

## DISSERTATION

Die Wirkung von antithrombotischen Substanzen auf die Plättchenfunktion während und nach der perkutanen Intervention mit Implantation von Koronarstents (PCI) und auf die Tissue Factor (TF) Expression.

Aus der Klinik für Kardiologie und Pulmologie Medizinische Klinik II  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Die Wirkung von antithrombotischen Substanzen auf die Plättchenfunktion während und nach der perkutanen Intervention mit Implantation von Koronarstents (PCI) und auf die Tissue Factor (TF) Expression.

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Wojciech Pepke

aus Wolsztyn/Polen

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. U. Rauch-Kröhnert

2. Prof. Dr. med. H. Völler

3. Priv.-Doz. Dr. med. C. Opitz

Datum der Promotion: 01.02.2013

1. Abstract	1
2. Einleitung und Zielsetzung	2
3. Methodik	3
4. Ergebnisse und Diskussion	5
5. Literaturverzeichnis	11
6. Anteilserklärung	13
7. Druckexemplare der ausgewählten Publikationen	
a. „Bivalirudin Inhibits Periprocedural Platelet Function and Tissue Factor Expression of Human Smooth Muscle Cells”	14
b. “Prolonged clopidogrel application reduces tissue factor expression after percutaneous coronary intervention in the porcine model”	23
c. “Role of the Phosphatidylinositol 3-Kinase/Protein Kinase B Pathway in Regulating Alternative Splicing of Tissue Factor mRNA in Human Endothelial Cells”	32
8. Curriculum vitae	40
9. Publikationsliste	42
10. Selbstständigkeitserklärung	43
11. Danksagung	44

## 1. Abstract

Die akute Stentthrombose stellt eine klinisch bedeutsame Komplikation nach perkutaner Koronarintervention mit Stentimplantation (PCI) dar. Eine effektive Hemmung der Plättchenfunktion bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung und PCI ist mit einer Reduktion von Stentthrombosen assoziiert und führt zu einer signifikant besseren klinischen Prognose nach der koronaren Intervention. Ziel der ersten Studie war es, die Wirkung von Bivalirudin auf die periprozedurale Plättchenfunktion im Vergleich zu der von unfraktioniertem Heparin zu erfassen. Ferner wurde die hemmende Wirkung von Bivalirudin auf die Expression von Tissue Factor (TF) in glatten Muskelzellen (SMC; Smooth Muscle Cells) nach deren Stimulation mit Thrombin bzw. Faktor VIIa/Faktor X untersucht. TF ist der Initiator des extrinsischen Gerinnungssystems und maßgeblich an der Entstehung von Thromben unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen beteiligt. In einer weiteren Studie wurde die Bedeutung von Clopidogrel auf vaskuläre TF-Expression nach PCI in einem Schweinmodell analysiert. Da die Regulation der TF-Isoformexpression auf zellulärer Ebene nur wenig erforscht ist, wurde in einem dritten Projekt die Rolle des Phosphatidylinositol 3-Kinase/Protein Kinase B Signalweges auf die Steuerung der alternativen Spleißprozesse der TF-prä-mRNA in humanen Endothelzellen (HUVEC) charakterisiert. Bivalirudin reduzierte signifikant die Agonist-induzierte Plättchenreaktivität nach PCI. Im direkten Vergleich zu unfraktioniertem Heparin (UFH) zeigte sich, dass die durch Adenosindiphosphat (ADP) und „*Thrombin Receptor Activating Peptide*“ (TRAP) induzierte Expression von Thrombospondin signifikant abfiel, wenn Bivalirudin während der PCI verwendet wurde. Im Gegensatz zu UFH reduzierte Bivalirudin auch die Expression von P-Selektin auf unstimulierten und ADP-stimulierten Plättchen. Die ADP-induzierte CD 63-Expression auf der Thrombozytenoberfläche war bei den mit Bivalirudin behandelten Patienten ebenfalls signifikant niedriger als bei den mit Heparin behandelten Patienten. Ferner ließ sich durch Bivalirudin die Thrombin-, jedoch nicht die Faktor VIIa/Faktor X-induzierte TF-Expression und -Prokoagulabilität der SMC hemmen. Im Tiermodell zeigte sich, dass eine verlängerte Gabe von Clopidogrel die koronare TF-Expression auf mRNA und Protein-Ebene signifikant verringerte und im Trend mit einem Abfall der im Blut zirkulierenden TF-Spiegel assoziiert war. Somit lässt sich vermuten, dass eine verlängerte Gabe von Clopidogrel möglicherweise das Risiko einer Spätthrombose nach PCI durch Reduktion der TF-Expression günstig beeinflusst. In abschließenden Untersuchungen ergab sich, dass der Phosphatidylinositol 3-Kinase/Protein Kinase B Signalweg das alternative Spleißen der TF prä-mRNA in humanen Endothelialzellen (HUVEC) differentiell beeinflusst.

## 2. Einleitung und Zielsetzung

Die perkutane koronare Intervention (PCI) ist mittlerweile die häufigste Therapie, welche Patienten mit höhergradigen Stenosierungen oder Okklusionen der Koronararterien bei koronarer Herzkrankheit (KHK) angeboten wird <sup>1</sup>. Zu der ausschlaggebenden Limitierung dieses therapeutischen Verfahrens mittels Stentimplantation gehören die Verletzungen der Koronararterien, die mit einer Exposition prothrombogener Substanzen aus der Gefäßwand verbunden sind <sup>2, 3</sup>. Eine Metaanalyse der CACHET, REPLACE-1, REPLACE-2, ACUITY und BAT Studien, in denen die Wirksamkeit und Sicherheit von Bivalirudin während PCI bei Akutem Koronarsyndrom (ACS) untersucht wurde, zeigte, dass die Therapie mit Bivalirudin der Therapie mit Heparin (UFH/LMWH) im Hinblick auf den Therapieerfolg nicht unterlegen war <sup>4, 5</sup>. Eine bedeutende klinische Komplikation nach Stentimplantation ist das Auftreten von Stentthrombosen <sup>2, 6</sup>. Glatte Muskelzellen (SMC; Smooth Muscle Cells) der Gefäßwand exprimieren konstitutiv Tissue Factor (TF) <sup>7</sup>. Thrombin induziert die Expression von TF und fördert damit die prothrombogene Aktivität der SMC noch zusätzlich <sup>8</sup>. Von SMC abstammender TF spielt eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Thromben <sup>7</sup>. Zwei Isoformen von TF werden durch humane glatte Muskelzellen exprimiert, nämlich eine membrangebundene fl-TF (full length TF) <sup>7</sup> und eine lösliche Form asHTF (alternativ gespleißter humaner TF (asHTF)) <sup>9</sup>. FITF, welcher auf der Membran der vaskulären Muskelzellen gebunden ist, und die freie Form asHTF tragen durch den Kontakt mit den im Blut zirkulierenden Bestandteilen der Koagulationskaskade zur Entstehung von Thromben bei <sup>10-15</sup>. TF ist ebenfalls in Plättchen zu finden <sup>16</sup>. Die Reduktion der Plättchendegranulation durch Clopidogrel kann die Ausschüttung von TF modulieren <sup>13, 17</sup>, was wiederum zu einer niedrigeren TF-Konzentration im Blut von Patienten mit KHK führte <sup>18</sup>. Die regulatorischen Kaskaden der differentiellen TF-Expression sind noch nicht vollständig erforscht. Bis heute ist nicht bekannt, welche SR Proteinkinasen an der Regulierung des TF-mRNA-Spleißens in endothelialen Zellen beteiligt sind. Das erste Ziel dieser Arbeit war es, die Wirkung von Bivalirudin auf die Agonist-induzierte Plättchenreaktivität im Vergleich zu unfraktioniertem Heparin (UFH) zu untersuchen. Des Weiteren wurde die Wirkung von Bivalirudin auf die Thrombin- und FVIIa/FX-induzierte Expression von TF und die prokoagulatorische Wirkung der membrangebundenen TF-Aktivität von SMC charakterisiert. Ferner wurde in einem Schweinmodell die Expression von TF in den Koronararterien nach PCI und im systemischen Blut unter der Medikation mit Clopidogrel in Abhängigkeit der Dauer dieser medikamentösen Behandlung untersucht. Ein weiteres Ziel bestand darin, die Bedeutung des PI3K/Akt-Signalweges auf die TF-Isoformexpression von humanen endothelialen Zellen zu erfassen.

### 3. Methodik

Achtundfünfzig Patienten mit KHK wurden in die Studie eingeschlossen. Alle Patienten wurden bereits vor der geplanten PCI dauerhaft mit Aspirin (100 mg/d) und Clopidogrel (75 mg/d) behandelt. Bei allen Patienten wurde während der Herzkatheteruntersuchung mindestens ein Stent (*Bare Metal Stent* oder *Drug Eluting Stent*) in eine Koronararterie implantiert. Die Patienten wurden in zwei Gruppen randomisiert: Die erste Gruppe (n=28) erhielt während der Prozedur Bivalirudin (BIVAL) (Bolus 0,75 mg/kg, dann Infusion 1,75 mg/kg/h für die Dauer der Untersuchung), der zweiten Gruppe (n=30) wurde unfractioniertes Heparin (UFH) verabreicht. Um eine *activated clotting time* (ACT) von 200 bis 300 Sekunden für die Dauer der Prozedur zu erreichen, wurde UFH intravenös als Bolus (60 bis 70 U/kg des Körpergewichtes) appliziert. Die Abnahme von arteriellem Blut erfolgte aus der femoralen Katheterschleuse unmittelbar vor der Verabreichung der antikoagulatorischen Medikation (Bivalirudin oder UFH). Eine zweite Blutprobe wurde nach der Stentimplantation, kurz bevor die Katheterschleuse entfernt wurde, gewonnen. Arteriell Blut wurde in Röhrchen mit „Acid Citrate Dextrose“ (ACD/1:7, Sigma) gesammelt. Nach der Zentrifugation mit 2600 rpm (Umdrehungen pro Minute) über 80 Sekunden wurde plättchenreiches Plasma isoliert und die gewonnenen Plättchen dann nochmals in ACD (1:7) gelöst. Als Nächstes folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt für die Dauer von 2 Minuten bei 3300 rpm. Das Pellet wurde dann in HEPES Tyrode Lösung (HEPES 5 mM, NaCl 134 mM, KCl 2,9 mM, NaHCO<sub>3</sub> 12 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,36 mM, Glucose 5 mM, Bovine Serum Albumine 0,5 mg/ml) resuspendiert. Die Konzentration der Plättchensuspension wurde auf 150000 Zellen/ $\mu$ l eingestellt. Kurz vor der Stimulation erfolgte eine Zugabe von Magnesium (MgCl<sub>2</sub> 200 mM) und Calcium (CaCl<sub>2</sub> 750 mM). Die Plättchen wurden dann für 5 Minuten mit ADP (20  $\mu$ M, Sigma) und TRAP (10  $\mu$ M, Calbiochem, SFLLRNPNDKYEPF) stimuliert. Eine Probe wurde unstimuliert belassen und diente als Kontrolle. Die Stimulation wurde durch die Fixierung in 2% Paraformaldehyd (PFA) gestoppt. Nach der Aktivierung wurden die Plättchen für die Dauer von 5 Minuten bei 2800 rpm zentrifugiert, dann gewaschen und schließlich die Membranproteine durch eine einstündige Inkubation mit Mouse IgG (unspezifische Bindung) und nachfolgend anhand von monoklonalen Antikörpern, die gegen P-Selektin (CD 62p), CD 63, CD 41 und Thrombospondin (TSP) (Coulter Immunotech) gerichtet waren, markiert. Anschließend wurden die oben genannten Antigene mit einem Fluorescein Isothiocyanat (F(ab)<sub>2</sub>-FITC) (Sigma)-gekoppelten Antikörper für eine halbe Stunde inkubiert. Schließlich wurde die Dichte der markierten Oberflächenproteine anhand eines Durchflusszytometers quantifiziert (FACScan, Becton Dickinson) <sup>19, 20</sup>. Nach Subtraktion der unspezifischen mit Mouse IgG assoziierten Immunfluoreszenz wurde die mit dem jeweiligen spezifischen Antikörper assoziierte Immunfluoreszenz als ein Median der Immunfluoreszenzintensität („arbitrary

unit“, AU) dargestellt, was der Dichte der gemessenen Oberflächenepitope auf den Plättchen entspricht.

In weiteren Versuchen wurden SMC in einem SMC-Medium von PromoCell (Heidelberg, Deutschland) - wie bereits publiziert - kultiviert <sup>7</sup>. Die SMC wurden mit 1,5 µg/ml BIVAL für 1 Stunde vorbehandelt. Danach folgte die Stimulation mit 1 U/ml Thrombin oder 80 nM FVIIa und 180 nM FX. Anschließend wurde die TF-Isoformexpression 2, 5 und 8 Stunden nach der Induktion auf mRNA-Ebene analysiert. Die Real-Time PCR wurde unter Verwendung von flTF-, asHTF- und GAPDH-spezifischen Primern, wie bereits publiziert, durchgeführt <sup>21</sup>. Dazu wurde zunächst die gesamte mRNA aus den SMC isoliert. Anschließend wurde 1µg mRNA revers transkribiert. In jeder Probe wurde die mRNA-Expression von flTF, asHTF und GAPDH bestimmt und eine Real-Time PCR durchgeführt. Die Messwerte wurden unter Einbeziehung der doppelsträngigen DNA Standards für flTF, asHTF und GAPDH anhand einer Standardkurve quantifiziert.

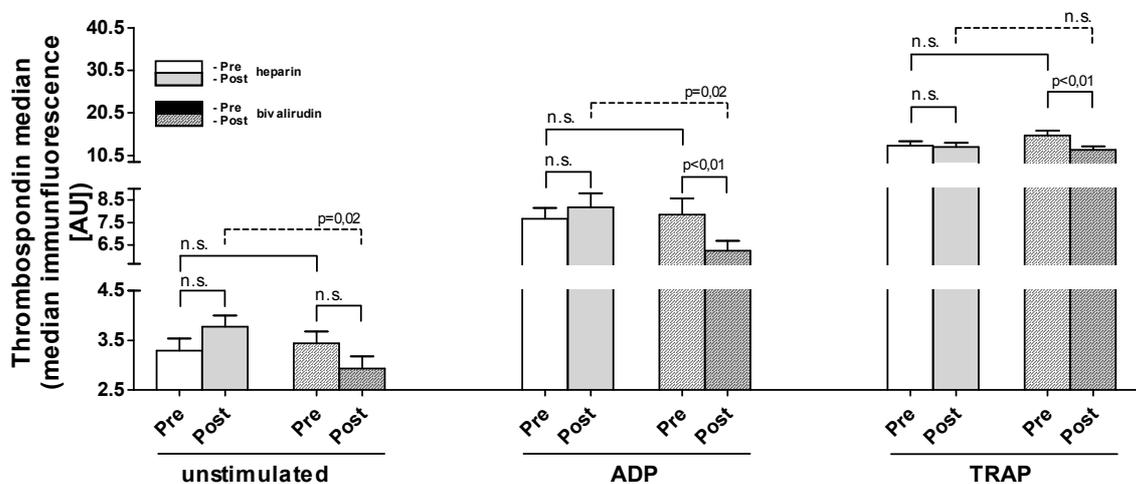
1x10<sup>5</sup> stimulierte und nicht stimulierte SMC wurden zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen. Anschließend erfolgte eine Inkubation bei 37°C mit 0,1 M n-octyl-β-D-Glycopyranosid in HEPES Puffer (10 mM HEPES, pH 7,5, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mg/mL BSA) für 15 Minuten, um die Zellen zu lysieren. 0,5 mM FXa Substrat (American Diagnostica) wurde zur jeder Probe gegeben. Der Anstieg der optischen Dichte (OD) wurde bei 405 nm für die Dauer von 30 Minuten mittels eines ELISA Plate Readers bei einer Temperatur von 37°C gemessen (Molecular Devices). Die TF-Aktivität wurde in Units anhand zuvor erstellter Standardkurve bestimmt.

In unserem Tiermodell wurden die Schweine mit Aspirin 325 mg/d und Clopidogrel 75 mg/d (initiale „loading Dosis“ 300 mg) behandelt und nachfolgend eine Ballondilatation (PTCA) durchgeführt. Zwei Schweine starben während der PTCA. Die Tiere wurden nach 24 Stunden (n=12), 1 Monat (n=12) und 3 Monaten (n=24) zur weiteren Untersuchung der Gewebe getötet. Umgehend nach Tötung der Tiere wurden die Herzen präpariert und in 4% Paraformaldehyd fixiert. Anschließend erfolgten die Analysen der TF und Fibrin/Fibrinogen-Expression in den Koronarien anhand von immunhistochemischen Untersuchungen, sowie eine Bestimmung der TF-Spiegel im Blut per ELISA. Ferner wurde die TF-Expression in den Koronarien auf mRNA-Ebene per Real-Time PCR (TaqMan) analysiert.

Die *in vitro* Untersuchungen zum Einfluss des PI3k/Akt-Signalweges waren so aufgebaut, dass humane Nabelschnur-Endothelzellen (HUVEC) mit 2,5 und 5 µmol/l des PI3k-Inhibitors (LY294002) für 1 Stunde präinkubiert wurden. Danach wurden die Zellen mit 10 ng/ml TNFα stimuliert. Der Einfluss der Inhibition auf die mRNA-Expression der beiden TF-Isoformen wurde 20 und 60 Minuten nach der Stimulation mit TNFα analysiert. Die Phosphorylierung verschiedener SR-Proteine wurde nach 5 Minuten bestimmt.

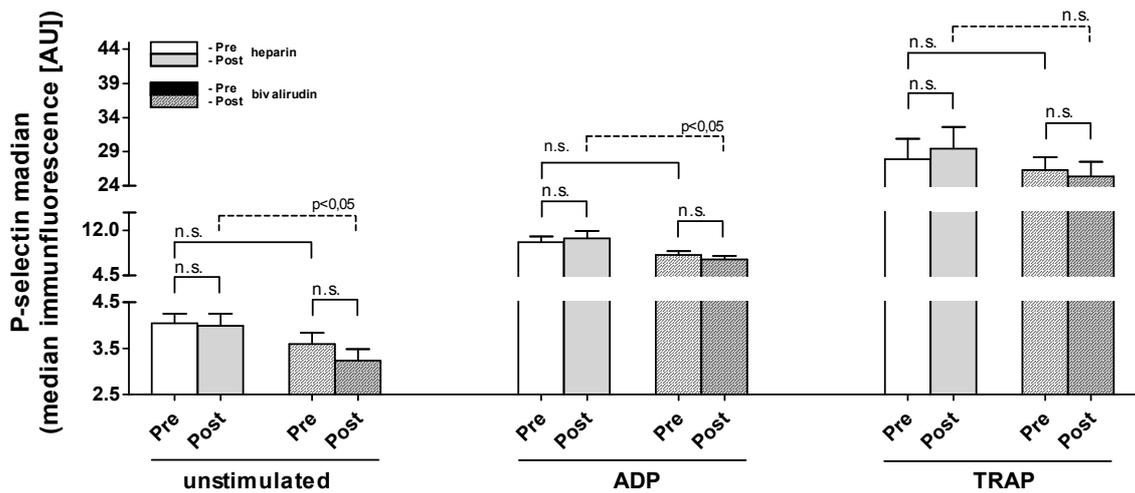
#### 4. Ergebnisse und Diskussion

Die Behandlung mit Bivalirudin reduzierte signifikant die durch Agonisten induzierte Reaktivität der Plättchen nach PCI (Abbildung 1). Die ADP- und TRAP-induzierte Thrombospondin-Expression nach PCI war signifikant geringer, wenn Bivalirudin im Vergleich während der Prozedur verabreicht wurde. Im Vergleich der beiden Gruppen direkt nach der Intervention fiel auf, dass die unstimulierte und ADP induzierte Plättchenreaktivität signifikant niedriger in der Bivalirudin-Gruppe als in der Heparin-Gruppe waren. Zwischen den beiden Gruppen ließen sich vor der Intervention keine Unterschiede in der Plättchenaktivität (Thrombospondin Expression) verzeichnen. Keine signifikanten Veränderungen der Expression von Thrombospondin zeigten sich in der Heparin-Gruppe im zeitlichen Verlauf vor und nach PCI.



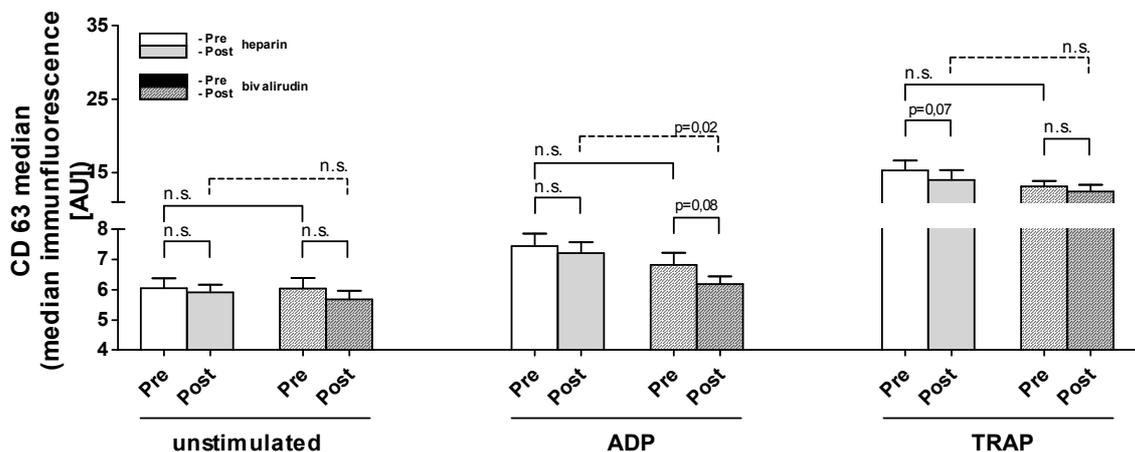
**Abbildung 1:** Wirkung von Bivalirudin und Heparin auf Plättchenexpression von Thrombospondin (TSP) bei Patienten mit stabiler koronarer Herzkrankheit (KHK). Verglichen wurden aus dem Blut isolierte Plättchen von Patienten vor und nach PCI. Die Daten sind als Mittelwert $\pm$ SEM dargestellt. AU, Arbitrary Units; n.s., nicht signifikant.

Im Vergleich von Bivalirudin mit UFH zeigte sich, dass die Behandlung mit Bivalirudin zu einer deutlichen Reduktion der P-Selektin-Dichte auf den unstimulierten und ADP-stimulierten Plättchen nach der PCI führte. Keine signifikante Reduktion der P-Selektin-Expression auf Plättchenoberfläche wurde innerhalb der Bivalirudin-Gruppe nach PCI im Vergleich zu den Basalwerten beobachtet. Es zeigte sich lediglich eine tendenzielle Reduktion der P-Selektin-Expression bei den unstimulierten Plättchen nach PCI, wenn Bivalirudin verabreicht wurde. In der UFH-Gruppe waren keine Unterschiede der P-Selektinexpression zu beobachten. Im Vergleich der beiden Gruppen vor UFH- bzw. Bivalirudin-Gabe ließen sich keine Unterschiede in der P-Selektin-Expression auf unstimulierten, ADP-induzierten oder TRAP-induzierten Plättchen nachweisen (Abbildung 2).



**Abbildung 2:** Wirkung von Bivalirudin und Heparin auf Plättchenexpression von P-Selektin bei Patienten mit stabiler koronarer Herzkrankheit (KHK). Verglichen wurden Plättchen aus dem Blut der Patienten vor und nach PCI. Die Daten sind als Mittelwert±SEM dargestellt. AU, Arbitrary Units; n.s., nicht signifikant.

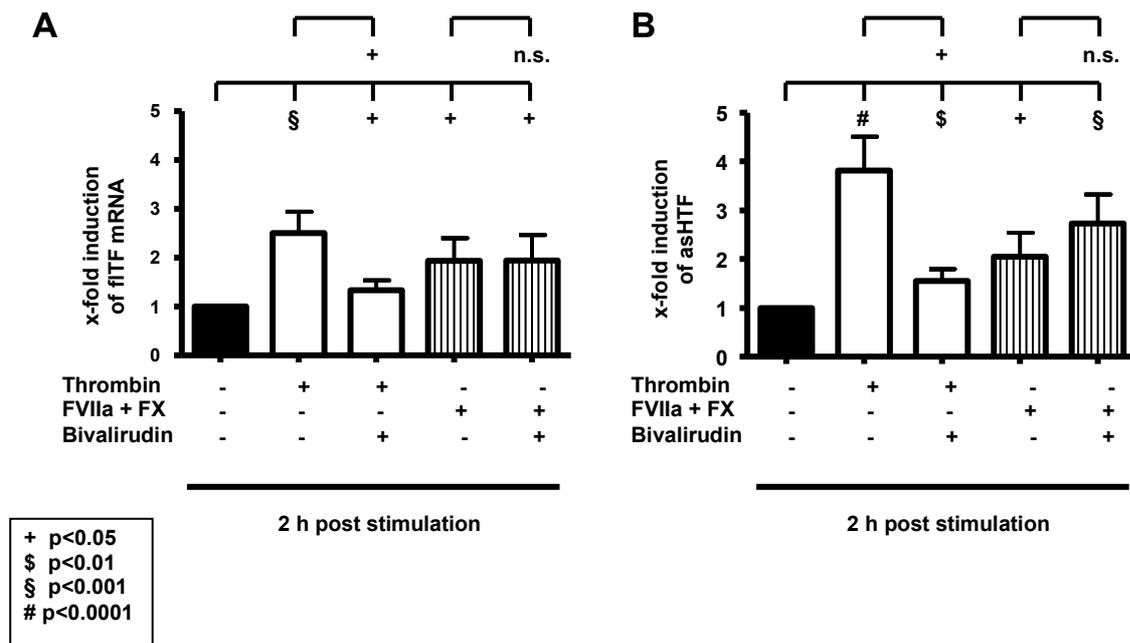
Die Behandlung mit Bivalirudin führte im Trend zu einer Reduktion der basalen sowie der ADP-induzierten CD 63-Expression auf der Plättchenoberfläche. Die ADP-induzierte CD-63 Expression auf Plättchen war signifikant niedriger in der Bivalirudin-Gruppe als in der UFH-Gruppe nach PCI (Abbildung 3). Die Expression von CD 63 auf unstimulierten und TRAP-induzierten Plättchen war nach der PCI in beiden Gruppen vergleichbar. Vor Gabe der Studienmedikation ergaben sich keine signifikanten Unterschiede der CD 63 Expression auf unstimulierten, ADP- und TRAP-induzierten Plättchen.



**Abbildung 3:** Wirkung von Bivalirudin und Heparin auf Plättchenexpression von CD 63 bei Patienten mit stabiler koronarer Herzkrankheit (KHK). Verglichen wurden Plättchen aus dem Blut der Patienten vor und nach PCI. Die Daten sind als Mittelwert±SEM dargestellt. AU, Arbitrary Units; n.s., nicht signifikant.

Nicht behandelte SMC exprimieren konstitutiv fITF und asHTF. Die Stimulation der SMC mit Thrombin führte - ebenso wie die Stimulation mit FVIIa/FX - zu einer Erhöhung der TF-Isoformexpression auf mRNA-Ebene (Abbildung 4A und B). Die Vorbehandlung der SMC mit 1,5 µg/ml Bivalirudin inhibierte die Thrombin-induzierte Expression von fITF und asHTF. Im Gegensatz zur Thrombin-induzierten TF-Isoform-Expression beeinflusste die

Behandlung mit Bivalirudin nicht die FVIIa/FX-induzierte Expression von fITF und asHTF in SMC.

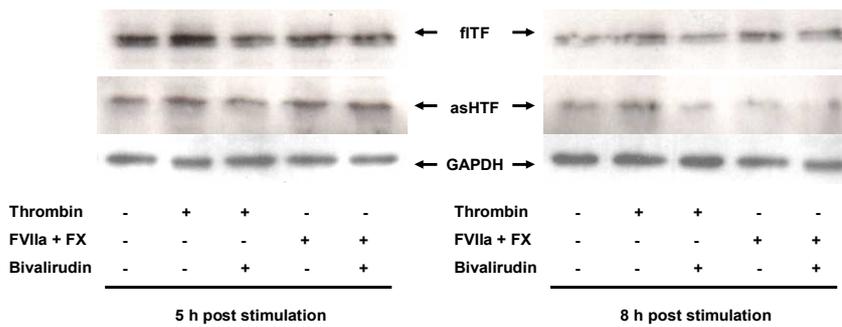


**Abbildung 4:** Gezeigt ist die Rate der mRNA Expression von TF Isoformen normalisiert mit GAPDH, 2 Stunden nach Stimulierung jeweils mit Thrombin und FVIIa/FX. (A) fITF mRNA Expression in nicht behandelten Zellen, Thrombin stimulierten SMC, Thrombin induzierten Zellen nach Vorbehandlung mit Bivalirudin und FVIIa/FX induzierten SMC, FVIIa/FX stimulierten Zellen nach Vorbehandlung mit Bivalirudin. (B) asHTF mRNA Expression. Die Daten sind als Mittelwert±SEM dargestellt. (+) p<0.05; (\$) p<0.01; (§) p<0.001; (#) p<0.0001; (n.s.) kein signifikanter Unterschied.

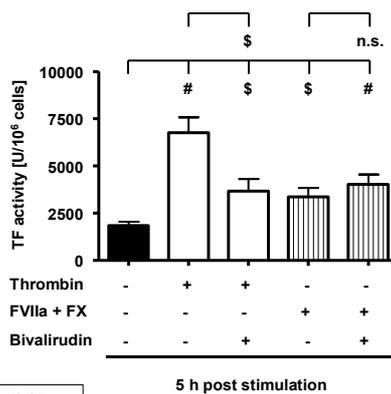
Western Blot Analysen wurden durchgeführt, um den Effekt von Bivalirudin auf die Proteinexpression der beiden TF-Isoformen nach Stimulation mit Thrombin- oder FVIIa/FX zu bestimmen. Die Proteinexpression von fITF und asHTF war 5 und 8 Stunden nach Stimulation sowohl mit Thrombin, als auch mit FVIIa/FX deutlich erhöht. Die Vorbehandlung der Zellen mit 1,5 µg/ml Bivalirudin reduzierte die Expression von fITF und asHTF 5 und 8 Stunden nach der Thrombin-Inhibition. Im Gegensatz dazu besaß Bivalirudin keinen Einfluss auf die FVIIa/FX-induzierte Erhöhung der TF-Protein-Isoformen (Abbildung 5A).

Um die Wirkung von Bivalirudin auf die prokoagulatorische Aktivität von SMC zu untersuchen, wurde ein chromogener TF-Assay, in dem die TF-induzierte Entstehung von Faktor Xa gemessen wird, durchgeführt. 5 und 8 Stunden nach Stimulation der Zellen mit Thrombin oder FVIIa/FX stieg die TF Aktivität signifikant an. Übereinstimmend mit den Ergebnissen der Proteinexpression (Abbildung 5A) führte die Vorbehandlung der SMC mit Bivalirudin zu einer Verringerung der Thrombin-induzierten TF-Aktivität nach 5 Stunden (Abbildung 5B) und 8 Stunden (Abbildung 5C). Im Gegensatz zur Thrombin-induzierten TF-Aktivitätserhöhung zeigt sich, dass die Behandlung mit Bivalirudin keinen Einfluss auf den FVIIa/FX-induzierten Anstieg der prokoagulatorischen TF-Aktivität in SMC besaß.

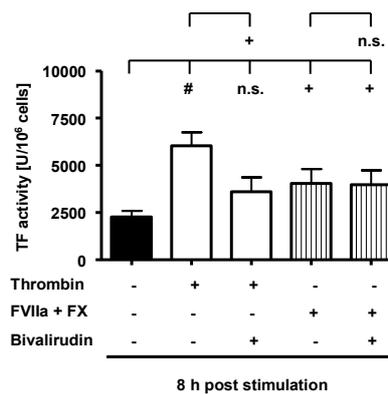
**A**



**B**



**C**



+ p<0.05  
\$ p<0.01  
§ p<0.001  
# p<0.0001

**Abbildung 5:** (A) Western Blots, welche die Protein Expression von fITF (47kD), asHTF (30kD) und GAPDH (37 kD) in humanen SMC 5 Stunden und 8 Stunden nach der Stimulation mit Thrombin oder FVIIa/FX zeigen. Gezeigt sind unbehandelte Kontrollproben, Thrombin-induzierte SMC und Thrombin-stimulierte Zellen, die mit Bivalirudin vorbehandelt sind, FVIIa/FX-induzierte SMC und FVIIa/FX-stimulierte Zellen, die mit Bivalirudin vorbehandelt wurden. (B, C) TF-Aktivität 5 Stunden (B) und 8 Stunden (C) nach der Stimulation mit Thrombin oder FVIIa/FX. Die Daten sind als arbiträre Einheit (arbitrary units) der TF-Aktivität je  $10^6$  Zellen und als Mittelwert $\pm$ SEM dargestellt. (+) p<0,05; (\$) p<0,01; (§) p<0,0001; (n.s.) kein signifikanter Unterschied.

In unserer zweiten Studie zeigte sich, dass eine drei-monatige im Vergleich zur ein-monatigen Clopidogrelapplikation zu einer signifikanten Reduktion der TF-Expression in den Koronararterien führte (Clopidogrel Gruppe  $8,975\pm 3,947\%$  vs. Kontrollgruppe  $26,44\pm 5,375\%$ , p=0,007). Der Spiegel zirkulierenden TF Proteins war drei Monate nach PCI tendenziell niedriger als ein Monat nach PCI, wenn die Medikation mit Clopidogrel für drei Monate fortgeführt wurde (Clopidogrel Gruppe  $488,3\pm 35,37$  pg/ml vs. Kontrollgruppe  $572,3\pm 39,9$  pg/ml, p=0,130).

In unserer dritten Studie zeigte sich, dass eine Inhibition des PI3K/Akt Signalweges durch LY294002 (1-5  $\mu$ M) die mRNA-Expression von asHTF, nicht aber von fITF reduzierte. Eine Hemmung von NF $\kappa$ B führte zur Absenkung der Expression beider Isoformen. Des Weiteren beeinflusste die Inhibition des PI3k/Akt-Signalweges die Phosphorylierung der SR-Proteine SRp75, SRp55 und SRp30a. Die pharmakologische Hemmung von NF $\kappa$ B modulierte diese Phosphorylierung hingegen nicht.

Die Ergebnisse der ersten Studie zeigten, dass 1) Bivalirudin signifikant die intraprozedurale-Agonist-induzierte Thrombozytenreaktivität hemmt, 2) UFH mit einer erhöhten Plättchenreaktivität nach PCI assoziiert ist, und 3) Bivalirudin die Thrombin-induzierte TF-Isoform-Expression verringert und damit die Prokoagulabilität humaner SMC *in vitro* hemmt. Bivalirudin, ein Abkömmling von Hirudin, ist ein direkter, bivalenter und reversibler Thrombinhemmer. Im Gegensatz zu Heparin kann Bivalirudin die Wirkung des Thrombinkoagulates neutralisieren. Es braucht dabei keinen Co-Faktor, kann nicht durch zirkulierende Inhibitoren inaktiviert werden und bindet nicht an Plasmaproteine oder aktivierte Plättchen <sup>22</sup>. Im Gegensatz zu Heparin ist die inhibitorische Wirkung von Bivalirudin auf Thrombin reversibel, was durch die kurze Halbwertszeit des Medikamentes bedingt ist <sup>4,22</sup>. Es wurde bereits gezeigt, dass Bivalirudin das Risiko einer Ischämie reduziert, während das Risiko einer ernsthaften Nachblutung nach koronarer Intervention während der ersten 30 Tage gesenkt wird <sup>23</sup>. Eine Meta-Analyse von BAT, CACHET, REPLACE-1 and REPLACE-2 zeigte, dass Todesfälle durch schwerwiegende Blutungen deutlich seltener in der Bivalirudin Gruppe auftraten <sup>23</sup>. *Busch et al.* konnte nachweisen, dass Bivalirudin die Aktivierung von zirkulierenden Plättchen und Monozyten nach PCI hemmt <sup>24</sup>. In unserer Studie führte Bivalirudin im Vergleich zur UFH zu einer Verringerung der Agonist-induzierten Plättchenreaktivität nach PCI. Die HORIZON-AMI-Studie zeigte, dass Bivalirudin während der ersten 30 Tage nach PCI die Komplikationsrate der ernsthaften Blutungen reduzierte und die Überlebensrate erhöhte, im Vergleich zur Behandlung mit Heparin und Glycoprotein IIb/IIIa Hemmer bei Patienten mit ST Elevationsmyokardinfarkt (STEMI) sowie primärer PCI und Stentimplantation. Hingegen war die Rate der Stentthrombosen innerhalb der ersten 24 Stunden nach der Versorgung in der Bivalirudin Gruppe erhöht <sup>25</sup>. Wir beobachteten, dass die durch Agonisten induzierte Plättchenreaktivität unmittelbar nach Gabe von Bivalirudin signifikant erniedrigt war. Aufgrund der kurzen Halbwertszeit kann jedoch eine überschießende Plättchenreaktivität nach Nachlassen der Bivalirudin-Wirkung nicht ausgeschlossen werden.

In unseren *in vitro*-Versuchen zeigte sich, dass die Vorbehandlung der SMC mit pharmakologischen Konzentrationen an Bivalirudin die Thrombin-induzierte, nicht aber die FVIIa/FX-induzierte TF-Expression inhibierte. SMC exprimieren konstitutiv beide TF-Isoformen. F1TF spielt eine wichtige Rolle bei der Entstehung einer Thrombose <sup>7</sup>. Neben der Aktivierung von Plättchen <sup>26</sup> induzierte Thrombin auch die Expression von prokoagulativ-wirksamen TF in SMC <sup>8</sup>, was die TF-vermittelte Entstehung von aktiviertem Faktor X steigerte <sup>7</sup>. FVIIa/FX trägt zu einer erhöhten TF-Expression über Aktivierung des PAR2-Signaltransduktionsweges bei <sup>27</sup>. Wir konnten zeigen, dass Bivalirudin zur Reduktion der durch Thrombin induzierten TF-Expression führte. Diese Daten stimmen mit den Ergebnissen

von *Chen et al.* überein. Darin wird beschrieben, dass Hirulog-ähnliche Peptide eine Reduktion der TF-Expression in der Karotiswand von Kaninchen mit Arteriosklerose bewirkten<sup>28</sup>. Die FVIIa/FX-induzierte TF-Expression und Aktivität wurde in dieser Arbeit durch Bivalirudin nicht beeinflusst. Dies deutet möglicherweise darauf hin, dass die Induktion der TF-Expression durch FVIIa/FX über den PAR-2-Signalweg vermittelt wird und unabhängig von der Thrombin-Funktion stattfindet<sup>27</sup>. Auf diese Weise wäre es möglich, dass Bivalirudin selektiv die Thrombin-induzierte TF-Expression und zelluläre Prokoagulabilität hemmt, so dass Thrombin-unabhängige Signalwege nicht beeinflusst werden.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass Bivalirudin als ein direkter Thrombinhemmer die Agonist-induzierte Plättchenreaktivität und die Thrombin induzierte TF-Isoform-Expression in SMC senkt. Die Daten des Tierversuches ergaben, dass die vaskuläre Expression von TF zu einer erhöhten Thrombogenität der Koronarien und des Blutes führte und eine verlängerte Clopidogrelgabe die TF-Expression in den Koronararterien reduzierte. Des Weiteren zeigte sich, dass der PI3K/Akt-Signalweg zumindest teilweise an der differenzierten Expression der TF-Isoformen durch die Regulation alternativer Spleißprozesse beteiligt war. Dies wurde vermutlich über die Regulation der Phosphorylierung von SRp75, SRp55 und SF2/ASF in TNF- $\alpha$  induzierten humanen endothelialen Zellen gesteuert. Diese Ergebnisse tragen zu einem besseren Verständnis der Regulation des alternativen Spleißens der TF-prä-mRNA und der TNF- $\alpha$  vermittelten TF-Expression und -Prokoagulabilität in humanen Endothelzellen bei.

Die Resultate dieser Arbeit demonstrieren, dass die intraprozedurale Verabreichung von Bivalirudin mit einer im Vergleich zu UFH signifikant besseren Plättchenfunktionshemmung assoziiert ist. Eine effektivere Hemmung der Plättchenreaktivität und der vaskulären TF-Isoform-Expression sowie -Prokoagulabilität könnte möglicherweise die unter Bivalirudin beobachtete Reduktion der Thrombogenität erklären. Da eine dreimonatige Therapie mit Clopidogrel nach PCI die TF-Expression in den Koronararterien signifikant reduzierte und den Spiegel des im Blut zirkulierenden TF tendenziell verringerte, könnte möglicherweise hierdurch auch das Risiko einer Spätthrombose beeinflusst werden. Ferner zeigte sich, dass das alternative Spleißen der TF-Isoformen auf post-transkriptioneller Ebene durch den PI3K/Akt-Signalweg moduliert wird und sich hierdurch die Prokoagulabilität von endothelialen Zellen differentiell beeinflussen lässt.

## 5. Literatur

1. Silber S, Hoffmeister HM, Bode C. [Optimal platelet inhibition after coronary stent implantation. Current status]. *Herz* 2008;33:244-53.
2. Rutsch W, Glicch V, Dubel HP, et al. [Standards in interventional therapy of coronary artery disease]. *Herz* 2002;27:481-501.
3. Kwaijtaal M, van Diest R, Bar FW, et al. Inflammatory markers predict late cardiac events in patients who are exhausted after percutaneous coronary intervention. *Atherosclerosis* 2005;182:341-8.
4. Lincoff AM, Kleiman NS, Kottke-Marchant K, et al. Bivalirudin with planned or provisional abciximab versus low-dose heparin and abciximab during percutaneous coronary revascularization: results of the Comparison of Abciximab Complications with Hirulog for Ischemic Events Trial (CACHET). *Am Heart J* 2002;143:847-53.
5. Lincoff AM, Bittl JA, Kleiman NS, et al. Comparison of bivalirudin versus heparin during percutaneous coronary intervention (the Randomized Evaluation of PCI Linking Angiomax to Reduced Clinical Events [REPLACE]-1 trial). *Am J Cardiol* 2004;93:1092-6.
6. Shah SH, Hauser ER, Crosslin D, et al. ALOX5AP variants are associated with in-stent restenosis after percutaneous coronary intervention. *Atherosclerosis* 2008;201:148-54.
7. Eisenreich A, Celebi O, Goldin-Lang P, Schultheiss HP, Rauch U. Upregulation of tissue factor expression and thrombogenic activity in human aortic smooth muscle cells by irradiation, rapamycin and paclitaxel. *Int Immunopharmacol* 2008;8:307-11.
8. Wu SQ, Aird WC. Thrombin, TNF-alpha, and LPS exert overlapping but nonidentical effects on gene expression in endothelial cells and vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005;289:H873-85.
9. Eisenreich A, Bogdanov VY, Zakrzewicz A, et al. Cdc2-like kinases and DNA topoisomerase I regulate alternative splicing of tissue factor in human endothelial cells. *Circ Res* 2009;104:589-99.
10. Rauch U, Nemerson Y. Circulating tissue factor and thrombosis. *Curr Opin Hematol* 2000;7:273-7.
11. Szotowski B, Antoniak S, Poller W, Schultheiss HP, Rauch U. Procoagulant soluble tissue factor is released from endothelial cells in response to inflammatory cytokines. *Circ Res* 2005;96:1233-9.
12. Bogdanov VY, Balasubramanian V, Hathcock J, Vele O, Lieb M, Nemerson Y. Alternatively spliced human tissue factor: a circulating, soluble, thrombogenic protein. *Nat Med* 2003;9:458-62.
13. Rauch U, Bonderman D, Bohrmann B, et al. Transfer of tissue factor from leukocytes to platelets is mediated by CD15 and tissue factor. *Blood* 2000;96:170-5.
14. Giesen PL, Rauch U, Bohrmann B, et al. Blood-borne tissue factor: another view of thrombosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:2311-5.
15. Eisenreich A, Malz R, Pepke W, et al. Role of the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway in regulating alternative splicing of tissue factor mRNA in human endothelial cells. *Circ J* 2009;73:1746-52.
16. Escolar G, Lopez-Vilchez I, Diaz-Ricart M, White JG, Galan AM. Internalization of tissue factor by platelets. *Thromb Res* 2008;122 Suppl 1:S37-41.
17. Xiao Z, Theroux P. Clopidogrel inhibits platelet-leukocyte interactions and thrombin receptor agonist peptide-induced platelet activation in patients with an acute coronary syndrome. *J Am Coll Cardiol* 2004;43:1982-8.
18. Stellbaum C, Willich T, Boltzen U, et al. Clopidogrel-mediated reduction of circulating tissue factor in patients with stable coronary artery disease. *Eur J Haematol* 2007;78:347-52.

19. Piorkowski M, Weikert U, Schwimbeck PL, Martus P, Schultheiss HP, Rauch U. ADP induced platelet degranulation in healthy individuals is reduced by clopidogrel after pretreatment with atorvastatin. *Thromb Haemost* 2004;92:614-20.
20. Weikert U, Kuhl U, Schultheiss HP, Rauch U. Platelet activation is increased in patients with cardiomyopathy: myocardial inflammation and platelet reactivity. *Platelets* 2002;13:487-91.
21. Szotowski B, Goldin-Lang P, Antoniak S, et al. Alterations in myocardial tissue factor expression and cellular localization in dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 2005;45:1081-9.
22. Gurm HS, Bhatt DL. Thrombin, an ideal target for pharmacological inhibition: a review of direct thrombin inhibitors. *Am Heart J* 2005;149:S43-53.
23. Ebrahimi R, Lincoff AM, Bittl JA, et al. Bivalirudin vs heparin in percutaneous coronary intervention: a pooled analysis. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 2005;10:209-16.
24. Busch G, Steppich B, Sibbing D, et al. Bivalirudin reduces platelet and monocyte activation after elective percutaneous coronary intervention. *Thromb Haemost* 2009;101:340-4.
25. Mehran R, Lansky AJ, Witzenbichler B, et al. Bivalirudin in patients undergoing primary angioplasty for acute myocardial infarction (HORIZONS-AMI): 1-year results of a randomised controlled trial. *Lancet* 2009;374:1149-59.
26. Rauch U, Osende JJ, Fuster V, Badimon JJ, Fayad Z, Chesebro JH. Thrombus formation on atherosclerotic plaques: pathogenesis and clinical consequences. *Ann Intern Med* 2001;134:224-38.
27. Petersen LC. Microarray studies of factor VIIa-activated cancer cells. *Thromb Res* 2008;122 Suppl 1:S11-3.
28. Chen X, Ren S, Ma MG, et al. Hirulog-like peptide reduces restenosis and expression of tissue factor and transforming growth factor-beta in carotid artery of atherosclerotic rabbits. *Atherosclerosis* 2003;169:31-40.

## 6. Anteilserklärung

Herr Wojciech Pepke hatte folgenden Anteil an den vorgelegten Publikationen:

- 1) **Autoren:** Wojciech Pepke, Andreas Eisenreich, Markus Jaster, Ronny Malz, Yunus Ayril, Alexander Mayer; Heinz-Peter Schultheiss, Ursula Rauch.  
**Titel:** Bivalirudin inhibits peri-procedural platelet function and tissue factor expression of human smooth muscle cells.  
**Zeitschrift und Erscheinungsjahr:** Cardiovascular Therapeutics, 2011 Dec 29. doi: 10.1111/j.1755-5922.2011.00305.x. [Epub ahead of print]

Impact Factor: 2.183

Anteilsnahme: 50%

Beitrag im Einzelnen: Zytometrische Messung der Plättchenaktivität, real-Time PCR, Western Blots.

- 2) **Autoren:** Ayril Y, Rauch U, Goldin-Lang P, Eisenreich A, **Pepke W**, Deiner C, Schwimmbeck PL, Schultheiss HP, Pels K.  
**Titel:** Prolonged clopidogrel application reduces tissue factor expression after percutaneous coronary intervention in the porcine model.  
**Zeitschrift und Erscheinungsjahr:** Cardiovasc Revasc Med. 2011 Jan-Feb;12(1):47-55.

\*SCImago Journal Rank 0,149

Anteilsnahme: 15%

Beitrag im Einzelnen: Beteiligung und Durchführung der perkutanen Intervention bei den Schweinen, Präparation der Proben.

- 3) **Autoren:** Eisenreich A, Malz R, **Pepke W**, Ayril Y, Poller W, Schultheiss HP, Rauch U.  
**Titel:** Role of the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway in regulating alternative splicing of tissue factor mRNA in human endothelial cells.  
**Zeitschrift und Erscheinungsjahr:** Circ J. 2009 Sep;73(9):1746-52. Epub 2009 Jul 13.

Impact Factor: 3.225

Anteilsnahme: 20%

Beitrag im Einzelnen: Zellkulturversuche, Durchführung der Real-time PCR

\*siehe unter <http://www.scimagojr.com/index.php>

Berlin, den 19.06.2012

Unterschrift des Doktoranden

**8. Lebenslauf:**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

## 9. Publikationsliste:

### Originalarbeiten:

- 1) Bivalirudin inhibits peri-procedural platelet function and tissue factor expression of human smooth muscle cells.  
**Pepke W**, Eisenreich A, Jaster M, Malz R, Ayrál Y, Mayer A, Schultheiss HP, Rauch U.  
Cardiovascular Therapeutics, 2011 Dec 29. doi: 10.1111/j.1755-5922.2011.00305.x.  
[Epub ahead of print]
- 2) Prolonged clopidogrel application reduces tissue factor expression after percutaneous coronary intervention in the porcine model.  
Ayrál Y, Rauch U, Goldin-Lang P, Eisenreich A, **Pepke W**, Deiner C, Schwimbeck PL, Schultheiss HP, Pels K.  
Cardiovasc Revasc Med. 2011 Jan-Feb;12(1):47-55.
- 3) Role of the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway in regulating alternative splicing of tissue factor mRNA in human endothelial cells.  
Eisenreich A, Malz R, **Pepke W**, Ayrál Y, Poller W, Schultheiss HP, Rauch U.  
Circ J. 2009 Sep;73(9):1746-52. Epub 2009 Jul 13.

### Abstrakts:

- 1) 2010: 76. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie in Mannheim  
  
Reduction of platelet reactivity by bivalirudin post coronary intervention.  
Rauch U, **Pepke W**, Stellbaum C, Ayrál Y, Knie W, Jaster M, Morguet AJ, Witzenbichler B, Schultheiss HP (2010)
- 2) 2008: 52. Jahrestagung der Gesellschaft für Thrombose- und Hämostaseforschung e.V.  
  
Inadequate inhibition of platelet reactivity after early coronary stent occlusion despite triple antithrombotic therapy.  
**Pepke W**, Ayrál Y, Jaster M, Knie W, Pauschinger M, Schultheiss HP, Rauch U (2008)
- 3) 2007: 73. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie in Mannheim  
  
Dual antiplatelet therapy does not inhibit the thrombin-induced platelet degranulation in patients with early complications post PCI.  
**Pepke W**, Ayrál Y, Morguet A, Jaster M, Schultheiss HP, Rauch U (2007)

## **10. Selbstständigkeitserklärung**

### **Erklärung**

„Ich, Wojciech Pepke geb. 27.02.1981, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Die Wirkung von antithrombotischen Substanzen auf die Plättchenfunktion während und nach der perkutanen Intervention mit Implantation von Koronarstents (PCI) und auf die Tissue Factor (TF) Expression“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift

## **11. Danksagung**

### **Danksagung**

Ich danke Frau Prof. Dr. med Ursula Rauch-Kröhnert sowie ihren Mitarbeitern, die mir stets Ansprechpartner waren und mein Forschungsprojekt durch ihre Ideen, ihre Anregungen und ihre konstruktive Kritik bereicherten.