

Aus dem Institut für Klinische Chemie der
Ludwig-Maximilians-Universität München
Komm. Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h.c. D. Seidel

**Die Beteiligung des intravaskulären TF-Systems an der Aktivierung
der Blutgerinnung durch atherosklerotische Plaques**

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

vorgelegt von
Christine Götz
aus
München
2007

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. B. Engelmann

Mitberichterstatter: Prof. Dr. P.C. Weber
Prof. Dr. K. Parhofer

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. S. Dlugai

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 06.12.2007

Inhaltsverzeichnis	1
Abkürzungsverzeichnis	4
I. Einleitung	6
I.1. Bedeutung der Atherosklerose	6
I.2. Atherogenese	6
I.3. Plaqueruptur	9
I.4. Atherothrombose	11
I.4.1. Blutgerinnungssystem	11
I.4.2. Mechanismen der Plättchenadhäsion, -aktivierung und -aggregation	14
I.4.3. Auslöse- und Verstärkermechanismen der Thrombusbildung	15
I.4.3.1. Einfluss der Plaquekomponenten auf die Gerinnungsaktivierung	15
I.4.3.2. Die Bedeutung des intravaskulären TF	17
I.5. Zielsetzung	18
II. Material und Methoden	19
II.1. Material	19
II.1.1. Chemikalien, Lösungsmittel und Fertiglösungen	19
II.1.2. Antikörper, Inhibitoren, Proteasen, Gerinnungsfaktoren und Substrate	19
II.1.3. Puffer	20
II.1.4. Materialien und Geräte	21
II.2. Methoden	23
II.2.1. Gewinnung des Lipidkerns atherosklerotischer Plaques	23
II.2.1.1. Bestimmung des TF-Gehaltes der Plaques	24
II.2.1.1.1. Proteinextraktion	24
II.2.1.1.2. Double-Sandwich-ELISA zur TF-Gehalt Bestimmung	24

II.2.2. Blut- und Zellpräparation	25
II.2.2.1. Präparation von plättchenreichem bzw. plättchenarmen Plasma	26
II.2.2.2. Blutzellisolierung	26
II.2.2.2.1. Thrombozytenisolierung	26
II.2.2.2.2. Bestimmung der Zellzahl und Zellviabilität	26
II.2.2.3. Mikropartikelgewinnung	27
II.2.3. Thrombelastographie	27
II.2.3.1. Versuchsprotokoll: Einsatz von Antikörpern im TEG	29
II.2.3.2. Versuchsprotokoll: Einsatz von MP im TEG	30
II.2.4. Faktor Xa Bildung	30
II.2.4.1. Versuchsprotokoll: Coatingversuche mit Anti-TF Antikörper VIC7	31
II.2.5. Lipidextraktion	33
II.2.6. Proteinbestimmung mit der BCA-Methode	34
II.2.7. Statistik	34
III. Ergebnisse	35
III.1. Der Lipidkern atherosklerotischer Plaques führt konzentrationsabhängig zur Gerinnungsaktivierung	35
III.2. Die plaqueinduzierte Gerinnungsaktivierung ist abhängig von den Thrombozyten	37
III.3. Die Gerinnungsaktivierung durch atherosklerotische Plaques ist abhängig von TF	40
III.4. TF-Gehalt der Lipidkerne atherosklerotischer Plaques	43
III.5. Atherosklerotische Plaques führen durch eine Thrombozytenaktivierung zu einer Steigerung der TF Aktivität	44
III.6. MP steigern die TF Aktivität in Gegenwart plaquestimulierter Thrombozyten	47
III.7. Die prokoagulatorische Aktivität von TF ist abhängig von einer PS-reichen Zelloberfläche	49
III.8. Atherosklerotische Plaques führen zur Aktivierung des intravaskulären TF	50

III.9. Lipidphase und wässrige Phase atherosklerotischer Kernregionen tragen zur Gerinnungsaktivierung bei	51
IV. Diskussion	53
IV.1. Gerinnungsaktivierung im Rahmen der Atherothrombose	53
IV.2. Plaque-TF	54
IV.3. Pathologische Bedeutung von intravaskulärem TF	55
IV.4. Die Bedeutung des thrombozytären TF für die pathologische Gerinnungsaktivierung	56
IV.5. Die Bedeutung des MP-TF für die pathologische Gerinnungsaktivierung	60
IV.6. Ausblick	62
V. Zusammenfassung	63
VI. Literaturverzeichnis	64
VII. Anhang	83
VII.1. Danksagung	83
VII.2. Lebenslauf	84

Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
Ak	Antikörper
APC	aktiviertes Protein C
ASS	Acetylsalizylsäure
ATP	Adenosintriphosphat
BHT	butyliertes Hydroxytoluen
BSA	Bovines Serum Albumin
CCA	Arteria carotis communis
CD	cluster of differentiation
CFT	clot formation time
CR	core region
CT	clotting time
CTI	corn trypsin inhibitor
DCF	5-carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester
DIT	diffuse intimal thickening
ECA	Arteria carotis externa
EDTA	Ethylendiamin-N, N, N, N-tetraessigsäure
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
EPR-1	effector cell protease receptor-1
ET 1	Endothelin 1
F	Faktor
FDP	fibrin degrading product
GP	Glykoprotein
HMWK	high molecular weight kininogen
ICA	Arteria carotis interna
ICAM	intercellular adhesion molecules
IL	Interleukin
mAk	monoklonaler Antikörper
LDL	low density lipoprotein
MCF	maximum clot firmness
MCP-1	monocyte chemotactic protein-1
MCSF	macrophage colony stimulating factor
MMP	Matrixmetalloproteinase
MP	Mikropartikel
mRNA	messenger RNA
NFκB	nukleärer Faktor kappa B
NI	normale Intima
NO	Stickstoffmonoxid
oxLDL	oxidiertes low density lipoprotein
PAI-1	plasminogen activator inhibitor
PAP	plättchenarmes Plasma
PAR	protease activated receptor
PBS	phosphate-buffered saline
PDGF	platelet derived growth factor
PGI ₂	Prostacyclin
PL	Homogenat des atherosklerotischen Lipidkerns
PRP	plättchenreiches Plasma
PS	Phosphatidylserin
PSGL 1	P-Selektin Glykoprotein Ligand 1

SRBI	scavenger receptor BI
SMC	smooth muscle cell
T	Thrombozyten
TBS	tris buffered saline
TEG	Thrombelastographie
TFPI	tissue factor pathway inhibitor
TNF α	Tumornekrosefaktor α
TF	tissue factor
tPA	tissue plasminogen activator
TxA ₂	Thromboxan A ₂
VB	Vollblut
VCAM	vascular cell adhesion molecules
VEGF	vascular endothelial growth factor
VLDL	very low density lipoproteins
vWF	von Willebrand Faktor

I. Einleitung

I.1. Bedeutung der Atherosklerose

Atherosklerose ist eine Erkrankung der größeren und mittleren muskulären und elastischen Arterien. Nach jahrzehntelanger asymptomatischer Progression atherosklerotischer Wandveränderungen manifestieren sich schwerwiegende klinische Folgeerkrankungen, wie das akute Koronarsyndrom, ischämische Hirninfarkte, periphere arterielle Verschlusskrankheit und Aneurysmen. Diese stellen die führenden Ursachen für Morbidität und Mortalität in den westlichen Industrienationen dar. In den letzten Jahrzehnten wurden erhebliche Fortschritte zu einem besseren Verständnis der Pathogenese der Atherosklerose erzielt. Die Atherosklerose wird in den meisten Fällen erst dann gefährlich, wenn sie eine Vasookklusion durch Thrombusbildung induziert (Atherothrombose). Dies geschieht in den meisten Fällen nach Ruptur bzw. durch Fissuren atherosklerotischer Plaques.

I.2. Atherogenese

Für die Pathogenese der Atherosklerose sind eine Reihe prädisponierender Faktoren maßgeblich. Dazu gehören u.a. Hypercholesterinämien. Auch spielen verminderte Scherbeanspruchungen und ein oszillatorischer Blutfluss mit Blutflussumkehr, welche sich v.a. an den Aufzweigungsstellen des arteriellen Gefäßbettes zeigen, eine pathogenetische Rolle (Ku et al. 1985, Slager et al. 2005, Cunningham et al. 2005). Die meisten dieser Faktoren lösen zunächst eine endotheliale Dysfunktion aus. Der wichtigste Faktor, der zur endothelialen Dysfunktion führt, ist die Akkumulation und anschließende Oxidation von Low Density Lipoproteinen (LDL) in der subendothelialen Matrix (Goldstein et al. 1979, Berliner et al. 1996, Galle et al. 2005). Aus der Dysfunktion der Endothelzellen resultieren eine Reihe biochemischer und molekularer Veränderungen, u.a. eine verstärkte Vasokonstriktion, da die Bioverfügbarkeit von Stickstoffmonoxid (NO) vermindert ist, und Endothelin-1 vermehrt sezerniert wird (Ruschitzka et al. 2000, Niemann et al. 2005). Auch kommt es zur Aktivierung des Nukleären Faktor kappa B (NFκB) Signaltransduktionsweges, welcher die Transkription einer Reihe proinflammatorischer Gene reguliert (z.B.

interzelluläre Adhäsionsmoleküle [ICAM-1], Gefäßzelladhäsionsmoleküle [VCAM-1], E-Selektin und Zytokine) (Barnes et al. 1997, Robbesyn et al. 2004, Yang et al. 2005, Yu et al. 2005). Ebenso führt das modifizierte LDL zu einer vermehrten Expression des Monozyten Kolonie stimulierenden Faktors (MCSF) und des Monozyten chemotaktischen Proteins-1 (MCP-1) in Endothelzellen (Han et al. 1999, Shih et al. 2000, Egashira et al. 2003). Hierdurch wird die Adhäsion und schließlich die Migration von Monozyten und Lymphozyten in das Subendothelium gefördert (Abb. 1).

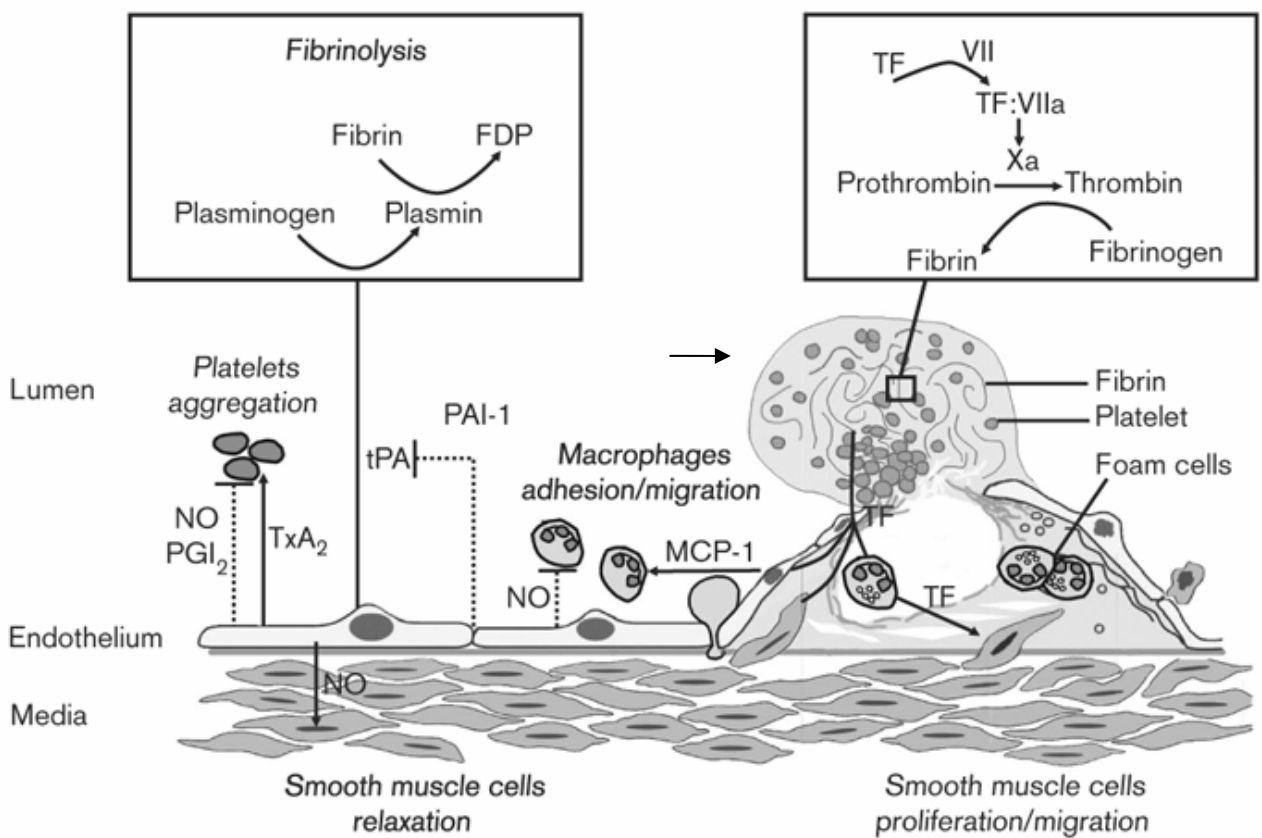


Abb. 1 Atherogenese und Atherothrombose

Funktionsfähiges Endothel (links) reguliert den Vasotonus durch die Produktion vasodilatatorischer (Stickstoffmonoxid [NO]) und vasokonstriktorischer Faktoren (Endothelin-1 [ET-1]). Ebenso verhindert es eine exzessive Plättchenaggregation (NO und Prostacyclin [PGI₂]) und beeinflusst das Blutgerinnungssystem über die Fibrinproduktion (tissue factor pathway inhibitor [TFPI]) und tissue factor [TF] und die Fibrinolyse (tissue plasminogen activator [tPA]/plasminogen activator inhibitor-1 [PAI-1]). Dysfunktionelles Endothel (rechts) fördert die Makrophagenadhäsion und -migration (monocyte chemoattractant protein 1 [MCP-1]) und damit das Wachstum des Plaques. Rupturiert der Plaque führt der Kontakt des Lipidkerns mit dem Blut zur Thrombusbildung. → = induzieren; ---- = inhibieren; FDP: fibrin degrading product; TXA₂: Thromboxan A₂; VEGF: vascular endothelial growth factor; SMC: smooth muscle cell (glatte Muskelzelle); MMP: Matrixmetalloproteinase (Corti et al. 2001).

Monozyten differenzieren daraufhin zu Makrophagen. Diese phagozytieren modifiziertes LDL über Scavenger Rezeptoren, welche keinem feedback Mechanismus unterliegen. Durch die Lipidakkumulation in den Makrophagen kommt es zu deren Transformation in sogenannte Schaumzellen, die sich in der Intima ansammeln und zusammen mit den Lymphozyten die frühen Fettstreifen darstellen (Ross et al. 1986, Llorente-Cortes et al. 2002, Shashkin et al. 2005). Dieser initiale Entzündungsreiz führt zu einer weiteren Rekrutierung von Blutzellen in die Gefäßwand, und der Sekretion von Mediatoren, wie z.B. Tumornekrosefaktor α (TNF α), Interleukin-1 (IL-1) und Platelet derived growth factor (PDGF), welche den Prozess der Atherogenese unterhalten (Shimokado et al. 1985, Libby et al. 1986, Nathe et al. 2002, Ohta et al. 2005).

Ein weiterer wichtiger Schritt der Atherogenese liegt in der Aktivierung, Migration und Proliferation glatter Muskelzellen (Stary et al. 1992). Der von den Thrombozyten und Makrophagen sezernierte PDGF regt die glatten Muskelzellen zur Proliferation an (Ross et al. 1986, Raines et al. 2004, Pintucci et al. 2005). Die Muskelzellen ändern ihren Phänotyp von einer kontraktilen zu einer sekretorisch aktiven Zelle (Sjölund et al. 1988). Sie setzen verschiedene Wachstumsfaktoren und Zytokine frei und stimulieren somit sowohl sich selbst als auch weitere glatte Muskelzellen zur Proliferation (Libby et al. 1988). Durch die Synthese von Proteinen der extrazellulären Matrix tragen sie wesentlich zur Progression der Atherosklerose bei (Schwartz et al. 1987). Kollagen (Typ I und III), Elastin und Proteoglykane sind die Hauptbestandteile des fibrösen Anteils eines Plaques, wobei Kollagen v.a. das Wachstum des Plaques bedingt, und die Proteoglykane und Elastin wichtig sind für die Bindung von Plättchen und Leukozyten (Katsuda et al. 2003). Die Matrix kann sekundär verkalken. Die so gebildeten fibrösen Plaques stellen nach den frühen Fettstreifen das zweite morphologische Korrelat der Atherosklerose dar. Das klassische Atherom stellt eine erhabene Läsion dar, deren Aufbau sich in eine fibröse Kappe und einen lipidhaltigen Kern gliedern lässt. Die fibrotische Kappe besteht aus glatten Muskelzellen, Kollagen und Proteoglykanen. Die nekrotische Kernregion setzt sich v.a. aus abgestorbenen Makrophagen und Mesenchymzellen, aus Cholesterinkristallen, Kalkablagerungen und extrazellulären Lipiden, die durch zerfallene Schaumzellen freigesetzt werden, zusammen (Falk et al. 1992). Die fibröse Kappe verhindert, dass der stark thrombogene Lipidkern in Kontakt mit dem Blut kommt, und somit die Thrombusbildung ausgelöst wird. Lassen sich zusätzlich

thrombotische Ablagerungen und/oder Hämorrhagien im Plaque nachweisen, spricht man von einer komplizierten bzw. komplexen Läsion (Stary et al. 1995, Fuster et al. 1996, Virmani et al. 2000).

Die Entwicklung von der endothelialen Dysfunktion zum komplexen atherosklerotischen Plaque erfolgt z.T. sehr langsam. Oft lassen sich jedoch kleine intramurale Thromben finden, die durch ihre fibrotische Organisation zu einer raschen Progression der Plaques führen. Analysen von Koronargefäßen von Patienten, die an einer ischämischen Herzerkrankung verstarben, demonstrierten, dass die Plaques zahlreiche abgeheilte Fissuren aufweisen. Auch bilden sich während der Atherogenese unter Umständen eine Vielzahl kleiner Thromben, die sich jedoch nicht klinisch manifestieren (Falk et al. 1983, 1985). Die den Thrombus bildenden Plättchen unterhalten den Prozess der Atherogenese in wesentlichem Maße, da sie u.a. Adhäsionsproteine (z.B. P-Selektin) zur weiteren Rekrutierung von Monozyten und Lymphozyten und Wachstumsfaktoren (z.B. PDGF) produzieren (Ross et al. 1993, Celi et al. 1997, Burger et al. 2003, Massberg et al. 2002, 2005).

I.3. Plaqueruptur

Bei Ruptur der fibrösen Kappe eines atherosklerotischen Plaques kommt es zum Kontakt der thrombogenen Anteile des Lipidkern mit dem fließenden Blut. Es erfolgt eine überschießende Aktivierung der Gerinnungskaskade, die entscheidend ist für das Entstehen eines gegenüber der hohen arteriellen Strömungsgeschwindigkeit resistenten Thrombus (Abb. 1). Somit können Plaques, die das Gefäßlumen nur partiell stenosieren zu einem akuten Gefäßverschluss führen. Die Plaqueruptur stellt den häufigsten Auslöser für das akute Koronarsyndrom dar (Fuster et al. 1996, 2005). In einem Drittel der Fälle von intravaskulärer Thrombusbildung lassen sich nur kleine oberflächliche Erosionen der Plaques nachweisen. Die Thrombusbildung ist hierbei am ehesten auf die verstärkte Thrombogenität des Blutes zurückzuführen (Virmani et al. 2000, Rauch et al. 2001).

Bei zwei Drittel der ischämischen Herzerkrankungen werden Plaques gefunden, die das Gefäßlumen um weniger als 60% einengen und somit die Hämodynamik nicht wesentlich beeinflussen (Falk et al. 1995). Dies liegt wohl auch darin begründet, dass eine höhergradige Gefäßstenose zur Bildung von protektiven Kollateralen führt, und

dass nach dem Laplace Gesetz in Gefäßen mit einem größeren Durchmesser stärkere physikalische Kräfte auf die fibröse Kappe wirken (Loree et al. 1992). Das Risiko für eine Plaqueruptur hängt wesentlich von der sog. Vulnerabilität eines Plaques ab. Vulnerable Plaques weisen ein relativ großes Volumen auf, wobei der Anteil des Lipidkerns allein über 40% ausmacht (Davies et al. 1993, Rao et al. 2005). Sie sind von weicher /visköser Konsistenz, u.a. durch die hohen Konzentrationen an Cholesterylestern (Loree et al. 1994, Felton et al. 1997).

Die fibröse Kappe variiert stark an Dicke, Stärke und Zellularität. Sie weist den geringsten Durchmesser im Bereich der Plaqueschulter auf, welche am Übergang der fibrösen Kappe zur normalen Intima liegt. Hier erfolgt in nahezu 60% der Fälle die Plaqueruptur (Loree et al. 1992). Diese Region ist stark infiltriert von Makrophagen und Schaumzellen (Falk et al. 1992, Pasterkamp et al. 1999). Die Stärke der fibrösen Kappe wird durch eine geringe Anzahl an glatten Muskelzellen als Folge der Apoptose, sowie durch einen geringeren Gehalt an Kollagen und Glykosaminoglykanen reduziert (Hangartner et al. 1986, Kolodgie et al. 2001, Kavurma et al. 2005).

Ebenso ist der vulnerable Plaque durch eine vermehrte Infiltration mit Entzündungszellen charakterisiert (van der Wal et al. 1994, Corti et al. 2004). Makrophagen sind in der Lage die extrazelluläre Matrix mittels Phagozytose oder durch die Sekretion proteolytischer Enzyme, wie Plasminogenaktivatoren und Matrixmetalloproteinasen (Kollagenasen, Elastasen, Gelatinasen etc.), abzubauen (Libby et al. 1995, Watanabe et al. 2004, May et al. 2005, Newby et al. 2005).

Auch externe Triggerfaktoren spielen eine wichtige Rolle. Diese führen jedoch nur dann zu einer Ruptur der fibrösen Kappe, wenn ein instabiler Plaque vorliegt. Je größer der Gefäßdurchmesser, je höher der Blutdruck und je dünner die Gefäßwand ist, desto größer sind die Kräfte, die auf die Gefäßwand wirken. Ebenso bedingt die Kontraktion des Herzmuskels eine Biegung und Dehnung der Koronargefäße und somit eine weitere physikalische Beanspruchung der Gefäßwand. Eine erhöhte Sympathikusaktivität verursacht einen erhöhten Blutdruck, eine gesteigerte Herzfrequenz und einen erhöhten Koronargefäßtonus. Damit steigt auch die Wahrscheinlichkeit für eine Plaqueruptur, wodurch sich zum Teil der protektive Effekt von β -Blockern erklären lässt.

I.4. Atherothrombose

I.4.1. Blutgerinnungssystem

Die zur Fibrinbildung führende Blutgerinnung wird unterteilt in ein extrinsisches und in ein intrinsisches System, welche jedoch nicht unabhängig voneinander betrachtet werden können (Abb. 2).

Tissue factor (TF), ein transmembranöses Glykoprotein der Cytokin-Rezeptor-Superfamilie, ist der Initiator der extrinsischen Gerinnung (Bach et al. 1988, Davie et al. 1991, Edgington et al. 1991, Walsh et al. 2002). Nach einer Gefäßwandverletzung bindet blutassoziiertes Faktor VII an subendotheliale TF. Damit wird eine Konformationsänderung der Proteasenregion des Faktors VII induziert und dieser aktiviert (Nemerson et al. 1985, Eilertsen et al. 2004, Osterlund et al. 2005). Der TF-FVII Komplex kann auch im Rahmen einer Autoaktivierung durch bereits gebildeten Faktor VIIa bzw. durch den TF-VIIa Komplex in die aktive Form überführt werden. Faktor VII ist damit in der Lage sowohl Faktor IX als auch Faktor X proteolytisch zu aktivieren (Lawson et al. 1994, Butenas et al. 1997). Die Menge an gebildetem Faktor Xa ist in dieser Phase noch gering (Mann et al. 1992). Jedoch führt Faktor Xa unter Bildung des Prothrombinase Komplexes mit Faktor Va auf der Zellmembranoberfläche zur Bildung kleiner Mengen an Thrombin aus Prothrombin (Mann et al. 1988, Lane et al. 2005). Thrombin aktiviert im Rahmen von positiven Rückkopplungsschleifen Faktor V, Faktor VIII und Faktor XI (Pieters et al. 1989, Baglia et al. 2000, Yun et al. 2003). Ebenso erfolgt eine starke Plättchenaktivierung über protease activated receptors (PARs), und damit u.a. eine Freisetzung von Faktor V aus den α -Granula (Brummel et al. 2002, Keuren et al. 2005). Die initial geringe Menge an Thrombin ermöglicht durch diese Mechanismen die Amplifikation der Thrombinbildung.

Thrombin wandelt durch die Abspaltung von niedermolekularen Peptiden (Fibrinopeptid A und B) Fibrinogen zu Fibrin um (Mosesson et al. 1992, 2005). Durch die Wirkung des Faktor XIIIa, einer ebenfalls durch Thrombin aktivierten Transamidase, kommt es zur kovalenten Verknüpfung von Fibrinmonomeren (Dickneite et al. 2002, Bereczky et al. 2003). Ebenso verhindert Thrombin den Abbau von Fibrin durch die Aktivierung von Inhibitoren der Fibrinolyse (Nesheim et al. 1997, Marx et al. 2004).

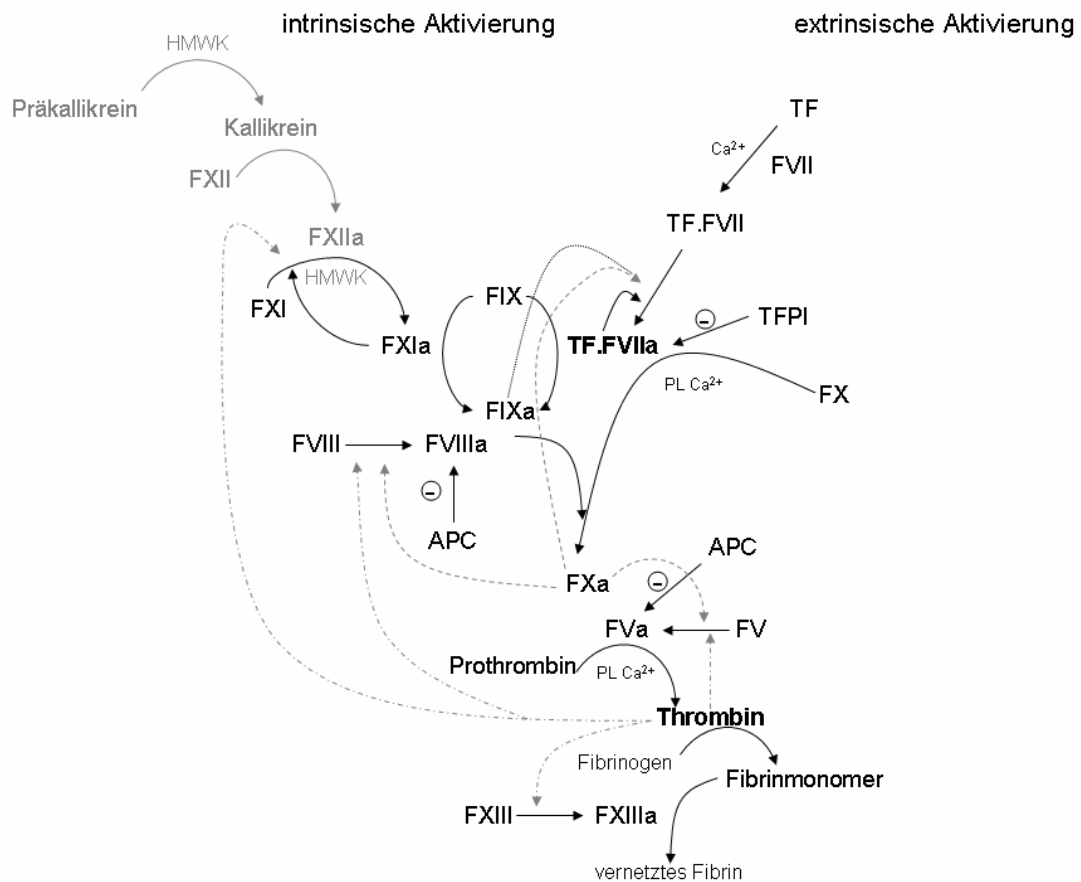


Abb. 2 Schematischer Überblick des Blutgerinnungssystems

Die Fibrinbildung wird durch einen intrinsischen und einen extrinsischen Gerinnungsweg induziert. TF: tissue factor; PL: Phospholipide; HMWK: high molecular weight kininogen. Positive Feedback Schleifen durch Thrombin (Punkt-Strich-Linie), FIXa (punktierete Linie) und FXa (gestrichelte Linie) sind in grauer Farbe dargestellt. ⊖ bedeutet Inhibition durch aktiviertes Protein C (APC) und tissue factor pathway inhibitor (TFPI) (adaptiert nach Spronk et al. 2003).

Neben dem TF-FVIIa Komplex führt Faktor XIa, als Bestandteil des intrinsischen Gerinnungsweges, zur Bereitstellung von Faktor IXa (Oliver et al. 1999). Zusammen mit Faktor VIIIa bildet der aktivierte Faktor IX auf der Thrombozytenoberfläche den sogenannten Tenase Komplex und führt somit zur Bildung einer großen Menge an Faktor Xa und damit zu einer für die Fibrinbildung ausreichenden Menge an Thrombin (Hockin et al. 2002, Butenas et al. 1997).

Die Regulation der Blutgerinnung erfolgt auf verschiedenen Ebenen der Kaskade, entweder durch Enzyminhibition oder Veränderung der Aktivität von Kofaktoren. TFPI bindet sowohl an Faktor Xa als auch an den ternären Komplex aus TF, Faktor VIIa und Faktor Xa (Broze 1995, Bajaj et al. 2001, Lwaleed et al. 2005). Die meisten

Enzyme, die an der Blutgerinnung beteiligt sind, u.a. Thrombin, Faktor IXa und Faktor Xa, werden durch den Serin Protease Inhibitor Antithrombin inaktiviert (Gomez et al. 2005). Thrombin bindet an das auf der Endothelzelle exprimierte Thrombomodulin und aktiviert somit Protein C (APC), welches zusammen mit seinem Kofaktor Protein S die Aktivität sowohl des Xase als auch des Prothrombinasekomplexes durch Proteolyse der Faktoren VIIIa und Va reduziert (Dahlbäck et al. 1995, Espana et al. 2005).

Die aktuellen Modelle der Hämostase gehen davon aus, dass TF den zentralen Auslöser der Blutgerinnung darstellt. Die physiologische und pathologische Rolle des intrinsischen Systems ist teilweise noch ungeklärt. Faktor IX, Faktor VIII und Faktor XI sind zwar Bestandteile des intrinsischen Weges, sie können jedoch wie oben beschrieben über den TF-FVIIa Komplex bzw. Thrombin aktiviert werden. Die Ausgangsprotease des intrinsischen Gerinnungsweges ist Faktor XII. Dieser kann in vitro durch negativ geladene Oberflächen aktiviert werden. Die Aktivierung des intrinsischen Weges unter physiologischen Bedingungen in vivo ist noch nicht vollständig geklärt. Neueren Untersuchungen zufolge lagern sich Präkallikrein und Faktor XI über high molecular weight kininogen (HMWK) zu einem Multiprotein-Rezeptor Komplex auf Endothelzellen zusammen. Dadurch wird Präkallikrein in Kallikrein umgewandelt, welches dann die Aktivierung von Faktor XII amplifiziert (Mahdi et al. 2001, Shariat-Madar et al. 2002). Auf diese Weise könnte das intrinsische System eine Rolle in der in vivo Blutgerinnung haben. Jedoch weisen Patienten mit einem Mangel an Faktor XII, HMWK und Präkallikrein keine Blutungsneigung auf (Kienast et al. 1993). Ebenso zeigte sich, dass eine Aktivierung des Faktor XI wesentlich effizienter durch Thrombin als durch Faktor XIIa erfolgt (Baglia et al. 2000). Jedoch könnte FXII bei der pathologischen Gerinnungsaktivierung eine gewisse Rolle spielen, da eine enge Korrelation zwischen der Konzentration an Faktor XII und dem Ausmaß der koronaren Atherosklerose besteht (Ishii et al. 2000, Zito et al. 2000). Ebenso führten Experimente mit Faktor XII defizienten Mäusen zu einem Defekt in der Bildung und Stabilisierung von plättchenreichen Thromben (Renne et al. 2005). Auch weist die Aktivierung der Blutgerinnung über das Kontaktaktivierungssystem durch very low density lipoproteins (VLDL), als Risikofaktor der Atherosklerose auf die Bedeutung des intrinsischen Systems hin (Cullen et al. 2000, Klein et al. 2001).

I.4.2. Mechanismen der Plättchenadhäsion, -aktivierung und –aggregation

Atherosklerotische Plaques enthalten eine Reihe von plättchenaktivierenden Molekülen, wie z.B. von Willebrand Faktor (vWF), Fibrin/Fibrinogen, Kollagen und oxidiertes LDL (Katsuda et al. 2003, de Meyer et al. 1999, Barnes et al. 1999, Weidtmann et al. 1995). Es ist aber noch teilweise ungeklärt ob diese Plaquebestandteile zur Plättchenaktivierung und dadurch zur Thrombusbildung nach Ruptur eines atherosklerotischen Plaques beitragen. Eine neuere Publikation konnte bereits nachweisen, dass Kollagen Typ I und III aus menschlichen atherosklerotischen Plaques die Thrombusbildung in vivo über eine Aktivierung des thrombozytären GP VI Rezeptors stimulieren (Penz et al. 2005). Aktivierte GPVI Rezeptoren führen neben anderen Plättchenagonisten wie z.B. Adenosindiphosphat (ADP) oder Thrombin zur Aktivierung weiterer Adhäsionsrezeptoren, u.a. der Integrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ und $\alpha_2\beta_1$ (Jung et al. 2000, Nieswandt et al. 2003, Lecut et al. 2004, Massberg et al. 2005).

Die Adhäsion bewirkt eine Aktivierung der Thrombozyten mit Formveränderung („shape change“), Sekretion von Granulainhaltsstoffen und Aggregatbildung. Der aktivierte Thrombozyt bildet aus freigesetzter Arachidonsäure Thromboxan A_2 , das den Aktivierungsvorgang verstärkt und gleichzeitig zur Vasokonstriktion führt (Roth et al. 1994, Liu et al. 2004, Wilson et al. 2005). ADP induziert nach der Freisetzung aus den dichten Granula die Synthese von Thromboxan A_2 und verstärkt die Wirkung anderer Plättchenagonisten (Cattaneo et al. 1999, Ruggeri et al. 2002, Murugappan et al. 2004, Hechler et al. 2005). Ebenso bewirkt die Bindung des ADP an seine Rezeptoren $P2Y_{12}$ und $P2Y_1$ eine Aktivierung der intravaskulären Blutgerinnung (Leon et al. 2004). Die Serin Protease α -Thrombin, die u.a. durch die gleichzeitig ablaufende Blutgerinnung entsteht induziert über die Bindung an Protease-aktivierte Rezeptoren (PAR1 und PAR4) und den GP Ib-IX-V Komplex eine starke Plättchenaktivierung (Coughlin 2000, Sambrano et al. 2001, De Candia et al. 2001, Diaz-Ricart et al. 2005).

Die Aktivierung der Plättchen führt zur raschen Konformationsänderung und damit erhöhten Affinität einiger Integrine der Zellmembran, u.a. von $\alpha_{IIb}\beta_3$ (GP IIb-IIIa Komplex) (Liddington et al. 2002, Calderwood 2004). Dadurch wird die Bindung von löslichem Fibrinogen an die Zelloberfläche möglich, und es resultiert eine

Quervernetzung benachbarter Thrombozyten durch Fibrinogenbrücken (Bennett et al. 2001).

Einzelne Schritte der Blutgerinnungskaskade sind entscheidend von der Anwesenheit aktivierter Thrombozyten abhängig. Diese enthalten in ihren α -Granula pro- und antikoagulatorische Proteine (TF, Faktor V, Faktor XI, Fibrinogen, Plasminogen, Protein S etc.) (Rendu et al. 2001, Müller et al. 2003). Durch die Bindung an Kollagen über GPVI oder an Fibrin über $\alpha_{IIb}\beta_3$ Integrine verändert sich die Phospholipidorientierung im Bereich der Plasmamembran (Thiagarajan et al. 1991, Beguin et al. 1997, Heemskerk et al. 1999). Es werden dabei negativ geladene Phospholipide, wie Phosphatidylserin (PS), auf der Thrombozytenoberfläche exponiert, welche eine erhöhte Bindung für Faktor V, VIIIa, IXa und Xa ermöglichen (Zwaal et al. 1998, Cohen et al. 2004, Wolfs et al. 2005). Damit werden zwei wichtige Reaktionen der Blutgerinnungskaskade beschleunigt: die Tenase- und die Prothrombinasereaktion (Van Dieijen et al. 1981, Ahmad et al. 2003). Vergleichbare koagulatorische Membranoberflächen lassen sich bei den Mikropartikeln finden, die sich in Form kleiner Membranvesikel von aktivierten Plättchen abschnüren (Thiagarajan et al. 1991, Heemskerk et al. 1997, Tan et al. 2005).

Durch die Zellaktivierung wird das transmembranale Glykoprotein P-Selektin auf die Zellmembranoberfläche transloziert (Stenberg et al. 1985). P-Selektin knockout Mäuse weisen eine verringerte TF Akkumulation und Fibrinbildung beim Thrombuswachstum auf. Dies ist vermutlich auf die verminderte Anlagerung PSGL 1 (P-Selektin Glykoprotein Ligand 1) tragender Mikropartikel an die Thrombozyten zurückzuführen (Falati et al. 2003, Vandendries et al. 2004, Polgar et al. 2005).

I.4.3. Auslöse- und Verstärkermechanismen der Thrombusbildung

I.4.3.1. Einfluss der Plaquekomponenten auf die Gerinnungsaktivierung

Komponenten atherosklerotischer Plaques lösen direkt die Gerinnungsaktivierung nach Plaqueruptur bzw. Plaquetfissur aus. In vitro und in vivo Experimente belegen, dass TF entscheidend zur Thrombogenität eines atherosklerotischen Plaques beiträgt. In der normalen Gefäßwand wird TF v.a. von Fibroblasten der Adventitia und zu einem kleineren Teil von glatten Muskelzellen der Tunica media exprimiert. In

Endothelzellen konnte keine TF mRNA und kein TF Protein detektiert werden. Somit wird eine anatomische Barriere gebildet, die die Aktivierung der Gerinnung verhindert (Wilcox et al. 1989, Drake et al. 1989, Flossel et al. 1994, Eilertsen et al. 2004).

Der Lipidkern eines Atheroms weist im Vergleich zu anderen Plaquebestandteilen das stärkste thrombogene Potential auf (Fernández-Ortiz et al. 1994, Toschi et al. 1997). Einige Studien konnten das TF Antigen und TF mRNA im Plaque nachweisen, wobei man die höchste Konzentration wiederum im Lipidkern fand. Ebenso wurde demonstriert, dass dieser TF funktionell aktiv ist. Daher zeigte sich auch eine positive Korrelation zwischen dem TF Gehalt und der Thrombin- bzw. Fibrinbildung (Wilcox et al. 1989, Thiruvikraman et al. 1996, Ichikawa et al. 1996, Toschi et al. 1997, Ardissino et al. 2001, Ott et al. 2003). Infolgedessen ließ sich die Fibrinablagerung auf atherosklerotischen Plaques durch den Einsatz von TFPI und humanem Anti-TF Antikörper erheblich reduzieren (Badimon et al. 1999).

Die meisten Zellen, die am Aufbau eines Plaques beteiligt sind, sind auch in der Lage TF zu exprimieren. Dies gilt für glatte Muskelzellen, Monozyten, Makrophagen und Schaumzellen (Wilcox et al. 1989, Landers et al. 1994, Thiruvikraman et al. 1996, Kamimura et al. 2004, Egorina et al. 2005). Verschiedene Faktoren, die die Pathogenese der Atherosklerose fördern, regulieren auch die TF Expression und Aktivität. Dies gilt insbesondere für modifiziertes (oxidiertes oder acetyliertes) LDL und Entzündungsmediatoren, wie IL-2, TNF β und Interferon gamma, die die TF Expression in mononukleären Zellen verstärken (Del Prete et al. 1995). In vitro Experimente belegen, dass PDGF und Thrombin die Transkription des TF Gens in glatten Muskelzellen induziert, und die Ligation des CD40 Rezeptors das TF Protein aktiviert (Schechter et al. 1997, Mach et al. 1997, Bavendiek et al. 2002). Auch die TF Expression in Endothelzellen wird durch Interleukine und TNF α induziert (Bevilacqua et al. 1984, 1986, Moore et al. 1987, Carlsen et al. 1988, Mulder et al. 1994, Wu et al. 2005). Die Entzündungsvorgänge, die die Atherogenese bewirken lösen in einem Großteil der Lymphozyten, Makrophagen und Endothelzellen Apoptose aus (Björkerud et al. 1996, Cai et al. 1997). Während dieses programmierten Zelltodes werden von der Zellmembranoberfläche Membranvesikel, die sog. Mikropartikel (MP) abgeschnürt (VanWijk et al. 2003). Mallat et al. (1999) stellten bei der Untersuchung von atherosklerotischen Plaques fest, dass diese apoptotischen MP, die sich hauptsächlich im nekrotischen Kern finden lassen, für den Großteil der TF Aktivität verantwortlich sind.

I.4.3.2. Die Bedeutung des intravaskulären TF

Es wurde lange Zeit angenommen, dass die Aktivierung der Gerinnungskaskade während der arteriellen Thrombogenese erst nach einem Gefäßschaden mit nachfolgendem Kontakt des TF der Gefäßwand mit dem zirkulierenden Blut aktiviert wird. Mitte der 90er Jahre konnten jedoch einige Gruppen erstmals TF im zirkulierenden Blut gesunder Probanden nachweisen. Dabei wurde ein erhöhter Gehalt an TF Antigen im Blut verschiedener Patienten gefunden, die an kardiovaskulären und hämatologischen Erkrankungen litten (Albrecht et al. 1996, Gando et al. 1998, Amengual et al. 1998, Key et al. 1998, Soejima et al. 1999). Giesen et al. (1999) demonstrierte, dass im menschlichen Vollblut funktionell aktiver TF enthalten ist. Diese und weitere Untersuchungen lassen vermuten, dass der blutassoziierte TF von beträchtlicher Bedeutung für die pathologische Fibrinbildung im Rahmen der arteriellen Thrombogenese ist. Diese Hypothese wird durch folgende Überlegung gestützt: zur Fibrinbildung ist die Assemblierung des aktivierten Faktors X mit Faktor Va zum Prothrombinasekomplex auf der Thrombozytenoberfläche entscheidend. Lagern sich jedoch die Plättchen während der Thrombogenese an den rupturierten atherosklerotischen Plaque, bildet sich dadurch eine impermeable Barriere für Faktor Xa. Somit würde unter der Annahme, dass TF nur auf Zellen der Gefäßwand exprimiert wird, die Bildung eines Fibrinnetzwerkes auf der Oberfläche des entstehenden Blutgerinnsels deutlich erschwert. Deshalb wurde postuliert, dass sich funktionell aktiver TF auch auf oder in Kontakt mit der Thrombozytenoberfläche befindet (Engelmann et al. 2003).

Interessanterweise können Plättchen, als wichtigster zellulärer Bestandteil eines arteriellen Thrombus, nach Stimulation mit Kollagen, Thrombin oder ADP in den α -Granula gespeicherten TF auf ihrer Zellmembranoberfläche präsentieren (Zillmann et al. 2001, Müller et al. 2003, Leon et al. 2004). Dieser Prozess findet v.a. in Neutrophilen-Plättchen und Monozyten-Plättchen Komplexen statt. Damit ist es prinzipiell möglich, dass der gesamte Gerinnungsprozess auf der Oberfläche der Leukozyten-Plättchen Komplexe abläuft.

Unter physiologischen Bedingungen lässt sich TF im Plasma zum größten Teil assoziiert mit zirkulierenden MP finden (Müller et al. 2003). Der größte Anteil zirkulierender MP in vivo ist unter physiologischen Bedingungen thrombozytären Ursprungs. Diejenigen, die von Erythrozyten, Granulozyten, Monozyten,

Lymphozyten und Endothelzellen abstammen, konnten in nur wesentlich geringeren Mengen nachgewiesen werden (Berckmans et al. 2001).

Sowohl in vitro präparierte als auch ex vivo MP initiieren und unterstützen die Thrombusbildung in vitro (Nieuwland et al. 1997, Combes et al. 1999, Berckmans et al. 2002, Müller et al. 2003). Eine Reihe von Untersuchungen belegen auch die Bedeutung prokoagulatorischer MP in vivo, da bei einer Vielzahl von Erkrankungen mit verstärkter Gerinnungsneigung, wie z.B. akutes Koronarsyndrom, zerebrovaskuläre Erkrankungen und Diabetes mellitus, eine erhöhte Anzahl dieser MP nachgewiesen werden kann (Lee et al. 1993, Hugel et al. 1999, Mallat et al. 2000, Diamant et al. 2002). Furie und Mitarbeiter (2004) konnten am Mausmodell nachweisen, dass der an MP gebundene intravaskuläre TF an der Gerinnungsaktivierung im Rahmen der Thrombogenese verantwortlich ist.

I.5. Zielsetzung

Rupturen und Fissuren atherosklerotischer Plaques und der damit verbundene Kontakt zwischen dem lipidreichen Kern und dem fließenden arteriellen Blut sind die entscheidenden Auslöser für die überschießende Aktivierung des Gerinnungssystems bei kardiovaskulären Erkrankungen wie Herzinfarkt und Schlaganfall und damit für die Entstehung einer arteriellen Thrombose.

In Voruntersuchungen fanden wir, dass Stimulierung von Vollblut gesunder Spender mit geringen Mengen der aus atherosklerotischen Plaques präparierten Lipidkerne zu einer ausgeprägten Stimulation der Fibrinbildung führte.

Daraus ergaben sich folgende Fragen:

- 1) Welche Rolle spielen die Thrombozyten für den durch atherosklerotische Plaques induzierten Gerinnungsstart?
- 2) Inwieweit ist das intravasale TF-System an der Fibrin- und Thrombusbildung beteiligt?
- 3) Welche Komponenten des lipidreichen Kerns unterstützen die Stimulation der Fibrinbildung bei Plaqueruptur?

II. Material und Methoden

II.1. Material

II.1.1. Chemikalien, Lösungsmittel und Fertiglösungen

BSA Fraktion V	Serva, Heidelberg
EDTA (freie Säure)	Roth, Karlsruhe
Glucose	Roth, Karlsruhe
Hepes	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Roth, Karlsruhe
Kaliumhydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
Magnesiumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumhydrogencarbonat	Roth, Karlsruhe
Natriumhydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
Tri-Natriumcitrat Dihydrat	Roth, Karlsruhe
Methanol	Roth, Karlsruhe
Chloroform	Roth, Karlsruhe
Butyliertes Hydroxytoluen (BHT)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Salzsäure	Roth, Karlsruhe
Schwefelsäure	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Tris/HCl	Roth, Karlsruhe
Trypanblau	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
BCA Protein Assay Reagens	Biorad, München
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Tween	Sigma-Aldrich, Deisenhofen

II.1.2. Antikörper, Inhibitoren, Proteasen, Gerinnungsfaktoren und Substrate

Antikörper:

Mouse-anti-human TF VIC7	PD Dr. Luther, Institut für Pathologie, TU Dresden
Mouse-anti-human TF III D8 (Peroxidase gekoppelt)	PD Dr. Luther, Institut für Pathologie, TU Dresden
GP IIb/IIIa Antikörper (Abciximab)	Centocor B.V., Leiden, Niederlande
Anti-GPVI-4 Antikörper	PD Dr. Massberg, Deutsches Herzzentrum, München
Anti-SRBI Antikörper	Santa Cruz Biotechnology, California, USA

Gerinnungsfaktoren:

RecombiPlasTin
(rekombinanter TF für TEG)
Rekombinanter TF für TF-ELISA

Instrumentation Laboratory, Lexington,
USA

American Diagnostica Inc, Greenwich,
CT

Beriplex PN 500
Thromborel S

Aventis Behring, Marburg
Dade Behring, Marburg

Proteine und Proteasen:

Annexin V
Apyrase Grade VII, Kartoffel

Becton Dickinson, Heidelberg
Sigma-Aldrich, Deisenhofen

Inhibitoren:

Faktor VIIai
Revasc (Desirudin)

Novo Nordisk, Bagsvaerd, Dänemark
Novartis/Rhone-Poulenc Rorer,
Frankreich

Corn Trypsin Inhibitor
Iloprost

Calbiochem, Bad Soden
Schering AG, Berlin

Substrate:

S 2222
Tetramethylbenzidin/H₂O₂

Chromogenix, Milano, Italien
Kirkegaard & Perry Lab, Gaithersburg,
Maryland, USA

II.1.3 Puffer

PBS (Phosphate-Buffered Saline):

NaCl, 136 mM
KCl, 2,6 mM
Na₂HPO₄, 10 mM
KH₂PO₄, 1,5 mM
pH 7,4

Resuspensionspuffer:

NaCl, 138 mM
KCl, 2,7 mM
NaHCO₃, 12 mM
NaH₂PO₄, 0,4 mM
D-Glucose, 5 mM
MgCl, 1 mM
Hepes, 5 mM
pH 7,4

Thrombozytenwaschpuffer:

NaCl, 138 mM
KCl, 3 mM
MgCl₂, 1 mM
Hepes, 15 mM
EDTA, 5 mM
D-Glucose, 5 mM
Tri-Natriumcitrat, 9 mM
Apyrase 0,5 g/l
pH 6,3

TEG Kalziumpuffer:

CaCl₂, 100 mM
Hepes, 10 mM
pH 7,4

Plaque-Puffer:

NaCl, 150 mM
EDTA, 1 mM
pH 7,2

Lyse Puffer:

Tris/HCl, 0,05 M
NaCl, 0,1 M
EDTA, 5 mM
BSA, 1 %
Triton X-100, 0,2 %
pH 7,6

Waschpuffer TP 20:

PBS
Tween, 0,5 %
pH 7,4

Blockierungspuffer WP 20:

TP 20
Kälberserum, 2 %

TBS Puffer:

Tris Puffer, 0,05 mM
NaCl, 0,1 M
EDTA, 5 mM
BSA, 1 %
Triton X-100, 0,2 %
pH 7,6

II.1.4. Materialien und Geräte

Materialien:

Bulk Diamond Tips
Pasteurpipetten
Transferpipetten
Eppendorf Reaktionsgefäß

Zentrifugenröhrchen

Gilson, Bad Comberg
Brand, Wertheim
Sarstedt, Nümbrecht
Eppendorf-Netheler-Hinz,
Hamburg
Sarstedt, Nümbrecht

Polypropylen Röhrchen	Becton-Dickinson, Franklin Lakes, USA
Parafilm	American Can Company, Greenwich, CT
Roteg Küvetten	Instrumentation Laboratory GmbH, Kirchheim
BD Discardit II Spritzen	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Cutasept F Hautdesinfiziens	Bode Chemie, Hamburg
Ecoflo Perfusionsbesteck	Dispomed Witt, Gelnhausen
Mikroskop Deckgläser	Menzel Gläser, Braunschweig
Microtest, Gewebe Kultur Platte, 96 well	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Mikrotiterplatte Maxisorp	Nunc GmbH, Wiesbaden

Geräte:

Zentrifuge Rotina 35 R	Hettich, Tuttlingen
Zentrifuge Universal 32	Hettich, Tuttlingen
Zentrifuge Mikro 32 R	Hettich, Tuttlingen
Thrombelastograph RoTEG	Dynabte GmbH, München
ELISA Reader Dynatech MR 7000	Dynatech Laboratories, Alexandria, USA
Speed Vac Concentrator	Bachofer, Reutlingen
Branson Sonifier Cell Disruptor	G. Heinemann, Schwäbisch-Gmünd
Vortex Genie 2	Bender & Hebei AG, Zürich, Schweiz
Axiovert 100 Mikroskop	Zeiss, Oberkochen
Neubauer Zählkammer	Hecht KG, Sondheim

II.2. Methoden

II.2.1. Gewinnung des Lipidkerns atherosklerotischer Plaques

Die in dieser Arbeit verwendeten Lipidkerne stammen von 25 Patienten, die sich aufgrund einer hochgradigen Carotisstenose einer Thrombendarteriektomie unterziehen mussten. Das atherosklerotische Plaquematerial wurde von Prof. Dr. R. Brandl (Gefäßchirurgische Abteilung des Klinikums München – Schwabing) und Prof. Dr. W. Siess (Institut für Prophylaxe und Epidemiologie der Kreislaufkrankheiten, Klinikum Innenstadt, Universität München) für diese Arbeit zur Verfügung gestellt. Jeder Patient erteilte seine Einwilligung mittels eines Formblattes des Ethikkomitees der Medizinischen Fakultät der Technischen Universität von München. Der Stenosegrad wurde mittels Ultraschall und biplanarer Angiographie ermittelt, entsprechend den allgemein gültigen NASCET (North American Symptomatic Carotid Endarterectomy Trial) Kriterien.

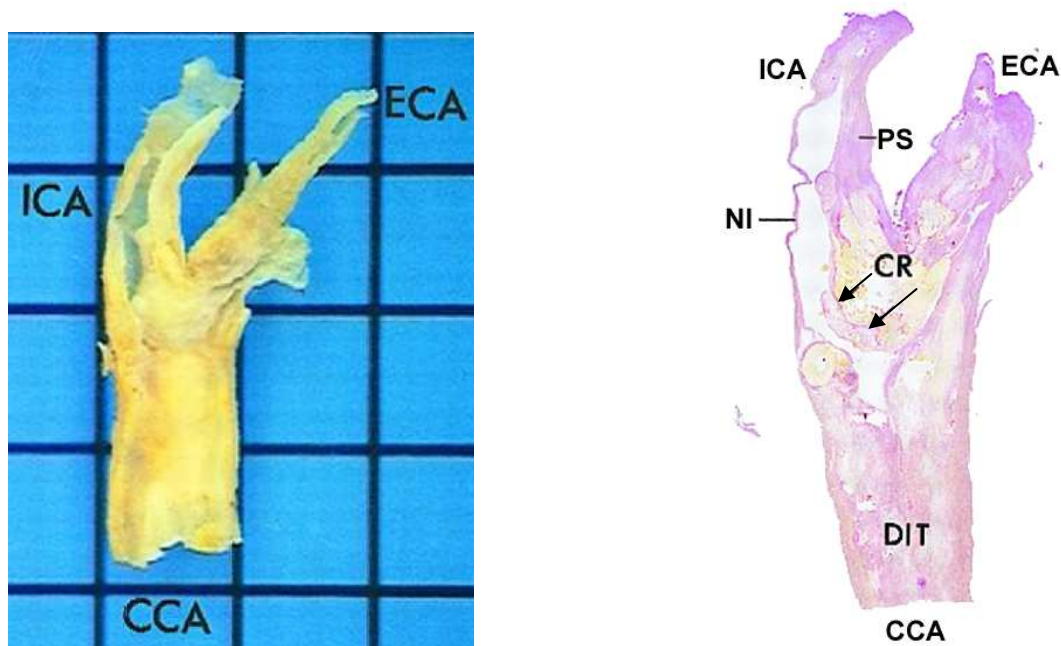


Abb. 3 Atherektomie-Präparat aus dem Bereich der Carotisbifurkation

Links: Digitalisiertes Photo eines längsgeschnittenen en bloc Atherektomie-Präparates aus dem Bereich der Carotisbifurkation. Rechts: Dieses histologische Schnittpräparat nach Paraffineinbettung zeigt eine exzentrische Läsion in der A. carotis interna (Elastica van Gieson Färbung). Die Kernregion ist gefüllt mit einer Masse an atheromatösem Debris. Am Abgang der A. carotis interna sind adhärenente Thromben nachweisbar (Pfeile). Somit lässt sich dieser Plaque entsprechend der American Heart Association Kriterien als Typ IV Läsion klassifizieren. DIT: diffuse intimale Verdickung; CR: core region (Kernregion); PS: Plaqueschulter; NI: normale Intima; CCA: A. carotis communis; ICA: A. carotis interna; ECA: A. carotis externa (adaptiert nach Brandl et al. 1997).

Jede Operation erfolgte unter Vollnarkose mit Fentanyl und Halothan sowie unter systemischer Heparin-gabe (100 U/kg) während der Abklemmzeit. Intraoperativ wurde das Plauegewebe durch Anwendung einer vorsichtigen operativen Technik endarteriektomiert, um die en bloc Plauestruktur zu erhalten (Abb. 3). Das Atherektomiepräparat ließ sich durch Abziehen der verdickten Intimaabschnitte leicht gewinnen, da sich diese Bereiche meist spontan von der darunterliegenden Media lösten. Es erfolgte eine sorgfältige Dissektion des atherosklerotischen Plaues. Die lipidreiche Kernregion dieses Atherektomiepräparates wurde anschließend in Puffer (NaCl 150 mmol/l, EDTA 1 mmol/l, pH 7,2), der mit gefrorenem Stickstoff abgesättigt wurde, homogenisiert und bei -20 °C gelagert. Das Feuchtgewicht der Kernregion der verschiedenen Plaues betrug 50 mg/ml.

II.2.1.1. Bestimmung des TF-Gehaltes der Plaues

II.2.1.1.1. Proteinextraktion

Zur Proteingewinnung wurde dem Plauematerial Lysepuffer (0,05 M Tris/HCl, 0,1 M NaCl, 5 mM EDTA, 1% BSA, 0,2 % Triton X-100, pH 7,6) zugegeben. Das Gemisch wurde bei 4 °C und 10.000 x g für 30 Minuten zentrifugiert. Der dabei gewonnene Überstand wurde zur Bestimmung des TF Gehaltes weiterverwendet.

II.2.1.1.2. Double-Sandwich-ELISA zur TF-Gehalt Bestimmung

Zur Bestimmung der TF Menge im Plaue wurde ein ELISA unter Verwendung zweier monoklonaler Antikörper (mAk) eingesetzt. Dabei wurde zuerst eine Mikrotiterplatte mit 50 µl pro well des anti-TF monoklonalen Antikörpers VIC7 (2,5 µg/ml) über Nacht bei 4 °C beschichtet. Anschließend wurden die Platten ausgeklopft und mit 200 µl TP 20 Waschpuffer pro well gewaschen. Um unspezifische Bindungen möglichst gering zu halten, wurden die Platten mit jeweils 200 µl pro well WP 20 Blockierungspuffer bei 37 °C für 30 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Platten wieder ausgeklopft.

Die Proben wurden mit TBS Puffer 1:20 verdünnt, und jeweils 50 µl davon wurden in ein well pipettiert. Für den Standard wurden verschiedene Mengen an rekombinantem TF mit TBS Puffer gemischt. Jeweils 50 µl dieser Verdünnungsreihe, die von 12,5 ng/ml bis 0,025 ng/ml reichte, wurden in die wells pipettiert. Es erfolgte eine Inkubation der Proben und des Standards für 2 Stunden bei 37 °C. Nach dreimaligem Waschen der Platten mit jeweils 200 µl TP 20 Waschpuffer, wurden jeweils 50 µl des peroxidasegekoppelten monoklonalen anti-TF Antikörpers III D8 zugegeben und für 90 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Platten wurden dann wieder ausgeklopft und fünfmal unter fließendem Leitungswasser gewaschen. Jeweils 50 µl Tetramethylbenzidin und H₂O₂ wurden in einem Verhältnis 1:1 als Substrat zugegeben und 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zugabe von 200 µl H₂SO₄ (Normalität = 1) stoppte die enzymatische Reaktion. Innerhalb von 30 Minuten erfolgte die photometrische Messung bei 450 nm. Mit Hilfe der Standardkurve konnten die Konzentrationen von TF in den verschiedenen atherosklerotischen Plaques bestimmt werden. Die untere Nachweisgrenze lag bei 30 pg/ml. Die Messungen wurden in Kooperation mit Herrn PD Dr. Thomas Luther (Institut für Pathologie, TU Dresden) durchgeführt.

II.2.2. Blut- und Zellpräparation

Für die Isolierung von Blutzellen und für die Herstellung von plättchenreichem bzw. plättchenarmen Plasma (PRP bzw. PAP) und Mikropartikeln wurde gesunden Probanden (23-45 Jahre) venöses Blut entnommen. Die Blutspender hatten mindestens zehn Tage zuvor keine Medikamente eingenommen, die die Blutgerinnung bzw. Thrombozytenfunktion beeinflussen könnten. Die Blutentnahme erfolgte nach ausreichender Hautdesinfektion aus einer in der Ellenbeuge verlaufenden Vene. Um ionisiertes Calcium zu binden, wurde das Blut in Kunststoffspritzen abgenommen, die Trinatriumcitrat (Endkonzentration 0,38%) enthielten. Die ersten 3 ml des gewonnenen Blutes wurden verworfen, um eine möglicherweise ausgelöste Aktivierung der Blutgerinnungskaskade bzw. der Blutplättchen auszuschließen.

II.2.2.1. Präparation von plättchenreichem bzw. plättchenarmen Plasma

Sofort nach Abnahme wurde das citrierte Vollblut (VB) gleichmäßig auf 10 ml Polypropylen-Röhrchen verteilt und für 15 Minuten bei 190 x g zentrifugiert. Anschließend wurden die oberen zwei Drittel des Überstandes, das sogenannte plättchenreiche Plasma, vom Zellsediment getrennt. Um PAP zu gewinnen, wurde das PRP erneut auf 10 ml Polypropylenröhrchen verteilt und bei 1000 x g für 20 Minuten zentrifugiert. Die oberen 80% des Überstandes wurden abpipettiert und wiederum 20 Minuten bei 1000 x g zentrifugiert. Der daraus resultierende Überstand wurde als PAP in den jeweiligen Versuchen eingesetzt.

II.2.2.2. Blutzellisolierung

II.2.2.2.1. Thrombozytenisolierung

Für die Isolierung von Blutplättchen wurde zuerst PRP mittels Zentrifugation gewonnen. Um eine Aktivierung der Thrombozyten während der Isolierung möglichst gering zu halten, wurde dem PRP 0,1 Units Apyrase/ml PRP zugefügt. Apyrase spaltet anorganisches Phosphat von ATP bzw. ADP ab und verhindert dadurch die Voraktivierung der Blutplättchen. Anschließend wurde das PRP für 10 Minuten bei 190 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde sofort verworfen, und die Thrombozyten wurden am Röhrchenboden als Pellet sichtbar. Das Plättchenpellet wurde noch einmal mit Thrombozyten-Waschpuffer gewaschen. Nach einer erneuten zehnmütigen Zentrifugation bei 190 x g wurde das entstandene Zellpellet je nach benötigter Konzentration in verschiedenen Volumina Resuspensionspuffer aufgenommen.

II.2.2.2.2. Bestimmung der Zellzahl und Zellviabilität

Die isolierten Blutzellen wurden mit Resuspensionspuffer 1:10 verdünnt, und das gleiche Volumen Trypanblau wurde zugegeben. Die so angefärbte Zellsuspension wurde auf eine Neubauer Zählkammer aufgetragen. Unter dem Deckglas erhielt man

so ein definiertes Volumen der Zellsuspension. Zur Ermittlung eines Mittelwertes wurde in zwei Zählkammern die Zellanzahl in jeweils 4 Quadranten bestimmt. Diese Zahl wurde mit dem Verdünnungsfaktor und dem messspezifischen Faktor 80 multipliziert, und man erhielt die absolute Zellanzahl pro μl . Da der Farbstoff von abgestorbenen Zellen aufgenommen wird, konnte auch die Zellviabilität überprüft werden.

II.2.2.3. Mikropartikelgewinnung

Zur Mikropartikelgewinnung wurde neben Trinatriumcitrat auch das Hirudin Analogon Desirudin in einer Konzentration von $1 \mu\text{g/ml}$ in der Blutabnahmespritze vorgelegt. PAP wurde nach dem oben beschriebenen Standardprotokoll gewonnen, wobei statt Apyrase das Prostacyclin Analogon Iloprost (1 ng/ml) dem PRP zugefügt wurde. Jeweils $250 \mu\text{l}$ PAP wurde in ein Eppendorf Reaktionsgefäß überführt und für 30 Minuten bei $18.000 \times g$ zentrifugiert. $225 \mu\text{l}$ vom Überstand wurden vorsichtig abgenommen, das restliche Volumen in $225 \mu\text{l}$ PBS Puffer aufgenommen und erneut 30 Minuten bei $18.000 \times g$ zentrifugiert. Daraufhin wurde das Plasma vollständig abgezogen, und die sich am Gefäßboden befindlichen Mikropartikel in $25 \mu\text{l}$ Resuspensionspuffer aufgenommen. Für die Messung der Entstehung von Faktor Xa wurden $100 \mu\text{l}$ des mikropartikelreichen Resuspensionspuffers pro Ansatz benutzt, entsprechend der Anzahl an Mikropartikeln, die man aus 1 ml PAP gewinnen konnte.

II.2.3. Thrombelastographie

Die Fibrinbildungsrate und das Ausmaß des Gerinnselwachstums wurde mit Hilfe der Rotations-Thrombelastographie bestimmt. Diese Technologie basiert auf einer Messzelle mit einer fixierten Küvette und einem sich darin permanent drehenden Stempel, dessen Bewegung durch ein optisches Detektionssystem erfasst wird. Die zylindrische Küvette wird mit der Blutprobe gefüllt und auf einen Stempel gesetzt, der an das untere Ende einer senkrechten Achse angesteckt ist. Diese Achse rotiert nach links und rechts durch Umdrehungen um einen Winkel von $4,75^\circ$. Die Strahlung einer Dioden-Lichtquelle wird über eine Spiegelplatte, die am oberen Ende der Achse

befestigt ist, abgelenkt. Somit lässt sich über einen lichtempfindlichen Sensor, der die reflektierte Lichtstrahlung registriert, das Ausmaß der Rotation bestimmen (Abb. 4). Die Bewegung ist bei fehlender Gerinnung ungehindert. Sobald sich jedoch ein Gerinnsel bildet und dieses an die umgebenden Oberflächen des Stempels und der Küvette anhaftet, wird die Bewegung behindert. Mit wachsender Festigkeit des Gerinnsels wird die Rotationsamplitude der Achse immer weiter reduziert. Somit ließ sich die Gerinnungszeit (CT = clotting time) und die Thrombuswachstumsrate (CFT = clot formation time), jeweils angegeben in Sekunden, ermitteln (Abb. 5).

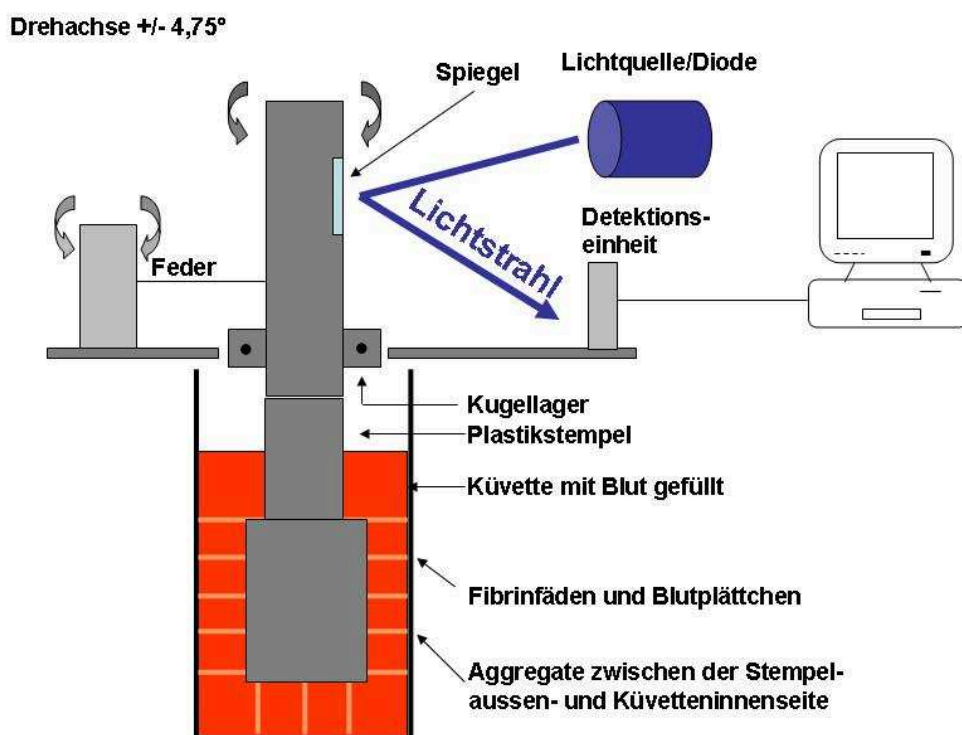


Abb. 4 Prinzip der Rotations-Thrombelastographie

Die mit Blut gefüllte Küvette wird auf einen Stempel gesetzt, der nach links und rechts durch Umdrehungen mit einem Winkel von 4,75° rotiert. Mit Beginn der Gerinnelbildung wird diese Bewegung behindert. Dadurch ändert sich das Ausmaß der Rotation, die durch ein optisches System registriert wird. Mit wachsender Festigkeit des Gerinnsels wird die Rotationsamplitude der Achse immer weiter reduziert.

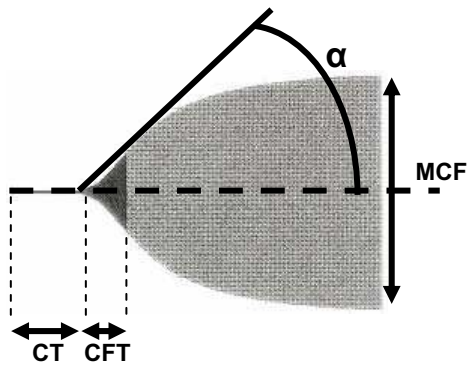


Abb. 5 Beispiel für ein Thrombelastogramm

CT: Zeitspanne vom Startzeitpunkt bis zum Beginn einer signifikant erkennbaren Gerinnungsbildung (initiale Gerinnungsbildungszeit). CFT: Zeitspanne von der initialen Gerinnungsbildung bis zum Erreichen einer Amplitude von 20 mm (gemäß Definition der Gerinnselfestigkeit). α – Winkel: Dieser Parameter ergibt sich durch den Winkel zwischen der Mittellinie und einer Tangente an die Kurve durch den 2 mm Amplitudenpunkt. Er beschreibt die Kinetik der Gerinnungsentstehung. MCF (maximum clot firmness): Dieser Parameter entspricht der maximalen Festigkeit, die das Gerinnsel in der Messung erreicht hat.

Die zylindrische auf 37 °C vorgewärmte Küvette wurde mit jeweils 0,3 ml antikoagulierem VB, PRP oder PAP gefüllt. Um eine Kontaktaktivierung des Blutes zu verhindern, wurde vor Versuchsbeginn corn trypsin inhibitor (CTI), ein Inhibitor des humanen Faktors XIIa in einer Konzentration von 32-50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ hinzugefügt. Der Gerinnungsprozess wurde durch Zugabe von 60 μl einer 100 mM $\text{CaCl}_2/10$ mM Hepes Lösung gestartet.

Je nach Versuchsaufbau wurde rekombinanter TF, die lipidreiche Kernregion eines atherosklerotischen Plaques oder Puffer als Kontrolle kurz vor der Rekalzifizierung des Blutes zugegeben. Im Allgemeinen erfolgte die Messung so lange bis die CFT ermittelt war.

II.2.3.1. Versuchsprotokoll: Einsatz von Antikörpern im TEG

Um die Rolle von TF für die plaqueinduzierte Fibrinbildung zu ermitteln, wurde der monoklonale Anti-TF Antikörper VIC7 eingesetzt. Dieser Antikörper ist gegen eine von Exon 5 kodierte Region der extrazellulären TF Domäne gerichtet. Er erkennt daher ausschließlich full-length TF und nicht die lösliche Splicing Form. Das citrierte VB wurde mit 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Anti-TF Antikörper VIC7 bei 37 °C für 20 Minuten vorinkubiert. Anschließend wurde dieses so vorbehandelte VB in die TEG Küvetten pipettiert, wie

oben beschrieben mit Plaquematerial stimuliert und mit einer CaCl_2 /Hepes Lösung rekalkifiziert. Die Fibrinbildungsrate wurde mittels des Thrombelastographen gemessen. Als Isotyp-Kontrolle wurde jeweils 20 $\mu\text{g/ml}$ Anti-SR-BI Antikörper eingesetzt. Andere im TEG eingesetzte Antikörper, wie z.B. Anti-GPVI Antikörper, Anti-GPIIb-IIIa Antikörper wurden in einer Konzentration von jeweils 10 $\mu\text{g/ml}$ kurz vor der Stimulation des Vollblutes mit dem Plaquematerial in die Küvette gegeben.

II.2.3.2. Versuchsprotokoll: Einsatz von Mikropartikeln im TEG

Um zu klären, ob MP eine Rolle bei der Fibrinstimulation spielen, wurden in PAP gelöste Thrombozyten einmal in Anwesenheit und in einem zweiten Ansatz in Abwesenheit von MP mit Plaquematerial stimuliert. Dafür wurden 2 x 400 ml PAP wie bei der Mikropartikelgewinnung beschrieben hergestellt und für 30 Minuten bei 18.000 x g zentrifugiert. Anschließend wurde aus einer Probe 275 μl vom Überstand abgenommen und dieses nun mikropartikelfreie PAP in eine TEG Küvette überführt. Das PAP der zweiten Probe wurde unmittelbar nach der Zentrifugation wieder resuspendiert, um die MP wieder im PAP zu verteilen. 275 μl dieser Suspension wurden ebenfalls in die TEG Küvette pipettiert. Parallel zur Herstellung des PAP wurden aus dem Vollblut des gleichen Spenders Thrombozyten isoliert. Die aus 2 ml PRP isolierten Thrombozyten wurden in 182 μl Resuspensionspuffer aufgenommen. Jeweils 25 μl davon wurden in die beiden mit PAP gefüllten TEG Küvetten pipettiert. Damit entsprach das Verhältnis von Thrombozyten zu Plasma dem im PRP vorliegenden Quotienten. Anschließend wurden die unterschiedlichen Thrombozytensuspensionen mit jeweils 5 μl Plaquematerial stimuliert, das Plasma wurde mit 60 μl CaCl_2 /Hepes rekalkifiziert, und die Gerinnungszeit im TEG gemessen.

II.2.4. Faktor Xa Bildung

Die TF Aktivität an isolierten Zellen, im PRP und PAP wurde anhand der Faktor Xa Bildung in einem chromogenen Assay bestimmt. Die durch die core region (CR) verschiedener atherosklerotischer Plaques induzierte Steigerung der TF Aktivität

wurde in Thrombozytensuspensionen alleine oder in Thrombozyten-Mikropartikelsuspensionen gemessen. Diesen Zellsuspensionen wurde noch der Gerinnungsfaktor VII zugegeben, so dass der TF-Faktor VIIa Komplex proteolytisch Faktor X zu Xa spalten konnte. Der so gebildete Faktor Xa war nun in der Lage das chromogene Substrat S2222 zu spalten. Dies induzierte eine Absorptionssteigerung bei 405 nm. Die Steigerung der Absorption pro Sekunde war proportional zur Enzymaktivität und wurde mittels eines Photometers gemessen.

Die isolierten Blutkomponenten wurden für 10 Minuten bei 37 °C in 170 µl Resuspensionspuffer zusammen mit 5 µl an Plaquematerial inkubiert. Es wurden dabei $1,5 \times 10^7$ Thrombozyten entsprechend dem Konzentrationsverhältnis im Blut eingesetzt. Zur Kontrolle wurde die CR der verschiedenen Plaques zu 170 µl reinem Resuspensionspuffer ohne jegliche zelluläre Komponente zugegeben, und die Faktor Xa Bildung wurde gemessen. Antikörper und andere Substanzen (Inhibitoren, z.B. FVIIai) wurden kurz vor der Stimulation zugegeben.

Jeweils 50 µl einer 8 mM CaCl_2 Lösung wurden in einer 96 well Platte vorgelegt. Anschließend wurden jeweils 50 µl der mit Plaquematerial stimulierten Zellsuspension in ein well pipettiert. Somit war es möglich, jeden Wert dreifach zu bestimmen und daraus Mittelwert und Standardabweichung zu berechnen. Um die enzymatischen Reaktionen starten zu können, wurden 100 µl Substrat pro Ansatz zugegeben. Dieses setzte sich aus 3370 µl Resuspensionspuffer, 400 µl des chromogenen Substrates S2222 (Endkonzentration: 125 µg/ml) und 225 µl eines Gerinnungsfaktorenkonzentrates zusammen. Dieses Konzentrat enthielt neben 0,88 U/ml Faktor VII auch die Faktoren II, IX, X und die antikoagulatorischen Faktoren Protein C, Antithrombin und Heparin. Nach einer einminütigen Inkubationszeit wurde die Zunahme der optischen Dichte bei 405 nm in fünf aufeinanderfolgenden 360 Sekunden Intervallen mit einem ELISA Reader bestimmt. Um die gemessene optische Dichte in die Aktivitätseinheit U/ml umrechnen zu können, wurde bei jeder Messung eine Standardkurve mittels einer TF Konzentrationsreihe erstellt.

II.2.4.1. Versuchsprotokoll: Coatingversuche mit Anti-TF Antikörper VIC7

Der in den Lipidkernen lokalisierte TF wurde durch Coating mit dem inhibitorischen Anti-TF Antikörper VIC7 inaktiviert. Um die dafür nötige Konzentration an Antikörper

festzulegen, waren Vorversuche notwendig. In mehreren Experimenten wurde diejenige Menge an rekombinantem TF ermittelt, die im VB eine CT von 600-700 Sekunden induzierte. Diese Zeit entsprach den Mittelwerten der CT der Plaques, die im Coating Versuch eingesetzt wurden. Die ermittelte Konzentration an rekombinantem TF betrug 5,36 pg/ml. Anschließend wurde die minimalste Konzentration an Anti-TF Antikörper ermittelt, die die Aktivierung durch 5,36 pg/ml rekombinantem TF gerade noch hemmen konnte. Die durch mehrere TEG Versuche festgestellte Antikörperkonzentration betrug 0,5 µg/ml (Abb. 6). Für die Coatingversuche wurden somit jeweils 2 x 5 µl Plaquematerial mit 0,5 µg/ml Anti-TF Antikörper bei 37 °C für 30 Minuten vorinkubiert. Daraus ergaben sich drei Versuchsansätze. In den ersten zwei Ansätzen wurden $1,5 \times 10^7$ Thrombozyten in 170 µl Resuspensionspuffer mit 5 µl gecoatetem bzw. nicht gecoatetem Plaquematerial bei 37 °C für 10 Minuten stimuliert. Im dritten Ansatz wurden zusätzlich zu den 5 µl gecoatetem Plaquematerial 10 µg/ml Anti-TF Antikörper zugegeben, um die Wirkung des intravaskulären TF zu inhibieren. Bei allen Ansätzen wurde jeweils die Faktor Xa Bildung mittels des ELISA Readers gemessen.

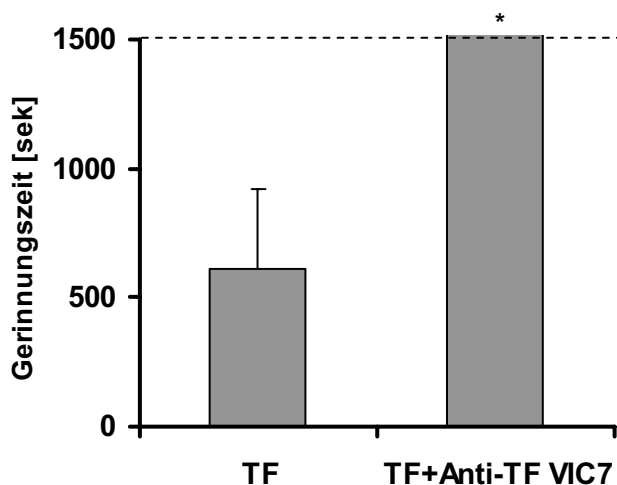


Abb. 6 Bestimmung der adäquaten Antikörperkonzentration für das Coating von Plaque-TF

Die Stimulation von antikoagulierem VB mit 5,36 pg/ml rekombinantem TF führte zu einer Gerinnungszeit von 600 - 700 s. Diese Zeit entsprach den Mittelwerten der CT der Plaques, die im Coating-Experiment eingesetzt wurden. 0,5 µg/ml Anti-TF Antikörper führten zu einer ausgeprägten Hemmung der Fibrinbildung. Die Gerinnungszeit verlängerte sich auf über 1500 s. n=6, *p<0,05 gegenüber TF alleine.

II.2.5. Lipidextraktion

Um die wässrige und die Lipidphase der Kernregionen von atherosklerotischen Plaques in der Thrombelastographie getrennt voneinander einsetzen zu können, wurde eine modifizierte Lipidextraktion nach der Methode von Bligh und Dyer angewandt.

5 µl Plaquematerial wurden zu 95 µl Resuspensionspuffer gegeben. Zur Homogenisierung wurde dieses Gemisch mit zehn kurzen Ultraschallimpulsen bei 4 °C behandelt. Daraufhin wurden 100 µl CHCl₃, versetzt mit BHT (50mg/ml), und 200 µl CH₃OH zugegeben, der Ansatz mit Stickstoff begast, 30 Sekunden gevortext und unter Parafilmverschluss 15 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Nachdem sich eine homogene Phase gebildet hatte, wurden noch 100 µl H₂O und 300 µl CHCl₃ dazupipettiert, mit N₂ begast, 30 Sekunden gevortext und für 10 Minuten bei 10 °C und 2000 x g zentrifugiert. Auf diese Weise bildeten sich zwei Phasen. Die untere, organische Phase wurde mit einer Pasteurpipette vorsichtig abgenommen. Die wässrige Phase wurde noch zweimal mit jeweils 400 µl CHCl₃ unter den gleichen Zentrifugationsbedingungen gewaschen. Die untere Phase wurde gesammelt und unter N₂ Begasung im Wasserbad bei 37 °C eingedampft. Nach dem letzten Waschvorgang wurden die oberen zwei Drittel der oberen Phase abgenommen. Diese wässrige Phase wurde in der Thrombelastographie in gleicher Weise wie oben für die gesamte CR beschrieben eingesetzt, um das Ausmaß der Gerinnungsaktivierung im citrierten VB zu messen. Das Volumen der wässrigen Lösung musste zuvor jedoch in einem Speed Vac Concentrator reduziert werden, um vergleichbare Bedingungen zu erhalten und das zur TEG Messung verwendete Blut nicht zu stark zu verdünnen.

Um auch den Einfluss der Lipidphase auf die Gerinnung zu untersuchen, wurden 500 µl VB 15 Minuten bei 1000 x g zentrifugiert. 150 µl des so entstandenen PAP wurden abpipettiert. Die eingedampfte Lipidphase wurde in 40 µl CHCl₃/CH₃OH (2:1) resuspendiert und dem PAP hinzugefügt. Dieses Gemisch wurde für 2 x 2 Minuten bei 4 °C unter kontinuierlicher N₂ Begasung mit einem Ultraschallhomogenisator behandelt. Um einen Hämatokrit von etwa 50% zu erhalten, wurden 150 µl des bei der Zentrifugation entstandenen Blutzellsediments dem PAP hinzugefügt. Sofort danach wurde dieses Vollblut auf seine Gerinnungsaktivität im TEG überprüft.

II.2.6. Proteinbestimmung mit der BCA-Methode

Zur Erstellung einer Kalibrierkurve wurde ein Standard, bestehend aus einer Konzentrationsreihe von Rinderserumalbumin hergestellt. Jeweils 5 µl des Standards bzw. des zu messenden Proteins wurden in eine 96 Loch-Platte pipettiert, und 25 µl der Lösung A und 200 µl der Lösung B des Biorad BCA Proteinbestimmungsassays zugegeben. Nach einer Inkubation von 8 Minuten bei Raumtemperatur wurde die Absorption photometrisch bei einer Wellenlänge von 700 nm gemessen. Mit Hilfe der Standardkurve konnte der Proteingehalt der einzelnen Proben ermittelt werden.

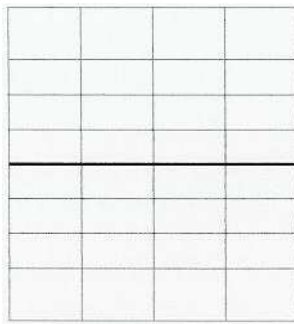
II.2.7 Statistik

Die statistische Signifikanz *p wurde mit der Software Stat Win (Jandel Cooperation) berechnet. Der Vergleich der Mittelwerte erfolgte bei Normalverteilung mit dem t-test oder bei Nicht-Normalverteilung mit dem Mann-Whitney-Rank-Sum-Test. Beim Vergleich von mehr als zwei Gruppen wurde bei Normalverteilung der One-Way-Analysis-of-Variance Test oder bei Nicht-Normalverteilung der Kruskal-Wallis One-Way-Analysis-of-Variance-on-Ranks Test benutzt. Die Werte sind als Mittelwert ± Standardabweichung ausgedrückt. *p-Werte <0,05 wurden als signifikant bezeichnet.

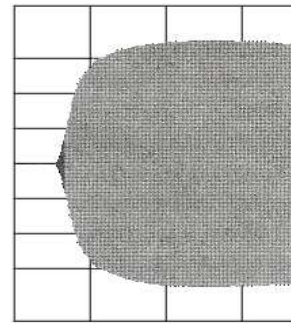
III. Ergebnisse

III.1. Der Lipidkern atherosklerotischer Plaques führt konzentrationsabhängig zur Gerinnungsaktivierung

Die Ruptur eines atherosklerotischen Plaques ermöglicht den Kontakt von Plaquematerial mit Blutbestandteilen und führt damit zur Thrombusbildung. Der lipidreiche Kern weist im Vergleich zu anderen Plaquebestandteilen das stärkste thrombogene Potential auf (Toschi et al. 1997). Um diese Situation in vitro zu reproduzieren, wurde die lipidreiche Kernregion atherosklerotischer Plaques aus dem Bifurkationsbereich der A. carotis communis von 25 Patienten isoliert, und die Homogenate in der Thrombelastographie eingesetzt. Es wurden 0,3 ml antikoaguliertes VB mit jeweils 5 µl Plaquematerial (Feuchtwicht 50 mg/ml) stimuliert. Damit konnte die Zeit, Rate, Festigkeit und Stabilität der Gerinnelbildung bestimmt werden. Die Untersuchungen führten wir in Gegenwart von CTI durch, um die Kontaktaktivierung der Gerinnung zu unterdrücken. Jeder der 25 eingesetzten Plaques führte zu einer rasch einsetzenden Fibrinbildung und zu einem äußerst stabilen Gerinnel im VB (Abb. 7). Jeder Plaque wurde dreimal in jeweils unabhängigen Versuchen zur Stimulation von VB eingesetzt. Das Blut wurde von drei unterschiedlichen gesunden Probanden gespendet. Die Gerinnungszeit streute dabei von minimal 268 ± 45 s bis maximal 964 ± 120 s. Daraus ergab sich ein Mittelwert von 538 ± 180 s (Abb. 8). Das Ausmaß der Gerinnungsaktivierung war abhängig von der Menge des eingesetzten Plaquematerials. Steigerte man die eingesetzte Konzentration des homogenisierten Lipidkerns um das Zehnfache verkürzte sich in einem Beispiel die CT von 778 s auf 542 s (Abb. 9).



CT: >2500 s
Kontrolle



CT: 254 s CFT: 69 s
Lipidkern

Abb. 7 Stimulation von VB im TEG

Citriertes VB wurde mit dem Aliquot eines homogenisierten Lipidkerns eines atherosklerotischen Plaques stimuliert und rekalfiziert (rechts). Zur Kontrolle wurde die gleiche Menge an Puffer zugegeben (links). Es ließ sich dabei eine ausgeprägte Fibrinbildung durch den Plaque nachweisen. CT: clotting time (Gerinnungszeit); CFT: clot formation time (Thrombuswachstumsrate).

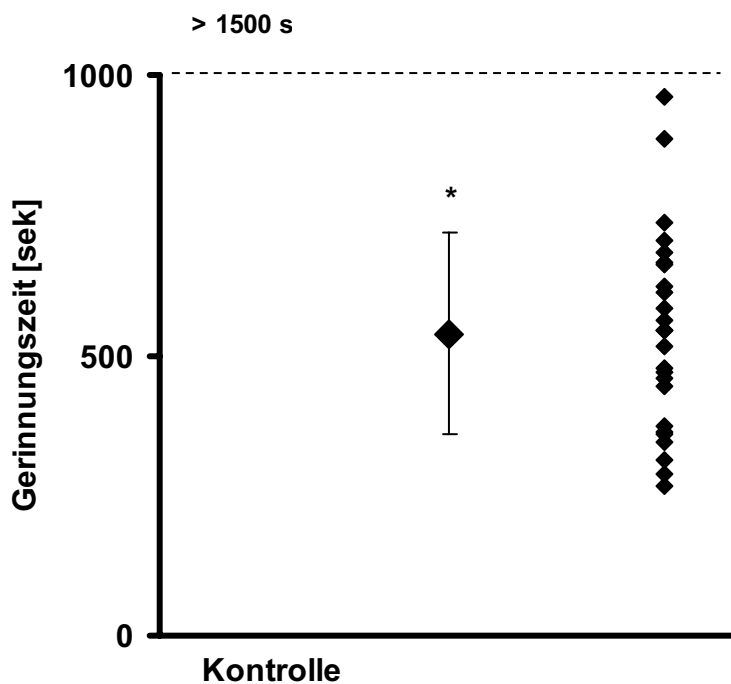
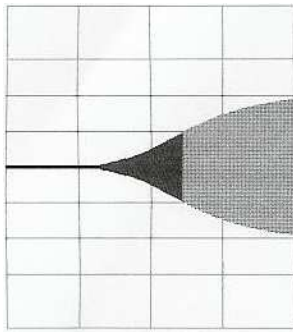
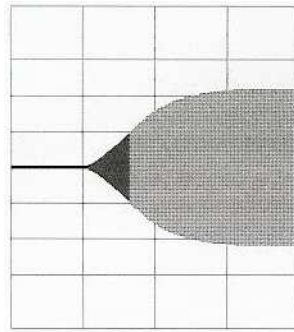


Abb. 8 Stimulation von VB durch Plaquematerial von 25 Patienten

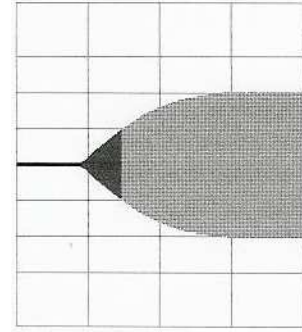
Jeweils 5 μ l der lipidreichen Kernregion der 25 Plaques wurde zu rekalfiziertem VB gegeben. Die Gerinnungszeit eines jeden Plaques wurde dreimalig im VB, gespendet von drei verschiedenen gesunden Probanden gemessen (rechts: Mittelwerte der einzelnen Plaques). Der errechnete Mittelwert aller gemessenen Gerinnungszeiten lag bei 538 ± 180 s (Mitte: Mittelwert der Gerinnungszeiten aller 25 Plaques). $n=3$ (für jeden untersuchten Plaque), $*p<0,05$ gegenüber der Kontrolle.



CT: 778 s CFT: 682 s
1 µl Lipidkern



CT: 648 s CFT: 336 s
5 µl Lipidkern



CT: 542 s CFT: 334 s
10 µl Lipidkern

Abb. 9 Konzentrationsabhängige Gerinnungsaktivierung durch den Lipidkern eines atherosklerotischen Plaques im VB

Je höher die Konzentration des eingesetzten Plaquematerials zur Stimulation von 0,3 ml VB war, desto schneller und ausgeprägter war die gemessene Gerinnungsaktivierung.

III.2. Die plaqueinduzierte Gerinnungsaktivierung ist abhängig von den Thrombozyten

Thrombozyten spielen eine zentrale Rolle bei der Bildung eines intravasalen Thrombus im Bereich eines rupturierten Plaques. Um festzustellen, ob zelluläre Blutbestandteile zur Stimulierung der Fibrinbildung durch die Lipidkerne notwendig sind, führten wir vergleichende TEG Experimente mit PRP und PAP durch. Alle 25 Plaques führten auch im PRP zu einer deutlichen Aktivierung des Gerinnungssystems. Der Mittelwert der CT im PRP lag bei 755 ± 437 s. Die Streubreite der einzelnen Werte war dabei noch ausgeprägter als im VB (Abb. 10). In einem nächsten Schritt entfernten wir mittels verschiedener Zentrifugationsschritte die Thrombozyten aus dem Plasma. Jeweils 0,3 ml des daraus gewonnenen plättchenarmen Plasmas stimulierten wir mit 5 µl Plaquematerial. Der Mittelwert aller im PAP gemessenen Gerinnungszeiten lag bei über 2000 s. Somit sind die Thrombozyten offensichtlich essentiell für eine rasche Gerinnungsaktivierung, was der Vergleich der Gerinnungszeiten in den drei verschiedenen Blutsystemen verdeutlicht (Abb. 11).

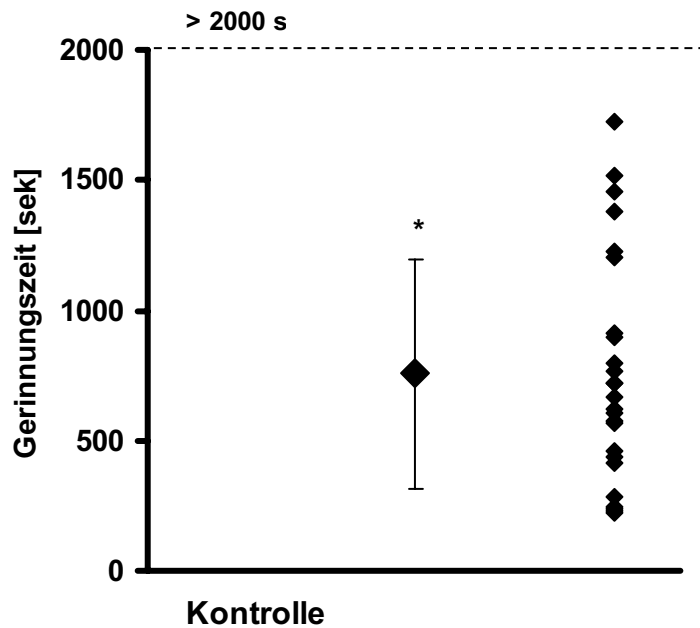


Abb. 10 Stimulation von PRP durch Plaquematerial von 25 Patienten

Jeweils 5 μ l des lipidreichen Kerns von insgesamt 25 Plaques wurden zu 0,3 ml PRP zur Stimulierung der Fibrinbildung gegeben. Es ließ sich auch in diesem Blutsystem eine rasche Aktivierung der Gerinnung nachweisen.

Links: Kontrolle; Mitte: Mittelwert aller Plaques; Rechts: Mittelwerte der einzelnen Plaques, ermittelt aus jeweils drei unabhängigen TEG Versuchen. $n=3$ (für jeden untersuchten Plaque), $*p<0,05$ gegenüber der Kontrolle.

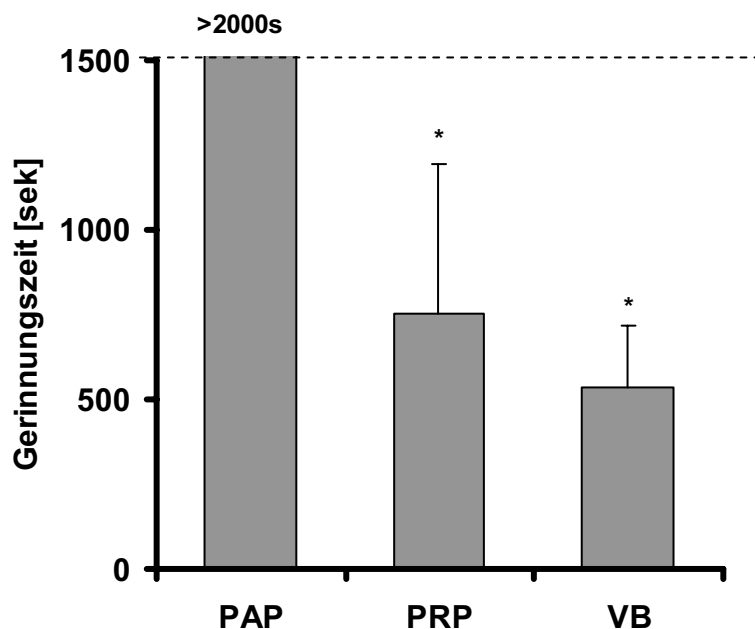


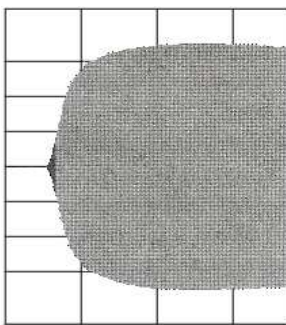
Abb. 11 Vergleich der Gerinnungszeiten im VB, PRP und PPP

0,3 ml des jeweiligen Blutsystems wurden mit 5 μ l des Lipidkerns atherosklerotischer Plaques von 25 verschiedenen Patienten stimuliert. Es zeigte sich eine Verlängerung der Gerinnungszeiten um 217 s im PRP (755 ± 437 s) im Vergleich zum VB (538 ± 180 s). Mit über 2000 s lagen die im PAP gemessenen Zeiten deutlich oberhalb der in den anderen Blutsystemen (VB und PRP) erzielten Werte. $n=3$ (für jeden untersuchten Plaque), $*p<0,05$ gegenüber PAP.

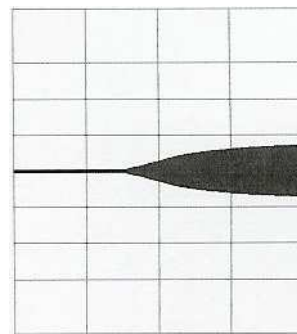
Betrachtete man nun aber die einzelnen im PAP ermittelten Gerinnungszeiten, so zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Plaques.

44% der untersuchten 25 Plaques zeigten im Vergleich zur Kontrolle auch im plättchenarmen Plasma eine Aktivierung der Fibrinbildung. Die maximale Festigkeit dieser Gerinnung im PAP lag jedoch deutlich unterhalb der Festigkeit, die durch die Stimulation mit den gleichen Plaques im VB bzw. PRP erreicht wurde. Die maximale Gerinnungsfestigkeit lag z.B. bei einem Plaque gemessen im VB bei 63 mm, im Vergleich dazu im PRP bei 17 mm (Abb. 12). Die Gruppe von Plaques, mit denen sich Gerinnungszeiten unter 1200 s im PAP erreichen ließen, wurde definitionsgemäß als PAP(+) Gruppe bezeichnet. Der Mittelwert der im PAP gemessenen Gerinnungszeiten lag für diese Gruppe bei 732 ± 456 s.

Die restlichen 56% der Plaques wiesen im PAP keine koagulatorische Aktivität auf. (Gerinnungszeit > 3400 s). Diese Werte sind vergleichbar mit den Kontrollwerten, die wir durch Zugabe von Puffer zu PAP erhielten, so dass man davon ausgehen muss, dass für diese Gruppe die Anwesenheit von Thrombozyten essentiell ist zur Gerinnungsaktivierung. Daher wurde diese Gruppe definitionsgemäß als PAP(-) Gruppe bezeichnet (Abb. 13).



CT: 254 s CFT: 69 s MCF: 63 mm
VB



CT: 935 s CFT: >4082 s MCF: 17 mm
PAP

Abb. 12 Vergleich der Gerinnungsfestigkeit im VB und PAP

Sowohl im VB als auch im PAP führte der Einsatz von einigen Plaques zur verstärkten Gerinnungsaktivierung im Vergleich zur Kontrolle. Die CT im PAP war jedoch mehr als dreimal so lang wie die im VB gemessene Gerinnungszeit. Auch die maximale Festigkeit des Gerinnungsfestigkeit im PAP war wesentlich geringer als die im VB erzielte.

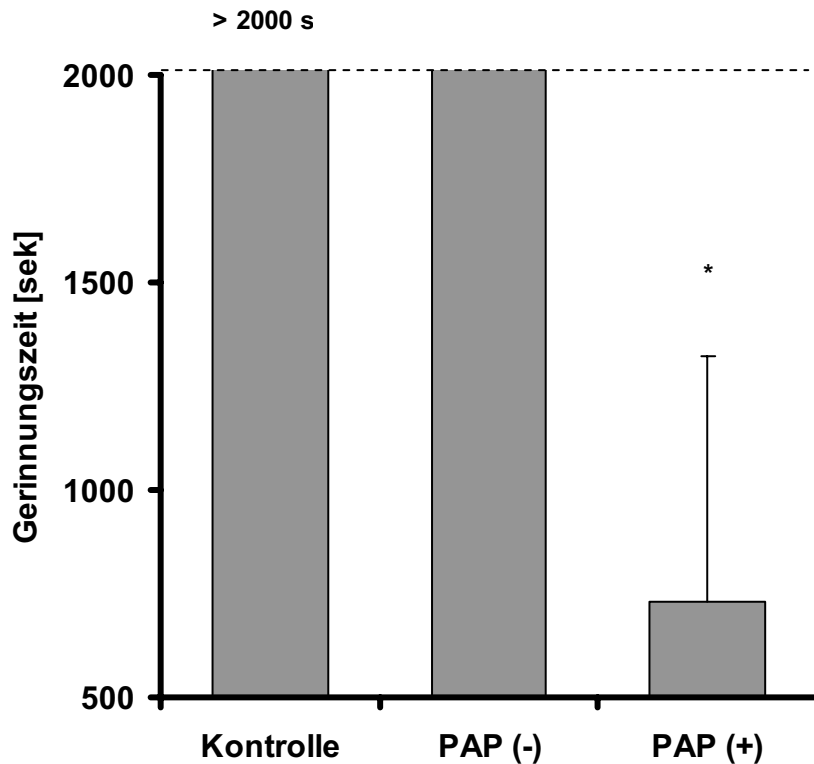
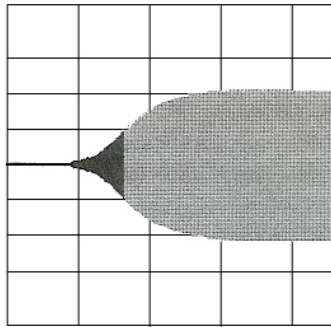


Abb. 13 Vergleich der PAP (+) und PAP (-) Gruppe

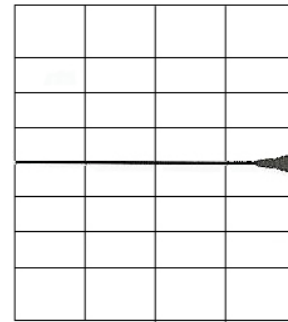
Die Messungen der Gerinnungszeiten im PAP ergaben zwei Gruppen: die PAP(+) Gruppe (11 Plaques) führte auch im PAP zu einer schnellen Stimulation der Gerinnung (rechte Säule, Mittelwert 732 ± 456 s); die PAP(-) Gruppe (14 Plaques) wies ebenso wie die Kontrolle keine Gerinnungsaktivierung im PAP auf. $n=3$ (für jeden untersuchten Plaque), $*p<0,05$ gegenüber der Kontrolle und der PAP(-) Gruppe.

III.3. Die Gerinnungsaktivierung durch atherosklerotische Plaques ist abhängig von TF

Der Komplex aus TF und Faktor VIIa gilt als zentraler Initiator der physiologischen Gerinnung. In weiteren Experimenten wurde untersucht, ob die Fibrinbildung nach Zugabe der Lipidkerne durch TF gestartet wird. Daher inkubierten wir vor Stimulation das VB mit $20 \mu\text{g/ml}$ des Anti-TF Antikörpers VIC7, der ausschließlich full-length TF erkennt. Der Antikörper konnte die Gerinnungsaktivierung durch die Mehrzahl der Plaques hemmen (Abb. 14 – Abb. 16).



CT: 539 s CFT: 440 s
Lipidkern



CT: 2041 s CFT: 560 s
Lipidkern + Anti-TF VIC7

Abb. 14 Hemmung der plaqueinduzierten Fibrinbildung im VB

Jeweils 0,3 ml citriertes VB wurden mit 20 µg/ml Anti-TF Antikörper VIC7 20 Minuten vorinkubiert. Danach wurden beide Proben mit 5 µl Plaquematerial stimuliert. Die Gerinnungszeit wurde durch den Antikörper um 1502 s verlängert.

Um nachzuweisen, dass der erzielte Effekt nicht eine unspezifische Antikörperwirkung war, wurde ein Isotyp-Antikörper eingesetzt. Bei 76% der Fälle war eine starke Hemmung der Fibrinbildung nach Zugabe des Anti-TF Antikörpers VIC7 festzustellen (Abb.15) Bei 24% der 25 Plaques wurde keine signifikante Verlängerung der Gerinnungszeit beobachtet (Abb.16). Diese 6 Plaques gehörten ausschließlich zur PAP(-) Gruppe. Mit Hilfe der TEG Experimente erhielten wir daher drei verschiedene Gruppen: die PAP(+) Gruppe (11 Plaques), die auch in Abwesenheit von Blutplättchen die Fibrinbildung stimulierten, die PAP(-) Gruppe (8 Plaques) und die TF unabhängige Gruppe (6 Plaques).

Vergleicht man die Abbildungen 15 und 16, so ist zu erkennen, dass die PAP(+) und die PAP(-) Gruppe die Fibrinbildung stärker stimulierten als die TF unabhängige Gruppe. Der Mittelwert aller gemessenen Gerinnungszeiten der TF unabhängigen Gruppe war mit 1243 ± 282 s wesentlich länger als der Mittelwert der PAP(-) und PAP(+) Gruppe mit 956 ± 239 s.

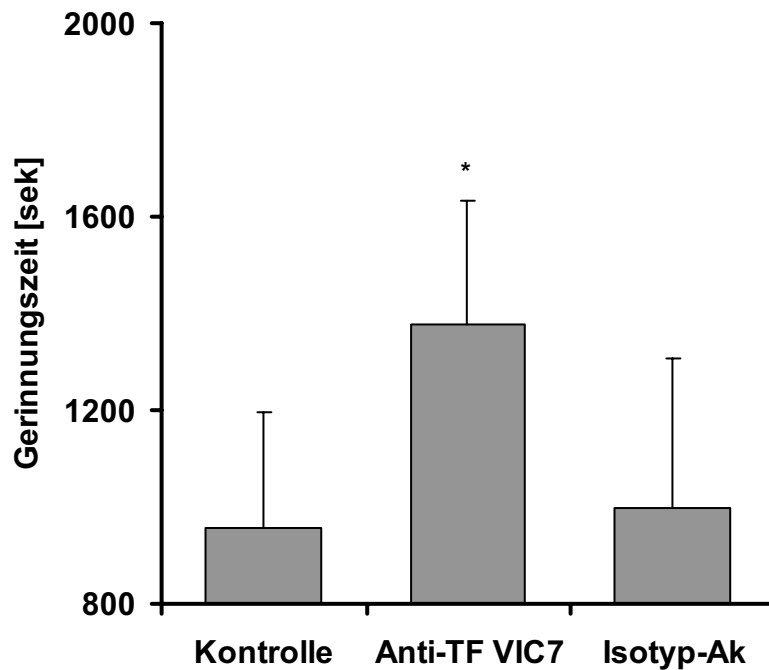


Abb. 15 TF-abhängige Gerinnungsaktivierung

Die Stimulation der Fibrinbildung konnte bei 76% der untersuchten Lipidkerne durch die Vorinkubation des VB mit 20 µg/ml Anti-TF Antikörper VIC7 gehemmt werden. Die Gerinnungszeit verlängerte sich von 956 ± 239 s bei Stimulation des VB mit 5 µl Plaquematerial auf 1376 ± 259 s durch Zugabe des Antikörpers. Der Einsatz eines unspezifischen Antikörpers ergab eine Gerinnungszeit von 999 ± 309 s. n=3 (für jeden untersuchten Plaque), *p<0,05 gegenüber Kontrolle und Isotyp-Ak.

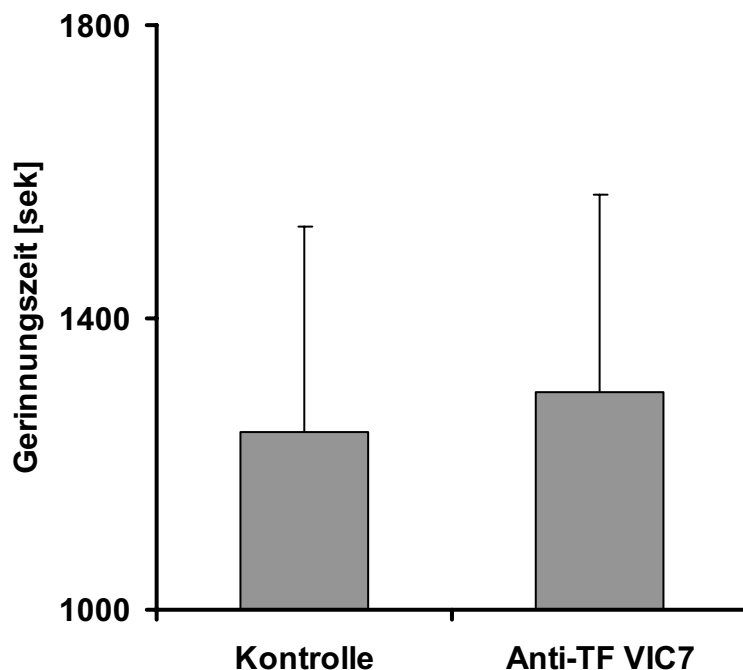


Abb. 16 TF-unabhängige Gerinnungsaktivierung

6 der insgesamt 25 untersuchten Plaques zeigten eine TF unabhängige Stimulierung der Fibrinbildung. Die linke Säule zeigt die gemessenen Gerinnungszeiten nach Zugabe von 5 µl homogenisierten Lipidkerns zu 0,3 ml VB. Die rechte Säule zeigt, dass die im TEG gemessene CT trotz Vorinkubation des VB mit 20 µg/ml Anti-TF Antikörpers VIC7 nicht verlängert war. Linke Säule: 1243 ± 282 s; rechte Säule: 1299 ± 268 s. n=3 (für jeden untersuchten Plaque)

III.4. TF-Gehalt der Lipidkerne atherosklerotischer Plaques

In den Lipidkernen aller 25 Plaques wurde die TF Konzentration mit Hilfe eines double sandwich ELISA ermittelt. Wir konnten aufgrund der Spezifität der eingesetzten Antikörper davon ausgehen, dass der ELISA ausschließlich die full length Form des TF erkennt und nicht die alternative Splicing-Form. Die untere Nachweisgrenze für TF lag bei 30 pg/ml. In einigen Plaques ließ sich kein TF nachweisen, während in anderen Fällen relativ hohe Konzentrationen mit bis zu 2660 pg/ml bestimmt wurden. Vergleicht man nun den TF Gehalt der PAP(+) Gruppe mit dem der PAP(-) Gruppe, so zeigten sich deutliche Unterschiede. In der PAP(+) Gruppe lag die Konzentration mit einem Mittelwert von 1614 ± 603 pg/ml wesentlich höher als in der PAP(-) Gruppe, bei der sich ein Wert von 594 ± 535 pg/ml ergab (Abb. 17). Allein bei 3 Plaques der PAP(-) Gruppe ließ sich kein TF nachweisen. Bei den 6 Plaques der TF unabhängigen Gruppe ließ sich auch ein relativ hoher TF Gehalt von 1157 ± 372 pg/ml nachweisen. Dieser TF schien nicht funktionell aktiv zu sein, da die plaqueinduzierte Gerinnungsaktivierung im TEG durch Einsatz des Anti-TF Antikörpers VIC7 nicht hemmbar war.

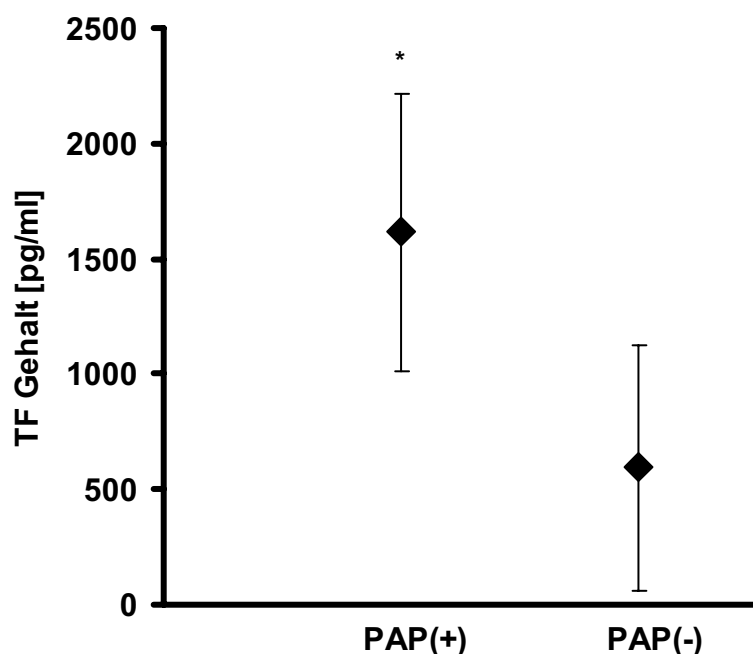


Abb. 17 TF Gehalt im Lipidkern atherosklerotischer Plaques

Der TF Gehalt wurde mit einem double sandwich ELISA bestimmt. Die Nachweisgrenze lag bei 30 pg/ml. Die Plaques, die auch im PAP zu einer ausgeprägten Stimulation der Fibrinbildung führten (links: PAP(+) Gruppe; 1614 ± 603 pg/ml) enthielten mehr TF als die PAP(-) Gruppe (rechts; 594 ± 535 pg/ml). * $p < 0,05$ gegenüber PAP(-).

III.5. Atherosklerotische Plaques führen durch eine Thrombozytenaktivierung zu einer Steigerung der TF Aktivität

TF konnte nicht nur innerhalb von Gefäßwänden, sondern auch assoziiert mit Blutzellen und Mikropartikel nachgewiesen werden (intravaskulärer TF). Daher wollten wir in weiteren funktionellen Experimenten erfassen, welche Rolle der intravaskuläre TF bei der pathologischen Gerinnung spielt. Dafür inkubierten wir Thrombozyten für 20 Minuten bei 37 °C mit jeweils 5 µl der Lipidkernhomogenate. Anschließend bestimmten wir die TF Aktivität über die Messung der Faktor Xa Bildung. Für diese Experimente setzten wir nur Plaques der PAP(+) und PAP(-) Gruppe ein. Die Plaques führten in Abwesenheit von Thrombozyten nur zu einer geringen Faktor Xa Bildung, obwohl alle für die Faktor Xa Bildung notwendigen Gerinnungsfaktoren in dem von uns eingesetzten Konzentrat enthalten waren. Ebenso wiesen unstimulierte Blutplättchen nur eine geringe TF Aktivität auf. Die Stimulation der Thrombozyten mit den Lipidkernen führte jedoch zu einer ausgeprägten Zunahme der Faktor Xa Bildung um das 14 fache in der PAP(-) Gruppe und um das 23 fache in der PAP(+) Gruppe (Abb. 18 und 19). Um nachzuweisen, dass die gemessene Faktor Xa Bildung auf die Aktivität des TF zurückzuführen ist, setzten wir der Blutzellsuspension kurz vor Stimulation jeweils 10 nM des Faktors VIIai zu. Dieser im aktiven Zentrum inaktivierte Faktor VIIa (FVIIai) bindet mit einer höheren Affinität an TF als Faktor VIIa und verhindert dadurch eine Aktivierung des Starterkomplexes der Blutgerinnung. Es zeigte sich ein drastischer Rückgang der Faktor Xa Bildung auf Höhe der Kontrollwerte. Eine etwas geringere Abnahme der TF Aktivität erzielten wir mit dem Prostacyclin-Analagon Iloprost. In der PAP(-) Gruppe verminderte sich die TF Aktivität um 69% und in der PAP(+) Gruppe um 50%.

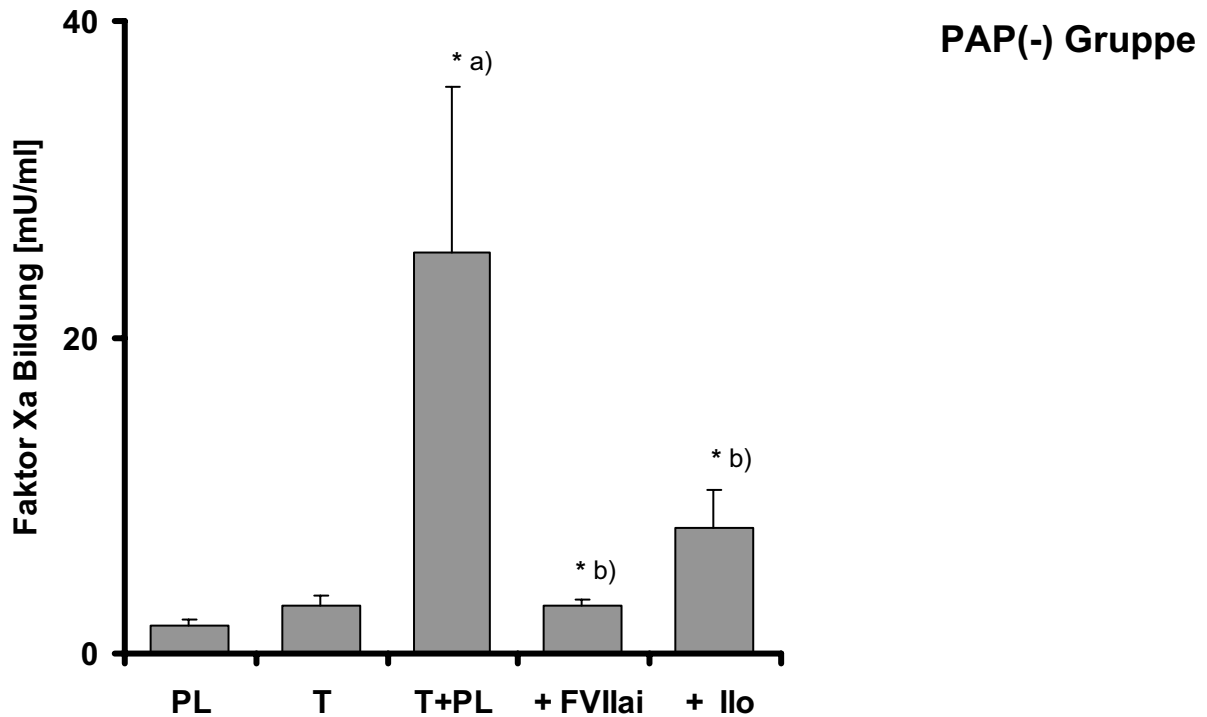


Abb. 18 Stimulation von Thrombozyten mit Plaques der PAP(-) Gruppe

Jeweils $1,5 \times 10^7$ Thrombozyten (T) wurden für 20 Minuten bei 37 °C mit dem Lipidkern eines Plaques (PL) der PAP(-) Gruppe stimuliert. Dabei kam es zu einer Steigerung der Faktor Xa Bildung um das 14 fache auf $25,4 \pm 10,4$ mU/ml. 10 nM des inaktivierten Faktors VIIa (FVIIai) führte zu einer Reduktion um 88% auf $3,0 \pm 0,4$ mU/ml. Mit dem Prostacyclin Analogon Iloprost (Ilo, 100 ng/ml) sank die Faktor Xa Bildung um 69% auf $7,9 \pm 2,4$ mU/ml. n=3 (für jeden untersuchten Plaque), *p<0,05 a) gegenüber PL und T, b) gegenüber T+PL.

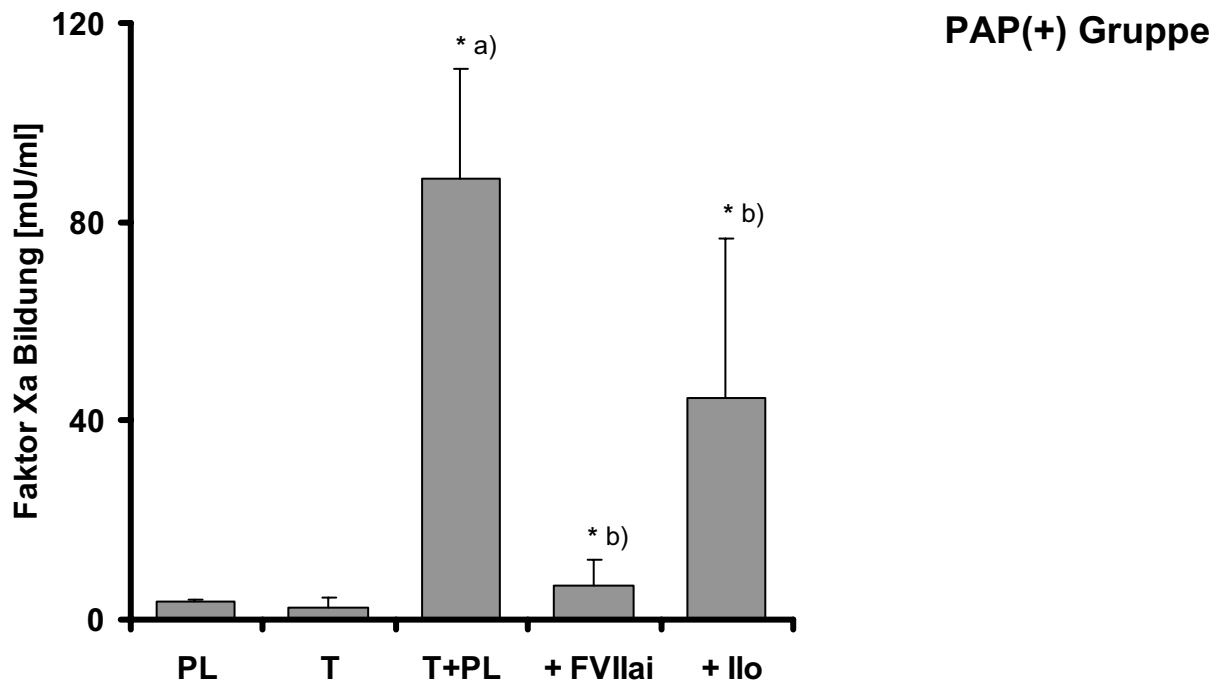


Abb.19 Stimulation von Thrombozyten mit Plaques der PAP(+) Gruppe

Die Stimulation von $1,5 \times 10^7$ Thrombozyten (T) durch die Lipidkerne der PAP(+) Gruppe (PL) steigerte ebenfalls die Faktor Xa Bildung auf $88,5 \pm 22,1$ mU/ml. 10 nM FVIIai reduzierte diesen Wert um 92% auf $6,8 \pm 5,2$ mU/ml und 100 ng/ml Iloprost (Ilo) führte zu einer Senkung der TF Aktivität auf die Hälfte. n=3 (für jeden untersuchten Plaque), *p<0,05 a) gegenüber PL und T, b) gegenüber T+PL.

In weiteren Experimenten wurde die Beteiligung von Rezeptoren der Thrombozytenoberfläche am plaqueinduzierten Gerinnungsstart getestet. Ein Antikörper, der gegen den Kollagenrezeptor GPVI gerichtet war, hemmte die prokoagulatorische Aktivität um 38% (Abb. 20). Der Einsatz eines unspezifischen Antikörpers als Kontrolle führte zu keiner Veränderung. Einen ähnlichen Effekt konnten wir mit Hilfe der Thrombelastographie demonstrieren. Der Einsatz von 10 µg/ml eines Anti-GPVI Antikörpers verlängerte die Gerinnungszeit um 64%. Auch die Hemmung des GPIIb-IIIa Rezeptors, der über Bindung an Fibrinogen zu einer Quervernetzung von Blutplättchen führt, reduzierte die Fibrinbildung. Die Gerinnungszeit verlängerte sich nach Zugabe von 10 µg/ml eines Anti-GPIIb-IIIa Antikörpers um 55%. Ebenso nahm die maximale Gerinnselfestigkeit (MCF) von 44 ± 4 mm um mehr als die Hälfte auf 19 ± 6 mm ab. In einem weiteren Versuchsansatz gaben wir jeweils 5 µg/ml beider Antikörper gleichzeitig vor Stimulation zum VB. Die Inhibierung beider Thrombozytenrezeptoren resultierte in eine Verlängerung der Gerinnungszeit um 74% von 884 ± 286 s auf 1540 ± 207 s (Abb. 21).

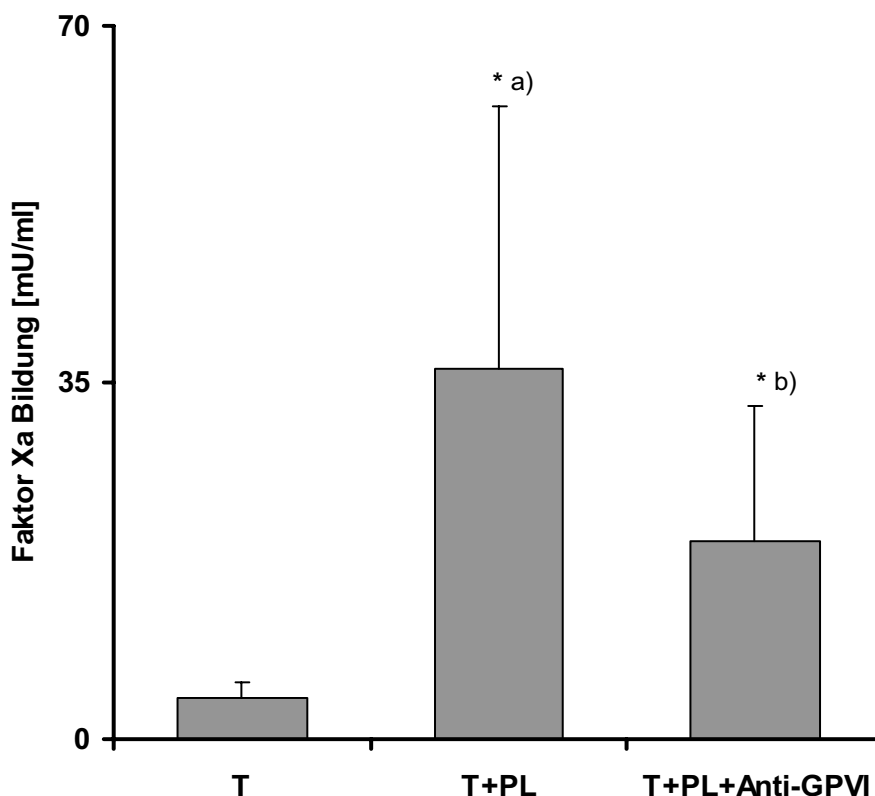


Abb. 20 Hemmung der TF Aktivität durch Anti-GPVI Antikörper

Zur Steigerung der TF Aktivität stimulierten wir $1,5 \times 10^7$ Thrombozyten (T) mit 5 µl des homogenisierten Lipidkernmaterials (PL) der PAP(-) Gruppe. Eine Blockierung der GPVI Rezeptoren mit spezifischen Antikörpern reduzierte die Faktor Xa Bildung von $32,5 \pm 23,1$ mU/ml auf $20,1 \pm 13,5$ mU/ml. n=12, *p<0,05 a) gegenüber T, b) gegenüber T+PL.

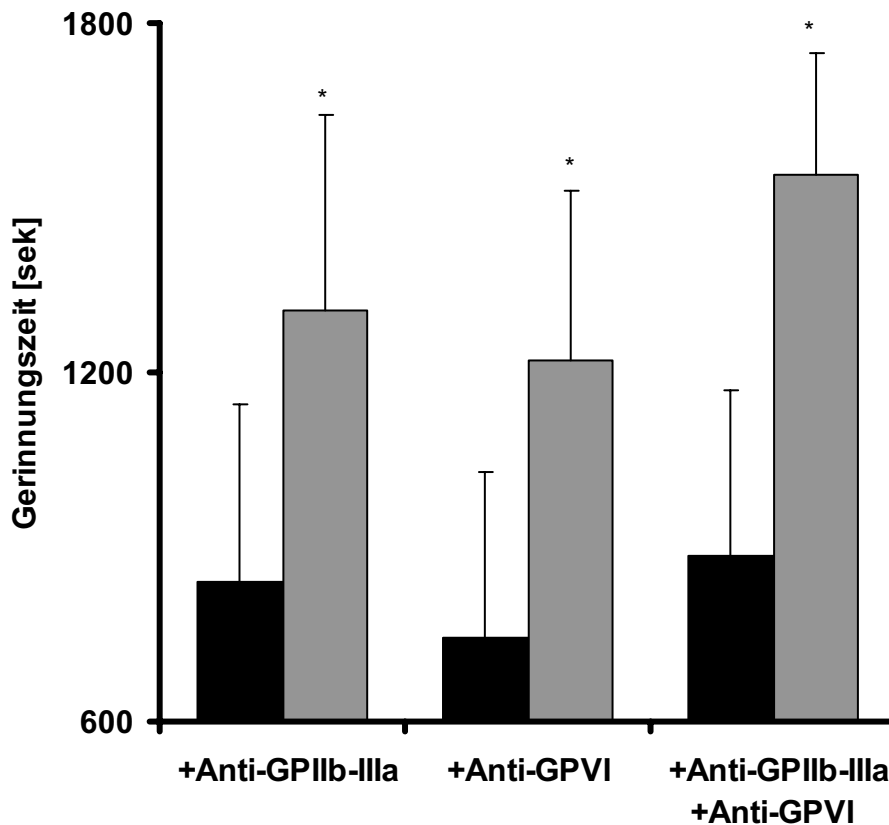


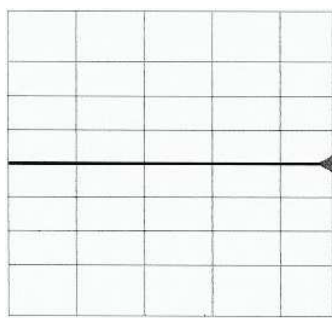
Abb. 21 Hemmung der Fibrinstimulation durch Anti-GPVI- und Anti-GPIIb-IIIa Antikörper

0,3 ml VB wurden mit jeweils 5 µl Plaquematerial stimuliert (schwarzer Balken: Kontrolle). Kurz vor Stimulation wurden jeweils 10 µg/ml eines Anti-GPIIb-IIIa Antikörpers bzw. eines Anti-GPVI Antikörpers zum VB gegeben. Durch den Einsatz von Antikörpern tendierte die Gerinnungszeit zu höheren Werten (von 841 ± 306 s auf 1306 ± 338 s bzw. von 744 ± 286 s auf 1220 ± 293 s). Zu einer noch stärkeren Hemmung der Fibrinbildung führte der gleichzeitige Einsatz von jeweils 5 µg/ml beider Antikörper: Die CT verlängerte sich von 884 ± 286 s auf 1540 ± 207 s. n=3 (für jeden untersuchten Plaque), *p<0,05 gegenüber Kontrolle.

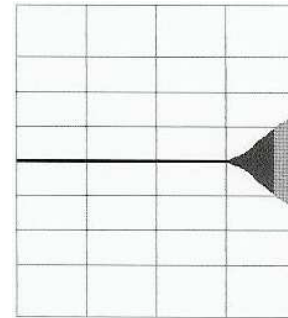
III.6. MP steigern die TF Aktivität in Gegenwart plaquestimulierter Thrombozyten

TF ist unter physiologischen und pathologischen Bedingungen auch in zirkulierenden MP des Plasmas lokalisiert. MP sind Fragmente der Zellmembran (<1 µm), die durch Exozytose entstehen und vor allem bei Zellaktivierung und während der Apoptose gebildet werden. Das in Abbildung 22 dargestellte Experiment zur Fibrinbildung im PAP demonstriert die Bedeutung der MP für die Stimulation der Fibrinbildung. Wir entfernten aus plättchenarmen Plasma die MP durch zwei Zentrifugationsschritte. Danach wurde dem mikropartikelfreien Plasma wieder die ursprüngliche Menge an Thrombozyten zugeführt. In einem zweiten Ansatz wurden vor der Stimulation dem mikropartikelfreien Plasma die isolierten MP wieder zugeführt. Die MP führten zu

einer 33%igen Verkürzung der Gerinnungszeit. Um zu überprüfen, ob dieser Effekt auf einer Steigerung der TF Aktivität beruht, führten wir mit Plaques der PAP(-) und der PAP(+) Gruppe Faktor Xa Bildungsversuche durch. Die Stimulation eines Gemisches aus Thrombozyten und MP im Vergleich zu einer alleinigen Stimulation der Blutzellen führte zu einem zusätzlichen Anstieg der Faktor Xa Bildung um 28% in der PAP(+) Gruppe und um 89% in der PAP(-) Gruppe. Abbildung 23 zeigt die Ergebnisse der PAP(-) Gruppe.



CT: 2740 s CFT: >98 s
PAP (-MP) + T + PL



CT: 1827 s CFT: 377 s
PAP (+MP) + T + PL

Abb. 22 MP führen zu einer Steigerung der Fibrinbildung

Mikropartikelreies und mikropartikelhaltiges thrombozytenreiches (T) Plasma [PAP] wurde mit jeweils 5 µl Plaquematerial (PL) stimuliert. Mikropartikel führten zu einer 33%igen Verkürzung der Gerinnungszeit.

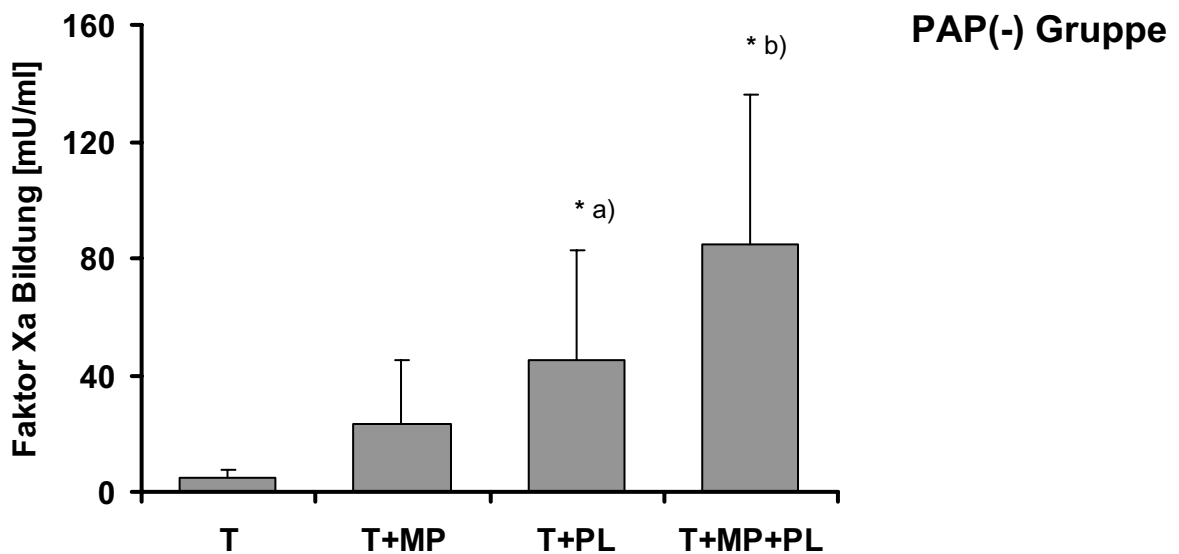


Abb. 23 Plaques steigern die TF Aktivität in Plättchen-Mikropartikel Suspensionen

$1,5 \times 10^7$ Thrombozyten (T) wurden alleine und zusammen mit MP mit jeweils 5 µl Plaquematerial (PL) für 20 Minuten bei 37 °C stimuliert. In der PAP(-) Gruppe führte der Einsatz von MP zur Steigerung der TF Aktivität um 89%. n=6, *p<0,05 a) gegenüber T, b) gegenüber T+MP.

III.7. Die prokoagulatorische Aktivität von TF ist abhängig von einer PS-reichen Zelloberfläche

Während der Aktivierung von Thrombozyten werden negativ geladene Phospholipide wie PS auf der Zelloberfläche exponiert, welche die Bindungsfähigkeit für plasmatische Gerinnungsfaktoren steigern. Daher wurde geprüft, ob die plaquebedingte Steigerung der TF Aktivität abhängig ist von der Exposition von PS. Einer Suspension aus $1,5 \times 10^7$ Thrombozyten wurde jeweils vor Plaquestimulation Annexin V in einer Konzentration von $0,1 \mu\text{M}$ und $1,0 \mu\text{M}$ zugegeben. Annexin V ist ein Ca^{2+} abhängiges, Phospholipid-bindendes Protein mit einer hohen Affinität für PS. Wir konnten dabei einen konzentrationsabhängigen Abfall der TF Aktivität feststellen. $0,1 \mu\text{M}$ Annexin führte zu einer Reduktion der Faktor Xa Bildung um 59%. Die zehnfache Annexin Konzentration ($1,0 \mu\text{M}$) verminderte die Faktor Xa Bildung um 90% auf $4 \pm 1,3 \text{ mU/ml}$. Dies entsprach nahezu dem Wert von nichtstimulierten Thrombozyten mit $2,7 \pm \text{mU/ml}$ (Abb. 24).

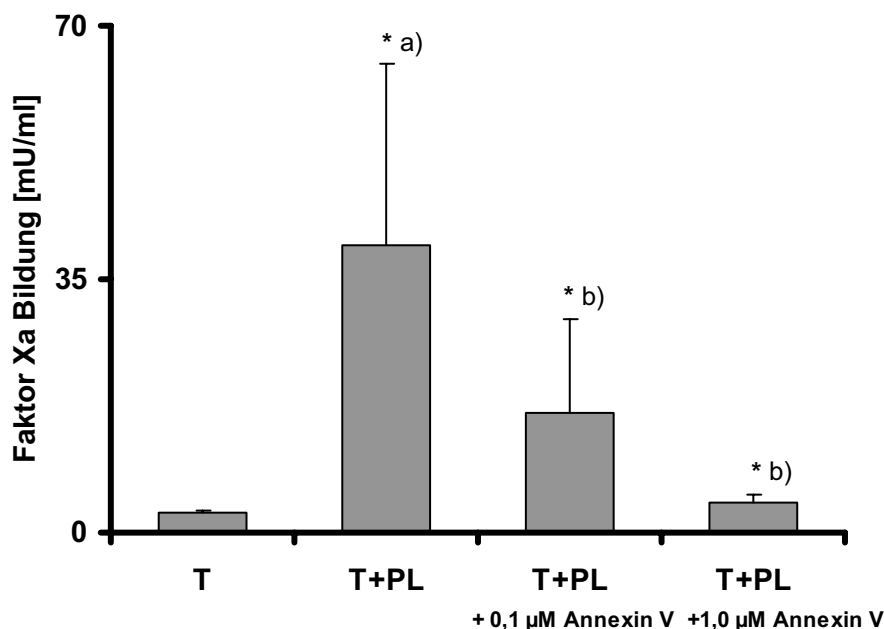


Abb. 24 TF Aktivität ist abhängig von einer PS-reichen Thrombozytenoberfläche

Jeweils $1,5 \times 10^7$ Thrombozyten (T) wurden mit $5 \mu\text{l}$ Lipidkernhomogenat (PL) stimuliert. In zwei Ansätzen wurde zusätzlich Annexin V in einer Konzentration von $0,1 \mu\text{M}$ und $1,0 \mu\text{M}$ zugegeben. Dies führte zu einer Verminderung der Faktor Xa Bildung von 59% bzw. 90%. $n=7$, $*p<0,05$ a) gegenüber T, b) gegenüber T+PL.

III.8. Atherosklerotische Plaques führen zur Aktivierung des intravaskulären TF

Um die Anteile von Gefäßwand-TF und thrombozytärem TF an der plaqueinduzierten Gerinnungsaktivierung zu ermitteln, wurde der in den Lipidkernen lokalisierte TF durch Coating mit dem inhibitorischen Anti-TF Antikörper VIC7 inaktiviert. Die für das Coating nötige Konzentration an Antikörper konnte in Vorversuchen ermittelt werden: 0,5µg/ml Anti-TF Antikörper VIC7 konnte die Menge an rekombinantem TF hemmen, die eine den Plaques vergleichbare CT von 600-700 Sekunden in VB Experimenten im TEG erzielte. Somit wurden zum Coating 0,5 µg/ml Anti-TF Antikörper VIC7 für 30 Minuten bei 37 °C mit Plaquematerial inkubiert. Mit diesem gecoateten Plaque stimulierten wir $1,5 \times 10^7$ Thrombozyten und bestimmten anschließend die Faktor Xa Bildung. Als Kontrolle diente die Stimulierung der gleichen Menge an Thrombozyten durch unbehandeltes Plaquematerial. Das Coating des Gefäßwand-TF führte zu einer Reduktion der Faktor Xa Bildung von $54,1 \pm 25,4$ mU/ml auf $32,9 \pm 20$ mU/ml (61% des Kontrollwertes). Trotz Hemmung der funktionellen Aktivität des im Plaque lokalisierten TF, konnten wir eine ausgeprägte TF Aktivität durch die Stimulation der Thrombozyten messen. Dies legt nahe, dass der intravaskuläre TF für die plaqueinduzierte Gerinnungsaktivierung von Bedeutung ist. In einem dritten Ansatz wurde vor Stimulation der Thrombozyten mit dem gecoateten Plaque zusätzlich 10 µg/ml Anti-TF Antikörper VIC7 zugegeben, um die Wirkung des intravaskulären TF zu hemmen. Die Inhibierung des intravaskulären TF führte zusätzlich zu einem starken Rückgang der Faktor Xa Bildung auf 12,8% des Kontrollwertes. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass der intravaskuläre TF deutlich an der durch Plaques induzierten Gerinnungsaktivierung beteiligt ist (Abb. 25).

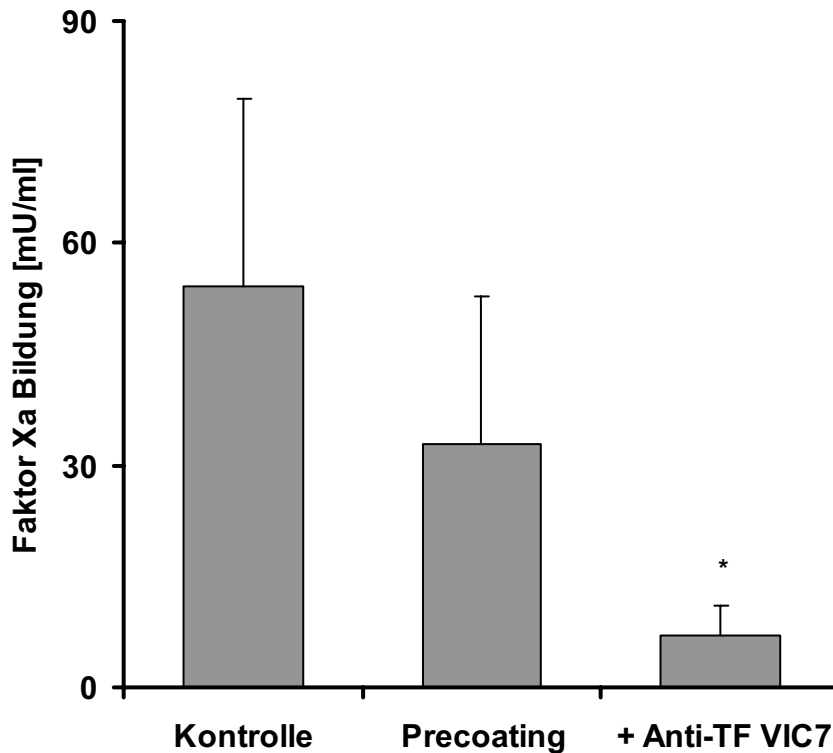


Abb. 25 Atherosklerotische Plaques aktivieren den intravaskulären TF

Jeweils $1,5 \times 10^7$ Thrombozyten wurden pro Versuchsansatz mit 5 μ l gecoatetem Plaque stimuliert. Als Kontrolle diente die Stimulation mit unbehandeltem Plaquematerial. Beim Precoating wurde vor Stimulation 5 μ l Plaquematerial mit 0,5 μ g/ml Anti-TF Antikörper VIC7 für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert, um den Plaque-TF zu hemmen. Es zeigte sich eine verminderte Faktor Xa Bildung (61% des Kontrollwertes). Die zusätzliche Hemmung des intravaskulären TF mit 10 μ g/ml Anti-TF Antikörper VIC7 reduzierte die Faktor Xa Bildung auf 12,8% des Kontrollwertes. n=10, *p<0,05 gegenüber precoating und Kontrolle.

III.9. Lipidphase und wässrige Phase atherosklerotischer Kernregionen tragen zur Gerinnungsaktivierung bei

Der atheromatöse Lipidkern gelangt nach Plaqueruptur und dem damit verbundenen Wegfall der schützenden fibrösen Kappe in direkten Kontakt mit dem zirkulierenden arteriellen Blut. Es ist noch nicht vollständig geklärt, welche Bestandteile des Lipidkerns für dessen Thrombogenität verantwortlich sind. In einem weiteren Versuchsaufbau wollten wir daher feststellen, welche Komponenten der von uns untersuchten Lipidkerne die Gerinnungsparameter im Vollblut am stärksten beeinflussen. Wir trennten mit Hilfe der Blich und Dyer Methode die Lipidkernhomogenate der PAP(-) Gruppe in eine wässrige- und eine Lipidphase. Anschließend stimulierten wir 0,3 ml antikoaguliertes VB mit Aliquots der jeweiligen Phase und bestimmten die Gerinnungszeit. Bei 25% der untersuchten Plaques führte

die Lipidphase zu einer kürzeren Gerinnungszeit als die wässrige Phase. Die Gerinnungsaktivierung durch diese Plaques ist in Abbildung 26 dargestellt. Die Lipidphase dieser Plaques der PAP(-) Gruppe führte zu nahezu der gleichen CT wie das gesamte Lipidkernhomogenat. Im Vergleich dazu zeigte die Stimulation mit der wässrigen Phase eine etwa doppelt so lange Gerinnungszeit. Bei weiteren 25% war die Gerinnungsaktivierung durch die wässrige Phase stärker als durch die Lipidphase (wässrige Phase: CT 550 ± 98 s, Lipidphase: CT 2130 ± 687 s, Gesamtplaque: CT 598 ± 103 s, $n=3$, $p<0,05$ wässrige Phase gegenüber Lipidphase und Gesamtplaque gegenüber Lipidphase). Die restlichen 50% zeigten keinen signifikanten Unterschied zwischen der wässrigen und Lipidphase (wässrige Phase: CT 551 ± 100 s, Lipidphase: CT 601 ± 115 s, Gesamtplaque: CT 587 ± 105 s, $n=3$, $p<0,05$). Somit haben je nach Plaque die beiden Phasen einen unterschiedlichen Einfluss auf die Gerinnungsparameter.

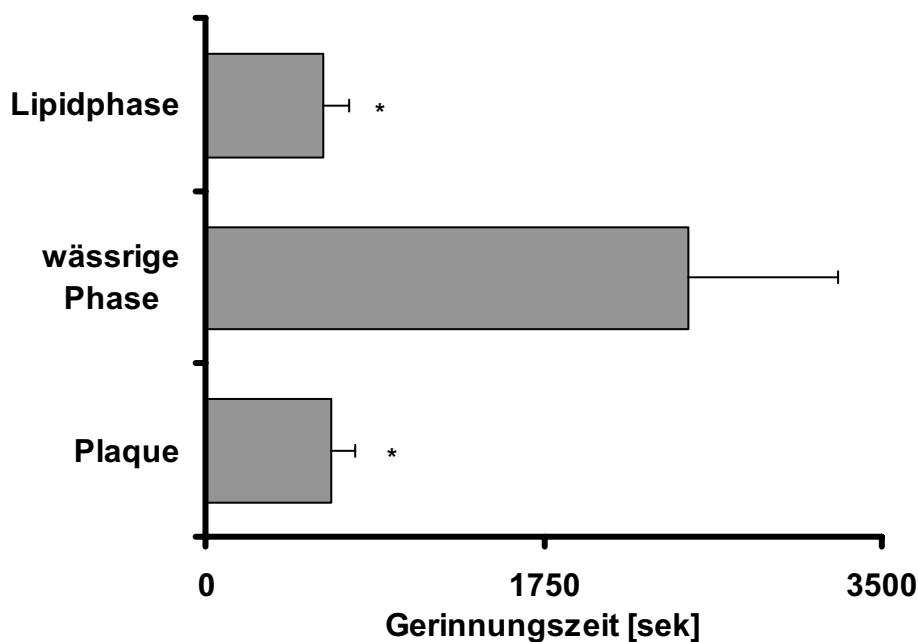


Abb. 26 Vollblutstimulation mit verschiedenen Komponenten der Plaques deren Lipidphase die gerinnungsaktivierende Komponente darstellt (entspricht 25% der untersuchten Plaques)

Die Kernregion der atherosklerotischen Plaques wurde nach der Blich und Dyer Methode in eine wässrige und eine Lipidphase aufgetrennt. Antikoaguliertes VB wurde jeweils mit einer der beiden Phasen oder mit der gesamten Kernregion stimuliert und die Gerinnungszeit gemessen. Die gerinnungsaktivierende Komponente der hier gezeigten Plaques aus der PAP(-) Gruppe lag in der Lipidphase.

Obere Säule: Stimulation mit der Lipidphase: 607 ± 137 s; Mittlere Säule: Stimulation mit der wässrigen Phase: 2497 ± 770 s; Untere Säule: Stimulation mit dem gesamten Lipidkernhomogenat: 647 ± 126 s. $n=3$, * $p<0,05$ gegenüber wässriger Phase.

IV. Diskussion

IV.1. Gerinnungsaktivierung im Rahmen der Atherothrombose

Die Ruptur eines atherosklerotischen Plaques ermöglicht den Kontakt von Plaquebestandteilen mit dem fließenden Blut und ist damit der entscheidende Auslöser für die pathologische Thrombusbildung im arteriellen System. Die Plaqueruptur bzw. -fissur stellt den zentralen Triggermechanismus in der Pathogenese ischämischer Erkrankungen wie dem akuten Koronarsyndrom und dem Schlaganfall dar. Innerhalb des Plaques weist der lipidreiche Kern das stärkste thrombogene Potential auf (Fernández-Ortiz et al. 1994, Toschi et al. 1997). Daher setzten wir bei den Experimenten zur Untersuchung der Gerinnungsaktivierung diese Komponente der Plaques ein. Bereits geringe Mengen der Lipidkernhomogenate führten konzentrationsabhängig zu einer deutlichen Verkürzung der Gerinnungszeit, wobei sich die bildenden Gerinnsel durch eine hohe Festigkeit auszeichneten. Die Gerinnungsaktivierung war bei der Mehrzahl der Plaques TF-abhängig. Die Ergebnisse bestätigen, dass TF nicht nur bei der physiologischen Gerinnungsaktivierung eine zentrale Rolle spielt, sondern dass dieses Protein entscheidend ist für die pathologische Thrombusbildung durch atherosklerotische Plaques.

Bei nahezu einem Viertel der Plaques konnte eine TF unabhängige Fibrinbildung nachgewiesen werden, da die Fibrinbildung durch den Anti-TF Antikörper VIC7 nicht verlängert werden konnte. Jedoch war die Verkürzung der Gerinnungszeit durch Plaquezugabe nicht so ausgeprägt wie in der Gruppe, die die Fibrinbildung über TF induzierten. Diese Plaques könnten über FXII, dem Starterprotein der intrinsischen Gerinnung, zur Thrombusbildung führen. Die pathophysiologische Bedeutung des FXII-getriggerten intrinsischen Gerinnungsweges ist noch nicht vollständig geklärt, zumal die hereditäre Defizienz von Faktor XII mit keiner Blutungsneigung assoziiert ist (Kienast et al. 1993). Da in den Kontrollversuchen keine Fibrinbildung messbar war, kann ausgeschlossen werden, dass es zu einer Kontaktaktivierung durch die Oberfläche der Küvetteninnenseite gekommen ist. Verschiedene Arbeiten konnten nachweisen, dass Faktor XII durch Kollagen Typ I, einem wichtigen Bestandteil atherosklerotischer Plaques, aktiviert werden kann (Cochrane et al. 1982). Auch könnte die PS-reiche äußere Zellmembran aktivierter Plättchen die entscheidende

Oberfläche zur Aktivierung des Kontaktsystems *in vivo* darstellen (Renne et al. 2005). Auch die Plaques, die nach unseren Ergebnissen unabhängig von TF zur Fibrinbildung führten, benötigten die Anwesenheit von Thrombozyten, um die Gerinnung zu aktivieren. Somit könnte das intrinsische Gerinnungssystem durch verschiedene Mechanismen im Rahmen des atherothrombotischen Prozesses aktiviert werden.

IV.2. Plaque-TF

Es ist bislang noch vollständig ungeklärt, welche Bedeutung der intravaskuläre TF gegenüber dem Gefäßwand-TF an der pathologischen Gerinnungsaktivierung nach Plaqueruptur hat. Funktionell aktiver TF konnte in nahezu allen Zellen des atherosklerotischen Plaques, v.a. in Makrophagen und Schaumzellen, nachgewiesen werden. Der größte Anteil an der Plaque-TF Aktivität wurde extrazellulär assoziiert mit apoptotischen Mikropartikeln monozytären und lymphozytären Ursprungs gefunden (Wilcox et al. 1989, Mallat et al. 1999, Tedgui et al. 2001). MP sind reich an Phosphatidylserinen, die die katalytische Effizienz von Enzymkomplexen der Gerinnungskaskade steigern (Zwaal et al. 2005).

Bei über 75% der Lipidkernhomogenate ließ sich eine TF abhängige Gerinnungsaktivierung im VB nachweisen. Auch bewirkte der Einsatz von FVIIaI oder Anti-TF Antikörper VIC7 eine starke Reduktion der plaqueinduzierten Faktor Xa Bildung. Dies ließ vermuten, dass die TF Aktivität im Rahmen der Atherothrombose nicht allein auf den Plaque-TF zurückzuführen war. Daher wurde in weiteren Versuchsansätzen der in den Lipidkernen lokalisierte TF durch Coating mit inhibitorischem Anti-TF Antikörper VIC7 inaktiviert, und die Faktor Xa Aktivität wurde bestimmt. Hierbei wurde im Mittel noch 61% der durch ungecoatete Plaques induzierten Faktor Xa Bildung gemessen.

Bei den Plaques der TF unabhängigen Gruppe ließ sich auch ein relativ hoher Gehalt an TF innerhalb des Lipidkerns nachweisen. Dieser TF war jedoch nicht funktionell aktiv (sogenannter kryptischer TF), da sich die plaqueinduzierte Gerinnungsaktivierung nicht durch den Anti-TF Antikörper VIC7 verlängern ließ.

Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass nicht nur der im Plaque lokalisierte TF für die Fibrinbildung nach Ruptur eines atherosklerotischen Plaques verantwortlich sein

kann. Der sogenannte intravaskuläre TF scheint eine bedeutende Rolle in der Aktivierung der Blutgerinnung durch atherothrombotische Plaques zu spielen.

IV.3. Pathologische Bedeutung von intravaskulärem TF

Mitte der 90er Jahre konnte eine Reihe von Gruppen erstmals TF im Plasma gesunder Probanden nachweisen (Koyama et al. 1994, Fareed et al. 1995). Bei Erkrankungen wie Angina pectoris, akuter Myokardinfarkt und Schlaganfall ließen sich erhöhte Plasmaspiegel an TF nachweisen (Misumi et al. 1998, He et al. 2002). Nemerson und Mitarbeiter demonstrierten, dass TF innerhalb eines Thrombus zu finden ist, der sich nach Passage von Vollblut über eine mit Kollagen beschichtete Oberfläche bildete. Daraus wurde die Hypothese abgeleitet, dass der blutassoziierte TF an der pathologischen Fibrinbildung im Rahmen der arteriellen Thrombose beteiligt ist. Mithilfe eines Maus-Modells konnte diese Hypothese bereits gestützt werden, da TF nach laserinduzierter Gefäßverletzung von Arteriolen innerhalb des sich bildenden Thrombus akkumulierte. Die damit einhergehende Fibrinbildung zeigte die biologische Aktivität des intravaskulären TF (Falati et al. 2003).

Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse verdeutlichen, dass der blutassoziierte TF einen entscheidenden Anteil an der pathologischen Fibrinbildung hat. In Vollblutexperimenten und im isolierten Zellsystem war kein Zusammenhang zwischen dem Gehalt an TF innerhalb des Plaques und der Gerinnungszeit bzw. der Faktor Xa Bildung zu erkennen. Bei nahezu einem Viertel der Plaques konnte zwar TF im Lipidkernhomogenat nachgewiesen werden, dieser war jedoch nicht funktionell aktiv. Ebenso führten alle untersuchten Plaques in Abwesenheit von Thrombozyten nur zu einer sehr geringen Faktor Xa Bildung obwohl in den Versuchsansätzen alle für die Faktor Xa Bildung notwendigen Gerinnungsfaktoren enthalten waren. Durch Einsatz von FVIIa1 bzw. Anti-TF Antikörper VIC7 ließ sich meist eine deutliche Reduktion der Fibrinbildung und Faktor Xa Bildung erzielen. Dabei konnte jedoch nicht unterschieden werden, ob diese Gerinnungsaktivierung durch den Plaque-TF oder blutassoziierten TF induziert wurde.

Dass diese Ergebnisse auch für die Thrombogenese in vivo relevant sein können, verdeutlichen folgende Überlegungen: der durch den Plaque-TF aktivierte Faktor X müsste eine beträchtliche Diffusionsstrecke zurücklegen, um auch an der Oberfläche

des sich bildenden Thrombus die Fibrinbildung zu induzieren. Ebenso stellen die Thrombozyten, die an einen rupturierten Plaque adhären, eine nahezu impermeable Barriere für den initial gebildeten Faktor Xa dar (Hathcock et al. 2004). Proteine in der Größe eines Blutgerinnungsfaktors (50 kDa) benötigen allein für eine Diffusionsstrecke von 1 mm ca. 3 Std. (Nemerson et al. 2002). Die Zunahme des Durchmessers eines Thrombus von 2 auf 3 mm erfolgt jedoch innerhalb von Minuten (Ambrose et al. 1997). Diese Daten machen es unwahrscheinlich, dass die Gerinnungsaktivierung und damit das schnelle Wachstum eines gefäßverschießenden Thrombus nur durch den Plaque-TF bedingt ist. Allein die Aktivität des intravaskulären TF macht es möglich, dass sich ein Fibrinnetzwerk ausbilden kann, das den gesamten Thrombus umfasst. Das gebildete Fibrin führt zur Quervernetzung von Thrombozyten über GP IIb-IIIa Rezeptoren und bedingt damit die Adhäsion von weiteren Plättchen und damit die Bildung eines äußerst stabilen Thrombus. Diese Überlegungen machen es verständlich, dass die Ruptur eines atherosklerotischen Plaques und die konsekutive Thrombusbildung innerhalb von Minuten zu einem vollständigen Gefäßverschluss führen kann.

IV.4. Die Bedeutung des thrombozytären TF für die pathologische Gerinnungsaktivierung

Plättchenaktivierung und Blutgerinnung sind im Rahmen der Hämostase komplementäre, voneinander abhängige Prozesse. Ein Ziel dieser Arbeit war es daher festzustellen, ob der plättchenassoziierte TF für die Stimulierung der Fibrinbildung durch die Lipidkerne verantwortlich ist. Neuere Befunde zeigen, dass innerhalb des Blutes neben den Monozyten auch Plättchen und Eosinophile in der Lage sind nach Stimulation TF zu synthetisieren bzw. zu speichern (Zillmann et al. 2001, Engelmann 2006, Moosbauer et al. 2007). Es konnte auch gezeigt werden, dass der thrombozytäre und der in Eosinophilen lokalisierte TF funktionell aktiv ist, da er zu einer Steigerung der prokoagulatorischen Aktivität führte (Schwertz et al. 2006, Moosbauer et al. 2007, Panes et al. 2007). Die TF Expression zirkulierender Monozyten ist bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom oder zerebraler Ischämie gesteigert (Kappelmayer et al. 1998, Ott et al. 2001). Allerdings spielt für die Initiationsphase der pathologischen Thrombusbildung der induzierbare monozytäre

TF wahrscheinlich keine Rolle, da die Synthese dieses Starterproteins der Gerinnung länger dauert als die Fibrinbildung nach Ruptur eines atherosklerotischen Plaques. In unstimulierten Monozyten und in Neutrophilen Granulozyten konnte kein präformierter TF nachgewiesen werden (Osterud et al. 2000, Zillmann et al. 2001). In der vorliegenden Arbeit ließ sich in der Tat in Abwesenheit von Leukozyten eine schnelle Fibrinbildung im PRP durch die Plaques induzieren. Jedoch zeigten sich bei Messungen im PAP deutliche Unterschiede zwischen den Plaques: 56% der Lipidkernhomogenate wiesen im PAP keine prokoagulatorische Aktivität auf. Diese Plaques benötigten für die Induktion der Fibrinbildung die Anwesenheit von Thrombozyten. In den Versuchsansätzen für die Coatingexperimente wurden als zellulärer Bestandteil ausschließlich Thrombozyten eingesetzt. Somit konnte die nachgewiesene Aktivität des intravaskulären TF nur thrombozytären Ursprungs sein. Der Plättchen-TF scheint daher für die plaqueinduzierte Fibrinbildung eine wichtige Rolle zu spielen.

Zillmann et al. (2001) und Müller et al. (2003) konnten nachweisen, dass TF in unstimulierten Plättchen im offenen kanalikulären System und in den α -Granula gespeichert wird. Nach einer 5-minütigen Stimulation mit Kollagen oder anderen Plättchenaktivatoren, wie z.B. ADP, Thrombin und Epinephrin wurde dieser TF auf der Zellmembranoberfläche exprimiert. Diese Befunde wurden von anderen Autoren bestätigt (Siddiqui et al. 2002, Camera et al. 2003, Leon et al. 2004). In atherosklerotischen Arterien adhären Thrombozyten verstärkt an Abschnitte der Gefäßwand, die eine hohe Konzentration an Kollagen Typ I und III aufweisen (van Zanten et al. 1994). Das Kollagen könnte dabei gleichzeitig zu einer vermehrten Expression von thrombozytären TF und damit zur Fibrinbildung im wachsenden Thrombus führen.

Aber auch Lipidbestandteile des Plaques sind mögliche Kandidaten für die Aktivierung des plättchenassoziierten TF. Oxidiertes LDL trägt nicht nur zur endothelialen Dysfunktion und zum Wachstum eines atherosklerotischen Plaques bei, sondern induziert in Monozyten und Endothelzellen auch die TF Expression (Drake et al. 1991, Brand et al. 1994). Modifiziertes Phosphatidylethanolamin und Lysophosphatidsäure - beides Bestandteile von oxidiertem LDL - weisen plättchenaktivierende Eigenschaften auf (Zieseniss et al. 2001, Siess et al. 2002). Es wäre daher möglich, dass diese aktiven Komponenten von oxLDL an der Freisetzung des TF aus den α -Granula der Thrombozyten beteiligt sind. Daher wurde in dieser

Arbeit untersucht, welche Bestandteile der Lipidkernhomogenate die Gerinnungsparameter im Vollblut am stärksten beeinflussen. 25% der Plaques induzierten die Fibrinbildung über die wässrige Phase, 25% über die Lipidphase und bei den restlichen 50% konnte kein Unterschied zwischen dem Ausmaß der Gerinnungsaktivierung durch die beiden Phasen festgestellt werden. Somit sind die thrombotischen Eigenschaften eines atherosklerotischen Plaques nicht an einen Bestandteil gebunden. Dies ist jedoch nicht verwunderlich, da auch die TF Synthese und Expression auf der zellulären Oberfläche durch verschiedenste physiologische und pathologische Stimuli induziert werden kann (Camerer et al. 1996).

Nach der initialen Plättchenaktivierung wird u.a. ADP freigesetzt, dass über autokrine und parakrine Mechanismen zur weiteren Rekrutierung von Plättchen an den wachsenden Thrombus führt. Daneben kann ADP auch über die Anlagerung an die Plättchenrezeptoren P2Y₁ und P2Y₁₂ zur Stimulation des intravaskulären TF beitragen (Leon et al. 2004). Der Plättchen-TF ist damit sowohl in der Initiations- als auch während der Amplifikationsphase der Thrombogenese an der Fibrinbildung beteiligt. Interessanterweise scheint auch der Schweregrad der klinischen Symptomatik mit dem Ausmaß der TF Expression auf Plättchen zu korrelieren (Camera et al. 2003).

Engelmann und Mitarbeiter fanden, dass der auf der Plättchenoberfläche nach Kollagenstimulation präsentierte TF nur eine relativ geringe Aktivität zeigt (Zillmann et al. 2001, Müller et al. 2003, Leon et al. 2004). Der Zustand dieses inaktiven TF wird auch als „encrypted“ bezeichnet. Es zeigte sich, dass eine Plättchen-Leukozyten Interaktion für die Kollagen-stimulierte intravaskuläre TF Aktivität notwendig war (Engelmann et al. 2003). Der Antagonist des Gerinnungsstarts, TFPI, scheint von erheblicher Bedeutung für die Regulation der Aktivität des thrombozytären TF zu sein. TFPI wird von aktivierten Plättchen in relativ hohen Mengen freigesetzt und inhibiert durch Komplexbildung mit TF, Faktor VIIa und Faktor Xa die initialen Reaktionen der Blutgerinnung (Novotny et al. 1988, Petersen et al. 1996). Durch den engen Kontakt zwischen Thrombozyten und Leukozyten könnte TFPI durch Proteasen, die von Neutrophilen Granulozyten sezerniert werden, gespalten und damit inaktiviert werden. Dies kann die hohe Aktivität des plättchenassoziierten TF in Anwesenheit von Leukozyten erklären. Dass die Plättchen-Leukozyten Interaktion eine Rolle bei der pathologischen Thrombusbildung spielt, wurde auch in anderen experimentellen Modellen beobachtet (Sakariassen et al. 1990, Palabrica et al.

1992, Kirchhofer et al. 1997). Die oben erwähnten, TFPI inaktivierenden leukozytären Proteasen, wie z.B. Matrixmetalloproteinase-8 (MMP-8), Neutrophilen-Elastase und Cathepsin G lassen sich auch in atherosklerotischen Plaques nachweisen (Cunningham et al. 2002, Dollery et al. 2003, Legedz et al. 2004). Somit könnten die Plaquebestandteile selbst zur Aktivierung des „encrypted“ TF beigetragen haben. Es ist daher anzunehmen, dass die Bestandteile eines Plaques sowohl durch direkte Steigerung der TF Aktivität als auch durch Hemmung der TF Inhibitoren die Thrombusbildung induzieren.

Da Kollagen die Plättchen-TF Präsentation induziert, sollte in diese Arbeit untersucht werden, welcher thrombozytäre Kollagenrezeptor an diesem Prozess beteiligt ist. Lange Zeit wurde postuliert, dass die Interaktion des GP Ib-V-IX mit von Willebrand Faktor für die initiale Rekrutierung von Thrombozyten an eine verletzte Gefäßwand verantwortlich ist (Ruggeri et al. 1997). Jedoch ist nach neueren Untersuchungen GPVI v.a. im Rahmen der pathologischen Thrombusbildung ein wichtiger Rezeptor für die Aktivierung und Aggregation von Thrombozyten (Kato et al. 2003, Massberg et al. 2003, Penz et al. 2005). In unseren Experimenten zeigte sich in der Tat, dass der GPVI-Rezeptor an der Gerinnungsaktivierung nach Plaqueruptur entscheidend beteiligt ist. Damit ist die Aktivierung des thrombozytären TF durch atherosklerotische Plaques von einer Interaktion zwischen dem GPVI Rezeptor der Plättchen und Kollagen abhängig. Der GPVI Antikörper führte jedoch nicht zu einer vollständigen Reduktion der Faktor-Xa Bildung auf das Niveau der Kontrollwerte. Nach unseren Ergebnissen ist auch der GPIIb-IIIa-Komplex an der Aktivierung des intravaskulären TF beteiligt: Abciximab, ein GPIIb-IIIa Antagonist verminderte die durch den thrombozytären TF induzierte Fibrinbildung. Abgesehen von der Hemmung von Plättchenrezeptoren verminderte auch die Inhibierung der Thrombozytenaggregation durch das Prostazyklinanalogon Iloprost die TF-Aktivität. Somit wird die Stimulierung des intravaskulären, thrombozytenassoziierten TF durch verschiedene Mechanismen der Thrombozytenaktivierung vermittelt.

„Encrypted“ TF ist zwar in der Lage Faktor VIIa zu binden, jedoch bleibt dieser Komplex katalytisch inaktiv. Auf welche Weise kryptischer TF aktiviert wird ist noch nicht geklärt. Im Rahmen der kollageninduzierten Plättchenaktivierung kommt es zur Exposition negativ geladener Phospholipide wie PS auf der Zellmembran. Dies erfolgt durch Inaktivierung der Aminophospholipid-Translokase und Aktivierung der Phospholipid-Scramblase (Beveris et al. 1982, Zwaal et al. 1997). Die

Phosphatidyserinexposition verstärkt die Assemblierung und Aktivierung zweier wichtiger Gerinnungskomplexe, des Tenase- und des Prothrombinasekomplexes. Die plaqueinduzierte prokoagulatorische TF Aktivität war in unseren Untersuchungen ebenfalls abhängig von einer PS-reichen Zelloberfläche. Annexin V, ein Ca^{2+} -abhängiges Protein mit einer hohen Affinität für PS, führte zu einem konzentrationsabhängigen Abfall der TF Aktivität um bis zu 90 %. Damit trägt PS zur Aktivierung des „encrypted“ TF der Thrombozyten bei.

Bei 44% der Plaques war auch im PAP eine Gerinnungsaktivierung messbar. Jedoch ließ sich im PAP nur eine geringe Gerinnselfestigkeit erzielen. Diese Plaques führten über TF zur Gerinnungsaktivierung. Die Fibrinbildung im PAP kann hierbei über den Plaque-TF induziert worden sein, da der Gehalt an Plaque-TF bei diesen Plaques nahezu um das dreifache höher war als bei den Plaques der PPP(-) Gruppe. Darüber hinaus könnte aber auch der MP assoziierte TF an der Aktivierung des Gerinnungssystems im PAP beteiligt gewesen sein.

IV.5. Die Bedeutung des MP-TF für die pathologische Gerinnungsaktivierung

MP sind Membranvesikel mit einem Durchmesser von unter 1 μm , die im Rahmen der Zellaktivierung oder -apoptose entstehen. Eine erhöhte Konzentration an zirkulierenden MP konnte bei Erkrankungen mit vermehrter Gerinnungsneigung, wie z.B. Myokardinfarkt, Diabetes mellitus, disseminierte intravasale Gerinnung, gefunden werden (Nieuwland et al. 2000, Mallat et al. 2000, Cohen et al. 2002). MP weisen prokoagulatorische Eigenschaften auf, da sie wie aktivierte Plättchen eine negativ geladene Phospholipidoberfläche aufweisen, über diese Gerinnungsfaktoren binden können und dadurch die Aktivierung des Tenase- und Prothrombinasekomplexes ermöglichen (VanWijk et al. 2003). Ebenso enthalten thrombozytäre MP eine große Menge an Faktor Va und sie weisen an ihrer Oberfläche eine hohe Dichte an Bindungsstellen für Faktor Va, VIIIa und IXa auf (Sims et al. 1988, Gilbert et al. 1991, Hoffman et al. 1992). Thrombozytäre MP exprimieren auf ihrer Oberflächen auch Antigene ihrer Ursprungszelle, die eine Rolle in der Thrombusbildung spielen. So konnten Glykoproteine, wie z.B. GP IIb-IIIa und GP Ib nachgewiesen werden (George et al. 1986). Interessanterweise zeigte sich, dass TF innerhalb der Plasmafraktion von menschlichem Blut zum größten Teil an

MP gebunden ist (Müller et al. 2003). Diese TF positiven MP können von Zellen abstammen, die TF präformiert speichern oder synthetisieren können, wie z.B. Plättchen, Leukozyten, Endothelzellen oder glatte Muskelzellen (Siljander et al. 1996, Combes et al. 1999, Schechter et al. 2000, Berckmans et al. 2001). Der Großteil der in vivo zirkulierenden MP sind thrombozytären Ursprungs. Jedoch scheint unter den verschiedenen pathologischen Zuständen nicht nur die Menge, sondern auch die zelluläre Abstammung der MP zu variieren (Martinez et al. 2005). So ließ sich eine erhöhte Menge zirkulierender MP monozytären Ursprungs bei Diabetes mellitus Typ 2 oder Patienten mit atherosklerotischen Plaques nachweisen. Bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom stammte die erhöhte Zahl an MP nicht nur von Thrombozyten, sondern auch von Endothelzellen ab (Diamant et al. 2004). Plättchen werden durch Stimulation mit starken Aktivatoren, wie z.B. Kollagen, Thrombin und Ca^{2+} Ionophor zur Bildung TF positiver MP angeregt. Dieser TF ist neben dem auf aktivierten Thrombozyten exprimierten TF möglicherweise ein entscheidender Auslöser für die intravasale Aktivierung des Gerinnungssystems (Müller et al. 2003). Mit Hilfe eines Maus Modells konnte demonstriert werden, dass intravaskulärer, funktionell aktiver TF gebunden an MP innerhalb eines arteriellen Thrombus akkumuliert. Dies erfolgt über die Adhäsionsmoleküle PSGL-1 auf den MP und dem auf Thrombozyten exprimierten P-Selektin (Falati et al. 2003, Chou et al. 2004, Del Conde et al. 2005). Auch unsere Daten zeigen, dass MP prokoagulatorische Eigenschaften aufweisen, da sie die Fibrinbildung in einem mit Plättchen angereicherten Plasma verstärkten. Die Faktor Xa Bildungsversuche bestätigten, dass die plaqueinduzierte Steigerung der Gerinnungsaktivierung hierbei in Anwesenheit von Thrombozyten auf eine verstärkte TF Aktivität zurückzuführen war. Nach diesen Ergebnissen kann angenommen werden, dass es im Rahmen der Thrombusbildung nach Ruptur eines atherosklerotischen Plaques neben einer Adhäsion von Plättchen an die verletzte Gefäßwand zu einer Anreicherung TF positiver MP innerhalb des wachsenden Thrombus kommt. Somit kann die ausgeprägte Fibrinbildung nach Plaqueruptur auch durch die Akkumulation von thrombozytärem und MP- assoziiertem intravaskulären TF innerhalb des Thrombus erklärt werden.

IV.6. Ausblick

In dieser Arbeit konnten wir verdeutlichen, dass der intravaskuläre thrombozytäre bzw. MP assoziierte TF eine wesentliche Rolle bei der pathologischen Thrombusbildung spielt. Zukünftige Untersuchungen der plaqueinduzierten Thrombogenese mit Hilfe eines Tiermodells müssen nun zeigen, ob diese Ergebnisse auch für die in vivo Situation relevant sind. Genauere Analysen könnten zur Identifikation der thrombogenen, die TF Expression induzierenden Plaquekomponenten beitragen. Weiterhin stellt sich die Frage, von welchen Zellen die zirkulierenden TF tragenden MP zum größten Teil abstammen, die an der Thrombogenese beteiligt sind. Ein weiteres Ziel ist die Untersuchung der molekularen Mechanismen, die an der Aktivierung des „encrypted“ TF beteiligt sind. Anhand der Klärung dieser pathophysiologischen Fragen könnten neue, vielversprechende Therapieansätze entwickelt werden. So können nach den Ergebnissen der vorliegenden Studie Antikörper gegen Plättchenrezeptoren, z.B. GP VI, GP IIb-IIIa nicht nur die Plättchenadhäsion bzw. -aggregation hemmen, sondern auch direkt die TF induzierte Gerinnungsaktivierung inhibieren. Da Thrombozyten auch an der Progression eines atherosklerotischen Plaques beteiligt sind, können die antiplatelet drugs möglicherweise nicht nur die Thrombusbildung vermindern, sondern auch ein weiteres Fortschreiten des atherogenetischen Prozesses und damit die Bildung eines vulnerablen Plaques verhindern. Aber auch die therapeutische Wirkung der spezifischen Inhibition von TF und FVIIa bzw. des TF-FVIIa Komplexes auf die plaqueinduzierte arterielle Thrombose sollte experimentell geklärt werden.

V. Zusammenfassung

TF gilt heute als entscheidendes Starterprotein der Blutgerinnung. Da TF in hohen Konzentrationen innerhalb des Lipidkerns atherosklerotischer Plaques gefunden werden konnte, wurde die Hypothese aufgestellt, dass es nach Plaqueruptur zu einem Kontakt des plaqueassoziierten TF mit dem fließenden Blut kommt, wodurch die ausgeprägte Fibrinbildung im Rahmen der pathologischen Thrombogenese induziert wird. Jedoch konnte eine Reihe von Untersuchungen der letzten Jahre zeigen, dass TF im Blut vorhanden ist. Neben Monozyten können auch aktivierte Thrombozyten TF auf ihrer Zelloberfläche präsentieren. Innerhalb der Plasmafraktion ist intravaskulärer TF zum größten Teil an zirkulierende MP gebunden. In der vorliegenden Arbeit zeigte sich, dass die Kernregionen atherosklerotischer Plaques Plättchen-TF aktivieren. Es stellte sich dabei heraus, dass die aktivierenden Plaquebestandteile innerhalb der Lipidphase und der wässrigen Phase vorhanden sind. Wir konnten GPVI und GPIIb-IIIa als Plättchenrezeptoren identifizieren, die an der raschen Präsentation des TF auf der Thrombozytenoberfläche nach Interaktion mit Kernregionen atherosklerotischer Plaques beteiligt sind. Essentiell für die katalytische Aktivität des TF-Faktor VIIa Komplexes war hierbei die Präsenz von Phosphatidylserin auf der äußeren Schicht der Thrombozytenzellmembran. Eine weitere Steigerung der plaqueinduzierten Fibrinbildung wurde in Anwesenheit von Blutplättchen durch den MP assoziierten TF erreicht. Mit Hilfe von Gerinnungsassays und der Vollblutkoagulometrie konnten wir zeigen, dass der intravaskuläre TF funktionell aktiv war und somit zur Fibrinbildung führte. Die initiale Fibrinbildung nach Plaqueruptur kann somit durch den TF innerhalb des Lipidkerns erfolgen. Für die weitere Stabilisierung und den oft lebensgefährlichen vollständigen Verschluss des arteriellen Gefäßes nach Plaqueruptur ist jedoch auch der intravaskuläre TF von erheblicher Bedeutung.

VI. Literaturverzeichnis

Ahmad SS, London FS, Walsh PN: The assembly of factor X-activating complex on activated human platelets. *J Thromb Haemost* 2003; 1(1): 48-59. Review.

Albrecht S, Kotzsch M, Siegert G, Luther T, Grossmann H, Grosser M, Müller M: Detection of circulating tissue factor and factor VII in normal population. *Thromb Haemost* 1996; 75(5): 772-777.

Ambrose JA, Almeida OD, Sharma SK, Dangas G, Ratner DE: Angiographic evolution of intracoronary thrombus and dissection following percutaneous transluminal coronary angioplasty (the Thrombolysis and Angioplasty in Unstable Angina [TAUSA] trial). *Am J Cardiol* 1997; 79(5): 559-563.

Amengual O, Atsumi T, Khamashta MA, Hughes GR: The role of the tissue factor pathway in the hypercoagulable state in patients with the antiphospholipid syndrome. *Thromb Haemost* 1998; 79(2): 276-281.

Ardissino D, Merlini PA, Bauer KA, Bramucci E, Ferrario M, Coppola R, Fetiveau R, Lucreziotti S, Rosenberg RD, Mannucci PM: Thrombogenic potential of human coronary atherosclerotic plaques. *Blood* 2001; 98(9): 2726-2729.

Bach RR: Initiation of coagulation by tissue factor. *CRC Crit Rev Biochem* 1988(4); 23: 339-368. Review.

Badimon JJ, Lettino M, Toschi V, Fuster V, Berrozpe M, Chesebro JH, Badimon L: Local inhibition of tissue factor reduces the thrombogenicity of disrupted human atherosclerotic plaques. *Circulation* 1999; 99(14): 1780-1787.

Baglia FA, Walsh PN: Thrombin-mediated feedback activation of factor XI on the activated platelet surface is preferred over contact activation by factor XIIa or XIa. *J Biol Chem* 2000; 275(27): 20514-20519.

Bajaj MS, Birktoft JJ, Steer SA, Bajaj SP: Structure and biology of tissue factor pathway inhibitor. *Thromb Haemost* 2001; 86(4): 959-972. Review.

Barnes PJ, Farndale RW: Collagens and atherosclerosis. *Exp Gerontol* 1999; 34(3):513-525. Review.

Barnes PJ, Karin M: Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med* 1997; 336(15): 1066-1071. Review.

Bavendiek U, Libby P, Kilbride M, Reynolds R, Mackman N, Schonbeck U: Induction of tissue factor expression in human endothelial cells by CD40 ligand is mediated via activator protein 1, nuclear factor kappa B, and Egr-1. *J Biol Chem* 2002; 277(28): 25032-25039.

Beguín S, Kumar R: Thrombin, fibrin and platelets: a resonance loop in which von Willebrand factor is a necessary link. *Thromb Haemost* 1997; 78(1): 590-594. Review.

Bennett JS: Platelet-fibrinogen interactions. *Ann NY Acad Sci* 2001; 936: 340-354. Review.

Berckmans RJ, Nieuwland R, Böing AN, Romijn FP, Hack CK, Sturk A: Cell-derived microparticles circulate in healthy humans and support low grade thrombin generation. *Thromb Haemost* 2001; 85(4): 639-646.

Berckmans RJ, Nieuwland R, Tak PP, Böing AN, Romijn FP, Kraan MC, Breedveld FC, Hack CE, Sturk A: Cell-derived microparticles from synovial fluid of inflamed arthritic joints support coagulation exclusively via a factor VII-dependent mechanism. *Arthritis Rheum* 2002; 46(11): 2857-2866.

Bereczky Z, Katona E, Muszbek L: Fibrin stabilization (factor XIII), fibrin structure and thrombosis. *Pathophysiol Haemost Thromb* 2003; 33(5-6): 430-437. Review.

Berliner JA, Heinecke JW: The role of oxidized lipoproteins in atherogenesis. *Free Radic Biol Med* 1996; 20(5):707-727. Review.

Bevers EM, Comfurius P, van Rijn JL, Hemker HC, Zwaal RF: Generation of prothrombin-converting activity and the exposure of phosphatidylserine at the outer surface of platelets. *Eur J Biochem* 1982; 122(2): 429-436.

Bevilacqua MP, Pober JS, Majeau GR, Cotran RS, Gimbrone MA Jr: Interleukin 1 (IL-1) induces biosynthesis and cell surface expression of procoagulant activity in human vascular endothelial cells. *J Exp Med* 1984; 160(2): 618-623.

Bevilacqua MP, Pober JS, Majeau GR, Fiers W, Cotran RS, Gimbrone MA Jr: Recombinant tumor necrosis factor induces procoagulant activity in cultured human vascular endothelium: characterization and comparison with the actions of interleukin 1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83(12): 4533-4537.

Billy D, Briedee J, Heemskerk JW, Hemker HC, Lindhout T: Prothrombin conversion under flow conditions by prothrombinase assembled on adherent platelets. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1997; 8(3): 168-174.

Björkerud S, Björkerud B: Apoptosis is abundant in human atherosclerotic lesions, especially in inflammatory cells (macrophages and T cells), and may contribute to the accumulation of gruel and plaque instability. *Am J Pathol* 1996; 149(2): 367-380.

Brand K, Banka CL, Mackman N, Terkeltaub RA, Fan ST, Curtiss LK: Oxidized LDL enhances lipopolysaccharide-induced tissue factor expression in human adherent monocytes. *Arterioscler Thromb* 1994; 14(5): 790-797.

Brandl R, Richter T, Haug K, Wilhelm MG, Maurer PC, Nathrath W: Topographic analysis of proliferative activity in carotid endarterectomy specimens by immunocytochemical detection of the cell cycle-related Antigen Ki-67. *Circulation* 1997; 96(10): 3360-3368.

Broze GJ Jr: Tissue factor pathway inhibitor. *Thromb Haemost* 1995; 74(1): 90-93. Review.

Brummel KE, Paradis SG, Butenas S, Mann KG: Thrombin functions during tissue factor-induced blood coagulation. *Blood* 2002; 100(1): 148-152.

Burger PC, Wagner DD: Platelet P-Selectin facilitates atherosclerotic lesion development. *Blood* 2003; 101(7): 2661-2666.

Butenas S, van't Veer C, Mann KG: Evaluation of the initiation phase of blood coagulation using ultrasensitive assays for serine proteases. *J Biol Chem* 1997; 272(34): 21527-21533.

Cai W, Devaux B, Schaper W, Schaper J: The role of Fas/APO 1 and apoptosis in the development of human atherosclerotic lesions. *Atherosclerosis* 1997; 131(2): 177-186.

Calderwood DA: Integrin activation. *J Cell Sci* 2004; 117(Pt5): 657-666. Review.

Camera M, Frigerio M, Marenzi GC, Salvioni A, Biglioli P, Tremoli E: Platelet-associated tissue factor expression in patients with unstable coronary artery disease. *J Thromb Haemost* 2003; 1(Suppl 1): OC009.

Camera M, Frigerio M, Toschi V, Brambilla M, Rossi F, Cottell DC, Maderna P, Parolari A, Bonzi R, De Vincenti O, Tremoli E: Platelet activation induces cell-surface immunoreactive tissue factor expression, which is modulated differently by antiplatelet drugs. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23(9): 1690-1696.

Camerer E, Kolsto AB, Prydz H: Cell biology of tissue factor, the principal initiator of blood coagulation. *Thromb Res* 1996; 81(1): 1-41. Review.

Carlsen E, Flatmark A, Prydz H: Cytokine-induced procoagulant activity in monocytes and endothelial cells. Further enhancement by cyclosporine. *Transplantation* 1988; 46(4): 575-580.

Cattaneo M, Gachet C: ADP receptors and clinical bleeding disorders. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19(10): 2281-2285. Review.

Celi A, Lorenzet R, Furie B, Furie BC: Platelet-leucocyte-endothelial cell interaction on the blood vessel wall. *Semin Hematol* 1997; 34(4): 327-335. Review.

Chou J, Mackman N, Merrill-Skoloff G, Pedersen B, Furie BC, Furie B: Hematopoietic cell-derived microparticle tissue factor contributes to fibrin formation during thrombus propagation. *Blood* 2004; 104(10): 3190-3197.

Cochrane CG, Griffin JH: The biochemistry and pathophysiology of the contact system of plasma. *Adv Immunol* 1982; 33: 241-306. Review.

Cohen Z, Gonzales RF, Davis-Gorman GF, Copeland JG, McDonagh PF: Thrombin activity and platelet microparticle formation are increased in type 2 diabetic platelets: a potential correlation with caspase activation. *Thromb Res* 2002; 107(5): 217-221.

Cohen Z, Wilson J, Ritter L, McDonagh P: Caspase inhibition decreases both platelet phosphatidylserine exposure and aggregation: caspase inhibition of platelets. *Thromb Res* 2004; 113(6): 387-393.

Combes V, Simon AC, Grau GE, Arnoux D, Camoin L, Sabatier F, Mutin M, Sanmarco M, Sampol J, Dignat-George F: In vitro generation of endothelial microparticles and possible prothrombotic activity in patients with lupus anticoagulant. *J Clin Invest* 1999; 104(1): 93-102.

Corti R, Badimon JJ: Value or desirability of hemorheological-hemostatic parameter changes as endpoints in blood lipid-regulation trials. *Curr Opin Lipidol* 2001; 12(6): 629-637. Review.

Corti R, Hutter R, Badimon JJ, Fuster V: Evolving concepts in the triad of atherosclerosis, inflammation and thrombosis. *J Thromb Thrombolysis* 2004; 17(1): 35-44. Review.

Coughlin SR: Thrombin signalling and protease-activated receptors. *Nature* 2000; 407(6801): 258-264. Review.

Cullen P: Evidence that triglycerides are an independent coronary heart disease factor. *Am J Cardiol* 2000; 86(9): 943-949. Review.

Cunningham AC, Hasty KA, Enghild JJ, Mast AE: Structural and functional characterization of tissue factor pathway inhibitor degradation by matrix metalloproteinase-8. *Biochem J* 2002; 367(Pt2): 451-458.

Cunningham KS, Gotlieb AI: The role of shear stress in the pathogenesis of atherosclerosis. *Lab Invest* 2005; 85(1): 9-23. Review.

Dahlbäck B: The protein C anticoagulant system: inherited defects as basis for venous thrombosis. *Thromb Res* 1995; 77(1): 1-43. Review.

Davie EW, Fujikawa K, Kisiel W: The coagulation cascade: initiation, maintenance, and regulation. *Biochemistry* 1991; 30(43): 10363-10370. Review.

Davies MJ, Richardson PD, Woolf N, Katz DR, Mann J: Risk of thrombosis in human atherosclerotic plaques: role of extracellular lipid, macrophage, and smooth muscle cell content. *Br Heart J* 1993; 69(5): 377-381.

De Candia E, Hall SW, Rutella S, Landolfi R, Andrews RK, De Cristofaro R: Binding of thrombin to glycoprotein Ib accelerates the hydrolysis of Par-1 on intact platelets. *J Biol Chem* 2001; 276(7): 4692-4698.

Del Conde I, Shrimpton CN, Thiagarajan P, Lopez JA: Tissue-factor-bearing microvesicles arise from lipid rafts and fuse with activated platelets to initiate coagulation. *Blood* 2005; 106(5): 1604-1611.

Del Prete G, De Carli M, Lammel RM, D'Elia MM, Daniel KC, Giusti B, Abbate R, Romagnani S: Th1 and Th2 T-helper cells exert opposite regulatory effects on procoagulant activity and tissue factor production by human monocytes. *Blood* 1995; 86(1): 250-257.

De Meyer GR, Hoylaerts MF, Kockx MM, Yamamoto H, Herman AG, Bult H: Intimal deposition of functional von Willebrand factor in atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19(10): 2524-2534.

Diamant M, Nieuwland R, Pablo RF, Sturk A, Smit JW, Radder JK: Elevated numbers of tissue-factor exposing microparticles correlate with components of the metabolic syndrome in uncomplicated type 2 diabetes mellitus. *Circulation* 2002; 106(19): 2442-2447.

Diamant M, Tushuizen ME, Sturk A, Nieuwland R: Cellular microparticles: new players in the field of vascular disease? *Eur J Clin Invest* 2004; 34(6): 392-401. Review.

Diaz-Ricart M, Fuste B, Estebanell E, Tonda R, Lozano M, Escolar G, Jamieson G, Ordinas A: Efficient tyrosine phosphorylation of proteins after activation of platelets with thrombin depends on intact glycoprotein Ib. *Platelets* 2005; 16(8): 453-461.

Dickneite G, Metzner HJ, Kroez M, Hein B, Nicolay U: The importance of factor XIII as a component of fibrin sealants. *J Surg Res* 2002; 107(2): 186-195.

Dollery CM, Owen CA, Sukhova GK, Krettek A, Shapiro SD, Libby P: Neutrophil elastase in human atherosclerotic plaques: production by macrophages. *Circulation* 2003; 107(22): 2829-2836.

Drake TA, Hannani K, Fei HH, Lavi S, Berliner JA: Minimally oxidized low-density lipoprotein induces tissue factor expression in cultured human endothelial cells. *Am J Pathol* 1991; 138(3): 601-607.

Drake TA, Morrissey JH, Edgington TS: Selective cellular expression of tissue factor in human tissues. Implications for disorders of hemostasis and thrombosis. *Am J Pathol* 1989; 134(5): 1087-1097.

Edgington TS, Mackman N, Brand K, Ruf W: The structural biology of expression and function of tissue factor. *Thromb Haemost* 1991; 66(1): 67-79. Review.

Egashira K: Molecular mechanisms mediating inflammation in vascular disease: special reference to monocyte chemoattractant protein-1. *Hypertension* 2003; 41(3 Pt 2): 834-841.

Egorina EM, Sovershaev MA, Bjorkoy G, Gruber FX, Olsen JO, Pahami-Seren B, Mann KG, Osterud B: Intracellular and surface distribution of monocyte tissue factor: application to intersubject variability. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25(7): 1493-1498.

Eilertsen KE, Osterud B: Tissue factor: (patho)physiology and cellular biology. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2004; 15(7): 521-538. Review.

Engelmann B: Initiation of coagulation by tissue factor carriers in blood. *Blood Cells Mol Dis* 2006; 36(2): 188-190. Review.

Engelmann B, Luther T, Müller I: Intravascular tissue factor pathway--a model for rapid initiation of coagulation within the blood vessel. *Thromb Haemost* 2003; 89(1): 3-8. Review.

Espana F, Medina P, Navarro S, Zorio E, Estelles A, Aznar J: The multifunctional protein C system. *Curr Med Chem Cardiovasc Hematol Agents* 2005; 3(2): 119-131. Review.

Falati S, Liu Q, Gross P, Merrill-Skoloff G, Chou J, Vandendries E, Celi A, Croce K, Furie BC, Furie B: Accumulation of tissue factor into developing thrombi in vivo is dependent upon microparticle P-selectin glycoprotein ligand 1 and platelet P-selectin. *J Exp Med* 2003; 197(11): 1585-1598.

Falk E: Plaque rupture with severe pre-existing stenosis precipitating coronary thrombosis: Characteristics of coronary atherosclerotic plaques underlying fatal occlusive thrombi. *Br Heart J* 1983; 50(2): 127-134.

Falk E: Unstable angina with fatal outcome: Dynamic coronary thrombosis leading to infarction and/or sudden death. Autopsy evidence of recurrent mural thrombosis with peripheral embolization culminating in total vascular occlusion. *Circulation* 1985; 71(4): 699-708.

Falk E: Why do plaques rupture? *Circulation* 1992; 86 (6 Suppl): III30-III42. Review.

Falk E, Shah PK, Fuster V: Coronary plaque disruption. *Circulation* 1995; 92(3): 657-671. Review.

Fareed J, Callas DD, Hoppensteadt D, Bermes EW Jr: Tissue factor antigen levels in various biological fluids. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1995; 6 Suppl 1: S32-36.

Felton CV, Crook D, Davies MJ, Oliver MF: Relation of plaque lipid composition and morphology to the stability of human aortic plaques. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17(7): 1337-1345.

Fernaandez-Ortiz A, Badimon JJ, Falk E, Fuster V, Meyer B, Mailhac A, Weng D, Shah PK, Badimon L: Characterization of the relative thrombogenicity of atherosclerotic plaque components: implications for consequences of plaque rupture. *J Am Coll Cardiol* 1994; 23(7): 1562-1569.

Flossel C, Luther T, Müller M, Albrecht S, Kasper M: Immunohistochemical detection of tissue factor (TF) on paraffin sections of routinely fixed human tissue. *Histochemistry* 1994; 101(6): 449-453.

Fuster V, Gotto AM, Libby P, Loscalzo J, McGill HC: 27th Bethesda Conference: matching the intensity of risk factor management with the hazard for coronary disease events. Task Force 1. Pathogenesis of coronary disease: the biological role of risk factors. *J Am Coll Cardiol* 1996; 27(5): 964-976.

Fuster V, Moreno PR, Fayad ZA, Corti R, Badimon JJ: Atherothrombosis and high-risk plaque: part I: evolving concepts. *J Am Coll Cardiol* 2005; 46(6): 937-954. Review.

Galle J, Hansen-Hagge T, Wanner C, Seibold S: Impact of oxidized low density lipoprotein on vascular cells. *Atherosclerosis* 2005;

Gando S, Nanzaki S, Sasaki S, Kemmotsu O: Significant correlations between tissue factor and thrombin markers in trauma and septic patients with disseminated intravascular coagulation. *Thromb Haemost* 1998; 79(6): 1111-1115.

George JN, Pickett EB, Saucerman S, McEver RP, Kunicki TJ, Kieffer N, Newman PJ: Platelet surface glycoproteins. Studies on resting and activated platelets and platelet membrane microparticles in normal subjects, and observations in patients during adult respiratory distress syndrome and cardiac surgery. *J Clin Invest* 1986; 78(2): 340-348.

Giesen PL, Rauch U, Bohrmann B, Kling D, Roque M, Fallon JT, Badimon JJ, Himber J, Riederer MA, Nemerson Y: Blood-borne tissue factor: another view of thrombosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96(5): 2311-2315.

Gilbert GE, Sims PJ, Wiedmer T, Furie B, Furie BC, Shattil SJ: Platelet-derived microparticles express high affinity receptors for factor VIII. *J Biol Chem* 1991; 266(26): 17261-17268.

Goldstein JL, Ho YK, Basu SK, Brown MS: Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoproteins, producing massive cholesterol deposition. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 76(1): 333-337.

Gomez K, McVey JH, Tuddenham E: Inhibition of coagulation by macromolecular complexes. *Haematologica* 2005; 90(11): 1570-1576.

Han KH, Han KO, Green SR, Quehenberger O: Expression of the monocyte chemoattractant protein-1 receptor CCR2 is increased in hypercholesterolemia. Differential effects of plasma lipoproteins on monocyte function. *J Lipid Res* 1999; 40(6): 1053-1063.

Hangartner JR, Charleston AJ, Davies MJ, Thomas AC: Morphological characteristics of clinically significant coronary artery stenosis in stable angina. *Br Heart J* 1986; 56(6): 501-508.

Hathcock JJ, Nemerson Y: Platelet deposition inhibits tissue factor activity: in vitro clots are impermeable to factor Xa. *Blood* 2004; 104(1): 123-127.

He M, Wen Z, He X, Xiong S, Liu F, Xu J, Li J, Xie Q, Jian Z, Chen F, Xioa B, Pu X, He S: Observations on tissue factor pathway and some other coagulation parameters during the onset of acute cerebrocardiac thrombotic diseases. *Thromb Res* 2002; 107(5): 223-228.

Hechler B, Cattaneo M, Gachet C: The P2 receptors in platelet function. *Semin Thromb Hemost* 2005; 31(2): 150-161. Review.

Heemskerk JW, Siljander P, Vuist WM, Breikers G, Reutelingsperger CP, Barnes MJ, Knight CG, Lassila R, Farndale RW: Function of glycoprotein VI and integrin alpha2beta1 in the procoagulant response of single, collagen-adherent platelets. *Thromb Haemost* 1999; 81(5): 782-792.

Heemskerk JW, Vuist WM, Feijge MA, Reutelingsperger CP, Lindhout T: Collagen but not fibrinogen surfaces induce bleb formation, exposure of phosphatidylserine, and procoagulant activity of adherent platelets. Evidence for regulation by protein tyrosine kinase-dependent Ca^{2+} responses. *Blood* 1997; 90(7): 2615-2625.

Hockin MF, Jones KC, Everse SJ, Mann KG: A model for the stoichiometric regulation of blood coagulation. *J Biol Chem* 2002; 277(21): 18322-18333.

Hoffman M, Monroe DM, Roberts HR: Coagulation factor IXa binding to activated platelets and platelet-derived microparticles: a flow cytometric study. *Thromb Haemost* 1992; 68(1): 74-78.

Hugel B, Socie G, Vu T, Toti F, Gluckman E, Freyssinet JM, Scrobohaci ML: Elevated levels of circulating procoagulant microparticles in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and aplastic anemia. *Blood* 1999; 93(10): 3451-3456.

Ichikawa K, Nakagawa K, Hirano K, Sueishi K: The localization of tissue factor and apolipoprotein(a) in atherosclerotic lesions of the human aorta and their relation to fibrinogen-fibrin transition. *Pathol Res Pract* 1996; 192(3): 224-232.

Ishii K, Oguchi S, Murata M, Mitsuyoshi Y, Takeshita E, Ito D, Tanahashi N, Fukuuchi Y, Oosumi K, Matsumoto K, Kitajima M, Yamamoto M, Watanabe G, Ikeda Y, Watanabe K: Activated factor XII levels are dependent on factor XII 46C/T genotypes and factor XII zymogen levels, and are associated with vascular risk factors in patients and healthy subjects. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2000; 11(3): 277-284.

Jung SM, Moroi M: Signal-transducing mechanisms involved in activation of the platelet collagen receptor integrin alpha(2)beta(1). *J Biol Chem* 2000; 275(11): 8016-8026.

Kamimura M, Bea F, Akizawa T, Katus HA, Kreuzer J, Viedt C: Platelet-derived growth factor induces tissue factor expression in vascular smooth muscle cells via activation of Egr-1. *Hypertension* 2004; 44(6): 944-951.

Kappelmayer J, Berecki D, Misz M, Olah L, Fekete I, Csiba L, Blasko G: Monocytes express tissue factor in young patients with cerebral ischemia. *Cerebrovasc Dis* 1998; 8(4): 235-239.

Kato K, Kanaji T, Russell S, Kunicki TJ, Furihata K, Kanaji S, Marchese P, Reiningger A, Ruggeri ZM, Ware J: The contribution of glycoprotein VI to stable platelet adhesion and thrombus formation illustrated by targeted gene deletion. *Blood* 2003; 102(5): 1701-1707.

Katsuda S, Kaji T: Atherosclerosis and extracellular matrix. *J Atheroscler Thromb* 2003; 10(5): 267-274. Review.

Kavurma MM, Bhindi R, Lowe HC, Chesterman C, Khachigian LM: Vessel wall apoptosis and atherosclerotic plaque instability. *J Thromb Haemost* 2005; 3(3): 465-472. Review.

Keuren JF, Wienders SJ, Ulrichs H, Hackeng T, Heemskerk JW, Deckmyn H, Bevers EM, Lindhout T: Synergistic effect of thrombin on collagen-induced platelet procoagulant activity is mediated through protease-activated receptor-1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25(7): 1499-1505.

Key NS, Slungaard A, Dandele L, Nelson SC, Moertel C, Styles LA, Kuypers FA, Bach RR: Whole blood tissue factor procoagulant activity is elevated in patients with sickle cell disease. *Blood* 1998; 91(11): 4216-4223.

Kienast J, Ostermann H: Blood coagulation and fibrinolysis. *Z Kardiol* 1993; 82 Suppl 2: 65-69. Review.

Kirchhofer D, Riederer MA, Baumgartner HR: Specific accumulation of circulating monocytes and polymorphonuclear leukocytes on platelet thrombi in a vascular injury model. *Blood* 1997; 89(4): 1270-1278.

Klein S, Spannagl M, Engelmann B: Phosphatidylethanolamine participates in the stimulation of the contact system of coagulation by very-low-density lipoproteins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21(10): 1695-1700.

Kolodgie FD, Burke AP, Farb A, Gold HK, Yuan J, Narula J, Finn AV, Virmani R: The thin-cap fibroatheroma: a type of vulnerable plaque: the major precursor lesion to acute coronary syndromes. *Curr Opin Cardiol* 2001; 16(5): 285-292. Review.

Koyama T, Nishida K, Ohdama S, Sawada M, Murakami N, Hirosawa S, Kuriyama R, Matsuzawa K, Hasegawa R, Aoki N: Determination of plasma tissue factor antigen and its clinical significance. *Br J Haematol* 1994; 87(2): 343-347.

Ku DN, Giddens DP, Zarins CK, Glagov S: Pulsatile flow and atherosclerosis in the human carotid bifurcation: Positive correlation between plaque location and low oscillatory shear stress. *Arteriosclerosis* 1985; 5(3): 293-302.

Landers SC, Gupta M, Lewis JC: Ultrastructural localization of tissue factor on monocyte-derived macrophages and macrophage foam cells associated with atherosclerotic lesions. *Virchows Arch* 1994; 425(1): 49-54.

Lane DA, Philippou H, Huntington JA: Directing thrombin. *Blood* 2005; 106(8): 2605-2612. Review.

Lawson JH, Kalafatis M, Stram S, Mann KG: A model for the tissue factor pathway to thrombin. I. An empirical study. *J Biol Chem* 1994; 269(37): 23357-23366.

Lecut C, Schoolmeester A, Kuijpers MJ, Broers JL, van Zandvoort MA, Vanhoorelbeke K, Deckmyn H, Jandrot-Perrus M, Heemskerk JW: Principal role of glycoprotein VI in $\alpha 2\beta 1$ and $\alpha 1\beta 3$ activation during collagen-induced thrombus formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24(9): 1727-1733.

Lee YJ, Jy W, Horstmann LL, Janania J, Reyes Y, Kelley RE, Ahn YS: Elevated platelet microparticles in transient ischemic attacks, lacunar infarcts, and multiinfarct dementias. *Thromb Res* 1993; 72(4): 295-304.

Legedz L, Randon J, Sessa C, Baguet JP, Feugier P, Cerutti C, McGregor J, Bricca G: Cathepsin G is associated with atheroma formation in human carotid artery. *J Hypertens* 2004; 22(1): 157-166.

Leon C, Alex M, Klocke A, Morgenstern E, Moosbauer C, Eckly A, Spannagl M, Gachet C, Engelmann B: Platelet ADP receptors contribute to the initiation of intravascular coagulation. *Blood* 2004; 103(2): 594-600.

Libby P: Molecular bases of acute coronary syndromes. *Circulation* 1995; 91(11): 2844-2850. Review.

Libby P, Ordovas JM, Auger KR, Robbins AH, Birinyi LK, Dinarello CA: Endotoxin and tumor necrosis factor induce interleukin-1 gene expression in adult human vascular endothelial cells. *Am J Pathol* 1986; 124(2): 179-185.

Libby P, Warner SJ, Salomon RN, Birinyi LK: Production of platelet-derived growth factor-like mitogen by smooth muscle cells from human atheroma. *N Engl J Med* 1988; 318(23): 1493-1498.

Liddington RC, Ginsberg MH: Integrin activation takes shape. *J Cell Biol* 2002; 158(5): 833-839. Review.

Liu J, Pestina TI, Berndt MC, Steward SA, Jackson CW, Gartner TK: The roles of ADP and TXA₂ in botrocetin/VWF-induced aggregation of washed platelets. *J Thromb Haemost* 2004; 2(12): 2213-2222.

Llorente-Cortes V, Otero-Vinas M, Sanchez S, Rodriguez C, Badimon L: Low-density lipoprotein upregulates low density-lipoprotein receptor-related protein expression in vascular smooth muscle cells: possible involvement of sterol regulatory element binding protein-2-dependent mechanism. *Circulation* 2002; 106(24): 3104-3110.

Loree HM, Kamm RD, Stringfellow RG, Lee RT: Effects of fibrous cap thickness on peak circumferential stress in model atherosclerotic vessels. *Circ Res* 1992; 71(4): 850-858.

Loree HM, Tobias BJ, Gibson LJ, Kamm RD, Small DM, Lee RT: Mechanical properties of model atherosclerotic lesion lipid pools. *Arterioscler Thromb* 1994; 14(2): 230-234.

Lwaleed BA, Bass PS: Tissue factor pathway inhibitor: structure, biology and involvement in disease. *J Pathol* 2005; 208(3):327-339.

Mach F, Schönbeck U, Bonnefoy JY, Pober JS, Libby P: Activation of monocyte/macrophage functions related to acute atheroma complication by ligation of CD40: induction of collagenase, stromelysin, and tissue factor. *Circulation* 1997; 96(2): 396-399.

Mahdi F, Shariat-Madar Z, Todd RF 3rd, Figueroa CD, Schmaier AH: Expression and colocalization of cytokeratin 1 and urokinase plasminogen activator receptor on endothelial cells. *Blood* 2001; 97(8): 2342-2350.

Mallat Z, Benamer H, Hugel B, Benessiano J, Steg PG, Freyssinet JM, Tedgui A: Elevated levels of shed membrane microparticles with procoagulant potential in the peripheral circulating blood of patients with acute coronary syndromes. *Circulation* 2000; 101(8): 841-843.

Mallat Z, Hugel B, Ohan J, Leseche G, Freyssinet JM, Tedgui A: Shed membrane microparticles with procoagulant potential in human atherosclerotic plaques: a role for apoptosis in plaque thrombogenicity. *Circulation* 1999; 99(3): 348-353.

Mann KG, Jenny RJ, Krishnaswamy S: Cofactor proteins in the assembly and expression of blood clotting enzyme complexes. *Annu Rev Biochem* 1988; 57: 915-956. Review.

Mann KG, Krishnaswamy S, Lawson JH: Surface-dependent hemostasis. *Semin Hematol* 1992; 29(3): 213-226. Review.

Martinez MC, Tesse A, Zobairi F, Andriantsitohaina R: Shed membrane microparticles from circulating and vascular cells in regulating vascular function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005; 288(3): H1004-1009. Review.

Marx PF: Thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor. *Curr Med Chem* 2004; 11(17): 2335-2348. Review.

Massberg S, Brand K, Gruner S, Page S, Müller E, Müller I, Bergmeier W, Richter T, Lorenz M, Konrad I, Nieswandt B, Gawaz M: A critical role of platelet adhesion in the initiation of atherosclerotic lesion formation. *J Exp Med* 2002; 196(7): 887-896.

Massberg S, Gawaz M, Grüner S, Schulte V, Konrad I, Zohlnhöfer D, Heinzmann U, Nieswandt B: A crucial role of glycoprotein VI for platelet recruitment to the injured arterial wall in vivo. *J Exp Med* 2003; 197(1): 41-49.

Massberg S, Schurzinger K, Lorenz M, Konrad I, Schulz C, Plesnila N, Kennerknecht E, Rudelius M, Sauer S, Braun S, Kremmer E, Emambokus NR, Frampton J, Gawaz M: Platelet adhesion via glycoprotein IIb integrin is critical for atheroprogession and focal cerebral ischemia: an in vivo study in mice lacking glycoprotein IIb. *Circulation* 2005; 112(8): 1180-1188.

May AE, Schmidt R, Bulbul BO, Holderle M, Walther F, Schömig A, Gawaz M, Klouche M: Plasminogen and matrix metalloproteinase activation by enzymatically modified low density lipoproteins in monocytes and smooth muscle cells. *Thromb Haemost* 2005; 93(4): 710-715.

Misumi K, Ogawa H, Yasue H, Soejima H, Suefuji H, Nishiyama K, Takazoe K, Kugiyama K, Tsuji I, Kumeda K, Nakamura S: Comparison of plasma tissue factor levels in unstable and stable angina pectoris. *Am J Cardiol* 1998; 81(1): 22-26.

Moore KL, Andreoli SP, Esmon NL, Esmon CT, Bang NU: Endotoxin enhances tissue factor and suppresses thrombomodulin expression of human vascular endothelium in vitro. *J Clin Invest* 1987; 79(1): 124-130.

Moosbauer C, Morgenstern E, Cuvelier SL, Manukyan D, Bidzhekov K, Albrecht S, Lohse P, Patel KD, Engelmann B: Eosinophils are a major intravascular location for tissue factor storage and exposure. *Blood* 2007; 109(3):995-1002.

Mosesson MW: The roles of fibrinogen and fibrin in hemostasis and thrombosis. *Semin Hematol* 1992; 29(3): 177-188. Review.

Mosesson MW: Fibrinogen and fibrin structure and functions. *J Thromb Haemost* 2005; 3(8): 1894-1904. Review.

Müller I, Klocke A, Alex M, Kotzsch M, Luther T, Morgenstern E, Zieseniss S, Zahler S, Preissner K, Engelmann B: Intravascular tissue factor initiates coagulation via circulating microvesicles and platelets. *FASEB J* 2003; 17(3): 476-478.

Mulder AB, Hegge-Paping KS, Magielse CP, Blom NR, Smit JW, van der Meer J, Hallie MR, Bom VJ: Tumor necrosis factor alpha-induced endothelial tissue factor is located on the cell surface rather than in the subendothelial matrix. *Blood* 1994; 84(5): 1559-1566.

Murugappan S, Shankar H, Kunapuli SP: Platelet receptors for adenine nucleotides and thromboxan A₂. *Semin Thromb Hemost* 2004; 30(4): 411-418. Review.

Nathe TJ, Deou J, Walsh B, Bourns B, Clowes AW, Daum G: Interleukin-1beta inhibits expression of p21(WAF1/CIP1) and p27(KIP1) and enhances proliferation in response to platelet-derived growth factor-BB in smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22(8): 1293-1298.

Nemerson Y: A simple experiment and a weakening paradigm: the contribution of blood to propensity for thrombus formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22(9): 1369. Review.

Nemerson Y, Repke D: Tissue factor accelerates the activation of coagulation factor VII: the role of bifunctional coagulation cofactor. *Thromb Res* 1985; 40(3): 351-358.

Nesheim M, Wang W, Boffa M, Nagashima M, Morser J, Bajzar L: Thrombin, thrombomodulin and TAFI in the molecular link between coagulation and fibrinolysis. *Thromb Haemost* 1997; 78(1): 386-391. Review.

Newby AC: Dual role of matrix metalloproteinases (matrixins) in intimal thickening and atherosclerotic plaque rupture. *Physiol Rev* 2005; 85(1): 1-31. Review.

Niemann B, Rohrbach S, Catar RA, Muller G, Barton M, Morawietz H: Native and oxidized low-density lipoproteins stimulate endothelin-converting enzyme-1 expression in human endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 334(3): 747-753.

Nieswandt B, Watson SP: Platelet-collagen interaction: is GPVI the central receptor? *Blood* 2003; 102(2): 449-461. Review.

Nieuwland R, Berckmans RJ, McGregor S, Boing AN, Romijn FP, Westendorp RG, Hack CE, Sturk A: Cellular origin and procoagulant properties of microparticles in meningococcal sepsis. *Blood* 2000; 95(3): 930-935.

Nieuwland R, Berckmans RJ, Rotteveel-Eijkman RC, Maquelin KN, Roozendaal KJ, Jansen PG, ten Have K, Eijssman L, Hack CE, Sturk A: Cell-derived microparticles generated in patients during cardiopulmonary bypass are highly procoagulant. *Circulation* 1997; 96(10): 3534-3541.

Novotny WF, Girard TJ, Miletich JP, Broze GJ Jr.: Platelets secrete a coagulation inhibitor functionally and antigenically similar to the lipoprotein associated coagulation inhibitor. *Blood* 1988; 72(6): 2020-2025.

Ohta H, Wada H, Niwa T, Kirii H, Iwamoto N, Fujii H, Saito K, Sekikawa K, Seishima M: Disruption of tumor necrosis factor-alpha gene diminishes the development of atherosclerosis in ApoE-deficient mice. *Atherosclerosis* 2005; 180(1): 11-17

Oliver JA, Monroe DM, Roberts HR, Hoffmann M: Thrombin activates factor XI on activated platelets in the absence of factor XII. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19(1): 170-177.

Osterlund M, Persson E, Carlsson U, Freskgard PO, Svensson M: Sequential coagulation factor VIIa domain binding to tissue factor. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 337(4): 1276-1282.

Osterud B, Rao LV, Olsen JO: Induction of tissue factor expression in whole blood: lack of evidence for the presence of tissue factor expression in granulocytes. *Thromb Haemost* 2000; 83(6): 861-867.

Ott I: Tissue factor in acute coronary syndromes. *Semin Vasc Med* 2003; 3(2): 185-192. Review.

Ott I, Andrassy M, Ziegler-Gansberger D, Geith S, Schömig A, Neumann FJ: Regulation of monocyte procoagulant activity in acute myocardial infarction: role of tissue factor and tissue factor pathway inhibitor-1. *Blood* 2001; 97(12): 3721-3726.

Palabrica T, Lobb R, Furie BC, Aronovitz M, Benjamin C, Hsu YM, Sajer SA, Furie B: Leucocyte accumulation promoting fibrin deposition is mediated in vivo by platelet P-selectin on adherent platelets. *Nature* 1992; 359(6398): 848-851.

Panes O, Matus V, Saez CG, Quiroga T, Pereira J, Mezzano D: Human platelets synthesize and express functional tissue factor. *Blood* 2007; 109(12): 5242-5250.

Pasterkamp G, Schoneveld AH, van der Wal AC, Hijnen DJ, van Wolvenen WJ, Plomp S, Teepen HL, Borst C: Inflammation of the atherosclerotic cap and shoulder of the plaque is a common and locally observed feature in unruptured plaques of femoral and coronary arteries. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19(1): 54-58.

Penz S, Reininger AJ, Brandl R, Goyal P, Rabie T, Bernlochner I, Rother E, Goetz C, Engelmann B, Smethurst PA, Ouwehand WH, Farndale R, Nieswandt B, Siess W: Human atheromatous plaques stimulate thrombus formation by activating platelet glycoprotein VI. *Faseb J* 2005; 19(8): 898-909.

Petersen LC, Bjorn SE, Olsen OH, Nordfang O, Norris F, Norris K: Inhibitory properties of separate recombinant Kunitz-type-protease-inhibitor domains from tissue-factor-pathway inhibitor. *Eur J Biochem* 1996; 235(1-2): 310-316.

Pieters J, Lindhout T, Hemker HC: In situ-generated thrombin is the only enzyme that effectively activates factor VIII and factor V in thromboplastin-activated plasma. *Blood* 1989; 74(3): 1021-1024.

Pintucci G, Yu PJ, Saponara F, Kadian-Dodov DL, Galloway AC, Mignatti P: PDGF-BB induces vascular smooth muscle cell expression of high molecular weight FGF-2, which accumulates in the nucleus. *J Cell Biochem* 2005; 95(6): 1292-1300.

Polgar J, Matuskova J, Wagner DD: The P-selectin, tissue factor, coagulation triad. *J Thromb Haemost* 2005; 3(8):1590-1596. Review.

Raines EW: PDGF and cardiovascular disease. *Cytokine Growth Factor Rev* 2004; 15(4): 237-254. Review.

Rao DS, Goldin JG, Fishbein MC: Determinants of plaque instability in atherosclerotic vascular disease. *Cardiovasc Pathol* 2005;14(6): 285-293.

Rauch U, Bonderman D, Bohrmann B, Badimon JJ, Hember J, Riederer MA, Nemerson Y: Transfer of tissue factor from leucocytes to platelets is mediated by CD15 and tissue factor. *Blood* 2000; 96(1):170-175.

Rauch U, Osende JI, Fuster V, Badimon JJ, Fayad Z, Chesebro JH: Thrombus formation on atherosclerotic plaques: pathogenesis and clinical consequences. *Ann Intern Med* 2001; 134(3): 224-238. Review.

Rendu F, Brohard-Bohn B: The platelet release reaction: granules' constituents, secretion and functions. *Platelets* 2001; 12(5): 261-273. Review.

Renne T, Pozgajova M, Grüner S, Schuh K, Pauer HU, Burfeind P, Gailani D, Nieswandt B: Defective thrombus formation in mice lacking coagulation factor XII. *J Exp Med* 2005; 202(2): 271-281.

Robbesyn F, Salvayre R, Negre-Salvayre A: Dual role of oxidized LDL on the NF-kappaB signaling pathway. *Free Radic Res* 2004; 38(6): 541-551. Review.

Ross R: The pathogenesis of atherosclerosis -- An update. *N Engl J Med* 1986; 314(8): 488-500. Review.

Ross R: The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 1993; 362(6432): 801-809. Review.

Roth GJ, Calverley DC: Aspirin, platelets, and thrombosis: Theory and practice. *Blood* 1994; 83(4): 885-898. Review.

Ruggeri ZM: Mechanisms initiating platelet thrombus formation. *Thromb Haemost* 1997; 78(1); 611-616. Review.

Ruggeri ZM: Platelets in atherothrombosis. *Nat Med* 2002; 8(11): 1227-1234. Review.

Ruggeri ZM, De Marco L, Gatti L, Bader R, Montgomery RR: Platelets have more than one binding site for von Willebrand factor. *J Clin Invest* 1983; 72(1): 1-12.

Ruschitzka F, Moehrlen U, Quaschnig T, Lachat M, Noll G, Shaw S, Yang Z, Teupser D, Subkowski T, Turina MI, Luscher TF: Tissue endothelin converting enzyme activity correlates with cardiovascular risk factors in coronary artery disease. *Circulation* 2000; 102(10): 1086-1092.

Sakariassen KS, Joss R, Muggli R, Kuhn H, Tschopp TB, Sage H, Baumgartner HR: Collagen type III induced ex vivo thrombogenesis in humans. Role of platelets and leukocytes in deposition of fibrin. *Arteriosclerosis* 1990; 10(2): 276-284.

Sambrano GR, Weiss EJ, Zheng YW, Huang W, Coughlin SR: Role of thrombin signalling in platelets in haemostasis and thrombosis. *Nature* 2001; 413(6851): 74-78.

Schechter AD, Giesen PL, Taby O, Rosenfield CL, Rossikhina M, Fyfe BS, Kohtz DS, Fallon JT, Nemerson Y, Taubmann MB: Tissue factor expression in human arterial smooth muscle cells. TF is present in three cellular pools after growth factor stimulation. *J Clin Invest* 1997; 100(9): 2276-2285.

Schechter AD, Spirn B, Rossikhina M, Giesen PL, Bogdanov V, Fallon JT, Fisher EA, Schnapp LM, Nemerson Y, Taubman MB: Release of active tissue factor by human arterial smooth muscle cells. *Circ Res* 2000; 87(2): 126-132.

Schwartz SM, Reidy MA: Common mechanism of proliferation of smooth muscle in atherosclerosis and hypertension. *Hum Pathol* 1987; 18(3): 240-247. Review.

Shariat-Madar Z, Mahdi F, Schmaier AH: Assembly and activation of the plasma kallikrein/kinin system: a new interpretation. *Int Immunopharmacol* 2002; 2(13-14): 1841-1849. Review.

Schwartz H, Tolley ND, Foulks JM, Denis MM, Risenmay BW, Buerke M, Tilley RE, Rondina MT, Harris EM, Kraiss LW, Mackman N, Zimmerman GA, Weyrich AS: Signal-dependent splicing of tissue factor pre-mRNA modulates the thrombogenicity of human platelets. *J Exp Med* 2006; 203(11):2433-2440.

Shashkin P, Dragulev B, Ley K: Macrophage differentiation to foam cells. *Curr Pharm Des* 2005; 11(23): 3061-3072. Review.

Shih DM, Xia YR, Wang XP, Miller E, Castellani LW, Subbanagounder G, Cheroutre H, Faull KF, Berliner JA, Witztum JL, Lusis AJ: Combined serum paraoxonase knockout/apolipoprotein E knockout mice exhibit increased lipoprotein oxidation and atherosclerosis. *J Biol Chem* 2000; 275(23): 17527-17535.

Shimokado K, Raines EW, Madtes DK, Barrett TB, Benditt EP, Ross R: A significant part of macrophage-derived growth factor consists of at least 2 forms of PDGF. *Cell* 1985; 43(1): 277-286.

Siddiqui FA, Desai H, Amirkhosravi A, Amaya M, Francis JL: The presence and release of tissue factor from human platelets. *Platelets* 2002; 13(4): 247-253.

Siess W: Athero- and thrombogenic actions of lysophosphatidic acid and sphingosine-1-phosphate. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1582(1-3): 204-215. Review.

Siljander P, Carpen O, Lassila R: Platelet-derived microparticles associate with fibrin during thrombosis. *Blood* 1996; 87(11): 4651-4663.

Sims PJ, Faioni EM, Wiedmer T, Shattil SJ: Complement proteins C5b-9 cause release of membrane vesicles from the platelet surface that are enriched in the membrane receptor for coagulation factor Va and express prothrombinase activity. *J Biol Chem* 1988; 263(34): 18205-18212.

Sjölund M, Hedin U, Sejersen T, Heldin CH, Thyberg J: Arterial smooth muscle cells express platelet-derived growth factor (PDGF) A chain mRNA, secrete a PDGF-like mitogen, and bind exogenous PDGF in a phenotype- and growth state- dependent manner. *J Cell Biol* 1988; 106(2): 403-413.

Slager CJ, Wentzel JJ, Gijzen FJ, Schuurbijs JC, van der Wal AC, van der Steen AF, Serruys PW: The role of shear stress in the generation of rupture-prone vulnerable plaques. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2005; 2(8): 401-407. Review.

Soejima H, Ogawa H, Yasue H, Kaikita K, Nishiyama K, Misumi K, Takazoe K, Miyao Y, Yoshimura M, Kugiyama K, Nakamura S, Tsuji I, Kumeda K: Heightened tissue factor associated with tissue factor pathway inhibitor and prognosis in patients with unstable angina. *Circulation* 1999; 99: 2908-2913.

Spronk HM, Govers-Riemslog JW, ten Cate H: The blood coagulation system as a molecular machine. *Bioessays* 2003; 25(12): 1220-1228. Review.

Stary HC: Composition and classification of human atherosclerotic lesions. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 1992; 421(4): 277-290. Review.

Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, Fuster V, Glagov S, Insull W Jr, Rosenfeld ME, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW: A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995; 15(9): 1512-1531.

Stenberg PE, McEver RP, Shumann MA, Jaques YV, Bainton DF: A platelet alpha-granule membran protein (GMP-140) is expressed on the plasma membrane after activation. *J Cell Biol* 1985; 101(3): 880-886.

Tan KT, Lip GY: The potential role of platelet microparticles in atherosclerosis. *Thromb Haemost* 2005; 94(3): 488-492. Review.

Tedgui A, Mallat Z: Apoptosis as a determinant of atherothrombosis. *Thromb Haemost* 2001; 86(1): 420-426. Review.

Thiagarajan P, Tait JF: Collagen-induced exposure of anionic phospholipids in platelets and platelet derived microparticles. *J Biol Chem* 1991; 266(36): 24302-24307.

Thiruvikraman SV, Guha A, Roboz J, Taubman MB, Nemerson Y, Fallon JT: In situ localization of tissue factor in human atherosclerotic plaques by binding of digoxigenin-labeled factors VIIa and X. *Lab Invest* 1996; 75(4): 451-461.

Toschi V, Gallo R, Lettino M, Fallon JT, Gertz SD, Fernandez-Ortiz A, Chesebro JH, Badimon L, Nemerson Y, Fuster V, Badimon JJ: Tissue factor modulates the thrombogenicity of human atherosclerotic plaques. *Circulation* 1997; 95(3): 594-599.

van der Wal AC, Becker AE, van der Loos CM, Das PK: Site of intimal rupture or erosion of thrombosed coronary atherosclerotic plaques is characterized by an inflammatory process irrespective of the dominant plaque morphology. *Circulation* 1994; 89(1): 36-44.

van Dieijen G, Tans G, Rosing J, Hemker HC: The role of phospholipids and factor VIIIa in the activation of bovine factor X. *J Biol Chem* 1981; 256(7): 3433-3442.

van Zanten GH, de Graaf S, Slootweg PJ, Heijnen HF, Connolly TM, de Groot PG, Sixma JJ: Increased platelet deposition on atherosclerotic coronary arteries. *J Clin Invest* 1994; 93(2): 615-632.

Vandendries ER, Furie BC, Furie B: Role of P-selectin and PSGL-1 in coagulation and thrombosis. *Thromb Haemost* 2004; 92(3): 459-466. Review.

VanWijk MJ, VanBavel E, Sturk A, Nieuwland R: Microparticles in cardiovascular disease. *Cardiovasc Res* 2003; 59(2): 277-287. Review.

Virmani R, Kolodgie FD, Burke AP, Farb A, Schwartz SM: Lessons from sudden coronary death: a comprehensive morphological classification scheme for atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20(5): 1262-1275. Review.

Walsh PN, Ahmad SS: Proteases in blood clotting. *Essays Biochem* 2002; 38: 95-111. Review.

Watanabe N, Ikeda U: Matrix metalloproteinases and atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep* 2004; 6(2): 112-120. Review.

Weidtmann A, Scheithe R, Hrboticky N, Pietsch A, Lorenz R, Siess W: Mildly oxidized LDL induces platelet aggregation through activation of phospholipase A2. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995; 15(8): 1131-1138.

Wilcox JN, Smith KM, Schwartz SM, Gordon D: Localization of tissue factor in the normal vessel wall and in the atherosclerotic plaque. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86(8): 2839-2843.

Wilson DP, Susnjar M, Kiss E, Sutherland C, Walsh MP: Thromboxane A2-induced contraction of rat caudal arterial smooth muscle involves activation of Ca²⁺ entry and Ca²⁺ sensitization: Rho-associated kinase-mediated phosphorylation of MYPT1 at Thr-855, but not Thr-697. *Biochem J* 2005; 389(Pt3): 763-774.

Wolfs JL, Comfurius P, Rasmussen JT, Keuren JF, Lindhout T, Zwaal RF, Bevers EM: Activated scramblase and inhibited aminophospholipid translocase cause phosphatidylserine exposure in a distinct platelet fraction. *Cell Mol Life Sci* 2005; 62(13): 1514-1525.

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(2): H873-875.

Yang PY, Rui YC, Lu L, Li TJ, Liu SQ, Yan HX, Wang HY: Time courses of vascular endothelial growth factor and intercellular adhesion molecule-1 expressions in aortas of atherosclerotic rats. *Life Sci* 2005; 77(20): 2529-2539.

Yu G, Rux AH, Ma P, Bdeir K, Sachais BS: Endothelial expression of E-selectin is induced by the platelet-specific chemokine platelet factor 4 through LRP in an NF-kappaB-dependent manner. *Blood* 2005; 105(9): 3545-3551.

Yun TH, Baglia FA, Myles T, Navaneetham D, Lopez JA, Walsh PN, Leung LL: Thrombin activation of factor XI on activated platelets requires the interaction of factor XI and platelet glycoprotein Ib alpha with thrombin anion-binding exosites I and II, respectively. *J Biol Chem* 2003; 278(48): 48112-48119.

Zieseniss S, Zahler S, Müller I, Hermetter A, Engelmann B: Modified phosphatidylethanolamine as the active component of oxidized low density lipoprotein promoting platelet prothrombinase activity. *J Biol Chem* 2001; 276(23): 19828-19835.

Zillmann A, Luther T, Müller I, Kotzsch M, Spannagl M, Kauke T, Oelschlagel U, Zahler S, Engelmann B: Platelet-associated tissue factor contributes to the collagen-triggered activation of blood coagulation. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 281(2): 603-609.

Zito F, Drummond F, Bujac SR, Esnouf MP, Morrissey JH, Humphries SE, Miller GJ: Epidemiological and genetic associations of activated factor XII concentration with factor VII activity, fibrinopeptide A concentration, and risk of coronary heart disease in men. *Circulation* 2000; 102(17): 2058-2062.

Zwaal RF, Comfurius P, Bevers EM: Lipid-protein interactions in blood coagulation. *Biochem Biophys Acta* 1998; 1376(3): 433-453. Review.

Zwaal RF, Comfurius P, Bevers EM: Surface exposure of phosphatidylserine in pathological cells. *Cell Mol Life Sci* 2005; 62(9): 971-988. Review.

Zwaal RF, Schroit AJ: Pathophysiologic implications of membrane phospholipid asymmetry in blood cells. *Blood* 1997; 89(4): 1121-1132. Review.

VII. Anhang

VII.1. Danksagung

Zu guter Letzt möchte ich mich ganz herzlich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. B. Engelmann für die Themenstellung, die exzellente Betreuung bei der Durchführung der Experimente und der Korrektur dieser Arbeit.

Desweiteren bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Dr. h.c. D. Seidel für die Bereitstellung der technischen Geräte in den Räumlichkeiten des Instituts für klinische Chemie.

Bei Prof. R. Brandl (Gefäßchirurgische Abteilung des Klinikums München – Schwabing) und Prof. Dr. W. Siess (Institut für Prophylaxe und Epidemiologie der Kreislaufkrankheiten, Klinikum Innenstadt, Universität München) möchte ich mich für die Bereitstellung der atherosklerotischen Plaques bedanken.

Ich bedanke mich ferner bei Herrn PD Dr. T. Luther (Institut für Pathologie, TU Dresden) für die Double-Sandwich-ELISA Bestimmungen, sowie die Bereitstellung von Antikörpern. Desweiteren möchte ich auch Herrn PD Dr. S. Massberg (Deutsches Herzzentrum München) auch für die Bereitstellung von Antikörpern danken.

Ausserdem möchte ich meinen Mitdoktoranden Tini M. und Ingrid M. für die Einführung in die Methodik danken. Ganz besonderer Dank gilt auch Berid A., Silke D., Lenka G. und Kiril B. für deren stete Hilfsbereitschaft und Rat bei Problemen sowie die vielen netten Abende außerhalb des Labors.

Meiner Schwester Cauli möchte ich für die tolle Unterstützung während des gesamten Studiums und der Durchführung der Doktorarbeit danken.

Mein allergrößter Dank gilt meinen Eltern, die mir das Medizinstudium ermöglicht haben und mich stets uneingeschränkt unterstützt haben.

VII.2. Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Götz
Vorname: Christine
Geburtsdatum/-ort: 05.02.1979, München
Anschrift: Marbachstr. 3
81369 München
Telefon: 089/368051
e-mail: tini.goetz@gmx.de

Schulbildung:

1985 – 1989 Grundsule in Gröbenzell
1989 – 1998 Gymnasium Puchheim
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Hochschulausbildung:

11/1998 – 09/2004 Technische Universität München: Studiengang
Humanmedizin
08/2000 Ärztliche Vorprüfung
08/2001 Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
08/2004 Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
10/2004 – 11/2005 Ludwig-Maximilian-Universität München:
Studiengang Humanmedizin
10/2004 – 09/2005 Praktisches Jahr
10/2005 Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung

Dissertation:

ab 10/2005 Doktorarbeit im Institut für klinische Chemie,
Klinikum Großhadern der Ludwig-Maximilians-
Universität in München, Forschungsschwerpunkt
„Vaskuläre Biologie und Hämostase“, Arbeitsgruppe
Professor Dr. med. B. Engelmann
Thema: Die Beteiligung des intravaskulären TF -
Systems an der Aktivierung der
Blutgerinnung durch atherosklerotische
Plaques

Berufliche Weiterbildung:

Seit 02/2006 Assistenzärztin in der Klinik für Kinder- und
Jugendmedizin des Klinikums Starnberg