

Einfluss von oral applizierter Acetylsalicylsäure (ASS) und Clopidogrel auf die Thrombozytenfunktion beim gesunden erwachsenen Hund

JONAS STEINEL



Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei den Autoren dieses Werkes.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung der Autoren oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2016

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Authors or the Publisher.

1st Edition 2016

© 2016 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Klinikum Veterinärmedizin -
Klinische Pathophysiologie und Klinische Laboratoriumsdiagnostik
Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen
Betreuer: Prof. Dr. A. Moritz

Einfluss von oral applizierter Acetylsalicylsäure (ASS) und Clopidogrel auf die Thrombozytenfunktion beim gesunden erwachsenen Hund

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Jonas Steinel

Tierarzt aus Friedberg, Hessen

Gießen 2015

Mit Genehmigung des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan:

Herr Prof. Dr. Dr. h.c. Martin Kramer

Gutachter:

Prof. Dr. Kerstin Fey
Prof. Dr. Sibylle Mazurek
Prof. Dr. Andreas Moritz

Tag der Disputation:

10.11.2015

Meinem Opa

Dr. Paul Hoffmann

(26.07.1920 - 01.09.2003)

1 Inhaltsverzeichnis

1	Inhaltsverzeichnis	5
2	Abkürzungsverzeichnis	8
3	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	10
4	Einleitung	13
5	Literaturübersicht	14
5.1	Hämostase.....	14
5.1.1	Thrombozyten.....	14
5.1.2	Primäre Hämostase.....	16
5.1.3	Sekundäre Hämostase	17
5.1.4	Natürliche Inhibitoren und Fibrinolyse	18
5.2	Hyperkoagulabilität.....	19
5.2.1	Immunhämolytische Anämie	19
5.2.2	Hyperadrenokortizismus.....	20
5.2.3	Diabetes mellitus	21
5.2.4	Sepsis und disseminierte intravasale Gerinnung	21
5.2.5	Neoplasien	21
5.2.6	Herzerkrankungen.....	22
5.2.7	Erkrankungen mit Proteinverlust.....	22
5.3	Untersuchung der primären Hämostase	22
5.3.1	Thrombelastographie (TEG) und Thrombelastometrie (ROTEM) als Globaltests aller Gerinnungsphasen.....	22
5.3.2	Bestimmung der Thrombozytenzahl und Thrombozytenaktivierungsindizes... 24	
5.3.3	Klinische Tests zur Überprüfung der Thrombozytenfunktion	24
5.3.4	Möglichkeiten der Thrombozytenmessung	25
5.3.5	Das Multiplate als Vollblutimpedanzaggregometrie-Messgerät.....	25
5.4	Möglichkeiten der Thrombozytenaggregationshemmung.....	27
5.4.1	Acetylsalicylsäure.....	28
5.4.2	Acetylsalicylsäureresistenz.....	30
5.4.3	Clopidogrel	31
5.4.4	Clopidogrelresistenz.....	32

5.5	Non-Responder	32
6	Material und Methoden	34
6.1	Studienaufbau	34
6.2	Probanden	36
6.3	Medikamentenverabreichung	36
6.4	Entnahme der Blutproben	37
6.5	Probengefäße	37
6.6	Probenaufbereitung	37
6.7	Durchführung der Messungen	38
6.7.1	Thrombelastographie TEG 5000	38
6.7.2	Hämatologie inklusive Thrombozytenaktivierungsindizes	38
6.7.3	Thrombozytenaggregometrie, Multiplate	39
6.7.4	Klinisch-chemische Analysen	42
6.8	Statistische Auswertung	42
7	Ergebnisse	43
7.1	Thrombelastographie	44
7.2	Thrombozytenaggregometrie	46
7.3	Die einzelnen Agonisten und ihre Aussagekraft	47
7.3.1	Kollagen	47
7.3.2	Arachidonsäure	47
7.3.3	ADP	49
7.4	Responder und Non Responder	50
7.5	Wirkdauer und Dosis	52
7.6	Thrombozytengranularität (MPC)	54
8	Diskussion	55
8.1	Magensaftresistenter Tablettenüberzug	55
8.2	Medikamentengabe mit Futter	56
8.3	Globaler Gerinnungstest mittels Thrombelastographie	56
8.4	Vollblutaggregometrie mit Multiplate	57
8.4.1	Agonisten	58
8.5	Non-Responder, Low-Responder	59
8.5.1	ASS	59
8.5.2	Clopidogrel	60

8.6	Thrombozytenfunktionshemmer beim Hund.....	61
8.6.1	ASS	61
8.6.2	Clopidogrel	62
8.7	Dauer der Medikamentenwirkung	63
8.7.1	ASS	63
8.7.2	Clopidogrel	64
8.8	Wechselwirkungen	64
8.9	Grenzen der Studie.....	65
9	Schlussfolgerung	67
10	Zusammenfassung	68
11	Summary	70
12	Literatur	72
13	Anhang 1	78
14	Anhang 2	80
15	Danksagung.....	85
16	Erklärung:.....	86

2 Abkürzungsverzeichnis

AA	Arachidonsäure
ACTH	Adrenokortikotropes Hormon
ADP	Adenosindiphosphat
ASPI	Arachidonsäure
AG	Aktiengesellschaft
ASS	Acetylsalicylsäure
ATP	Adenosintriphosphat
AUC	Fläche unter der Kurve
BMBT	Schleimhautblutungszeit
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CD47	Unterscheidungsgruppe 47
CD82	Unterscheidungsgruppe 82
CD9	Unterscheidungsgruppe 9
COL	Kollagen
COX	Cyclooxygenase
CYP	Cytochrom P
DIC	Disseminierte intravasale Gerinnung
DNS	Desoxiribonukleinsäure
DTS	Dichtes Tubulussystem
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Faktor IIa	aktiviertes Prothrombin
Faktor IX	antihämophiles Globulin B
Faktor VII	Prokonvertin
Faktor VIII	antihämophiles Globulin A
Faktor X	Stuart-Prower Faktor
Faktor XI	Plasma Thromboplasmin Antecedent
Faktor XII	Hagemann-Faktor
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
Gi	inhibitorisches G-Protein
GP	Glykoprotein
GP VI	Glykoprotein VI
GPq	Glykoprotein q
Gs	stimulierendes G-Protein
ICAM	intrazelluläes Adhäsionsmolekül
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IL	Interleukin
IMHA	immunhämolytische Anämie
K	Koagulationszeit
LTA	Messgerät mit Hilfe der Lichtdurchlässigkeit
MA	Maximale Amplitude
MPC	Thrombozytendichte
NaCl	Natriumchlorid
PAF	Plättchenaktivierender Faktor

PAR.....	Proteaseaktivierender Rezeptor
PDGF	Thrombozytenabgeleiteter Wachstumsfaktor
PE	Polyethylen
PECAM	Thrombozyten-Endothelzell-Adhäsionsmolekül
PGI2.....	Prostaglandin 2
PLE	Proteinverlust Enteropathie
PLN.....	Proteinverlust Nephropathie
PPI	Protonenpumpeninhibitor
pT	Prothrombinzeit
pTT	partielle Prothrombinzeit
PTA.....	Rosenthal-Faktor
PU.....	Polyurie
R	Reaktionszeit
RCS	Rabbit Aorta Contracting Substance
TF	Gewebefaktor
TNF.....	Tumornekrosefaktor
TVA.....	Tierversuchsantrag
vWF	von Willebrand Faktor

3 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

ABBILDUNG 2: TEG ANHAND EINER MESSUNG AUS DER STUDIE; R=REAKTIONSZEIT, K=GERINNUNGSZEIT, A=GESCHWINDIGKEIT DER FIBRINBILDUNG, MA=MAXIMALE AMPLITUDE MIT DEN JEWELIGEN REFERENZWERTEN.....	23
ABBILDUNG 3: WIRKUNGSWEISE VON KOLLAGEN AUF DEN THROMBOZYTEN (MODIFIZIERT NACH CEZARY); COX-1=CYCLOOXIGENASE-1, TxA ² =THROMBOXAN A2, ADP=ADENOSINDIPHOSPHAT, TRAP=THROMBINREZEPTOR AKTIVIERTES PROTEIN, GP=GLYKOPROTEIN	40
ABBILDUNG 4: WIRKUNGSWEISE VON ARACHIDONSÄURE AUF DEN THROMBOZYTEN (MODIFIZIERT NACH CEZARY); COX-1=CYCLOOXIGENASE-1, TxA ² =THROMBOXAN A2, ADP=ADENOSINDIPHOSPHAT, TRAP=THROMBINREZEPTOR AKTIVIERTES PROTEIN, GP=GLYKOPROTEIN	41
ABBILDUNG 5: WIRKUNGSWEISE VON ADP AUF DEN THROMBOZYTEN (MODIFIZIERT NACH CEZARY); COX-1=CYCLOOXIGENASE-1, TxA ² =THROMBOXAN A2, ADP=ADENOSINDIPHOSPHAT, TRAP=THROMBINREZEPTOR AKTIVIERTES PROTEIN, GP=GLYKOPROTEIN	42
ABBILDUNG 6: NICHT AUSWERTBARE TEG-KURVE VON HUND 4 VOR ERSTER ASS-GABE	44
ABBILDUNG 7: AM TEG GEMESSENE MAXIMALAMPLITUDE (MA) (REF.: 51-69MM) ZU DEN VERSCHIEDENEN ZEITPUNKTEN VOR MEDIKAMENTENGABE (1), NACH 6 STUNDEN (2), NACH 24H (3), NACH 14 TAGEN (4); ABKÜRZUNGEN: TEG: THROMBELASTOGRAPHIE, TI: THROMBOZYTENINHIBITOR, T: ZEIT, TI-XT: THROMBOZYTENINHIBITOR-ZEIT.....	45
ABBILDUNG 8: AM TEG GEMESSENE GERINNUNGSZEIT (K) (REF.: 1-3 MIN) ZU DEN VERSCHIEDENEN ZEITPUNKTEN (REF.: 1-3MIN) VOR MEDIKAMENTENGABE (1), NACH 6 STUNDEN (2), NACH 24H (3), NACH 14 TAGEN (4); ABKÜRZUNGEN: TEG: THROMBELASTOGRAPHIE.....	45
ABBILDUNG 9: AM TEG GEMESSENE FIBRINBILDUNGSGESCHWINDIGKEIT (WINKEL A) (REF.: 55-78°) ZU DEN VERSCHIEDENEN ZEITPUNKTEN VOR MEDIKAMENTENGABE (1), NACH 6 STUNDEN (2), NACH 24H (3), NACH 14 TAGEN (4); ABKÜRZUNGEN: TEG: THROMBELASTOGRAPHIE.....	46
ABBILDUNG 10: AM TEG GEMESSENE REAKTIONSZEIT (R) (REF.: 2-8 MIN) ZU DEN VERSCHIEDENEN ZEITPUNKTEN VOR MEDIKAMENTENGABE (1), NACH 6 STUNDEN (2), NACH 24H (3), NACH 14 TAGEN (4); ABKÜRZUNGEN: TEG: THROMBELASTOGRAPHIE	46
ABBILDUNG 11: VOLLBLUTAGGREGOMETRIE MIT 3,23µG KOLLAGEN/ML VOLLBLUT ALS INDUKTOR; AUC (AREA UNDER THE CURVE, 1U=10AU*MIN.); GEMESSEN VOR DER MEDIKAMENTENEINGABE (1), NACH 6 STUNDEN (2), 12H (3), 24H(4), TAG 3 (5), TAG 4 (6), TAG 8 (7), TAG 10 (8), TAG 12 (9), TAG 14 (10); ABKÜRZUNGEN: TI (THROMBOZYTENINHIBITOR), T (ZEIT), TI-T (THROMBOZYTENINHIBITOR-ZEIT)	47
ABBILDUNG 12: VOLLBLUTAGGREGOMETRIE MIT 0,5MM ARACHIDONSÄURE ALS INDUKTOR; AUC (AREA UNDER THE CURVE, 1U=10AU*MIN.) GEMESSEN VOR DER MEDIKAMENTENEINGABE (1), NACH 6 STUNDEN (2), 12H (3), 24H(4), TAG 3 (5), TAG 4 (6), TAG 8 (7), TAG 10 (8), TAG 12 (9), TAG 14 (10); ABKÜRZUNGEN: TI (THROMBOZYTENINHIBITOR), T (ZEIT), TI-T (THROMBOZYTENINHIBITOR-ZEIT) .	48
ABBILDUNG 13: VOLLBLUTAGGREGOMETRIE NUR DIE FÜNF RESPONDER (AUC < 48% DES AUSGANGSWERTES) MIT 0,5MM ARACHIDONSÄURE (ASPI) ALS INDUKTOR; AUC (AREA UNDER THE CURVE,	

1U=10AU*MIN.) GEMESSEN VOR DER MEDIKAMENTENEINGABE (1), NACH 6 STUNDEN (2), 12H (3), 24H(4), TAG 3 (5), TAG 4 (6), TAG 8 (7), TAG 10 (8), TAG 12 (9), TAG 14 (10)	48
ABBILDUNG 14: VOLLBLUTAGGREGOMETRIE NUR NON-RESPONDER (AUC BLEIBT >48% DES AUSGANGSWERTES) MIT 0,5MM ARACHIDONSÄURE (ASPI) ALS INDUKTOR; AUC (AREA UNDER THE CURVE, 1U=10AU*MIN.) GEMESSEN VOR DER MEDIKAMENTENEINGABE (1), NACH 6 STUNDEN (2), 12H (3), 24H(4), TAG 3 (5), TAG 4 (6), TAG 8 (7), TAG 10 (8), TAG 12 (9), TAG 14 (10)	49
ABBILDUNG 15: VOLLBLUTAGGREGOMETRIE MIT 6,5µM ADP (ADENOSINDIPHOSPHAT) ALS INDUKTOR; AUC (AREA UNDER THE CURVE, 1U=10AU*MIN.) GEMESSEN VOR DER MEDIKAMENTENEINGABE (1), NACH 6 STUNDEN (2), 12H (3), 24H(4), TAG 3 (5), TAG 4 (6), TAG 8 (7), TAG 10 (8), TAG 12 (9), TAG 14 (10); ABKÜRZUNGEN: TI (THROMBOZYTENINHIBITOR), T (ZEIT), TI-T (THROMBOZYTENINHIBITOR-ZEIT)	49
ABBILDUNG 16: VOLLBLUTAGGREGOMETRIE MIT 6,5µM ADP UND 9,4NM PROSTAGLANDIN E1 ALS INDUKTOREN; AUC (AREA UNDER THE CURVE, 1U=10AU*MIN.) GEMESSEN VOR DER MEDIKAMENTENEINGABE (1), NACH 6 STUNDEN (2), 12H (3), 24H(4), TAG 3 (5), TAG 4 (6), TAG 8 (7), TAG 10 (8), TAG 12 (9), TAG 14 (10); ABKÜRZUNGEN: TI (THROMBOZYTENINHIBITOR), T (ZEIT), TI-T (THROMBOZYTENINHIBITOR-ZEIT)	50
ABBILDUNG 17: VERGLEICH DER ASS (ASPIRIN) RESPONDER UND NON-RESPONDER: GEMESSEN VOR DER MEDIKAMENTENEINGABE (1), NACH 6 STUNDEN (2), 12H (3), 24H(4), TAG 3 (5), TAG 4 (6), TAG 8 (7), TAG 10 (8), TAG 12 (9), TAG 14 (10)	50
ABBILDUNG 18: MESSUNG DER AUC (1U=10AU*MIN.) VON HUND 5 MIT EINEM PLÖTZLICHEN ABFALL ZUM ZEITPUNKT 5 (TAG 3)	51
ABBILDUNG 19: VERGLEICH CLOPIDOGREL RESPONDER UND LOW-RESPONDER GEMESSEN MIT ADP	51
TABELLE 20: AUC (AREA UNDER THE CURVE, 1U=10AU*MIN) IN PROZENT ZUM AUSGANGSWERT MIT 6,5µM ADP ALS INDUKTOR; FETT HERVORGEHOBENE ZAHLEN MARKIEREN EINE AUSREICHENDE THROMBOZYTENAGGREGATIONSHEMMUNG.	52
TABELLE 21: AUC (AREA UNDER THE CURVE, 1U=10AU*MIN) IN PROZENT ZUM AUSGANGSWERT MIT 6,5µM ADP DU 9,4NM PGE1 ALS INDUKTOR; FETT HERVORGEHOBENE ZAHLEN MARKIEREN EINE AUSREICHENDE THROMBOZYTENAGGREGATIONSHEMMUNG.	52
TABELLE 22: AUC (AREA UNDER THE CURVE, 1U=10AU*MIN) MIT 0,5MM ARACHIDONSÄURE (ASPI) ALS INDUKTOR; FETT HERVORGEHOBENE ZAHLEN MARKIEREN EINE AUSREICHENDE THROMBOZYTENAGGREGATIONSHEMMUNG	53
TABELLE 23: AUC (AREA UNDER THE CURVE, 1U=10AU*MIN) MIT 0,5MM ARACHIDONSÄURE ALS INDUKTOR; FETT HERVORGEHOBENE ZAHLEN MARKIEREN EINE AUSREICHENDE THROMBOZYTENAGGREGATIONSHEMMUNG.	53
TABELLE 24: AUC (AREA UNDER THE CURVE, 1U=10AU*MIN) IN PROZENT ZUM AUSGANGSWERT MIT 0,5MM ARACHIDONSÄURE ALS INDUKTOR; FETT HERVORGEHOBENE ZAHLEN MARKIEREN EINE AUSREICHENDE THROMBOZYTENAGGREGATIONSHEMMUNG.	54
ABBILDUNG 25: AUC (AREA UNDER THE CURVE, 1U=10AU*MIN) MIT 0,5MM ARACHIDONSÄURE ALS INDUKTOR; FETT HERVORGEHOBENE ZAHLEN MARKIEREN EINE AUSREICHENDE THROMBOZYTENAGGREGATIONSHEMMUNG.	54

ABBILDUNG 26: THROMBOZYTENGRANULARITÄT (MPC) IN GRAMM/DECILITER (G/DL) ZU DEN VERSCHIEDENEN MESSZEITPUNKTEN, GEMESSEN VOR DER MEDIKAMENTENEINGABE (1), NACH 6 STUNDEN (2), 12H (3), 24H(4), TAG 3 (5), TAG 4 (6), TAG 8 (7), TAG 10 (8), TAG 12 (9), TAG 14 (10) 54

TABELLE 1: REZEPTOREN DER THROMBOZYTEN UND IHRE FUNKTION NACH (WEISS ET AL., 2010) 80

TABELLE 27: MESSUNG DER AUC (1U=10AU*MIN), ASPIRIN 80

TABELLE 28: MESSUNG DER AUC (1U=10AU*MIN), CLOPIDOGREL 81

TABELLE 29: MESSUNG DER AUC (1U=10AU*MIN), ASPIRIN 81

TABELLE 30: MESSUNG DER AUC (1U=10AU*MIN), CLOPIDOGREL 81

TABELLE 31: MESSUNG DER AUC (1U=10AU*MIN), ASPIRIN 81

TABELLE 32: MESSUNG DER AUC (1U=10AU*MIN), CLOPIDOGREL 82

TABELLE 33: MESSUNG DER AUC (1U=10AU*MIN), ASPIRIN 82

TABELLE 34: MESSUNG DER AUC (1U=10AU*MIN), CLOPIDOGREL 82

TABELLE 35: MESSUNG DER AUC (1U=10AU*MIN), ASPIRIN 82

TABELLE 36: MESSUNG DER AUC (1U=10AU*MIN), CLOPIDOGREL 83

TABELLE 37: MESSUNG DER AUC (1U=10AU*MIN), CLOPIDOGREL 83

TABELLE 38: MESSUNG DER AUC (1U=10AU*MIN), CLOPIDOGREL 83

TABELLE 39: MESSUNG DER AUC (1U=10AU*MIN), ASPIRIN 83

TABELLE 40: MESSUNG DER AUC (1U=10AU*MIN), CLOPIDOGREL 83

TABELLE 41: MESSUNG DER AUC (1U=10AU*MIN), ASPIRIN 84

TABELLE 42: MESSUNG DER AUC (1U=10AU*MIN), CLOPIDOGREL 84

TABELLE 43: MESSUNG DER AUC (1U=10AU*MIN), ASPIRIN 84

TABELLE 44: MESSUNG DER AUC (1U=10AU*MIN), CLOPIDOGREL 84

TABELLE 45: MESSUNG DER AUC (1U=10AU*MIN), ASPIRIN 85

TABELLE 46: MESSUNG DER AUC (1U=10AU*MIN), CLOPIDOGREL) 85

4 Einleitung

Die Bildung von intravaskulären Thromben stellt bei Hunden mit Herzerkrankungen (Tarnow et al., 2005), septischen Geschehen (Mischke et al., 2005) oder immunhämolytischen Anämien (Scott-Moncrieff et al., 2001; Mellett et al., 2011) eine ernst zu nehmende Komplikation dar.

Die Pathogenese von Thromben ist sehr unterschiedlich: Verursachen Herzerkrankungen Turbulenzen im Blutfluss oder eine Hämostase, können sich Thromben in den Herzohren (Auriculae atrii) bilden und in die Arterien (Aorta, Aa. Iliacae, Aa. pulmonales) ausgeschwemmt werden. Je kleiner der Gefäßdurchmesser wird, umso größer ist die Gefahr, dass der Thrombus im Gefäß hängen bleibt und dieses teilweise oder komplett verschließt.

Bei Infektionen werden vermehrt Gerinnungsfaktoren produziert und ausgeschüttet. Dies verstärkt die Blutgerinnung und erhöht das Risiko einer Thrombenbildung direkt in den Gefäßen. Auch bei hämolytischen Anämien können sich Thromben direkt in den Gefäßen bilden, wenn Erythrozyten durch Antikörper zerstört werden. Durch die fehlende Blutversorgung eines oder mehrerer Organe kommt es schließlich zum Multiorganversagen.

Um die Entstehung von Thromben zu verhindern wird empfohlen, betroffene Tiere mit dem Gerinnungshemmer Heparin oder niedrig dosiert mit Acetylsalicylsäure (ASS, 0,5 mg/kg/Tag) (Scott-Moncrieff et al., 2001; Shearer L., 2009) zu behandeln. Ein Nachweis, dass der Einsatz von ASS tatsächlich in dieser Dosierung die Thrombozytenfunktion beim Hund hemmt, fehlt bisher (Shearer L., 2009).

Weiterhin werden Gerinnungshemmer (Heparin) in der Therapie von portosystemischen Shunts beim Hund eingesetzt, um die Thrombenbildung am Verschlussystem zu verlangsamen (Stosic, 2011). Heparine haben den Nachteil, dass sie parenteral verabreicht werden müssen, wohingegen die Thrombozytenaggregationshemmer ASS und Clopidogrel oral gegeben werden können.

Die Wirksamkeit von Heparin beruht auf einer Hemmung von Thrombin und antiFaktor Xa, die Aktivierung der Thrombozyten beeinflussen Heparine bei Standarddosis nicht (Pittman et al., 2010). Ganz anders die Thrombozytenaggregationshemmer: ASS hemmt die Cyclooxygenase und Clopidogrel blockiert den Rezeptor P2Y12, in beiden Fällen resultiert daraus eine irreversible Hemmung der Thrombozyten (Cattaneo, 2004)

ASS und Clopidogrel werden bisher überwiegend empirisch beim Hund eingesetzt (Tarnow et al., 2005; Pape et al., 2007). Erst sechs veterinärmedizinische Studien haben die Wirkung und das Ausmaß der Gerinnungshemmung dieser Substanzen beim Hund untersucht (Grauer et al., 1992; Nielsen et al., 2007; Halmay et al., 2008; Shearer L., 2009; Sharpe et al., 2010; Mellett et al., 2011). Wohingegen allein die Suche über das Web of Science (www.webofknowledge.com) nach Veröffentlichungen zur Wirkung von Heparin bei Hunden

bereits zu 229 Treffern führt. Gründe für diese Zurückhaltung der Gerinnungsdiagnostik in der Veterinärmedizin könnten sein: die erforderlichen Geräte und Agonisten waren sehr teuer, die Probenaufbereitung aufwändig und die Ergebnisse ungenau.

Eine Loading Dose ASS oder Clopidogrel wurde nach Literaturrecherche des Autors bisher nicht in der Veterinärmedizin eingesetzt. Der Ansatz scheint aber interessant, da in der Humanmedizin mit doppelter Anfangsdosis ein schnellerer Wirkungseintritt und eine längere Wirkungsdauer erzielt werden konnte als mit der normalen 300 mg Clopidogrel Dosierung (Müller, 2001). Auf Grund dieser Ergebnisse verwendeten wir in unserer Studie ebenfalls eine Loading Dose von ASS und Clopidogrel.

Das Ziel der prospektiven Studie bestand darin, bei Hunden die Wirksamkeit von ASS und Clopidogrel mittels einer Vollblutaggregation zu überprüfen. Als Messgeräte wurden das Vollblutaggregationsmessgerät Multiplate (Dynabyte, München; jetzt: Roche, Mannheim) (Kalbantner et al., 2010), sowie der Thrombelastograph TEG 5000 (Haemonetics, Braintree) verwendet

5 Literaturübersicht

In diesem Kapitel werden die Hämostase mit Fokus auf die Thrombozytenfunktion und geeignete Messverfahren dargestellt.

5.1 Hämostase

Die Blutgerinnung resultiert aus primärer und sekundärer Hämostase, natürlichen Inhibitoren und der Fibrinolyse. Durch neue Erkenntnisse aus experimentellen und klinischen Studien ist die alte Einteilung in intrinsische und extrinsische Hämostase überholt (Hoffman und Monroe, 2001). Es hat sich gezeigt, dass die Gerinnung in vivo besser durch ein zellbasiertes Modell beschrieben werden kann, bei dem das Hauptaugenmerk auf den Zellen inklusive des Gewebefaktors (TF) und den Thrombozyten liegt.

Die Einteilung des intrinsischen und extrinsischen Weges der Blutgerinnung wird heute in Aktivierung, Verstärkung, Ausdehnung und Terminierung unterteilt (Hoffman und Monroe, 2001). Die Aktivierung erfolgt durch Schädigung der Endothelzellen und damit verbundener Ausschüttung des Gewebefaktors (TF). Bei der Verstärkung wandern die Thrombozyten durch das geschädigte Endothel, binden sich an Kollagen und andere Bestandteile der extrazellulären Matrix, wodurch ein Thrombus entsteht. Die Phase der Ausdehnung ist geprägt durch die Migration vieler Thrombozyten und der damit verbundenen Produktion von Prothrombin und Tenasekomplexen (Hoffman und Monroe, 2001). Die anschließende Terminierung wird bewirkt durch Inhibitoren und Fibrinolyse.

5.1.1 Thrombozyten

5.1.1.1 Entwicklung von Thrombozyten

Pluripotente Stammzellen entwickeln sich zu Megakaryoblasten, welche durch Polyploidisierung und Endoreduplikation der DNS zu Promegakaryozyten und schließlich, ohne eine Teilung des Zytoplasmas, zu Megakaryozyten heranreifen.

Mit jedem Reifungsabschnitt vergrößert sich die Zelle, wodurch der reife Megakaryozyt (neben dem Osteoklasten) die größte Zelle im Knochenmark ist. Die stark basophil erscheinenden Megakaryozyten sind die Vorläufer der Thrombozyten und verharren neben dem Gefäßsinus im Knochenmark. Durch Zytoplasmaabschnürungen entlässt jeder Megakaryozyt ca. 1000-1500 reife Thrombozyten in den Blutkreislauf. (Harvey, 2001).

Thrombozyten überleben bei Hunden vier bis sieben Tage (Dale et al., 1996) im Blut und werden hauptsächlich in der Milz abgebaut.

5.1.1.2 Detaillierter Aufbau eines Thrombozyten

Die Membranstruktur der Blutplättchen besteht aus einer Phospholipiddoppelschicht, in der Glykoproteine und Rezeptoren eingelagert sind.

Die Glykoproteine (GP) Ib-IX-V und VI liegen in der Lipidschicht und binden an den von-Willebrand-Faktor und an Kollagen. Andere Glykoproteine wie der Glykoproteinkomplex IIb-IIIa liegen außen der Lipidschicht an (Douglas J. Dorahy, 1996). Diese Rezeptoren sind ebenfalls an intrazellulären Prozessen beteiligt und tragen maßgeblich zur Aggregation der Thrombozyten bei. Eine genaue Auflistung findet sich in Anhang 1.

Direkt innen an der Thrombozytenmembran liegt ein Band aus Mikrotubuli, das den Zellen ihre Form gibt. Unter physiologischen Bedingungen wird β 1-Tubulin als ein Bestandteil der Mikrotubuli exprimiert und spielt eine Rolle bei der Fragmentierung der Megakaryozyten (Schwer et al., 2001).

Durch das Zytoplasma führt bis an die Zellmembran ein offenes Kanalsystem, vermutlich ein Überbleibsel der Megakaryozyten. Da es jedoch bei Rindern fehlt, wird diese Behauptung angezweifelt (Zucker-Franklin et al., 1985).

Ein weiteres Kanalsystem ist das dichte Tubulussystem (DTS). Ein Überrest des, den Mikrotubuli eng anliegenden, endoplasmatischen Retikulums der Megakaryozyten. DTS besitzt zwar keine Verbindung zum Zytoplasma oder der Thrombozytenmembran, enthält aber Cyclooxygenase und Thromboxansynthetase, was für einen Zusammenhang mit der Prostaglandinsynthese spricht. Das DTS ist zudem an der Kalziumabgabe des Thrombozyten beteiligt (Kovacs et al., 1997).

Weiterhin enthalten Thrombozyten Mitochondrien als Energielieferanten für die Stoffwechselforgänge in der Zelle und für deren Aggregation (Weiss et al., 2010).

Das Zytoskelett der Thrombozyten besteht auf der Membraninnenseite aus Aktin, Spektrin, Adducin, Filamin und Glykoprotein Ib-IX-V. Dieses Skelett interagiert mit dem zytoplasmatischen Aktinnetzwerk. Während der Plättchenaktivierung dissoziieren die Adducinproteine von den Aktinfilamenten, welche sich so neu reorganisieren können (Weiss et al., 2010).

Thrombozyten besitzen drei verschiedene Arten von Granula (Weiss et al., 2010):

1. Die **dichten Granula** enthalten eine 1000fach höhere Serotoninkonzentration als das Zytoplasma. Hier sind 70% des gesamten Kalziums der Thrombozyten gespeichert, welches bei der Plättchenaktivierung, im Gegensatz zu dem im DTS, nicht ausgeschüttet wird. Auch enthalten sie Ganglioside und Phospholipide. Wichtig sind außerdem die in den Granula vorhandenen Proteine, die nach Fusion mit der Zellmembran infolge der Thrombozytenaktivierung nach außen entlassen werden.
2. Die **Alpha-Granula** sind die zahlreichsten und größten Granula in den Blutplättchen. Sie sind für die azurophile Färbung der Thrombozyten unter dem Lichtmikroskop verantwortlich. Zur Stabilisierung bestehen die Granula aus einer zentralen Nucleotidregion mit Proteoglykanen. In den α -Granula liegen auch β -Thromboglobulin, der Plättchenfaktor IV und andere Proteine. In ihrer peripheren, grau erscheinenden Matrix finden sich der von Willebrand-Faktor, Multimerin, Faktor V, Fibrinogen, Thrombospondin und Fibronectin. Während der Aktivierung kommt es zur Kompartimentierung und zur Freisetzung der Proteine. Es lassen sich zwei Proteintypen unterscheiden: Das aus den Megakaryozyten stammende α -Thromboglobulin und Thrombozytenfaktor IV sowie von anderen Zellen gebildete Eiweiße, die in den Thrombozytengranula gespeichert werden (Faktor V, Platelet Derived Growth Factor (PDGF) (Suehiro et al., 2005). Letztere werden auch thrombozytenassoziierte Proteine genannt wie Fibrinogen, welches durch das Glykoprotein IIa-IIIb aktiviert wird. Das wohl bekannteste Protein, was von den Alpha-Granula freigesetzt wird, ist P-Selectin, welches auch in der Membran der dichten Granula entdeckt wurde. Es vermittelt das so genannte „Rolling“ von Leukozyten an aktivierten Endothelzellen. Weiterhin ist dessen Ausschüttung verantwortlich für Größe und Stabilität der Thrombozytenaggregate (Merten und Thiagarajan, 2000). Bei Hunden wurde ein monoklonaler Antikörper entwickelt, der die Anwesenheit von P-Selectin nachweist (Doré et al., 1993).
3. Die **lysosomalen Granula** enthalten säureabhängige Hydrolasen wie Glykosidasen, Proteasen und Lipasen zur Auflockerung der subendothelialen Struktur. Lysosomale Granula lassen sich mittels spezifischer zytochemischer Färbung nachweisen.

5.1.2 Primäre Hämostase

Die primäre Hämostase spiegelt die Interaktion zwischen den Thrombozyten und dem Endothel wider, durch die ein Gefäßwanddefekt verschlossen wird (Hawiger, 1989). Sie dient der Blutstillung und läuft in mehreren Phasen ab, an denen unterschiedliche Faktoren und Substanzen beteiligt sind: Das Subendothel enthält Kollagen, Fibroblasten, elastische Fasern

und glatte Muskulatur. Die Endothelzellen bilden die Grenze der Gefäße. Unter physiologischen Bedingungen können sich Thrombozyten wegen antithrombotischer Substanzen (Prostazykline) und der negativen Ladung auf der Zellinnenseite nicht an das Endothel anheften. Die Anheftung funktioniert daher nur sekundär über Liganden, wie Kollagen oder dem von Willebrand-Faktor (vWF), einem Protein, welches von den Endothelzellen synthetisiert wird.

Der vWF hat zwei wichtige Funktionen (Ruggeri, 2001): Als Träger des Faktor VIII (antihämophiles Globulin A) ist er mitverantwortlich für die Thrombozytenadhäsion bei Gefäßverletzungen. vWF besteht aus größeren und kleineren Einheiten, wobei die größeren Moleküle eine höhere Affinität zu den Thrombozyten aufweisen. In den Endothelzellen wird vWF gespeichert bis verschiedene Stimuli (z.B. Thrombin, Fibrin) seine Ausschüttung bewirken. Andererseits wird vWF, teilweise durchgehend, in das Plasma und subendotheliale Gewebe abgegeben. Megakaryozyten aus dem Knochenmark synthetisieren zudem ebenfalls in geringen Mengen vWF und speichern ihn in den Thrombozytengranula (Day und Kohn, 2012).

Ein weiterer Bestandteil der primären Gerinnung sind die Thrombozyten selbst. Sie sind 2-4µm groß. Wenn es zur Schädigung eines Blutgefäßes kommt, wird die Endothelschicht verletzt. Dadurch werden Faktoren, welche normalerweise dafür sorgen, dass sich Thrombozyten nicht an das Endothel anheften können, lokal zurückgehalten und andere Substanzen (z.B. Kollagen) zur Thrombozytenaggregation ausgeschüttet. Außerdem kommt es zur Vasodilatation direkt am Defekt und zur umliegenden Vasokonstriktion, wodurch die Fließgeschwindigkeit des Blutes in diesem Bereich herabgesetzt wird. So können Zellen und Botenstoffe, die für die Blutgerinnung benötigt werden, die Gefäßwand passieren.

Thrombozyten binden sich an subendotheliales Kollagen, indem sie sich an spezifische Plasmamembranrezeptoren anheften. Diese Kollagenbindung führt zur Thrombozytenaktivierung und löst die Gerinnung aus. Die nun aktivierten Thrombozyten ändern ihre Konformation hin zu einer diskoiden Form mit multiplen Pseudopodien, welche ihre Zelloberfläche um ein Vielfaches erweitert. Die Aktivierung ausgebildeter Fibrinogenrezeptoren auf den Blutplättchen führt zur Aggregation der Thrombozyten untereinander. In den dichten Granula sowie den Alphagranula gespeicherte Bestandteile werden ausgeschüttet, was weitere Thrombozyten zur Bruchstelle lockt, die sich an die schon aggregierten Thrombozyten anheften.

Auch der von Willebrand Faktor ändert seine Konformation und wird so für die Thrombozyten erkennbar. Die Blutplättchen binden sich direkt an ihn und damit an das Subendothel, was ihre Aktivierung weiter steigert. All diese Prozesse führen zum primären Thrombozytenaggregat (Weiss et al., 2010).

5.1.3 Sekundäre Hämostase

Im Anschluss an die primäre Stoppung des Blutflusses findet die endgültige Blutgerinnung statt. Bei dieser sekundären Hämostase spielt Thrombin eine wichtige Rolle, da es Fibrinogen

in festes Fibrin umwandelt. Fibrin durchzieht und festigt das Koagel. Gewebethromboplastin (Tissue-Factor) wird ausgeschüttet und löst eine Kaskade enzymatischer Reaktionen aus.

Bestimmte Bestandteile sind essentiell für die sekundäre Hämostase. Hierzu gehört die negativ geladene Phospholipidschicht. Während sie bei inaktiven Thrombozyten innen liegt, wandert sie nach der Aktivierung nach außen. Hier wird sie vor allem als Andockstation für die beiden, während der Koagulation gebildeten Koenzyme Tenase und Prothrombinase gebraucht. Des Weiteren spielt ionisiertes Kalzium bei der Bildung dieser Koenzymkomplexe eine Rolle.

Auch der Gewebefaktor (TF) ist ein wichtiger Bestandteil der sekundären Hämostase. TF ist ein Glykoprotein auf der Plasmamembran und befindet sich in vielen Zellen, auch auf Fibroblasten. Im Subendothel kommt der Gewebefaktor bei Zellschädigungen an die Oberfläche und interagiert mit Prokonvertin und anderen Faktoren aus dem Blutkreislauf (Day und Kohn, 2012). Die Aktivierung von Prokonvertin (Faktor VII) mittels Faktor XIIa, Faktor IXa, Faktor Xa, Kallikrein und Plasmin führt dann zur Bildung der aktiven Form von Faktor X.

Folgende weitere Faktoren sind bei der sekundären Hämostase relevant: Der Hagemannfaktor (Faktor XII) wird aktiviert und sorgt zusammen mit ionisiertem Kalzium für die Aktivierung des Rosenthalfaktors (Faktor XI), auch Plasma Thromboplasmin Antecedent (PTA) genannt. PTA aktiviert wiederum das antihämophile Globulin B (Faktor IX), welches aktiviertes antihämophiles Globulin A (Faktor VIII) zur Aktivierung des Stuart Prower Faktors (Faktor X) braucht. Der Faktor VIII wird mit Hilfe von aktiviertem Prothrombin (Faktor IIa) gebildet. Dadurch kommt es zur Aktivierung von Faktor X, welcher die zentrale Rolle in der sekundären Hämostase spielt. In Verbindung mit Prothrombin konvertiert Faktor X zu Thrombin, welches für die Bildung eines stabilen Blutkoagel essentiell ist.

5.1.4 Natürliche Inhibitoren und Fibrinolyse

Um einen thrombotischen Verschluss des Gefäßes zu verhindern, muss die Hämostase gestoppt werden. Dies geschieht durch vier natürliche Inhibitoren, welche parallel zum Ablauf der Gerinnung ausgeschüttet werden. Um diese jedoch nicht zu unterminieren findet sie zeitverzögert statt: Der tissue factor pathway inhibitor (TFPI) wird vom Endothel ausgeschieden und bildet mit dem Gewebefaktor (TF), Faktor VIIa und Faktor Xa einen quartären Komplex. Dieser Komplex generiert schließlich das Schlüsselenzym der Fibrinolyse: das Plasmin. So wird die Koagulation verhindert (Hoffman und Monroe, 2001).

Weitere natürliche Antikoagulantien sind Protein C und Protein S. Protein C ist ein Vitamin-K-abhängiges Glykoprotein und fördert die Proteolyse von Faktor Va. Aktiviert wird es durch Thrombin, welches auf der Oberfläche intakter Endothelzellen am Transmembranprotein Thrombomodulin (TM) gebunden ist. Protein S zirkuliert zu 30% ungebunden im Plasma und wirkt als Kofaktor des aktivierten Protein C (Hoffman und Monroe, 2001).

Antithrombin inhibiert Thrombin und andere Proteasen wie Faktor IX, Xa, Xia und Xlla. Verschiedene von Endothelzellen produzierte Glykosaminoglykane spielen als Bindestellen für Antithrombin eine wichtige Rolle bei der schnellen Inaktivierung von Thrombin (Hoffman und Monroe, 2001). So stoppen diese Proteine vor allem die sekundäre Hämostase

5.2 Hyperkoagulabilität

Eine pathologisch gesteigerte Blutgerinnung (Hyperkoagulabilität) spielt bei verschiedenen Erkrankungen des Hundes eine Rolle. Die wichtigsten sind die immunhämolytische Anämie und endokrine Erkrankungen wie der Hyperadrenokortizismus (Boswood et al., 2000) oder der Diabetes mellitus (New und Byers, 2011).

Aber auch septische Geschehen und die, durch den hyperkoagulablen Zustand induzierte, disseminierte intravasale Gerinnung (Johnson et al., 1999) gehen damit einher.

Weiterhin können bei Neoplasien (Hardie et al., 1995) oder Herzerkrankungen (Marcucci et al., 2006) Thromboembolien auftreten.

Auch Erkrankungen mit hohem Proteinverlust (v.a. Antithrombin, Protein C, Protein S) bergen das Risiko einer Hyperkoagulabilität, Beispiele sind die Proteinverlust Entero- oder Nephropathie sowie die Parvovirose (Otto et al., 2000).

5.2.1 Immunnämolytische Anämie

Bei der immunnämolytischen Anämie werden die Erythrozyten durch einen Angriff auf ihre Membranproteine oder Glykophorinpeptide zerstört (Liang, 2009). Dies geschieht entweder direkt in den Gefäßen (intravasal) oder extravasal in Organen beispielsweise in der Leber, der Milz oder dem Knochenmark.

Die immunnämolytische Anämie (IMHA) beim Hund wird eingeteilt in eine primäre und sekundäre Form.

Bei primären IMHA ist deren Ursache nicht bekannt (McCullough, 2003).

Die **primäre immunnämolytische Anämie** ist eine Typ 2 Hypersensitivitätsreaktion (Balch und Mackin, 2007), bestehend aus fünf Subtypen:

- Subtyp 1 ist geprägt durch eine IgM und IgG vermittelte Hämolyse. Folge ist eine intravasale, als einziger meist perakut verlaufende Hämagglutination.
- Der 2. Subtyp spielt sich ebenfalls intravasal ab und basiert auf einer IgM vermittelten Komplementaktivierung.
- Bei Subtyp 3 ist IgG zwar beteiligt, die eigentliche Zerstörung wird aber durch eine mononukleäre Phagozytose, extravasal in der Milz hervorgerufen.

- Subtyp 4 ist im Gegensatz zu den ersten drei wärmeagglutinierenden (agglutinieren bei Körpertemperatur) Subtypen kälteagglutinierend. Kälteantikörper werden erst bei Temperaturen unter der normalen Körpertemperatur aktiv.
- Subtyp 5 ist ebenfalls nur kältereagierend (tritt bei Körpertemperatur nicht auf), agglutiniert allerdings nicht. Dies bedeutet eine Zerstörung der Erythrozyten ohne Agglutination (Liang, 2009).

Den sekundären IMHA liegen Erkrankungen zu Grunde (Toxine, Medikamente, Blutparasiten, Viren, Bakterien, Neoplasien), die therapiert werden müssen, um eine Heilung zu gewährleisten.

Die Thrombozyten werden bei der immunhämolytischen Anämie intravasal an Antikörper gebunden und so aktiviert, was zu einer Thrombose führen kann.

Viele Hunde zeigen während der initialen Behandlungsphase in den ersten vierzehn Tagen einer immunhämolytischen Anämie eine Hyperkoagulabilität. Mellet et al. wiesen in ihrer Studie auf eine Mortalitätsrate bei der IMHA des Hundes zwischen 50% und 70% hin, vor allem in den ersten zwei Wochen der Therapie. Todesursache war bei 80% der verstorbenen Tiere ein venöser Thrombus oder eine pulmonale Thromboembolie (Mellett et al., 2011).

Werden die Erythrozyten schon auf Knochenmarksebene zerstört, heißt die Erkrankung Pure Red Cell Aplasia (Weiss, 2008).

Hyperurikämie oder -billirubinämie, Thrombozytopenie und erniedrigtes Albumin begünstigen die Entstehung einer Thromboembolie (Scott-Moncrieff et al., 2001; Carr et al., 2002).

Zur Vorbeugung dieser Thromboemboliegefahr werden Antikoagulantien wie Heparin oder Antithrombotika wie ASS oder Clopidogrel eingesetzt (Wiinberg et al., 2012)

5.2.2 Hyperadrenokortizismus

Der Hyperadrenokortizismus ist eine hormonelle Überproduktion in einer Nebenniere oder der übergeordneten Hormondrüse im Gehirn, dem Hypophysenvorderlappen. Ursache der Überfunktion ist eine tumoröse Entartung in einer der hormonproduzierenden Drüsen.

Beim Hund beruht die Erkrankung in 80 -85% der Fälle auf einer neoplastischen Entartung in der Hypophyse mit gesteigerter Synthese und Ausschüttung des Hormons ACTH (Stephen J. Ettinger, 2010).

Die vermehrte Abgabe von ACTH führt zu einer Hyperplasie beider Nebennieren, wodurch die dort gebildeten Hormone (Androgene, Kortikosteroide, Mineralokortikoide) vermehrt gebildet und abgegeben werden. Der gesamte Hormonhaushalt kommt so in ein Ungleichgewicht, die Folge sind Polyurie, Polydipsie, Stammfettsucht und Alopezie.

Hyperadrenokortizismus geht mit einem verminderten Antithrombin einher, was zu einer allgemeinen Hyperkoagulabilität (Wiinberg et al., 2012) mit Ausbildung von intravasalen

Thromben führen kann. Die Gründe des Antithrombinmangels beziehungsweise der Verklumpung von Antithrombin sind noch nicht ausreichend geklärt. Die Hyperkoagulabilität kann mittels Thrombelastographie nachgewiesen werden. Die erhöhte Gerinnbarkeit des Blutes steigert die Komplikationsrate und erhöht die Mortalität (Kitrell und Berkwitt, 2012a). Deshalb ist bei Hyperadrenokortizismus eine Thrombozytenhemmung sinnvoll.

5.2.3 Diabetes mellitus

Das Gleiche gilt auch bei Diabetes mellitus Typ 1 und 2, Erkrankungen des Pankreas. Beim Hund tritt der Diabetes mellitus Typ 1 am häufigsten auf. Hierbei werden die β -Zellen des Pankreas zerstört, was zu einer verminderten Insulinproduktion führt. Fehlt das Insulin im Blut, kann aufgenommene Glukose nicht mehr in die Zellen übertragen werden. Es kommt zu einer Hyperglykämie (Stephen J. Ettinger, 2010).

Hohe Blutzuckerwerte führen zu einer gesteigerten nichtenzymatischen Glykosylierung, vor allem am Glykoprotein IIIb/IIa der Thrombozyten. Der zusätzlich entstehende oxidative Stress erhöht die Thrombozytenadhäsionsfähigkeit durch Ausschütten verschiedener Gerinnungsfaktoren (VII, VIII, X, XI, XII), von Willebrand Faktor und Thrombin (Kitrell und Berkwitt, 2012a).

5.2.4 Sepsis und disseminierte intravasale Gerinnung

Die Sepsis und auch die disseminierte intravasale Gerinnung (DIC) sind intensivmedizinisch zu betreuende Erkrankungen, welche sekundär auf Grund von Neoplasien, Infektionen (bakteriell, parasitär, fungal), Schockgeschehen oder anderer akut auftretender Erkrankungen entstehen (Laforcade, 2012).

Unabhängig von der möglichen Ursache kommt es zur Aktivierung von immunkompetenten Zellen. Diese schütten TNF- α und IL-1 aus, wodurch TF (Tissue factor) aktiviert wird. TF bildet einen Komplex mit Prokonvertin (Faktor VII) und triggert so die intrinsische und extrinsische Gerinnungskaskade. In der Folge entstehen intravasal kleine, aber auch größere Thromben, welche einen Gefäßverschluss verursachen können.

Da bei solch akuten Geschehen Gerinnungsfaktoren nicht schnell genug nachgebildet werden können, entwickeln sich eine Verbrauchskoagulopathie und Blutungsneigung (Weiss et al., 2010).

Während der hyperkoagulablen Phase ist eine medikamentöse Thrombozytenhemmung indiziert, um einem ischämischen Organversagen vorzubeugen (Mischke et al., 2005).

5.2.5 Neoplasien

Neoplasien können, wie oben beschrieben, die Blutgerinnung durch eine DIC steigern. Allerdings aktivieren die entarteten Zellen selbst vermehrt TF (Gewebefaktor), der wiederum eine Aktivierung von Faktor VII (Prokonvertin) zur Folge hat. Der Gerinnungsprozess wird hierdurch reaktiviert.

Die meisten Tumorzellen bauen Gerinnungsfaktoren auch langsamer ab (Goodwin et al., 2011), so dass eine therapeutische Thrombozytenhemmung sinnvoll ist.

5.2.6 Herzerkrankungen

Vor allem hochgradige Klappeninsuffizienzen verschiedenen Ursprungs führen zu einer Erweiterung des oder der Vorhöfe und den dort lokalisierten Ausstülpungen, den Herzohren. Die Herzohren sind prädestiniert, dass hier reingespültes Blut seine Fließeigenschaften ändert – Turbulenzen oder Verlangsamung des Blutflusses treten auf (Tarnow et al., 2005). Das erhöht die Gefahr der Bildung eines Thrombus. Thromben können vom Blutstrom mitgerissen werden und vom Herzen abgehenden Arterien verlegen.

In der Humanmedizin steigen bei Herzerkrankungen auch verschiedene Entzündungsparameter. Die Bestimmung solcher Parameter helfen subklinische Herzprobleme frühzeitig zu diagnostizieren (Marcucci et al., 2006). Entzündungsparameter können, ähnlich wie Infektionskrankheiten oder ein Parasitenbefall, die Gerinnungsfähigkeit und so die Entstehung von intravasalen Thromben erhöhen. Diese Erkenntnisse basieren, auf Grund weniger valider Studien in der Veterinärmedizin (Schmitz und Moritz, 2009), momentan hauptsächlich auf humanmedizinischen Untersuchungen.

5.2.7 Erkrankungen mit Proteinverlust

Auch Erkrankungen, die mit dem Verlust von Proteinen einhergehen, können zu Thromboembolien führen.

Hierzu gehören vor allem die PLE (Protein-losing Enteropathie), die PLN (Protein-losing Nephropathie) (Goodwin et al., 2011) und infektiöse Erkrankungen wie die Parvovirose (Otto et al., 2000). Da das Antithrombin, als antithrombotisches Protein, sehr klein (65000 Dalton) ist, wird es früher ausgeschieden als die meist größeren prothrombotischen Proteine (Kitrell und Berkwitz, 2012a), und fehlt dann bei der Komplettierung der Gerinnungskaskade.

Weiterhin gelten eine erhöhte Thrombozytenaktivierung, sowie eine erhöhte Fibrinogenkonzentration bei Entzündungen (Abdullah, 1988) als Ursachen für die Hyperkoagulabilität.

5.3 Untersuchung der primären Hämostase

Die 2011 neu aufgelegten Richtlinien zur Bestimmung der Thrombozytenfunktion (Harrison et al., 2011) teilen die vorhandenen Testmöglichkeiten in verschiedene Gruppen ein.

5.3.1 Thrombelastographie (TEG) und Thrombelastometrie (ROTEM) als Globaltests aller Gerinnungsphasen

Es existieren vier Variable (R, K, Winkel α , MA) der TEG-Messung, von denen vor allem die maximale Amplitude (MA) die Aktivität der Thrombozyten widerspiegelt. (Wiinberg et al., 2005).

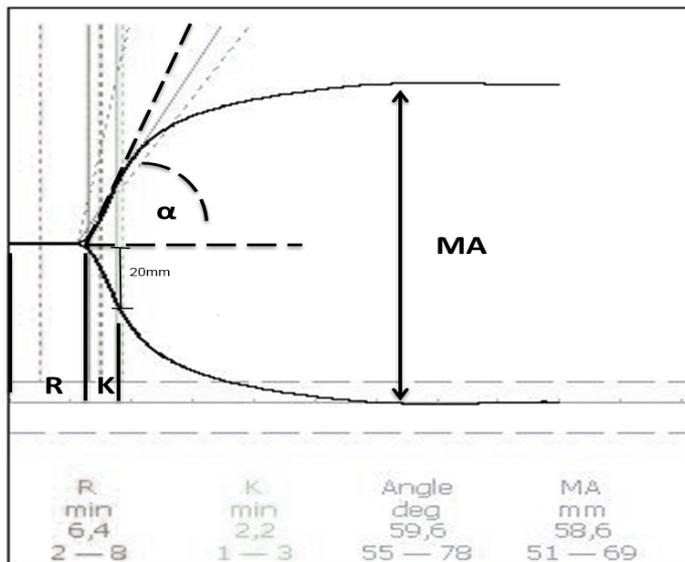


Abbildung 1: TEG anhand einer Messung aus der Studie; R=Reaktionszeit, K=Gerinnungszeit, α =Geschwindigkeit der Fibrinbildung, MA=maximale Amplitude mit den jeweiligen Referenzwerten

In der oben gezeigten Abbildung stellt R die Reaktionszeit dar, also die Zeit zwischen dem Einbringen des Blutes in das Messgerät bis zur Ausbildung der ersten Fibrinfäden. Die Zeit wird gemessen bis die Amplitude des Graphen 2mm erreicht hat.

Die Gerinnungszeit K beginnt mit dem Ende von R und dauert bis zu einer Amplitudengröße von 20mm. In dieser Zeit bildet sich aus den ersten Fibrinfäden ein stabiles Gerinnsel. Die Dauer bis zur Ausbildung des festen Koagels ist abhängig von der Menge an Thrombozyten, anderen Gerinnungsfaktoren sowie von Fibrinogen.

Der Winkel α repräsentiert die Geschwindigkeit der Fibrinbildung und -verknüpfung und basiert auf den Thrombozyten, genauso wie der Fibrinogenkonzentration und den Gerinnungsfaktoren an sich (Wiinberg et al., 2005).

MA ist die maximale Amplitude welche erreicht wird. Diese wird zu 80% von der Funktion der Thrombozyten beeinflusst und ist der sensitivste Wert, um die Thrombozytenfunktion darzustellen. Hier spielen auch Gerinnungsfaktoren und die Fibrinkonzentration eine Rolle. Je größer die maximale Amplitude, desto fester ist das endgültige Gerinnsel.

Die Hinzugabe von Agonisten wie ADP oder Arachidonsäure erlaubt eine genauere Aussage zur Funktion der Thrombozyten während einer Therapie mit Acetylsalicylsäure, Clopidogrel oder anderen Thrombozyteninhibitoren. In der Veterinärmedizin wurden diese Agonisten bisher nur von Blois et al. an Hunden verwendet. Es erfolgte eine Blutentnahme bei 20 gesunden Hunden. Die Gerinnung mit einem Zusatz von entweder ASPI oder ADP per TEG wurde gemessen. Eine Medikamentengabe erfolgte nicht. Im Vordergrund stand eine Funktionsanalyse der Thrombozyten, jedoch waren die Ergebnisse nicht signifikant (Blois et al., 2013).

Die Thrombelastographie TEG oder die rotierende Thrombelastometrie (ROTEM) sind in verschiedenen Geräten integriert. Zur Einleitung der Hämostase nutzen beispielsweise das TEG 5000 (Haemonetics Corporation, Braintree, MA, USA) und das ROTEM (Tem Innovations GmbH, München) Agonisten. Die Geräte messen über einen Magnetrührer den Widerstand und damit die Viskosität von Flüssigkeiten. Dieser wird dann in einer auswertbaren Kurve dargestellt.

Während sich beim TEG das mit Blut gefüllte Gefäß bewegt, rotiert beim ROTEM-System der Magnetrührer. Allerdings wird in gleicher Studie auch erwähnt, dass die TEG beziehungsweise die ROTEM für eine Fragestellung direkt zur Thrombozytenfunktion nicht die beste Wahl ist, da das Hauptaugenmerk der hier angefertigten Messungen auf der ganzheitlichen Gerinnung liegt. Die Betrachtung bezieht also auch alle Gerinnungsfaktoren mit ein (David Perry).

5.3.2 Bestimmung der Thrombozytenzahl und Thrombozytenaktivierungsindizes

Zur ersten Gruppe gehören Apparate, mit denen sich eine Vielzahl hämatologischer Parameter bestimmen lassen. Die meisten Geräte in gut eingerichteten Labors sind fähig Werte wie Thrombozytenzahl, -größe und -morphologie auszuwerten.

Das Hämatologiesystem **ADVIA 2120** ist zur Messung einiger Parameter geeignet, mit denen sich eine Thrombozytenaktivierung detektieren lässt (Beard et al., 2011). Neben den Standardwerten wie der Thrombozytenzahl erlaubt die durchflusszytometrische Messung durch Bestimmung des Brechungsindex weitere Indizes zu bestimmen (Moritz et al., 2005).

Die mittlere Plättchenkomponenten-Konzentration (MPC, mean platelet component concentration) und die Plättchenkomponenten-Verteilungsbreite (MPCDW, mean platelet component distribution width) stehen als Indikatoren für die Degranulierung der Thrombozyten im Vordergrund .

Die MPC entspricht der Dichte der Thrombozyten, welche linear mit dem Aktivierungsgrad korreliert. Während die MPCDW die Verteilungsbreite der Dichte der gemessenen Thrombozyten darstellt. Nimmt sie ab, ist dies gleichbedeutend mit einer Absenkung der MPC und daraus resultierender Aktivierung (Degranulierung) von Thrombozyten.

MCP- Abnahme korreliert linear mit dem P-Selectin, als weiterer Indikator der Thrombozytenaktivierung (Moritz et al., 2005). Das Hämatologiesystem ADVIA 2120 ermöglicht also die vollautomatische Messung der Thrombozytenaktivierung (Beard et al., 2011).

5.3.3 Klinische Tests zur Überprüfung der Thrombozytenfunktion

Die Erfassung der Schleimhautblutungszeit ist die wohl älteste Methode zur Feststellung einer Thrombopathie beziehungsweise Störung der primären Hämostase und wird seit 1910

angewendet. Allerdings ist sie bei geringen Abnormalitäten meist wenig aussagekräftig und schlecht reproduzierbar (Rodgers und Levin, 1990).

Heute bieten verschiedene Firmen für die Tiermedizin vorgefertigte und standardisierte Kits an, mit denen sich die Thrombozytenfunktion in einem gewissen Rahmen beurteilen lässt. (Fresno et al., 2005)

5.3.4 Möglichkeiten der Thrombozytenmessung

Die heutzutage wichtigsten Messmöglichkeiten in der Thrombozytendiagnostik sind der PFA 100 (Platelet Function Analyzer, Siemens Healthcare Diagnostics; Eschborn), der LTA (Light Transmission Aggregometry) und die Vollblutaggregometrie.

Beim **PFA 100** wird Blut durch eine Öffnung geleitet und Agonisten zur Aktivierung der Thrombozyten hinzugegeben. Die Hämostase an den Seiten der Öffnung vermindert den Blutfluss bis er zum Stillstand kommt. So wird die Aktivierung messbar (Favaloro, 2008).

Der **LTA** nutzt einen Lichtstrahl, der durch einen mit plättchenreichem Plasma gefüllten Behälter hindurchgeht. Die Zugabe von Agonisten aktiviert und aggregiert die Thrombozyten, was zu einer veränderten Lichtdurchlässigkeit führt. Die Aktivierung wird also mit Hilfe der veränderten Lichtintensität messbar (G. Escolar und J. Bozzo).

Die **Vollblutaggregometrie** nutzt die Anheftung von Thrombozyten an elektrische Ladungen. Man setzt zwei Elektroden in ein Gefäß mit Vollblut und aktiviert die Gerinnung durch Agonisten. Daraufhin setzen sich die aktivierten Thrombozyten an die stromdurchflossenen Elektroden. Durch das Anheften erhöht sich der Widerstand der Elektroden und der Stromdurchfluss nimmt ab. Diese Veränderungen lassen sich mit Hilfe einer Computersoftware messen und auswerten (Cezary Watala, 2008).

5.3.5 Das Multiplate als Vollblutimpedanzaggregometrie-Messgerät

Die Vollblutimpedanzaggregometrie ist die Methode der Wahl zur Funktionsdiagnostik von Thrombozyten (Martina Leitner). In früheren Untersuchungen wurde das PFA-Gerät als Goldstandard verwendet (Cattaneo, 2004; Tarnow et al., 2005; Pape et al., 2007; Favaloro, 2008).

In der Humanmedizin existieren bereits viele Veröffentlichungen über die Thrombozytendiagnostik mit dem Vollblutaggregometriemessgerät Multiplate (Müller, 2001; Mueller et al., 2007; Pape et al., 2007; Loreth und Klose, 2010). In der Veterinärmedizin wird das Gerät erst seit kurzem, aber ebenfalls mit Erfolg eingesetzt, wie einige Studien bereits belegen (Grauer et al., 1992; Shearer L., 2009).

Das Multiplate (Firma Dynabyte Informationssysteme GmbH, seit 2011 w Roche Diagnostics AG Verum Diagnostica GmbH, 2008) ist ein Mehrkanal-Impedanz-Aggregometer mit fünf

unabhängigen Kanälen, welche über einen Computer verbunden sind. Die Messeinheit besteht aus einem Trichter, über den das benötigte Vollblut mit der Pipette eingefüllt wird. Das Blut gelangt in einen Behälter, an dessen Boden sich ein Teflon-beschichteter Magnetrührer befindet. Dieser durchmischt das Blut und hält es in Bewegung.

Das Gerät verfügt über fünf Steckplätze, um parallel Messungen durchführen zu können. Ein Netzkabel verbindet jeden Platz mit dem integrierten Computer und ermöglicht so die software-gestützte Auswertung. Eine Steckmöglichkeit für das Kabel befindet sich an jeder, einmalig zu verwendenden Messzelle, in welcher die Messung stattfindet. Diese Testzellen werden in den auf 37°C vorgewärmten Wärmeklotz gesteckt. Daraufhin fängt der Magnetrührer am Boden der Zelle an sich zu drehen. Verbunden mit der Computersoftware werden die Messergebnisse direkt an das Gerät übertragen.

Im Behälter enden zwei Sensoren mit je einem stromdurchflossenen Elektrodenpaar. Die Thrombozyten werden mit Hilfe von verschiedenen Thrombozytenaktivierungsagonisten aktiviert, wodurch sie sich an die Elektroden (Aggregation) anheften. Anschließend wird der Stromfluss durch Erhöhung des Widerstandes reduziert, damit sich die Thrombozytenaktivität messen lässt.

Da jede Messzelle des Multiplate zwei Elektrodenpaare besitzt, lässt sich das Messergebnis durch eine simultan durchgeführte Kontrolle überprüfen (Cezary Watala, 2008).

Das Multiplate wurde bereits in mehreren Studien der Humanmedizin (Mueller et al., 2007; Cezary Watala, 2008; Kalbantner et al., 2010) und der Veterinärmedizin (Grauer et al., 1992; Sharpe et al., 2010; Bauer et al., 2012) validiert.

5.3.5.1 Hirudin als Antikoagulanz

Hirudin ist ein Gemisch aus Peptiden, die dem Speichel des medizinischen Blutegels (*Hirudo medicinalis*) entstammen. Die Substanz wurde 1884 von dem britischen Physiologen John Berry Haycraft (1859-1923) entdeckt. Der Physiologe beobachtete, dass Blutegel beim Blutsaugen einen Stoff mit einer starken antikoagulatorischen Wirkung absondern.

Hirudin besteht aus linearen Polypeptiden, die aus 65 bis 66 Aminosäuren aufgebaut sind. Sie besitzen drei Disulfidbrücken und auf Position 63 einen sulfatierten Tyrosinrest. Der isoelektrische Punkt von Hirudin liegt bei einem pH-Wert von 3,9 (Teuscher, 1997).

Hirudin setzt sich an die gleiche Fibrinogenbindungsstelle wie Thrombin. Es besetzt das aktive Zentrum, so dass sich Thrombin nicht mehr binden und seine Wirkung entfalten kann. (Nowak und Schrör, 2007). Weitere Proteine oder Mineralstoffe beeinträchtigt Hirudin dagegen kaum und ist daher anderen Antikoagulantien wie Zitrat oder Kalium-EDTA überlegen (Brandt, 2008).

Das in Hirudin-Röhrchen (Sarstedt) verwendete Lepirudin gehört zu den r-Hirudinen und wird aus gentechnisch veränderten Hefen (*Saccharomyces cerevisiae*) gewonnen.

5.3.5.2 Agonisten zur Verwendung am Multiplate

Kollagen bindet an den Kollagenrezeptor der Thrombozyten und setzt Arachidonsäure frei, die als Substrat der Cyclooxygenase in Thromboxan A₂ umgewandelt wird.

Eine Aktivierung der Thrombozyten über die Arachidonsäure findet vor allem dann nicht oder nur bedingt statt, wenn der GP IIb/IIIa-Rezeptor gehemmt oder antagonisiert wird. Auch bei Inaktivierung von Cyclooxygenase können Thrombozyten nicht mehr durch Arachidonsäure aktiviert werden.

Adenosindiphosphat (ADP) ist der Hauptbotenstoff des P₂Y₁₂-Rezeptors, der über eine Aktivierung der Thrombozyten die Gerinnung auslöst. ADP lässt sich durch Arzneistoffe wie Thienopyridine hemmen.

Prostaglandine sind natürliche Antagonisten der Thrombozytenaktivierung. Sie erhöhen das Level des intrazellulären Botenstoffs cAMP und hemmt so die Gerinnung. Gebildet wird es auch aus der Arachidonsäure. Die Zugabe von Prostaglandin bei einer Messdurchführung mit ADP führt zu einer geringer ausgeprägten Gerinnung und erschwert so das Aufdecken von weniger signifikanten Gerinnungsstörungen. Dafür reagiert die Messung sensibler und, vor allem bei Zugabe von Clopidogrel, lassen sich Abweichungen der Thrombozytenaktivierung leichter detektieren.

5.4 Möglichkeiten der Thrombozytenaggregationshemmung

In der Humanmedizin werden bereits viele verschiedene Medikamente eingesetzt, um die Thrombozytenaktivierung zu hemmen.

Hierzu gehören:

1. Acetylsalicylsäure (ASS), die durch Azetylierung der Cyclooxygenase 1 wirkt,
2. Ticlopidine, Clopidogrel und Prasugrel, welche den P₂Y₁₂-Rezeptor irreversibel hemmen und
3. Eptifibatide, Abciximab und Tirofiban, die Integrin α 2b β 3 antagonisieren. Diese Wirkstoffe können nur intravenös gegeben werden.

Darüber hinaus werden Stoffe verwendet, welche unter anderem die Phosphodiesterase hemmen wie Dipyridamol oder Cilostazol (Michelson, 2010).

Die in der Humanmedizin am meisten eingesetzten Thrombozytenaggregationshemmer sind ASS und Clopidogrel (Cattaneo, 2004; Dai und Ge, 2012; Kwok und Loke, 2012). Während früher nur in der Veterinärmedizin ASS verwendet wurde, wird heute auch Clopidogrel routinemäßig eingesetzt. Auf diese beiden Wirkstoffe wird in den folgenden Abschnitten näher eingegangen.

5.4.1 Acetylsalicylsäure

Die Acetylsalicylsäure (ASS) ist das am meisten verwendete Arzneimittel der Welt (Vane und Botting, 2003).

1874 wurde Salicylsäure das erste Mal kommerziell hergestellt (Vane und Botting, 2003). Der anhaltende Erfolg führte zur Weiterentwicklung und Indikationsausweitung dieser Substanz durch die pharmazeutische Firma von Frederick Bayer.

Die Firma beauftragte 1895 den jungen Chemiker Felix Hoffmann (1868-1946) mit der Weiterentwicklung. Hoffmann gelang es 1897 durch Acetylierung der Hydroxylgruppe des Benzenrings aus der Salicylsäure die Acetylsalicylsäure zu synthetisieren (Vane und Botting, 2003).

1899 ließ die Firma Bayer die Substanz unter dem Namen Aspirin als Warenbezeichnung eintragen. Der Ursprung der Bezeichnung ist unklar: Einerseits könnte der Name abgeleitet sein vom neapolitanischen Bischof Sankt Aspirinius, welcher der Schutzpatron der Kopfschmerzen war. Andererseits, und das scheint wahrscheinlicher, bezieht er sich auf das lateinische Wort *Spiraea*, welches früher der Name für Mädesüss, einer Rosenstrauchart, war. Mädesüss enthält Salicylaldehyd, das zu Salicylsäure oxidiert werden kann und im Deutschen Spirsäure genannt wird. Durch die Acetylierung entsteht **Acetylspirsäure**. Die Endung "-in" wurde damals häufig für die Kennzeichnung von Schmerzmitteln verwendet (Vane und Botting, 2003).

Während der Suche nach Substanzen, welche bei einer anaphylaktischen Reaktion ausgeschüttet werden, wurden verschiedene Prostaglandine identifiziert, darunter auch die damals beschriebene rabbit aorta contracting substance (RCS) (Piper P. J., 1969). RCS wurde 1975 als Thromboxan A2 identifiziert. Damals wurde auch nachgewiesen, dass ASS die Ausschüttung von RCS blockiert (Vane und Botting, 2003).

ASS acetyliert Serin 529 der Cyclooxygenase (COX) 1. Dadurch ändert sich die Konformation von COX 1 und hemmt die Bildung des Thrombozytenaktivators Thromboxan A2 (Smith et al., 2012).

Die Wirkung von ASS ist abhängig von der Hydroperoxidkonzentration in den Zellen, wodurch die Thromboxan A2 Hemmung bei Patienten unterschiedlich stark ausgeprägt sein kann (Smith et al., 2012). Da Thrombozyten keinen Zellkern haben, bleiben diese Veränderungen so lange bestehen, bis die Zellen sterben und sich neue Thrombozyten gebildet haben. Thromboxan A2 wirkt auch vasokonstringierend (Dai und Ge, 2012) und hemmt vorübergehend das vasodilatatorisch und thrombozytenaggregationshemmend wirkende Prostacyclin (Prostaglandin I₂) in den Endothelzellen der Gefäßwände. Bei der in dieser Studie eingesetzten Erhaltungsdosis von 1mg/kg ASS wird die Prostacyclinbildung jedoch nicht beeinflusst.

Darüber hinaus wirkt die Acetylsalicylsäure als nichtsteroidales Antiphlogistikum analgetisch und antiphlogistisch (Bayer Healthcare).

Nach der Einnahme wird ASS vollständig resorbiert und in den aktiven Hauptmetaboliten Salicylsäure umgewandelt. Seine Ausscheidung erfolgt über die Nieren. Des Weiteren bilden sich Salicylursäure, Salicylphenolglukuronid und die durch Oxidation entstehende

Gentisinsäure mit deren Glycinkonjugat. ASS wird im Bereich des Duodenums und beginnenden Jejunums aufgenommen. 70% des Wirkstoffes stehen dem Körper dann zur Verfügung, abhängig von Faktoren wie dem gastralen pH-Wert und dessen Entleerungsgeschwindigkeit. Nach der jejunalen Aufnahme erfolgt eine Hydrolysierung zu Salicylsäure, welche sich gleichmäßig in Organen wie Leber, Lunge und Herz anreichert.

Beim Menschen erreicht die Acetylsalicylsäure nach 10-20 Minuten ihren maximalen Plasmaspiegel, während das Gesamtsalicylat 20 Minuten bis zwei Stunden braucht um seinen maximalen Spiegel zu erreichen. Je nach Dosierung dauert die Elimination bei gesunden, normalgewichtigen Erwachsenen von zwei Stunden – bei Aufnahme von 0,5g – bis zu 20 Stunden bei einer Dosis von 5g.

Die Plasmabindung von Acetylsalicylsäure liegt je nach Dosierung zwischen 49% und über 70%, die von Salicylsäure zwischen 66% und 98%. Während der Elimination ist Salicylsäure auch in der Muttermilch, Plazenta, Synovialflüssigkeit und im Liquor nachweisbar (Bayer Healthcare).

ASS wird in der Tiermedizin bisher nur zur prophylaktischen Behandlung von Thromboserisikopatienten eingesetzt. In der Humanmedizin ist das Indikationsspektrum klarer definiert. So hat die Substanz einen festen Stellenwert bei der Therapie der instabilen Angina pectoris, des akuten Myokardinfarkt, als Reinfarktprophylaxe nach arteriellen gefäßchirurgischen oder interventionellen Eingriffen und zur Prävention von transitorisch ischämischen Attacken und Hirninfarkten.

Aus der Humanmedizin ist bekannt, dass die Hemmung der Thrombozytenfunktion (Dai und Ge, 2012) Gerinnungsstörungen auslösen kann. Meist handelt es sich um leichte Blutungen wie Zahnfleischbluten oder Epistaxis. In seltenen Fällen treten aber auch schwerwiegendere Hämorrhagien auf, vor allem bei nicht eingestellten Hypertoniepatienten. Zu den häufigeren Nebenwirkungen zählen auch gastrointestinale Beschwerden wie Sodbrennen, Übelkeit, Vomitus und Diarrhoe, während Ulzera oder gastrointestinale Blutungen seltener auftreten. Bei der Einnahme von ASS über einen langen Zeitraum kann sich durch okkulte Blutungen eine Eisenmangelanämie entwickeln. Sehr selten kommen allergische Reaktionen der Haut, erhöhte Leberwerte, Nierenfunktionsstörungen oder Hypoglykämien vor (Bayer Healthcare). Schleimhautirritationen durch Acetylsalicylsäure in therapeutischer Dosis können in Form von gastrointestinale Blutungen und Ulzera auftreten. Deshalb steht bei Auftreten von unerwünschten Wirkungen die Schleimhautprotektion im Vordergrund (Plumb, 2008).

Eine chronische Überdosierung mit Acetylsalicylsäure kann sich durch Störung des zentralen Nervensystems bemerkbar machen, zum Beispiel mit Symptomen wie Schwindelgefühl, Benommenheit, Verwirrtheit oder Übelkeit.

Die akute ASS Intoxikation führt zu einer schweren Störung des Säure-Basen-Haushalts. Die durch Salicylsäure ausgelöste respiratorische Alkalose wird im Normalfall über eine erhöhte Ausscheidung von Hydrogencarbonat kompensiert. Bei akuter Intoxikation funktioniert dieser Mechanismus nicht mehr: Der verminderte Atemantrieb und die reduzierte Säureausscheidung über die Nieren bewirkt eine kombinierte respiratorischer und metabolischer Azidose (Plumb, 2008).

Die verwendete ASS Dosis zur Thrombozyteninhibition bei Tieren liegt je nach Studie zwischen 0,5mg/kg und 4mg/kg. Nebenwirkungen wurden in diesen Studien nicht gesehen oder konnten nicht eindeutig der Gabe des Medikaments zugeordnet werden (Balch und Mackin, 2007; Plumb, 2008; Shearer L., 2009; Sharpe et al., 2010).

In der Veterinärmedizin sollte der Wirkstoff nicht eingesetzt werden bei Patienten, welche schon bei früherer Therapie mit Acetylsalicylsäure eine Hypersensitivitätsreaktion aufwiesen, beispielsweise gastrale Ulzera entwickelt haben. Auf Grund der hohen Albuminaffinität von ASS sollte seine Dosierung bei Hypoalbuminämie reduziert werden (Plumb, 2008).

Durch die hepatoide Konjugation und renale Exkretion ist bei Schäden von Leber und/oder Niere, je nach Schweregrad, auf eine Therapie mit ASS zu verzichten.

Bis zu sieben Tage vor einem chirurgischen Eingriff sollte auf jegliche thrombozyteninhibierende Therapie verzichtet werden, um das intraoperative Blutungsrisiko nicht zu erhöhen (Plumb, 2008).

ASS wird beim Menschen deutlich schneller renal ausgeschieden, wenn der Urin-pH auf Grund von zum Beispiel Kaliummangel oder rein vegetarischer Ernährung in den basischen Bereich ansteigt. In diesen Fällen sollten die Einnahmeintervalle verkürzt, oder die Dosis erhöht werden (Plumb, 2008).

Die gleichzeitige Einnahme von ASS und Kortikosteroiden oder nichtsteroidalen Antiphlogistika erhöht das Risiko von Schleimhautreizungen und -blutungen. ASS hemmt bei gleichzeitiger Einnahme die Ausscheidung von Digoxinen, wodurch deren Plasmakonzentration steigt (Plumb, 2008).

Der Einfluss von ASS auf Diuretika ist unterschiedlich: Die Wirkung von Spironolacton wird gehemmt, wohingegen Furosemide, auf Grund einer kompetitiven Hemmung, die Exkretion von Acetylsalicylsäure verringern (Plumb, 2008). Beim Tier sind diese Interaktionen bisher sehr wenig dokumentiert.

5.4.2 Acetylsalicylsäureresistenz

Die gleichzeitige Einnahme von schmerzlindernden nichtsteroidalen Antiphlogistika kann COX-1 hemmen, da diese eine hohe Bindungsaffinität zu bestimmten Regionen dieser Cyclooxygenase haben. Die Anbindung von ASS und somit die Acetylierung von Serin 529 wird unterbunden (Svenstrup Poulsen et al., 2005).

Bei Diabetespatienten des Typ-2 ist die Thrombozytenaktivierung erhöht. Das Überangebot an Thrombozyten und deren Aktivatoren vermindert die Wirksamkeit von ASS (Mortensen et al., 2010). Der gleiche Mechanismus vermindert auch bei Patienten mit einem metabolischen Syndrom die ASS Wirkung (Smith et al., 2012).

Die gleichzeitige Einnahme von Protonenpumpeninhibitoren (PPIs) aktiviert ebenfalls die Thrombozyten und schwächt die Wirkung von Acetylsalicylsäure (Wurtz et al., 2010).

Dass eine Dosisanpassung die genannten Probleme beheben könnte, wird zwar diskutiert (Wurtz et al., 2010), konnte bisher aber in keiner Studie nachgewiesen werden.

Eine veterinärmedizinischen Studie mit gesunden Beaglehunden zur Niedrigdosierung von ASS (0,5mg/kg alle 24 Stunden über 2 Tage) ermittelte 30% Non-Responder. Erklärt wurde dies mit parallel, aber unabhängig von COX 1 ablaufenden Aktivierungskaskaden im Thrombozyten. Die Thrombozytenfunktion wurde in dieser Studie mittels Impedanzvollblutaggregometrie überprüft. (Sharpe et al., 2010).

5.4.3 Clopidogrel

Clopidogrel ist ein Prothrombotikum aus der Familie der Thienopyridine. Im ursprünglichen Zustand hat es so gut wie keinen Effekt auf die Thrombozyten. Durch ein Mitglied des Cytochrom P450 Systems, das Cytochrom P450 2C19 (CYP2C19), wird Clopidogrel in der Leber aktiviert. Im aktivierten Zustand ist es in der Lage, den G-Protein gekoppelten Thrombozytenrezeptor P2Y₁₂ irreversibel zu blockieren.

Normalerweise wird der P2Y₁₂-Rezeptor durch ADP aktiviert und verändert die Konformation des Oberflächenmoleküls GPIIb/IIIa. Dies erhöht seine Affinität zu Fibrinogen und dem von Willebrand-Faktor, wodurch die Thrombozyten aggregieren können. Blockiert Clopidogrel P2Y₁₂, verhindert das die Plättchenaktivierung (Comin und Kallmes, 2011).

In der Humanmedizin beschleunigt man den Wirkungseintritt von Clopidogrel durch initial höher Dosierungen (Loading Dose). Untersuchungen haben gezeigt, dass mit einer Initialdosis von 900mg Clopidogrel innerhalb von zwei Stunden die gleiche Thrombozytenaggregationshemmung erreicht wird, wie mit einer Dosis von 300mg innerhalb von sechs Stunden (Comin und Kallmes, 2011). Nebenwirkungen von Clopidogrel beim Menschen sind vor allem: Einblutungen in die Haut (Hämatome, Purpura), Epistaxis und gastrointestinale Blutungen. Das Risiko von Blutungen im Gastrointestinaltrakt ist allerdings geringer als bei Gabe von ASS (Harker et al., 1999).

Andere Nebenwirkungen sind allergische Reaktionen mit Hautjuckreiz. Studien der Humanmedizin zeigen, dass ungefähr 30% der Menschen nicht adäquat auf die Therapie mit Clopidogrel ansprechen. Solche Non-Responder sind vor allem asiatischer Herkunft. Ursache hierfür sind natürliche Genvarianten des Cytochrom P2C19 (Esposito, 2011). Aber auch die unterschiedliche intestinale Resorption durch genetischen Polymorphismus des ABCB1-Gens spielt eine Rolle (Comin und Kallmes, 2011). Bei Hunden fehlen bisher Studien, die den Einfluss von Genvarianten auf Clopidogrel untersucht haben.

5.4.4 Clopidogrelresistenz

Protonenpumpeninhibitoren wie Omeprazol vermindern die Wirkung von Clopidogrel. Mocerri et al. empfehlen zwar die Dosis des Thrombozytenhemmers entsprechend anzupassen, geben aber keine klare Dosierungsangabe (Mocerri et al., 2011). Werden zur Prophylaxe von gastrointestinalen Blutungen zusätzlich Protonenpumpeninhibitoren gegeben, sollte Pantoprazol eingesetzt werden. Dieser Wirkstoff scheint die Thrombozytenfunktion weniger zu beeinflussen als beispielsweise Omeprazol (Mocerri et al., 2011; Kwok und Loke, 2012)

Ein genetischer Polymorphismus von Bestandteilen des Cytochrom P 450 Enzyms, zum Beispiel des Cytochrom P2C19 (Esposito, 2011), kann ebenfalls die Wirkung von Clopidogrel vermindern oder komplett hemmen, wenn dadurch das Prodrug nicht in den aktiven Metaboliten umgewandelt werden kann (Cattaneo, 2004).

Auch unspezifische Entzündungsreaktionen können die Clopidogrelwirkung vermindern: Erhöhtes C-reaktives Protein vermindert, wahrscheinlich durch eine gesteigerte Gerinnung, die Inaktivierung der Thrombozyten durch Clopidogrel (Bernlochner et al., 2010).

Weitere Gründe für eine Clopidogrelresistenz sind ein Polymorphismus des P2Y12-Rezeptors, unterschiedliche Resorption aus dem Darm oder eine geringere Metabolisierung in der Leber (Gachet und Aleil, 2005).

Führt Clopidogrel nicht zu dem erwünschten Erfolg, sollte eine Dosisanpassung oder Medikamentenumstellung vorgenommen werden.

Eine Loading Dose ASS wurde nach Literaturrecherche des Autors bisher nicht in der Veterinärmedizin eingesetzt, während dies bei Clopidogrel nur einmal beim Pferd und parallel zu vorliegender Studie geschah (Roscher et al., 2015). Der Ansatz scheint interessant, da in der Humanmedizin mit doppelter Anfangsdosis ein schnellerer Wirkungseintritt und eine längere Wirkungsdauer erzielt werden konnte als mit der normalen 300mg Clopidogrel Dosierung (Müller, 2001). Auf Grund dieser Ergebnisse verwendeten wir in unserer Studie ebenfalls eine Loading Dose von ASS und Clopidogrel.

Das Ziel der prospektiven Studie bestand darin, bei Hunden die Wirksamkeit von ASS und Clopidogrel mittels einer Vollblutaggregation zu überprüfen.

5.5 Non-Responder

Einige humanmedizinische Studien belegen, dass ASS oder Clopidogrel nicht immer zu einer ausreichenden Thrombozytenhemmung führen (Gachet und Aleil, 2005; Svenstrup Poulsen et al., 2005; Lev et al., 2006; Pape et al., 2007).

Die Wirkmechanismen sind zurzeit noch weitestgehend unklar und ob die messbaren Abweichungen eine klinische Relevanz haben, ist nicht durch Studien verifiziert (Cattaneo,

2004). Eine häufige Ursache dürfte die fehlende oder falsche Einnahme des Medikaments sein (Svenstrup Poulsen et al., 2005).

6 Material und Methoden

6.1 Studienaufbau

Die prospektive Studie zur Thrombozytenaggregationshemmung mittels ASS im Vergleich zu Clopidogrel an Beaglehunden wurde vom Veterinärdezernat des Regierungspräsidiums Gießen bewilligt (TVA V54 – 19c 20 15 (1) GI 18/17 Nr. 95/2011).

Zwischen Januar und Mai 2012 nahm jeder Proband über sechs Wochen an der Studie teil. Die Hunde erhielten jeweils in der ersten Phase über vier Tage ASS und nach einer vierzehntägigen Wash-Out-Phase dann über vier Tage Clopidogrel.

Jeder Hund wurde initial, nach zwölf Stunden und anschließend einmal täglich einer allgemeinen klinischen Untersuchung (Verhalten, Futteraufnahme, Puls, Atmung, Schleimhäute, Körpertemperatur, Kotfarbe und -konsistenz, Urinausscheidung) unterzogen. Alle Tiere waren zu jedem Untersuchungszeitpunkt während der Studiendauer anhand der klinischen und labordiagnostischen Befunde gesund.

Acetylsalicylsäure und Clopidogrel wurden einmal täglich mit Nassfutter und in folgender Dosierung verabreicht:

- Tag 1: jeweils 10 mg/kg
- Tag 2-4: pro Tag 1 mg/kg ASS bzw. 2 mg/kg Clopidogrel

Tabelle 2: Dosierungs- und Blutentnahmeschema bei Gabe von Acetylsalicylsäure:

Zeit	0	6h	12h	24h	d 3	d 4	d 5	d 6	d 7	d 8	d 9	d 10	d 11	d 12	d 13	d 14
Dosis (mg/kg)	10			1	1	1										
Klinische U.	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Blutentnahme	X	X	X	X	X	X		X		X		X		X		X

Abkürzungen: U=Untersuchung, mg/kg=milligramm/kilogramm, h=Stunde, d=Tag

Tabelle 3: Dosierungs- und Blutentnahmeschema bei Gabe von Clopidogrel:

Zeit	0	6h	12h	24h	d 3	d 4	d 5	d 6	d 7	d 8	d 9	d 10	d 11	d 12	d 13	d 14
Dosis (mg/kg)	10			2	2	2										
Klinische U.	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Blutentnahme	X	X	X	X	X	X		X		X		X		X		X

Abkürzungen: U=Untersuchung, mg/kg=milligramm/kilogramm, h=Stunde, d=Tag

Die eingesetzten Dosierungen der beiden Medikamente stützen sich auf frühere Studien (Grauer et al., 1992; JC Goodwin, 2007; Shearer L., 2009; Sharpe et al., 2010) und klinischen Erfahrungswerten in der eigenen Universität.

Die Blutentnahmen erfolgten an der Vena jugularis.

Die Messungen zur Thrombozytenaggregationshemmung wurden an Tag 1 vor der initialen Dosis sowie 6h, 12h und 24h danach durchgeführt. Von Tag 2 bis 4 erfolgten die Messungen einmal täglich und anschließend, bis Tag 14, jeden 2. Tag immer direkt vor der Medikamentengabe.

Die Thrombozytenfunktion wurde mittels Vollblutaggregometrie (Multiplate Dynabyte, München; jetzt: Roche Diagnostik GmbH, Mannheim) bestimmt.

Die hämatologischen Untersuchungen erfolgten mit dem ADVIA 2120 (Siemens Healthcare Diagnostics, Eschborn). Sie wurden, inklusive der Bestimmung von Thrombozytenindizes, bei jeder Blutprobenentnahme durchgeführt.

Die Thrombelastgraphie mittels TEG 5000 Thrombelastograph (Haemonetics Corporation, Braintree, MA, USA) diente als Globaltest der Gerinnung. Die Messungen von Thrombinzeit (pT) und partieller Thrombinzeit (pTT) erfolgten im Zentrallabor des Klinikums Veterinärmedizin der JLU Giessen und wurden mit dem STA compact (Roche Diagnostik GmbH, Mannheim) durchgeführt.

Vor Beginn der Medikamentengabe, sowie an Tag 4 und 14 wurden die Organparameter (Harnstoff, Kreatinin, Natrium ionisiert, Chlorid, Kalium ionisiert, Kalzium, Phosphor, Magnesium, Gesamteiweiß, Albumin, Globulin, Glukose, Bilirubin gesamt, Cholesterin, Triglyceride, alkalische Phosphatase, Alanin-Aminotransferase, Glutamatdehydrogenase, Kreatinkinase) ebenfalls im Zentrallabor mittels des Analysegeräts Pentra 400 (AxonLab, Kaiserslautern) überprüft, um den genauen Gesundheitsstatus der Hunde zu überwachen. pT und pTT wurden vor der Medikamentengabe und nach 14 Tagen gemessen.

Nach der Thrombozytenfunktionsmessung unter Acetylsalicylsäure wurde vor Wechsel auf Clopidogrel eine zweiwöchige Wash-Out-Phase eingehalten, um eine mögliche Interaktion

der beiden Medikamente auszuschließen und eine evtl. anhaltende Wirkung abklingen zu lassen.

6.2 Probanden

In die Studie wurden zehn Beaglehunde der Klinik für Kleintiere, Innere Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen eingeschlossen. Es handelte sich um sechs männlich-kastrierte und vier weiblich-kastrierte Hunde mit einem durchschnittlichen Gewicht von 13,5kg (+3,8/-4,2). Das Alter lag median bei 52 (+12/-6) Monaten.

6.3 Medikamentenverabreichung

Bisher gibt es keine für Tiere zugelassene Thrombozytenaggregationshemmer. Auch eine Studie zur Wirksamkeit der auf dem Markt erhältlichen Generika findet sich nicht. Aus diesem Grund wurde auf die in der Humanmedizin bewährten Originalprodukte zurückgegriffen und Aspirin® protect 100mg (Bayer Healthcare) und Plavix® 75mg (Sanofi-Aventis GmbH, Frankfurt) als humanmedizinische Arzneimittel nach Umwidmung verwendet.

Neue Studien zur Vergleichbarkeit von Originalprodukten wie Plavix, und Clopidogrel in anderen Zusammensetzungen erschienen kürzlich. In diesen gab es keine relevanten Unterschiede, weder in der Wirkung, noch in der Verträglichkeit (Kim et al., 2011; Suh et al., 2011). Inwiefern sich diese pharmakologischen Eigenschaften bestätigen lassen, müssen kommende Studien zeigen.

Der Wirkstoff von Aspirin protect ist 100mg Acetylsalicylsäure. Weitere Bestandteile sind Maisstärke, Cellulosepulver, Methacrylsäure-Ethylacrylat-Clopolymer, 1:1-Dispersion 30%, Polysorbat 80, Natriumdodecylsulfat, Talkum und Triethylcitrat. Die Tabletten sind, sofern sie nicht geteilt werden, magensaftresistent und werden im Dünndarm resorbiert (Bayer Healthcare).

Zur Verabreichung von Clopidogrel wurde Plavix 75mg der Firma Sanofi genutzt. Das Präparat enthält 75mg Clopidogrel als Hydrogensulfat. Weitere Bestandteile sind Mannitol, hydriertes Rizinusöl, Cellulose, Makrogol 6000 und Hydrolyse sowie Lactose-Monohydrat, Triacetin, Eisen-III-Oxid und Titandioxid.

Die in der Studie eingesetzten Tabletten wurden mittels Keramikmörser zerkleinert, das Pulver auf ein Papierschiffchen gegeben und die Dosierung mit einer Präzisionswaage (Kern und Sohn GmbH, Balingen) auf ein hundertstel Gramm abgewogen. Nach Verschluss des Schiffchens wurde es für die Einnahme über dem Nassfutter geöffnet und das Medikament mit einem Spatel vom Papier gekratzt und so über dem Futter verteilt. Zusammen mit der Nahrung (Intestinal Nassfutter von Royal Canin) gelangte das jeweilige Medikament oral in den Verdauungstrakt des Probanden. Die Hunde wurden einzeln gefüttert und auf die vollständige Leerung des Napfes geachtet. Späteres Erbrechen wurde nicht beobachtet.

6.4 Entnahme der Blutproben

Der Hals wurde großflächig rasiert und die Einstichstelle mit Jodtupfern gereinigt. Danach wurde Alkohol zur Desinfektion aufgetragen und eine kurze Einwirkzeit abgewartet.

Die Blutentnahme erfolgte venös mit einer gelben 20Gauge Sterican Einmalkanüle (Braun Melsungen AG, Melsungen: Durchmesser 0,9mm; Länge 40mm).

Das Blut wurde mit einer Einmalspritze abwechselnd an der rechten oder linken Vena jugularis entnommen. Dies geschah beim sitzenden Hund, wobei eine Hilfsperson seinen Kopf nach oben streckte und fixierte.

Das Blut wurde sofort in die vorher geöffneten Röhrchen gefüllt und die Einstichstelle mit einem Jodtupfer abgedrückt, um die Blutung zu stillen.

Die Probenentnahmen erfolgten zu den in den folgenden Tabellen beschriebenen Intervallen:

6.5 Probengefäße

Beim Einfüllen des Blutes in die jeweiligen Probenröhrchen wurde darauf geachtet, dass das Blut am Rand der Röhrchen nach unten lief, um eine mechanischen Zerstörung von einzelnen Blutbestandteilen wie Erythrozyten zu vermeiden.

Für die Hämatologie wurden Kalium 3-EDTA Mikro-Probengefäße mit einem Volumen von 1,3ml und anhängendem PE-Softstopfen (Sarstedt, Nümbrecht: Katalognummer 41.1504.005) verwendet.

Die Erstellung eines labordiagnostischen Organprofils erfolgte in Lithium-Heparin Mikro-Probengefäßen mit anhängendem PE-Softstopfen (Sarstedt, Nümbrecht: Katalognummer 41.1503.005) für 1,3ml Probenvolumen.

Zur TEG-Messung wurde ein Citrat Mikroprobengefäß der gleichen Bauart (Sarstedt, Nümbrecht: Katalognummer 41.1506.005) verwendet.

Die Messung mit dem Multiplate erfolgte aus einer S-Monovette Hirudin, (Sarstedt, Nümbrecht: Katalognummer 04.1944.001). Dieses Hirudinbeschichtete Röhrchen wurde von der Firma Sarstedt zusammen mit dem Hersteller des Multiplate auf die Geräteeigenschaften angepasst. Im hier dargelegten Versuchsaufbau wird das Hirudinderivat Refludan® (Lepirudin) der Firma Roche, Mannheim verwendet, mit einer Endkonzentration von 0,045mg/ml Blut in einem 2,7ml Blutröhrchen.

6.6 Probenaufbereitung

Die jeweils befüllten Blutröhrchen für die Messungen der Hämatologie, klinischen Chemie sowie von pT und pTT wurden direkt nach der Probenentnahme 5mal geschwenkt und in das

Zentrallabor des Klinikums Veterinärmedizin gebracht. Die Bestimmung der Messwerte erfolgte innerhalb von 15 Minuten nach Eintreffen im Labor.

Das Citratröhrchen für die TEG-Messung wurde nach Befüllung ebenfalls fünfmal geschwenkt und vom Autor zum Messgerät verbracht. Dort ruhte es anschließend eine Stunde bei Zimmertemperatur bis die Messung, ebenfalls durch den Autor, erfolgte.

Auch die Hirudinröhrchen wurden nach der Befüllung genau fünfmal geschwenkt und danach in einem Styroporkissen befestigt. Vorsichtig wurden die Hirudinröhrchen möglichst ohne Erschütterung auf einem Tisch neben dem Multiplate abgestellt, um dreißig Minuten zu ruhen.

6.7 Durchführung der Messungen

6.7.1 Thrombelastographie TEG 5000

Das Messgerät war ein Thrombelastograph TEG 5000 (Haemonetics, Braintree).

Das Citratblut wurde nach einstündiger Ruhezeit mit einer, auf eine 1ml-Spritze aufgesetzte 20G-Einmalkanüle (Braun Melsungen AG, Melsungen) aus dem Röhrchen gezogen. Nach Entfernen der Kanüle wurden die Flüssigkeit in ein, auf Zimmertemperatur angewärmtes Kaolinröhrchen gegeben und anschließend dreimal geschwenkt. Danach erfolgte die Entnahme von 360µl Blut mit der Pipette und das Einbringen in das Messgefäß.

Bei den sich anschließenden Analysen war eine Messzeit von 45 Minuten fest eingestellt. Die interne Qualitätskontrolle erfolgte 24 Stunden nach der letzten Messung mittels Level-1-Testung (Messung mit einer standardisierten hypokoagulatorischen Lösung) und Level-2-Testung (Messung mit einer standardisierten hyperkoagulatorischen Lösung).

6.7.2 Hämatologie inklusive Thrombozytenaktivierungsindizes

Der ADVIA 2120 (Siemens Healthcare Diagnostics) ist ein automatischer 5-part-Diff-Hämatologie-Analyzer, mit dem neben der Hämatologie auch die Retikulozytenzählung durchgeführt wurde.

Nach mehrmaligem Schwenken wurde die Probe mit Hilfe der Probennadel des Geräts direkt aus dem Röhrchen entnommen. Die Probenaufbereitung erfolgte teils durch den Autor und teils durch das Laborpersonal.

Die Messungen beinhalteten folgende Parameter:

1. **Leukozyten**, (WBC): neutrophile (Neutr), eosinophile (Eos) und basophile (Baso) Granulozyten sowie Lymphozyten (Lymph) und Monozyten (Mono), große ungefärbte Zellen (Large unstained Cells, LUC)

2. **Erythrozyten**, (RBC): Hämoglobin (Hgb), Hämatokrit (Htc), mittleres Erythrozytenvolumen (MCV), Größenverteilung der Erythrozyten (RDW), mittlerer Hämoglobingehalt (MCH) und mittlere Hämoglobinkonzentration (MCHC)
3. **Thrombozyten**: Thrombozytenzahl (PLT), Thrombozytenaggregate (PLT-Aggr), mittlere Thrombozytendichte (MPC)
4. **Retikulozyten**

6.7.3 Thrombozytenaggregometrie, Multiplate

Das Multiplate (Dynabyte, München; jetzt: Roche Diagnostik GmbH, Mannheim) ist ein Mehrkanal-Impedanz-Aggregometer.

Die Messzeiten und Dosierungen wurden manuell eingegeben und zu pipettierende Mengen automatisch an die Pipette übermittelt.

Nach Ablauf der 30 Minuten Ruhezeit wurden 300µl Vollblut aus dem Hirudinröhrchen mit der Pipette in die Testzelle des Gerätes eingegeben. Die Verbindung der Pipette mit dem Computer ermöglicht per Knopfdruck das Einbringen der gleichen Menge Vollblut und isotoner Natriumchlorid-Lösung (Braun Melsungen AG, Melsungen).

Nach einer dreiminütigen Inkubationszeit und dem Einbringen von 20 µl der im Folgenden beschriebenen Agonisten wurde die Messung gestartet. Die Messzeit betrug 12 Minuten.

6.7.3.1 Verwendete Agonisten

Jede Messung am Multiplate wurde mit vier verschiedenen Agonisten in vier Messzellen durchgeführt, die bei normal funktionierenden Thrombozyten eine Gerinnung auslösen. Als Kontrolle dienten Messungen von isotoner Natriumchloridlösung in Messzelle Fünf.

6.7.3.1.1 Kollagen

Verwendet wurde der COLtest (Roche, Mannheim), eine 1ml Ampulle mit 100µg/ml Kollagen. Die Trockensubstanz wurde mit 1ml sterilem Wasser gelöst und gemäß Bedienungsanleitung bis zur vollständigen Rekonstitution geschwenkt.

Die Messung erfolgte nach Zugabe von 20µl dieser vorbereiteten Lösung, was einer Konzentration von 3,23µg Kollagen/ml Vollblut entspricht. Die Restmenge wurde bismaximal 7 Tage zur weiteren Verwendung im Kühlschrank gelagert. Danach erfolgten die weiteren Messungen mit jeweils neu gemischten Lösungen.

Die Wirkung von Kollagen wird vereinfacht in folgender Abbildung dargestellt:

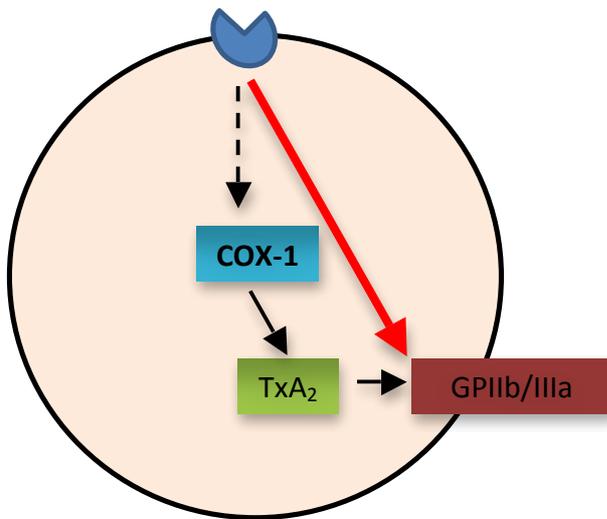


Abbildung 2: Wirkungsweise von Kollagen auf den Thrombozyten (modifiziert nach Cezary); COX-1=Cyclooxygenase-1, TxA²=Thromboxan A2, ADP=Adenosindiphosphat, TRAP=Thrombinrezeptor aktiviertes Protein, GP=Glykoprotein

6.7.3.1.2 Arachidonsäure

In dieser Studie wurde der ASPItest (Roche, Mannheim) als 1ml Ampulle mit 15 mM Arachidonsäure als Trockensubstanz verwendet. Diese wurde mit 1ml sterilem Wasser rekonstituiert. Bei jeder Messung wurden 20 µl verbraucht, was einer Dosierung von 0,5 mM entspricht.

Je 30 µl (10 µl Reservevolumen) der angemischten Lösung wurde mit einer Einkanal-Präzisionspipette in Eppendorfröhrchen (Sarstedt) verteilt und in einem Tiefkühlschrank bei -20° Celsius eingefroren. Erst unmittelbar vor den Messungen wurden die dafür benötigten Röhrchen aufgetaut und auf 37° Celsius Zimmertemperatur erwärmt.

Die Wirkung von Arachidonsäure wird vereinfacht in folgender Abbildung dargestellt:

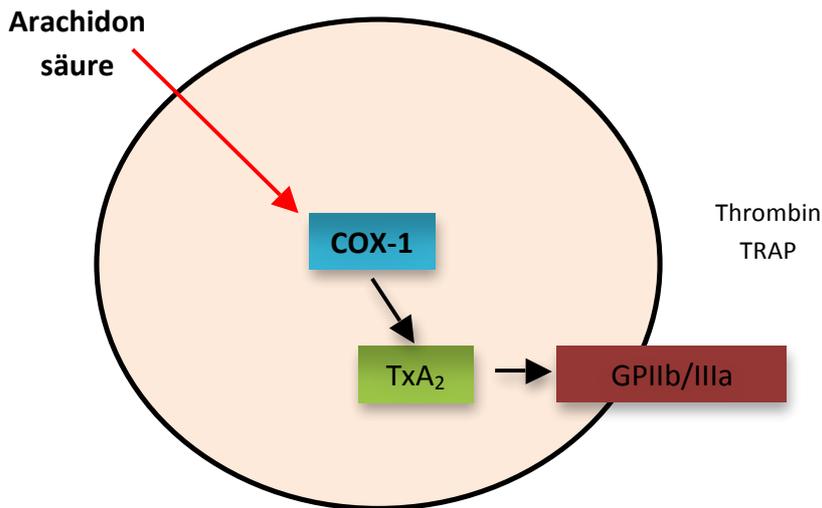


Abbildung 3: Wirkungsweise von Arachidonsäure auf den Thrombozyten (modifiziert nach Cezary); COX-1=Cyclooxygenase-1, TxA²=Thromboxan A₂, ADP=Adenosindiphosphat, TRAP=Thrombinrezeptor aktiviertes Protein, GP=Glykoprotein

6.7.3.1.3 ADP

Der ADPtest (Roche, Mannheim) besteht aus 1ml-Ampullen mit 0,2mM Trockenmasse ADP. Diese wurden mit 1 ml sterilem Wasser rekonstituiert und in gleicher Weise wie die Arachidonsäure auf Eppendorf-Röhrchen verteilt. Durch die Aufteilung auf 30µl-Portionen dauerte der Auftauprozess nur wenige Sekunden.

Gemessen wurde die Thrombozytenaktivierung mit einer Konzentration von 6,5µM ADP.

Die Wirkung von ADP wird vereinfacht in folgender Abbildung dargestellt:

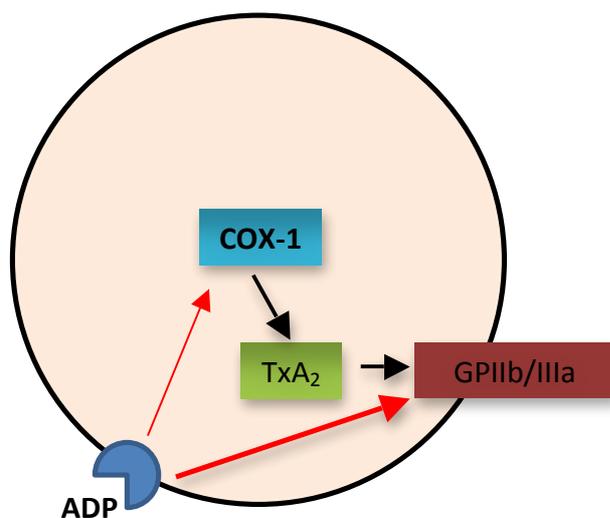


Abbildung 4: Wirkungsweise von ADP auf den Thrombozyten (modifiziert nach Cezary); COX-1=Cyclooxygenase-1, TxA²=Thromboxan A₂, ADP=Adenosindiphosphat, TRAP=Thrombinrezeptor aktiviertes Protein, GP=Glykoprotein

6.7.3.1.4 ADP + Prostaglandin E1

Verwendet wurde Prostaglandin E1 (Dynabyte, München; jetzt: Roche, Mannheim) als Trockenmasse in einer 1ml Ampulle in einer Konzentration von 300nM. Diese wurde nach dem gleichen Prinzip wie die anderen Agonisten rekonstituiert und in 30µl-Portionen eingefroren.

Nach portionsweisem Auftauen wurden die Messungen durchgeführt, wobei zuerst das Prostaglandin und direkt anschließend das ADP in die Testzelle gegeben wurden. In der Gesamtlösung von ADP und Prostaglandin betrug die Konzentration an PGE1 9,4nM.

6.7.3.1.5 Natriumchlorid (NaCl)

Für die Kontrollmessungen wurde dem Vollblut statt eines Gerinnungsagonisten 20µl NaCl (0,9%) als Negativprobe hinzugefügt. So wurde gewährleistet, dass kein Fehler bei der Probenentnahme oder ein Materialfehler vorlag, welcher per se schon zu einem Ausbleiben der Wirkung des Gerinnungshemmers Hirudin geführt hätte.

6.7.4 Klinisch-chemische Analysen

Am ABX Pentra 400 (Axonlab, Stuttgart) wurden die Parameter der klinischen Chemie und einige Elektrolyte vollautomatisch gemessen. Dies geschah ausschließlich durch die medizinisch technischen Assistenten des Zentrallabors.

In einer Zentrifuge wurde das heparinisierte Vollblut bei 14000 Umdrehungen/Minute für eine Minute in Heparinplasma und Erythrozyten aufgetrennt. Folgende Parameter wurden anschließend im Plasma gemessen: Harnstoff (Urea), Kreatinin (Crea), Alkalische Phosphatase (ALKP), Alaninaminotransferase (ALT), Glutamatdehydrogenase (GLDH), Bilirubin (Bili), Glukose (Glu), Creatinkinase (CK), Cholesterin (Chol), Triglyzeride (Tri), Totalprotein (TP) und Albumin.

Diese Untersuchung fand vor der ersten Medikamentengabe, an Tag 4 und am Ende der jeweiligen zweiwöchigen Messperiode statt.

6.8 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung wurde von der Arbeitsgemeinschaft Biomathematik und Datenverarbeitung der Justus Liebig Universität Gießen, Fachbereich Veterinärmedizin, unter Leitung von Dr. rer. nat. Klaus Failingund Verwendung des BMDP Softwareprogramms Release 8.1 (BMDP Statistical software Inc., 1440 sepulveda Blvd, Los Angeles, CA 90025 USA) durchgeführt. Daten wurden mittel Q-Q-Plot auf Normalverteilung überprüft. Die Datenauswertung erfolgte mittels einer zweifaktoriellen Varianzanalyse mit

Messwiederholung bezüglich der Faktoren "Messzeitpunkt" und "Aggregationhemmer". Die Auswertung erfolgte sowohl mit untransformierten Daten (Messzeitpunkt und Thrombozyteninhibitor), als auch nach Wurzeltransformation und logarithmischer Transformation. Das zu Grunde liegende Signifikanzniveau betrug $P < 0,05$.

Die Referenzwerte für die Thrombozytenaktivierungsindizes und TEG-Parameter wurden von unserer Arbeitsgruppe in früheren Studien bereits evaluiert (Bauer et al., 2009).

Mit dem Computerprogramm GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, San Diego; California) wurden die Graphen erstellt.

Die Wirkung des Thrombozyteninhibitors wurde als ausreichend definiert, wenn bei mindestens einem Agonisten die Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve (Area under the curve, AUC) bei mindestens einem Agonisten im Vergleich zum Ausgangswert $\geq 48\%$ abgenommen hat.

Die Graphen des Thrombozyteninhibitors Clopidogrel wurden zur besseren Darstellung der Standardabweichungen geringgradig nach rechts verschoben.

7 Ergebnisse

Die zehn Beaglehunde wurden klinisch untersucht und als gesund befunden. Sie konnten durchgehend ohne besondere Vorkommnisse an der Studie teilnehmen. Während des gesamten Studienverlaufs zeigten sie keine klinischen Zeichen medikamentenspezifischer Nebenwirkungen wie Blutungen oder Magen-Darm-Symptome.

Auf Grund technischer Mängel und Problemen bei der Handhabung waren fünf TEG-Messungen, vor allem zu Beginn der Studie nicht auswertbar. Die durch das Studiendesign bedingte zeitliche Begrenzung zwischen den einzelnen Messungen sowie die langen Inkubationszeiten der Citratröhrchen verhinderten eine Wiederholung der Tests.

Die Messungen an den Geräten im Zentrallabor konnten von den dortigen Angestellten bzw. vom Autor selbst ohne Probleme durchgeführt werden. Die Heparinröhrchen wurden abzentrifugiert und, sofern die Blutentnahme am Wochenende stattfand, das direkt im Anschluss abpipettierte Plasma im Kühlschrank gelagert. Am darauffolgenden Montag untersuchte das Laborpersonal die Proben. Dieses Vorgehen beeinflusste die Messungen nicht. Die routinemäßigen Laboruntersuchungen wiesen teils marginale Veränderungen zu den vorgegebenen Referenzwerten auf, was jedoch klinisch nicht relevant war.

7.1 Thrombelastographie

Auf Grund technischer Mängel fehlten Messwerte, was die Aussagekraft der Ergebnisse beeinflussen könnte. Für Hund 1 gab es keine Ergebnisse zum Zeitpunkt 1 und 3. Bei Hund 2 war die zweite Messung (6h) nicht auswertbar. Die TEG-Messungen bei Hund 4 während der ASS-Phase waren zu Zeitpunkt 1 und 2 nicht auswertbar. Ein Beispiel hierfür zeigt Abbildung 6:

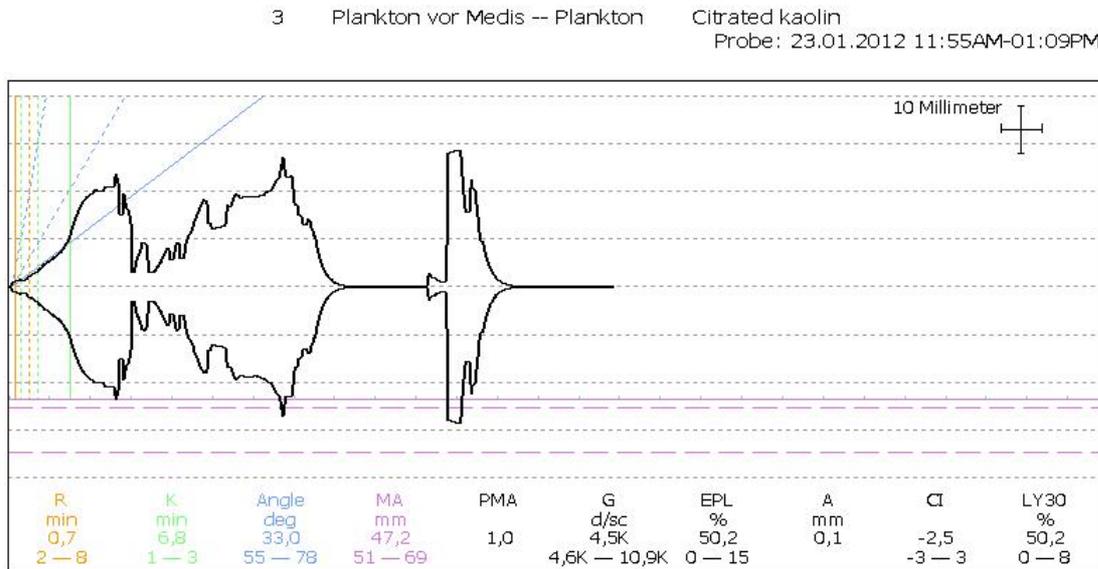


Abbildung 5: Nicht auswertbare TEG-Kurve von Hund 4 vor erster ASS-Gabe

In der Clopidogrel-Phase waren alle Graphen auswertbar. Die Messwerte sechs Stunden, 24 Stunden nach Clopidogrelgabe und am Ende der Messperiode variierten bei keinem der erfassten Parameter signifikant. Diese Ergebnisse stützen sich auf den Wald Test nach Signifikanz festgelegter Daten mit Kovarianten, (Thrombozyteninhibitor: $p=0,9811$, Zeit: $p=0,2921$, Thrombozyteninhibitor-Zeit: $p=0,4457$).

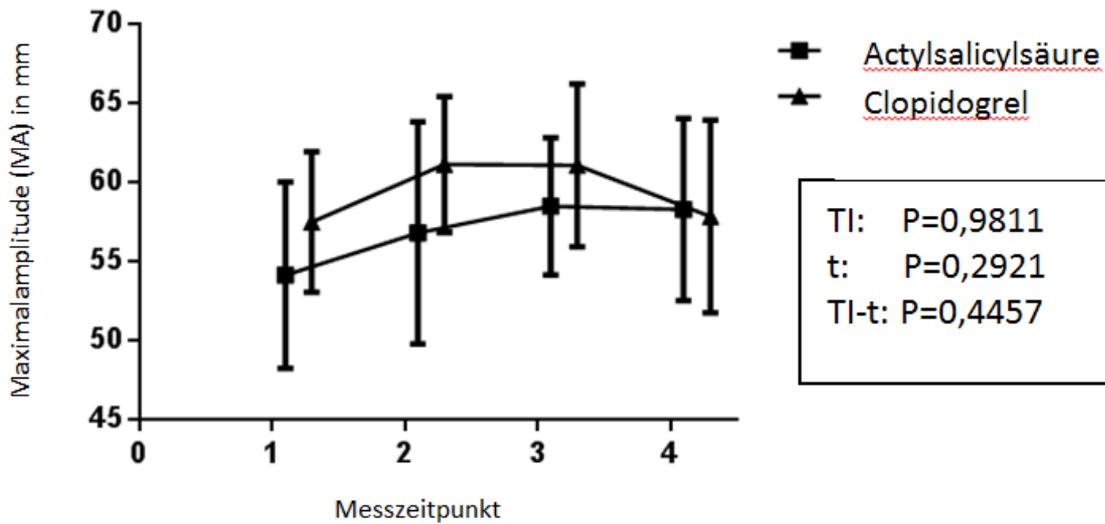


Abbildung 6: Am TEG gemessene Maximalamplitude (MA) (Ref.: 51-69mm) zu den verschiedenen Zeitpunkten vor Medikamentengabe (1), nach 6 Stunden (2), nach 24h (3), nach 14 Tagen (4); Abkürzungen: TEG: Thrombelastographie, TI: Thrombozyteninhibitor, t: Zeit, TI-t: Thrombozyteninhibitor-Zeit

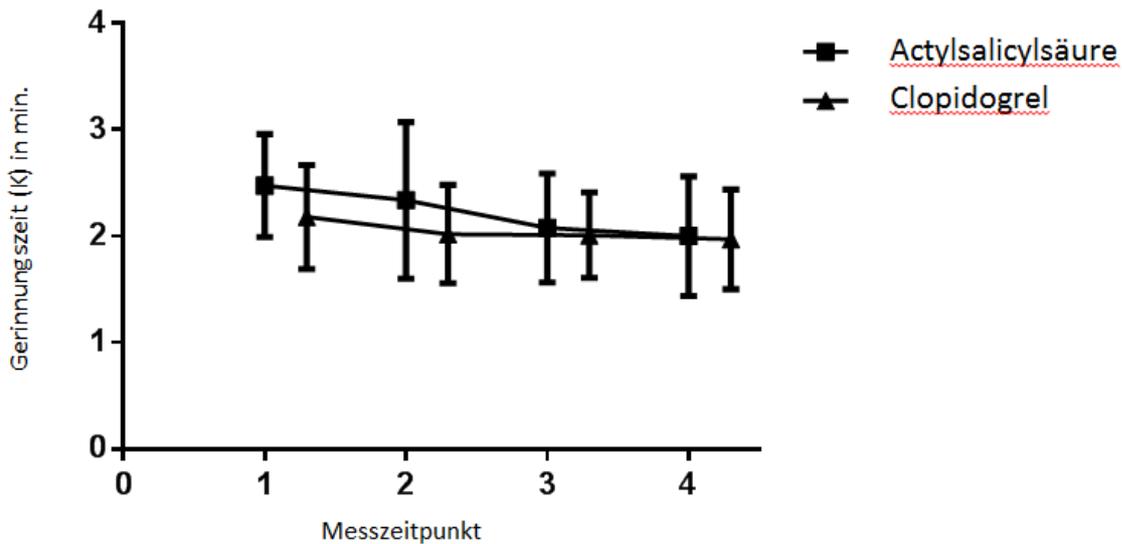


Abbildung 7: Am TEG gemessene Gerinnungszeit (K) (Ref.: 1-3 min) zu den verschiedenen Zeitpunkten (Ref.: 1-3min) vor Medikamentengabe (1), nach 6 Stunden (2), nach 24h (3), nach 14 Tagen (4); Abkürzungen: TEG: Thrombelastographie

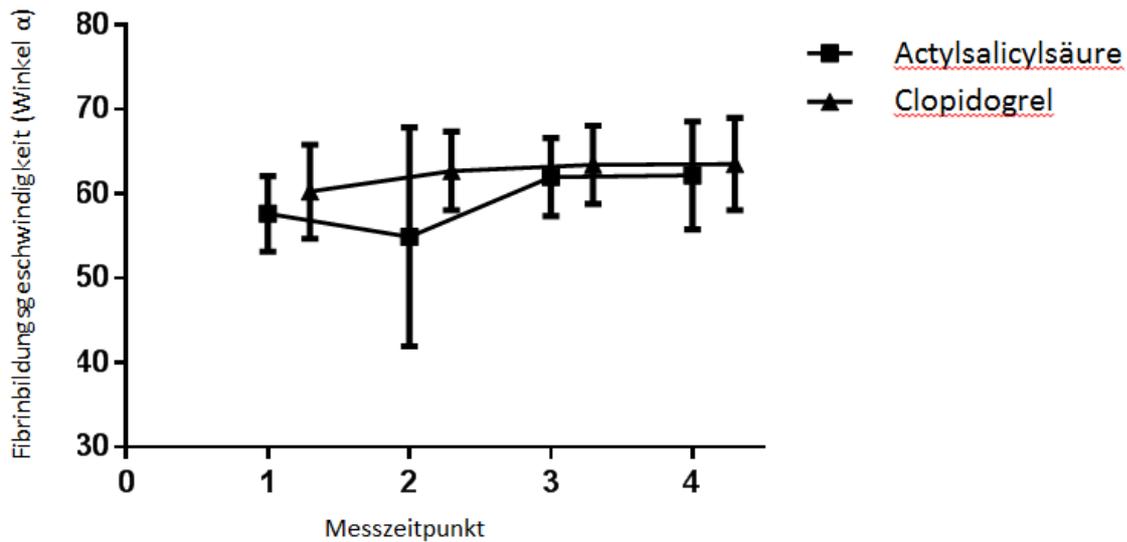


Abbildung 8: Am TEG gemessene Fibrinbildungsgeschwindigkeit (Winkel α) (Ref.: 55-78°) zu den verschiedenen Zeitpunkten vor Medikamentengabe (1), nach 6 Stunden (2), nach 24h (3), nach 14 Tagen (4); Abkürzungen: TEG: Thrombelastographie

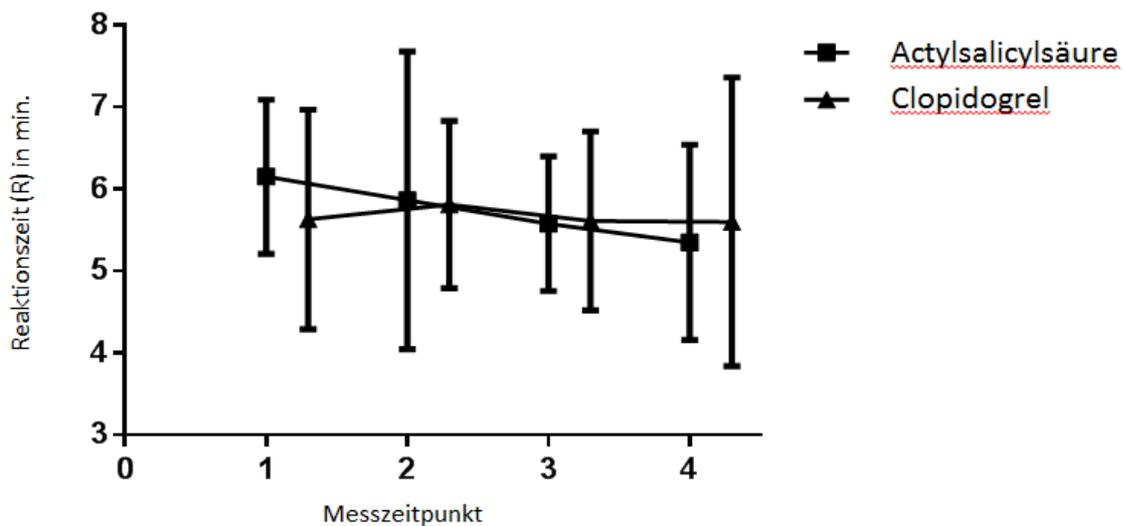


Abbildung 9: Am TEG gemessene Reaktionszeit (R) (Ref.: 2-8 min) zu den verschiedenen Zeitpunkten vor Medikamentengabe (1), nach 6 Stunden (2), nach 24h (3), nach 14 Tagen (4); Abkürzungen: TEG: Thrombelastographie

7.2 Thrombozytenaggregometrie

Die in Anhang 2 aufgelisteten Tabellen zeigen die AUC (Area under the Curve) der einzelnen Versuchstiere in der Acetylsalicylsäure- und der Clopidogrel-Phase, jeweils nach Hinzugabe der unterschiedlichen Agonisten (Col, ASPI, ADP, ADP+PG).

7.3 Die einzelnen Agonisten und ihre Aussagekraft

7.3.1 Kollagen

Kollagen ist der wohl am weitesten verbreitete Induktor zum Nachweis der Thrombozytenfunktion. Die folgende Abbildung 11 zeigt dessen Einfluss als Agonist auf den Wirkungsnachweis der eingesetzten Thrombozytenfunktionsinhibitoren. Es ergaben sich unter keinem Medikament signifikante Unterschiede ($P_{\text{Thrombozyteninhibitor}}=0,8242$) zwischen Ausgangswert und Folgemessungen.

Kollagen eignet sich demnach nicht zur Überprüfung der Wirkung von Acetylsalicylsäure oder Clopidogrel am Multiplate.

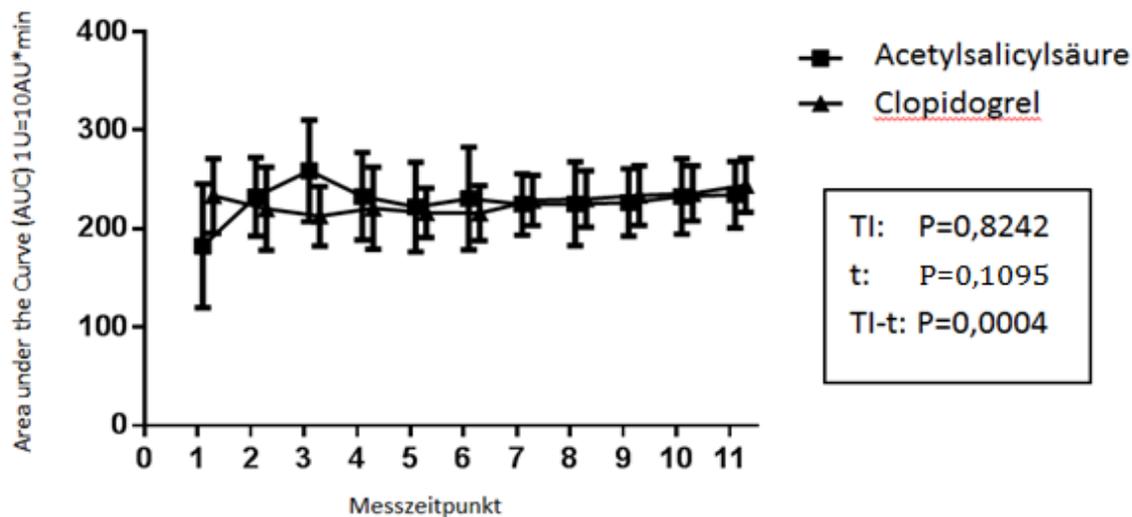


Abbildung 10: Vollblutaggregometrie mit 3,23µg Kollagen/ml Vollblut als Induktor; AUC (Area under the Curve, 1U=10AU*min.); gemessen vor der Medikamenteneingabe (1), nach 6 Stunden (2), 12h (3), 24h(4), Tag 3 (5), Tag 4 (6), Tag 8 (7), Tag 10 (8), Tag 12 (9), Tag 14 (10); Abkürzungen: TI (Thrombozyteninhibitor), t (Zeit), TI-t (Thrombozyteninhibitor-Zeit)

7.3.2 Arachidonsäure

Die Arachidonsäure (ASPI) wird als Agonist vor allem zur Messung der Wirksamkeit von Acetylsalicylsäure eingesetzt (siehe Kapitel 7.7.4.1.2). Abbildung 12 zeigt eine signifikante Wirkung der Arachidonsäure auf die Thrombozytenwirkung ($P_{\text{Thrombozyteninhibitor}}<0,0001$).

Damit belegt die Studie die agonistischen Eigenschaften der Arachidonsäure auf die hier verwendeten Thrombozytenfunktionsinhibitoren. Auch die Wirksamkeit von Clopidogrel ließ sich mit diesem Agonisten nachweisen.

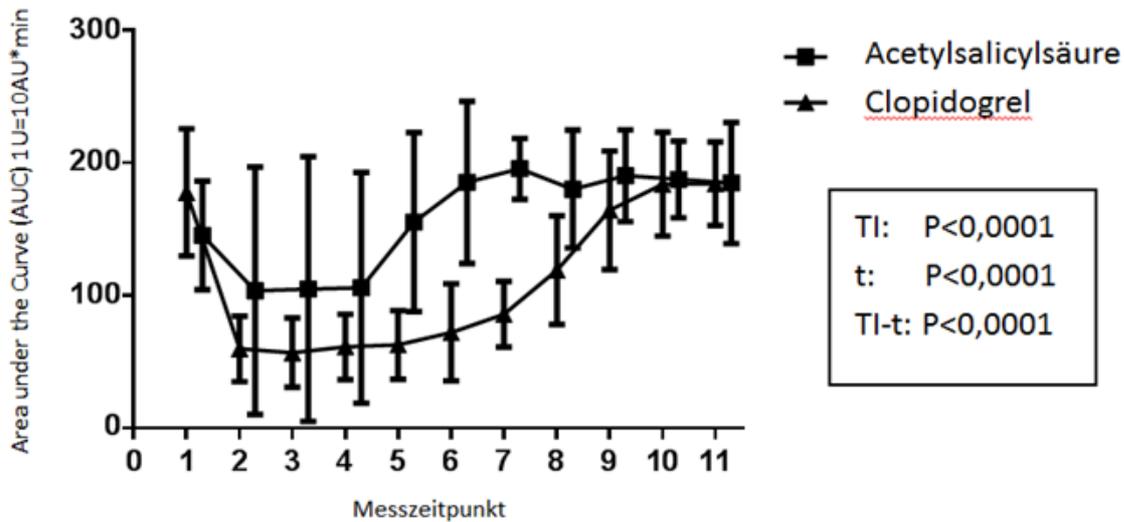


Abbildung 11: Vollblutaggregometrie mit 0,5mM Arachidonsäure als Induktor; AUC (Area under the Curve, 1U=10AU*min.) gemessen vor der Medikamenteneingabe (1), nach 6 Stunden (2), 12h (3), 24h(4), Tag 3 (5), Tag 4 (6), Tag 8 (7), Tag 10 (8), Tag 12 (9), Tag 14 (10); Abkürzungen: TI (Thrombozyteninhibitor), t (Zeit), TI-t (Thrombozyteninhibitor-Zeit)

Die Wirkung von ASS lässt sich nur durch Zugabe des Agonisten Arachidonsäure (ASPI) nachweisen. Alle anderen in dieser Studie verwendeten Agonisten waren ungeeignet eine Thrombozytenaggregationshemmung durch ASS zu detektieren.

ASPI ermöglicht auch den Wirkungsnachweis von Clopidogrel. Damit scheint ASPI der wichtigste Agonist zur Wirkungsbeurteilung von Thrombozyteninhibitoren am Multiplate. Mit der Substanz lassen sich auch Responder von Non-Respondern differenzieren.

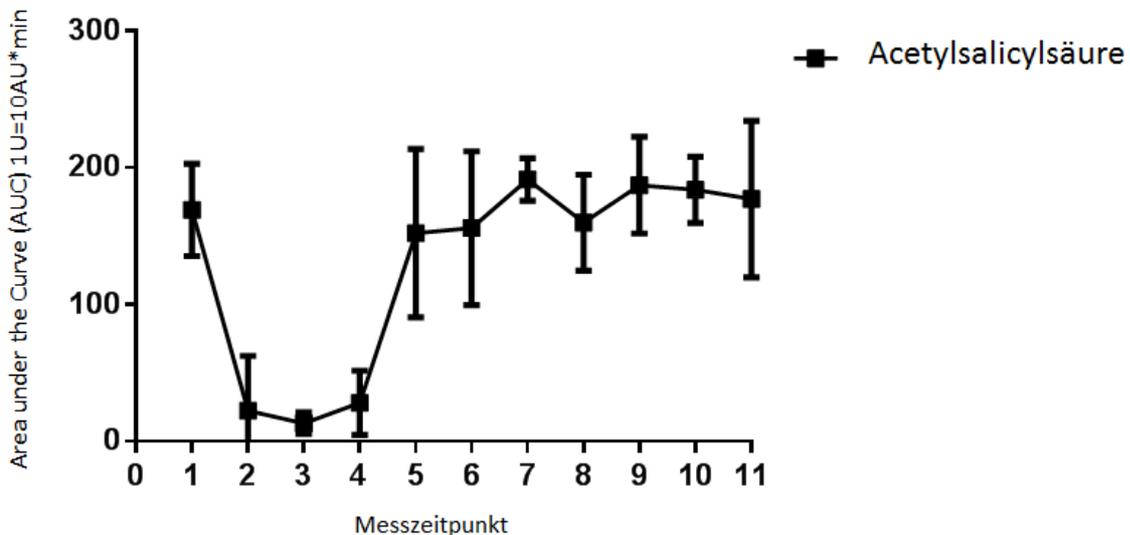


Abbildung 12: Vollblutaggregometrie nur die fünf Responder (AUC < 48% des Ausgangswertes) mit 0,5mM Arachidonsäure (ASPI) als Induktor; AUC (Area under the Curve, 1U=10AU*min.) gemessen vor der Medikamenteneingabe (1), nach 6 Stunden (2), 12h (3), 24h(4), Tag 3 (5), Tag 4 (6), Tag 8 (7), Tag 10 (8), Tag 12 (9), Tag 14 (10)

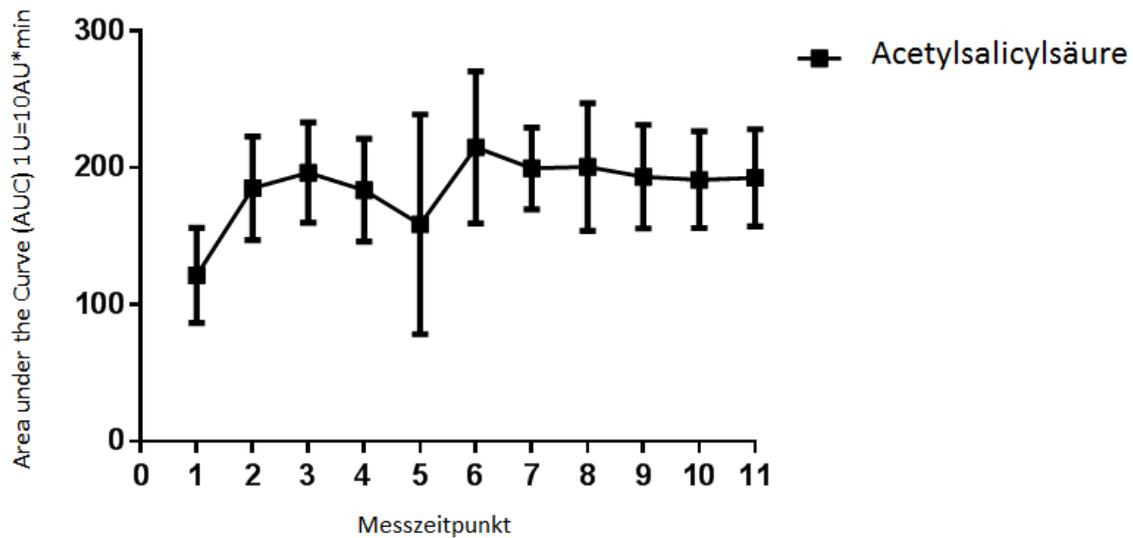


Abbildung 13: Vollblutaggregometrie nur Non-Responder (AUC bleibt >48% des Ausgangswertes) mit 0,5mM Arachidonsäure (ASPI) als Induktor; AUC (Area under the Curve, 1U=10AU*min.) gemessen vor der Medikamenteneingabe (1), nach 6 Stunden (2), 12h (3), 24h(4), Tag 3 (5), Tag 4 (6), Tag 8 (7), Tag 10 (8), Tag 12 (9), Tag 14 (10)

7.3.3 ADP

Adenosindiphosphat (ADP) ist ein gängiger Agonist um die Wirksamkeit von Clopidogrel zu belegen. Unter Zugabe von Prostaglandin E1 kommt es zu einer weiteren Wirkungsverstärkung von Clopidogrel, was die Interpretation der Messwerte erleichtert. Dieser Ansatz erlaubt auch so genannte Low Responder (reagieren nur begrenzt auf den Thrombozyteninhibitor) zu detektieren.

Für ASS ließ sich dagegen bei Zugabe von ADP keine Wirkung nachweisen wie die folgenden Abbildungen zeigen.

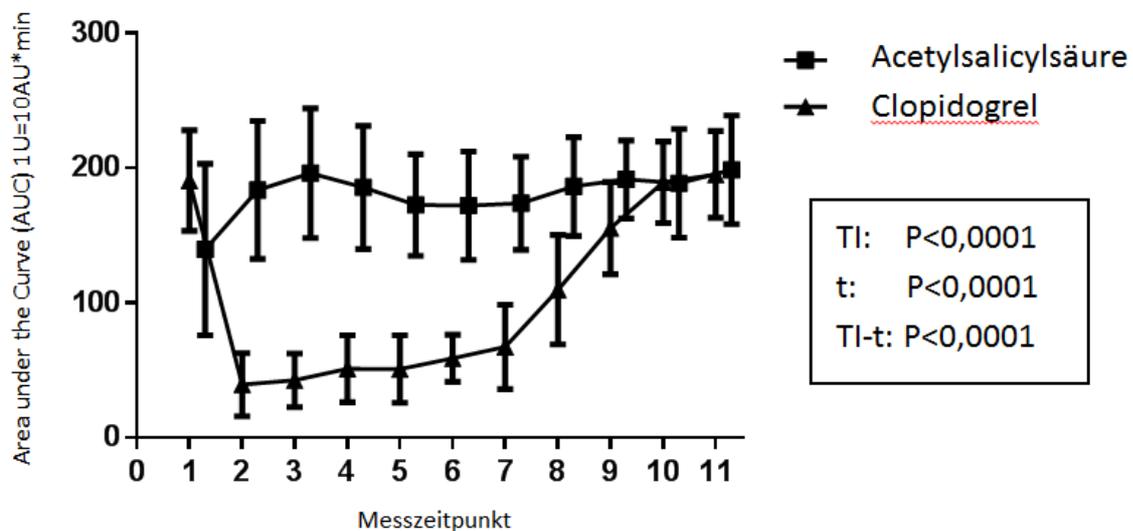


Abbildung 14: Vollblutaggregometrie mit 6,5µM ADP (Adenosindiphosphat) als Induktor; AUC (Area under the Curve, 1U=10AU*min.) gemessen vor der Medikamenteneingabe (1), nach 6

Stunden (2), 12h (3), 24h(4), Tag 3 (5), Tag 4 (6), Tag 8 (7), Tag 10 (8), Tag 12 (9), Tag 14 (10);
 Abkürzungen: TI (Thrombozyteninhibitor), t (Zeit), TI-t (Thrombozyteninhibitor-Zeit)

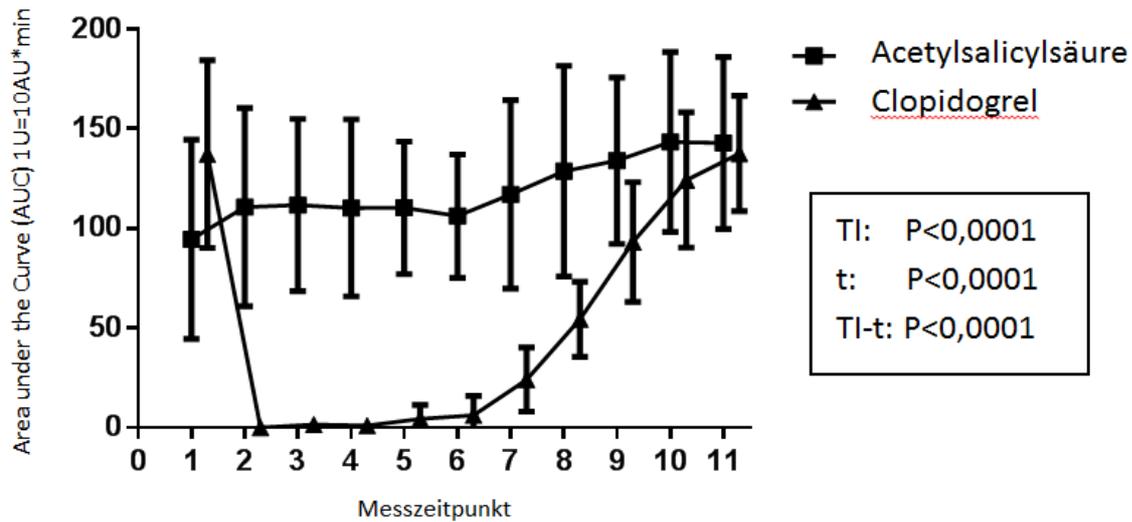


Abbildung 15: Vollblutaggregometrie mit 6,5µM ADP und 9,4nM Prostaglandin E1 als Induktoren; AUC (Area under the Curve, 1U=10AU*min.) gemessen vor der Medikamenteneingabe (1), nach 6 Stunden (2), 12h (3), 24h(4), Tag 3 (5), Tag 4 (6), Tag 8 (7), Tag 10 (8), Tag 12 (9), Tag 14 (10); Abkürzungen: TI (Thrombozyteninhibitor), t (Zeit), TI-t (Thrombozyteninhibitor-Zeit)

7.4 Responder und Non Responder

Die Studie zeigte, dass ASS nur bei 50% (n=5) der Hunde eine ausreichende Thrombozytenfunktionshemmung mit dem Induktor ASPI bewirkte:

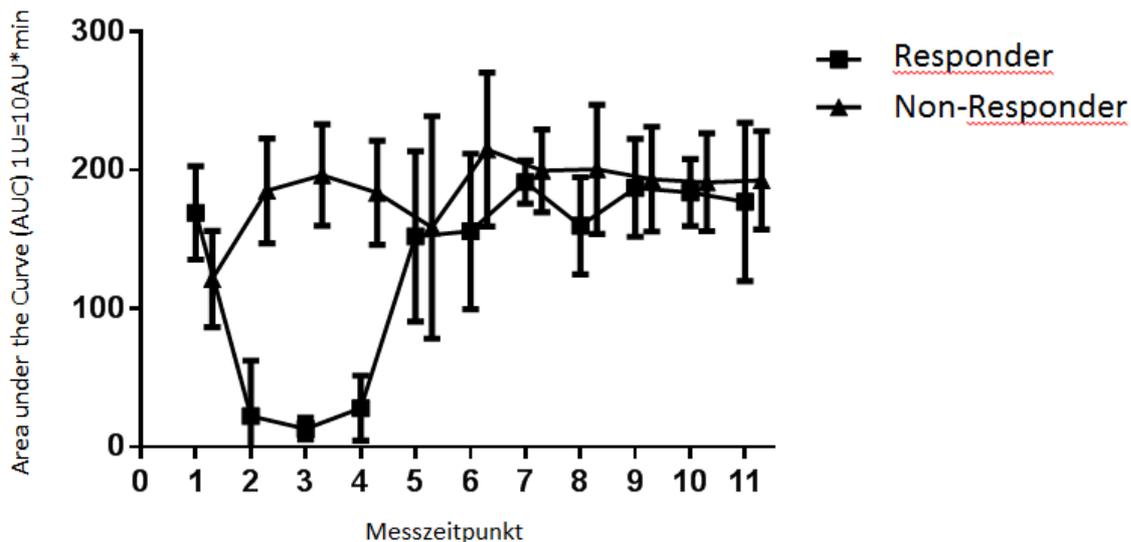


Abbildung 16: Vergleich der ASS (Aspirin) Responder und Non-Responder: gemessen vor der Medikamenteneingabe (1), nach 6 Stunden (2), 12h (3), 24h(4), Tag 3 (5), Tag 4 (6), Tag 8 (7), Tag 10 (8), Tag 12 (9), Tag 14 (10)

Die nächste Tabelle belegt bei Hund 5 zum Zeitpunkt 5 (Tag 3) einen Abfall der AUC, gemessen mit dem Agonisten Arachidonsäure.

Zeitpunkt	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
AUC	114	186	212	174	42	223	164	179	171	171	179

Abbildung 17: Messung der AUC (1U=10AU*min.) von Hund 5 mit einem plötzlichen Abfall zum Zeitpunkt 5 (Tag 3)

Da es nach dem Abfall an Tag 3 (Zeitpunkt 5) zu einem Rebound mit einer AUC von 223 kam, wird vermutet, dass die Messung tatsächlich ein kurzes Ansprechen mit darauf folgender Gegenregulation zeigt und kein Messfehler vorliegt.

Bei Clopidogrel sprachen alle Hunde auf die Therapie an, jedoch wiesen zwei Probanden eine geringere Wirkung, gemessen mit ASPI, auf. Diese basiert auf einem niedrigeren Ausgangswert, während der Verlauf der Medikamentenwirkung dem der anderen entspricht (Abbildung 37). Bei der Messung mit ADP lagen alle Hunde im vorgegebenen Referenzbereich.

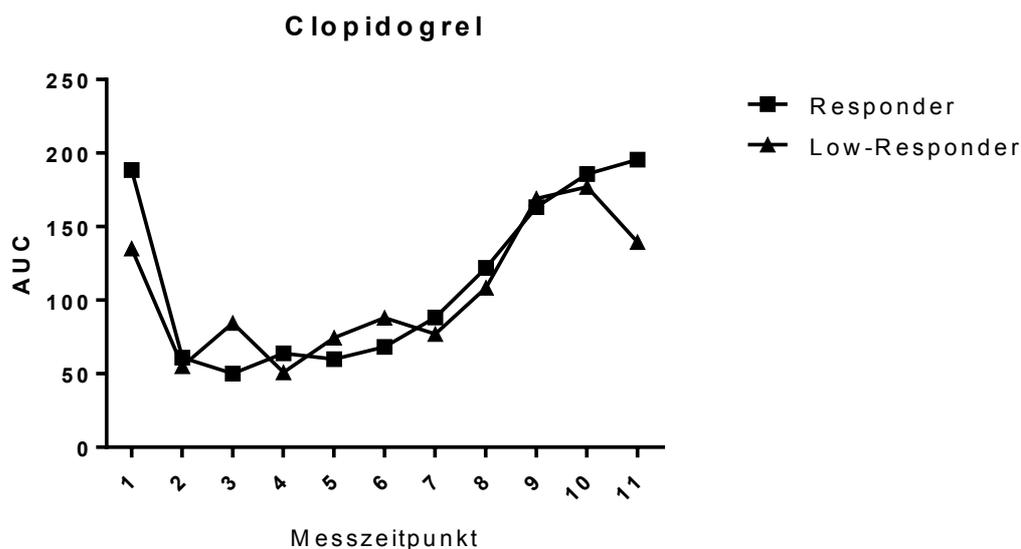


Abbildung 18: Vergleich Clopidogrel Responder und Low-Responder gemessen mit ADP

Clopidogrel und ADP

Zeitpunkt	0	6h	12h	24h	3d	4d	6d	8d	10d	12d	14d
Hund 1	241	94	87	109	92	97	133	202	231	247	240
Hund 2	173	31	46	19	44	55	70	117	158	181	141
Hund 3	166	39	34	52	39	58	66	105	138	173	167
Hund 4	185	48	52	52	64	74	87	104	145	189	194
Hund 5	215	57	34	37	51	72	47	139	122	233	223
Hund 6	142	20	32	23	19	42	42	67	113	148	176
Hund 7	152	40	56	55	7	53	25	105	156	160	173
Hund 8	237	19	18	49	58	43	94	62	170	185	209
Hund 9	164	15	44	63	62	42	44	120	185	184	192
Hund 10	232	30	22	52	72	53	65	76	136	194	237

Tabelle 19: AUC (Area under the Curve, 1U=10AU*min) in Prozent zum Ausgangswert mit 6,5µM ADP als Induktor; Fett hervorgehobene Zahlen markieren eine ausreichende Thrombozytenaggregationshemmung.

Gibt man dem ADP Prostaglandin hinzu, verbessert sich die Empfindlichkeit des Testansatzes und die AUC-Werte sinken gegen 0. Hier zeigt sich eine teils längere Wirkdauer der Funktionshemmung wie bei der Messung nur mit ADP

Cloidogrel und ADP+PGE1

Zeitpunkt	0	6h	12h	24h	3d	4d	6d	8d	10d	12d	14d
Hund 1	198	0	0	2	0	10	54	85	143	182	184
Hund 2	97	0	0	0	3	7	33	63	80	77	105
Hund 3	97	0	0	0	0	0	24	68	85	103	106
Hund 4	144	0	12	0	11	16	30	47	122	152	145
Hund 5	160	0	0	4	0	29	14	18	90	159	141
Hund 6	63	0	0	0	0	0	0	38	63	92	107
Hund 7	133	0	3	0	0	0	10	60	54	100	113
Hund 8	220	0	0	0	10	0	20	50	103	134	158
Hund 9	131	0	0	4	20	0	42	69	129	140	173
Hund 10	130	0	0	0	0	0	14	46	64	104	144

Tabelle 20: AUC (Area under the Curve, 1U=10AU*min) in Prozent zum Ausgangswert mit 6,5µM ADP und 9,4nM PGE1 als Induktor; Fett hervorgehobene Zahlen markieren eine ausreichende Thrombozytenaggregationshemmung.

7.5 Wirkdauer und Dosis

Die vorliegende Studie untersuchte neben der Thrombozytenhemmung durch ASS und Clopidogrel auch den Zeitraum bis neu gebildete Thrombozyten ihre Funktion aufnehmen und die Blutgerinnung wieder normal funktioniert. In folgenden Tabellen sind die einzelnen Ergebnisse der Thrombozytenaggregometrie mit dem Agonisten Arachidonsäure aufgeführt. Die fettgedruckten Zahlen markieren die Zeitdauer der Thrombozyteninhibition.

Bei den ASS Respondern (Hund 2, 6, 7, 8 und 10) kam es sechs Stunden nach Gabe der 10mg/kg Loading Dose zu einer suffizienten Thrombozytenfunktionshemmung. Bei allen Respondern hielt die Wirkung 24 Stunden an, bei Hund 7 sogar vier Tage. Die Erhaltungsdosis von 1mg/kg ASS an Tag 2-4 hemmte die Thrombozytenfunktion dagegen nicht.

Die Ergebnisse lassen vermuten, dass ASS für eine ausreichende Thrombozytenfunktionshemmung höher dosiert werden muss als die hier verwendete Erhaltungsdosis von 1mg/kg.

Unter Clopidogrel zeigten alle Probanden eine ausreichende Thrombozytenfunktionshemmung (AUC < 48% vom Ausgangswert) über mindestens 24 Stunden, insofern ADP dem Testansatz zugesetzt wurde. Dies galt sowohl mit Loading Dose (10mg/kg), als auch während der Erhaltungsdosis (2mg/kg).

Durch die Zugabe von ASPI bekommt man zwar eine Absenkung der AUC. Allerdings zeigt folgende Tabelle, dass die Thrombozytenhemmung bei Hund 1 an Tag 4 mit 58% des Ausgangswertes wieder außerhalb des vom Autor vorgegebenen ausreichenden Bereichs lag. Hund 2 und 4 zeigten lediglich nach sechs und nach 24 Stunden eine ausreichende Hemmung der Blutgerinnung unter 52% des Ausgangswertes. Bei beiden Hunden war die AUC zwar unter 67% in Relation zum gemessenen Anfangswert, aber nicht unter der vorgegebenen Prozentzahl von 48% unter dem Anfangswert.

Acetylsalicylsäure (ASS) und ASPI

Zeitpunkt	0h	6h	12h	24h	3d	4d	6d	8d	10d	12d	14d
Hund 2	118	0	21	22	162	150	190	148	170	179	150
Hund 6	170	0	19	30	167	178	169	163	172	160	176
Hund 7	165	3	3	2	46	63	204	109	162	162	101
Hund 8	182	93	16	66	203	178	208	175	249	210	253
Hund 10	211	16	7	21	183	210	186	204	183	208	205

Tabelle 21: AUC (Area under the Curve, 1U=10AU*min) mit 0,5mM Arachidonsäure (ASPI) als Induktor; fett hervorgehobene Zahlen markieren eine ausreichende Thrombozytenaggregationshemmung

Clopidogrel und ASPI

Zeitpunkt	0	6h	12h	24h	3d	4d	6d	8d	10d	12d	14d
Hund 1	239	112	73	112	99	139	144	202	189	245	212
Hund 2	118	44	59	37	66	80	72	101	176	178	132
Hund 3	184	61	50	69	71	95	87	167	149	181	167
Hund 4	152	66	110	65	83	96	82	116	162	176	147
Hund 5	184	70	61	71	74	74	74	128	159	185	202
Hund 6	140	27	48	46	16	18	70	87	181	183	190
Hund 7	104	34	11	19	29	17	55	72	46	89	160
Hund 8	239	73	57	67	71	75	90	76	189	194	228
Hund 9	202	69	69	68	78	77	108	136	201	200	192
Hund 10	215	42	31	59	41	51	77	107	191	208	213

Tabelle 22: AUC (Area under the Curve, 1U=10AU*min) mit 0,5mM Arachidonsäure als Induktor; Fett hervorgehobene Zahlen markieren eine ausreichende Thrombozytenaggregationshemmung.

Clopidogrel und ASPI

Zeitpunkt	0	6h	12h	24h	3d	4d	6d	8d	10d	12d	14d
Hund 1	100	47	31	47	41	58	60	85	79	103	89
Hund 2	100	37	50	31	55	67	61	86	149	151	112
Hund 3	100	33	27	38	39	52	47	91	81	98	91
Hund 4	100	43	72	43	54	63	53	76	107	116	97
Hund 5	100	38	33	39	40	40	40	70	86	101	110
Hund 6	100	19	34	33	11	13	50	62	129	131	136
Hund 7	100	33	11	18	28	16	52	69	44	86	154
Hund 8	100	31	24	28	30	31	38	32	79	81	95
Hund 9	100	34	34	34	39	38	53	67	100	99	95
Hund 10	100	20	14	27	19	24	36	50	89	97	99

Tabelle 23: AUC (Area under the Curve, 1U=10AU*min) in Prozent zum Ausgangswert mit 0,5mM Arachidonsäure als Induktor; Fett hervorgehobene Zahlen markieren eine ausreichende Thrombozytenaggregationshemmung.

Clopidogrel und ADP

Zeitpunkt	0	6h	12h	24h	3d	4d	6d	8d	10d	12d	14d
Hund 1	241	94	87	109	92	97	133	202	231	247	240
Hund 2	173	31	46	19	44	55	70	117	158	181	141
Hund 3	166	39	34	52	39	58	66	105	138	173	167
Hund 4	185	48	52	52	64	74	87	104	145	189	194
Hund 5	215	57	34	37	51	72	47	139	122	233	223
Hund 6	142	20	32	23	19	42	42	67	113	148	176
Hund 7	152	40	56	55	7	53	25	105	156	160	173
Hund 8	237	19	18	49	58	43	94	62	170	185	209
Hund 9	164	15	44	63	62	42	44	120	185	184	192
Hund 10	232	30	22	52	72	53	65	76	136	194	237

Abbildung 24: AUC (Area under the Curve, 1U=10AU*min) mit 0,5mM Arachidonsäure als Induktor; Fett hervorgehobene Zahlen markieren eine ausreichende Thrombozytenaggregationshemmung.

7.6 Thrombozytengranularität (MPC)

Ein sinkendes MPC (mean platelet component) beschreibt die Degranulation von aktivierten Thrombozyten. In der Studie wurde ebenfalls untersucht, ob die medikamentös ausgelöste Thrombozytenfunktionshemmung nach Behandlungsende eine verstärkte Thrombozytenaktivierung auslöst (Reboundeffekt). Dies lässt sich mit dem ADVIA 2120 über ein sinkendes MPC (vgl. Kapitel 7.3.1) nachweisen. Die Messwerte belegen eine unveränderte Thrombozytenaktivität vor, während und nach der ASS- oder Clopidogrel-

Phase.

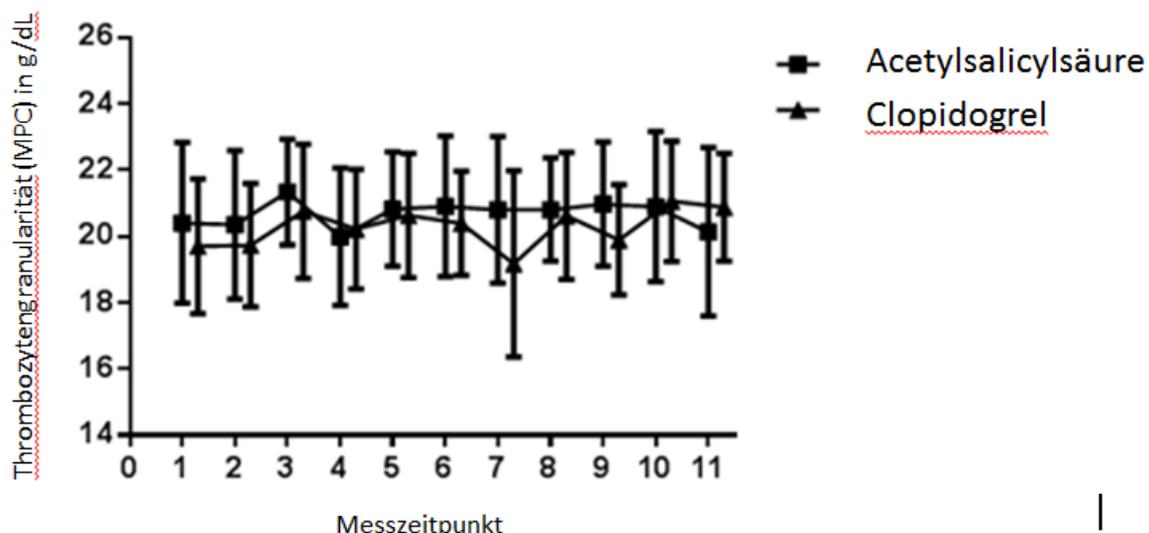


Abbildung 25: Thrombozytengranularität (MPC) in gramm/deciliter (g/dL) zu den verschiedenen Messzeitpunkten, gemessen vor der Medikamenteneingabe (1), nach 6 Stunden (2), 12h (3), 24h(4), Tag 3 (5), Tag 4 (6), Tag 8 (7), Tag 10 (8), Tag 12 (9), Tag 14 (10)

8 Diskussion

Die Thrombozytenfunktionshemmung ist sowohl in der Humanmedizin als auch in der Veterinärmedizin eine wichtige Zusatztherapie bei Erkrankungen mit erhöhtem Thromboserisiko (Mellett et al., 2011; Kitrell und Berkwitz, 2012b). Hierbei spielen Acetylsalicylsäure und Clopidogrel die wohl größte Rolle als Thrombozytenaggregationshemmer. Ob diese Substanzen zufriedenstellend wirken, wurde bisher jedoch nur in der Humanmedizin ausreichend überprüft (Pape et al., 2007).

In der vorliegenden Studie wurde daher untersucht, ob ASS oder Clopidogrel auch beim Hund ausreichend wirken und sich dies mittels Thrombozytenaggregometrie nachweisen lässt.

8.1 Magensaftresistenter Tablettenüberzug

Da es kein Acetylsalicylsäure Präparat gibt, das für den Einsatz in der Tiermedizin zugelassen ist, wurde Aspirin® protect 100mg (Bayer Healthcare) verwendet. Das Medikament wird in der Humanmedizin zur Verminderung eines Thromboserisikos eingesetzt. Die Tabletten sind mit einer magensaftresistenten Schicht überzogen (Bayer Healthcare), welche in dieser Studie während der Teilung zerstört wurde, um eine an das Gewicht der Hunde adaptierte Dosierung zu ermöglichen. Dies könnte die Resorptionsmenge des Wirkstoffes im Jejunum beeinflussen.

Ein Granulat wurde nicht eingesetzt, da die Studie sich an der veterinärmedizinischen Praxis orientierte und diese überprüfen wollte.

Auch das Clopidogrel Präparat Plavix® (Sanofi-Aventis) wurde aus oben genannten Gründen zerbrochen und so die magensaftresistente Schicht zerstört.

Eine eventuell aufgetretene teilweise Medikamentenzerstörung durch die Magensäure könnte ausschlaggebend für die schlechtere Wirkung von Acetylsalicylsäure sein, da die Tabletten in kleinere Portionen (ca. 1/10) aufgeteilt werden mussten als Clopidogrel (ca. 1/4). Eine Dosiserhöhung müsste dann bei beiden Arzneimitteln eine bessere Wirksamkeit zeigen.

Die Entfernung des Tablettenüberzugs könnte aber auch einen positiven Effekt auf die Geschwindigkeit und die Fähigkeit der Resorption haben. Ohne Hülle kann das Medikament eventuell schneller in den Blutkreislauf aufgenommen werden. In vorangegangenen Studien (Shearer L., 2009; Sharpe et al., 2010) der Veterinärmedizin wurde die verwendete Formulierung der Acetylsalicylsäure nicht erwähnt und dementsprechend auch nicht diskutiert. Deswegen ist eine Vergleichbarkeit mit diesen schwierig.

Dies zu ergründen bleibt weiteren Studien vorbehalten.

8.2 Medikamentengabe mit Futter

Die Medikamente wurden gemörsert, die richtige Menge auf einer Präzisionswaage abgewogen und in Papierschiffchen verbracht. Die richtige Dosierung auf den Papierschiffchen erhielten die Hunde mit jeweils einer halben Dose (ca. 200g) Nassfutter (Gastrointestinal, Royal Canin).

Die Magenentleerung bei Hunden hängt mit der Konsistenz und dem Energiegehalt der aufgenommenen Nahrung zusammen (Martinez und Papich, 2009): Bei Gabe eines Medikamentes in Pulverform oder mit magensaftresistenter Schicht überzogen, variierten die Zeiten bis zum Maximum des Plasmaspiegels deutlich. Während der Wirkstoff in Pulverform schon nach einer Stunde seinen maximalen Wirkspiegel erreichte, dauerte dies bei Tabletten mit Überzug über vier Stunden. Die Dauer der Magenentleerung und die Magenaktivität beeinflussen die Resorption von Stoffen erheblich (Martinez und Papich, 2009). Da es zu ASS und Clopidogrel keine Vergleichsstudien zur Resorption von Pulver und magensaftresistenten Tabletten gibt, bleibt die Frage offen, ob unter normalen, schwankenden Futterbedingungen mit kommerziellen Futtersorten aus dem normalen Einkaufsmarkt die Medikamente in vergleichbarer Weise resorbiert werden. Diese Interaktionen müssten in weiteren Studien geklärt werden.

8.3 Globaler Gerinnungstest mittels Thrombelastographie

Die TEG-Messungen wurden direkt vor sowie sechs und 24 Stunden nach der ersten Medikamenteneingabe durchgeführt. Am Ende der jeweiligen Messperiode (zwei Wochen) erfolgte eine Kontrollmessung. Zu den einzelnen Messzeiten zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in den Messwerten. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass das TEG einen Einfluss der Wirkstoffe auf die Hämostase nicht darstellen kann. Ob es bei höheren Dosen dazu im Stande wäre bleibt ungeklärt.

In der Humanmedizin werden Messungen standardmäßig mit Hilfe des Thrombelastogramms durchgeführt, bringen aber nicht so gute Ergebnisse bei der Therapie mit ASS oder Clopidogrel wie der VerifyNow Plättchenfunktionstest (Accumetrics, Sorrento) oder die Lichttransmissionsaggregometrie (Madsen et al., 2010).

In vorliegender Studie durchgeführte Messungen am Thrombelastograph mit Arachidonsäure (AA) wurden vorzeitig beendet, da es nach Gabe von Acetylsalicylsäure auch unter 20facher Überdosierung der Probe von AA zu keiner Gerinnung in der Messzelle kam. Die Messung der Thrombozytenfunktion mittels ADP nach Gabe von Clopidogrel wies auch bei einer höheren Dosis immer die gleiche, nicht aussagekräftige Kurve auf.

Mögliche Ursachen könnte eine zu niedrig gewählte Dosierung der Agonisten sein oder eine zeitweise Erwärmung bei potentielltem Stromausfall während der Lagerung der Proben im Kühlschrank. Eine falsche Handhabung des Gerätes oder der Reagenzien scheint ausgeschlossen, da auch Wiederholungsmessungen die gleichen Werte lieferten. Möglich ist auch, dass Hunde, anders als Menschen, nicht auf die Kombination dieses Induktors und der Messmethode ansprechen.

In einem Telefonat mit dem Hersteller der Agonisten und des TEG 5000 Gerätes konnten keine weiteren potentiellen Ursachen detektiert werden.

TEG-Messungen scheinen für die Fragestellung in dieser Studie keine geeignete Messmethode.

8.4 Vollblutaggregometrie mit Multiplate

Eine entscheidende Fragestellung in dieser Studie war, ob die Vollblutaggregometrie mit Multiplate (Dynabyte, München; jetzt: Roche, Mannheim) auch in der Tiermedizin zur Überprüfung der Wirksamkeit von Thrombozytenfunktionshemmern einsetzbar ist.

Bei Menschen wird die Vollblutaggregometrie bereits seit längerem erfolgreich eingesetzt (Mueller et al., 2007; Pape et al., 2007; Jámbor et al., 2009).

In der Veterinärmedizin existieren zwar Studien zur Wirksamkeit von Arzneimitteln mittels Vollblutaggregation bei Pferd (Roscher et al., 2015), Katze (ASS+Meloxicam) (Cathcart et al., 2012) und Hund (Meloxicam) (Fresno et al., 2005). Die Studie beim Pferd aus gleichem Hause wurde parallel mit vorliegender ausgearbeitet. Bei der Katze blieb eine Wirkung aus und beim Hund wurde kein antithrombotisches Medikament eingesetzt. Bei beiden Studien wurde der PFA-100 eingesetzt und sie waren nicht auf eine Verlaufskontrolle des Therapieerfolgs eines Antithrombotikums ausgelegt, was einen Vergleich schwierig macht.

Bereits 1999 verglichen Soloviev et al. die Messung verschiedener Thrombozyten (Mensch, Hund, Kalb) mit Hilfe eines Vollblutaggregometers (Chrono-Log lumi-aggregometer, Model 550) (Soloviev et al., 1999). In dieser Studie zeigte sich ein unterschiedliches Ansprechen der verschiedenen Spezies auf die verwendeten Aggregationsagonisten.

Sechzehn Jahre später sind Geräte wie das Chrono-Log Model 700 (Chrono-Log Corporation), der PFA 100 oder das Multiplate weitaus genauer in den Messungen und einfacher in der Bedienung. So ist teils auch kurz geschultes Personal in der Lage, die Messungen fehlerfrei durchzuführen. Durch die leicht zu bedienende Software und die an das Computersystem angeschlossene Präzisionspipette wird möglichen Bedienungsfehlern bereits vorgebeugt.

Das Gerät eignet sich für Kliniken und größeren Praxen die Wirksamkeit einer Antithrombolyse zu kontrollieren.

Im Rahmen dieser Studie war die Messung innerhalb einer halben Stunde möglich und die Durchführung funktionierte einwandfrei. Messungen in externen Großlabors scheinen wegen des engen Zeitfensters zwischen Blutentnahme und Auswertung, maximal drei Stunden, weniger sinnvoll. Zukünftige Studien müssen zeigen, inwiefern ein längerer Transport bei anderen Temperaturen oder durch Zugabe von Gerinnungshemmern möglich ist.

8.4.1 Agonisten

In bisherigen Studien wurden bereits verschiedene der hier verwendeten Agonisten genutzt, um eine Aussage über die Thrombozytenfunktion zu treffen. Jedoch lagen andere Fragen, wie eine wirksame Dosierung von Acetylsalicylsäure (Shearer L., 2009) oder eine aussagekräftige Konzentration der verwendeten Agonisten (Kalbantner et al., 2010; Sharpe et al., 2010) im Vordergrund.

Aus diesen Studien wurden die hier verwendeten Dosierungen übernommen. Alle beim Hund bisher eingesetzten Agonisten (Kollagen, Arachidonsäure, Adenosindiphosphat) wurden gleichzeitig verwendet und eine Kontrollmessung mit NaCl durchgeführt. Somit war auch eine Vergleichbarkeit der Agonisten möglich. Damit auch geringgradige Veränderungen der Thrombozytenfunktion nach Clopidogrel sichtbar werden, wurde Adenosindiphosphat Prostaglandin zugesetzt.

Außer bei Kollagen, gibt es bei allen verwendeten Agonisten (ASPI, ADP, PGE1) die Möglichkeit, sie portionsweise einzufrieren und nach Bedarf wieder aufzutauen. So bleiben die laufenden Kosten auch bei wenigen Messungen im Rahmen. Betrachtet man das Gesamtbild und die laufende Entwicklung in der Kleintiermedizin, so stellt das Multiplate durchaus ein Alltagsgerät zur Thrombozytenfunktionsdiagnostik dar.

8.4.1.1 Kollagen

Die vorliegende Studie zeigt, dass weder ASS noch Clopidogrel signifikant auf eine Kollagen Aktivierung ansprechen. Dies kann einerseits an der gewählten Dosierung von Kollagen liegen, andererseits aber auch an einer zu fokalen Wirkung von Kollagen auf den Thrombozyten bei Verwendung eines der beiden Funktionshemmer. Da Mischke et al. (Kalbantner et al., 2010) die hier verwendete Konzentration bei gesunden Hunden ohne Medikamenteneinfluss als ausreichend befanden, ist es wahrscheinlich, dass Kollagen kein aussagekräftiger Agonist ist, um eine Wirkung von ASS oder Clopidogrel nachzuweisen.

8.4.1.2 Arachidonsäure (ASPI)

Nur die Arachidonsäure wies eine signifikante Abnahme der AUC (Area under the Curve) bei ASS-Gabe auf, während die anderen Agonisten keinerlei signifikante Änderungen zeigten. Es sollte hier also nicht auf ASPI verzichtet werden. Allerdings bleibt zu berücksichtigen, dass keine Aussage darüber getroffen wird, ob die Hemmung der Thrombozyten auf Grund der

Dosis von ASPI detektiert werden kann. Dies würde bedeuten dass höhere Dosen der anderen Agonisten eventuell in der Lage wären, die Wirkung von ASS darzustellen.

Bei der Gabe von Clopidogrel kann ASPI ebenfalls eine Wirkung nachvollziehen, jedoch reagieren nicht alle Hunde genügend stark. So werden teils Low-Responder detektiert, welche bei der Messung mit ADP nicht auftauchen. Es sollte also solchen Fälle eine zusätzliche Messung erfolgen.

8.4.1.3 ADP und Prostaglandin E1

ADP alleine oder in Kombination mit Prostaglandin zeigte eine Hemmung der Thrombozytenfunktion bei allen Hunden während einer Clopidogrelgabe.

Obwohl die AUC bei zusätzlicher Gabe von Prostaglandin deutlicher sanken, als jene, bei welchen ausschließlich ADP verwendet wurde, waren beide gleichermaßen aussagekräftig. Die Ergebnisse belegen, dass sich die Wirkung von Clopidogrel unter Zusatz von ADP gut messen lässt. Auch Hunde, welche bei der Messung mit ASPI nicht gewünscht reagieren, können so gefunden werden. Hier ist dann zu prüfen, ob eine Dosiserhöhung sinnvoll ist, da diese Tiere als eventuelle Low-Responder weniger stark zureagieren scheinen.

Eine Kombination mit Prostaglandin scheint nicht zwingend notwendig, um die Thrombozytenfunktionshemmung von Clopidogrel nachzuweisen. Zur Kontrolle von grenzwertigen Messungen kann es jedoch sinnvoll sein, zusätzlich Prostaglandin einzusetzen.

8.5 Non-Responder, Low-Responder

Deckend mit Literatur aus Humanmedizin (Cattaneo, 2004; Neubauer et al., 2011; Ibrahim et al., 2012; Salama et al., 2012) und Veterinärmedizin (Sharpe et al., 2010) finden sich auch in dieser Studie Non-Responder bei der Gabe von Acetylsalicylsäure.

Unter Clopidogreltherapie gibt es zwar Non-Responder (Neubauer et al., 2011; Ibrahim et al., 2012), und Low-Responder (Asher et al., 2014) in der Humanmedizin, veterinärmedizinisch wurden bisher jedoch nur beim Pferd Resistenzen auf die Gabe von Clopidogrel nachgewiesen (Brooks et al., 2013).

Low-Responder (20%) unter einer Therapie mit Clopidogrel zeigen sich nur, sofern man Arachidonsäure als Induktor verwendet. Dies zeigt dass ASPI zwar geeignet ist als Agonist, jedoch nicht spezifisch bei der Gabe von Clopidogrel.

8.5.1 ASS

Übereinstimmend mit bereits bestehender veterinärmedizinischer Literatur von Sharpe et al. in welcher 30% der 18 Hunde nicht auf eine Dosis von 0,5mg/kg ASS ansprachen (Sharpe et al., 2010), reagieren hier sogar 50% der Probanden nicht auf eine Dosis von 1mg/kg ASS.

Wo die Gründe hierfür liegen ist bisher unbekannt. In der Humanmedizin (Cattaneo, 2004; Svenstrup Poulsen et al., 2005; Salama et al., 2012) werden eine verminderte Resorption, genetische Polymorphismen oder erhöhte COX-Expressionen diskutiert, aber auch eine schlechte Compliance der Patienten.

Beim Hund wurde ebenfalls eine Erhöhung der Expression der Cyclooxygenase-1 angenommen und untersucht (Thomason et al., 2011). Dieser Ansatz wurde jedoch im Jahr 2013 bereits von der gleichen Arbeitsgruppe widerlegt (A. Dudley et al., 2013). Sie fanden trotz einer Erhöhung der COX-Expression bei Hunden eine ausreichende Thrombozytenfunktionshemmung durch ASS. Wie auch in der Humanmedizin sind bei Tieren eine unterschiedliche Resorption im Darm, eine gastrale Zerstörung des Wirkstoffes oder genetische Polymorphismen denkbar.

Auf Grund der Schwere der Erkrankungen, welche mit einer Hyperkoagulabilität einhergehen, ist eine sichere Thrombozytenfunktionshemmung unerlässlich.

Wegen des hohen Prozentsatzes von Non-Respondern muss eine entsprechende Erfolgskontrolle stattfinden, um die Wirkung zu gewährleisten. Diese kann mit dem hier verwendeten Multiplate oder jedem anderen Vollblutaggregationsmessgerät erfolgen. Eine initiale Messung für einen Grundwert der Blutgerinnung ist sinnvoll.

Falls eine insuffiziente Wirkung vorliegt, sollte auf eine Alternative wie Clopidogrel umgestiegen, oder zusätzlich eingesetzt werden.

Der Einsatz von ASS ohne mögliche Erfolgskontrolle sollte kritisch hinterfragt werden.

Da während der Studie kein zusätzliches Blut asserviert wurde, um die Blutplasmaspiegel der verwendeten Arzneimittel nachzuvollziehen, kann über die Ätiologie der Non-Responder nur spekuliert werden.

8.5.2 Clopidogrel

Durch Zugabe des Agonisten ADP zeigten alle Hunde eine ausreichende Thrombozytenfunktionshemmung. Mittels PGE1 waren die Werte sogar noch aussagekräftiger.

Die Messung mit ASPI senkte die AUC bei zwei Hunden weniger (< 67%) als bei den Anderen (<52%). Ein Hund zeigte eine Erhöhung (>57%) der Thrombozytenfunktion bereits an Tag 4 der Messungen.

Ein schlechteres Ansprechen auf Clopidogrel wird auch in der Humanmedizin diskutiert (Asher et al., 2014). Veterinärmedizinisch wurden Low-Responder bisher nicht diskutiert.

Bei Hund 4 kam es zu einem kurzzeitigen Funktionsanstieg nach 12 Stunden. Die nächste Messung war allerdings wieder in der Norm. Hier liegt eine Fehlmessung nahe. Da aber keine

Blutproben asserviert wurden, kann keine Auflösung erfolgen. Auch ein kurzzeitiger Rebound-Effekt wäre möglich, jedoch kann dieser nicht bewiesen werden.

Wieso die Aggregation bei einem Hund schon an Tag vier wieder ansteigt, kann bedingt sein durch eine schlechtere Resorption, veränderter Magenentleerung (Martinez und Papich, 2009), akuter subklinischer Erkrankung oder noch nicht erforschter Faktoren. Eine Auflösung bedarf größerer Studien mit mehr Probanden, um auch eine Fehlmessung auszuschließen.

Insgesamt lässt sich sagen, dass Low-Responder wohl durch Zugabe von falschen Agonisten zustande kommen können. Deshalb sollte bei einer solchen Fragestellung nicht nur auf einen einzelnen Induktor zurückgegriffen werden.

8.6 Thrombozytenfunktionshemmer beim Hund

8.6.1 ASS

ASS ist das wohl am häufigsten eingesetzte Medikament zur Thrombozytenfunktionshemmung, sowohl beim Mensch als auch beim Tier. Ihr Wirkmechanismus ist seit über 100 Jahren bekannt. Die Substanz ist sicher, wirksam, billig und weltweit verfügbar (Vane und Botting, 2003).

Die verwendeten Arzneimittel stammen aus der Humanmedizin und sind deshalb an den Mensch und dessen Gewicht angepasst. Da die Tabletten also nicht geteilt werden müssen, kann eine magensaftresistente Schicht verwendet werden. Das Medikament ist so besser verträglich und die Nebenwirkungen geringer. (Bayer Healthcare).

Grundlage der, in dieser Studie, verwendeten Dosierung ist eine möglichst geringe Dosierung, um die Nebenwirkungen gering zu halten. Dennoch muss sie hoch genug sein, um eine Thrombozytenfunktionshemmung herbeizuführen.

In veterinärmedizinischen Studien reichen die wirksamen ASS Konzentrationen von 0,5mg/kg (Sharpe et al., 2010), über 1mg/kg oder 2mg/kg (Shearer L., 2009), 3,5mg/kg/12h (Grauer et al., 1992) bis hin zu 10mg/kg (Shearer L., 2009). Sharpe et al. konnten bei 6 von 18 Hunden keine Wirksamkeit von 0,5mg/kg ASS nachweisen. Auch Shearer et al. befanden die Dosis von 0,5mg/kg Aspirin als nicht ausreichend bei sechs untersuchten, gesunden Hunden, wohingegen 1mg/kg die niedrigste Dosierung für eine suffiziente Wirkung war. Deshalb wurde in vorliegender Studie eine Konzentration von 1mg/kg Erhaltungsdosis nach Shearer et al. verwendet. Eine Loading Dose von Acetylsalicylsäure ist nach Literaturrecherche des Autors bisher nur in der Humanmedizin eingesetzt worden (Neubauer et al., 2011).

Auf Grund einer humanmedizinischen Studie aus dem Jahr 2001 (Müller, 2001) führte jedoch der Einsatz einer Loading Dose Clopidogrel (600mg) zu einem signifikant schnelleren Wirkungseintritt. Außerdem hielt die Wirkung bei Gabe der doppelten Dosis über 48

Stunden an, während sie bei der normalen Dosierung von 300mg nach dieser Zeit ausblieb. Da keine Zwischenmessungen durchgeführt wurden, ist die tatsächliche Dauer der Wirkung nicht nachzuvollziehen (Müller, 2001).

Wegen dieser Ergebnisse wurde in vorliegender Studie eine Loading Dose von ASS verwendet. Ohne Kontrollgruppe kann aber nicht verifiziert werden, ob es einen Unterschied in Bezug auf Wirkungsweise oder Wirkungsdauer zu einer niedrigeren Anfangsdosis gibt.

Da thrombozytenhemmende Medikamente vor allem bei schwerwiegenden Erkrankungen eingesetzt werden, ist ein schneller Wirkungseintritt wichtig. Eine höhere Anfangsdosis wie bereits in der Humanmedizin beschrieben (Müller, 2001) erscheint also sinnvoll, um dies zu erreichen. Weitere Studien mit dem Hauptaugenmerk auf die Loading Dose von ASS sind nötig, um verschiedene Schemata und Zeitintervalle zu vergleichen.

8.6.2 Clopidogrel

Das seit einiger Zeit immer häufiger verwendete Präparat zur Thrombozytenfunktionsinhibition neben der ASS in der Veterinärmedizin ist Plavix®. Der enthaltene Wirkstoff Clopidogrel gehört zu den Thienopyridinen und blockiert den P2Y12 Rezeptor.

In dieser Studie wurde nach einer Loading Dose von 10mg/kg Clopidogrel eine Erhaltungsdosis von 2mg/kg verabreicht. Die Erhaltungsdosis orientiert sich an bereits veröffentlichten Studien beim Hund (Müller, 2001; Mellett et al., 2011). Beide Studien überprüften die Wirksamkeit ihrer Dosierung nicht mit einem Thrombozytenfunktionstest, sondern legten nur Wert auf die Mortalität.

Goodwin et al. definierten die Wirkung von Clopidogrel bei Hunden als erwiesen, wenn sich die Schleimhautblutungszeit verlängert. Dies trat ab einer Dosis von 4mg/kg auf (JC Goodwin, 2007).

Dies ist nicht Ziel der vorliegenden Studie. Deshalb wurde eine Dosis von 2mg/kg nicht überschritten. Ein positives Ansprechen auf diese Dosierung wurde allen Probanden erreicht, ohne dass Nebenwirkungen auftraten.

Wie bei ASS wurde in dieser Studie auch bei Clopidogrel eine initial höhere Dosis eingesetzt, um den Wirkungseintritt zu beschleunigen.

In der Veterinärmedizin wurde schon bei Hunden (JC Goodwin, 2007) und Pferden (Brooks et al., 2013; Roscher et al., 2015) eine Loading Dose vor der Erhaltungsdosis verwendet. Goodwin et al. verwendeten 10mg/kg Loading Dose bei sechs Hunden mit anschließend 1, 2 oder 3mg/kg Erhaltungsdosis. Allerdings wies erst die Dosis von 3mg/kg eine Inhibition der Thrombozyten auf. Gemessen wurde mittels BMBT und Thrombozytenaggregation in Vollblut mit dem Induktor Kollagen. Bei Brooks et al. zeigten sich 2 Non-Responder bei 12 Pferden, gemessen mit dem Platelet Function Analyzer und ADP, bzw. Kollagen als Induktor

(Brooks et al., 2013). Die Studie von Roscher et al. zeigte eine erfolgreiche Inhibition der Thrombozyten mit Clopidogrel in einer Loading Dose von 6-6,5mg/kg und einer Erhaltungsdosis von 1,2-1,4mg/kg über 4 Tage bei 10 Pferden (Roscher et al., 2015).

Auch in der Humanmedizin werden höhere Anfangsdosen verabreicht mit folgender Erhaltungsdosis. Ein Beispiel ist die Studie von Müller et al.: Bei 600mg statt der allgemein üblichen 300mg Plavix® Loading Dose, trat die Wirkung statt nach sechs bereits nach vier Stunden ein. Und bei 900mg Loading Dose war der Wirkeintritt bereits nach zwei Stunden erreicht.

Vorliegende Studie verwendete Clopidogrel in einer Anfangsdosis von 10mg/kg mit einer Erhaltungsdosis von 2mg/kg. Hiermit konnte ein gutes Ansprechen erreicht werden.

Insgesamt ist Clopidogrel auf Grund der besseren Wirksamkeit und der längeren Wirkdauer das sicherere Medikament zur Thrombozytenfunktionshemmung.

Da bisher sehr wenige Studien zur Wirksamkeit von Clopidogrel beim Tier existieren, müssen weitere, und größere Untersuchungen mit genauem Augenmerk nur auf den Wirkstoff Clopidogrel Aufschluss darüber geben, inwieweit dies ein sicherer Hemmer der Thrombozytenfunktion ist.

Die Erkrankungen (siehe 6.3), bei denen Clopidogrel in der Tiermedizin eingesetzt wird, haben meist ein hohes Thromboserisiko. Eine rasche Thrombozytenaggregationshemmung ist daher wünschenswert und kann die Mortalität entscheidend beeinflussen. Wegen der fehlenden Kontrollgruppe in dieser Studie, kann auch hier keine definitive Aussage getroffen werden inwieweit die erhöhte Dosis zu Beginn einen Vorteil bringt.

8.7 Dauer der Medikamentenwirkung

Vorliegende Studie beschreibt eine unterschiedliche Wirkdauer von ASS und Clopidogrel. Während die Dauer der Thrombozytenhemmung bei Acetylsalicylsäure nicht über 24 Stunden nach der initialen Loading Dose hinausgeht, bleibt die Aggregation unter Clopidogrel bei sechs Hunden für zwei Tage nach der letzten Gabe gehemmt bevor die Thrombozytenfunktion wieder ansteigt. Drei Hunde zeigen sogar eine anhaltende Wirkung über vier Tage. Bei Hund 1 setzt schon an Tag Vier wieder eine Gerinnung ein.

8.7.1 ASS

Die vorliegenden Ergebnisse lassen vermuten, dass bei ASS nur die Anfangsdosis von 10mg/kg zu einer ausreichenden Thrombozytenhemmung führt, während die Erhaltungsdosis von 1mg/kg, im Gegensatz zu den Ergebnissen von Shearer et al. (Shearer L., 2009) keinen weiteren Therapieerfolg bringt. Grund für die unterschiedlichen Ergebnisse könnte sein, dass Shearer et al. die Messungen mit optischer Aggregometrie in plättchenreichem Plasma durchgeführt haben.

Weiterhin entspricht die Dauer bis zur Normalisierung der Blutgerinnung (2-4 Tage nach letzter Medikamentengabe) nicht der Lebensspanne eines Thrombozyten, was eine Gegenregulation oder eine erhöhte Abgabe von neuen Thrombozyten aus dem Knochenmark vermuten lässt.

8.7.2 Clopidogrel

Die Wirkung von Clopidogrel in der Erhaltungsdosis von 2mg/kg hält zu 90% über 48 Stunden nach der Medikamentengabe an. Wenn also die Tabletteneingabe einmalig vergessen wird, oder die Aufnahme durch andere Umstände nicht erfolgreich ist (Vomitus, Diarrhoe), scheint das den therapeutischen Erfolg nicht zu beeinflussen. Drei Hunde zeigen unter dieser Dosis bereits eine noch längere Wirkdauer. Ob diese durch eine Erhöhung von Clopidogrel verlängert werden kann, müssen weitere Studien überprüfen.

Zwei Hunde haben bei der Messung mit Arachidonsäure zwölf Stunden nach der initialen Gabe von Clopidogrel einen kurzen Anstieg der Aggregation (Hund 2 = 50%, Hund 4 = 72% der AUC vor Behandlung). Nachfolgende Werte sind wieder niedriger. Diese beiden Hunde scheinen als Low-Responder eine Gegenregulation zu durchlaufen. Bei der Messung mit ADP erscheinen diese Hunde nicht.

Auf Grund der Kürze und des Aufbaus der Studie bleibt unklar, ob die Thrombozytenfunktionshemmung durch gesteigerte Thrombopoese vermindert wird oder vorhandene und funktionsfähige Thrombozyten aus dem Körperkreislauf ihre Aktivität steigern. Auch die Genese, und ob eine Dosiserhöhung die Low-Responder beeinflussen könnte, bleibt weitestgehend ungeklärt wie in 10.4.2 diskutiert.

8.8 Wechselwirkungen

Vorliegende Studie verwendet die zu untersuchenden Thrombozytenfunktionshemmer jeweils einzeln und ohne zusätzliche Medikamente.

Alle Probanden waren gesund.

Zur Thromboseprophylaxe kommen die Wirkstoffe jedoch bei Erkrankungen zum Einsatz, die die Gabe zusätzlicher Medikamente erforderlich macht. In diesen Fällen müssen die potentiellen Wechselwirkungen von Thrombozytenaggregationshemmern mit anderen Wirkstoffen berücksichtigt werden.

Aus der Humanmedizin bekannte Wechselwirkungen bei ASS sind gastrointestinale Blutungen bei gleichzeitiger Einnahme von Kortison oder ein gesenkter Blutzuckerspiegel durch zusätzliche Antidiabetika (Bayer Healthcare). Auch Protonenpumpeninhibitoren (PPI) vermindern die Hemmung der Thrombozyten durch ASS (Wurtz et al., 2010).

Clopidogrel weist Wechselwirkungen mit Esomeprazol (S-Isomer von Omeprazol) auf, während Pantoprazol keinen Einfluss hatte (Kwok und Loke, 2012). Mocerì et al. fanden eine

Normalisierung der Thrombozytenhemmung durch eine gleichzeitige Verdopplung der Dosis von Clopidogrel, wenn es zusammen mit Omeprazol verabreicht wird (Moceri et al., 2011).

Inwieweit diese Interaktionen auch bei Hunden auftreten, ist bisher nicht untersucht worden. Daher sollte, bis neue Erkenntnisse vorliegen, während einer Therapie mit ASS oder Clopidogrel auf PPI verzichtet werden

Menschen mit Diabetes Typ 2 sprechen schlechter auf die Hemmung der Thrombozyten an. Bei dieser Erkrankung scheint eine höhere Thrombozytenaktivität vorzuliegen (Mortensen et al., 2010).

Eine weitere Studie zeigte eine Korrelation der Thrombozytenaktivität mit dem, auf akute Entzündungsreaktionen hinweisenden C-reaktiven Protein, wodurch Thrombozytenfunktionshemmer geringere Wirkung zeigen könnten (Bernlochner et al., 2010).

Der Einsatz von ASS oder Clopidogrel spielt vor allem bei komplexen und schwerwiegenden Erkrankungen eine entscheidende Rolle für den Patienten. Deshalb sollten Untersuchungen an kranken Hunden durchgeführt werden, um die Wechselwirkungen mit den verschiedenen, eingesetzten Medikamenten zu untersuchen, und deren Wirksamkeit im jeweiligen Einsatzgebiet nachzuvollziehen.

8.9 Grenzen der Studie

Die Studie belegt bei gesunden Hunden eine Wirkung von ASS und Clopidogrel auf die Thrombozytenhemmung. Die Wirksamkeit lässt sich mit dem Vollblutimpedanzaggregometer Multiplate unter Zusatz bestimmter Agonisten nachweisen.

Einige Fragen bleiben jedoch offen: Die geringe Probandenzahl (10) erlaubt keine exakte Bestimmung von Low- beziehungsweise Non-Respondern. Auch die richtige Dosierung der beiden Medikamente bedarf einer Überprüfung. Eine höhere Loading Dose von ASS und höhere Erhaltungsdosen bei beiden Arzneimitteln könnten zu einem besseren Ansprechen, allerdings auch zu Nebenwirkungen führen.

Wegen der nicht gemessenen Blutplasmaspiegel der Medikamente bleibt auch die Frage der Genese von Non-, beziehungsweise Low-Respondern unklar.

Da hier nur eine Funktionsüberprüfung der Thrombozyten erfolgte, muss der klinische Einfluss der verwendeten Medikamente auf die gesamte Blutgerinnung in vivo überprüft werden.

Die Studie erfolgte an gesunden Hunden. Somit bleibt ebenfalls offen, ob bei kranken Tieren, die weitere Medikamente einnehmen müssen, die Wirkung der hier eingesetzten Thrombozytenaggregationshemmer beeinträchtigt wird.

Es wäre wünschenswert, wenn sich Folgestudien den einzelnen Fragestellungen annehmen und die Ergebnisse dieser Studie bestätigen könnten.

9 Schlussfolgerung

Die Studie konnte zeigen, dass Acetylsalicylsäure bei 50%, Clopidogrel aber bei allen Probanden die Thrombozytenaggregation wirksam hemmt. Die Loading Dose (10mg/kg) von ASS reichte aus, während die Erhaltungsdosis von 1mg/kg nicht hoch genug war die Blutgerinnung effektiv zu hemmen.

Die initiale Dosis von Clopidogrel (10mg/kg) zeigte genauso eine Wirkung wie auch die Erhaltungsdosis (2mg/kg). Jedoch wies die Messung mit ASPI Low-Responder auf, welche ADP aber als normal ansprechende Probanden deklarierte. Somit ist eine zusätzliche Messung mit ADP sinnvoll, sofern die Messwerte bei der Verwendung des Induktors ASPI im Grenzbereich liegen.

Eine Funktionsüberprüfung zu Beginn, sowie eine regelmäßige und engmaschige Therapiekontrolle ist unerlässlich. Bei stabilem Ansprechen können die Kontrollintervalle sukzessive verlängert werden. Diese Messabstände einzuschätzen obliegt weiteren und größer angelegten Studien. Das Multiplate (Roche, Mannheim) als Vollblutimpedanzaggregometriegerät eignet sich zur Messung, während die Thrombelastographie nicht sensibel genug ist.

Die Vollblutaggregometrie sollte bei Gabe von ASS mit dem Agonisten ASPI erfolgen. Die Wirkung von Clopidogrel kann zwar mit ASPI nachgewiesen werden, sollte in Grenzfällen aber mit ADP kontrolliert werden. Ob diese Patienten im Grenzbereich direkt eine höhere Dosis erhalten sollten, ist abzuwägen.

Kollagen ist kein genügend sensibler Agonist.

10 Zusammenfassung

Das Risiko von Thromboembolien verschlechtert bei vielen Erkrankungen der Endokrinologie, des Herz-Kreislauf-Systems und bei septischen Prozessen des Hundes deren Prognose.

Die Behandlung mit einem Thrombozytenaggregationshemmer kann diesem Risiko entgegenwirken und wird, während in der Humanmedizin schon Standardtherapie, zunehmend auch in der Veterinärmedizin eingesetzt. Die Wirkung solcher Substanzen in der Tiermedizin ist bisher kaum untersucht.

Die vorliegende Studie hat daher überprüft, ob Acetylsalicylsäure beziehungsweise Clopidogrel bei Hunden die Thrombozytenfunktion ausreichend hemmen. Die Wirksamkeit der beiden Präparate wurde mit der Vollblutaggregometrie ermittelt.

Die prospektive Studie (TVA GI 18/17 Nr. 95/2011) wurde mit zehn gesunden, erwachsenen Beaglehunden der Justus Liebig Universität Gießen durchgeführt. An Tag 1 bekamen die Hunde jeweils eine 10mg/kg Loading Dose ASS oder Clopidogrel, an den Tagen 2-4 entweder 1mg/kg ASS beziehungsweise 2 mg/kg Clopidogrel. Die Medikamente wurden oral mit Nassfutter verabreicht.

Blutentnahmen an der Vena jugularis erfolgten direkt vor Medikamentengabe sowie 6h, 12h und 24h nach der initialen Loading Dose, danach bis zum 4. Tag einmal täglich und anschließend bis zum Tag 14 jeden 2. Tag. Vor der ersten Medikamentengabe, nach 4 Tagen und nach 14 Tagen wurde eine blutchemische Untersuchung (PENTRA 400, Axonlab, Reichenbach/Stuttgart) durchgeführt. Das Blut wurde hämatologisch, inklusive Thrombozytenindizes, untersucht und eine Retikulozytenzählung am ADVIA 2120 (Siemens Healthcare Diagnostics, Eschborn) durchgeführt.

Die Thrombozytenfunktion wurde mit Vollblutaggregation (Multiplate, Roche Diagnostik GmbH, Mannheim) unter Zusatz eines Agonisten – (Arachidonsäure 0,5mM (ASPI), Adenosindiphosphat 6,5µl (ADP), Kollagen 3,2µl (COL) oder Prostaglandin 9,4nM (PG) + ADP 6,5µl – analysiert. Eine Kaolin-aktivierte Thrombelastographie (TEG) erfolgte vor sowie 6h und 24h nach der Loading Dose und an Tag 14 zum Ende der jeweiligen Messperiode.

Für die statistische Auswertung wurde ein Test auf Normalverteilung mittels Q-Q-Plot und anschließend eine 2-faktorielle Varianzanalyse mit Messwiederholung durchgeführt. Die Analyse erfolgte durch die Arbeitsgemeinschaft Biomathematik und Datenverarbeitung an der Justus Liebig Universität unter Leitung von Dr. rer. Nat. Dipl. Math. Klaus Failing. Die Ergebnisgrafiken wurden mit dem Computerprogramm GraphPad Prism 6 erstellt. Die TEG-Messungen wurden log-transformiert und mit einem Signifikanz-Test festgelegter Daten mit Kovarianten ausgewertet. Das Signifikanzniveau betrug $p < 0,05$.

In der vorliegenden Studie waren die Ergebnisse des Multiplate aussagekräftig. Die Messwerte wurden als Fläche unter der Kurve (AUC) angegeben, andere Parameter wie die Rotationsgeschwindigkeit oder die Aggregation zeigten ähnlich gute Ergebnisse.

Kein Hund zeigte im Studienzeitraum klinische Anzeichen einer Unverträglichkeit auf die Medikamente.

Die initiale Dosis von 10mg/kg ASS führte bei 5/10 (50%) der Probanden zu einer ausreichenden Inaktivierung ($P_{AUC} < 0,0001$) der Thrombozyten (> 48% Reduktion der AUC zum Ausgangswert). Die folgende Erhaltungsdosis von 1mg/kg konnte dagegen nur bei einem Hund die Blutgerinnung über die gesamte Behandlungsdauer (4 Tage) erfolgreich hemmen. Die verbleibenden vier Hunde zeigten nur bis 24 Stunden nach Therapiebeginn eine genügende Hemmung der Thrombozytenfunktion. Bei der nächsten Messung, einen Tag später, waren die Werte wieder normal.

Clopidogrel wies bei allen Probanden eine ausreichende Hemmung ($P_{AUC} < 0,0001$) über den gesamten Behandlungszeitraum auf. Eine erneute Zunahme der Thrombozytenfunktion fand bei einem Hund bereits drei Tage nach der ersten Gabe statt, während sie bei sechs Probanden an Tag 6 erfolgte. Drei Hunde zeigten eine Wirkung über acht Tage .

Die Verwendung von Kollagen als Agonist für das Multiplate zeigte keine signifikante Änderung der AUC im Vergleich zur Ausgangsmessung vor der Medikamentengabe ($P_{AUC} = 0,8242$), weder bei ASS noch bei Clopidogrel. ASPI (Arachidonsäure) hingegen reduzierte bei beiden Thrombozytenaggregationshemmern die AUC ($P_{AUC} < 0,0001$) signifikant und eignet sich somit zur Funktionsüberprüfung der eingesetzten Medikamente. Die Arachidonsäure war der einzige der verwendeten Agonisten, der die Hemmung der Thrombozytenfunktion sowohl bei ASS als auch bei Clopidogrel darstellen konnte. Jedoch sind Hunde im Grenzbereich mittels einer ADP-Messung zu überprüfen.

ADP zeigte in der vorliegenden Studie nur bei der Verwendung des Inhibitors des Glykoprotein 2b3a-Rezeptorkomplexes eine Erniedrigung der AUC, während bei der Gabe von Acetylsalicylsäure keine signifikanten Unterschiede zu erkennen waren. Setzt man nur Clopidogrel ein, sollte besser ADP zur Verlaufskontrolle der Therapie verwendet werden. Auch ist hier eine Zugabe von Prostaglandin E1 möglich. Durch die so sensibilisierte Messung können auch Patienten ermittelt werden, welche zwar noch auf die Therapie ansprechen, bei denen eine Anpassung der Dosis jedoch zu erwägen ist, um weiterhin eine sichere Arzneimittelwirkung zu gewährleisten.

Weder die Thrombozytendichte (MPC), noch die Anzahl der Thrombozyten änderte sich im Studienverlauf. Dies schließt eine starke Aktivierung oder einen Verlust von Thrombozyten durch die Studienmedikation aus.

Die anfängliche TEG-Messung mit den Agonisten ASPI bzw. ADP wurde im Verlauf der Studie vorzeitig beendet, da sich die Werte auch unter ansteigender Dosierung der Agonisten nicht änderten.

In Übereinstimmung mit der Literatur (Sharpe et al., 2010) fanden sich bei der ASS-Therapie Non-Responder beim Hund, weshalb eine Therapiekontrolle, zum Beispiel mittels Vollblutimpedanzaggregometrie empfohlen wird. Weitere Studien müssen klären, ob eine höhere ASS Dosis die Zahl der Non-Responder reduzieren kann. Die hier verwendete Erhaltungsdosis von 1mg/kg erscheint auf Grund der vorliegenden Ergebnisse zu gering.

Eine initiale Loading Dose Clopidogrel mit nachfolgender Erhaltung zur Thrombozytenfunktionsinhibition führte in dieser Studie bei allen Probanden zu einer ausreichenden Hemmung der Thrombozytenfunktion. Eine Therapiekontrolle ist jedoch auch hier sinnvoll, da mittels ASPI Low-Responder nachgewiesen wurden. Diese sollten genau beobachtet und engmaschig kontrolliert werden.

Weitere Studien an erkrankten Hunden mit erhöhtem Thromboserisiko sollten folgen, um die Ergebnisse dieser Studie zu überprüfen, und neue Erkenntnisse hinzuzugewinnen.

11 Summary

The thromboembolic risk worsens the outcome in many endocrinologic and cardiovascular diseases as well as in septic processes in dogs.

Platelet aggregation inhibitors can counteract this danger and, meanwhile standard therapy in humans, are more and more used in veterinary medicine. But the real impact of such substances is hardly examined.

This study has verified the platelet inhibiting effect of acetylsalicylic acid (ASA) and clopidogrel in dogs. The effectiveness of both the compounds has been investigated in form of whole blood aggregometry.

The prospective study (TVA GI 18/17 Nr. 95/2011) was carried out with 10 healthy, adult beagle dogs of the Justus Liebig University in Giessen. The dogs each got an initial dose of 10mg/kg ASA or 10mg/kg clopidogrel, on day 2-4 they were feeded 1mg/kg ASA, respectively 2mg/kg clopidogrel orally with canned food.

Blood was taken out of the vena jugularis before, 6h, 12h and 24h after the initial loading dose followed by daily blood withdrawal up to day 4 and afterwards every second day to day 14. Before first drug intake, 4 days and 14 days after, a blood chemistry (Pentra 400; Axonlab, Reichenbach/Stuttgart) was carried out. There was also a hematologic examination (ADVIA 2120; Siemens Healthcare Diagnostics, Eschborn) including platelet indices and reticulocyte counting.

The platelet function was analyzed by means of whole blood impedance aggregometry (Multiplate; Roche Diagnostik GmbH, Eschborn) with different agonists - arachidonic acid

0,5mM (ASPI), adonosindiphosphate 6,5µl (ADP), collagen 3,2µl (Col) or prostaglandine 9,4nM (PG) + ADP 6,5µl in addition. A kaolin-activated thrombelastography (TEG) took place before, 6h and 24h after the loading dose and on day 14 at the end of the particular measuring period.

Statistical analysis was performed with a test for normal distribution with Q-Q plot and afterwards a two-way repeated measures analysis of variance by chair of mathematics at Justus Liebig University, Giessen under the direction of Dr. Klaus Failing. The result graphics were established with the computer program Graph Pad Prism 6. The TEG-measurements were log transformed and evaluated by a test of significance with fixed data. The level of significance was $P < 0,05$.

The results in this study were significant. The measured values are declared as area under the curve (AUC), other parameters like rotation speed or aggregation showed similar findings.

No dog showed any clinical signs of drug intolerance.

The initial dose of 10mg/kg ASA leads to an adequate platelet inhibition ($P_{AUC} < 0,0001$) in 5/10 (50%) probands (<48% AUC-reduction of initial value). Otherwise the following maintenance dose of 1mg/kg could hinder platelet activity in only one dog for the whole treatment duration (4 days). The remaining four dogs showed a sufficient inhibition of platelet aggregation for 24 hours after initial medical intake. At the next measurement one day after the values were normal again.

Clopidogrel achieved an adequate platelet inactivation ($P < 0,0001$) during the whole period of treatment. One dog showed re-increasing platelet function already 3 days after initial treatment, while it occurred on day 6 in six subjects. Three dogs made an impact for 8 days.

The agonist collagen had no significant changes in AUC in comparison to initial values before medical treatment ($PAUC = 0,8242$) neither with ASA nor with Clopidogrel. ASPI on the other hand reduced AUC significantly ($P < 0,0001$) in both platelet aggregation inhibitors and therefor suits for checking efficacy of the applied drugs. The arachidonic acid was the only used agonist which could detect inhibition of platelet function with ASA as well as with clopidogrel. However dogs in threshold range should be reviewed by ADP.

In present study, ADP showed a decrease of AUC only in using the inhibitor of Glycoprotein 2b3a-receptor complex, while with ASA there was no considerably difference. If you use clopidogrel alone, ADP is the best agonist for controlling therapy development. The addition of prostaglandin E1 is possible here for sensing patients, which still respond on therapy but perhaps need dose adjustments for ensuring the drug effect.

Neither the mean platelet component, nor the platelet count differed during study progress. This suspends a strong activation or a loss of platelets because of the used medication.

The initial TEG measurement with the agonists ASPI and ADP were aborted, because the values did not differ even under increasing dosage.

In accordance with other literature (Sharpe et al., 2010) ASA-therapy in dogs showed Non-Responder for which reason therapy monitoring is recommended, for example by using whole blood impedance aggregometry. Further studies have to clarify, if a higher dose of ASA can reduce the number of these. The maintenance dose of 1mg/kg in this study appears too small due to the results.

The Loading Dose (10mg/kg) of clopidogrel with a maintenance dose of 2mg/kg leads to a sufficient inhibition of platelet function in all subjects of the present study. However a therapy monitoring is useful, because Low-Responder were detected in using the agonist ASPI. These should be checked closely controlled frequently.

Further studies in sick dogs with increased risk of thrombosis should follow for recheck the results of this study and obtain new knowledge.

12 Literatur

A. Dudley, Thomason J, Fritz S, Grady J, Stokes J, Wills R, Pinchuk L, Mackin A, Lunsford K (2013): Cyclooxygenase Expression and Platelet Function in Healthy Dogs Receiving Low-Dose Aspirin. *J Vet Intern Med* 27: 141–149.

Abdullah R (1988): Hemostatic abnormalities in nephrotic syndrome. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 18: 105–113.

Asher E, Fefer P, Shechter M, Beigel R, Varon D, Shenkman B, Savion N, Hod H, Matetzky S (2014): Increased mean platelet volume is associated with non-responsiveness to clopidogrel. *Thromb Haemost* 112: 137–141.

Balch A, Mackin A (2007): Canine immune-mediated hemolytic anemia: pathophysiology, clinical signs, and diagnosis. *Compend Contin Educ Vet* 29: 217–225.

Bauer NB, Er E, Moritz A (2012): Effect of submaximal aerobic exercise on platelet function, platelet activation, and secondary and tertiary hemostasis in dogs. *Am. J. Vet. Res.* 73: 125–133.

Bauer N, Eralp O, Moritz A (2009): Establishment of Reference Intervals for Kaolin-Activated Thromboelastography in Dogs Including an Assessment of the Effects of Sex and Anticoagulant Use. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 21: 641–648.

Bayer Healthcare: Fachinformation Aspirin protect 100mg/-300mg.

Beard MJ, Jeewa Z, Bashir S, Cardigan R, Thomas S (2011): Comparison of platelet activation in platelet concentrates measured by flow cytometry or ADVIA 2120. *Vox Sanguinis* 101: 122–130.

Bernlochner I, Steinhubl SR, Braun S, Morath T, Jaitner J, Stegherr J, Mehilli J, Beckerath N von, Schömig A, Kastrati A, Sibbing D (2010): Association between inflammatory biomarkers

and platelet aggregation in patients under chronic clopidogrel treatment. *Thromb Haemost* 104: 1193–1200.

Blois SL, Banerjee A, Wood RD, Park FM (2013): Thromboelastography platelet mapping in healthy dogs using 1 analyzer versus 2 analyzers. *Can. J. Vet. Res.* 77: 231–236.

Boswood A, Lamb CR, White RN (2000): Aortic and iliac thrombosis in six dogs. *J Small Anim Pract* 41: 109–114.

Brandt N (2008): Hirudin als in vitro-Antikoagulan in Universalblutentnahmeröhrchen (UBT`s). Berlin, Charité-Universitätsmedizin Berlin, Abteilung für Innere Medizin II, Hämatologie, Onkologie und Transfusionsmedizin, Inaugural-Dissertation.

Brooks MB, Divers TJ, Watts AE, Ness SL, Frye AH, Stokol T, Fubini SL (2013): Effects of clopidogrel on the platelet activation response in horses. *Am. J. Vet. Res.* 74: 1212–1222.

Carr AP, Panciera DL, Kidd L (2002): Prognostic Factors for Mortality and Thromboembolism in Canine Immune-Mediated Hemolytic Anemia: A Retrospective Study of 72 Dogs // Prognostic factors for mortality and thromboembolism in canine immune-mediated hemolytic anemia: a retrospective study of 72 dogs. *J. Vet. Intern. Med.* 2002 // 16: 504–509.

Cathcart CJ, Brainard BM, Reynolds LR, Al-Nadaf S, Budsberg SC (2012): Lack of inhibitory effect of acetylsalicylic acid and meloxicam on whole blood platelet aggregation in cats. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)* 22: 99–106.

Cattaneo M (2004): Aspirin and Clopidogrel: Efficacy, Safety, and the Issue of Drug Resistance. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 24: 1980–1987.

Cezary Watala (2008): Impedance whole blood electrical aggregometry. Measurements, Evaluation and interpretation of aggregometry outcomes.

Comin J, Kallmes D (2011): Clopidogrel (Plavix). *American Journal of Neuroradiology* 32: 2002–2004.

Dai Y, Ge J (2012): Clinical Use of Aspirin in Treatment and Prevention of Cardiovascular Disease. *Thrombosis* 2012: 1–7.

Dale GL, Wolf RF, Hynes LA, Friese P, Burstein SA (1996): Quantitation of platelet life span in splenectomized dogs. *Exp. Hematol.* 24: 518–523.

David Perry TT: Practical-Haemostasis.com. a practical guide to laboratory haemostasis. www.practical-haemostasis.com.

Day MJ, Kohn B (Hrsg.) (2012): BSAVA manual of canine and feline haematology and transfusion medicine. Chapter 9: Overview of Haemostasis. British Small Animal Veterinary Association, Gloucester.

Doré M, Hawkins HK, Entman ML, Smith CW (1993): Production of a monoclonal antibody against canine GMP-140 (P-selectin) and studies of its vascular distribution in canine tissues. *Vet. Pathol* 30: 213–222.

Douglas J. Dorahy (1996): biochemical isolation of a membrane microdomain from resting platelets highly enriched in the plasma membrane glycoprotein CD36. *Biochemical Journal:* 67–72.

Esposito G (2011): Responsiveness to P2Y12 receptor inhibitors. *Current Opinion in Cardiology* 26: S31.

- Favaloro E (2008):** Clinical Utility of the PFA-100. *Semin Thromb Hemost* 34: 709–733.
- Fresno L, Moll J, Peñalba B, Espada Y, Andaluz A, Prandi D, Gopegui RR de, García F (2005):** Effects of preoperative administration of meloxicam on whole blood platelet aggregation, buccal mucosal bleeding time, and haematological indices in dogs undergoing elective ovariohysterectomy. *The Veterinary Journal* 170: 138–140.
- G. Escolar und J. Bozzo:** optical aggregometry in platelet rich plasma.
- Gachet C, Aleil B (2005):** Variabilité interindividuelle de la réponse au clopidogrel. *Arch Mal Coeur Vaiss* 98: 216–225.
- Goodwin L, Goggs R, Chan D, Allenspach K (2011):** Hypercoagulability in Dogs with Protein-Losing Enteropathy. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 25: 273–277.
- Grauer GF, Rose BJ, Toolan L, Thrall MA, Colgan SP (1992):** Effects of low-dose aspirin and specific thromboxane synthetase inhibition on whole blood platelet aggregation and adenosine triphosphate secretion in healthy dogs. *Am. J. Vet. Res.* 53: 1631–1635.
- Halmai D, Gaál T, Kocsis R (2008):** Influencing factors of ADP-induced, epinephrine-induced and ristomycin-induced platelet aggregation in dogs. *Blood Coagul. Fibrinolysis* 19: 14–22.
- Hardie EM, Vaden SL, Spaulding K, Malarkey DE (1995):** Splenic infarction in 16 dogs: a retrospective study. *J. Vet. Intern. Med.* 9: 141–148.
- Harker LA, Boissel J, Pilgrim AJ, Gent M (1999):** Comparative Safety and Tolerability of Clopidogrel and Aspirin. *Drug Safety* 21: 325–335.
- Harrison P, Mackie I, Mumford A, Briggs C, Liesner R, Winter M, Machin S (2011):** Guidelines for the laboratory investigation of heritable disorders of platelet function. *Br. J. Haematol.* 155: 30–44.
- Harvey JW (2001):** Atlas of veterinary hematology. Blood and bone marrow of domestic animals. W.B. Saunders, Philadelphia, PA.
- Hawiger J (1989):** Fibrinogen-independent platelet adhesion and thrombus formation on subendothelium mediated by glycoprotein IIb-IIIa complex at high shear rate. *J. Clin. Invest.* 83: 288–297.
- Hoffman M, Monroe DM (2001):** A cell-based model of hemostasis. *Thromb. Haemost.* 85: 958–965.
- Ibrahim O, Oteh M, Syukur A, HH CH, W SF, Rahman MM (2012):** Evaluation of Aspirin and Clopidogrel resistance in patients with Acute Coronary Syndrome by using Adenosine Diphosphate Test and Aspirin Test. *Pak J Med Sci* 29.
- Jámbor C, Weber CF, Gerhardt K, Dietrich W, Spannagl M, Heindl B, Zwissler B (2009):** Whole blood multiple electrode aggregometry is a reliable point-of-care test of aspirin-induced platelet dysfunction. *Anesth. Analg.* 109: 25–31.
- JC Goodwin DHHG (2007):** The pharmacodynamics of clopidogrel in the dog. ACVIM 2007 Abstract # 135. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 21: 609.
- Johnson LR, Lappin MR, Baker DC (1999):** Pulmonary thromboembolism in 29 dogs: 1985–1995. *J. Vet. Intern. Med.* 13: 338–345.
- Kalbantner K, Baumgarten A, MISCHKE R (2010):** Measurement of platelet function in dogs using a novel impedance aggregometer. *The Veterinary Journal* 185: 144–151.

- Kim Y, Kim KS, Suh K, Shanmugam S, Woo JS, Yong CS, Choi H (2011):** New clopidogrel napadisilate salt and its solid dispersion with improved stability and bioequivalence to the commercial clopidogrel bisulphate salt in beagle dogs. *International Journal of Pharmaceutics* 415: 129–139.
- Kitrell D, Berkwitt L (2012a):** Hypercoagulability in dogs: pathophysiology. *Compend Contin Educ Vet* 34: E1-5.
- Kitrell D, Berkwitt L (2012b):** Hypercoagulability in dogs: treatment. *Compend Contin Educ Vet* 34: E3.
- Kovacs T, Berger G, Corvazier E, Paszty K, Brown A, Bobe R, Papp B, Wuytack F, Cramer EM, Enouf J (1997):** Immunolocalization of the multi-sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺ATPase system in human platelets. *Br J Haematol* 97: 192–203.
- Kwok CS, Loke YK (2012):** Effects of Proton Pump Inhibitors on Platelet Function in Patients Receiving Clopidogrel. *Drug Safety* 35: 127–139.
- Laforcade A de (2012):** Diseases Associated with Thrombosis. *Topics in Companion Animal Medicine* 27: 59–64.
- Lev EI, Patel RT, Maresh KJ, Guthikonda S, Granada J, DeLao T, Bray PF, Kleiman NS (2006):** Aspirin and Clopidogrel Drug Response in Patients Undergoing Percutaneous Coronary Intervention. *Journal of the American College of Cardiology* 47: 27–33.
- Liang MM (2009):** Primäre immunhämolytische Anämie und primäre immunbedingte Thrombozytopenie beim Hund. Studien zur genetischen Assoziation mit dem Haupthistokompatibilitätskomplex und zum Vererbungsmodus. mbv, Mensch & Buch, Berlin.
- Loreth RM, Klose G (2010):** Comparison of Two Different Blood Sample Tubes for Platelet Function Analysis with the Multiplate® System. *Transfus Med Hemother* 37: 289–292.
- Madsen EH, Saw J, Kristensen SR, Schmidt EB, Pittendreigh C, Maurer-Spurej E (2010):** Long-Term Aspirin and Clopidogrel Response Evaluated by Light Transmission Aggregometry, VerifyNow, and Thrombelastography in Patients Undergoing Percutaneous Coronary Intervention. *Clinical Chemistry* 56: 839–847.
- Marcucci R, Gori AM, Giannotti F, Baldi M, Verdiani V, Del Pace S, Nozzoli C, Abbate R (2006):** Markers of hypercoagulability and inflammation predict mortality in patients with heart failure. *J. Thromb. Haemost.* 4: 1017–1022.
- Martina Leitner:** Evaluation of Laboratory Methods for Testing Anti-Platelet Drug Resistance 2009.
- Martinez MN, Papich MG (2009):** Factors influencing the gastric residence of dosage forms in dogs. *J. Pharm. Sci.* 98: 844–860.
- McCullough S (2003):** Immune-mediated hemolytic anemia: understanding the nemesis. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 33: 1295–1315.
- Mellett AM, Nakamura RK, Bianco D (2011):** A Prospective Study of Clopidogrel Therapy in Dogs with Primary Immune-Mediated Hemolytic Anemia. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 25: 71–75.
- Merten M, Thiagarajan P (2000):** P-Selectin Expression on Platelets Determines Size and Stability of Platelet Aggregates. *Circulation* 102: 1931–1936.

Michelson AD (2010): Antiplatelet therapies for the treatment of cardiovascular disease. *Nat Rev Drug Discov* 9: 154–169.

Mischke R, FEHR M, NOLTE I (2005): Efficacy of low molecular weight heparin in a canine model of thromboplastin-induced acute disseminated intravascular coagulation. *Research in Veterinary Science* 79: 69–76.

Moceri P, Doyen D, Cerboni P, Ferrari E (2011): Doubling the dose of Clopidogrel restores the loss of antiplatelet effect induced by esomeprazole. *Thrombosis Research* 128: 458–462.

Moritz A, Walcheck BK, Weiss DJ (2005): Evaluation of flow cytometric and automated methods for detection of activated platelets in dogs with inflammatory disease. *American Journal of Veterinary Research* 66: 325–329.

Mortensen S, Larsen S, Grove E, Kristensen S, Hvas A (2010): Reduced platelet response to aspirin in patients with coronary artery disease and type 2 diabetes mellitus. *Thrombosis Research* 126: e318.

Mueller T, Dieplinger B, Poelz W, Calatzis A, Haltmayer M (2007): Utility of whole blood impedance aggregometry for the assessment of clopidogrel action using the novel Multiplate analyzer--comparison with two flow cytometric methods. *Thromb. Res.* 121: 249–258.

Müller I (2001): Effect of a high loading dose of clopidogrel on platelet function in patients undergoing coronary stent placement. *Heart* 85: 92–93.

Neubauer H, Kaiser AFC, Endres HG, Krüger JC, Engelhardt A, Lask S, Pepinghege F, Kusber A, Mügge A (2011): Tailored antiplatelet therapy can overcome clopidogrel and aspirin resistance - The BOchum CLoPIDogrel and Aspirin Plan (BOCLA-Plan) to improve antiplatelet therapy. *BMC Med* 9: 3.

New H, Byers CG (2011): Pulmonary thromboembolism. *Compend Contin Educ Vet* 33: E1.

Nielsen LA, Zois NE, Pedersen HD, Olsen LH, Tarnow I (2007): Platelet function in dogs: breed differences and effect of acetylsalicylic acid administration. *Vet Clin Pathol* 36: 267–273.

Nowak G, Schrör K (2007): Hirudin – the long and stony way from an anticoagulant peptide in the saliva of medicinal leech to a recombinant drug and beyond. A historical piece. *Thromb Haemost.*

Otto CM, Rieser TM, Brooks MB, Russell MW (2000): Evidence of hypercoagulability in dogs with parvoviral enteritis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 217: 1500–1504.

Pape K von, Dzijan-Horn M, Bohner J, Spannagl M, Weisser H, Calatzis A (2007): Vollblutaggregometrie zur Kontrolle der Wirksamkeit von Azetylsalizylsäure bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit. Vergleich von PFA-100 und Multiplate. *Hamostaseologie* 27: 155-60; quiz 161-2.

Piper P. J. VJR (1969): Release of Additional Factors in Anaphylaxis and its Antagonism by Anti-inflammatory Drugs. *Nature* 223: 29–35.

Pittman JR, Koenig A, Brainard BM (2010): The effect of unfractionated heparin on thrombelastographic analysis in healthy dogs. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care* 20: 216–223.

Plumb DC (2008): Plumb's veterinary drug handbook. PharmaVet; Distributed by Blackwell Pub., 6. Aufl., Stockholm, Wis, Ames, Iowa.

- Rodgers RP, Levin J (1990):** A critical reappraisal of the bleeding time. *Semin. Thromb. Hemost.* 16: 1–20.
- Roscher KA, Failing K, Moritz A (2015):** Inhibition of platelet function with clopidogrel, as measured with a novel whole blood impedance aggregometer in horses. *The Veterinary Journal* 203: 332–336.
- Ruggeri ZM (2001):** Structure of von Willebrand factor and its function in platelet adhesion and thrombus formation. *Best Practice & Research Clinical Haematology* 14: 257–279.
- Salama MM, Mohamed Morad A, Saleh MA, Sabri NA, Zaki MM, ElSafady LA (2012):** Resistance to low-dose aspirin therapy among patients with acute coronary syndrome in relation to associated risk factors. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics* 37: 630–636.
- Schmitz S, Moritz A (2009):** Chronische disseminierte intravasale Gerinnung bei einem Hund mit Lungenwurmbefall. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde* 151: 281–286.
- Schwer HD, Lecine P, Tiwari S, Italiano JE, Hartwig JH, Shivdasani RA (2001):** A lineage-restricted and divergent β -tubulin isoform is essential for the biogenesis, structure and function of blood platelets. *Current Biology* 11: 579–586.
- Scott-Moncrieff JC, Treadwell NG, McCullough SM, Brooks MB (2001):** Hemostatic abnormalities in dogs with primary immune-mediated hemolytic anemia. *J Am Anim Hosp Assoc* 37: 220–227.
- Sharpe KS, Center SA, Randolph JF, Brooks MB, Warner KL, Stokol T, Barr SC, Felipe MJ (2010):** Influence of treatment with ultralow-dose aspirin on platelet aggregation as measured by whole blood impedance aggregometry and platelet P-selectin expression in clinically normal dogs. *Am. J. Vet. Res.* 71: 1294–1304.
- Shearer L. (2009):** Effects of Aspirin and Clopidogrel on platelet function in healthy dogs. *J. Vet. Intern. Med.*: 673–786.
- Smith JP, Haddad EV, Taylor MB, Oram D, Blakemore D, Chen Q, Boutaud O, Oates JA (2012):** Suboptimal Inhibition of Platelet Cyclooxygenase-1 by Aspirin in Metabolic Syndrome. *Hypertension* 59: 719–725.
- Soloviev MV, Okazaki Y, Harasaki H (1999):** Whole blood platelet aggregation in humans and animals: a comparative study. *J. Surg. Res.* 82: 180–187.
- Stephen J. Ettinger (Hrsg.) (2010):** Textbook of veterinary internal medicine. Seventh Edition. Chapter 52; Helena Rylander. Saunders, Philadelphia [u.a.].
- Stosic A (2011):** Die Embolisation des kongenitalen extrahepatischen portosystemischen Shunts beim Hund mit einem singulären Coil. VVB Lauferweiler, 1. Aufl., Giessen.
- Suehiro Y, Veljkovic DK, Fuller N, Motomura Y, Massé JM, Cramer EM, Hayward CPM (2005):** Endocytosis and storage of plasma factor V by human megakaryocytes. *Thrombosis and Haemostasis*.
- Suh J, Seung K, Kwak C, Kim K, Hong S, Park T, Kim S, Choi Y, Joo S, Tahk S, Kim H (2011):** Comparison of Antiplatelet Effect and Tolerability of Clopidogrel Resinate With Clopidogrel Bisulfate in Patients With Coronary Heart Disease (CHD) or CHD-Equivalent Risks: A Phase IV, Prospective, Double-Dummy, Parallel-Group, 4-Week Noninferiority Trial. *Clinical Therapeutics* 33: 1057–1068.

Svenstrup Poulsen T, Risom Kristensen S, ren, Atar D, Mickley H (2005): A Critical Appraisal of the Phenomenon of Aspirin Resistance. *Cardiology* 104: 83–91.

Tarnow I, Kristensen AT, Olsen LH, Falk T, Haubro L, Pedersen LG, Pedersen HD (2005): Dogs with heart diseases causing turbulent high-velocity blood flow have changes in platelet function and von Willebrand factor multimer distribution. *J. Vet. Intern. Med.* 19: 515–522.

Teuscher E (1997): Biogene Arzneimittel. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, 5. Aufl., Stuttgart.

Thomason J, Lunsford K, Mullins K, Stokes J, Pinchuk L, Wills R, Mclaughlin R, Langston C, Pruett S, Mackin A (2011): Platelet cyclooxygenase expression in normal dogs. *J. Vet. Intern. Med.* 25: 1106–1112.

Vane J, Botting R (2003): The mechanism of action of aspirin. *Thrombosis Research* 110: 255–258.

Verum Diagnostica GmbH (2008): Multiplate Homepage. <http://www.multiplate.net/en/index.php> (20.10.2012).

Weiss D (2008): Bone Marrow Pathology in Dogs and Cats with Non-Regenerative Immune-Mediated Haemolytic Anaemia and Pure Red Cell Aplasia. *Journal of Comparative Pathology* 138: 46–53.

Weiss DJ, Wardrop KJ, Schalm OW (2010): Schalm's veterinary hematology. Wiley-Blackwell, 6. Aufl., Ames, Iowa.

Wiinberg B, Jensen AL, Rojkjaer R, Johansson P, Kjelgaard-Hansen M, Kristensen AT (2005): Validation of human recombinant tissue factor-activated thromboelastography on citrated whole blood from clinically healthy dogs. *Veterinary clinical Pathology* 34: 389–393.

Wiinberg B, Jessen LR, Tarnow I, Kristensen AT (2012): Diagnosis and treatment of platelet hyperactivity in relation to thrombosis in dogs and cats. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care* 22: 42–58.

Wurtz M, Grove EL, Kristensen SD, Hvas A (2010): The antiplatelet effect of aspirin is reduced by proton pump inhibitors in patients with coronary artery disease. *Heart* 96: 368–371.

Zucker-Franklin D, Benson KA, Myers KM (1985): Absence of a surface-connected canalicular system in bovine platelets. *Blood* 65: 241–244.

13 Anhang 1

Rezeptoren	Beschreibung
Integrine	
Integrin α IIb- β 3 (GP IIb-IIIa; CD41/CD61)	<ul style="list-style-type: none"> - Fibrinogenrezeptor - 50000-80000 Rezeptoren/Thrombozyt - Aktivierung führt zur Konformationsänderung und Ligandenbindung mit Proteinen wie Fibrinogen, von Willebrand-Faktor, Thrombospondin, Fibronectin, Vitronectin
α v β 3 (CD51/CD61)	<ul style="list-style-type: none"> - Vitronectinrezeptor - 2000-3000 Rezeptoren/Thrombozyt - Ligandenbindung mit Vitronectin, Fibronectin,

	Osteopontin
$\alpha 2\beta 1$ (GP Ia-IIa; CD49b/CD29)	<ul style="list-style-type: none"> - Hauptrezeptor für die Kollagenbindung - 2000-3000 Rezeptoren/Thrombozyt
Leucinreiche GP Ib-IX-V	<ul style="list-style-type: none"> - der von Willebrand-Faktor-Rezeptor - 60000 Rezeptoren/Thrombozyt - bindet auch an Mac-1 und P-Selectin - wirkt vor allem bei hohen Scherkräften
Protease-aktivierende Rezeptoren (PAR)	<ul style="list-style-type: none"> - Thrombinrezeptor - 7 verschiedene PAR bekannt - Bei Mensch und Hund hauptsächlich funktionale PAR 1 und PAR 4
ADP- Rezeptoren	<ul style="list-style-type: none"> - P2Y1 und P2Y12 - P2Y1 geknüpft an die Guanylatzyklase (GC) mobilisiert Kalzium, was zu einer reversiblen Thrombozytenaggregation führt - an Gi gekoppelt P2Y12 inhibiert Adenylatzyklase (Ac), senkt so den cAMP-Level und führt zu einer irreversible Thrombozytenaggregation
Thromboxanrezeptor (TXA2/PGH2)	<ul style="list-style-type: none"> - - TXA2/GPH2 interagieren mit TPα und TPβ - TPα und TPβ sind jeweils mit verschiedenen Glykoproteinen (Gs, Gi) auf dem Thrombozyten verknüpft - Beim Hund nur Vorkommen von TPα bewiesen
Prostazyklinrezeptor (PGI2)	<ul style="list-style-type: none"> - Bindung aktiviert Adenylatzyklase, welche cAMP positiv beeinflusst die Thrombozytenaktivierung zu hemmen
Thrombozytenaktivierender Faktor (PAF) –Rezeptor	<ul style="list-style-type: none"> - PAF initiiert Konformationsänderung und die damit verbundene Aggregation
Adenosinrezeptor	<ul style="list-style-type: none"> - 3 Subtypen - Aktivierung erhöht cAMP und hemmt die Thrombozyten
Adrenerger Rezeptor	<ul style="list-style-type: none"> - an Gi-Protein gekoppelter $\alpha 2$-adrenerger Rezeptor - Rezeptorbindung erniedrigt cAMP -> Boosterung der Thrombozytenaktivierung - beteiligt an Thrombusstabilität
Serotoninrezeptor	<ul style="list-style-type: none"> - An G-Proteine gekoppelt - führt zu Kalziumfreisetzung -> verbesserte Thrombozytenaktivierung
Immunglobuline/ITAM/ITIM	
GPVI-FcR γ	<ul style="list-style-type: none"> - einer der bedeutendsten Kollagenrezeptoren– besteht aus 2, kollagenbindenden Immunglobulinringen (C2) - FcRγ enthält ein ITAM, welches während der Thrombozytenaktivierung phosphoryliert wird
Fc ϵ RI	<ul style="list-style-type: none"> - IgE –Rezeptor - Stimuliert die Ausschüttung von Serotonin
ICAM-2	<ul style="list-style-type: none"> - Befindet sich auf aktivierten und nicht aktivierten Thrombozyten - Einziger $\beta 2$ Integrinligand auf Thrombozyten

	<ul style="list-style-type: none"> - spielt eine Rolle bei der Leukozyten-Thrombozyten-Interaktion
PECAM-1 (CD31)	<ul style="list-style-type: none"> - besteht aus 6 C2-Immunglobulin-Domänen - sowohl Inhibitor (ITAM) als auch Adjuvans (αIbβ3) der Thrombozytenaktivierung
CD47	<ul style="list-style-type: none"> - Thrombospondinrezeptor oder Integrin-assoziiertes Protein genannt - Bindung inhibiert Nitritoxid/cGMP-Signal ->Thrombozytenaktivierung wird gesteigert
Tetraspanine	
CD9	<ul style="list-style-type: none"> - Zusammen mit α2bβ3 auf Plasmamembran von inaktivierten Thrombozyten
CD82	<ul style="list-style-type: none"> - Mögliche Rolle im Zusammenspiel mit Lymphozyten
CD151 (PETA-3)	<ul style="list-style-type: none"> - Mögliche Rolle in der Integrin-Signalkaskade
Andere	
P2X1	<ul style="list-style-type: none"> - ATP-Rezeptor - fördert die Kalziumaufnahme - an Verstärkung der Thrombozytenaktivierung beteiligt
CD36 (GPIV, GPIIb)	<ul style="list-style-type: none"> - diese Liganden enthalten Thrombospondin, modifizierte Phospholipide und langkettige Fettsäuren
C1q	<ul style="list-style-type: none"> - Spielt eventuell eine Rolle in der klassischen Aktivierungskaskade der Thrombozyten
Serotonin Wiederaufnahme	<ul style="list-style-type: none"> - Rezeptor wird durch Serotoninaktivierung aktiviert - verantwortlich für den Transport von Serotonin durch Plasmamembran
Thrombopoetinrezeptor	<ul style="list-style-type: none"> - Gehört zur Tyrosinkinasefamilie - beteiligt an der Thrombozytenproduktion - verstärkt Thrombozytenaktivierung

Tabelle 26: Rezeptoren der Thrombozyten und ihre Funktion nach (Weiss et al., 2010)

14 Anhang 2

Hund 1 - zeitlicher Verlauf der Thrombozytenfunktion während der ASS- und der Clopidogrel-Phase, angegeben ist die Fläche unter der Aggregationskurve (AUC) in der Einheit U (=10AU*min), die über die Vollblutaggregometrie mit den verschiedenen Agonisten bestimmt wurde:

Zeitpunkt Tag/ Agonist	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Col	201	292	341	323	292	349	294	329	290	303	311
ASPI	95	247	249	233	245	305	222	280	257	251	208
ADP	187	212	163	205	182	175	193	206	209	230	228
ADP+PG	59	242	217	226	183	172	224	251	221	241	235

Tabelle 27: Messung der AUC (1U=10AU*min), Aspirin

Zeitpunkt Tag/	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
----------------	---	---	---	---	---	---	---	---	---	----	----

Agonist											
Col	304	314	260	271	245	258	271	283	262	266	263
ASPI	239	112	73	112	99	139	144	202	189	245	212
ADP	241	94	87	109	92	97	133	202	231	247	240
ADP+PG	198	0	0	2	0	10	54	85	143	182	184

Tabelle 28: Messung der AUC (1U=10AU*min), Clopidogrel

Hund 2 - zeitlicher Verlauf der Thrombozytenfunktion während der ASS- und der Clopidogrel-Phase, angegeben ist die Fläche unter der Aggregationskurve (AUC) in der Einheit U (=10AU*min), die über die Vollblutaggregometrie mit den verschiedenen Agonisten bestimmt wurde:

Zeitpunkt Tag/ Agonist	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Col	104	229	308	182	168	172	202	177	185	194	247
ASPI	118	0	21	22	162	150	190	148	170	179	150
ADP	205	190	218	196	146	177	195	192	186	153	192
ADP+PG	29	101	128	93	95	100	99	92	100	130	101

Tabelle 29: Messung der AUC (1U=10AU*min), Aspirin

Zeitpunkt Tag/ Agonist	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Col	256	235	199	219	199	210	187	192	196	219	200
ASPI	118	44	59	37	66	80	72	101	176	178	132
ADP	173	31	46	19	44	55	70	117	158	181	141
ADP+PG	97	0	0	0	3	7	33	63	80	77	105

Tabelle 30: Messung der AUC (1U=10AU*min), Clopidogrel

Hund 3 - zeitlicher Verlauf der Thrombozytenfunktion während der ASS- und der Clopidogrel-Phase, angegeben ist die Fläche unter der Aggregationskurve (AUC) in der Einheit U (=10AU*min), die über die Vollblutaggregometrie mit den verschiedenen Agonisten bestimmt wurde:

Zeitpunkt Tag/ Agonist	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Col	134	298	302	275	289	232	229	252	204	206	233
ASPI	114	186	212	174	42	223	164	179	171	171	179
ADP	190	156	146	152	158	155	141	189	207	200	213
ADP+PG	27	80	95	96	80	106	49	90	91	86	97

Tabelle 31: Messung der AUC (1U=10AU*min), Aspirin

Zeitpunkt Tag/ Agonist	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Col	254	249	227	307	255	271	229	237	259	232	238

ASPI	184	61	50	69	71	95	87	167	149	181	167
ADP	166	39	34	52	39	58	66	105	138	173	167
ADP+PG	97	0	0	0	0	0	24	68	85	103	106

Tabelle 32: Messung der AUC (1U=10AU*min), Clopidogrel

Hund 4 - zeitlicher Verlauf der Thrombozytenfunktion während der ASS- und der Clopidogrel-Phase, angegeben ist die Fläche unter der Aggregationskurve (AUC) in der Einheit U (=10AU*min), die über die Vollblutaggregometrie mit den verschiedenen Agonisten bestimmt wurde:

Zeitpunkt Tag/ Agonist	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Col	62	216	182	216	190	179	210	204	187	194	194
ASPI	94	159	157	143	178	164	195	187	161	163	138
ADP	192	121	188	161	142	135	157	174	179	190	184
ADP+PG	63	101	122	113	133	135	120	127	157	122	130

Tabelle 33: Messung der AUC (1U=10AU*min), Aspirin

Zeitpunkt Tag/ Agonist	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Col	214	186	162	205	201	192	198	193	233	197	209
ASPI	152	66	110	65	83	96	82	116	162	176	147
ADP	185	48	52	52	64	74	87	104	145	189	194
ADP+PG	144	0	12	0	11	16	30	47	122	152	145

Tabelle 34: Messung der AUC (1U=10AU*min), Clopidogrel

Hund 5 - zeitlicher Verlauf der Thrombozytenfunktion während der ASS- und der Clopidogrel-Phase, angegeben ist die Fläche unter der Aggregationskurve (AUC) in der Einheit U (=10AU*min), die über die Vollblutaggregometrie mit den verschiedenen Agonisten bestimmt wurde:

Zeitpunkt Tag/ Agonist	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Col	219	239	293	272	263	276	247	218	260	269	250
ASPI	179	150	196	211	210	205	237	198	196	195	208
ADP	149	101	154	124	115	114	114	141	151	163	145
ADP+PG	135	109	114	72	120	81	114	111	163	168	190

Tabelle 35: Messung der AUC (1U=10AU*min), Aspirin

Zeitpunkt Tag/ Agonist	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Col	221	207	238	213	233	189	260	255	244	286	286
ASPI	184	70	61	71	74	74	74	128	159	185	202
ADP	215	57	34	37	51	72	47	139	122	233	223

ADP+PG	160	0	0	4	0	29	14	18	90	159	141
---------------	-----	---	---	---	---	----	----	----	----	-----	-----

Tabelle 36: Messung der AUC (1U=10AU*min), Clopidogrel

Hund 6 - zeitlicher Verlauf der Thrombozytenfunktion während der ASS- und der Clopidogrel-Phase, angegeben ist die Fläche unter der Aggregationskurve (AUC) in der Einheit U (=10AU*min), die über die Vollblutaggregometrie mit den verschiedenen Agonisten bestimmt wurde:

Zeitpunkt Tag/ Agonist	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Col	193	198	265	202	177	248	203	211	208	227	218
ASPI	170	0	19	30	167	178	169	163	172	160	176
ADP	194	201	212	222	216	233	189	208	237	236	217
ADP+PG	83	71	75	77	61	73	77	89	76	112	105

Tabelle 37: Messung der AUC (1U=10AU*min), Clopidogrel

Zeitpunkt Tag/ Agonist	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Col	204	159	202	154	184	189	223	214	227	223	249
ASPI	140	27	48	46	16	18	70	87	181	183	190
ADP	142	20	32	23	19	42	42	67	113	148	176
ADP+PG	63	0	0	0	0	0	0	38	63	92	107

Tabelle 38: Messung der AUC (1U=10AU*min), Clopidogrel

Hund 7 - zeitlicher Verlauf der Thrombozytenfunktion während der ASS- und der Clopidogrel-Phase, angegeben ist die Fläche unter der Aggregationskurve (AUC) in der Einheit U (=10AU*min), die über die Vollblutaggregometrie mit den verschiedenen Agonisten bestimmt wurde:

Zeitpunkt Tag/ Agonist	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Col	225	170	250	235	217	232	243	218	240	256	230
ASPI	165	3	3	2	46	63	204	109	162	162	101
ADP	43	193	157	168	180	163	200	173	180	141	167
ADP+PG	103	66	80	98	106	73	89	88	118	119	126

Tabelle 39: Messung der AUC (1U=10AU*min), Aspirin

Zeitpunkt Tag/ Agonist	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Col	202	234	236	208	215	205	221	252	240	224	238
ASPI	104	34	11	19	29	17	55	72	46	89	160
ADP	152	40	56	55	7	53	25	105	156	160	173
ADP+PG	133	0	3	0	0	0	10	60	54	100	113

Tabelle 40: Messung der AUC (1U=10AU*min), Clopidogrel

Hund 8 - zeitlicher Verlauf der Thrombozytenfunktion während der ASS- und der Clopidogrel-Phase, angegeben ist die Fläche unter der Aggregationskurve (AUC) in der Einheit U (=10AU*min), die über die Vollblutaggregometrie mit den verschiedenen Agonisten bestimmt wurde:

Zeitpunkt Tag/ Agonist	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Col	214	232	206	227	215	206	197	225	247	237	242
ASPI	182	93	16	66	203	178	208	175	249	210	253
ADP	60	198	182	179	160	163	140	160	158	152	173
ADP+PG	141	111	97	85	113	88	113	118	139	143	149

Tabelle 41: Messung der AUC (1U=10AU*min), Aspirin

Zeitpunkt Tag/ Agonist	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Col	250	208	199	227	197	212	239	219	215	251	264
ASPI	239	73	57	67	71	75	90	76	189	194	228
ADP	237	19	18	49	58	43	94	62	170	185	209
ADP+PG	220	0	0	0	10	0	20	50	103	134	158

Tabelle 42: Messung der AUC (1U=10AU*min), Clopidogrel

Hund 9 - zeitlicher Verlauf der Thrombozytenfunktion während der ASS- und der Clopidogrel-Phase, angegeben ist die Fläche unter der Aggregationskurve (AUC) in der Einheit U (=10AU*min), die über die Vollblutaggregometrie mit den verschiedenen Agonisten bestimmt wurde:

Zeitpunkt Tag/ Agonist	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Col	268	204	218	189	184	198	192	186	206	187	190
ASPI	125	183	168	157	118	177	180	159	182	176	230
ADP	74	179	241	160	181	160	182	151	177	166	179
ADP+PG	170	125	126	132	92	120	146	189	134	172	158

Tabelle 43: Messung der AUC (1U=10AU*min), Aspirin

Zeitpunkt Tag/ Agonist	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Col	172	193	177	200	194	212	240	218	182	206	226
ASPI	202	69	69	68	78	77	108	136	201	200	192
ADP	164	15	44	63	62	42	44	120	185	184	192
ADP+PG	131	0	0	4	20	0	42	69	129	140	173

Tabelle 44: Messung der AUC (1U=10AU*min), Clopidogrel

Hund 10 - zeitlicher Verlauf der Thrombozytenfunktion während der ASS- und der Clopidogrel-Phase, angegeben ist die Fläche unter der Aggregationskurve (AUC) in der Einheit U (=10AU*min), die über die Vollblutaggregometrie mit den verschiedenen Agonisten bestimmt wurde:

Zeitpunkt Tag/ Agonist	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Col	206	246	223	208	225	214	231	233	239	256	230
ASPI	211	16	7	21	183	210	186	204	183	208	205
ADP	101	286	300	288	245	245	227	269	231	255	288
ADP+PG	136	101	64	111	121	114	140	133	141	121	138

Tabelle 45: Messung der AUC (1U=10AU*min), Aspirin

Zeitpunkt Tag/ Agonist	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Col	257	217	227	205	240	221	220	238	279	255	268
ASPI	215	42	31	59	41	51	77	107	191	208	213
ADP	232	30	22	52	72	53	65	76	136	194	237
ADP+PG	130	0	0	0	0	0	14	46	64	104	144

Tabelle 46: Messung der AUC (1U=10AU*min), Clopidogrel)

15 Danksagung

Zum Abschluss geht mein Dank an alle, die mir mit Rat und Tat zur Seite gestanden haben.

Mein Dank gilt Prof. Dr. Andreas Moritz, der mir das ausgearbeitete Thema vorgeschlagen, und mir während der Themensuche bis hin zum Abschluss der Dissertation mit viel Engagement zur Seite gestanden hat.

Außerdem danke ich PD. Dr. (habil) Natali Bauer für ihre Betreuung und Hilfe. Sie hatte immer ein offenes Ohr für meine Probleme und konnte mich ein ums andere Mal wieder aufbauen, um meine Studie fortzusetzen, auch wenn nicht immer alles wie geplant verlief. Auch während der schriftlichen Ausarbeitung war sie stets für mich da und ich konnte mich auf schnelle und hilfreiche Antworten verlassen. Auch Dr. Katja Roscher möchte ich für die Chance danken, ihr Studiendesign auf Hunde übertragen zu dürfen.

Weiterhin danke ich meiner Tante Dr. Claudine Hoffman für das mehrfache Korrekturlesen und die Geduld dabei.

Ich möchte mich bei dem Personal des Zentrallabors des Klinikums Veterinärmedizin bedanken, die mir auch am Wochenende zur Seite standen, wenn mal wieder das Hämatologiegerät nicht so wollte wie ich.

Besonders bedanken möchte ich mich bei meinem Vater Dr. Guido Steinel, der während des Studiums sowie während der stressigen Zeit der Dissertation und im beruflichen Alltag immer zu mir gehalten und mich emotional sowie finanziell unterstützt hat.

Zum Schluss noch Danke an die Klinikbeagle Lennox, Gordy, Debbie, Plankton, Emma, Gulliver, Hank, Ida, Norman und Tiffy. Ohne euch wäre diese Studie nicht möglich gewesen. Ich hoffe ihr habt ein schönes Leben in euren neuen Familien und könnt das Dasein als Familienhund genießen.

Am Ende gilt mein größter Dank meiner Frau Kathrin Steinel, welche mich während der ganzen Zeit begleitet, mir in jeder Situation beigestanden und mich unterstützt hat.

16 Erklärung:

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Arbeit, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6410-5



9 783835 196410 5