

1. Medizinische Klinik und Poliklinik der Technischen Universität München
Klinikum rechts der Isar
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. A. Schömig)

**Thrombozytenfunktion während der Fibrinolysetherapie
des akuten Myokardinfarktes
und differentieller Einfluss von GPIIb-IIIa-Antagonisten auf die
Thrombozytenfunktion**

Winfried Oliver Taubitz

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen
Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation:

1. Privatdozent Dr. M. P. Gawaz
2. Univ.-Prof. Dr. F.-J. M. Neumann

Die Dissertation wurde am 19.01.2001 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 16.05.2001 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Bedeutung der Thrombozyten für Hämostase und arterielle Thrombose.....	1
1.2	Physiologie der Thrombozyten.....	2
1.2.1	Thrombozytenmorphologie.....	2
1.2.2	Funktionsstadien der Plättchenaktivierung.....	3
1.2.2.1	Adhäsion.....	3
1.2.2.2	Aggregation.....	5
1.2.3	Thrombozytäre Membranglykoproteine.....	7
1.2.4	Immunologische Marker.....	11
1.2.4.1	Marker für den GPIIb-IIIa.....	11
1.2.4.2	Marker für den GPIb/IX/V.....	12
1.2.4.3	Degranulationsmarker.....	12
1.3	Pathophysiologie der Thrombozyten.....	15
1.3.1	Atherogenese und Progression der Atherosklerose.....	15
1.3.2	Akute Koronarsyndrome.....	15
1.3.3	Fibrinolyse im akuten Myokardinfarkt.....	16
1.4	Antithrombozytäre Substanzen.....	17
1.4.1	Acetylsalicylsäure.....	17
1.4.2	Thienopyridine.....	18
1.4.3	GPIIb-IIIa-Antagonisten.....	18
1.5	Antithrombozytäre Therapie und koronare Herzerkrankung.....	21
1.5.1	Therapie der akuten Koronarsyndrome.....	21
1.5.2	Fibrinolysetherapie des akuten Myokardinfarkt.....	22
1.6	Pharmakologisches Monitoring der antithrombozytären Therapie.....	23
2	Zielsetzung	25

3 Patienten und Methodik	26
3.1 Patientenuntersuchung.....	26
3.1.1 Studienpopulation.....	26
3.1.2 Antithrombozytäre Therapie der Studienpatienten.....	28
3.1.3 Probengewinnung.....	29
3.1.4 Probenweiterverarbeitung.....	30
3.1.5 Aggregometrische Messung.....	31
3.1.6 Durchflusszytometrische Messung.....	33
3.1.7 Statistische Auswertung.....	36
3.2 Experimentelle Untersuchung.....	36
3.2.1 Verwendete GPIIb-IIIa-Antagonisten.....	36
3.2.2 Aggregometrische Untersuchung von Thrombozyten.....	37
3.2.2.1 Probengewinnung.....	37
3.2.2.2 Probenweiterverarbeitung.....	37
3.2.2.3 Messung.....	39
3.2.3 Durchflusszytometrische Untersuchung von Thrombozyten.....	39
3.2.3.1 Probengewinnung.....	39
3.2.3.2 Probenweiterverarbeitung.....	39
3.2.3.3 Monoklonale Antikörper.....	41
3.2.3.4 Messung.....	41
3.2.4 Durchflusszytometrische Untersuchung von CHO-Zellen mit rekombinantem GPIIb-IIIa.....	41
3.2.4.1 Kultivierung und Gewinnung der CHO-Zellen.....	41
3.2.4.2 Probenweiterverarbeitung.....	42
3.2.4.3 Monoklonale Antikörper.....	42
3.2.4.4 Messung.....	43
3.2.5 Adhäsionsuntersuchung von Thrombozyten.....	43
3.2.5.1 Herstellung von gewaschenen Thrombozyten.....	43
3.2.5.2 Verwendete Mikrotiterplatten.....	44
3.2.5.3 Prinzip und Versuchsdurchführung.....	44

3.2.6	Adhäsionsuntersuchung von CHO-Zellen mit rekombinantem GPIIb-IIIa.....	46
3.2.6.1	Kultivierung und Gewinnung der CHO-Zellen.....	46
3.2.6.2	Verwendete Mikrotiterplatten	46
3.2.6.3	Prinzip und Versuchsdurchführung.....	46
3.2.7	Statistische Auswertung.....	47
4	Ergebnisse	48
4.1	Patientenuntersuchung.....	49
4.1.1	Aggregation	48
4.1.2	Freisetzungsreaktion	49
4.1.3	Exposition thrombozytärer Membranglykoproteine.....	51
4.2	Experimentelle Untersuchung.....	52
4.2.1	Induktion der Liganden-induzierten-Bindungsstelle (LIBS).....	53
4.2.2	Aggregation und Deaggregation.....	57
4.2.3	Freisetzungsreaktion	60
4.2.4	Oberflächenexpression von CD61	62
4.2.5	Echistatin-Bindung	63
4.2.6	Adhäsion	64
5	Diskussion	68
5.1	Patientenuntersuchung.....	68
5.1.1	Aggregation	69
5.1.2	Freisetzungsreaktion	70
5.2	Experimentelle Untersuchung.....	71
5.2.1	Intrinsische Aktivierungsvorgänge	72
5.2.2	Aggregation und Deaggregation.....	75
5.2.3	Echistatin-Bindung	76
5.2.4	Adhäsion	76
5.2.5	Therapeutische Möglichkeiten.....	77
5.3	Studienbeschränkungen	78

6 Zusammenfassung	80
Abkürzungsverzeichnis.....	82
Abbildungsverzeichnis.....	84
Tabellenverzeichnis	84
Literaturverzeichnis	86
Lebenslauf.....	95
Danksagung	96
Anhang.....	97

1 Einleitung

1.1 Bedeutung der Thrombozyten für Hämostase und arterielle Thrombose

Die komplexen Mechanismen der physiologischen Blutstillung ermöglichen bei ausreichender Funktion der Einzelkomponenten einen wirksamen Schutz gegen größere Blutverluste. Der Vorgang der Hämostase ist dabei durch ein enges Zusammenspiel von vaskulären, zellulären und plasmatischen Vorgängen gekennzeichnet. Jedes System für sich weist sowohl pro- als auch antithrombotische Mechanismen auf, die sich im physiologischen Zustand im Gleichgewicht befinden und somit ein unkontrolliertes Thrombuswachstum verhindern.

Verschiebt sich das Gleichgewicht zugunsten eines prothrombotischen Zustands, entsteht eine Thromboseneigung (thrombophile Diathese). Überwiegen die antithrombotischen und fibrinolytischen Mechanismen, werden Blutungen begünstigt (hämorrhagische Diathese).

Zentraler Bestandteil der zellulären Komponente sind Thrombozyten, die aufgrund vielfacher Interaktionen in der Lage sind, auch auf die vaskuläre und plasmatische Blutstillung einzuwirken (Schrör 1994, Colman 1994). Eine gestörte Funktion der Blutplättchen oder eine zu geringe Anzahl bergen die Gefahr schwerer bis hin zu unstillbaren Blutungen. Thrombozyten spielen ebenso eine große Rolle bei der Atherogenese, der Entwicklung von akuten arteriellen Thrombosen und ischämischen Komplikationen bei atherosklerotischen Krankheitsbildern (Ross 1993, Fuster 1992, Willerson 1989).

Unter physiologischen Bedingungen interagieren die Blutplättchen nicht oder nur sehr eingeschränkt mit der Gefäßwand. Verletzungen der Gefäßinnenwand jedoch stören die antithrombotischen Eigenschaften des Endothels und setzen das Blut den adhäsiven Molekülen des Subendothels aus. Die Plättchenadhäsion an die beschädigte Gefäßwand ist der erste Schritt der Hämostase und Thrombose (Sixma 1994). Nach der Adhäsion kommt es zur Formveränderung der Blutplättchen und zur Aktivierung, was weiterhin zur Freisetzung intrazellulärer Granula und zur Aggregation führt (Nurden 1994, Siess 1989).

1.2 Physiologie der Thrombozyten

1.2.1 Thrombozytenmorphologie

Thrombozyten sind kernlose, korpuskuläre Blutbestandteile und entstehen im Knochenmark aus Megakaryozyten. Sie zirkulieren mit einer durchschnittlichen Anzahl von 150.000 bis 300.000 pro μl für neun bis zehn Tage im peripheren Blut (Mackie 1988). Im ruhenden Zustand haben sie eine diskoide Form, einen Durchmesser von 2-4 μm und ein durchschnittliches Volumen von 9,5 μm^3 . Thrombozyten zeigen einen komplexen inneren Aufbau, den man nach morphologischen Kriterien in vier unterschiedliche Bereiche einteilen kann (Mackie 1988):

Periphere Zone: Dieser Bereich besteht aus der trilaminären Zellmembran, die reich an Glykoproteinen, Proteinen und Mukopolysacchariden ist. Die Glykoproteine, die sich elektrophoretisch trennen lassen, übernehmen als Oberflächenrezeptoren spezifische Funktionen (Mackie 1988).

Strukturelle Zone: Sie enthält das Zytoplasma und das Zytoskelett, das sich aus Mikrofilamenten, Mikrotubuli und submembranös gelagerten Aktinfilamenten zusammensetzen. Die Verankerung dieses fibrillären, kontraktilen Systems mit der Zellmembran ermöglicht dem stimulierten Thrombozyten aktive Formveränderungen und die Ausbildung von Pseudopodien (Mackie 1988).

Zone der Zellorganellen: In diesem Bereich befinden sich vor allem Mitochondrien, Golgi-Apparate, Ribosomen und eine hohe Anzahl an plättchenspezifischen Granula. Bei den Granula werden Lysosomen, α -Granula und Dichte-Granula, welche elektronenmikroskopisch als dicht erscheinen, unterschieden. Alle Arten von Granula verschmelzen nach Aktivierung der Thrombozyten mit der Zellmembran und setzen zahlreiche hämostaserelevante Substanzen frei (Mackie 1988).

Membransysteme: Es wurden bisher zwei verschiedene Membransysteme beschrieben, welche sich in Aufbau und Funktion unterscheiden. Das offene kanalikuläre System („Surface Connected System“, SCS) bewirkt eine starke Vergrößerung der Zelloberfläche, während im dichten tubulären System („Dense Tubular System“, DTS) der Arachidonsäure-Metabolismus des Blutplättchens stattfindet (Mackie 1988). Das kanalikuläre System bildet transzelluläre Membranstapel, welche mit der Plättchenoberfläche und mit dem Zellinneren verbunden sind und so dem Stoffaustausch dienen können. Die Membranstapel können nach Aktivierung des Thrombozyten mit der Zellmembran verschmelzen, wodurch Glykoproteine, die als Membranrezeptoren fungieren können, an die Zelloberfläche gelangen. Das kanalikuläre System stellt somit ein Reservepotential an Glykoproteinen dar (Charo 1994).

1.2.2 Funktionsstadien der Plättchenaktivierung

Es läßt sich bei den Funktionsstadien der Plättchenaktivierung die Adhäsion von der Aggregation unterscheiden.

1.2.2.1 Adhäsion

Die Adhäsion von noch ruhenden Blutplättchen an die verletzte Gefäßwand ist der erste Schritt der primären Hämostase und wird primäre Adhäsion genannt. Die Anlagerung von schon aktivierten Thrombozyten an Strukturen des Subendothels wird als sekundäre Adhäsion bezeichnet (Andrews 1997, DeGroot 1990, Ruggeri 1994).

Der Adhäsionsvorgang wird durch thrombozytäre Membranglykoproteine gesteuert. Durch den ersten Kontakt zirkulierender Blutplättchen mit der subendothelialen Oberfläche im Bereich einer Gefäßwandläsion bindet der Glykoprotein(GP)-Ib/V/IX-Komplex mit kollagen-immobilisiertem von-Willebrand-Faktor. Dadurch kommt es zur Haftung des Blutplättchens an der Gefäßwand (**Kontaktphase**) (Sixma 1994, Nurden 1994). Über weitere membranständige Adhäsionsrezeptoren (Kollagen-, Fibronektin- und Lamininrezeptoren) erfolgt eine Stabilisierung der Plättchenadhäsion (**Phase der Stabilisierung**) (Nurden 1994).

Der Kollagen-Rezeptor $\alpha_2\beta_1$ ist ein bedeutender sekundärer Rezeptor für die Plättchen-Adhäsion. Die Interaktion zwischen $\alpha_2\beta_1$ und Kollagen führt zur Aktivierung des Blutplättchens und zu dessen Formveränderung. Während dieses Prozesses wird auch der Fibrinogen-Rezeptor GPIIb-IIIa aktiviert und stellt den engen Kontakt des Blutplättchens mit der Oberfläche sicher (**Phase der Aktivierung**) (Nurden 1994). Während der Formveränderung kommt es zur Bildung von Pseudopodien und zur Ausspreizung des Thrombozyten, was eine effektive Abdichtung der Gefäßwandläsion begünstigt (**Phase des Ausspreizens**) (Nurden 1994).

Der adhärenente und aktivierte Thrombozyt bildet aus freigesetzter Arachidonsäure (AA) Thromboxan A_2 (TxA_2), welches nach Abgabe in den Extrazellularraum über Bindung an einen spezifischen Thromboxanrezeptor den Aktivierungsvorgang verstärkt. Des weiteren werden während der Adhäsion Granulainhaltsstoffe freigesetzt (Sekretion), welche sowohl autokrin den Aktivierungsvorgang verstärken als auch durch Stimulation noch ruhender Thrombozyten (parakrin) diese aus der Zirkulation rekrutieren und zur Aggregation mit schon adhärenenten Plättchen anregen (Siess 1989). Die Interaktion von noch zirkulierenden Blutplättchen mit schon adhärenenten Thrombozyten erfolgt über aktivierte GPIIb-IIIa-Rezeptoren. Das Endstadium der Adhäsion ist erreicht, wenn der Thrombozyt vollkommen über dem Subendothel ausgespreizt ist und die Endothelläsion gegenüber dem Blutstrom abgedichtet ist (Nurden 1994) (Abbildung 1).

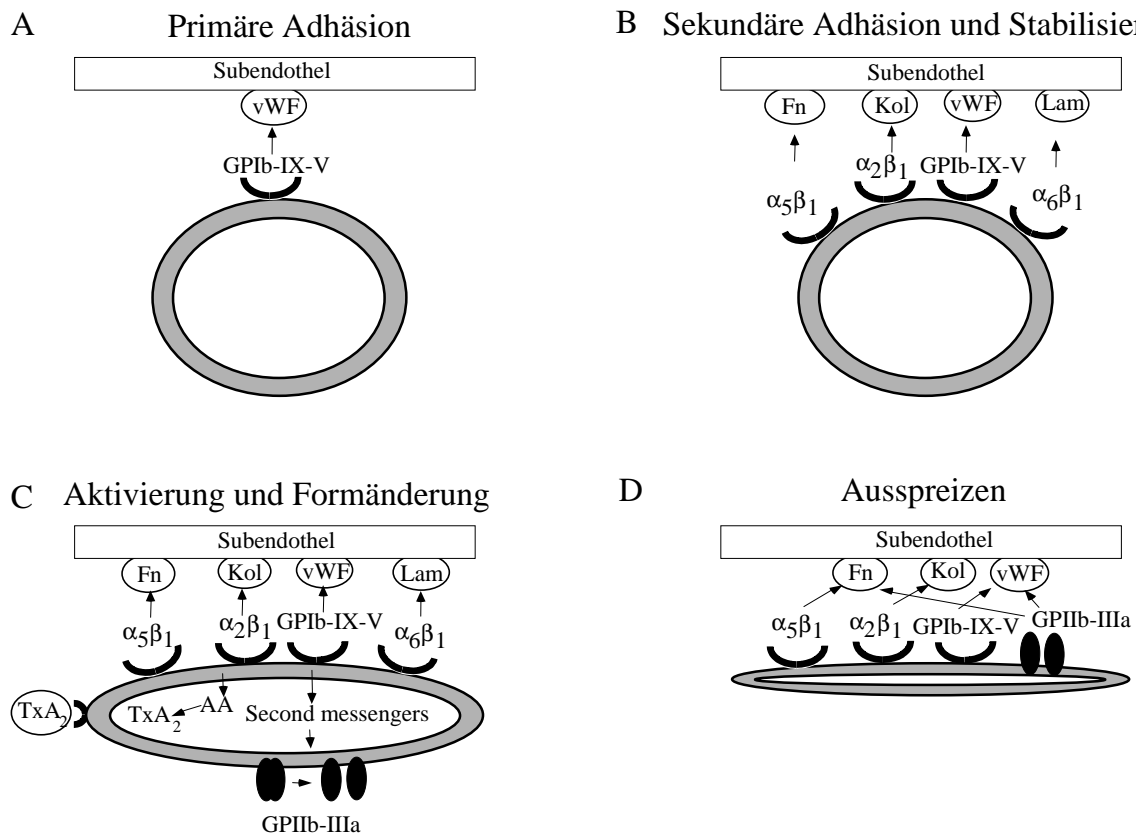


Abb 1: Schematische Darstellung der Thrombozytenadhäsion an subendothelialen Strukturen: Zu Beginn erfolgt die Bindung von GP Ib-IX-V an den von-Willebrand-Faktor der Endothelzellen (A). Dieser Kontakt löst eine weitere Aktivierung von Membranglykoproteinen aus und bewirkt damit die Stabilisierung der Bindung (B). Es kommt zur Aktivierung und Formveränderung des Thrombozyten mit Aktivierung des GPIIb-IIIa-Rezeptors und der Freisetzung von Granulainhaltsstoffen (C). Schließlich kommt es zur Bildung von Pseudopodien und zur Auspreizung des Thrombozyten (D).
 Fn: Fibronektin; Kol: Kollagen; Lam: Laminin; vWF: von Willebrandt-Faktor; TxA₂: Thromboxan A₂; AA: Arachidonsäure.

1.2.2.2 Aggregation

Aggregation nennt man den Vorgang der Koadhäsion zwischen zwei Thrombozyten. Ein bedeutender Rezeptor für die Aggregation der Blutplättchen ist der Fibrinogen-Rezeptor GPIIb-IIIa. Die Aggregation erfordert eine Konformationsänderung des GPIIb-IIIa, die durch verschiedene Stimulatoren, wie z.B. ADP, Thrombin oder Adrenalin, bewirkt wird.

Diese Konformationsänderung ermöglicht die Bindung von löslichem Fibrinogen an den GPIIb-IIIa-Rezeptor und damit an die Plättchenmembran (Gawaz 1999). Im weiteren Verlauf bewirken Fibrinogenbrücken die Ausbildung von Plättchen-Aggregaten (Siess 1989, Ginsberg 1995, Gawaz 1991, Plow 1992) (Abbildung 2).

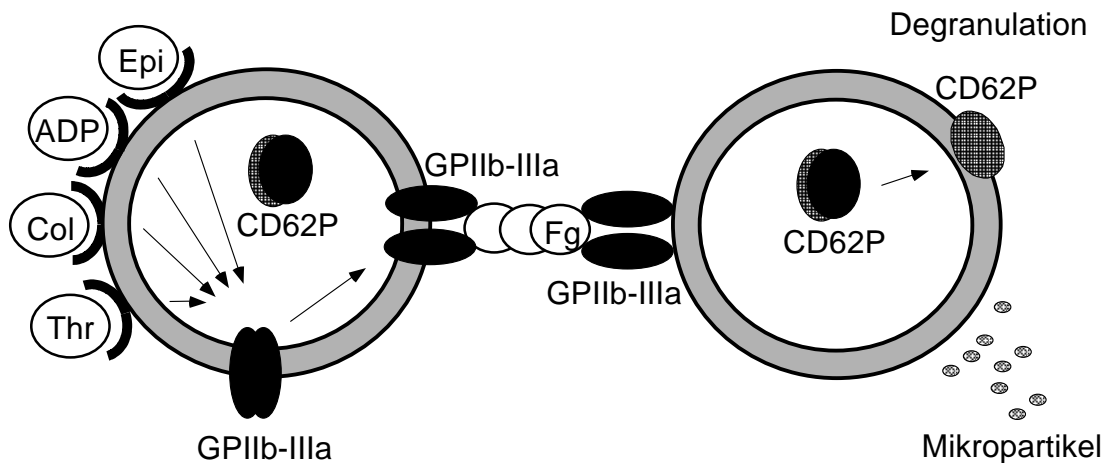


Abb 2: Schematische Darstellung der Thrombozytenaggregation: Die Stimulierung des Thrombozyten bewirkt eine Konformationsänderung des GPIIb-IIIa. Dies ermöglicht die Bindung von löslichem Fibrinogen an den GPIIb-IIIa und die Bildung von Plättchenaggregaten über Fibrinogenbrücken. Außerdem kommt es durch die Aktivierung des Thrombozyten zur Freisetzung von Granulainhaltsstoffen. Epi: Epinephrin; Col: Kollagen; Thr: Thrombin; ADP: Adenosintriphosphat; Fg: Fibrinogen.

Es wird die primäre von der sekundären Aggregation unterschieden. Während der primären Phase werden Thrombozyten über Fibrinogenbrücken locker miteinander verbunden. Dieser Vorgang ist reversibel. Die irreversible, sekundäre Aggregation tritt nach Aggregationsbeginn verzögert auf und beginnt sobald der Thrombozyt Granulainhaltsstoffe freisetzt (Ruggeri 1994).

Die Adhäsion und die Aggregation lösen intrazelluläre Signalwirkungen aus, welche zahlreiche Reaktionen zur Folge haben, wie z.B. die Bildung und Sekretion von Thromboxan A₂ (TXA₂), Serotonin und ADP. Diese Substanzen bewirken wiederum die Aktivierung von weiteren Blutplättchen, eine Verengung der Blutgefäße und eine Verlangsamung des Blutflusses. Dadurch steigt einerseits die Interaktion zwischen den Blutplättchen untereinander und andererseits zwischen den Plättchen und der Gefäßwand an (Willerson 1989, Siess 1989).

1.2.3 Thrombozytäre Membranglykoproteine

Das bedeutendste Membranglykoprotein ist der Fibrinogenrezeptor GPIIb-IIIa. Es befinden sich zwischen 60.000 und 100.000 dieser Rezeptoren auf einem Blutplättchen (Ginsberg 1995). 80% des GPIIb-IIIa sind im Ruhezustand auf der Plättchenoberfläche exprimiert, die restlichen 20% befinden sich im „surface connecting system“ (SCS) und in den intrazellulären α -Granula (Nurden 1994, Morgenstern 1997). Bei Aktivierung der Blutplättchen gelangen die Rezeptoren, welche sich in diesen inneren Speichern befinden an die Zelloberfläche (Woods 1986). Angeborene Defekte des GPIIb-IIIa, wie bei der Thrombasthenie Glanzmann (Morbus Glanzmann), führen zu einer fehlerhaften Plättchenaggregation und zu verlängerten Blutungszeiten (Nurden 1994). Der GPIIb-IIIa-Rezeptor ist ein Heterodimer und besteht aus einer α -Untereinheit (GPIIb) und einer β -Untereinheit (GPIIIa) (Plow 1992). Bestimmte Aminosäuresequenzen, wie RGD oder KQAGDV, welche z.B. Bestandteil des Fibrinogenmoleküls sind, binden an spezifische Regionen des GPIIb-IIIa-Komplexes. RGD und KQAGDV enthaltende Peptide konkurrieren dabei mit Fibrinogen um eine gemeinsame Bindungsstelle (Plow 1992, Lefkovitz 1995) (Abbildung 3).

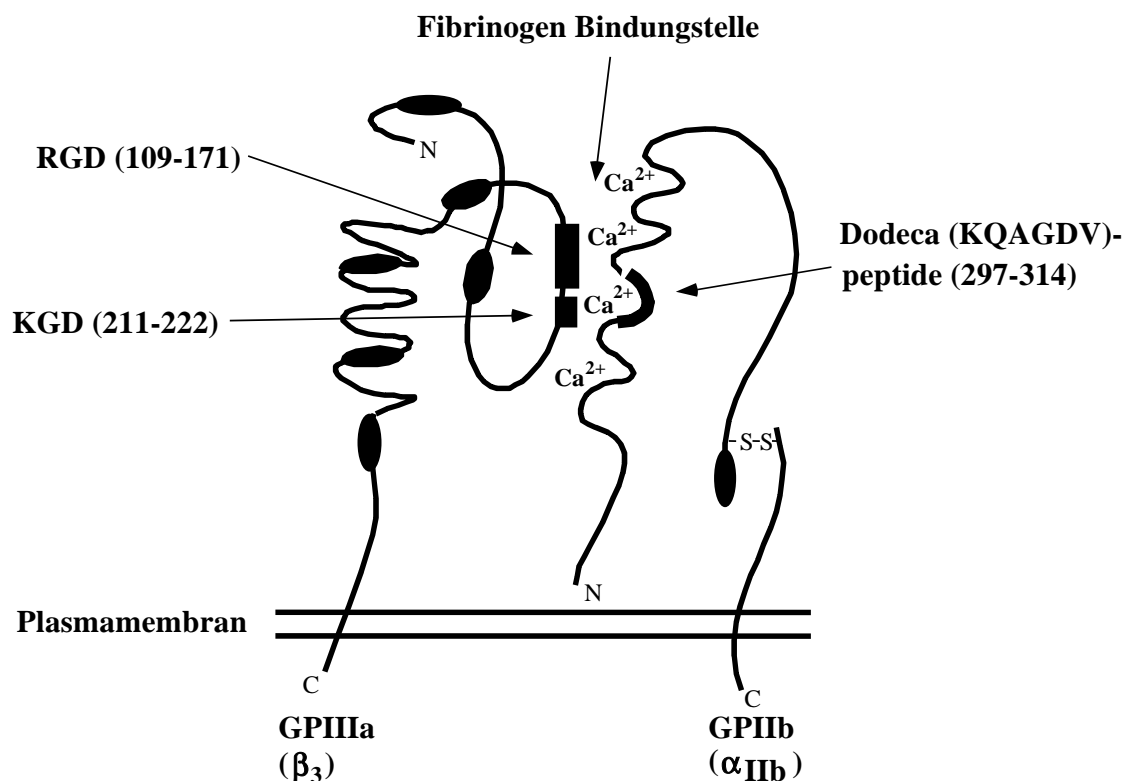


Abb 3: Struktur des GP IIb-IIIa: Der GPIIb-IIIa-Rezeptor besteht aus einer α -Untereinheit (GPIIb) und einer β -Untereinheit (GPIIIa).

Auf nicht-stimulierten Blutplättchen kann der GPIIb-IIIa-Komplex RGD-enthaltende, lösliche Glykoproteine (wie z.B. Fibrinogen, von-Willebrand-Faktor, Vitronektin oder Fibronektin) nicht binden. Durch Stimulierung der Thrombozyten mit Agonisten kommt es jedoch zur Konformationsänderung des GPIIb-IIIa-Rezeptors, wodurch eine Bindung von löslichem Fibrinogen ermöglicht wird (Plow 1992). Andererseits können kleine, RGD-enthaltende Peptide auch aktivierungsunabhängig direkt an den GPIIb-IIIa-Komplex binden (Plow 1992). Beide Bindungsmöglichkeiten führen zu einer weiteren Konformationsänderung des GPIIb-IIIa (Liganden besetzter Zustand) und damit zur Induktion von Liganden-induzierten Bindungsstellen (LIBS). Die RGD-Sequenz innerhalb von Liganden verursacht demnach sowohl die Bindung selbst als auch eine sekundäre Konformationsänderung, die zur Expression von kryptogenen Neoepitopen, wie LIBS führt (Plow 1992, Phillips 1991) (Abbildung 4).

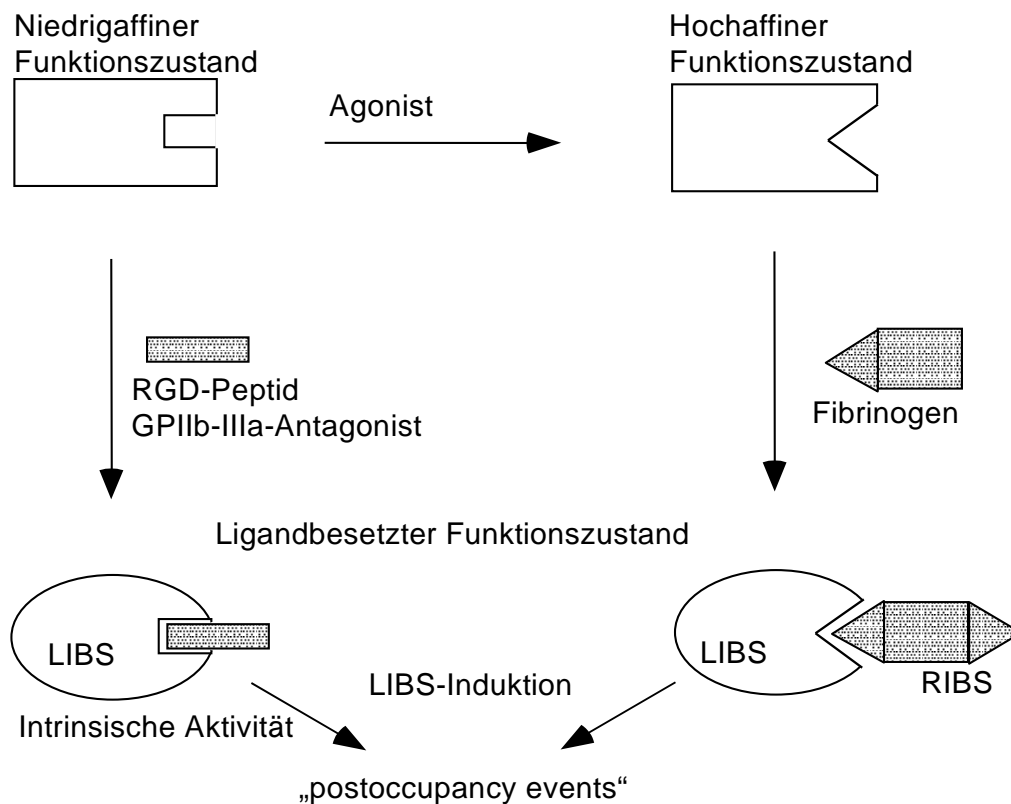


Abb 4: Aktivierungsstadien des GPIIb-IIIa: Nach Aktivierung ändert sich die Form des GPIIb-IIIa-Rezeptors und ermöglicht so die Bindung von Fibrinogen. Dadurch kommt es zu Konformationsänderungen mit Ausbildung von LIBS auf dem GPIIb-IIIa und von RIBS auf dem Fibrinogenmolekül. Die Ausbildung von LIBS kann ebenso direkt durch RGD-Peptide ohne vorherige Aktivierung des GPIIb-IIIa ausgelöst werden. LIBS: Liganden-induzierte Bindungsstelle; RIBS: Rezeptor-induzierte Bindungsstelle.

Weitere Membranglykoproteine der Thrombozyten sind die β 1-Integrine, die als Rezeptoren für Kollagen, Fibronectin und Laminin fungieren (Nurden 1994). Zwei nicht-Integrin-Rezeptoren, welche auch eine Rolle bei der Plättchenadhäsion spielen, sind das Leucin-reiche Glykoprotein Ib/IX/V (Rezeptor für den von-Willebrand-Faktor) und das Glykoprotein IV (GPIIb), ein Rezeptor für Kollagen und Thrombospondin (Nurden 1994). Ein angeborener Defekt des GP Ib/IX/V im Bernard-Soulier-Syndrom führt zu einem funktionellen Defekt der Plättchenadhäsion und zu einer erhöhten Blutungsneigung (Nurden 1994). P-Selektin (GMP-140, PADGEM, CD 62P) ist ein Membranglykoprotein, das in den α -Granula der Blutplättchen und in den Weibel-Palade-Körperchen der Endothelzellen lokalisiert ist. Durch Aktivierung der Blutplättchen kommt es zu einer Verschmelzung der α -Granula mit dem SCS und zur Expression von P-Selektin auf der Thrombozytenoberfläche (Nurden 1994). P-Selektin ist ein wichtiger Oberflächenrezeptor für die Interaktion von aktivierten Blutplättchen mit neutrophilen Granulozyten und Monozyten (Nurden 1994). Ein weiteres Glykoprotein (GP 53, CD 63) befindet sich in den thrombozytären Lysosomen und hat strukturelle Ähnlichkeit mit den lysosomalen integralen Membranproteinen (LIMPs) (Nurden 1994). Des Weiteren befinden sich auf der Thrombozytenoberfläche Immunglobulin-ähnliche Adhäsionsmoleküle, wie das „platelet-endothelial cell adhesion molecule“ (PECAM)-1 und das „intercellular adhesion molecule“ (ICAM)-2 (Nurden 1994). Einen Überblick über die Glykoproteine der Thrombozytenmembran gibt Tabelle 1.

Tab 1: Thrombozytäre Membranglykoproteine

Klassifikation	Elektrophoretische Einteilung	CD-Einteilung (Cluster of Determinants)	Anzahl der Rezeptoren	Liganden
Integrine				
$\alpha_2\beta_1$	GP Ia/Ia	CD49b	1000	Kollagen
$\alpha_5\beta_1$	GP Ic/IIa	CD49c	1000	Fibronektin
$\alpha_6\beta_1$	GP Ic`/IIa	CD49f	1000	Laminin
$\alpha_{Ib}\beta_3$	GP IIbIIIa	CD41-CD61	60 000-100 000	Fibrinogen Fibronektin v.Willebrand-Faktor Vitronektin
$\alpha_v\beta_3$	GP α_v /IIIa	CD51-CD61	100	Vitronektin Fibrinogen Fibronektin
Leucin-reiche Glykoproteine				
	GP Ib/V/IX	CD42a-b-c	25 000	v.Willebrand-Faktor
	GP IV	CD36	15 000-25 000	Kollagen Thrombospondin
Selektine				
	P-Selektin	CD62P	12 000	PSGL-1
Immunglobulin ähnliche Adhäsions-Rezeptoren				
	ICAM-2	CD102	5 000	LFA-1
	PECAM-1	CD31	3 000	?
Lysosomale Membranproteine				
	GP 53	CD63	3 000	?

1.2.4 Immunologische Marker

Die Markierung der Blutplättchen mit monoklonalen Antikörpern und ihre durchflusszytometrische Messung, erstmals beschrieben von Shattil et al (Shattil 1987), erlaubt die Beurteilung von thrombozytären Membranglykoproteinen und ist die derzeitige Methode der Wahl, um die funktionellen Aspekte der Thrombozyten zu überprüfen (Michelson 1996). Die Durchflusszytometrie erlaubt anderen Markern der Plättchenaktivierung gegenüber die Erkennung von spezifischen aktivierungsabhängigen Veränderungen auf der thrombozytären Membranoberfläche (Gawaz 1999).

Man unterscheidet folgende drei Gruppen von immunologischen Markern:

1.2.4.1 Marker für den GPIIb-IIIa

Die Verfügbarkeit von monoklonalen Antikörpern ermöglicht eine Beurteilung des Funktionszustands des GPIIb-IIIa-Rezeptors. Antikörper können sowohl im Ruhezustand, als auch im aktivierten oder Liganden-besetzten Zustand an den GPIIb-IIIa-Rezeptor binden (Gawaz 1999).

Durch die Verwendung von Echistatin als kleines, RGD-enthaltendes Polypeptid (und damit als nicht-Antikörper) kann die Zugänglichkeit der Fibrinogen-Bindungsstelle innerhalb des nicht-aktivierten GPIIb-IIIa-Komplexes überprüft werden. Der anti-CD41 bindet von außen an die GPIIb-Untereinheit des Rezeptors, während anti-CD61 an die GPIIIa-Untereinheit bindet (Gawaz 1999). Der Zustand mit hoher Affinität des aktivierten GPIIb-IIIa kann mit Hilfe des PAC-1 Antikörpers beurteilt werden, welcher spezifisch an den aktivierten, nicht aber an den nicht-aktivierten Komplex bindet (Taub 1989). Der Liganden-besetzte Zustand kann mit monoklonalen Antikörpern, welche spezifisch für Liganden-induzierte Bindungsstellen (LIBS) sind, beurteilt werden (LIBS-Epitope; LIBS-1 und PMI-1) (Ginsberg 1990). Diese Epitope werden nicht von Blutplättchen exprimiert, welche sich im Ruhezustand oder im aktivierten, nicht mit Liganden besetzten Zustand befinden. LIBS-Epitope befinden sich sowohl auf der GPIIb als auch auf der GPIIIa Untereinheit des Rezeptors. Ein PMI-1-Epitop befindet sich am Carboxy-Ende der schweren Kette des GPIIb (Plow 1992). Im Gegensatz zu PAC-1, wird die Bindung von LIBS-1 nicht durch verschiedene Liganden beeinträchtigt, die auch an den GPIIb-IIIa binden.

Eine andere Möglichkeit, um die aktivierten und mit Ligand besetzten Blutplättchen zu charakterisieren, ist die Verwendung von spezifischen monoklonalen Antikörpern, welche gegen Liganden des GPIIb-IIIa (z.B. anti-Fibrinogen oder anti-von-Willebrand-Faktor) gerichtet sind (Warkentin 1990). Diese Liganden sind dabei an den GPIIb-IIIa-Rezeptor gebunden. Ebenfalls eine Möglichkeit, um die Bindung von Liganden zu erkennen, ist die Benutzung von konformationsabhängigen Antikörpern, wie anti-RIBS (Rezeptor induzierte Bindungsstelle). Diese erkennen ausschließlich Rezeptor-gebundenes Fibrinogen, bei welchem sich eine Konformationsänderung im Ligand (im Gegensatz zu LIBS nicht im GPIIb-IIIa) ereignet hat und damit eine Bindungsstelle für anti-RIBS frei wurde (Ginsberg 1990). Da der GPIIb-IIIa-Rezeptor allerdings verschiedene Liganden binden kann, könnte die Messung von gebundenem Fibrinogen die Menge an gebundenen Liganden als zu niedrig einschätzen, wenn ein genügend hoher Prozentsatz des Rezeptors bereits von anderen Liganden besetzt ist, wie z.B. von von-Willebrand-Faktor (Gawaz 1999).

1.2.4.2 Marker für den GP Ib/IX/V

Das Glykoprotein Ib/IX/V kann durch spezifische Antikörper gegen diesen Komplex, wie anti-CD42a-b-c, registriert werden. Im Gegensatz zu den aktivierungsabhängigen monoklonalen Antikörpern, welche gegen den GPIIb-IIIa-Rezeptor gerichtet sind, ist die Bindung von GPIb-spezifischen Antikörpern an Thrombin-stimulierte Blutplättchen durch eine Internalisierung des Rezeptor-Komplexes in das SCS herabgesetzt (Michelson 1996).

1.2.4.3 Degranulationsmarker

Die Bindung von anti-P-Selektin Antikörpern zeigt spezifisch die Freisetzungsreaktion aus den thrombozytären α -Granula an. Die Bindung von anti-GP 53 dient dagegen der Beurteilung der Sekretion aus den Lysosomen (Nurden 1994).

Einige wichtige Degranulationsprodukte der Thrombozyten sind in Tabelle 2 dargestellt.

Tab 2: Thrombozytäre Degranulationsprodukte

Alpha-Granula	Dichte Granula	Lysosomale Granula
Fibrinogen	Serotonin	Saure Hydrolasen
Albumin	Kalzium	GP 53
von-Willebrand-Faktor	Magnesium	
Fibrinogen	ADP	
Thrombospondin	ATP	
P-Selektin		
Plättchenfaktor 4		
β -Thromboglobulin		
CD 40 Ligand		
(Die markierten Granula wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit gemessen)		

Einen Überblick über die verschiedenen immunologischen thrombozytären Oberflächenmarker geben Tabelle 3 und Abbildung 5.

Tab 3: Immunologische Marker

Oberflächenantigen	monoklonaler Antikörper	Aussage
GPIIb-IIIa	4F10, 2G12	Bestimmung der Oberflächenexpression des intakten GPIIb-IIIa-Komplexes
GPIIb-IIIa	anti-CD61	Oberflächenexpression der β_3 -Kette
	anti-CD41	Oberflächenexpression der α_{IIb} -Kette
	PAC-1	Nachweis des aktivierten Fibrinogenrezeptors
	LIBS-1, LIBS-2, LIBS-6,	
	PMI-1	Nachweis des ligandengebundenen GPIIb-IIIa
Fibrinogen	RIBS	Nachweis von gebundenem Fibrinogen
GPIb-V-IX	anti-CD42	Internalisierung nach Thrombin-Aktivierung
P-Selektin	anti-CD62P	Degranulation von α -Granula
GP-53	anti-CD63	Degranulation von Lysosomen

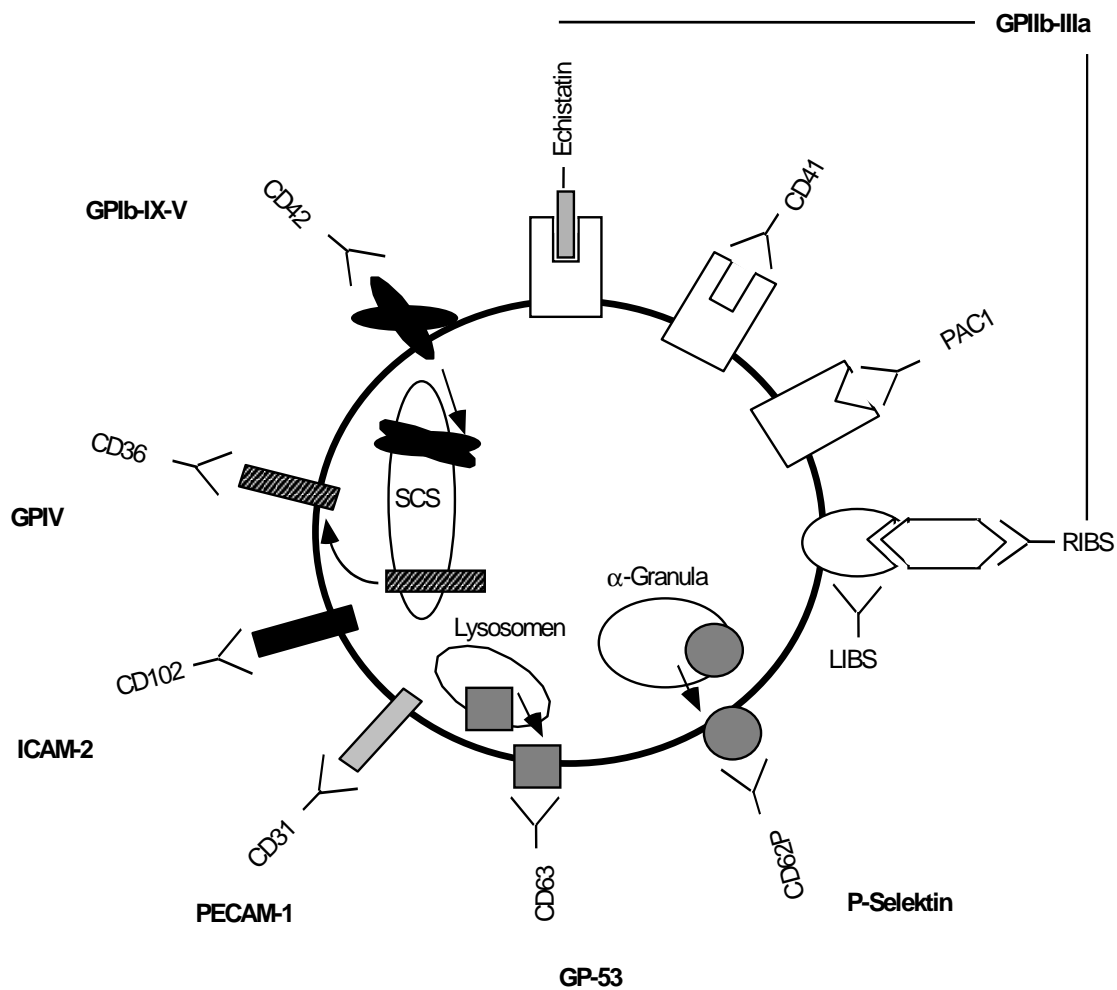


Abb 5: Immunologische Marker: Mit Hilfe monoklonaler Antikörper ist es möglich spezifische Funktionszustände des GPIIb-IIIa-Rezeptors zu unterscheiden (anti-CD41 = komplexierter GPIIb-IIIa; PAC-1 = aktivierter GPIIb-IIIa; LIBS = ligandenbesetzter GPIIb-IIIa). Antikörper gegen P-Selektin (anti-CD62P) und gegen GP53 (CD63) erkennen die Degradation der α -Granula bzw. der Lysosomen. Die Bindung von anti-CD42 nimmt durch Internalisierung des GPIb-Rezeptors nach Aktivierung ab.

1.3 Pathophysiologie der Thrombozyten

1.3.1 Atherogenese und Progression der Atherosklerose

Zahlreiche Studien belegen, dass Thrombozyten eine zentrale Rolle in der Pathogenese der ischämischen Herzerkrankung spielen (Becker 1993, Fuster 1988, Fuster 1992, Willerson 1989). Aufgrund ihrer Fähigkeit zur Exkretion zahlreicher biologisch aktiver Substanzen sind Thrombozyten zunächst vor allem in der Lage, einen fördernden Effekt auf die Atherogenese auszuüben (Badimon 1993, White 1994). Die α -Granula der Blutplättchen enthalten eine Vielzahl von mitogenen Wachstumsfaktoren, wie z.B. „platelet-derived growth factor“ (PDGF) und „transforming growth factor“ (TGF) (Siess 1989). Diese Wachstumsfaktoren bewirken eine Einwanderung und Proliferation von glatten Muskelzellen und eine Intima-Proliferation der Blutgefäße an Stellen mit erhöhter Aktivität der Blutplättchen (Ross 1993). Darüber hinaus können die koronaren Risikofaktoren über eine Beeinflussung der Thrombozytenfunktion zur Atherogenese beitragen. Die Veränderung der Plättchenfunktion bei Diabetikern resultiert wahrscheinlich aus einer primären Freisetzung von größeren Blutplättchen mit erhöhter Oberflächendichte an thrombozytären Membranglykoproteinen (Tschoepe 1991). Eine Hypercholesterinämie ist verbunden mit einem Anstieg der Fibrinogen-Bindung an aktivierte Blutplättchen und einer angestiegenen Degranulation des P-Selektins (Pawlowska 1993, Andrioli 1996). Die koronaren Risikofaktoren könnten so durch einen systemischen Anstieg von Aktivierung und Degranulation von zirkulierenden Blutplättchen frühe Mechanismen der Atherogenese induzieren (Gawaz 1999).

1.3.2 Akute Koronarsyndrome

Der Begriff des akuten Koronarsyndroms umfasst ein klinisches Spektrum akuter oder rasch fortschreitender Symptome einer myokardialen Ischämie, das von der instabilen Angina pectoris über den nicht-transmuralem Myokardinfarkt (Nicht-Q-Zacken-Infarkt) bis zum akuten transmuralen Myokardinfarkt (Q-Zacken-Infarkt) reicht (Theroux 1998). Die Übergänge hierbei sind fließend. Im Gegensatz zur stabilen Angina pectoris, die im Allgemeinen durch eine verringerte Sauerstoffversorgung des myokardialen Gewebes, bedingt durch eine stabile atherosklerotische Gefäßeinengung hervorgerufen wird, kann es nach unterschiedlich langer Latenzzeit durch akute Veränderungen im atherosklerotisch veränderten Blutgefäß (z.B. durch

Einrisse eines atheromatösen Plaques) zur Freilegung subendothelialer, thrombogener Strukturen kommen (Willerson 1989). Die dadurch bedingte Plättchenaktivierung kann zur plötzlichen Stenosenbildung oder zu Gefäßverschlüssen durch intravasale Thrombosierung führen. Dies bildet die pathophysiologische Grundlage der akuten Koronarsyndrome (Schafer 1979, Willerson 1989). Die Bildung des intravasalen Thrombus im Bereich des rupturierten Plaques ist ein sehr komplexer Vorgang mit Ineinandergreifen von verschiedensten thrombozytären und koagulatorischen Prozessen. Thrombozyten spielen dabei die zentrale Rolle und regulieren durch Interaktion mit Gerinnungsvorgängen die Thrombusbildung (Fuster 1992). Neben der Bildung des thrombotischen Gefäßverschlusses sind Blutplättchen auch an Mikroembolisation und Vasokonstriktion, Plaqueprogression und systemischer Entzündungsreaktion beteiligt. Dies sind Mechanismen, welche die Prognose akuter Koronarsyndrome entscheidend beeinflussen (Fuster 1992).

1.3.3 Fibrinolyse im akuten Myokardinfarkt

Die intravenöse Thrombolyse ist die weitverbreitete Standardtherapie des akuten Myokardinfarktes und führt zur signifikanten Reduktion der Sterblichkeit nach akutem Myokardinfarkt.

Bei bis zu 50% der Patienten kommt es jedoch nicht zu einer befriedigenden Reperfusion des Infarktgefäßes (Califf 1999, Hudson 1999). Eine weitere Limitation der Effektivität der Thrombolyse besteht darin, dass es bei 5% bis 15% der Fälle, trotz initial erfolgreicher Wiedereröffnung des Infarktgefäßes, zum Wiederverschluss kommt, was mit einer hohen Mortalitätsrate verbunden ist (Califf 1999). Eine erhöhte intravasale Plättchenaktivierung scheint den Erfolg der fibrinolytischen Reperfusion und das Auftreten von Reokklusionen entscheidend zu beeinflussen (Bihour 1995, Topol 1998). In ihren Arbeiten konnten Fitzgerald und Mitarbeiter zeigen, dass es während und nach der Thrombolyse zur gesteigerten Bildung von Thromboxan A₂ und zur Freisetzungsreaktion aus aktivierten Thrombozyten kommt (Fitzgerald 1986). Während der Fibrinolyse kommt es zur Auflösung der Fibrinquer- vernetzungen des Koronarthrombus mit Freisetzung von freiem Thrombin (Collen 1995, Gillis 1995). Freies Thrombin wiederum führt zur verstärkten Plättchenaktivierung in der Umgebung eines lysierten Thrombus. Fibrinolytika, wie Streptokinase oder rekombinanter „tissue plasminogen activator“ (rtPA), mit welchem die Patienten in der vorliegenden Arbeit behandelt wurden, führen auch direkt zur Aktivierung von Blutplättchen (Bertolino 1992).

Diese Untersuchungen machen wahrscheinlich, dass eine adjuvante antithrombozytäre Therapie innerhalb der ersten 24 Stunden den Erfolg der Thrombolyse unterstützen kann. Seit langem ist bekannt, dass Acetylsalicylsäure (ASS) den Erfolg der Thrombolysebehandlung entscheidend verbessert und deshalb auch derzeit die antithrombozytäre Standardtherapie bei der Thrombolyse darstellt. ASS besitzt jedoch eine verhältnismäßig schwache antiaggregatorische Wirkung und beeinflusst die Freisetzungsreaktion und Fibrinogenrezeptoraktivierung der Blutplättchen nur wenig (Patrono 1994, Braun 1994). Neuere antithrombozytäre Substanzen wie die GPIIb-IIIa-Antagonisten und Clopidogrel weisen eine deutlich stärkere Hemmung der Thrombozytenaggregation auf als ASS. Gegenwärtig wird die Wirksamkeit der adjuvanten Gabe von Fibrinogenrezeptorantagonisten bei Thrombolyse im akuten Myokardinfarkt in klinischen Studien untersucht.

1.4 Antithrombozytäre Substanzen

In der Vergangenheit wurde ein Vielzahl von Medikamenten entwickelt, die diskrete Mechanismen der Thrombozyten beeinflussen. Eine Vielzahl derzeit gebräuchlicher Substanzen beeinflussen intrazelluläre Aktivierungsschritte (Erhöhung der zyklischen Nukleotide, Inhibierung der Zyklooxygenase) und haben dadurch eine Hemmwirkung. Andere Substanzen greifen direkt im Bereich der Thrombozytenoberfläche an und verhindern so diskrete Aktivierungswege (z.B. ADP-Aktivierung) oder die Aggregation (GPIIb-IIIa-Antagonisten) (Cannon 1995, Collier 1995, Coukell 1997, Schrör 1995).

Es lassen sich die folgenden drei Gruppen von antithrombozytären Substanzen unterscheiden:

1.4.1 Acetylsalicylsäure

1954 wurde von Bounameaux die Wirkung der Acetylsalicylsäure auf die Thrombozyten beschrieben und 1971 der inhibitorische Effekt auf die Thromboxan-Synthese erkannt. Seither wurde die antithrombotische Wirksamkeit bei kardiovaskulären Erkrankungen in einer Vielzahl klinischer Studien unter Einschluss von insgesamt mehr als 30.000 Patienten belegt.

Der Einsatz von ASS gilt als „Goldstandard“ in der Therapie und Prophylaxe atherothrombotischer Krankheitsbilder (Cohen 1976, Patrono 1994).

1.4.2 Thienopyridine

Experimentelle und klinische Studien belegen die Bedeutung der ADP-induzierten Thrombozytenaktivierung für die arterielle Thrombose, besonders unter hohen Strömungsbedingungen und bei gestörter Endothelfunktion. Seit mehr als 15 Jahren ist bekannt, dass Thienopyridine, zu denen die Substanzen Ticlopidin und Clopidogrel zählen, durch ihren Einfluss auf die ADP-induzierte Thrombozytenaktivierung wirkungsvoll arterielle Thrombosen unterdrücken (Coukell 1997, Harker 1993, Herbert 1993).

1.4.3 GPIIb-IIIa-Antagonisten

Durch die Blockierung des GPIIb-IIIa-Rezeptors besteht die Möglichkeit die Thrombozytenaggregation selektiv zu hemmen und damit der Bildung von plättchenreichen Thromben in einem frühen Stadium entgegenzuwirken. Die Blockade der Fibrinogenbindungsstelle durch GPIIb-IIIa-Antagonisten führt, unabhängig von der Art der Aktivierung, zur effektiven Hemmung der Fibrinogenbindung am GPIIb-IIIa-Rezeptor und dadurch zur Aggregationshemmung. Während das Wirkprinzip aller derzeit verfügbaren GPIIb-IIIa-Antagonisten identisch ist, unterscheiden sich die strukturellen, pharmakologischen Eigenschaften und die Spezifität der einzelnen Antagonisten erheblich (Coller 1995, Mousa 1996, Madan 1998). Um diese unterschiedlichen pharmakologischen Effekte der GPIIb-IIIa-Antagonisten auf die Thrombozytenfunktion zu überprüfen und daraus Erkenntnisse über eine erweiterte klinische Anwendung zu erhalten, wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit folgende klinisch relevanten GPIIb-IIIa-Antagonisten untersucht (Tabelle 4).

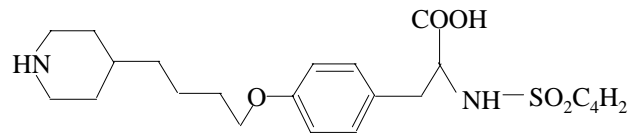
Tab 4: Untersuchte GPIIb-IIIa-Antagonisten

Substanz	chemische Gruppe	Applikationsform
Abciximab	chimärer Mab-Fab	i.v.
Integrelin	zyklisches KGD-Peptid	i.v.
Lamifiban	RGD-Peptidomimetikum	i.v.
Tirofiban	RGD-Peptidomimetikum	i.v.
YM 337	Humanisierter Mab-Fab	i.v.
EMD 122347	Peptidomimetisches prodrug	oral

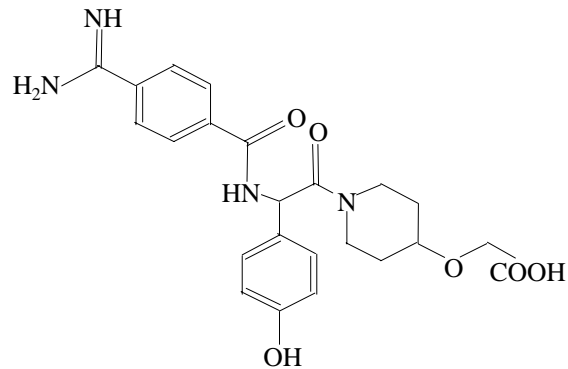
Abciximab ist ein chimäres Derivat des monoklonalen Antikörpers 7E3, welcher gegen den GPIIb-IIIa-Komplex gerichtet ist. Das Fc-Fragment wurde vom kompletten Antikörper abgespalten, so dass Abciximab nur den Fab-Anteil aufweist. Zusätzlich wurde der größte Teil des unspezifischen murinen Fab-Anteils durch einen menschlichen Fab-Anteil ersetzt. Integrelin ist ein über Disulfidbrücken verbundenes zyklisches Peptid mit sieben Aminosäuren (Heptapeptid) und weist die Aminosäuresequenz KGD auf. Integrelin bindet im Bereich der RGD-Bindungsregion des GPIIb-IIIa-Rezeptors. Lamifiban und Tirofiban (MK383) sind nicht-peptische Moleküle. Im Gegensatz zu Integrelin, welches durch seine RGD-ähnliche Molekülstruktur mit der Fibrinogenbindungsstelle konkuriert, imitieren die nicht-peptischen Antagonisten die geometrischen, stereotaktischen und Oberflächenladungseigenschaften der RGD-Sequenz und hemmen dadurch die Fibrinogenbindung (Coller 1995, Mousa 1996).

Die Strukturformeln von Integrelin, Lamifiban und Tirofiban, sowie die Struktur von Abciximab sind in Abbildung 6 dargestellt.

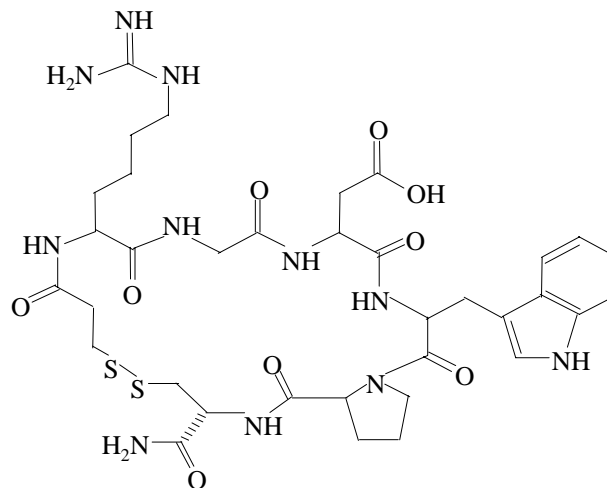
Tirofiban



Lamifiban



Integrelin



Abciximab

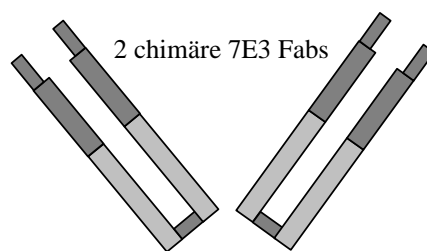


Abb 6: Strukturformeln verschiedener GPIIbIIIa-Antagonisten: Lamifiban und Tirofiban sind nicht-peptische Moleküle. Integrelin ein über Disulfidbrücken verbundenes zyklisches Peptid. Abciximab ist ein chimäres Derivat des monoklonalen Antikörpers 7E3, welcher gegen den GPIIb-IIIa-Komplex gerichtet ist. Das Fc-Fragment wurde vom kompletten Antikörper abgespalten, so dass Abciximab nur den Fab-Anteil aufweist.

YM 337 und EMD 122347 zählen zu den neueren GPIIb-IIIa-Antagonisten. YM 337 ist ein Fab-Fragment eines humanisierten monoklonalen Antikörpers gegen GPIIb-IIIa. EMD 122347 dagegen ist ein peptidähnlicher GPIIb-IIIa-Antagonist mit Benzamidinoxazolidinon Struktur, welcher enteral resorbiert werden kann und somit für die orale Gabe geeignet ist (Kuwahara 1998, Kamm 1999, Thomasberger 1999). H12 und GRGDSP gehören zu den nicht klinisch relevanten Substanzen und wurden im Rahmen dieser Studie als Vergleichswerte mitgeführt. H12 ist ein KQAGDV-Peptid und bindet an die KQAGDV-Bindungsregion, während das RGD-Peptid GRGDSP an die RGD-Bindungsregion des GPIIb-IIIa-Rezeptors bindet (Coller 1995, Mousa 1996).

1.5 Antithrombozytäre Therapie und koronare Herzerkrankung

1.5.1 Therapie der akuten Koronarsyndrome

Den therapeutischen Nutzen von ASS bei instabiler Angina pectoris belegen im wesentlichen vier große plazebokontrollierte Studien: Die „Veterans Administration Cooperative Study“ (Lewis 1983), die „Kanadische Multicenterstudie“, die „Montreal Heart Institute Study“ (Theroux 1988) und die RISC-Studie (The RISC-Group 1990). Die Ergebnisse dieser Studien zeigen, dass bei Patienten mit instabiler Angina pectoris ein hochsignifikanter kardioprotektiver Effekt von ASS vorliegt. Den überzeugendsten Nachweis des präventiven Nutzens von ASS bei akutem Myokardinfarkt erbrachten die zwei großen internationalen Studien ISIS-2 und ISIS-3. Die Ergebnisse zeigen, dass die frühzeitige Gabe von ASS die Letalität und Reinfarkthäufigkeit bei akutem Myokardinfarkt senkt. Trotz nachgewiesener Wirksamkeit von ASS in der Behandlung akuter Koronarsyndrome bleibt ein großer Teil behandelter Patienten, bei denen unter der konventionellen antithrombotischen Therapie kein zufriedenstellender Therapieerfolg zu erzielen ist.

Die Entwicklung potenter Aggregationshemmer in Form der GPIIb-IIIa-Antagonisten hat das Spektrum der zur Verfügung stehenden antithrombozytären Substanzen erweitert und die Behandlung akuter Koronarsyndrome in jüngster Zeit entscheidend verbessert. In klinischen Studien der Phase III konnte für die GPIIb-IIIa-Antagonisten Abciximab, Lamifiban und Integrelin gezeigt werden, dass die Substanzen gut verträglich sind und bei Patienten mit instabiler Angina pectoris ischämische Komplikationen deutlich reduzieren können.

Aus den Studien mit Tirofiban (The PRISM-Investigators 1998, the PRISM-PLUS-Investigators 1998) ergibt sich, dass durch zusätzliche Gabe des GPIIb-IIIa-Antagonisten zur Standardtherapie, bestehend aus ASS und Heparin, unabhängig von der weiteren Therapie das Mortalitäts- und Morbiditätsrisiko von Patienten mit akutem Koronarsyndrom günstig beeinflusst werden kann. In der CAPTURE-Studie wurde die Wirksamkeit von Abciximab bei Patienten mit refraktärer instabiler Angina pectoris untersucht (The CAPTURE-Investigators 1997). In der PURSUIT-Studie wurde die Wirksamkeit von Integrelin und in der PARAGON-Studie die Wirksamkeit von Lamifiban bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom überprüft. (The PURSUIT-Investigators 1998, The PARAGON-Investigators 1998).

Nach zusammenfassender Analyse dieser Studien zeigte sich, dass durch den Einsatz von GPIIb-IIIa-Antagonisten beim akuten Koronarsyndrom eine signifikante Verbesserung der medikamentösen Therapie erzielt werden kann. Entscheidend für den zukünftigen Einsatz von GPIIb-IIIa-Antagonisten zur Behandlung akuter Koronarsyndrome ist nicht zuletzt aus ökonomischer Sicht die Identifizierung von „Hoch-Risiko-Patienten“, die von GPIIb-IIIa-Antagonisten am meisten profitieren.

1.5.2 Fibrinolyse-therapie des akuten Myokardinfarkt

Die antithrombozytäre Therapie besitzt einen herausragenden Stellenwert in der Fibrinolyse-therapie des akuten Myokardinfarktes. Trotz nachgewiesener Wirksamkeit von ASS in Verbindung mit Fibrinolytika besteht weiterhin das Problem, dass der Koronarfluss unter herkömmlicher fibrinolytischer Therapiestrategie sich nur suboptimal wiederherstellen lässt (Califf 1999, Cannon 1999).

Da die am Myokardinfarkt beteiligten Thromben einen sehr hohen Gehalt an Thrombozyten aufweisen, könnte durch den Einsatz von potenten GPIIb-IIIa-Antagonisten in Kombination mit Fibrinolytika ein zusätzlicher Nutzen erwartet werden. In Tierversuchen konnte gezeigt werden, dass die adjuvante Verabreichung von GPIIb-IIIa-Antagonisten zur fibrinolytischen Therapie die Zeit bis zur Reperfusion beschleunigt und die Reokklusion verhindert (Gold 1988, Kawasaki 1998). Selbst die alleinige Gabe von GPIIb-IIIa-Antagonisten besitzt in Abwesenheit von exogenen Fibrinolytika thrombolytische Wirksamkeit (Gold 1997). Diese Befunde waren Ausgangspunkt für weiterführende klinische Patientenstudien, wie die TIMI-8-Pilotstudie, die IMPACT-AMI-Studie, die PARADIGM-Studie und die TIMI-14-Studie (Cannon 1999, The IMPACT-AMI-Investigators 1997, The PARADIGM-

Investigators 1998, Antman 1999). Zusammenfassend lässt sich aus den Ergebnissen dieser Studien folgern, dass GPIIb-IIIa-Antagonisten die Thrombolyse beschleunigen und eine Reduzierung der Fibrinolytikumdosis ermöglichen. In der laufenden SPEED-Studie erhalten Patienten mit akutem Myokardinfarkt randomisiert entweder Abciximab plus Reteplase in reduzierter Dosis oder Abciximab allein (Califf 1999, Ohman 1998). Die Daten der TIMI-14-Studie und der SPEED-Studie bilden die Grundlage für eine groß angelegte Studie GUSTO-IV, in der die Wirksamkeit und Sicherheit von Abciximab mit niedrigdosierten Fibrinolytika untersucht wird. Bis endgültige Ergebnisse dieser Studien vorliegen, wird der Einsatz von GPIIbIIIa-Antagonisten in Verbindung mit Fibrinolytika derzeit nicht empfohlen.

In der vorliegenden Arbeit soll geprüft werden, zu welchem Zeitpunkt der Fibrinolysetherapie und in welchem Ausmaß es zu messbaren Aktivitätssteigerungen der Thrombozyten kommt, um dadurch zu klären, wann und wie lange die Gabe von antithrombozytären Substanzen am sinnvollsten ist.

1.6 Pharmakologisches Monitoring der antithrombozytären Therapie

Eine wirkungsvolle antithrombozytäre Therapie ist ein wesentliches Behandlungsziel bei der koronaren Herzerkrankung. Hilfreich in der Entwicklung neuer antithrombozytärer Therapiestrategien ist ein zuverlässiges pharmakologisches Monitoring. Neben klassischen aggregatorischen Funktionsuntersuchungen haben sich zur Beurteilung der pharmakologischen Wirksamkeit antithrombozytärer Behandlungsformen durchflusszytometrische Nachweisverfahren etabliert (Coller 1998, Cox 1998). Im Gegensatz zu ASS oder den Thienopyridinen, welche irreversibel die Funktion der Blutplättchen über deren gesamte Lebenszeit hinweg blockieren, ist die Blockade des Fibrinogenrezeptors durch die überwiegende Zahl der GPIIb-IIIa-Antagonisten ein reversibler Prozess und abhängig von der aktuellen Plasmakonzentration (Patrono 1994, Coukell 1997, Mousa 1996). Um einen effektiven antithrombotischen Schutz durch Hemmung des GPIIb-IIIa-Rezeptors zu erhalten, müssen daher ständig über 80% der Gesamtzeptorzahl blockiert werden. Eine niedrigere Blockade zeigt keine zuverlässige antithrombozytäre Wirksamkeit. Höhere Rezeptorblockierungen (über 90%) erhöhen das Blutungsrisiko. Die Hemmung der Plättchenaggregation durch niedermolekulare Fibrinogenrezeptorantagonisten korreliert mit dem Grad der GPIIb-IIIa-Rezeptorblockade in einer steilen Dosis-Wirkungs-Beziehung, welche die Dosierung der Fibrinogenrezeptorantagonisten erschwert (Coller 1998, Cox 1998). Bei den meisten GPIIb-IIIa-Antagonisten führen

kleine Veränderungen der effektiven Plasmakonzentration des Inhibitors zu großen Variationen der Aggregation (Coller 1998). Aus diesem Grund wird der zunehmende Einsatz von GPIIb-IIIa-Antagonisten, insbesondere die Langzeittherapie mit oralen Antagonisten, ein zuverlässiges pharmakologisches Monitoring erfordern.

Gegenwärtig wird die Wirksamkeit der Therapie mit GPIIb-IIIa-Antagonisten anhand der ADP-induzierten Aggregation im Aggregometer überprüft. Die Gabe eines GPIIb-IIIa-Antagonisten führt dabei zu einer raschen Hemmung der ADP-induzierten Aggregation (Coller 1998). Der Grad der Aggregationshemmung ist abhängig von der GPIIb-IIIa-Rezeptorblockade, welche durchflusszytometrisch mittels fluoreszeinkonjugierten GPIIb-IIIa-Antagonisten (z.B. c7E3-FITC) oder einem fluoreszeinkonjugierten GPIIb-IIIa-Liganden (z.B. Echistatin-FITC) bestimmt werden kann (Coller 1998, Cox 1998). Während die ADP-induzierte Aggregation fast vollständig durch z.B. Abciximab gehemmt werden kann, läßt sich die TRAP (Thrombin Rezeptor Activating Peptide)-induzierte Aggregation nur sehr unvollständig hemmen. Dies könnte klinisch von Bedeutung sein bei Patienten mit erhöhter Thrombinaktivität (z.B. bei Fibrinolysetherapie). Inwieweit zwischen den verfügbaren GPIIb-IIIa-Antagonisten Unterschiede in der Thrombin-(TRAP)-induzierten Aggregation bestehen, kann durch pharmakologisches Monitoring mittels aggregometrischer und durchflusszytometrischer Methoden überprüft werden (Coller 1998, Cox 1998).

2 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es in einer klinischen Studie den Einfluss der Fibrinolyse-therapie bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt auf die Thrombozytenfunktion und Thrombozytenaktivierung zu untersuchen. Dabei soll sowohl der Grad der Thrombozytenaktivierung, als auch der zeitliche Ablauf bestimmt werden. Die unterschiedliche Beeinflussung der Thrombozyten soll durch die Messung folgender Thrombozytenfunktionen überprüft werden:

- a) Plättchenaggregation
- b) Degranulation der Blutplättchen
- c) Exposition thrombozytärer Membranproteine

Desweiteren soll in einer experimentellen Studie der Effekt unterschiedlicher GPIIb-IIIa-Antagonisten auf die Thrombozytenfunktion untersucht werden, um die Wirkprinzipien für eine erweiterte therapeutische Nutzung zu prüfen.

Es sollen dazu die Auswirkungen der GPIIb-IIIa-Antagonisten auf die folgenden Funktionen der Thrombozyten untersucht werden:

- a) Plättchenaggregation (primäre und sekundäre Aggregation)
- b) Degranulation der Blutplättchen
- c) Exposition thrombozytärer Membranproteine
- d) Plättchenadhäsion

Zusätzlich sollen die Auswirkungen der GPIIb-IIIa-Antagonisten speziell auf den GPIIb-IIIa-Rezeptor untersucht werden. Dazu werden rekombinante Zellen verwendet, welche speziell den GPIIb-IIIa-Rezeptor exprimieren.

3 Patienten und Methodik

3.1 Patientenuntersuchung

3.1.1 Studienpopulation

In der klinischen Studie wurde die Thrombozytenaktivität im Verlauf der Fibrinolyse-therapie bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt untersucht. Es wurden insgesamt acht Patienten in die Studie aufgenommen. Einschlusskriterien für diese Studie waren: Nachweis eines akuten Myokardinfarktes aufgrund klinischer Symptome zusammen mit infarkttypischen EKG-Veränderungen und/oder Anstieg von Myokardenzymen im Blut. Von der Studie ausgeschlossen wurden Patienten mit einem erhöhten Blutungsrisiko, Blutgerinnungsstörungen oder Erkrankungen, die mit einer Störung der Thrombozytenfunktion einhergehen, wie im Folgenden aufgeführt:

- Sepsis, chronische Entzündungen
- Blutungsanamnese, bekannte Thrombozytenfunktionsstörung, Gerinnungsstörung oder bekannte Thrombozytopenie, Heparin-Unverträglichkeit oder –allergie einschließlich einer Heparin-induzierten Thrombozytopenie
- Zustand nach kardiopulmonaler Wiederbelebung
- Schwere Traumen innerhalb der letzten sechs Monate, größere chirurgische Eingriffe innerhalb der letzten vier Wochen, invasive Eingriffe innerhalb der letzten 14 Tage, koronare Angioplastie innerhalb der letzten sechs Monate oder koronarer Bypass im letzten Monat
- Aktive peptische Ulzera
- Anhaltende Hypertension mit Werten von systolisch >180 mmHg und/oder diastolisch 110 mmHG zu Beginn der Studie
- Akutes Lungenödem, schwere Herzinsuffizienz (NYHA III-IV) oder kardiogener Schock
- Chronisches Nierenversagen
- Zerebrale Erkrankungen
- Verdacht auf Perikarditis oder hämodynamisch signifikante Herzklappenerkrankung, angeborene Herzfehler, hypertrophe und/oder restriktive Kardiomyopathie, Verdacht auf Aortendissektion
- klinisch bedeutsame systemische Erkrankung
- Schwangere, Stillende oder Frauen im gebärfähigen Alter

Anamnese, Untersuchung und Aufklärung der Patienten erfolgte durch den diensthabenden Arzt. Alle Patienten wurden vor Studienbeginn aufgeklärt und gaben eine Einverständniserklärung bezüglich ihrer Studienteilnahme. Die Genehmigung des Studienprotokolls durch die Ethikkommission der Technischen Universität München lag vor.

Eine Übersicht über die Laborwerte der Studiengruppe gibt Tabelle 5.

Tab 5: Laborparameter der Studienpatienten (n=8)

	Mittelwert \pm SD	Referenzwerte
Leukozyten ($10^9/l$)	11,5 \pm 3,0	4-10
Hämoglobin (g/dl)	12,9 \pm 1,4	13-18
Thrombozyten ($10^9/l$)	245,3 \pm 92	150-450
GOT (ASAT) (U/l)	27,4 \pm 4,0	<18
LDH (U/l)	321,9 \pm 21,4	80-240
CRP (mg/dl)	1,2 \pm 0,4	<0,5
Fibrinogen(mg/dl)	303,3 \pm 56,7	200-450
Creatinkinase (U/l)	273 \pm 94,5	<80
CK max. (U/l)	873,7 \pm 190,1	

Die demographischen Daten der Studienpatienten sind in Tabelle 6 aufgeführt.

Tab 6: Demographische Daten der Studienpatienten (n=8)

Geschlecht (M/W)	7/1
Alter (J), (Mittelwert \pm SD)	59,3 \pm 14,4
Koronare Herzkrankheit,n (%)	
1-Gefäß	3 (38)
2-Gefäße	3 (38)
3-Gefäße	2 (25)
Koronares Risikoprofil,n (%)	
Hypercholesterinämie	6 (75)
Hypertonus	7 (88)
Nikotinabusus	3 (38)
Diabetes melitus	1 (13)
Adipositas	5 (63)
Anamnestischer Myokardinfarkt,n (%)	2 (25)
Frühere PTCA,n (%)	1 (13)
Frühere Stentimplantation,n (%)	1 (13)
Prä-Medikation,n (%)	
ASS	8 (100)
β -Blocker	2 (25)
Nitrate	2 (25)

3.1.2 Antithrombozytäre Therapie der Studienpatienten

Die Studienpatienten bekamen einen intravenösen Bolus von 5.000 I.E. Heparin gefolgt von einer kontinuierlichen Verabreichung von 800 bis 1000 I.E Heparin pro Stunde intravenös. Nach etwa 48 Stunden wurden die Patienten mit zwei mal täglich 7.500 I.E. Heparin subkutan antikoaguliert. Zusätzlich wurden sofort nach Krankenseinlieferung 300 bis 500 mg Acetylsalicylsäure (Aspisol[®]) intravenös verabreicht. An den nachfolgenden Tagen

erfolgte eine orale Applikation von 100 mg Acetylsalicylsäure pro Tag. Die Thrombolysetherapie erfolgte im Mittel etwa 30 Minuten nach Krankenhausaufnahme durch eine Bolus-Gabe von 15 mg eines Gewebs-Plasminogen-Aktivators (rt-PA = rekombinant tissue plasminogen activator = Alteplase[®]), gefolgt von einer 30-minütigen intravenösen Infusion von 50 mg. Anschließend erfolgte eine zweite Infusion von 35 mg Alteplase über 60 Minuten, bis eine Maximaldosis von 100 mg erreicht wurde.

3.1.3 Probengewinnung

Den Patienten wurde zu insgesamt sechs verschiedenen Zeitpunkten Blut abgenommen:

- vor Beginn der Lysetherapie
- 90 Minuten nach Lysebeginn
- sechs Stunden nach Lysebeginn
- nach einem Tag
- nach zwei Tagen
- nach drei Tagen

Durch dieses Protokoll war es möglich, Veränderungen im peripheren Blut während der Gabe des Fibrinolytikums und über einen längeren Zeitraum danach zu messen. Die Proben wurden jeweils langsam aus einer Oberarmvene bei mäßiger Stauung abgenommen. Dabei wurde für die durchflusszytometrische Messung in ein Röhrchen 5 ml Blut abgenommen, das mit 2,8% Zitrat antikoaguliert wurde (Zitrat-Blut). Für die aggregometrische Messung wurden 10 ml Zitrat-Blut abgenommen. Ein 2 ml EDTA-Röhrchen wurde zur Bestimmung von Thrombozytenzahl, Hämoglobin, Hämatokrit und weiteren Laborparametern entnommen. Die Zitrat-Blut-Röhrchen wurden sofort nach der Abnahme auf Eis gelagert und innerhalb 30 Minuten weiterverarbeitet. Die Bestimmungen der Laborparameter aus den EDTA-Röhrchen erfolgte durch die Abteilung für Klinische Chemie unserer Klinik.

3.1.4 Probenweiterverarbeitung

Plättchen-reiches Plasma (PRP) wurde aus Zitrat-Blut durch Zentrifugation hergestellt (200g bei 20°C für 10 Minuten). Der PRP-haltige Überstand wurde daraufhin mit einer Eppendorf-Pipette (Fa. Eppendorf, Hamburg, Deutschland) abgenommen, in ein 15 ml Kunststoffgefäß (Falcon, Fa. Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland) umgefüllt und dort durch leichte Bewegung vermischt. Von dem gewonnenen PRP wurden 20 µl für die Durchflusszytometrie verwendet, der Rest war für die Aggregometrie vorgesehen. Um Plättchen-armes Plasma (PPP) herzustellen, wurden 2 ml PRP in ein 2 ml Eppendorf-Gefäß umgefüllt und bei 2000g drei Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde die Thrombozytenzahl des PRP im Zählgerät (Fa. Sysmex, Norderstadt, Deutschland) bestimmt und durch Zugabe von PPP auf eine konstante Plättchenzahl von 2×10^8 pro µl eingestellt.

Für die Aggregometrie wurden jeweils 450 µl PRP in silikonisierte Glasküvetten (Fa. Bio/Data, Horsham, USA) gegeben und 50 µl Chrono-Lume (Fa. Nobis, Endingen, Deutschland) hinzugefügt. Als Referenzwert diente eine zweite Glasküvette, die mit 500 µl PPP gefüllt wurde. Die aggregometrische Messung erfolgte sofort im Anschluss. Für die Durchflusszytometrie wurden 20 µl des PRP mit 1980 µl PBS-Puffer (Fa. Sigma, Deisenhofen, Deutschland) verdünnt (Verdünnung 1:100). Man gab in vorher beschriftete Kunststoffröhrchen (Firma Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland) mittels Eppendorf-Pipetten jeweils 5 µl des Antikörpers CD 42-PE bzw. CD40L-PE, 5 µl eines spezifischen, FITC-gefärbten, monoklonalen Antikörpers und 35 µl verdünntes PRP. Jeder Probe wurde ein Agonist in Form von 5 µl ADP (100 µM), 5 µl TRAP (=Thrombin-Rezeptor-Aktivating-Peptide) (250 µM) oder 5 µl Thrombin (2,2 U/ml) (Fa. Sigma, Deisenhofen, Deutschland) zugegeben bzw. als unstimulierter Referenzwert 5 µl PBS. Auf diese Weise erhielt man ein konstantes Gesamtreaktionsvolumen von 50 µl. Anschließend wurden die Proben unter Lichtausschluss und ohne Agitation 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Antikörperbindung wurde nach der Inkubationsphase durch Zugabe von jeweils 300 µl einer 0,5%-Paraformaldehyd-PBS-Lösung pH 7,4 (Fa. Sigma, Deisenhofen, Deutschland) gestoppt. Bis zur durchflusszytometrischen Messung innerhalb von 24 Stunden wurden die Proben unter Lichtausschluss bei 4°C aufbewahrt (Tabelle 7).

Tab 7: Verwendete Antikörper und Agonisten - Patientenuntersuchung

CD42b-PE	+ CD41-FITC	+ PBS bzw. ADP bzw. TRAP bzw. Thrombin
CD42b-PE	+ PAC-1-FITC	+ PBS bzw. ADP bzw. TRAP bzw. Thrombin
CD42b-PE	+ Echistatin-FITC	+ PBS bzw. ADP bzw. TRAP bzw. Thrombin
CD42b-PE	+ CD62p-FITC	+ PBS bzw. ADP bzw. TRAP bzw. Thrombin
CD42b-PE	+ CD63-FITC	+ PBS bzw. ADP bzw. TRAP bzw. Thrombin
CD42b-PE	+ LIBS-1-FITC	+ PBS bzw. ADP bzw. TRAP bzw. Thrombin
CD40L-PE	+ CD41-FITC	+ PBS bzw. Thrombin

3.1.5 Aggregometrische Messung

Die Bestimmung der Aggregation erfolgte gemäß der turbidimetrischen Methode nach Born et al. (Born 1963). PRP wird hierbei in silikonisierte Glasküvetten gegeben und unter Verwendung eines Rührstäbchens (konstant 1000 Umdrehungen pro Minute) mittels Magnetrührer durchmischt. Durch ein photometrisches Verfahren wird die plättchenbedingte Trübung der Suspension anhand einer Referenzküvette, die 500 µl PPP enthält, bestimmt. Durch Zugabe eines Plättchenstimulus in die mit PRP gefüllte Küvette kommt es zur Aggregatbildung und damit zur Abnahme der Trübung. Der Grad der Trübungsänderung ist ein Maß für die Aggregation, die als Funktion der Zeit mittels Schreiber in Form einer Aggregationskurve aufgezeichnet wird. Parallel zur Messung der Aggregation war am verwendeten Zweikanal-Chronolog-Aggregometer (Fa. Nobis, Eendingen, Deutschland) auch eine Bestimmung des freigesetzten ATP aus den Dichte-Granula der Thrombozyten möglich. Dazu wurde dem PRP (450 µl) eine Menge von 50 µl Chrono-Lume-Reagenz (Luziferin-Luziferase-Extrakt) hinzugesetzt, das in Gegenwart von ATP luminesziert. Die bei der ATP-Freisetzung entstehende Lumineszenz wurde von einem empfindlichen Photomultiplier erfaßt und über einen Schreiber aufgezeichnet. Zur quantitativen Bestimmung des ATPs wurde am Schluss jeder Einzelmessung eine Menge von 5 µl ATP-Standard (Fa. Sigma, Deisenhofen, Deutschland) hinzugegeben, welches einer Stoffmenge von 2 nmol entspricht. Die Plättchenaggregation sowie die ATP-Freisetzung wurden bei 37°C gemessen. Die Verstärkung für die Aggregation war konstant auf 0,1 Volt eingestellt, die Verstärkung der ATP-Freisetzung auf 0,5 Volt. Der Papiervorschub war auf 2 cm pro Minute festgelegt. Wie in Abbildung 7 dargestellt, konnten auf diese Weise sowohl die größte Amplitude (maximale Aggregation), die größte Steigung („Slope“) als auch die ATP-Freisetzung (im Vergleich zum ATP-Standard) bestimmt werden.

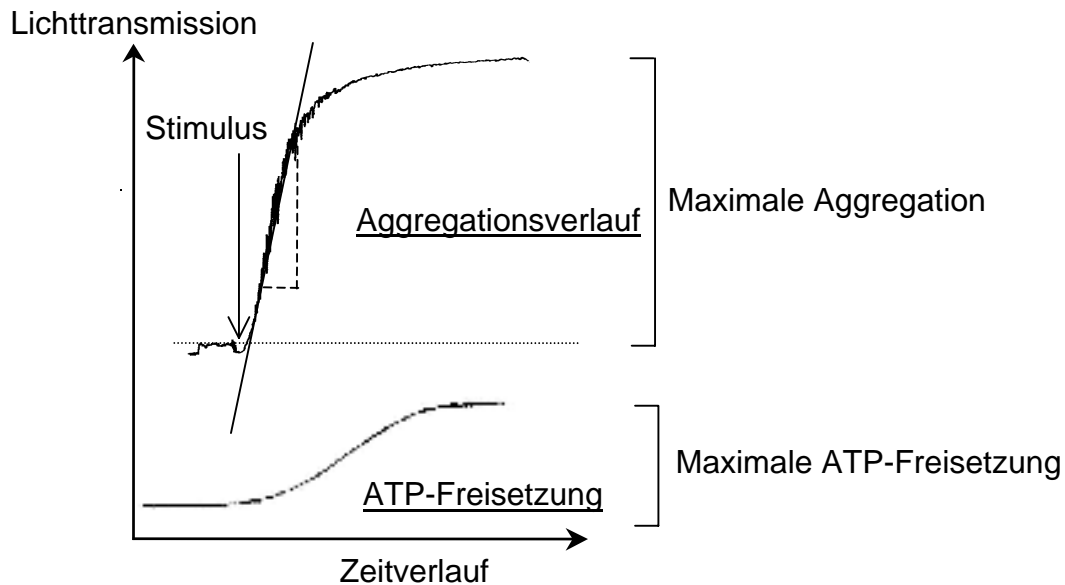


Abb 7: Auswertung der Lichtaggregometrie und Luminometrie: Anhand der Aggregationskurve wurde sowohl der maximale Ausschlag (maximale Aggregation), als auch die Steigung der Kurve durch Berechnung des Quotienten aus a durch b bestimmt. Bei der ATP-Freisetzung wurde ebenfalls der maximale Ausschlag gemessen und ins Verhältnis zu einer Standard-Dosis von ATP gesetzt.

Im Rahmen der Patientenuntersuchung wurde zu Beginn die Spontanaggregation gemessen. Dabei wurde die Messung nach Nulllinieneinstellung für die Dauer von fünf Minuten ohne Zugabe eines Agonisten laufen gelassen. Die Messungen mit Agonist wurden nach Nulllinieneinstellung mit jeweils 5 µl ADP 1 mM (Endkonzentration 10 µM) bzw. 5 µl TRAP 2,5 mM (Endkonzentration 25 µM) bzw. 5 µl Thrombin 22 U/ml (Endkonzentration 0,22 U/ml) gestartet. Nach der Aktivierung der Aggregation lief die Messung fünf Minuten, nach deren Ablauf zur quantitativen Bestimmung der ATP-Freisetzung der Messküvette 5 µl ATP-Standard hinzugegeben wurden.

3.1.6 Durchflusszytometrische Messung

Sämtliche Messungen wurden an einem Zwei-Watt-Argonlaser „FACScan-Durchflusszytometer“ (Fa. Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland) durchgeführt. Dieses wurde mittels im Handel erhältlichen Standard-Fluoreszenz-Mikrobeads (Calibrite[®], Firma Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland) geeicht. Die Auswertung der Daten erfolgte durch das am Gerät angeschlossene Datenverarbeitungsprogramm (FACScan) des Herstellers. Neben therapeutischen Gesichtspunkten dient der Nachweis thrombozytärer Membranglykoproteine mit Hilfe der Durchflusszytometrie zur diagnostischen Beurteilung prothrombotischer Krankheitsbilder (Abrams 1991, Böck 1994, Gawaz 1994, Kestin 1993, Michelson 1996, Nurden 1994). Die Entwicklung aktivierungsabhängiger monoklonaler Antikörper und spezieller durchflusszytometrischer Methoden ermöglicht es, den Funktionszustand zirkulierender Thrombozyten *ex vivo* zu bestimmen (Abrams 1991). Anhand früherer Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die angewandte Methodik zur Untersuchung der Thrombozytenfunktion *ex vivo* geeignet und reproduzierbar ist (Abrams 1991, Becker 1994, Böck 1994, Gawaz 1993, Gawaz 1994)

Man untersucht die Exposition thrombozytärer Membranglykoproteine durch Inkubation der Blutplättchen mit spezifischen monoklonalen Antikörpern. Die Antikörper können durch ihre Konjugation mit fluoreszierenden Substanzen, wie Phycoerythrin (PE) oder Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) nach ihrer Bindung an die Thrombozyten in einem Durchflusszytometer registriert werden. Dazu werden die monoklonalen Antikörper im vielfachen Überschuss eingesetzt, um gesättigte Konzentrationen zu erreichen. Desweiteren besitzen Thrombozyten im Durchflusszytometer aufgrund ihrer Größe und Oberflächenbeschaffenheit eine für sie charakteristische Lichtstreuung (Becker 1994, Böck 1994, Gawaz 1993, Gawaz 1994). Mit Hilfe der Durchflusszytometrie ist es möglich, gleichzeitig sowohl Fluoreszenz als auch Streulichtsignale einer Zelle zu messen. Innerhalb kürzester Zeit können so mehrere tausend Zellen gemessen und klassifiziert werden. Die Klassifizierung der Thrombozyten erfolgte dabei anhand der charakteristischen Lichtstreuung und der für Blutplättchen spezifischen CD42b-PE Fluoreszenz. Der Messbereich konnte so selektiv auf die Plättchenpopulation eingestellt werden, während Detritus und andere Zellpopulationen, wie Leukozyten und Erythrozyten, nicht gemessen wurden. Der Registrierbereich wurde vor jeder Messreihe konstant auf diesen Bereich eingestellt.

Die Einstellung erfolgte dabei mit Hilfe der Zwei-Parameter-Darstellung. Es können bei der Zwei-Parameter-Darstellung zwei unabhängige Parameter wie z.B. PE-Fluoreszenz und Vorwärtsstreulicht zusammen abgebildet werden, wobei die Intensitätsachsen der beiden Parameter gegeneinander aufgetragen werden (Abbildung 8).

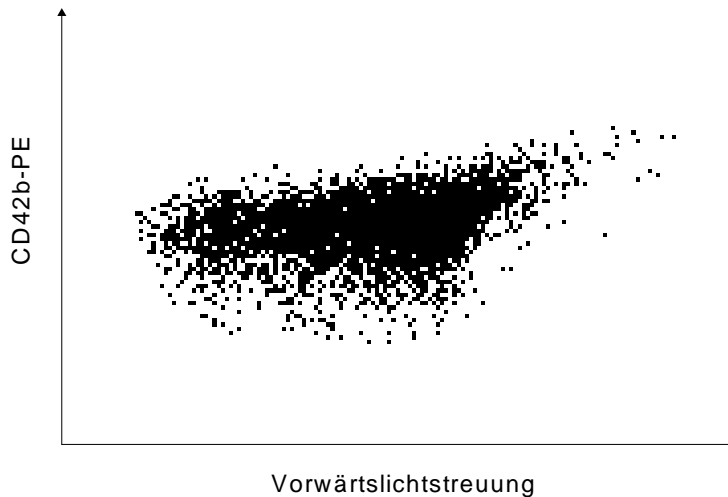


Abb 8: Die Zwei-Parameter Darstellung in der Durchflusszytometrie: Jeder Punkt im Diagramm entspricht einer Zelle mit der entsprechenden CD42-PE-Fluoreszenz und Vorwärtslichtstreuung. Der aus den einzelnen Punkten entstehende Streubereich ist charakteristisch für die Thrombozytenpopulation.

Anschließend ließ sich die spezifische FITC-Fluoreszenz der so eingestellten Thrombozyten in Form eines Histogramms darstellen. Bei der Histogramm-Abbildung handelt es sich um eine Ein-Parameter-Darstellung, bei der die x-Achse des Diagramms die Fluoreszenzintensität bezeichnet, während die y-Achse die Anzahl der Ereignisse abbildet. So ist es möglich, die Verteilung einer Zelleigenschaft, wie z.B. der FITC-Fluoreszenz, innerhalb einer Zellpopulation zu beschreiben. Ein Signal schwacher Intensität wird dabei auf der linken Seite der x-Achse abgebildet, ein stärkeres Signal rechts davon. Pro Messung wurden 2500 Fluoreszenzereignisse registriert und deren Intensität in einer Verteilungskurve dargestellt. Der bestimmte Mittelwert der Kurvenverläufe erlaubt anschließend eine quantitative Aussage über die Antikörperbindung und damit über die Exposition thrombozytärer Membranglykoproteine.

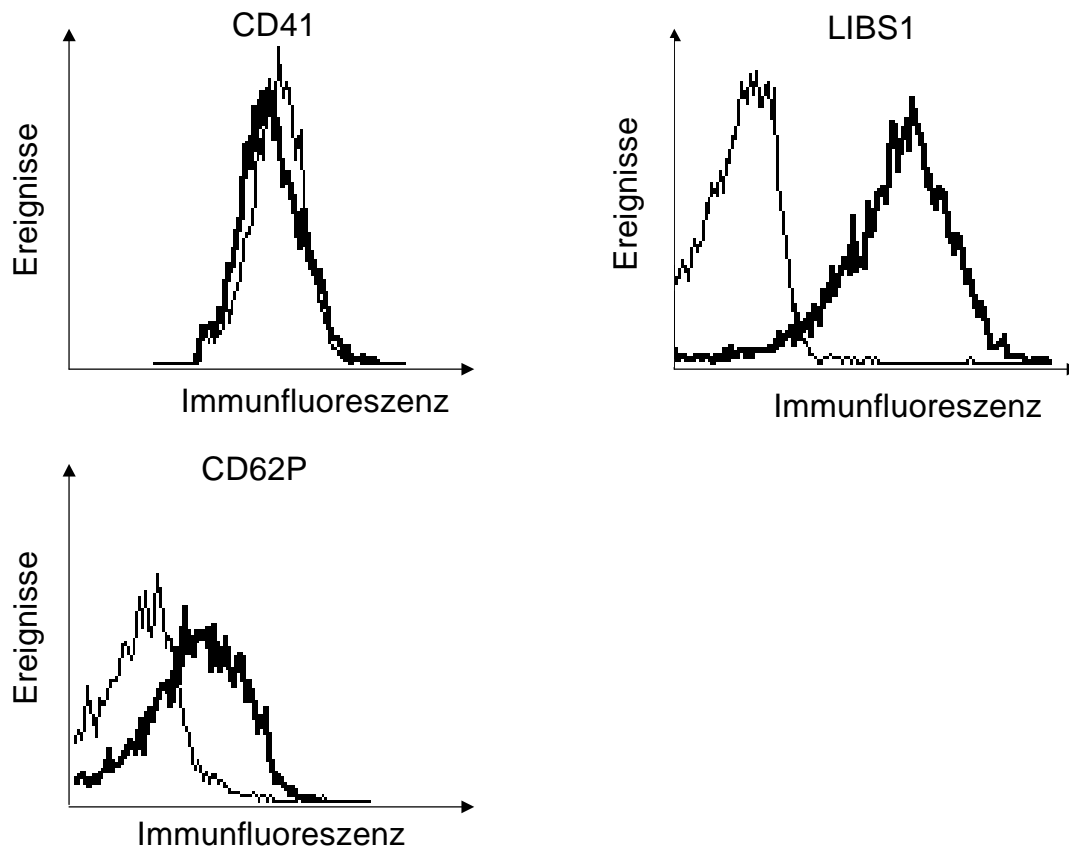


Abb 9: Die Darstellung als Histogramm in der Durchflusszytometrie: Abgebildet sind jeweils die Intensitätsverteilungen von zwei Messproben mit je 2500 registrierten Fluoreszenzereignissen. Die fett dargestellten Kurven stammen von Proben mit stimulierten Thrombozyten und somit veränderter Gesamtintensität, erkennbar an der Verschiebung der Kurve in Richtung höherer bzw. niedrigerer Fluoreszenzintensitätsbereiche.

Auf analoge Weise wurde die Messung von CD40L-PE durchgeführt. Dabei hat man den Messbereich auf CD41-FITC positive Zellen mit der für Blutplättchen charakteristischen Vorwärtslichtstreuung eingestellt. Danach konnte ein Histogramm mit der gemessenen CD40L-PE Fluoreszenz abgebildet und daraus der Mittelwert bestimmt werden.

Die Geräteeinstellung für die Messung der Thrombozyten am Durchflusszytometer ist im Anhang dargestellt.

3.1.7 Statistische Auswertung

Anhand Datenanalyse durch den Kolmogorov-Smirnov-Test konnte festgestellt werden, dass die Ergebnisse der Untersuchungen keiner Normalverteilung nach Gauß unterlagen.

Deshalb wurden nicht parametrische Testverfahren angewandt:

- Friedman- und Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben
- Kruskal-Wallis-Test und Mann-Whitney-Test für unverbundene Stichproben

p-Werte von $< 0,05$ galten als signifikant, von $< 0,01$ als hochsignifikant.

Die statistische Auswertung erfolgte durch das Programm „SPSS 9.0 for Windows“.

3.2 Experimentelle Untersuchung

Im Rahmen der experimentellen Studie wurde der Einfluss von verschiedenen GPIIb-IIIa-Antagonisten auf die Thrombozytenfunktion untersucht.

3.2.1 Verwendete GPIIb-IIIa-Antagonisten

Es wurden sechs verschiedene, klinisch relevante GPIIb-IIIa-Antagonisten verwendet:

- c7E3 (ReoPro, Abciximab) von Beiersdorf-Lilly (Hamburg, Deutschland)
- Integrelin (Integrilin, Eptifibatide) von Cor Therapeutics (San Francisco, USA)
- Lamifiban von Hoffman LaRouche (Basel, Schweiz)
- Tirofiban (MK 383, Aggrastat) von Merck&Co (West Point, USA).
- EMD 122347 von Merck (Darmstadt, Deutschland)
- YM 337 von Yamanouchi (Leiderdorp, Niederlande)

Desweiteren wurden zwei nicht klinisch relevante GPIIb-IIIa-Antagonisten als Vergleichswerte benutzt. Das Peptid GRGDSP und das Peptid HHLGGAKQAGDV (H12) wurden beide von Sigma (Deisenhofen, Deutschland) erworben.

3.2.2 Aggregometrische Untersuchung von Thrombozyten

3.2.2.1 Probengewinnung

Für die aggregometrische Untersuchung wurde mit 2,8% Zitrat antikoaguliertes Blut verwendet. Dazu nahm man gesunden Probanden Blut in eine mit Zitrat gefüllte 10 ml Spritze ab. Die Abnahme erfolgte aus einer mäßig gestauten Oberarmvene durch Punktion mit einer 19 Gauche-Kanüle. Wie in früheren Studien belegt wurde, führt diese Abnahmetechnik zu keiner messbaren in vitro Aktivierung der Thrombozyten (Frelinger 1991). Danach wurden die Proben sofort, wie im Folgenden beschrieben, weiterverarbeitet.

3.2.2.2 Probenweiterverarbeitung

Aus dem Zitrat-Blut wurde wie unter 3.1.4 beschrieben PRP und PPP hergestellt.

Mit dem gewonnenen PRP wurden drei verschiedene Versuche durchgeführt:

Bei dem ersten Versuch variierte die Konzentration der GPIIb-IIIa-Antagonisten, jedoch die Inkubationszeit blieb konstant (vgl. Punkt a).

Beim zweiten Versuch variierte die Inkubationszeit, hingegen die Antagonistenkonzentration blieb konstant (vgl. Punkt b).

Beim dritten Versuch wurde der Einfluss der GPIIb-IIIa-Antagonisten auf die sekundäre Aggregation bestimmt (vgl. Punkt c).

- a) Das PRP wurde mit den GPIIb-IIIa-Antagonisten aus Tabelle 8 30 Minuten vorinkubiert. Pro Antagonist wurden dabei sechs verschiedene Konzentrationen verwendet. Zusätzlich wurde ein Ausgangswert, ohne Zugabe eines Antagonisten bestimmt.

Tab 8: GPIIb-IIIa-Antagonistenkonzentrationen (Konzentrationsverlauf)

Antagonist		Endkonzentration					
C7E3	(in µg/ml)	1	5	10	25	50	100
GRGDSP	(in mM)	0,06	0,125	0,25	0,5	1,0	2,0
Integrelin	(in ng/ml)	40	100	200	400	2000	4000
EMD122347	(in ng/ml)	70	270	360	720	1800	3600
H12	(in mM)	0,06	0,125	0,25	0,5	1,0	2,0
Lamifiban	(in ng/ml)	10	25	50	100	500	1000
Tirofiban	(in ng/ml)	2,5	25	50	100	125	250
YM337	(in µg/ml)	5	10	20	40	60	100

b) Das gewonnene PRP wurde mit einer konstanten GPIIb-IIIa-Antagonistenkonzentration inkubiert und zu verschiedenen Inkubationszeiten gemessen. Die Inkubationszeiten betragen 15, 30, 60 und 120 Minuten. Zusätzlich wurde ein Ausgangswert, ohne Zugabe eines Antagonisten bestimmt (Tabelle 9).

Tab 9: GPIIb-IIIa-Antagonistenkonzentrationen (Zeitverlauf)

Antagonist	Endkonzentration
C7E3	50 µg/ml
GRGDSP	1,0 mM
Integrelin	2000 ng/ml
EMD122347	3600 ng/ml
H12	1,0 mM
Lamifiban	500 ng/ml
Tirofiban	125 ng/ml
YM337	60 µg/ml

Für die Inkubation wurde je 445 µl PRP, 5 µl GPIIb-IIIa-Antagonist in verschiedenen Konzentrationen und 50 µl Chrono-Lume (Luciferase Luciferin Reagent) verwendet. Danach wurden 500 µl vorinkubiertes und mit Chrono-Lume versetztes PRP in eine silikonisierte Glasküvette (Test Tubes 7,25x55mm, Fa. Bio/Data, Horsham, USA) gegeben. Als Referenzwert diente eine zweite Glasküvette, die mit 500 µl PPP gefüllt wurde.

c) Zur Bestimmung des Einflusses der GPIIb-IIIa-Antagonisten auf die sekundäre Aggregation wurden 400 µl PRP + 50 µl Chronolume in die Glasküvetten gegeben. Die Zugabe der GPIIb-IIIa-Antagonisten erfolgte zu einem späteren Zeitpunkt.

3.2.2.3 Messung

Das Prinzip der Aggregometrie und Luminometrie wurde bereits unter Punkt 3.1.5 beschrieben.

Die Messungen wurden nach Nulllinieneinstellung mit jeweils 5 µl ADP 2 mM (Endkonzentration 20 µM) bzw. 5 µl TRAP 5 mM (Endkonzentration 50 µM) gestartet. Nach der Aktivierung der Aggregation lief die Messung für die Dauer von fünf Minuten, nach deren Ablauf zur quantitativen Bestimmung der ATP-Freisetzung der Messküvette 5 µl ATP-Standard hinzugegeben wurden. Bei Messung der sekundären Aggregation variierte die Versuchsdurchführung insofern, dass nach Stimulierung der Blutplättchen mit ADP und TRAP die Aggregation bis zum maximalen Wert laufen gelassen wurde. Nach dem Erreichen dieses Punktes wurden der Messküvette 50 µl GPIIb-IIIa-Antagonist zugegeben. Die Endkonzentrationen der Antagonisten entsprachen denen in Tabelle 9. Anschließend lief die Messung ebenfalls fünf Minuten, um festzustellen, ob es durch den Einfluss der GPIIb-IIIa-Antagonisten zu einer Deaggregation der Blutplättchen kommt.

3.2.3 Durchflusszytometrische Untersuchung von Thrombozyten

3.2.3.1 Probengewinnung

Die Blutabnahme an gesunden Probanden erfolgte wie unter 3.2.2.1 beschrieben.

3.2.3.2 Probenweiterverarbeitung

PRP wurde aus dem Zitrat-Blut wie unter 3.1.4 beschrieben, gewonnen. Danach wurde das gewonnene PRP im Verhältnis 1:100 mit PBS (Phosphate Buffered Saline, Fa. Sigma,

Deisenhofen, Deutschland) verdünnt. Das verdünnte PRP wurde entsprechend der Messung der Aggregation (vgl. Punkt 3.2.2.2) mit den verschiedenen GPIIb-IIIa-Antagonisten inkubiert. Dabei variierten ebenso einerseits die Konzentrationen der Antagonisten und andererseits die Inkubationszeiten. Anschließend wurde zur Sicherung der Ergebnisse der Versuch mit den Antagonistenkonzentrationen wie in Tabelle 9 und einer Inkubationszeit von 30 Minuten in zwei weiteren Durchgängen durchgeführt. Für die Inkubation wurden je 60 µl verdünntes PRP und 10 µl GPIIb-IIIa-Antagonist in verschiedenen Konzentrationen verwendet. Die Endkonzentration wurde auf ein Gesamtvolumen von 100 µl berechnet, um den Verdünnungsfehler durch die anschließende Zugabe der Antikörper und Agonisten zu vermeiden. Während der Inkubationsphase wurden in vorher beschriftete Kunststoffröhrchen (Falcon 2052, Fa. Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland) jeweils 10 µl CD42b-PE bzw. 10 µl CD40L-PE, 10 µl eines spezifischen, FITC-gefärbten Antikörpers sowie 10 µl Agonist bzw. PBS (für den unstimulierten Wert) vorgegeben (Tabelle 10).

Tab 10: Verwendete Antikörper und Agonisten – Messung der Thrombozyten am Durchflusszytometer

CD42b-PE	+ LIBS-1-FITC	+ PBS
CD42b-PE	+ PM1-1-FITC	+ PBS
CD42b-PE	+ CD61-FITC	+ PBS
CD42b-PE	+ CD61-FITC	+ TRAP
CD42b-PE	+ Echistatin-FITC	+ PBS
CD42b-PE	+ Echistatin-FITC	+ TRAP
CD42b-PE	+ CD62p-FITC	+ PBS
CD42b-PE	+ CD62p-FITC	+ ADP
CD42b-PE	+ CD62p-FITC	+ TRAP
CD40L-PE	+ CD41-FITC	+ PBS
CD40L-PE	+ CD41-FITC	+ Thrombin

Nach Zugabe der vorinkubierten Blutplättchen in die Kunststoffröhrchen wurde 15 Minuten mit den Antikörpern inkubiert. Während dieser Zeit konnte die Bindung der Antikörper an die entsprechenden Membranglykoproteine der Thrombozyten stattfinden. Anschließend wurde sofort die durchflusszytometrische Messung durchgeführt.

3.2.3.3 Monoklonale Antikörper

Die verwendeten monoklonalen Antikörper anti-CD42b und anti-CD40L (Fa. Immunotech, Marseille, Frankreich) lagen PE-Fluoreszenz markiert vor. Anti-CD62P, anti-CD61 und anti-CD41 (Fa. Immunotech, Marseille, Frankreich) lagen als direkt markierte Fluoreszenzkonjugate (FITC) vor. Anti-LIBS1 und Anti-PMI-1 wurden mit einem den Standardmethoden entsprechenden Fluoreszenzfarbstoff (FITC) markiert und uns großzügigerweise von Dr. Mark Ginsberg (Scipps Research Institute, La Jolla, USA) zur Verfügung gestellt. Echistatin wurde ebenfalls mit einem den Standardmethoden entsprechenden Fluoreszenzfarbstoff markiert und von unserem Labor hergestellt.

Eine ausführliche Darstellung der thrombozytären Oberflächenrezeptoren und des Wirkmechanismus der einzelnen verwendeten Antikörper als immunologische Marker erfolgte bereits in der Einleitung.

3.2.3.4 Messung

Das Prinzip und die Durchführung der Durchflusszytometrie wurden unter Punkt 3.1.6 beschrieben.

3.2.4 Durchflusszytometrische Untersuchung von CHO-Zellen mit rekombinantem GPIIb-IIIa

3.2.4.1 Kultivierung und Gewinnung der CHO-Zellen

Die stabile Zelllinie von Chinesischen-Hamster-Ovar (CHO)-Zellen, die menschliche, rekombinante GPIIbIIIa-Rezeptoren exprimierten, wurde freundlicherweise von Dr. Mark Ginsberg (Scipps Research Institute, La Jolla, USA) zur Verfügung gestellt. Die im CHO-Zell-Vollmedium (DMEM-Medium, 10% Foetal-Calf-Serum FCS, Penicillin/Streptomycin, L-Glutamin, Nicht-essentielle Aminosäuren; Fa. Sigma, Deisenhofen, Deutschland) kultivierten CHO-Zellen wurden mit einer Trypsin-EDTA-Lösung (Fa. Sigma, Deisenhofen, Deutschland) von der Zellkulturflasche abgelöst. Die gewonnene Lösung wurde daraufhin in

ein 15 ml Kunststoffgefäß umgefüllt und mit PBS auf 15 ml aufgefüllt. Anschließend erfolgte ein Zentrifugationsschritt mit 200g für eine Dauer von zehn Minuten, nach deren Ablauf der Überstand abgesaugt und das Pellet mit 1 ml Tyrodes-Puffer pH 7,4 + Ca²⁺ (2mM) (Fa. Sigma, Deisenhofen, Deutschland) vorsichtig resuspendiert wurde. Im Anschluss wurde die Zellzahl in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt und mit dem Tyrodes-Puffer auf $2,0 \times 10^6$ Zellen pro ml eingestellt.

3.2.4.2 Probenweiterverarbeitung

Die gewonnenen CHO-Zellen wurden mit den GPIIb-IIIa-Antagonisten aus Tabelle 8 30 Minuten vorinkubiert. Pro GPIIb-IIIa-Antagonist wurden sechs verschiedene Konzentrationen verwendet. Anschließend wurde zur Sicherung der Ergebnisse der Versuch mit den Antagonistenkonzentrationen der Tabelle 9 in drei weiteren Durchgängen vorgenommen. Für die Inkubation nahm man je 70 µl CHO-Zellen und 10 µl GPIIb-IIIa-Antagonist in verschiedenen Konzentrationen. Die Endkonzentration wurde dabei auf ein Gesamtvolumen von 100 µl berechnet, um den Verdünnungsfehler durch die anschließende Zugabe der Antikörper zu vermeiden. Während der Inkubationsphase wurden in vorher beschriftete Kunststoffröhrchen jeweils 10 µl CD41-PE und 10 µl LIBS-1-FITC bzw. PM1-1-FITC vorgegeben. Nach Zugabe der vorinkubierten CHO-Zellen in die Kunststoffröhrchen wurde 15 Minuten mit den Antikörpern inkubiert. Während dieser Zeit konnte die Bindung der Antikörper an den GPIIb-IIIa-Rezeptor der CHO-Zellen stattfinden. Anschließend wurde sofort die durchflusszytometrische Messung durchgeführt.

3.2.4.3 Monoklonale Antikörper

Der verwendete monoklonale Antikörper anti-CD41 (Fa. Immunotech, Marseille, Frankreich) lag PE-Fluoreszenz markiert vor. Die Antikörper anti-LIBS-1 und anti-PMI-1 wurden bereits unter 3.2.3.3 beschrieben.

3.2.4.4 Messung

Das Prinzip der Durchflusszytometrie wurde unter Punkt 3.1.6 beschrieben.

Die CHO-Zellen konnten durch ihre positive Anfärbarkeit mit CD41-PE sowie durch ihre charakteristische Streulichtverteilung im Durchflusszytometer registriert und so von unspezifischen Einflüssen, wie zum Beispiel Zelldetritus, unterschieden werden. Auf diese Weise ließ sich der Registrierbereich vor jeder Messreihe konstant auf diesen Bereich einstellen. Danach konnten ein Histogramm mit der gemessenen LIBS-1-FITC bzw. PMI-1-FITC Fluoreszenz abgebildet und daraus der Mittelwert bestimmt werden.

Die Geräteeinstellungen für die Messung der CHO-Zellen am Durchflusszytometer sind im Anhang dargestellt.

3.2.5 Adhäsionsuntersuchung von Thrombozyten

3.2.5.1 Herstellung von gewaschenen Thrombozyten

Zur Herstellung gewaschener Thrombozyten wurde in eine mit 4 ml saurer Dextrose-Zitrat-Lösung pH 4,5 gefüllte 20 ml-Spritze 16 ml Blut von gesunden Probanden abgenommen (Verhältnis 1:5). Das Blut wurde dabei wie unter 3.2.2.1 beschrieben abgenommen. Je 10 ml Blut wurden daraufhin in zwei 15 ml Kunststoffgefäße gegeben. Zur Herstellung von PRP wurden die Gefäße bei 200g 20 Minuten zentrifugiert. Das gewonnene PRP wurde mit einer Eppendorf-Pipette abgenommen, in ein 50 ml Kunststoffgefäß gegeben und mit Tyrodes-Puffer pH 6,5 auf 35 ml aufgefüllt. Anschließend wurde zehn Minuten bei 400g zentrifugiert und der Überstand komplett abgesaugt. Das Pellet musste daraufhin mit 500 µl Tyrodes-Puffer pH 6,5 vorsichtig resuspendiert und mit weiteren 500 µl Tyrodes-Puffer pH 7,4 vermischt werden. Danach bestimmte man die Thrombozytenzahl im Zählgerät (Fa. Sysmex, Norderstadt, Deutschland) und stellte sie durch Verdünnung mit Tyrodes-Puffer pH 7,4 + Ca^{2+} (2mM) auf eine Zellzahl von 2×10^5 pro µl ein. Die gewaschenen Thrombozyten wurden danach sofort weiterverarbeitet. Die verwendeten Reagenzien für die Herstellung von gewaschenen Thrombozyten sind im Anhang in Tabelle 19 dargestellt.

3.2.5.2 Verwendete Mikrotiterplatten

Für den Versuch wurden folgende beschichtete Mikrotiterplatten verwendet:

- Fibronectin
- Laminin
- Kollagen (alle drei von Biocoat, Fa. Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland)
- Fibrinogen
- Vitronectin

Die mit Fibrinogen und Vitronectin beschichteten Mikrotiterplatten wurden selbst hergestellt. Dafür wurden unbeschichtete 96-Napf-Mikrotiterplatten (Fa. Greiner, Frickenhausen, Deutschland) pro Napf mit jeweils 100µl frisch hergestellter, PBS-gepufferter Fibrinogen- (5µg/ml) bzw. Vitronectinlösung (5µg/ml) für drei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Entfernen dieser Lösungen wurden die Platten einmal mit PBS (100µl) gewaschen, anschließend mit 2,5 % BSA-Lösung (Bovines Serum Albumin, Fa. Sigma, Deisenhofen, Deutschland) versehen und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert, um eine Absättigung unspezifischer Valenzen zu erreichen. Danach folgten zwei Waschgänge mit PBS zur Entfernung von überschüssigem BSA und die Austrocknung der Platten an der Raumluft.

3.2.5.3 Prinzip und Versuchsdurchführung

Es wurde die Thrombozytenbindung auf immobilisierte Proteine (Fibrinogen, Vitronectin, Fibronectin, Laminin und Kollagen) untersucht, die sich auf verschiedenen 96-Napf-Mikrotiterplatten befanden. Zur Kontrolle diente eine unbeschichtete Plastikplatte. Die Menge adhärenter Thrombozyten konnte durch kolorimetrische Methoden quantitativ bestimmt werden. Die gewaschenen Thrombozyten wurden mit verschiedenen GPIIb-IIIa-Antagonisten bei Raumtemperatur 30 Minuten vorinkubiert. Die Konzentrationen der GPIIb-IIIa-Antagonisten sind der Tabelle 9 zu entnehmen.

Es wurden jeweils 10 µl GPIIb-IIIa-Antagonist auf 90 µl Thrombozytensuspension (Verdünnung 1:10) verwendet. Die Benutzung von EDTA diente der Spezifitätsbestimmung der Thrombozytenadhäsion und wurde bei jeder Messreihe in analoger Weise mitgeführt.

Von den so vorinkubierten Blutplättchen wurden 100µl pro Napf auf die beschichteten 96-Napf-Mikrotiterplatten und als Kontrolle auf eine unbeschichtete Plastikplatte pipettiert. Anschließend wurden die Mikrotiterplatten zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. In dieser Zeit konnte die Adhäsion der Thrombozyten an die beschichteten Napfwände stattfinden. Nach Ablauf der zwei Stunden wurde die Flüssigkeit abgesaugt und die Platten zweimal mit Tyrodes-Puffer pH 7,4 + Ca^{2+} (2mM) gewaschen, wodurch die nicht adhärenen Blutplättchen entfernt wurden. Nach diesem Waschgang wurden 100 µl Lyse-Substrat-Puffer (3 mg/ml p-Nitrophenyl-phosphat; 50 mM Natriumazetat; 1% Triton-X; pH 5,0, Fa. Sigma, Deisenhofen, Deutschland) pro Napf hinzupipettiert. Es folgte eine Inkubationszeit von 30 Minuten bei 37°C im Brutschrank, in der die Thrombozyten lysiert wurden und das p-Nitrophenylphosphat von thrombozytären, intrazellulär gelagerten Phosphatasen in ein gelb gefärbtes Reaktionsprodukt mit spezifischem Extinktionsmaximum bei 405nm Wellenlänge umgewandelt wurde. Der Abbruch dieses Vorgangs erfolgte nach der Inkubationszeit durch Zugabe von 50µl NaOH (1M) pro Napf. Anschließend wurde die Messung der Extinktionsintensität bei 405nm in einem geeigneten Photometer (ELISA-Reader, Fa. Dynatech, Deutschland) mit einem Referenzfilter von 630nm durchgeführt. Durch die Intensitätsmessung der abgelaufenen Farbreaktion konnte eine quantitative Bestimmung der Thrombozytenadhäsion erfolgen.

Dieser Versuch wurde mit dem Blut von drei verschiedenen, gesunden Probanden durchgeführt, wobei für jeden Messwert eine vierfach Bestimmung vorgenommen wurde. Somit erhielt man für jede Mikrotiterplatte pro verwendeten GPIIb/IIIa-Antagonisten zwölf Messwerte. Zur Bestimmung der entsprechenden Farbintensität je Thrombozytenzahl erstellte man für jeden Probanden eine Eichkurve, wofür in fünf verschiedene Näpfe bekannte Mengen an Thrombozyten pipettiert und anschließend nach Lysierung die Farbreaktion bestimmt wurden.

Zusätzlich wurde analog zu dieser Versuchsdurchführung die sekundäre Adhäsion nach Stimulierung der Thrombozyten mit TRAP getestet. Dabei wurden statt 100 µl vorinkubierter Thrombozyten 90 µl verwendet und zusätzlich 10 µl TRAP 500 µM (Endkonzentration 50 µM) in jeden Napf pipettiert. Der weitere Versuchsablauf entsprach dem oben beschriebenen.

3.2.6 Adhäsionsuntersuchung von CHO-Zellen mit rekombinantem GPIIb-IIIa

3.2.6.1 Kultivierung und Gewinnung der CHO-Zellen

Die im CHO-Zell-Vollmedium (DMEM-Medium, 10% Foetal-Calf-Serum FCS, Penicillin/Streptomycin, L-Glutamin, Nicht-essentielle Aminosäuren; Fa. Sigma, Deisenhofen, Deutschland) herangezüchteten Chinesischen-Hamster-Ovar (CHO)-Zellen wurden mit einer Trypsin-EDTA-Lösung von der Zellkulturflasche abgelöst. Die gewonnene Lösung wurde daraufhin in zwei 50 ml Kunststoffgefäße umgefüllt und mit CHO-Zell-Vollmedium auf jeweils 50 ml aufgefüllt. Danach erfolgte ein zehnminütiger Zentrifugationsschritt bei 200g, nach dessen Ablauf der Überstand abgesaugt, das Pellet mit 1 ml Vollmedium vorsichtig resuspendiert und anschließend das Gefäß wieder mit Vollmedium auf 50 ml aufgefüllt wurde. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurde erneut der Überstand abgesaugt und das Pellet mit 1 ml Nährlösung (wie Vollmedium, aber ohne FCS) resuspendiert. Anschließend wurde die Zellzahl in der Neubauer-Zählkammer bestimmt und mit der Nährlösung auf 5×10^3 Zellen pro μl eingestellt. Am Ende erfolgte eine Zugabe von Ca^{2+} (2mM Endkonzentration).

3.2.6.2 Verwendete Mikrotiterplatten

Die verwendeten Mikrotiterplatten wurden bereits unter 3.2.5.2 beschrieben.

3.2.6.3 Prinzip und Versuchsdurchführung

Das Prinzip und die Vorinkubation mit den verschiedenen GPIIb-IIIa-Antagonisten wurde unter Punkt 3.2.5.3 beschrieben und mit den CHO-Zellen auf analoge Weise durchgeführt.

Die vorinkubierten CHO-Zellen wurden auf die beschichteten 96-Napf-Mikrotiterplatten pipettiert. Dabei verwendete man 100 μl pro Napf, wobei pro Platte je GPIIb-IIIa-Antagonist eine Vierfachbestimmung durchgeführt wurde. Anschließend wurden die Platten bei 37°C im Brutschrank vier Stunden inkubiert. In dieser Zeit erfolgte die Adhäsion der CHO-Zellen an die Plattenwände, was durch die Betrachtung der Zellmorphologie

unter dem Lichtmikroskop vor der weiteren Verarbeitung bestätigt wurde. Die weitere Versuchsdurchführung und Messung entsprachen denjenigen der Thrombozytenadhäsion (Punkt 3.2.5.3). Wegen der nicht möglichen Stimulierung der CHO-Zellen wurde im Gegensatz zur Thrombozytenadhäsion keine Versuchsreihe mit TRAP-Stimulierung durchgeführt.

3.2.7 Statistische Auswertung

Die Datenanalyse durch Kolmogorov-Smirnov Test zeigte, dass die Ergebnisse der Untersuchung keiner Normalverteilung nach Gauß unterlagen. Daher wurden nicht parametrische Testverfahren zur statistischen Datenanalyse angewandt. Die Bestimmung der Signifikanzniveaus erfolgte mittels:

- Friedman- und Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben
- Kruskal-Wallis- und Mann-Whitney-Test für unverbundene Stichproben

p-Werte $< 0,05$ wurden als signifikant bezeichnet.

Die statistische Auswertung erfolgte durch das Programm „SPSS 9.0 for Windows“.

4 Ergebnisse

4.1 Patientenuntersuchung

4.1.1 Aggregation

Bei der Thrombozytenaggregation wurden sowohl der maximale Anstieg als auch die Steigung der Aggregationskurve bestimmt (Abbildung 7 unter Punkt 3.1.5). Es wurden Werte für unstimulierte (Spontanaggregation) und für stimulierte Thrombozyten gemessen.

Der maximale Anstieg der Aggregationskurve bei unstimulierten Thrombozyten zeigte bis zum Wert sechs Stunden nach Beginn der Fibrinolysetherapie einen tendentiellen Abfall und bei den folgenden Werten einen Anstieg. Diese Unterschiede waren allerdings nicht signifikant (Tabelle 11). Der maximale Anstieg bei Stimulierung der Thrombozyten mit ADP und TRAP ergab einen tendentiellen, jedoch nicht signifikanten Abfall (Tabelle 11). Bei der durch Thrombin ausgelösten Aggregation ergab sich am dritten Tag ein Anstieg von vorher zwischen 3,7 und 7,1 mm auf 31,3 mm (Tabelle 11).

Tab 11: Aggregation (Maximaler Anstieg), Patientenuntersuchung

Maximale Aggregation	prä	1,5 h	6 h	24 h	48 h	72 h
unstimuliert	7,9 ± 6,0*	6,9 ± 4,2	6,7 ± 6,1	9,7 ± 4,1	7,0 ± 3,7	11,9 ± 4,4
ADP-stimuliert	129,7 ± 30,7	125,3 ± 17,9	113,4 ± 19,8	118,6 ± 23,4	112,4 ± 18,2	115,6 ± 18,1
TRAP-stimuliert	144,6 ± 21,3	146,0 ± 32,9	133,9 ± 33,8	133,9 ± 39,1	115,6 ± 31,9	130,9 ± 19,7
Thrombin-stimuliert	7,3 ± 6,3	3,7 ± 5,6	3,6 ± 6,9	3,7 ± 3,9	6,1 ± 3,5	31,3 ± 36,1

* Mittelwert ± Standardabweichung

Bei der Messung der Steigung der Aggregationskurve unterschieden sich die unstimulierten Werte nicht voneinander (Tabelle 12). Bei den mit ADP und TRAP stimulierten Werten ergab sich bei der Messung 90 Minuten nach Fibrinolysebeginn eine signifikante ($p=0,034$ und $p=0,025$) Erhöhung der Steigung (Tabelle 12 und Abbildung 10). Bei den mit Thrombin stimulierten Werten zeigte sich nach 72 Stunden ein signifikanter Anstieg (Tabelle 12).

Tab 12: Aggregation (Steigung), Patientenuntersuchung

Aggregation (Steigung)	prä	1,5 h	6 h	24 h	48 h	72 h
unstimuliert	0,1 ± 0,1*	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,1
ADP-stimuliert	5,6 ± 1,7	7,6 ± 1,6	5,9 ± 1,4	6,4 ± 2,3	5,2 ± 2,0	5,5 ± 1,8
TRAP-stimuliert	6,7 ± 1,4	10,3 ± 2,9	7,3 ± 2,2	7,4 ± 2,5	6,4 ± 2,6	7,0 ± 2,2
Thrombin-stimuliert	0,1 ± 0,1	0,0 ± 0,1	0,2 ± 0,4	0,2 ± 0,4	0,2 ± 0,4	2,5 ± 3,5

* Mittelwert ± Standardabweichung

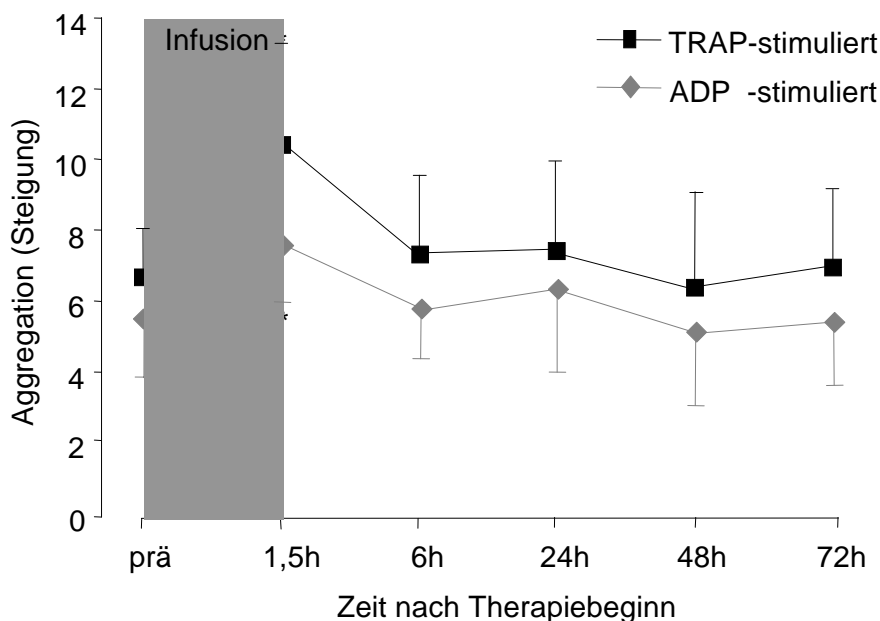


Abb 10: Aggregation (Steigung), Patientenuntersuchung: Es kam 1,5 Stunden nach Beginn der Fibrinolysetherapie zu einem signifikanten Anstieg sowohl der ADP- als auch der TRAP-induzierten Steigung der Aggregationskurve (* = Signifikanz).

4.1.2 Freisetzungsreaktion

Die Effekte auf die Degranulation der Blutplättchen wurden durch die Messung der ATP-Freisetzung (Dichte Granula), der Oberflächenexpression von CD 63 (Lysosomen) und von P-Selektin und CD 40L (α -Granula) bestimmt.

Bezüglich der ATP-Freisetzung ergaben sich über den Zeitverlauf signifikante Unterschiede nach 72 Stunden. Dabei kam es durch Thrombin-Stimulierung zu einem Anstieg von 0,0 auf 0,2 nmol (Tabelle 13). Bei der Oberflächenexpression des P-Selektins war bis zum Zeitpunkt von sechs Stunden nach Beginn der Fibrinolysetherapie ein tendentieller, jedoch nicht signifikanter Anstieg zu verzeichnen. Anschließend fiel der Wert wieder etwas unterhalb des Ausgangswertes ab (Tabelle 13). Für CD 63 zeigte sich über den Zeitverlauf eine tendentielle Abnahme der Oberflächenexpression. Diese Abnahme war allerdings nicht signifikant (Tabelle 13). Bei CD40L war über den Zeitverlauf eine kontinuierliche Steigerung der Oberflächenexpression festzustellen. Dieser Anstieg sowohl der unstimulierten als auch der Thrombin-stimulierten Werte war bereits sechs Stunden nach Beginn der Fibrinolysetherapie signifikant (Tabelle 13 und Abbildung 11).

Tab 13: Freisetzungsreaktion, Patientenuntersuchung

ATP-Freisetzung	prä	1,5 h	6 h	24 h	48 h	72 h
unstimuliert	0,0 ± 0,0*	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
ADP-stimuliert	0,3 ± 0,2	0,4 ± 0,2	0,4 ± 0,2	0,3 ± 0,1	0,4 ± 0,2	0,3 ± 0,3
TRAP-stimuliert	0,8 ± 0,5	0,9 ± 0,4	0,9 ± 0,4	1,1 ± 0,6	0,8 ± 0,5	0,9 ± 0,7
Thrombin-stimuliert	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,2 ± 0,3
CD 62P						
unstimuliert	186 ± 59	193 ± 42	205 ± 27	177 ± 30	180 ± 27	174 ± 33
ADP-stimuliert	249 ± 61	233 ± 45	255 ± 66	227 ± 43	226 ± 43	217 ± 45
TRAP-stimuliert	292 ± 45	308 ± 53	311 ± 36	287 ± 36	273 ± 31	277 ± 30
Thrombin-stimuliert	316 ± 45	329 ± 52	327 ± 38	317 ± 57	311 ± 61	322 ± 53
CD 63						
unstimuliert	183 ± 30	180 ± 19	170 ± 20	174 ± 18	171 ± 15	173 ± 19
ADP-stimuliert	210 ± 24	207 ± 20	219 ± 31	213 ± 24	211 ± 25	214 ± 15
TRAP-stimuliert	265 ± 43	263 ± 34	264 ± 28	263 ± 30	257 ± 29	274 ± 35
Thrombin-stimuliert	311 ± 25	297 ± 26	298 ± 24	288 ± 34	288 ± 49	290 ± 41
CD 40L						
unstimuliert	103 ± 12	113 ± 14	137 ± 20	159 ± 50	170 ± 52	181 ± 60
Thrombin-stimuliert	125 ± 25	141 ± 36	155 ± 28	175 ± 39	192 ± 39	193 ± 53

* Mittelwert ± Standardabweichung

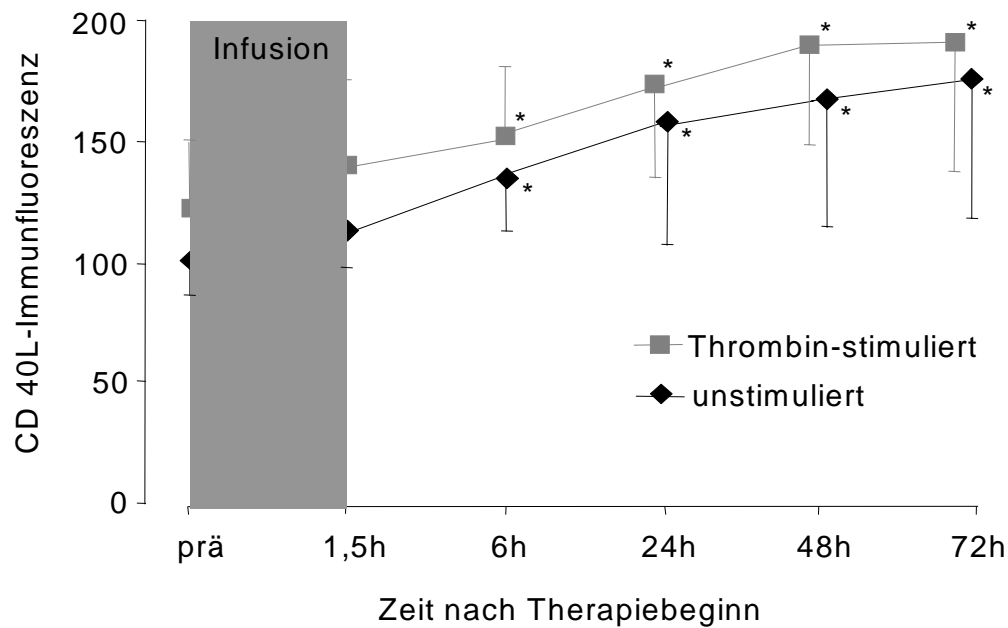


Abb 11: Veränderung der CD 40L-Expression, Patientenuntersuchung: Es zeigte sich im Zeitverlauf ein kontinuierlicher Anstieg der Oberflächenexposition von CD 40L. Dieser Anstieg war ab sechs Stunden nach Fibrinolysebeginn signifikant (* = Signifikanz).

4.1.3 Exposition thrombozytärer Membranglykoproteine

Bei der Exposition thrombozytärer Membranglykoproteine, welche Aussagen über den Funktionszustand des GPIIb-IIIa-Rezeptors erlauben, ergab sich über den Zeitverlauf für CD 41 und für PAC-1 ein tendentieller Abfall der Oberflächenexpression, dieser war jedoch nicht signifikant (Tabelle 14). Bei LIBS-1 und Echistatin war keine Tendenz festzustellen (Tabelle 14).

Tab 14: Exposition thrombozytärer Membranglykoproteine, Patientenuntersuchung

CD 41	prä	1,5 h	6 h	24 h	48 h	72 h
unstimuliert	515 ± 35*	504 ± 23	507 ± 19	507 ± 19	500 ± 26	498 ± 22
ADP-stimuliert	540 ± 26	528 ± 15	521 ± 14	516 ± 19	520 ± 25	520 ± 20
TRAP-stimuliert	556 ± 20	555 ± 40	535 ± 16	533 ± 16	537 ± 18	537 ± 18
Thrombin-stimuliert	557 ± 14	543 ± 21	543 ± 21	538 ± 22	536 ± 23	536 ± 23
LIBS-1						
unstimuliert	220 ± 32	220 ± 25	233 ± 38	216 ± 34	217 ± 29	225 ± 35
ADP-stimuliert	272 ± 37	278 ± 37	284 ± 29	262 ± 46	264 ± 32	274 ± 40
TRAP-stimuliert	267 ± 36	277 ± 35	283 ± 31	286 ± 23	275 ± 39	292 ± 48
Thrombin-stimuliert	299 ± 45	315 ± 34	308 ± 31	289 ± 58	291 ± 55	303 ± 53
PAC-1						
unstimuliert	239 ± 37	189 ± 41	197 ± 52	204 ± 57	184 ± 54	184 ± 60
ADP-stimuliert	310 ± 69	299 ± 53	291 ± 49	283 ± 66	273 ± 53	284 ± 51
TRAP-stimuliert	282 ± 47	270 ± 29	288 ± 41	280 ± 40	274 ± 60	272 ± 54
Thrombin-stimuliert	367 ± 53	363 ± 56	368 ± 51	338 ± 55	326 ± 66	332 ± 56
Echistatin						
unstimuliert	186 ± 27	175 ± 26	177 ± 27	164 ± 18	162 ± 22	166 ± 25
ADP-stimuliert	193 ± 25	190 ± 23	189 ± 21	188 ± 16	180 ± 22	188 ± 23
TRAP-stimuliert	210 ± 25	205 ± 21	205 ± 17	214 ± 23	204 ± 22	211 ± 23
Thrombin-stimuliert	218 ± 22	206 ± 25	209 ± 21	216 ± 29	219 ± 26	222 ± 15

* Mittelwert ± Standardabweichung

4.2 Experimentelle Untersuchung

Die jeweils sechs unterschiedlichen Konzentrationen der untersuchten GPIIb-IIIa-Antagonisten sind der Tabelle 8 unter Punkt 3.2.2.2 zu entnehmen. Bei Verwendung nur einer Konzentration, wurde diese gewählt, mit welcher eine maximale Aggregationshemmung am Aggregometer zu erzielen war (Tabelle 9).

4.2.1 Induktion der Liganden-induzierten-Bindungsstelle (LIBS)

Durch die Verwendung von konformationsabhängigen, monoklonalen Antikörpern (LIBS-1, PMI-1) wurde der Effekt von GPIIb-IIIa-Antagonisten auf die LIBS-Induktion des GPIIb-IIIa-Rezeptors der Blutplättchen untersucht. Dabei bindet LIBS-1 an die GPIIIa-Untereinheit und PMI-1 an die GPIIb-Untereinheit.

Integrelin, c7E3, Tirofiban und Lamifiban induzierten die LIBS-1-Oberflächenexpression in einem konzentrations- und zeitabhängigen Muster (Abbildung 12). Im Gegensatz dazu induzierten EMD 122347 und YM 337 nicht die LIBS-1-Aktivität und zeigten in höheren Konzentrationen eine Abnahme der LIBS-1-Expression (Abbildung 12). Die Originaldaten sind im Anhang in Tabelle 20 und 21 aufgeführt.

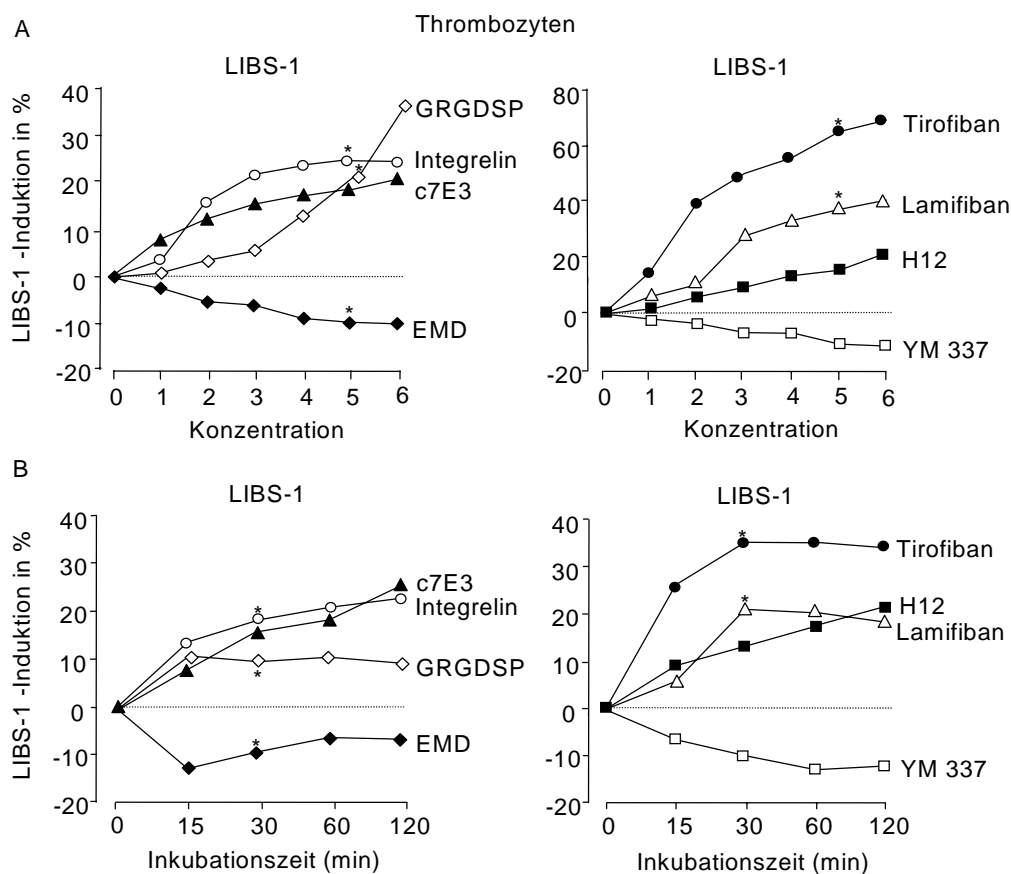


Abb 12: LIBS-1-Bindung bei Thrombozyten: GRGDSP, Integrelin, c7E3, Tirofiban, Lamifiban und H12 führten zu einer LIBS-1-Induktion in einem konzentrationsabhängigen (A) und zeitabhängigen (B) Muster. EMD 122347 und YM 337 dagegen führten zu einer Abnahme der LIBS-1-Expression (* = Signifikanz).

Ähnliche Ergebnisse wie bei der LIBS-1-Bindung an LIBS-Epitope der GPIIIa-Untereinheit zeigten sich für die PMI-1-Bindung an LIBS-Epitope der GPIIb-Untereinheit. Dabei induzierten ebenso Integrelin, c7E3, Tirofiban und Lamifiban die PMI-1-Oberflächenexpression in einem konzentrations- und zeitabhängigen Muster (Abbildung 13). Die höchste PMI-1-Bindung wurde hierbei durch Lamifiban erreicht. EMD 122347 und YM 337 zeigten dagegen eine Abnahme der PMI-1-Expression (Abbildung 13). Die LIBS-Induktion war somit unabhängig vom Typ des monoklonalen Antikörpers, der dazu verwendet wurde, die Konformationsänderung des GPIIb-IIIa-Rezeptors zu registrieren. Die Originaldaten sind im Anhang in Tabelle 22 und 23 aufgeführt.

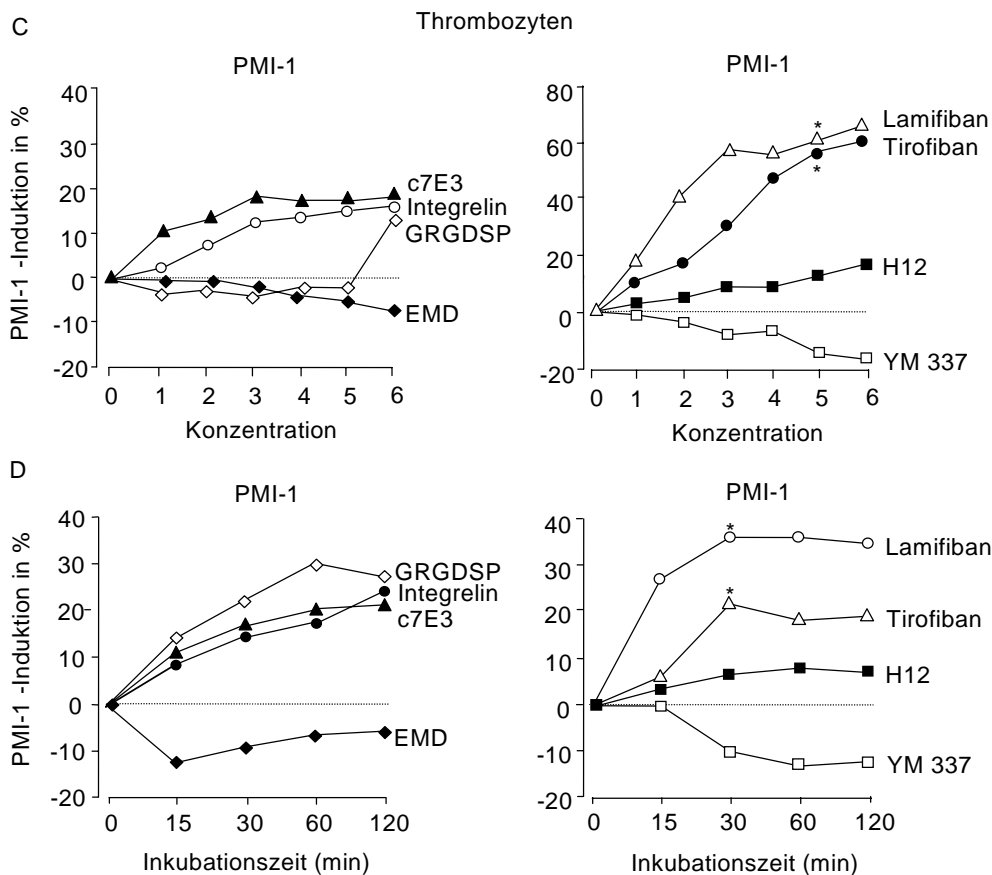


Abb 13: PMI-1-Bindung bei Thrombozyten: GRGDSP, Integrelin, c7E3, Tirofiban, Lamifiban und H12 führten zu einer PMI-1-Induktion in einem konzentrationsabhängigen (C) und zeitabhängigen (D) Muster. EMD 122347 und YM 337 dagegen führten zu einer Abnahme der PMI-1-Expression (* = Signifikanz).

Die Messung von vier unterschiedlichen Proben mit einer Inkubationszeit von 30 Minuten und einer Konzentration der GPIIb-IIIa-Antagonisten, die eine maximale Aggregationshemmung bewirkt, zeigte einen signifikanten Anstieg der LIBS-1-Bindung für GRGDSP, Integrelin, Tirofiban und Lamifiban. Eine signifikante Hemmung ergab sich dagegen bei EMD 122347 (Tabelle 15). Bei der PMI-1-Bindung zeigte sich ein signifikanter Anstieg für Tirofiban und Lamifiban (Tabelle 15). Die Originaldaten sind im Anhang in Tabelle 24 aufgeführt.

Tab 15: LIBS-1- und PMI-1-Bindung bei Thrombozyten (n=4)

Antagonist	Konzentration	LIBS-1 % Abweichung	p-Wert	PMI-1 % Abweichung	p-Wert
c7E3	50µg/ml	12,2	0,38	18,7	0,15
GRGDSP	1mM	19,9	0,08	9,0	0,15
Integrelin	2µg/ml	36,4	0,02	17,7	0,08
EMD 122347	3,6µg/ml	-12,3	0,02	-1,4	0,77
H12	1mM	7,6	0,38	5,5	0,15
Lamifiban	500ng/ml	21,5	0,02	39,9	0,02
Tirofiban	125ng/ml	41,6	0,02	35,6	0,02
YM 337	60µg/ml	-1,1	0,77	-5,3	0,77

Um den Effekt der GPIIb-IIIa-Antagonisten auf die LIBS-Induktion unabhängig von der umgebenden Plättchenmembran und intrazellulärer Aktivierungsmechanismen zu untersuchen, wurde eine stabile CHO-Zelllinie benutzt, die den menschlichen, rekombinanten GPIIb-IIIa-Rezeptor exprimiert. Wie für die intakten Blutplättchen beschrieben, induzierten alle getesteten Antagonisten, außer EMD 122347 und YM 337, die LIBS-1-Aktivität auf dem rekombinanten GPIIb-IIIa (Abbildung 14). Die Originaldaten sind im Anhang in Tabelle 25 aufgeführt.

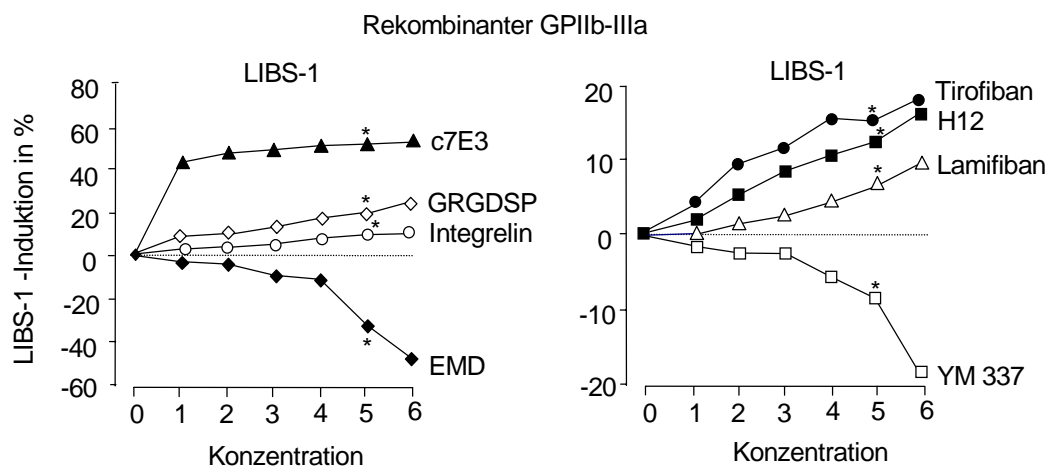


Abb 14: LIBS-1-Bindung bei CHO-Zellen mit rekombinantem GPIIb-IIIa: GRGDSP, Integrelin, c7E3, Tirofiban, Lamifiban und H12 führten zu einer LIBS-1-Induktion in einem konzentrationsabhängigen Muster. EMD 122347 und YM 337 dagegen führten zu einer Abnahme der LIBS-1-Expression (* = Signifikanz).

Die Messung von vier unterschiedlichen Proben zeigte einen signifikanten Anstieg der LIBS-1-Induktion für GRGDSP, Integrelin, c7E3, Tirofiban und Lamifiban und H12. Eine signifikante Hemmung der LIBS-1-Induktion ergab sich dagegen bei EMD 122347 und YM 337 (Tabelle 16). Die Originaldaten sind im Anhang in Tabelle 26 aufgeführt.

Tab 16: LIBS-1-Bindung bei CHO-Zellen mit rekombinantem GPIIb-IIIa (n=4)

Antagonist	Konzentration	% Abweichung	p-Wert
c7E3	50µg/ml	52,2	0,02
GRGDSP	1mM	15,7	0,02
Integrelin	2µg/ml	12,0	0,02
EMD 122347	3,6µg/ml	-28,0	0,02
H12	1mM	11,4	0,02
Lamifiban	500ng/ml	9,9	0,04
Tirofiban	125ng/ml	15,5	0,02
YM 337	60µg/ml	-10,4	0,02

4.2.2 Aggregation und Deaggregation

Alle getesteten GPIIb-IIIa-Antagonisten hemmten die ADP (20µM)-induzierte Plättchenaggregation in einem konzentrationsabhängigen Muster. Bei hohen Konzentrationen wurde die ADP-induzierte Aggregation durch alle Antagonisten komplett gehemmt (Abbildung 15). Im Gegensatz dazu wurde bei Stimulierung der Thrombozyten mit TRAP (50µM) bei allen Antagonisten eine deutlich geringere Hemmung der Plättchenaggregation erreicht. Selbst bei hohen Konzentrationen war keiner der GPIIb-IIIa-Antagonisten in der Lage die TRAP-induzierte Aggregation komplett zu hemmen. Es blieb je nach verwendeten GPIIb-IIIa-Antagonisten eine Restaggregation zwischen 8,7 und 24,7 % (Abbildung 15). Die Originaldaten sind im Anhang in Tabelle 27 aufgeführt.

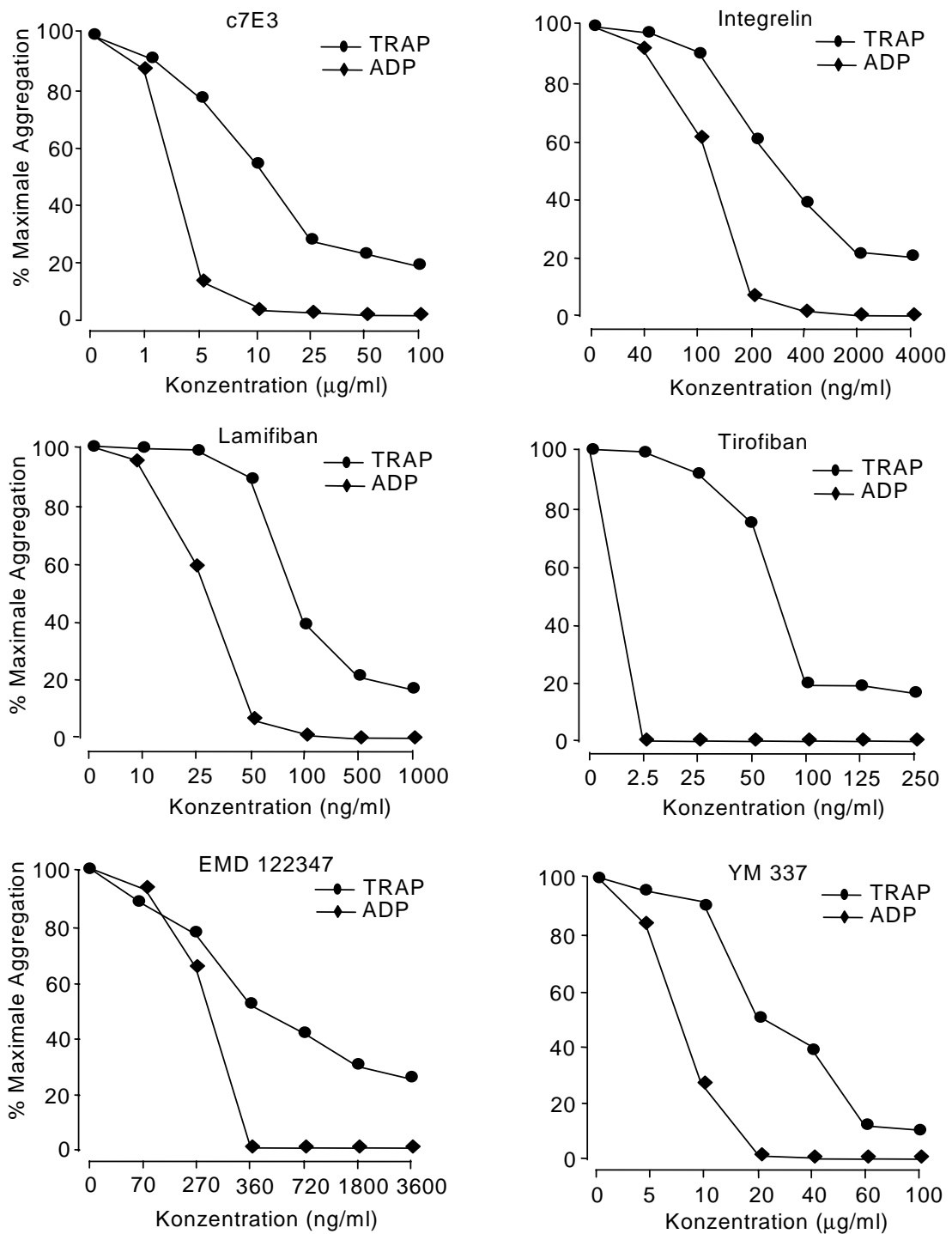


Abb 15: Aggregation, Konzentrationsverlauf: Eine vollständige Aggregationshemmung durch GPIIb-IIIa-Antagonisten kann erreicht werden bei Stimulierung der Thrombozyten mit ADP. Bei Stimulierung mit TRAP ist dagegen nur eine inkomplette Hemmung möglich.

Um zu testen, ob die Hemmung des GPIIb-IIIa-Rezeptors durch GPIIb-IIIa-Antagonisten zu einer Deaggregation von bereits aggregierten Thrombozyten führen kann, wurden GPIIb-IIIa-Antagonisten in Konzentrationen, welche die TRAP-induzierte Aggregation maximal hemmen, den Blutplättchen nach Starten der Aggregation mit TRAP (50 μ M) bzw ADP (20 μ M) zugegeben. Dabei zeigte keiner der untersuchten Antagonisten einen Effekt auf die Deaggregation, wenn die Blutplättchen nach Stimulierung mit TRAP bereits aggregiert waren.

Bei Durchführung der entsprechenden Versuche mit ADP als Agonist, war nur der peptidähnliche GPIIb-IIIa-Antagonist EMD 122347, jedoch keiner der anderen Antagonisten, dazu in der Lage, die ADP-stimulierten Blutplättchen unter den experimentellen Bedingungen zu deaggregieren (Abbildung 16).

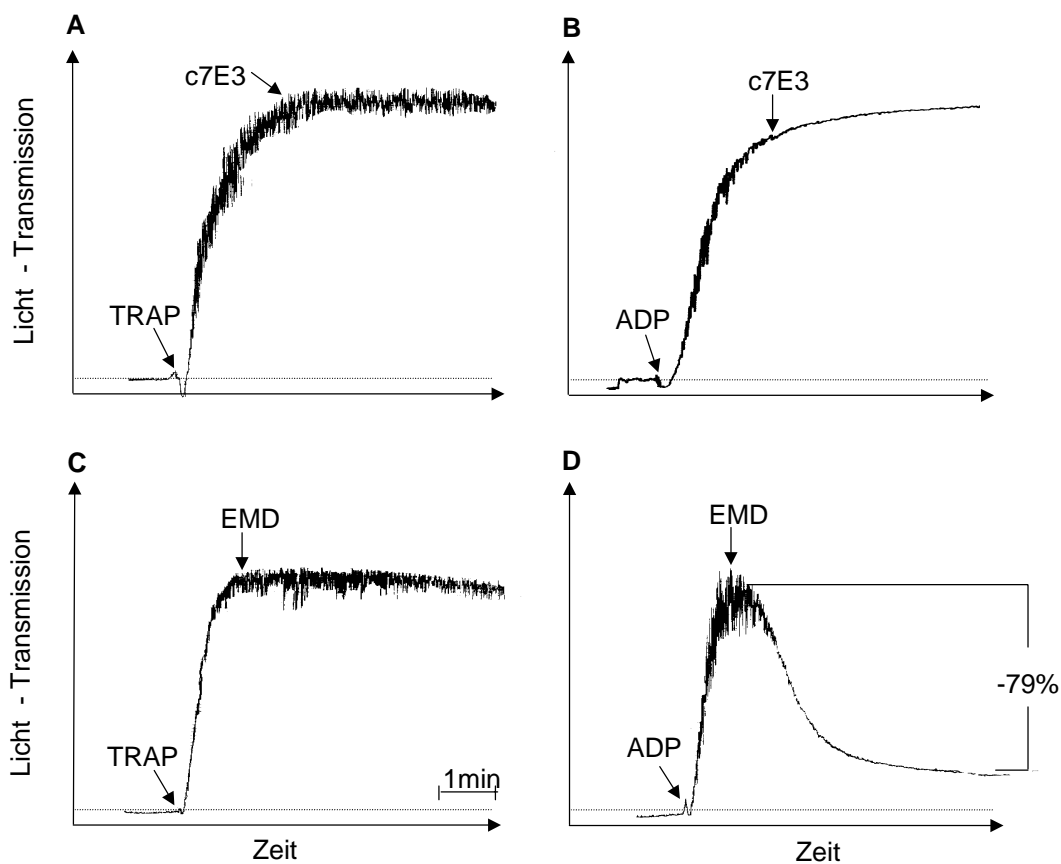


Abb 16: Deaggregation von Thrombozyten: Durch die Zugabe von c7E3 (50 μ g/ml) zu Thrombozyten, die mit TRAP oder ADP stimuliert wurden, war keine Deaggregation zu erkennen (A und B). Bei Zugabe von EMD 122347 (3,6 μ g/ml) war bei TRAP-Stimulierung ebenfalls keine Deaggregation möglich (C). Bei Stimulierung mit ADP dagegen war eine Abnahme der Aggregation von 79% auszulösen (D).

4.2.3 Freisetzungsreaktion

Die Effekte der Antagonisten auf die Degranulation der Blutplättchen wurden durch die Messung der ATP-Sekretion (Dichte Granula) und der Oberflächenexpression des P-Selektins (α -Granula) bestimmt.

Alle getesteten GPIIb-IIIa-Antagonisten hemmten die ATP-Freisetzung bei ADP-stimulierten Blutplättchen auf einen ähnlichen Wert von etwa 80%. Dagegen war bei Verwendung von TRAP als Plättchenstimulus eine deutlich geringere oder keine Hemmung der ATP-Freisetzung feststellbar, je nach dem, welcher Typ von GPIIb-IIIa-Inhibitor in der Plättchensuspension enthalten war (Abbildung 17). Während die ATP-Freisetzung bei EMD 122347, Tirofiban und YM 337 um etwa 40% gehemmt wurde, wie das auch bei GRGDSP der Fall war, fand kein wesentlicher Hemmeffekt der TRAP-induzierten ATP-Freisetzung bei c7E3, Integrelin und Lamifiban statt (Abbildung 17 und Abbildung 18). Die Originaldaten sind im Anhang in Tabelle 27 aufgeführt.

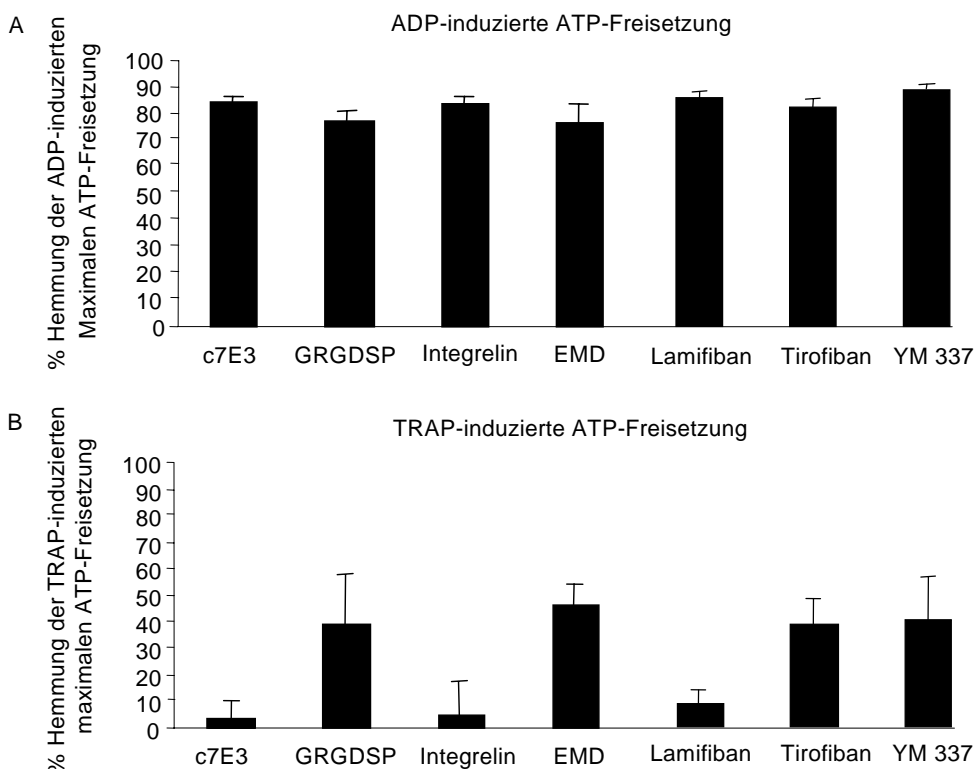


Abb 17: Hemmung der ATP-Freisetzung: Alle getesteten GPIIb-IIIa-Antagonisten hemmten die ATP-Freisetzung bei Stimulierung der Thrombozyten mit ADP auf einen ähnlichen Wert von etwa 80% (A). Dagegen war bei Verwendung von TRAP als Stimulus eine deutlich geringere oder keine Hemmung der ATP-Freisetzung feststellbar (B).

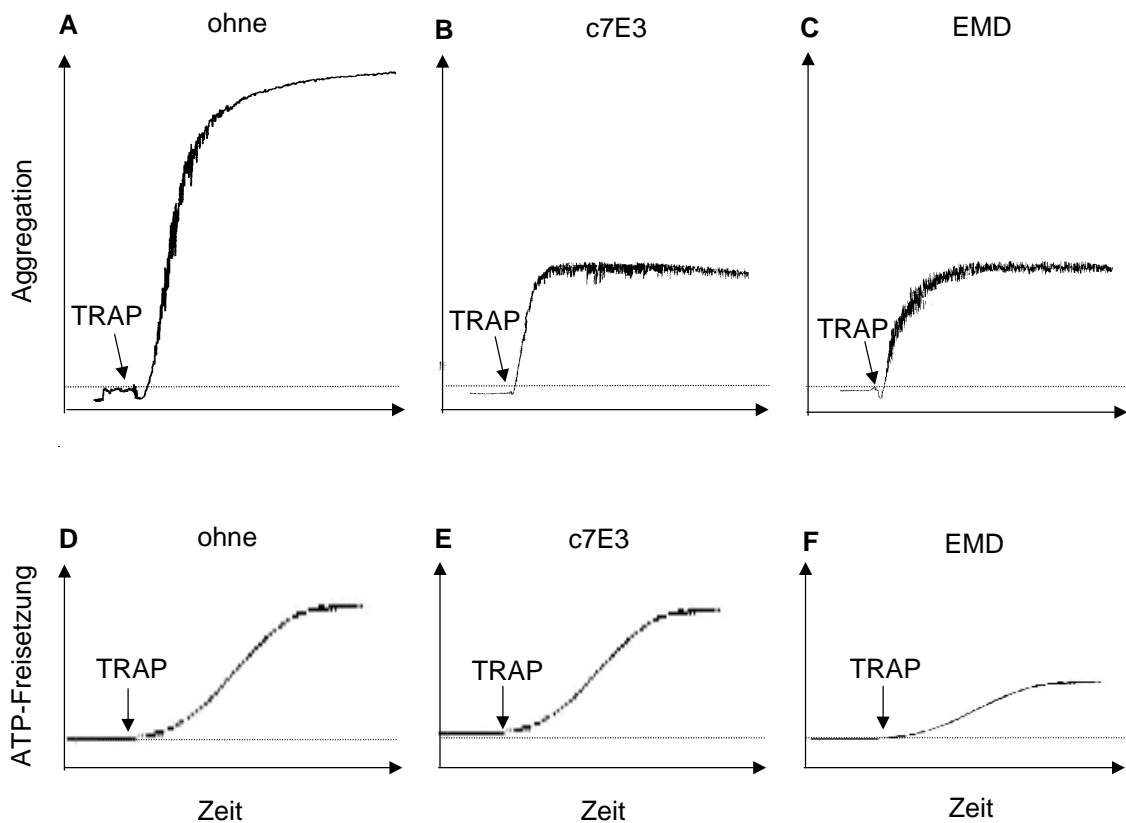


Abb 18: Hemmung der ATP-Freisetzung: Die Thrombozytenaggregation ließ sich bei TRAP-Stimulierung durch c7E3 und EMD122347 auf etwa gleiche Werte hemmen (A, B und C). Dagegen veränderte c7E3 die ATP-Freisetzung aus den Thrombozyten nicht, während durch EMD122347 eine Hemmung von über 40% zu erreichen war (D, E und F).

Bei Untersuchung des Effektes der GPIIb-IIIa-Antagonisten auf die aktivierungsabhängige Oberflächenexpression des P-Selektins, hemmte keiner der getesteten Antagonisten in bemerkenswertem Umfang die P-Selektin-Degranulation, mit Ausnahme von EMD 122347, welches auf schwache Weise die aktivierungsabhängige P-Selektin Exposition um über 15% reduzierte (Abbildung 19). Die Originaldaten sind im Anhang in Tabelle 29 aufgeführt.

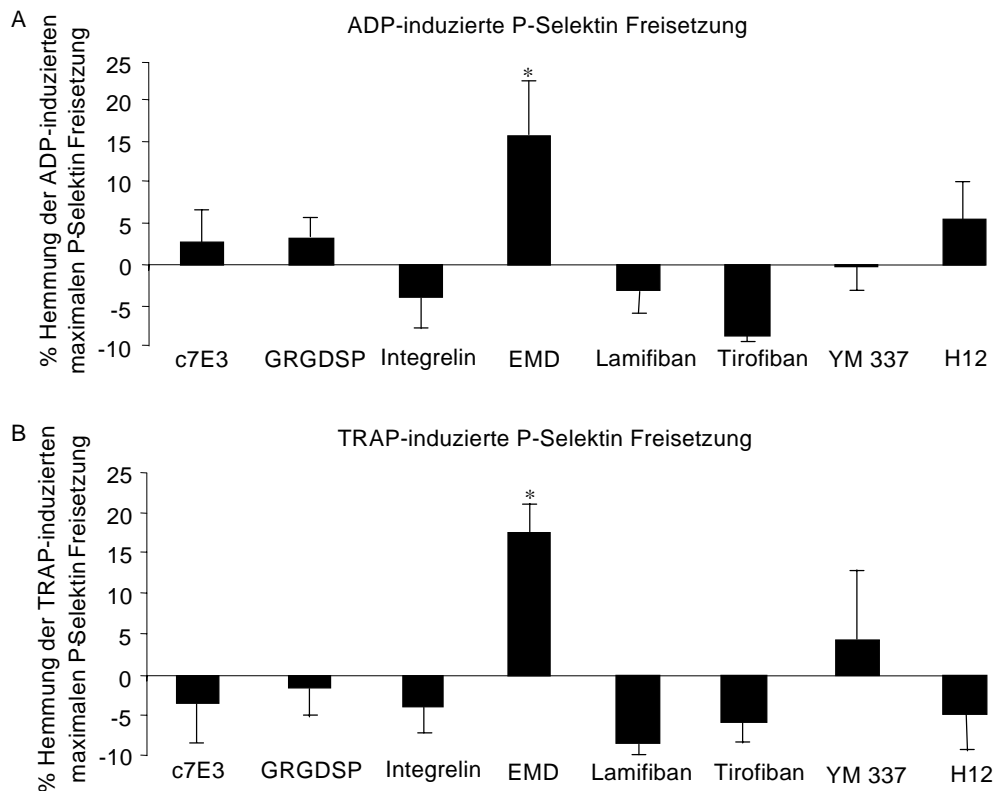


Abb 19: Hemmung des P-Selektins: EMD 122347 führte zu einer signifikanten Hemmung der P-Selektin Degranulation, sowohl bei Stimulierung der Thrombozyten mit ADP (A), als auch bei TRAP-Stimulierung (B). Ansonsten war keiner der anderen GPIIb-IIIa-Antagonisten dazu in der Lage (* = Signifikanz).

4.2.4 Oberflächenexpression von CD61

Bei Messung der Oberflächenexpression von CD61 anhand vier unterschiedlicher Proben mit einer Inkubationszeit von 30 Minuten und einer Konzentration der GPIIb-IIIa-Antagonisten, die eine maximale Aggregationshemmung bewirkt, wurden sowohl unstimulierte als auch mit TRAP-stimulierte Blutplättchen verwendet. Das Ergebnis wurde jeweils auf den Ausgangswert von unstimulierten Thrombozyten ohne Zugabe eines Antagonisten bezogen.

Dabei ergab keiner der Werte eine signifikante Abweichung vom Ausgangswert. Es zeigte sich allerdings für unstimulierte Blutplättchen eine tendenzielle Abnahme der Oberflächenexpression von CD61 bei c7E3, EMD 122347, H12 und YM 337. Bei den TRAP-stimulierten Werten ergab sich dagegen eine Zunahme zwischen 3,7 und 9,6% (Tabelle 24). Die Originaldaten sind im Anhang in Tabelle 30 aufgeführt.

Tab 17: Oberflächenexpression von CD61 (n=4)

Antagonist	Konzentration	% Abweichung vom Ausgangswert (unstimuliert)	% Abweichung vom Ausgangswert (TRAP-stimuliert)
c7E3	50µg/ml	-1,9	9,2
GRGDSP	1mM	2,5	9,4
Integrelin	2µg/ml	3,8	9,3
EMD 122347	3,6µg/ml	-8,9	3,7
H12	1mM	-5,7	6,1
Lamifiban	500ng/ml	-0,3	9,6
Tirofiban	125ng/ml	1,3	9,2
YM 337	60µg/ml	-3,7	4,3

4.2.5 Echistatin-Bindung

Die Veränderung der Zugänglichkeit des unaktivierten GPIIb/IIIa-Rezeptors wurde durch die Bindung der Blutplättchen mit Echistatin registriert. Dabei zeigte sich für c7E3, EMD122347 und H12 unter TRAP-Stimulierung eine signifikante Abnahme der Echistatin-Bindung gegenüber dem Ausgangswert und eine signifikant höhere Hemmung gegenüber den übrigen Antagonisten (Abbildung 20). Die Originaldaten sind im Anhang in Tabelle 31 aufgeführt.

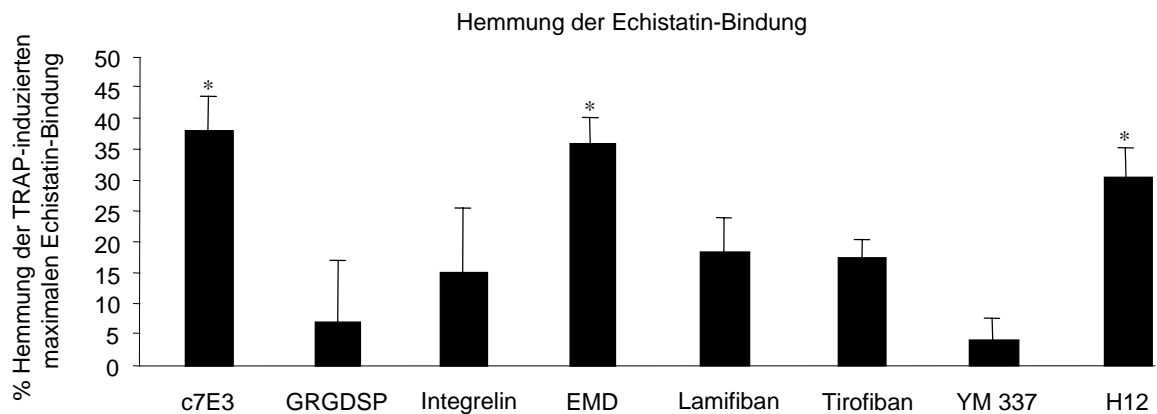


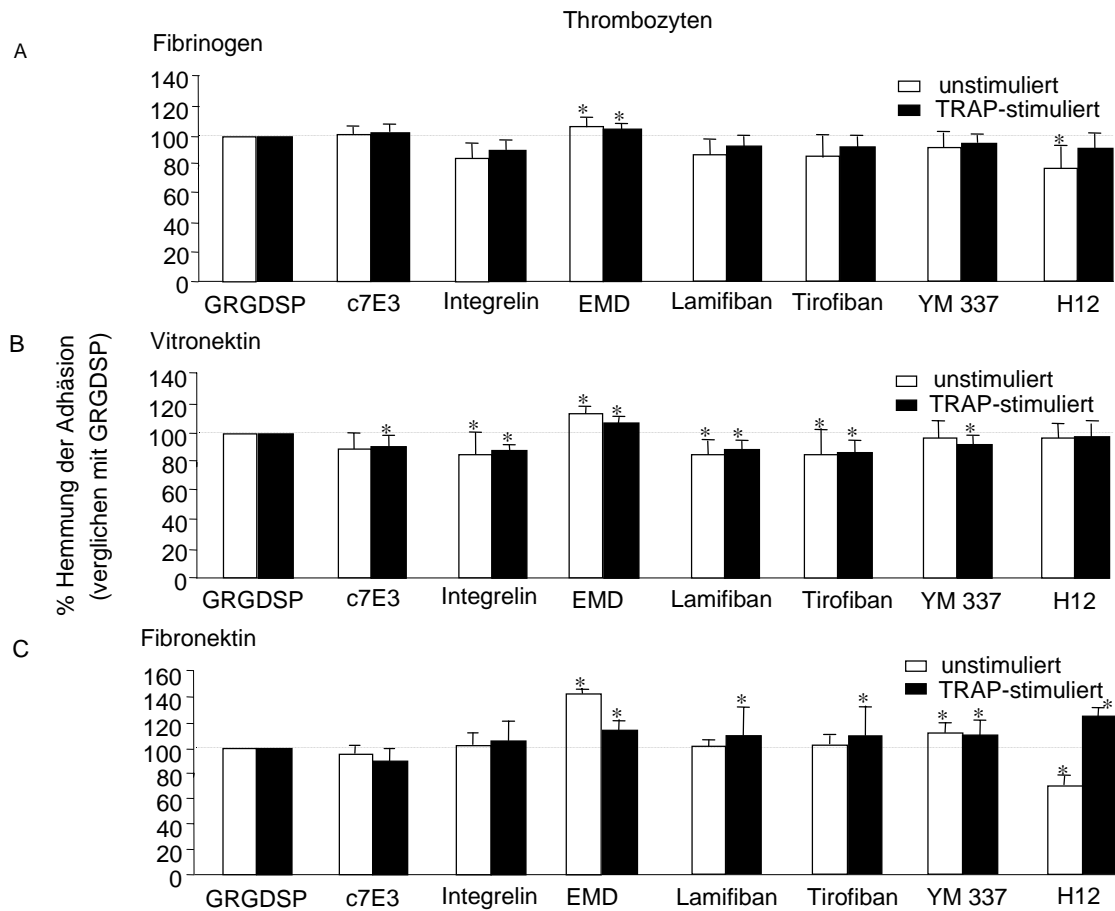
Abb 20: Hemmung der Echistatin-Bindung: Es ergab sich für c7E3, EMD122347 und H12 unter TRAP-Stimulierung eine signifikante Abnahme der Echistatin-Bindung (* = Signifikanz).

4.2.6 Adhäsion

Um zu untersuchen in welchem Umfang GPIIb-IIIa-Antagonisten in der Lage sind, Einfluss auf die Adhäsion von Thrombozyten zu nehmen und welche Rolle dabei der GPIIb-IIIa-Rezeptor spielt, wurden unstimulierte Blutplättchen (Messung der primären Adhäsion) mit TRAP stimulierte Blutplättchen (Messung der sekundären Adhäsion) sowie CHO-Zellen mit rekombinantem GPIIb-IIIa-Rezeptor verwendet. Die Thrombozyten und CHO-Zellen wurden dabei mit unterschiedlichen GPIIb-IIIa-Antagonisten vorinkubiert, um zu messen, in welchem Umfang anschließend eine Adhäsion an verschiedenen Oberflächenmolekülen möglich ist. Bei der Auswertung der Adhäsionsmessung wurde das Ergebnis der Adhäsionshemmung der einzelnen Antagonisten auf GRGDSP als Vergleichswert bezogen.

Bei der primären Adhäsion zeigte sich für EMD 122347 auf allen verwendeten Oberflächenmolekülen eine signifikant stärkere Adhäsionshemmung gegenüber GRGDSP. Für c7E3, Integrelin, Lamifiban, Tirofiban und YM337 ergaben sich insgesamt keine bzw. nur geringe Unterschiede im Vergleich zu GRGDSP. Bei H12 dagegen zeigte sich eine eher geringere Adhäsionshemmung (Abbildung 21).

Die Messung der sekundären Adhäsion ergab für EMD 122347 auf allen verwendeten Oberflächenmolekülen, mit Ausnahme von Kollagen, eine signifikant stärkere Adhäsionshemmung gegenüber GRGDSP. Bei den übrigen GPIIb-IIIa-Antagonisten zeigten sich insgesamt sehr unterschiedliche Ergebnisse bei Stimulierung der Thrombozyten mit TRAP und der anschließenden Adhäsionsmessung (Abbildung 21). Die Originaldaten sind im Anhang in Tabelle 32 und 33 aufgeführt.



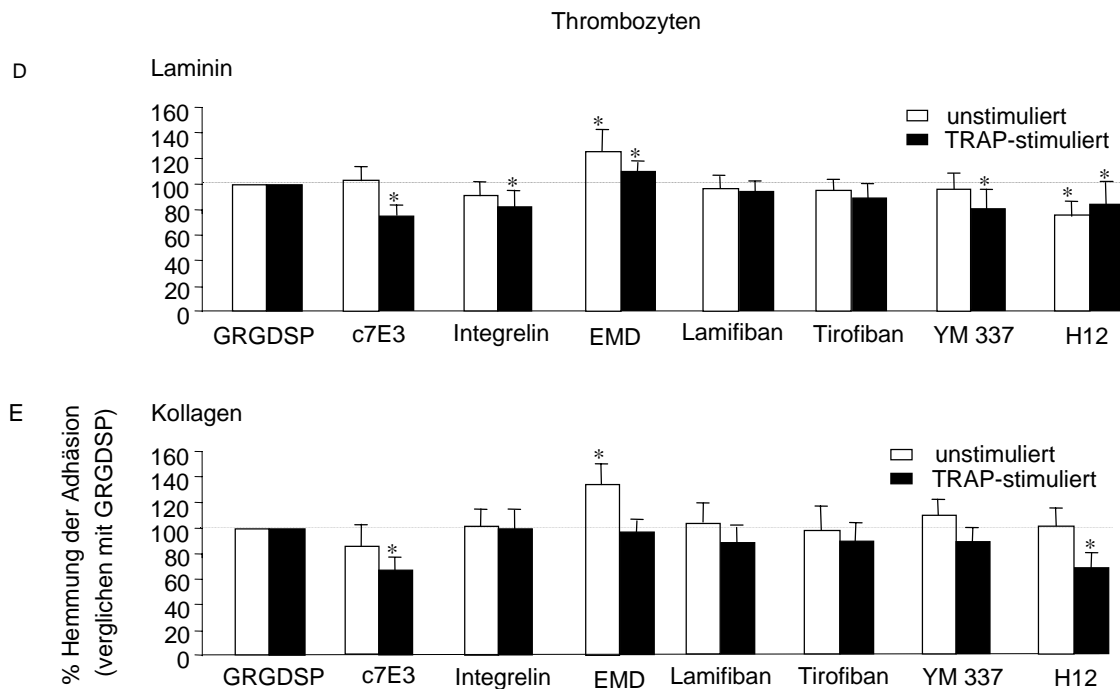


Abb 21: Adhäsionshemmung bei Thrombozyten: Dargestellt ist die Adhäsionshemmung von Thrombozyten durch Inkubation mit verschiedenen GPIIb-IIIa-Antagonisten. Als Vergleichswert diente dabei der Antagonist GRGDSP, welcher dem Wert von 100% entsprach. Als Oberflächenmoleküle wurden Fibrinogen (A), Vitronektin (B), Fibronektin (C), Laminin (D) und Kollagen (E) verwendet (* = Signifikanz).

Bei der Adhäsion der CHO-Zellen ergab sich auf Fibrinogen zwischen den unterschiedlichen GPIIb-IIIa-Antagonisten kein signifikanter Unterschied. Auf Vitronektin als Oberflächenmolekül wurde die Adhäsion durch c7E3, Integrelin, Lamifiban, Tirofiban und H12 im Vergleich zu GRGDSP signifikant schwächer gehemmt. EMD 122347 und YM337 dagegen unterschieden sich nicht signifikant von GRGDSP (Abbildung 22). Die Originaldaten sind im Anhang in Tabelle 34 aufgeführt.

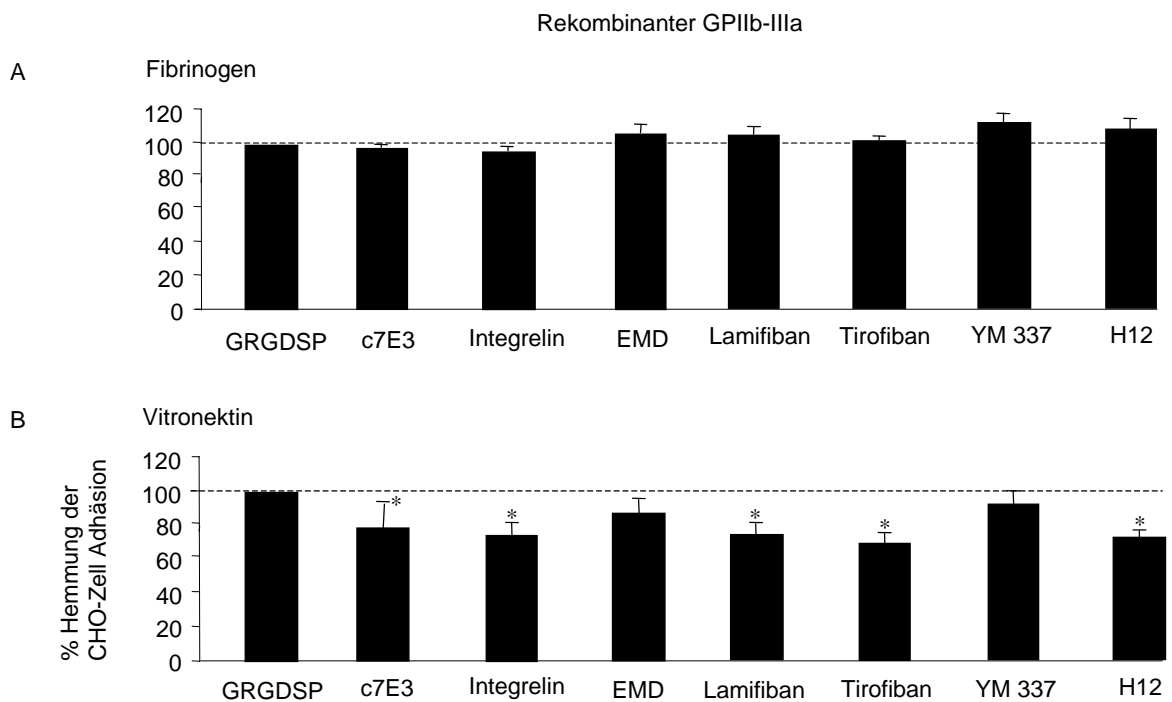


Abb 22: Adhäsionshemmung bei CHO-Zellen mit rekombinatem GPIIb-IIIa: Dargestellt ist die Adhäsionshemmung von CHO-Zellen durch Inkubation mit verschiedenen GPIIb-IIIa-Antagonisten. Als Vergleichswert diente dabei der Antagonist GRGDSP, welcher dem Wert von 100% entsprach. Als Oberflächenmoleküle wurden Fibrinogen (A) und Vitronektin (B) verwendet (* = Signifikanz).

5 Diskussion

5.1 Patientenuntersuchung

Trotz initial erfolgreicher Wiedereröffnung eines Infarktgefäßes kommt es in bis zu 15% der Fälle zum Wiederverschluss, was mit einer hohen Mortalitätsrate verbunden ist (Califf 1999). Eine erhöhte intravasale Thrombozytenaktivierung scheint den Erfolg der fibrinolytischen Reperfusion und das Auftreten von Reokklusionen entscheidend zu beeinflussen (Bihour 1995, Topol 1998).

Es konnte bereits gezeigt werden, dass es während der Fibrinolyse zur Freisetzung von freiem Thrombin kommt, welches wiederum zur verstärkten Thrombozytenaktivierung in der Umgebung eines lysierten Thrombus führt (Collen 1995, Gillis 1995). Fibrinolytika, wie Streptokinase oder rekombinanter „tissue plasminogen aktivator“ (rt-PA), sind auch in der Lage zu einer direkten Aktivierung von Blutplättchen zu führen (Bertolino 1992).

Es stellt sich deshalb die Frage, zu welchem Zeitpunkt und in welchem Umfang es zu einer Aktivierung der Blutplättchen kommt, um zu klären, ob eine adjuvante antithrombozytäre Therapie den Erfolg der Fibrinolyse unterstützen kann.

Die Hauptergebnisse der vorliegenden Studie sind im Folgenden dargestellt:

- a) Es ergab sich bei den mit ADP und TRAP stimulierten Werten bei der Messung 90 Minuten nach Fibrinolysebeginn eine signifikante ($p=0,034$ und $p=0,025$) Erhöhung der Aggregationsgeschwindigkeit.
- b) Bei dem Degranulationsmarker CD40L war über den Zeitverlauf eine deutliche kontinuierliche Steigerung der Oberflächenexpression festzustellen. Dieser Anstieg sowohl der unstimulierten als auch der Thrombin-stimulierten Werte war bereits sechs Stunden nach Beginn der Fibrinolysetherapie signifikant.

5.1.1 Aggregation

Es ergab sich über den Zeitverlauf von 72 Stunden bei ADP- und TRAP-Stimulation keine signifikante Änderung der Thrombozytenaggregation. Es zeigte sich aber, dass es bei Thrombin-Stimulierung nach 72 Stunden zu einem Anstieg der Thrombozytenaggregation kam. Dies ist wahrscheinlich auf eine geringere Heparin-Konzentration im Patientenblut zurückzuführen, was daher zu einer herabgesetzten Hemmung des Thrombins führt. Die geringere Heparinkonzentration kommt dabei durch eine Umstellung von einer intravenösen „high-dose“-Heparinisierung zu einer subkutanen „low-dose“-Heparinisierung zustande.

Die Steigung der Aggregation und damit die Reaktionsgeschwindigkeit der Blutplättchen erhöhte sich 90 Minuten nach Fibrinolysebeginn signifikant. Die Thrombozyten befinden sich zu diesem Zeitpunkt wahrscheinlich in einem Zustand erhöhter Reaktionsbereitschaft und reagieren deshalb schneller auf einen äußeren Reiz, wie z.B. die Zugabe eines Agonisten, ohne dass sich der Endzustand und damit die maximale Aggregation im Verlauf der Fibrinolysetherapie verändert.

In anderen Studien konnte gezeigt werden, dass es innerhalb von 72 Stunden nach Fibrinolysebeginn trotz der Gabe von Acetylsalicylsäure und Heparin zu einer Aktivierung des GPIIb-IIIa-Rezeptors kommt (Bihour 1995). Dies assoziiert mit einem erhöhten Risiko eines thrombotischen Wiederverschlusses des Infarkt-Gefäßes (Topol 1998).

Die Kombination von GPIIb-IIIa-Antagonisten mit Fibrinolytika scheint sich vorteilhaft auf die Rekanalisationsrate bei der Fibrinolysetherapie des akuten Myokardinfarktes auszuwirken (Coller 1990, Lefkovits 1995, Topol 1996). Diese Vorteile ergeben sich durch eine schnellere und vollständigere Reperfusion (Hudson 1999) und durch eine verbesserte angiographische und klinische Effektivität der Thrombolyse ohne ein erhöhtes Blutungsrisiko (Cannon 1999). Es konnte gezeigt werden, dass eine frühe und vollständige Reperfusion mit der Überlebensrate der Patienten korreliert (The PARADIGM-Investigators 1998).

Die IMPACT-AMI-Studie, die PARADIGM-Studie und die TIMI-14-Studie zeigen, dass GPIIb-IIIa-Antagonisten die Thrombolyse beschleunigen, zu einer besseren Reperfusion führen und eine Reduzierung der Fibrinolytikumdosis ermöglichen (The IMPACT-AMI-Investigators 1997, The PARADIGM-Investigators 1998, Cannon 1999).

Frühe Ergebnisse der noch laufenden SPEED- und GUSTO IV-Studien zeigen, dass durch die Kombination eines niedrig-dosierten Fibrinolytikums (Retepase) mit einem GPIIb-IIIa-Antagonisten (Abciximab) eine frühzeitige und komplette Reperfusion möglich ist (Califf 1999). Außerdem scheint im Gegensatz zum alleinigen Einsatz eines hochdosierten Fibrinolytikums die Reokklusionsrate herabgesetzt zu sein und eine geringere Gefahr von Blutungskomplikationen zu bestehen (Califf 1999).

Diese Beobachtungen und die Messergebnisse in der vorliegenden Arbeit zeigen die günstige Beeinflussung einer zusätzlichen antithrombozytären Therapie mit GPIIb-IIIa-Antagonisten, um die Effektivität der Fibrinolysetherapie zu verbessern und die Gefahren eines Wiederverschlusses für den Patienten zu vermindern. Allerdings sollten auch die Gefahren eines eventuell erhöhten Blutungsrisikos berücksichtigt werden.

Der Einsatz von GPIIb-IIIa-Antagonisten sollte frühzeitig erfolgen, weil es offenbar bereits 90 Minuten nach Beginn der Fibrinolyse und damit genau in der Phase, in der das Fibrinolytikum verabreicht wird, zu einer Aktivitätssteigerung der Thrombozyten kommt.

5.1.2 Freisetzungsreaktion

Bezüglich des Einflusses der Fibrinolysetherapie auf die Freisetzungsreaktion aus den Thrombozyten zeigten sich über den Zeitverlauf von 72 Stunden signifikante Unterschiede beim CD40-Ligand (CD40L, CD154). Es war eine kontinuierliche Steigerung der Oberflächenexpression von CD40L festzustellen. Dieser Anstieg sowohl der unstimulierten als auch der Thrombin-stimulierten Werte war bereits sechs Stunden nach Beginn der Fibrinolysetherapie signifikant.

CD40L ist ein transmembranes Protein, welches strukturell verwandt mit dem Zytokin TNF- α (Tumor-Nekrose-Faktor-Alpha) ist und ursprünglich auf CD4-positiven T-Zellen identifiziert wurde. Eine Interaktion zwischen CD40L auf T-Zellen mit CD40 auf B-Zellen (CD40L-CD40-Interaktion) ist von großer Bedeutung für die Entwicklung und Funktion der humoralen Immunabwehr (Henn 1998). Allerdings ist zu vermuten, dass CD40L eine breitere Funktion hat, weil CD40 neben B-Zellen auch auf Monozyten, Makrophagen und Zellen des Gefäßendothels nachgewiesen wurde (Henn 1998, Slupsky 1998).

Ebenso wie TNF- α und Interleukin-1 induziert auch CD40L auf Blutplättchen bei Zellen des Gefäßendothels die Sekretion von Chemokinen und die Expression von Adhäsionsmolekülen. Dadurch spielt CD40L eine Rolle bei der Interaktion von Thrombozyten mit dem Gefäßendothel. Aktivierte Thrombozyten induzieren dabei bei kultivierten Endothelzellen die Oberflächenexpression von ICAM-1, Interleukin-6, Interleukin-8, chemotaktisch auf Monozyten wirkendes Protein-1 und TF (Tissue-Faktor) über einen CD40L-vermittelten Mechanismus. Dadurch führt CD40L zu einer Entzündungsreaktion der Gefäßwand und spielt somit eine Rolle in der Pathogenese der Atherosklerose (Hawrylowicz 1991, Gawaz 1998, Henn 1998, Slupsky 1998, Aukrust 1999).

Es konnte bereits gezeigt werden, dass es bei Patienten mit akuten Koronarsyndromen, wie akutem Myokardinfarkt und instabiler Angina pectoris, im Vergleich zu Patienten mit stabiler Angina pectoris oder einer Kontrollgruppe zu einem signifikant höheren Anstieg der Oberflächenexpression von CD40L auf den Blutplättchen kommt (Aukrust 1999, Lee 2000). Ebenso konnte man erkennen, dass es bei Patienten mit stabiler Angina pectoris zu einem Anstieg von CD40L kommt. Man vermutet daher, dass die CD40L-CD40 Interaktion eine pathogenetische Rolle sowohl in der Entwicklung des atherosklerotischen Prozesses als auch in der Ausbildung und dem Fortschreiten von akuten Koronarsyndromen spielt (Aukrust 1999). Die Plaqueruptur und folgende Thrombusbildung führt dabei zu einer Aktivierung der CD40L-Expression von zirkulierenden Thrombozyten bei Patienten mit akuten Koronarsyndromen (Lee 2000).

Ein Anstieg von CD40L würde demnach bedeuten, dass sich im Verlauf der Fibrinolyse-therapie bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt eine Entzündungsreaktion des Gefäßendothels mit thrombozytärer Beteiligung abspielt, was das Plaquewachstum begünstigen und die Gefahr eines erneuten Verschlusses oder einer Restenose des Infarkt-Gefäßes erhöhen könnte. Dies zeigt wiederum die Notwendigkeit, die Thrombozyten mit Hilfe von kompetenten antithrombozytären Substanzen in ihrer Interaktion mit dem Gefäßendothel zu hemmen, um damit die Entzündungsreaktion abzuschwächen.

5.2 Experimentelle Untersuchung

Die vorliegende experimentelle Studie zeigt, dass zwischen den untersuchten GPIIb-IIIa-Antagonisten grundlegende Unterschiede in Bezug auf verschiedene Aspekte der Thrombozytenfunktion bestehen. Dies bedeutet im Einzelnen:

- a) Die Mehrzahl der untersuchten GPIIb-IIIa-Antagonisten induzieren Liganden-induzierte-Bindungsstellen (LIBS) auf dem GPIIb-IIIa-Rezeptor.
- b) Alle getesteten GPIIb-IIIa-Antagonisten hemmen die Aggregation von mit ADP, nicht aber mit TRAP, stimulierten Blutplättchen.
- c) GPIIb-IIIa-Antagonisten sind schwache Inhibitoren der Degranulation der Blutplättchen (ATP und P-Selektin Sekretion), besonders, wenn zur Plättchenaktivierung starke Agonisten (wie TRAP) verwendet werden.
- d) Die einzelnen GPIIb-IIIa-Antagonisten üben einen sehr unterschiedlichen Einfluss auf die Thrombozyten- und CHO-Zelladhäsion aus.

Diese Ergebnisse zeigen, daß signifikante Unterschiede zwischen den klinisch relevanten GPIIb-IIIa-Antagonisten bestehen. Besonders deshalb, weil unterschiedliche Aspekte der Thrombozytenfunktion betroffen sind, so wie intrinsische Aktivierung des GPIIb-IIIa-Rezeptors und Freisetzungsreaktion aus den Blutplättchen. Die beschriebenen unterschiedlichen Effekte der GPIIb-IIIa-Antagonisten auf die Plättchenfunktion können somit Konsequenzen für die Therapie von Patienten mit koronaren Ereignissen haben. Außerdem könnten sie helfen, die antithrombotischen Strategien bei diesen Patienten zu verbessern.

5.2.1 Intrinsische Aktivierungsvorgänge

In der Vergangenheit wurde eine Vielzahl von Antagonisten des GPIIb-IIIa-Rezeptors entwickelt, welche alle eine effektive Reduzierung von thrombo-ischämischen Ereignissen bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom zeigten, sowie ebenso bei Patienten, welche sich einer koronaren Intervention bei symptomatischer koronarer Herzerkrankung unterzogen (Coller 1995, Lefkovits 1995, The PARAGON-Investigators, The PRISM-PLUS-Investigators 1998, The IMPACT II-Investigators 1997).

Zur Zeit werden drei Typen von GPIIb-IIIa-Antagonisten klinisch untersucht:

- a) GPIIb-IIIa blockierende monoklonale Antikörper (c7E3, YM337)
- b) Synthetische Peptide, welche eine RGD- oder KGD-Sequenz enthalten und aus Schlangengiften entwickelt werden (Integrelin, Lamifiban)
- c) Synthetische nicht-Peptide, welche die Struktur von RGD und KGD imitieren (Tirofiban, EMD 122347)

Obwohl alle GPIIb-IIIa-Antagonisten die Fibrinogenbindung an den GPIIb-IIIa-Rezeptor sowie die Plättchenaggregation effektiv hemmen, zeigen experimentelle Daten signifikante Unterschiede, die mit einer unterschiedlichen klinischen Effektivität bei ähnlichem klinischen Einsatzgebiet assoziiert sein könnten.

In der vorliegenden Studie wurde der Effekt der klinisch relevanten GPIIb-IIIa-Antagonisten auf potentielle intrinsische Aktivierungsvorgänge untersucht. Es wurde herausgefunden, dass die Mehrzahl der getesteten Antagonisten (c7E3, Integrelin, Tirofiban und Lamifiban) eine LIBS-Exposition sowohl auf intakten ruhenden Blutplättchen als auch auf rekombinantem menschlichen GPIIb-IIIa bewirken. Andere untersuchte Antagonisten (EMD 122347 und YM 337) verursachten jedoch keine LIBS-Exposition.

Dies lässt vermuten, dass obwohl alle GPIIb-IIIa-Antagonisten mit Fibrinogen um eine gemeinsame Bindungsstelle auf dem GPIIb-IIIa-Rezeptor konkurrieren, die Bindungscharakteristiken an den Rezeptor und die daraus folgenden Effekte auf die Konformationsänderung des Rezeptors unterschiedlich sind. Eine Konsequenz der LIBS-Induktion könnte sein, dass GPIIb-IIIa-Antagonisten einen aktiven funktionellen Zustand auf dem Rezeptor induzieren, welcher proaggregatorische Effekte nach Abdissoziation des Antagonisten und anschließender Fibrinogen-Bindung hat. Dies wurde bereits für einige Antagonisten beschrieben (Du 1991, Peter 1998, Satoh 1994).

Diese Induktion des aktiven funktionellen Zustandes des GPIIb-IIIa-Rezeptors kommt wahrscheinlich durch eine über Thromboxan-A₂ vermittelte Erhöhung der intrazellulären Calcium-Konzentration zustande (Honda 1998, Peter 1998).

Eine weitere Konsequenz der intrinsischen Aktivierungsfähigkeit der GPIIb-IIIa-Antagonisten ist daher möglicherweise, dass über die LIBS-Induktion eine intrazelluläre Signalübertragung moduliert wird (outside in signaling), welche anschließend zu einer Freisetzungsreaktion aus den aktivierten Blutplättchen führt.

Es wurde bereits gezeigt, dass Antagonisten mit LIBS-Aktivität einen Thrombin-induzierten intrazellulären Kalziumanstieg bewirken (Honda 1998). Weil die Freisetzungsreaktion aus den Blutplättchen stark abhängig von der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration ist (Siess 1989), wurde der Effekt der GPIIb-IIIa-Antagonisten auf die Freisetzungsreaktion der Blutplättchen im Rahmen dieser Arbeit untersucht.

Es wurde herausgefunden, dass GPIIb-IIIa-Antagonisten keine effektiven Inhibitoren der Freisetzungsreaktion unter den Bedingungen einer starken Plättchenaktivierung sind. Obwohl alle getesteten Antagonisten die Freisetzungsreaktion aus mit ADP-aktivierten Blutplättchen grundlegend hemmten, war die Hemmung der TRAP-induzierten Degranulation gering. Interessanterweise zeigte ein Antagonist, der keine LIBS-Induktion aufweist, EMD 122347, eine schwache Hemmung der TRAP-induzierten Degranulation. Dieses Ergebnis lässt einen Zusammenhang zwischen LIBS-Expression und einer über GPIIb-IIIa verursachten Freisetzungsreaktion aus den Blutplättchen vermuten.

Wie bereits beschrieben, erhöhen GPIIb-IIIa-Antagonisten, die LIBS auf der β_3 (GPIIIa)-Untereinheit induzieren, die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration über eine Thromboxan- A_2 Produktion. Andererseits beeinträchtigen Antagonisten, die keine LIBS-Aktivität zeigen, nicht die Thrombin-induzierte intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration (Honda 1998).

Weil Blutplättchen eine Vielzahl von freisetzungsfähigen, aktiven Bestandteilen enthalten (Nukleotide, Wachstumsfaktoren, Adhäsionsmoleküle), welche an der Pathophysiologie von Restenosen und Mikrozirkulationsstörungen beteiligt sind, wäre eine effektive Hemmung der Freisetzungsreaktion neben einer Hemmung der Aggregation wünschenswert. Es sind allerdings zusätzliche Studien nötig, um die Rolle der Antagonisten-induzierten LIBS-Expression auf die Freisetzungsreaktion der Blutplättchen näher zu untersuchen.

5.2.2 Aggregation und Deaggregation

Es zeigte sich, dass es mit keinem der GPIIb-IIIa-Antagonisten möglich war, die Aggregation der Thrombozyten durch Stimulierung mit einem starken Agonisten, wie TRAP, vollkommen zu hemmen.

Bei der Messung der Oberflächenexpression von CD61, und damit der Bestimmung der Oberflächendichte des zur Aggregation der Thrombozyten notwendigen GPIIb-IIIa-Rezeptors, konnte bei unstimulierten und mit GPIIb-IIIa-Antagonisten vorinkubierten Blutplättchen bei einigen der Antagonisten eine tendenzielle Abnahme gezeigt werden. Dagegen kam es bei Stimulierung mit TRAP trotz Anwesenheit der Antagonisten zu einer Zunahme der Oberflächendichte des GPIIb-IIIa-Rezeptors.

Die verminderte Oberflächenexpression von GPIIb-IIIa-Rezeptoren bei Inkubation der Blutplättchen mit GPIIb-IIIa-Antagonisten ist auf eine Aufnahme in den Intrazellularraum zurückzuführen. Durch einen starken Stimulus kommt es dagegen zu einer gesteigerten Oberflächenexpression von intrazellulär gespeicherten GPIIb-IIIa-Rezeptoren, die trotz Anwesenheit von GPIIb-IIIa-Antagonisten nicht adäquat blockiert werden können, weil durch Stimulierung mit starken Agonisten GPIIb-IIIa-Rezeptoren, welche bereits mit Fibrinogen oder anderen Liganden gebunden sind, aus dem „Surface Connecting System“ (SCS) und den Membranen der α -Granula an die Thrombozytenoberfläche gelangen können (Woods 1986, Wencel-Drake 1986, Morgenstern 1992). Dadurch können auch in hoher Konzentration vorhandene Antagonisten nicht mehr an den Rezeptor binden und somit ist es auch nicht möglich die Thrombozytenaggregation komplett zu hemmen.

Der einzige GPIIb-IIIa-Antagonist, mit dem eine Deaggregation von mit ADP-stimulierten und bereits aggregierten Blutplättchen möglich war, ist EMD122347. Dieser Antagonist verursachte auch keine LIBS-Induktion und ist deshalb vermutlich auch nicht verantwortlich für eine intrinsische Aktivierung des GPIIb-IIIa-Rezeptors. Durch den möglichen fehlenden proaggregatorischen Effekt könnte so die Deaggregationsfähigkeit zu erklären sein (Du 1991, Peter 1998, Satoh 1994).

5.2.3 Echistatin-Bindung

Mit Hilfe der Echistatin-Bindung wurde die Zugänglichkeit des unaktivierten GPIIb-IIIa-Rezeptors gemessen. Von den klinisch relevanten GPIIb-IIIa-Antagonisten zeigten dabei c7E3 und EMD 122347 eine signifikant stärkere Hemmung der Echistatin-Bindung im Vergleich zu den anderen Antagonisten.

Dies bedeutet, dass die Zugänglichkeit des GPIIb-IIIa für kleine, RGD-enhaltende Peptide durch die beiden genannten Antagonisten gehemmt wird, während die übrigen Antagonisten weiterhin eine Bindung von kleinen Peptiden zulassen. Diese Bindung könnte zur Folge haben, dass es innerhalb des GPIIb-IIIa-Komplexes zu einer Verstärkung der LIBS-Induktion und damit zu einer proaggregatorischen Wirkung kommen kann (Du 1991, Peter 1998, Satoh 1994).

5.2.4 Adhäsion

Die Ergebnisse der Adhäsionsmessung zeigten einen sehr unterschiedlichen Einfluss der einzelnen GPIIb-IIIa-Antagonisten auf die Hemmung der Thrombozytenbindung an verschiedene Oberflächenmoleküle.

Dies legt die Vermutung nahe, dass die Antagonisten neben einer unterschiedlich stark ausgeprägten Beeinflussung des GPIIb-IIIa-Rezeptors (α IIB β 3-Integrin) auch noch diverse Beeinflussungsmöglichkeiten auf die anderen Thrombozyten-Integrine, z.B. die β 1-Integrine haben. Wahrscheinlich kommt es durch die Bindung der GPIIb-IIIa-Antagonisten zu einer trans-dominanten Hemmung von anderen Integrinen (Diaz-Gonzalez 1996). Deshalb war neben der Hemmung der Thrombozytenbindung auf Fibrinogen, Vitronektin und Fibronektin (Bindung v.a. über β 3-Integrine), auch eine Adhäsionshemmung auf Laminin und Kollagen möglich (Bindung über β 1-Integrine).

Vor allem ein Antagonist, der keine LIBS-Induktion und damit wahrscheinlich keine intrinsische Aktivierung des GPIIb-IIIa zeigte, EMD 122347, stach bei der Untersuchung besonders heraus, indem er bei allen Oberflächenstrukturen einen zum Teil deutlich besseren Hemmeffekt auf die Thrombozytenadhäsion ausübte.

Bei der CHO-Zelladhäsion zeigte sich dagegen keine bessere Adhäsionshemmung von EMD 122347 gegenüber den anderen GPIIb-IIIa-Antagonisten. Wahrscheinlich hat EMD 122347 in größerem Umfang die Möglichkeit, auf andere Thrombozyten-Integrine Einfluss zu nehmen und damit die Adhäsion in höherem Maße zu hemmen.

Aufgrund der bei dieser Studie verwendeten CHO-Zellen, die nur den rekombinanten GPIIb-IIIa-Rezeptor exprimieren, besteht jedoch nicht die Möglichkeit, auf andere Integrine außer dem α IIB β 3-Integrin einzuwirken. So ist zu erklären, dass EMD122347 zwar eine deutlich bessere Adhäsionshemmung gegenüber den restlichen Antagonisten bei den Thrombozyten zeigte, nicht aber bei den CHO-Zellen.

5.2.5 Therapeutische Möglichkeiten

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchten unterschiedlichen Effekte der GPIIb-IIIa-Antagonisten auf die Plättchenfunktion können bei Entwicklung und Design von neuen GPIIb-IIIa-Antagonisten helfen. Allerdings werfen diese Effekte auch viele Fragen bezüglich der Therapiestrategien für Patienten auf. Vom therapeutischen Standpunkt aus könnte die Expression von LIBS-Neoepitopen eine Produktion von Antikörpern gegen die LIBS-Neoepitope nach sich ziehen und so eine ausgesprochene Immunthrombozytopenie verursachen (Berkowitz 1997). Es wurde gezeigt, dass bei Gabe von c7E3 eine LIBS1-Expression induziert wird, die mit der peripheren Plättchenzahl korreliert (Gawaz 1998). Jedoch gibt es im Moment keine umfassenden klinischen Daten, die diese Hypothese unterstützen.

Außerdem wurde gezeigt, dass LIBS-induzierende GPIIb-IIIa-Antagonisten eine Thromboxan-A₂-Produktion nach Aktivierung der Blutplättchen mit Thrombin bewirken (Honda 1998). Weil Thromboxan A₂ als ein Vasokonstriktor den koronaren Durchfluss während einer thrombotischen Situation beeinträchtigen kann, könnte die daraus entstehende Mikrozirkulationsstörung einen gegensätzlichen Effekt bei Patienten mit vermehrten thrombotischen Ereignissen haben und die Notwendigkeit einer gemeinsamen Therapie eines GPIIb-IIIa-Antagonisten mit einem Cyklooxygenasehemmer nahelegen.

Außerdem könnten unterschiedliche Effekte der GPIIb-IIIa-Antagonisten auf die β 1-Integrine die adhäsive Funktion der Blutplättchen an die Gefäßwand beeinflussen. Neben ihrer allgemeinen aggregationshemmenden Aktivität könnten GPIIb-IIIa-Antagonisten deshalb vorteilhaft auf die adhäsive Funktion von Blutplättchen während der Reperfusion sein oder positiv auf proliferative Mechanismen innerhalb der Gefäßwand einwirken.

5.3 Studienbeschränkungen

Die Untersuchung von Thrombozytenfunktionen wird immer von dem potentiellen Risiko einer artifiziellen Thrombozytenaktivierung in vitro, bei der Gewinnung oder Verarbeitung der Proben, beeinträchtigt. Um fehlerhafte Ergebnisse zu vermeiden, wurden deshalb sämtliche methodische Variablen innerhalb der untersuchten Patienten konstant gehalten und außerdem alle Proben innerhalb kürzest möglicher Zeit verarbeitet. Die durchflusszytometrische Untersuchung erlaubt allerdings nur Aussagen über noch zirkulierende Thrombozyten, aber keine Beurteilung einer Aktivierung von Blutplättchen, die bereits sequestriert wurden. Demnach wäre es möglich, dass die thrombozytäre Aktivität unterbewertet wurde, was besonders bei Patienten mit geringer systemischer Thrombozytenaktivierung zum Tragen kommen könnte.

Durch die Wahl der im Rahmen der Patientenstudie verwendeten Agonistenkonzentrationen, war es möglich eine höhere Reaktionsbereitschaft der Thrombozyten nachzuweisen. Es konnten keine signifikanten Unterschiede in der maximalen Aggregation und in der ATP-Freisetzung gemessen werden, wohl aber in der Steigung der Aggregationskurve. Mit Hilfe der Durchflusszytometrie ist es dagegen nicht möglich nur kleine Unterschiede in der Reaktionsbereitschaft der Thrombozyten nachzuweisen, weil durch diese Methodik nur der Endzustand der Thrombozyten dargestellt werden kann und nicht der Verlauf bis zu diesem Zustand. So ist zu erklären, dass in der Durchflusszytometrie durch die gewählten Agonistenkonzentrationen keine signifikanten Unterschiede in der Oberflächenexpression der meisten Membranglykoproteine messbar waren.

Zur Zeit gibt es keine Daten darüber, ob die unterschiedlichen Effekte der im Rahmen der experimentellen Studie getesteten GPIIb-IIIa-Antagonisten Konsequenzen bezüglich der Behandlung von Patienten mit koronarer Herzerkrankung haben. Es wäre von besonderem Interesse, ob GPIIb-IIIa-Antagonisten, welche Konformationsänderungen im GPIIb-IIIa-Rezeptor bewirken können, zu einer thrombotischen Episode in pathophysiologischen Situationen führen können. Es sollte eine vergleichende Beurteilung der Antagonisten in vivo durchgeführt werden, bevor endgültige Entscheidungen bezüglich dieses Themas getroffen werden. Obwohl experimentelle Daten zeigen, dass die Aktivierung des GPIIb-IIIa-Rezeptors durch Antagonisten reversibel ist, sind weitere klinische Studien notwendig, um die Reversibilität der GPIIb-IIIa-Aktivierung bei Patienten zu bestätigen oder zu widerlegen.

In dieser Arbeit wurde nicht das Thema des synergistischen Effektes von anderen Thrombozytenhemmern (Acetylsalicylsäure, Ticlopidin) zusammen mit GPIIb-IIIa-Antagonisten auf die Plättchenfunktion behandelt. Obwohl die Effekte der GPIIb-IIIa-Antagonisten auf die Plättchenfunktion, so wie Aggregation, Adhäsion, Freisetzungsreaktion oder prokoagulatorische Aktivität, in Gegenwart von anderen Thrombozytenhemmern unterschiedlich sein könnten, wurde allerdings bereits gezeigt, dass Acetylsalicylsäure die intrinsischen Aktivierungsvorgänge der GPIIb-IIIa-Antagonisten nicht beeinträchtigt (Peter 1998).

6 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde in einer klinischen-experimentellen Studie die Thrombozytenaktivität im Verlauf der Fibrinolysetherapie bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt untersucht. Es wurden insgesamt acht Patienten in die Studie aufgenommen. Der Beobachtungszeitraum betrug 72 Stunden nach Therapiebeginn. In diesem Zeitraum wurden sechs Blutabnahmen bei jedem Patienten vorgenommen. Als Methodik der Probenuntersuchung dienten dabei die Aggregometrie und Luminometrie zur Messung der Thrombozytenaggregation und Freisetzungsreaktion von ATP und die Durchflusszytometrie zur Bestimmung des Aktivierungszustandes der einzelnen thrombozytären Membranglykoproteine.

Dabei ergab sich 90 Minuten nach Beginn der Fibrinolyse eine signifikante Erhöhung der Steigung der Thrombozytenaggregationskurve, was auf eine Aktivitätszunahme der Blutplättchen in der Phase der Fibrinolytikumgabe hindeutet. Zur Verhinderung dieser Aktivitätssteigerung und damit zur Erreichung einer schnelleren und kompletteren Thrombolyse und einer geringeren Gefahr eines Wiederverschlusses des Infarkt-Gefäßes wäre der Einsatz von antithrombozytären Substanzen, wie GPIIb-IIIa-Antagonisten, sinnvoll. Dadurch könnte auch die Dosierung des Fibrinolytikums herabgesetzt werden. Der Einsatz von GPIIb-IIIa-Antagonisten sollte allerdings unter Berücksichtigung einer eventuell erhöhten Blutungsneigung erfolgen.

Bei der durchflusszytometrischen Messung ergaben sich über den Zeitverlauf bei den meisten der untersuchten thrombozytären Membranglykoproteine keine signifikanten Unterschiede. Ausnahme war CD40L, welches eine Rolle bei der Vermittlung einer Entzündungsreaktion von Blutplättchen auf das Gefäßendothel spielt. Ein Anstieg dieses Markers würde bedeuten, dass sich im Verlauf der Fibrinolysetherapie bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt eine Entzündungsreaktion des Gefäßendothels über einen durch Thrombozyten vermittelten Mechanismus abspielt. Dies könnte die Gefahr eines Wiederverschlusses des Infarktgefäßes erhöhen und legt damit bei diesen Patienten die Wichtigkeit einer antithrombozytären Therapie zur Verhinderung dieses Ereignisses nahe.

Desweiteren wurde im Rahmen dieser Arbeit in einer experimentellen Studie die Thrombozytenfunktion unter dem Einfluss von verschiedenen, klinisch relevanten Fibrinogenrezeptor (GPIIb-IIIa)-Antagonisten untersucht. Die verwendeten GPIIb-IIIa-Antagonisten waren Abciximab (c7E3, ReoPro), Integrelin (Integrilin, Eptifibatide), Lamifiban, Tirofiban (MK 383, Aggrastat), EMD 122347 und YM 337.

Als methodische Verfahren dienten dabei die Aggregometrie und Luminometrie zur Messung der Thrombozytenaggregation und Freisetzungsreaktion von ATP, die Durchflusszytometrie zur Bestimmung des Aktivierungszustandes der einzelnen thrombozytären Membranglykoproteine und die Bindung von Blutplättchen an beschichtete Mikrotiterplatten zur Untersuchung der Thrombozytenadhäsion. Zusätzlich wurden zum Teil rekombinante Hamsterzellen (CHO-Zellen), die den menschlichen GPIIb-IIIa-Rezeptor exprimierten, verwendet.

Dabei zeigte sich, dass zwischen den untersuchten GPIIb-IIIa-Antagonisten einige wichtige Unterschiede in Bezug auf verschiedene Aspekte der Thrombozytenfunktion bestehen. Die Hauptergebnisse sind:

- a) Die Mehrzahl, aber nicht alle der untersuchten GPIIb-IIIa-Antagonisten induzieren Liganden-induzierte-Bindungsstellen (LIBS) auf dem GPIIb-IIIa-Rezeptor.
- b) Alle getesteten GPIIb-IIIa-Antagonisten hemmen die Aggregation bei Stimulierung mit schwachen, nicht aber mit starken Agonisten.
- c) GPIIb-IIIa-Antagonisten sind schwache Inhibitoren der Freisetzungsreaktion aus den Blutplättchen besonders, wenn starke Agonisten benutzt werden, um die Plättchen zu aktivieren.
- d) Die einzelnen GPIIb-IIIa-Antagonisten üben einen sehr unterschiedlichen Einfluss auf die Thrombozyten- und CHO-Zelladhäsion aus.

Besonders EMD 122347 stach bei der Untersuchung heraus. Dieser induzierte nicht die Liganden-induzierten-Bindungsstellen (LIBS) auf dem GPIIb-IIIa-Rezeptor und hatte deshalb wahrscheinlich auch keine intrinsische Aktivierung des GPIIb-IIIa-Rezeptors zur Folge. Dadurch ist auch zu erklären, dass EMD 122347 im Vergleich zu den anderen Antagonisten den stärksten Einfluss auf die Hemmung der Freisetzungsreaktion aus den Blutplättchen besitzt, auch wenn die Hemmung insgesamt schwach ausgeprägt ist. Auch bei der Messung der Thrombozytenadhäsion zeigte sich, dass vor allem EMD 122347 ausgeprägte Beeinflussungsmöglichkeiten auf die Adhäsionshemmung besitzt.

Die beschriebenen unterschiedlichen Effekte der GPIIb-IIIa-Antagonisten auf die Plättchenfunktion könnten sowohl Konsequenzen für die Therapie von Patienten mit koronaren Ereignissen haben als auch helfen die antithrombotischen Strategien bei diesen Patienten zu verbessern. Zudem könnten diese Ergebnisse bei Entwicklung und Design von neuen GPIIb-IIIa-Antagonisten helfen.

Abkürzungsverzeichnis

AA	Arachidonsäure
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosin-diphosphat
AMI	Akuter Myokardinfarkt
AP	Angina pectoris
ASS	Acetylsalicylsäure
ATP	Adenosin-triphosphat
BSA	bovines serum albumin
C	Konzentration
CAPTURE	chimeric 7E3 antiplatelet in unstable angina refractory to standard treatment trial
CD	Cluster of Determinants
CD40L	CD40-Ligand
Col	Kollagen
DTS	dense tubular system
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetra-Azetat
Epi	Epinephrin
Fg	Fibrinogen
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
Fn	Fibronectin
g	Erdbeschleunigung
GP	Glykoprotein
I.E.	Internationale Einheiten
ICAM	Intercellular adhesion molecule
IMPACT	Integrelin to manage platelet aggregation to combat thrombosis trial
ISIS	international study of infarct survival
KHK	Koronare Herzerkrankung
Lam	Laminin
LIBS	Liganden-induzierte Bindungsstelle
LIMP	lysosomale integrale Membran Proteine
M	mol/l
MAk	Monoklonaler Antikörper

PARAGON	platelet IIb-IIIa antagonist for the reduction of acute coronary syndrome events in a global organization network
pAVK	periphere arterielle Verschlusskrankheit
PE	Phycoerythrin
PBS	phosphate buffered saline
PDGF	platelet derived growth factor
PECAM	platelet endothelial cellular adhesion molecule
PPP	Platelet Poor Plasma
PRISM PLUS	platelet receptor inhibition for ischemic syndrome management study plus
PRISM	platelet receptor inhibition for ischemic syndrome management study
PRP	Platelet Rich Plasma
PTCA	percutane transluminale korangioplastie
PURSUIT	platelet IIb-IIIa underpriming the receptor for suppression of unstable ischemia trial
RGD	Arginin-Glycin-Aspartat
RIBS	Rezeptor-induzierte Bindungsstelle
rtPA	rekombinant tissue plasminogen activator
SCS	surface connected system
SD, Stabw.	Standardabweichung
Tab.	Tabelle
TGF	transforming growth factor
Thr	Thrombin
TRAP	thrombin receptor activating peptide
TxA ₂	Thromboxan A ₂
vWF	von Willebrand Faktor
Z.n.	Zustand nach

Abbildungsverzeichnis

Abb 1: Thrombozytenadhäsion.....	5
Abb 2: Thrombozytenaggregation.....	6
Abb 3: Struktur des GP IIb-IIIa.....	7
Abb 4: Aktivierungsstadien des GPIIb-IIIa.....	8
Abb 5: Immunologische Marker.	14
Abb 6: Strukturformeln von GPIIbIIIa-Antagonisten.	20
Abb 7: Auswertung der Lichtaggregometrie und Luminometrie.	32
Abb 8: Die Zwei-Parameter Darstellung in der Durchflusszytometrie.	34
Abb 9: Die Darstellung als Histogramm in der Durchflusszytometrie.	35
Abb 10: Aggregation (Steigung), Patientenstudie.	49
Abb 11: CD 40L, Patientenstudie.	51
Abb 12: LIBS-1-Induktion bei Thrombozyten.	53
Abb 13: PMI-1-Induktion bei Thrombozyten.	54
Abb 14: LIBS-Induktion bei CHO-Zellen mit rekombinantem GPIIb-IIIa.	56
Abb 15: Aggregation, Konzentrationsverlauf.....	58
Abb 16: Deaggregation von Thrombozyten.....	59
Abb 17: Hemmung der ATP-Freisetzung.	60
Abb 18: Hemmung der ATP-Freisetzung, c7E3 vs. EMD 122347.....	61
Abb 19: Hemmung des P-Selektins.	62
Abb 20: Hemmung der Echistatin-Bindung.....	64
Abb 21: Adhäsionshemmung bei Thrombozyten.	66
Abb 22: Adhäsionshemmung bei CHO-Zellen mit rekombinantem GPIIb-IIIa.	67

Tabellenverzeichnis

Tab 1: Thrombozytäre Membranglykoproteine.....	10
Tab 2: Thrombozytäre Degranulationsprodukte.....	13
Tab 3: Immunologische Marker	13
Tab 4: Untersuchte GPIIb-IIIa-Antagonisten	19
Tab 5: Laborparameter der Studienpatienten (n=8).....	27

Tab 6: Demographische Daten der Studienpatienten (n=8).....	28
Tab 7: Verwendete Antikörper und Agonisten - Patientenuntersuchung	31
Tab 8: GPIIb-IIIa-Antagonistenkonzentrationen (Konzentrationsverlauf)	38
Tab 9: GPIIb-IIIa-Antagonistenkonzentrationen (Zeitverlauf)	38
Tab 10: Verwendete Antikörper und Agonisten	40
Tab 11: Aggregation (Maximaler Anstieg) - Patientenuntersuchung	48
Tab 12: Aggregation (Steigung) - Patientenuntersuchung	49
Tab 13: Freisetzungsreaktion - Patientenuntersuchung.....	50
Tab 14: Exposition thrombozytärer Membranglykoproteine - Patientenuntersuchung	52
Tab 15: LIBS-1- und PMI-1-Bindung bei Thrombozyten (n=4).....	55
Tab 16: LIBS-1-Bindung bei CHO-Zellen mit rekombinantem GPIIb-IIIa (n=4).....	57
Tab 17: Oberflächenexpression von CD61 (n=4)	63
Tab 18: Geräteeinstellungen.....	97
Tab 19: Verwendete Reagenzien.....	98
Tab 20: Werte zu Abbildung 12 A (LIBS-1-Induktion bei Thrombozyten)	99
Tab 21: Werte zu Abbildung 12 B (LIBS-1-Induktion bei Thrombozyten)	100
Tab 22: Werte zu Abbildung 13 C (PMI-1-Induktion bei Thrombozyten)	101
Tab 23: Werte zu Abbildung 13 D (PMI-1-Induktion bei Thrombozyten).....	102
Tab 24: Werte zu Tabelle 15 (LIBS-1- und PMI-1-Induktion bei Thrombozyten)	103
Tab 25: Werte zu Abbildung 14 (LIBS-1-Induktion bei CHO-Zellen).....	104
Tab 26: Werte zu Tabelle 16 (LIBS-1-Induktion bei CHO-Zellen).....	105
Tab 27: Werte zu Abbildung 15 (Aggregationsmessung).....	106
Tab 28: Werte zu Abbildung 17 (ATP-Freisetzung in mmol).....	107
Tab 29: Werte zu Abbildung 19 (P-Selektin-Freisetzung).....	108
Tab 30: Werte zu Tabelle 17 (Oberflächenexpression von CD 61)	109
Tab 31: Werte zu Abbildung 20 (Echistatin-Bindung).....	110
Tab 32: Werte zu Abbildung 21 (Thrombozytenadhäsion, unstimuliert)	111
Tab 33: Werte zu Abbildung 21 (Thrombozytenadhäsion, TRAP-stimuliert).....	113
Tab 34: Werte zu Abbildung 22 (CHO-Zell-Adhäsion).....	115

Literaturverzeichnis

1. Abrams C, Shattil SJ. Immunological detection of activated platelets in clinical disorders. *Thromb Haemost* 1991; 65: 467-473
2. Andrews RK, Lopez JA, Bendt MC. Molecular mechanisms of platelet adhesion and activation. *Int J Biochem Cell Biol* 1997; 29: 91-105
3. Andrioli G, Ortolani R, Fontana L, Gaino S, Bellavite P, Lechi C, Minuz P, Manzato F, Tridente G, Lechi A. Study of platelet adhesion in patients with uncomplicated hypertension. *J Hypertens* 1996; 14: 1215-1221
4. Antman EM, Giugliano RP, Gibson CM, McCabe CH, Coussement P, Kleiman NS. Abciximab facilitates the rate and extent of thrombolysis. Results of the thrombolysis in myocardial infarction (TIMI) 14 trial. *Circulation* 1999; 99: 2720-2732
5. Aukrust P, Muller F, Ueland T, Berget T, Aaser E. Enhanced levels of soluble and membrane-bound CD40 ligand in patients with unstable angina. Possible reflection of T-lymphocyte and platelet involvement in the pathogenesis of acute coronary syndroms. *Circulation* 1999; 100: 614-620
6. Badimon JJ, Fuster V, Chesebro JH, Badimon L. Coronary atherosclerosis, a multifactorial disease. *Circulation* 1993; 87: II-3 – II-16
7. Becker RC, Tracy RP, Bovill EG, Mann KG, Ault K. The clinical use of flow cytometry for assessing platelet activation in acute coronary syndroms. TIMI-III thrombolysis and anticoagulation group. *Coron Art Dis* 1994; 5: 339-345
8. Becker RC. Antiplatelet therapy in coronary heart disease. *Arch Pathol Lab Med* 1993; 117: 89-96
9. Berkowitz SD, Harrington RA, Rund MM, Tchong JE. Acute profound thrombocytopenia after c7E3 FAB therapy. *Circulation* 1997; 95: 809-813
10. Bertolino G, Noris P, Previtali M, Gamba G, Ferrario M, Montani M, Balduini CL. Platelet function after in vivo and in vitro treatment with thrombolytic agents. *Am J Cardiol* 1992; 69: 457-461
11. Bihour C, Durrieu-Jais C, Besse P, Nurden P, Nurden AT. Flow cytometry reveals activated GPIIb-IIIa complexes on platelets from patients undergoing thrombolytic therapy after acute myocardial infarction. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1995; 6: 395-410
12. Böck M, Gawaz M, Dietzler A, Heim MU, Mempel W. Single-donor platelet concentrates: changes of surface glycoproteins during storage. *Haemostasis* 1994; 24: 230-235

13. Born GVR, Cross MJ. The aggregation of blood platelets. *J Physiol* 1963; 168: 178-196
14. Braun M, Kramann J, Strohbach H, Schrör K. Incomplete inhibition of platelet secretion by low-dose aspirin. *Platelets* 1994; 5: 325-331
15. Califf RM. Glycoprotein IIb/IIIa blockade and thrombolytics: early lessons from the SPEED and GUSTO IV trials. *Am Heart J* 1999; 138: S12-15
16. Cannon CP, Tracy R. Clotting for the clinician: an overview of thrombosis and antithrombotic therapy. *J Thrombosis and Thrombolysis* 1995; 2: 95-106
17. Cannon CP. Combination therapy for acute myocardial infarction: glycoprotein IIb/IIIa inhibitors plus thrombolysis. *Clin Cardiol* 1999; 22: IV37-43
18. Charo IF, Kieffer N, Phillips DR. Platelet membrane glycoproteins. Aus: Colman RW, Hirsh J, Marder V, Salzman EW (Hrsg.): *Hemostasis and Thrombosis: Basic principles and clinical practice*. Philadelphia, JB Lippincott, 3. Auflage 1994 (489-507)
19. Cohen LS. Clinical pharmacology of acetylsalicylic acid. *Sem Thromb Hemost* 1976; 2: 95-106
20. Collen D, Lijnen HR. Molecular basis of fibrinolysis, as relevant for thrombolytic therapy. *Thromb Haemost* 1995; 74: 167-171
21. Collier BS. Blockade of platelet GPIIb/IIIa receptors as an antithrombotic strategy. *Circulation* 1995; 92: 2373-2380
22. Collier BS. Monitoring platelet GPIIb/IIIa antagonist therapy. *Circulation* 1998; 97: 5-9
23. Collier BS. Platelets and thrombolytic therapy. *New Engl J Med* 1990; 322: 33-42
24. Colman RW, Cook JJ, Niewiarowski S. Mechanisms of platelet aggregation. Aus: Colman RW, Hirsh J, Marder V, Salzman EW (Hrsg.): *Hemostasis and Thrombosis: Basic principles and clinical practice*. Philadelphia, JB Lippincott, 3. Auflage 1994b (508-521)
25. Colman RW, Marder VJ, Salzman EW, Hirsh J. Overview of Hemostasis. Aus: Colman RW, Hirsh J, Marder V, Salzman EW (Hrsg.): *Hemostasis and Thrombosis: Basic principles and clinical practice*. Philadelphia, JB Lippincott, 3. Auflage 1994a (3-18)
26. Coukell AJ, Markham A. Clopidogrel. *Drugs* 1997; 54: 745-750
27. Cox D. Methods for monitoring platelet function. *Am Heart J* 1998; 135: S160-S169
28. D'Souza SE, Ginsberg MH, Matsueda GR, Plow EF. A discrete sequence in a platelet integrin is involved in ligand recognition. *Nature* 1991; 350: 66-68
29. DeGroot PG, Sixma JJ. Platelet adhesion. *Br J Haematol* 1990; 75: 581-589
30. Diaz-Gonzalez F, Forsyth J, Steiner B, Ginsberg MH. Trans-dominant inhibition of integrin function. *Mol Biol Cell* 1996; 7: 1939-1951

31. Du X, Plow EF, Frelinger AL, O'Toole TE, Loftus JC, Ginsberg MH. Ligands activate integrin β IIB β 3 (platelet GPIIb-IIIa). *Cell* 1991; 65: 409-416
32. Fitzgerald DJ, Roy L, Catella F, Fitzgerald GA. Platelet activation in unstable coronary disease. *N Engl J Med* 1986; 315: 983-989
33. Frelinger AL, Cohen I, Plow EF, Smith MA, Roberts J, Lam SCT, Ginsberg MH. Monoclonal antibodies to ligand-occupied conformers of integrin α IIB- β 3 (Glycoprotein IIB-IIIa) alter receptor affinity, specificity and function. *J Biol Chem* 1990; 266: 17106-17111
34. Fuster V, Badimon L, Badimon J, Chesebro JH. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndroms. *N Engl J Med* 1992; 326: 242-250
35. Fuster V, Badimon L, Cohen M, Ambrose JA, Badimon JJ, Chesebro J. Insights into pathogenesis of acute ischemic syndroms. *Circulation* 1988; 77: 1213-1220
36. Gawaz M, Bogner C, Gurland HJ. Flowcytometry analysis of mepacrine-labelled platelets in patients with end-stage renal failure. *Haemostasis* 1993; 23: 284-289
37. Gawaz M, Dobos G, Späth M, Mujais SK. Platelet membrane glycoprotein GPIIb/IIIa function is impaired in end-stage renal failure (ESRF). *J Am Soc Nephrol* 1994; 5: 36-46
38. Gawaz M, Loftus JC, Bajt ML, Frojmovic MM, Plow EF, Ginsberg MH. Ligand bridging mediates integrin α IIB β 3 dependent homotypic and heterotypic cell-cell interactions. *J Clin Invest* 1991; 8: 1128-1134
39. Gawaz M, Neumann FJ, Dickfeld T, Koch W, Laugwitz KL, Adelsberger H, Langenbrink K, Page S, Neumeier D, Schömig A, Brand K. Activated platelets induce monocyte chemotactic protein-1 secretion and surface expression of intercellular adhesion molecule-1 on endothelial cells. *Circulation* 1998; 98: 1164-1171
40. Gawaz M, Neumann FJ, Schömig A. Evaluation of platelet membrane glycoproteins in coronary artery disease, consequences for diagnosis and therapy. *Circulation* 1999; 99: e1-e11
41. Gillis JC, Wagstaff AJ, Goa KL. Alteplase. A reappraisal of its pharmacological properties and therapeutic use in acute myocardial infarction. *Drugs* 1995; 50: 102-136
42. Ginsberg MH, Frelinger AL, Lam SCT, Forsyth J, McMillian R, Plow EF, Shattil SJ. Analysis of platelet aggregation disorders based on flow cytometric analysis of membrane glycoprotein IIB-IIIa with conformation-specific monoclonal antibodies. *Blood* 1990; 76: 2017-2023
43. Ginsberg MH, Loftus JC. Platelet integrins. *Thromb Haemost.* 1995; 74: 352-359

44. Gold HK, Collier BS, Yasuda T, Saito T, Fallon JT, Guerrero JL, Leinbach RC, Ziskind AA, Collen D. Rapid and sustained coronary artery recanalization with combined bolus injection of recombinant tissue-type plasminogen activator and monoclonal antiplatelet GPIIb/IIIa antibody in a canine preparation. *Circulation* 1988; 77: 670-677
45. Gold HK, Garabedian HD, Dinsmore RE, et al. Restoration of coronary flow in myocardial infarction by intravenous chimeric 7E3 antibody without exogenous plasminogen activators: observations in animals and humans. *Circulation* 1997; 95: 1755-1759
46. Harker LA, Bruno JJ. Ticlopidines mechanism of action on human platelets. Aus: Hass K, Easton JD (Hrsg). *Ticlopidine, Platelets and Vascular Disease*. New York, NY: Springer Verlag; 1993: 99-116
47. Hawrylowicz CM, Howells GL, Feldmann M. Platelet-derived interleukin-1 induces human endothelial adhesion molecule expression and cytokine production. *J Exp Med* 1991; 174: 785-790
48. Henn V, Slupsky JR, Gräfe M, Anagnostopoulos I, Förster R, Müller-Berghaus G, Kroczeck RA. CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature* 1998; 391: 591-594
49. Herbert JM, Frehel D, Vellee E, Kieffer G, Gouy D, Berger Y, Necciari J, Defreyn G, Maffrand JP. Clopidogrel, a novel antiplatelet and antithrombotic agent. *Cardiovasc drug rev* 1993; 11: 180-198
50. Honda S, Tomiyama Y, Aoki T, Shiraga M, Kurata Y, Seki J, Matsuzawa Y. Association between ligand-induced conformational changes of integrin α IIb β 3 and α IIb β 3-mediated intrazellular Ca²⁺ signaling. *Blood* 1998; 92: 3675-3683
51. Hudson MP, Greenbaum AB, Harrington RA, Ohman EM. Use of glycoprotein IIb/IIIa inhibition plus fibrinolysis in acute myocardial infarction. *J Thromb Thrombolysis* 1999; 7: 241-245
52. Kaku S, Umemura K, Mizuno A, Yano S, Suzuki K, Kawasaki T, Nakashima M. Evaluation of a GPIIb/IIIa receptor antagonism on platelet membrane glycoproteins after coronary stent placement. *Thromb Haemost* 1998; 80: 994-1001
53. Kamm W, Raddatz P, Gante J, Kissel T. Prodrug approach for α IIb β 3-peptidomimetic antagonists to enhance their transport in monolayers of a human intestinal cell line (Caco-2): comparison of in vitro and in vivo data. *Pharm Res* 1999; 16: 1527-33

54. Kawasaki T, Sato K, Suzuki K, Sakai Y, Taniuchi Y, Kaku S, Yano S. Enhancement of tissue-type plasminogen activator-induced thrombolysis and prevention of reocclusion by combination with a humanized anti-glycoprotein IIb/IIIa monoclonal antibody, YM 337, in a rhesus monkey model of coronary thrombosis. *Thromb Haemost* 1998; 79: 663-667
55. Kestin AS, Ellis PA, Barnard MR, Errichetti A, Rosner BA, Michelson AD. The effect of strenuous exercise on platelet activation state and reactivity. *Circulation* 1993; 88: 1502-1511
56. Kuwahara M, Sugimoto M, Tsuji S, Miyata S, Nishio K, Kaku S, Suzuki K, Kawasaki T, Yoshioka A. Comparative studies on the antiplatelet effects of humanized anti-platelet glycoprotein IIb/IIIa antibody (YM337) and ReoPro under flow conditions. *Thromb Haemost* 1998; 80: 28-31
57. Lee Y, Lee W, Lee S, Ahn K, Choi Y, Park S, Seo J, Park J. CD40L Activation in circulating platelets in patients with acute coronary syndrome. *Cardiology* 2000; 92: 11-16
58. Lefkowitz J, Plow EF, Topol EJ. Platelet glycoprotein IIb-IIIa receptors in cardiovascular medicine. *N Engl J Med* 1995; 332: 1553-1559
59. Lewis HD, Davis JW, Archibald DG, Steinke WE. Protective effects of aspirin against acute myocardial infarction and death in men with unstable angina. Results of a veterans administration cooperative study. *N Engl J Med* 1983; 309: 396-403
60. Mackie IJ, Neal CR. *The Platelet. Platelet-vessel wall interactions (The Bloomsbury series in clinical science)*. Springer Verlag Berlin, Heidelberg; 1988: 1-32
61. Madan M, Berkowitz SD, Tchong JE. Glycoprotein GPIIb-IIIa integrin blockade. *Circulation* 1998; 98: 2629-2635
62. Michelson AD. Flow cytometry: a clinical test of platelet function. *Blood* 1996; 87: 4925-4936
63. Morgenstern E, Ruf A, Patscheke H. Transport of anti-glykoprotein IIb/IIIa-antibodies into the alpha-granules of unstimulated human blood platelets. *Thromb Haemost* 1992; 67: 121-125
64. Morgenstern E. Platelets morphology/ultrastructure. In: Bruchhausen FV, Walter U, eds. *Platelets and their factors: Handbook of Experimental Pharmacology*. Heidelberg, Germany: Springer Verlag; 1997: 27-52
65. Mousa SA, Bennett JS,. Platelets in health and disease: Platelet GPIIb-IIIa structure and function : recent advances in antiplatelet therapy. *Drugs of the future* 1996; 21: 114 1-1154

66. Nurden A, Macchi L, Bihour C, Durrieu C, Besse P, Nurden P. Markers of platelet activation in coronary hearts disease patients. *Eur J Clin Invest* 1994; 24: 42-45
67. Nurden A. Human platelet Glykoproteins. In: Bloom A, Forbes CD, eds. *Haemostasis and Thrombosis*. 3rd ed. New York, NY: Churchill Livingstone; 1994: 115-165
68. Ohman EM, Lincoff AM, Bode C, Bachinsky WB, Ardissino D, Matteo I. Enhanced early reperfusion at 60 minutes with low-dose reteplase combined with full-dose abciximab in acute myocardial infarction: preliminary results from GUSTO-4 pilot (SPEED) dose ranging trial. *Circulation* 1998; 98: I-504
69. Patrono C. Aspirin as an antiplatelet drug. *N Engl J Med* 1994; 330: 1287-1294
70. Pawlowska Z, Swiatkowska M, Krzeslowska J, Pawlicki L, Cierniewski CS. Increased platelet-fibrinogen interaction in patients with hypercholesterolemia and hypertriglyceridemia. *Atherosclerosis* 1993; 103: 13-20
71. Peter KH, Schwarz M, Ylänne J, Kohler B, Moser M, Nordt T, Salbach P, Kübler W, Bode C. Induction of fibrinogen binding and platelet aggregation as a potential intrinsic property of various glycoprotein IIb/IIIa (α IIb β 3) inhibitors. *Blood* 1998; 92: 3240-3249
72. Phillips DR, Charo IF, Scarborough RM. GPIIb-IIIa: the responsive integrin. *Cell* 1991; 65: 359-362
73. Plow EF, D'Souza SE, Ginsberg MH. Ligand binding to GPIIb-IIIa: a status report. *Semin Thromb Memost*. 1992; 18: 324-332
74. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990's. *Nature* 1993; 362: 801-809
75. Ruggeri ZM. New insights into mechanisms of platelet adhesion and aggregation. *Sem Hematol* 1994; 31: 229-239
76. Satoh T, Kouns WC, Yamashita Y, Kamiyama T, Steiner B. Tetrafabricin, a novel non-peptide fibrinogen receptor antagonist, induces conformational changes in glycoprotein IIb/IIIa. *Biochem J* 1994; 301: 785-791
77. Schrör K. Antiplatelets drugs. A comparative review. *Drugs* 1995; 50: 7-28
78. Schrör K. *Thrombozyten*. (Physis Spezial; 67). Verlag Urban und Vogel, München; 1993
79. Shattil SJ, Cunningham M, Hoxie JA. Detection of activated platelets in whole blood using activation-dependent monoclonal antibodies and flow cytometry. *Blood* 1987; 70: 307-312
80. Shattil SJ. Function and regulation of the β 3 integrins in hemostasis and vascular biology. *Thromb Haemost* 1995; 74: 149-155

81. Siess W. Molecular mechanisms of platelet activation. *Physiol Rev* 1989; 69: 50-178
82. Siess W. Molecular mechanisms of platelet activation. *Physiol Rev* 1989; 69: 50-178
83. Sixma JJ. Interaction of blood platelets with the vessel wall. In: Bloom A, Forbes CD, eds. *Haemostasis and Thrombosis*. 3rd ed. New York, NY: Churchill Livingstone; 1994: 259-285
84. Slupsky JR, Kalbas M, Willuweit A, Henn V, Krockek RA, Muller-Berghaus G. Activated platelets induce tissue factor expression on human umbilical vein endothelial cells by ligation of CD40. *Thromb Haemost* 1998; 80: 1008-1014
85. Taub R, Gould RJ, Garsky VM, Ciccarone TM, Hoxie J, Friedman PA, Shattil SJ. A monoclonal antibody against the platelet fibrinogen receptor contains a sequence that mimics a receptor recognition domain of fibrinogen. *J Biol Chem* 1989; 264: 259-265
86. The CAPRIE Steering Committee. A randomized, blinded, trial of clopidogrel versus aspirin in patients at risk of ischaemic events (CAPRIE). *Lancet* 1996; 348: 1329-1339
87. The CAPTURE Investigators. Randomized placebo-controlled trial of abciximab before and during coronary intervention in refractory unstable angina: The CAPTURE study. *Lancet* 1997; 349: 1429-1435
88. The EPIC Investigators. Use of monoclonal antibody directed against the platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor in high-risk coronary angioplasty. *N Engl J Med* 1994; 330: 956-961
89. The EPILOG Investigators. Platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor blockade and low dose heparin during percutaneous coronary revascularization. *N Engl J Med* 1997; 336: 1689-1698
90. The IMPACT II Investigators. Randomized placebo-controlled trial of the effect of eptifibatid on complications of percutaneous coronary intervention: IMPACT II. *Lancet* 1997; 349: 1422-1428
91. The IMPACT-AMI-Investigators. Combined accelerated tissue-plasminogen activator and platelet glycoprotein IIb/IIIa integrin receptor blockade with Integrelin in acute myocardial infarction. Results of a randomized, placebo-controlled, dose-ranging trial (IMPACT-AMI). *Circulation* 1997; 95: 846-854
92. The PARADIGM-Investigators. Combining thrombolysis with the platelet glycoprotein IIb/IIIa inhibitor lamifiban: results of the Platelet Aggregation Receptor Antagonist Dose Investigation and Reperfusion Gain in Myocardial Infarction (PARADIGM) trial. *J Am Coll Cardiol* 1998; 32: 2003-2010

93. The PARAGON Investigators. International, randomized, controlled trial of lamifiban (a platelet glycoprotein IIb/IIIa inhibitor), heparin, or both in unstable angina: Platelet IIb/IIIa Antagonism for the Reduction of Acute coronary syndrome events in a Global Organization Network (PARAGON). *Circulation* 1998; 97: 2386-2395
94. The PRISM Investigators. A comparison of aspirin plus tirofiban with aspirin plus heparin for unstable angina. *N Engl J Med* 1998; 338: 1498-1505
95. The PRISM-PLUS Investigators. Inhibition of the platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor with tirofiban in unstable angina and non Q-wave myocardial infarction. *N Engl J Med* 1998; 338: 1488-1497
96. The PURSUIT Investigators. Inhibition of platelet glycoprotein IIb/IIIa with eptifibatid in patients with acute coronary syndroms. *N Engl J Med* 1998; 339: 436-443
97. The RAPPORT Investigators. Randomized, placebo-controlled trial of platelet glycoprotein IIb/IIIa blockade with primary angioplasty for acute myocardial infarction. *Circulation* 1998; 98: 734-741
98. The RESTORE Investigators. Effects of platelet glycoprotein IIb/IIIa blockade with tirofiban on adverse cardiac events in patients with unstable angina or acute myocardial infarction undergoing coronary angioplasty. *Circulation* 1997; 96: 1445-1453
99. The RISC Group. Risk of myocardial infarction and death during treatment with low dose aspirin and intravenous heparin in men with unstable coronary artery disease. *Lancet* 1990; 336: 827-830
100. Theroux P, Fuster V. Acute coronary syndroms. Unstable angina and non-Q-wave myocardial infarction. *Circulation* 1998; 97: 1195-1206
101. Theroux P, Quimet H, McCans J, Latour JG et al. Aspirin, heparin, or both to treat acute unstable angina. *N Engl J Med* 1988; 319: 1105-1111
102. Thomasberger A, Engels F, Feige K. Determination of the impurity profile of ethyl-2-(4-[(5R)-3[4-(methoxycarboxamidoiminomethyl)-phenyl]-2-oxo-5-oxazolidinylmethyl]-1-piperazinyl) acetate, citrate, a highly active platelet aggregation inhibitor, by liquid chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1999; 854: 13-22
103. Topol EJ. Platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor antagonists in coronary artery disease. *Eur Heart J* 1996; 17: 9-18
104. Topol EJ. Toward a new frontier in myocardial reperfusion therapy: emerging platelet preeminence. *Circulation* 1998; 97: 211-218
105. Tschoepe D, Roesen P, Esser J. Large platelets circulate in an activated state in diabetes mellitus. *Semin Thromb Hemost* 1991; 13: 857-862

106. Warkentin TE, Powling MJ, Hardisty RM. Measurement of fibrinogen binding to platelets in whole blood by flow cytometry: a micromethod for the detection of platelet activation. *Br J Haematol* 1990; 76: 387-394
107. Wencel-Drake JD, Plow EF, Kunicki TJ, Woods VL, Keller DM, Ginsberg MH. Localization of internal pools of membrane glykoproteins involved in platelet adhesive responses. *Am J Pathol* 1986; 124: 324-334
108. White JG. Platelets and atherosclerosis. *Eur J Clin Invest* 1994; 24, Suppl. 1: 25-29
109. Willerson JT, Golino P, Eidt J, Campbell WB, Buja M. Specific platelet mediators and unstable coronary artery lesions: Experimental evidence and potential clinical implications. *Circulation* 1989; 80: 198-205
110. Woods VL, Wolff LE, Keller DM. Resting platelets contain a substantial centrally located pool of glycoprotein IIb-IIIa complex which may be accessible to some but not other extracellular proteins. *J Biol Chem* 1986; 261: 15242-15251

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name	Taubitz, Winfried Oliver
Geburtsdatum, -ort	9. August 1972, München
Staatsangehörigkeit	deutsch
Konfession	römisch-katholisch
Familienstand	ledig
Eltern	Taubitz, Rudolf Taubitz, Irmgard
Geschwister	Taubitz, Manfred; geb. 1971 Taubitz, Evelin; geb. 1978

Schulbildung:

1979-1983	Kafka-Grundschule in München
1983-1992	Heinrich-Heine-Gymnasium in München
	Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Weiterbildung:

1992-1993	Zivildienst bei der Johanniter-Unfallhilfe in München
1994	Prüfung zum Rettungssanitäter

Hochschulbildung:

Seit 1994	Studium der Medizin an der Ludwig-Maximilians-Universität in München
1996	Ärztliche Vorprüfung
1997	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
1999	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
1999-2000	Praktisches Jahr
2000	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Danksagung

Bei Herrn PD Dr. Meinrad Gawaz möchte ich mich für die Bereitstellung des Themas, seine kompetente Führung und seine motivierende und hilfsbereite Betreuung bedanken. Durch ihn habe ich eine fachliche als auch menschliche Bereicherung erfahren.

Außerdem möchte ich mich ganz herzlich bei Frau Gisela Pogatsa-Murray und Frau Kirsten Langenbrink bedanken, die mich bei der Laborarbeit tatkräftig unterstützten.

Anhang

Tab 18: Geräteeinstellungen

Durchflusszytometer / Thrombozytenmessung:

Cytometer Type:	Facsan				
Detectors/Amps:	Parameter	Detector	Voltage	Amplification	Gain Mode
	P1	FSC	E00	1,00	log
	P2	SSC	261	1,00	log
	P3	FL1	670	1,00	log
	P4	FL2	565	1,00	log
	P5	FL3	150	1,00	log
Threshold:	Parameter FSC Value 200				
Compensation:	FL1 0,0% FL2 FL2 45,0% FL1 FL2 0,0% FL3 FL3 0,0% FL2				
Log Data Units:	Channel Values				

Durchflusszytometer / CHO-Zell Messung:

Cytometer Type:	Facsan				
Detectors/Amps:	Parameter	Detector	Voltage	Amplification	Gain Mode
	P1	FSC	E00	1,00	lin
	P2	SSC	330	1,00	lin
	P3	FL1	430	1,00	log
	P4	FL2	440	1,00	log
	P5	FL3	150	1,00	log
Threshold:	Parameter FSC Value 88				
Compensation:	FL1 6,0% FL2 FL2 35,0% FL1 FL2 0,0% FL3 FL3 0,0% FL2				
Log Data Units:	Channel Values				

Tab 19: Verwendete Reagenzien

Tyrodes 10x:

80g NaCl

+10,15g NaHCO₃

+1,95g KCl

+1000ml Aqua dest.

Tyrodes-Puffer (pH 7,4):

0,2g BSA (Bovines Serum Albumin, Fa. Sigma)

+0,2g Glucose

+20ml Tyrodes 10x

+180ml Aqua dest.

Mit Hepes (Fa. Sigma) am pH-Meter auf pH 7,4 einstellen

Tyrodes-Puffer (pH 6,5):

Tyrodes-Puffer (pH 7,4) durch Zugabe von HCl am pH-Meter auf pH 6,5 einstellen

Lyse-Substrat-Puffer:

30mg p-Nitrophenylphosphat (Fa. Sigma)

+25mg Triton x-100 (Fa. Sigma)

+2,5ml Natriumacetat (200mM)

+7,5ml Aqua dest.

Tab 20: Werte zu Abbildung 12 A (LIBS-1-Induktion bei Thrombozyten)

GRGDSP

Konzentrationen in mM	0	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2
LIBS-1	183	184	190	193	203	220	251
% Anstieg	0	1	4	5	11	20	37

c7E3

Konzentrationen in µg/ml	0	1	5	10	25	50	100
LIBS-1	209	225	234	241	245	249	253
% Anstieg	0	8	12	15	17	19	21

Integrelin

Konzentrationen in ng/ml	0	40	100	200	400	2000	4000
LIBS-1	176	178	204	214	218	217	217
% Anstieg	0	1	16	22	24	23	23

Lamifiban

Konzentrationen in ng/ml	0	10	25	50	100	500	1000
LIBS-1	175	185	188	222	231	238	244
% Anstieg	0	6	7	27	32	36	39

Tirofiban

Konzentrationen in ng/ml	0	2,5	25	50	100	125	250
LIBS-1	175	200	243	261	270	286	293
% Anstieg	0	15	39	49	54	63	67

EMD 122347

Konzentrationen in mM	0	0,2	0,75	1	2	5	10
LIBS-1	178	175	169	167	162	161	160
% Anstieg	0	-2	-5	-6	-9	-10	-10

YM 337

Konzentrationen in µg/ml	0	5	10	20	40	60	100
LIBS-1	192	190	185	180	179	171	170
% Anstieg	0	-1	-4	-6	-7	-11	-11

H12

Konzentrationen in mM	0	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2
LIBS-1	173	174	156	184	198	195	201
% Anstieg	0	1	-10	6	14	13	16

Tab 21: Werte zu Abbildung 12 B (LIBS-1-Induktion bei Thrombozyten)

GRGDSP

Zeit in Minuten	0	15	30	60	120
LIBS-1	166	184	176	172	182
% Anstieg	0	11	6	4	10

c7E3

Zeit in Minuten	0	15	30	60	120
LIBS-1	209	236	249	261	268
% Anstieg	0	13	19	25	28

Integrelin

Zeit in Minuten	0	15	30	60	120
LIBS-1	176	201	217	222	230
% Anstieg	0	14	23	26	31

Lamifiban

Zeit in Minuten	0	15	30	60	120
LIBS-1	165	182	208	205	206
% Anstieg	0	10	26	24	25

Tirofiban

Zeit in Minuten	0	15	30	60	120
LIBS-1	165	174	210	208	210
% Anstieg	0	5	27	26	27

EMD 122347

Zeit in Minuten	0	15	30	60	120
LIBS-1	165	148	150	151	146
% Anstieg	0	-10	-9	-8	-12

YM 337

Zeit in Minuten	0	15	30	60	120
LIBS-1	188	180	173	174	172
% Anstieg	0	-4	-8	-7	-9

H12

Zeit in Minuten	0	15	30	60	120
LIBS-1	148	150	154	155	160
% Anstieg	0	1	4	5	8

Tab 22: Werte zu Abbildung 13 C (PMI-1-Induktion bei Thrombozyten)

GRGDSP

Konzentrationen in mM	0	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2
PMI-1	149	144	146	144	145	144	174
% Anstieg	0	-3	-2	-3	-3	-3	17

c7E3

Konzentrationen in µg/ml	0	1	5	10	25	50	100
PMI-1	221	245	251	263	260	260	258
% Anstieg	0	11	14	19	18	18	17

Integrelin

Konzentrationen in ng/ml	0	40	100	200	400	2000	4000
PMI-1	192	193	208	217	219	224	225
% Anstieg	0	1	8	13	14	17	17

Lamifiban

Konzentrationen in ng/ml	0	10	25	50	100	500	1000
PMI-1	180	200	209	233	264	282	292
% Anstieg	0	11	16	28	47	57	62

Tirofiban

Konzentrationen in ng/ml	0	2,5	25	50	100	125	250
PMI-1	180	202	258	283	280	289	299
% Anstieg	0	12	43	57	56	61	66

EMD 122347

Konzentrationen in mM	0	0,2	0,75	1	2	5	10
PMI-1	195	196	194	190	189	186	181
% Anstieg	0	1	-1	-3	-3	-5	-7

YM 337

Konzentrationen in µg/ml	0	5	10	20	40	60	100
PMI-1	166	165	158	150	153	140	131
% Anstieg	0	-1	-5	-10	-8	-16	-21

H12

Konzentrationen in mM	0	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2
PMI-1	156	164	170	166	171	165	168
% Anstieg	0	5	9	6	10	6	8

Tab 23: Werte zu Abbildung 13 D (PMI-1-Induktion bei Thrombozyten)

GRGDSP

Zeit in Minuten	0	15	30	60	120
PMI-1	144	166	179	191	184
% Anstieg	0	15	24	33	28

c7E3

Zeit in Minuten	0	15	30	60	120
PMI-1	221	250	260	268	273
% Anstieg	0	13	18	21	24

Integrelin

Zeit in Minuten	0	15	30	60	120
PMI-1	192	210	224	230	242
% Anstieg	0	9	17	20	26

Lamifiban

Zeit in Minuten	0	15	30	60	120
PMI-1	160	205	220	220	218
% Anstieg	0	28	38	38	36

Tirofiban

Zeit in Minuten	0	15	30	60	120
PMI-1	160	170	196	190	192
% Anstieg	0	6	23	19	20

EMD 122347

Zeit in Minuten	0	15	30	60	120
PMI-1	140	122	127	131	132
% Anstieg	0	-13	-9	-6	-6

YM 337

Zeit in Minuten	0	15	30	60	120
PMI-1	156	154	140	135	136
% Anstieg	0	-1	-10	-13	-13

H12

Zeit in Minuten	0	15	30	60	120
PMI-1	160	166	171	173	172
% Anstieg	0	4	7	8	8

Tab 24: Werte zu Tabelle 15 (LIBS-1- und PMI-1-Induktion bei Thrombozyten)

GRGDSP

LIBS-1	0	1mM
	178,0 ± 9,6	213,5 ± 29,9

PMI-1	0	1mM
	158,3 ± 13,8	172,5 ± 18,4

c7E3

LIBS-1	0	50µg/ml
	186,5 ± 17,7	209,3 ± 30,0

PMI-1	0	50µg/ml
	171,8 ± 33,8	204,0 ± 37,9

Integrelin

LIBS-1	0	2µg/ml
	178,5 ± 9,1	243,5 ± 27,2

PMI-1	0	2µg/ml
	176,5 ± 17,9	207,8 ± 20,0

Lamifiban

LIBS-1	0	500ng/ml
	177,8 ± 10,0	216,0 ± 14,9

PMI-1	0	500ng/ml
	165,5 ± 9,7	231,5 ± 34,4

Tirofiban

LIBS-1	0	125ng/ml
	177,8 ± 10,0	251,8 ± 32,4

PMI-1	0	125ng/ml
	165,5 ± 9,7	224,5 ± 44,0

EMD

122347

LIBS-1	0	3,6µg/ml
	178,5 ± 9,9	156,5 ± 4,1

PMI-1	0	3,6µg/ml
	164,3 ± 22,8	162,0 ± 24,9

YM 337

LIBS-1	0	60µg/ml
	187,8 ± 3,7	185,8 ± 15,5

PMI-1	0	60µg/ml
	161,0 ± 4,2	152,5 ± 17,4

H12

LIBS-1	0	1mM
	158,8 ± 12,3	170,8 ± 17,5

PMI-1	0	1mM
	162,5 ± 7,3	171,5 ± 6,2

Tab 25: Werte zu Abbildung 14 (LIBS-1-Induktion bei CHO-Zellen)

GRGDSP

Konzentrationen (in mM)	0	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2
LIBS-1	238	245	256	269	280	288	300
% Abweichung	0	3	8	13	18	21	26

c7E3

Konzentrationen (in µg/ml)	0	1	5	10	25	50	100
LIBS-1	240	350	361	364	370	372	375
% Abweichung	0	46	50	52	54	55	56

Integrelin

Konzentrationen (in ng/ml)	0	40	100	200	400	2000	4000
LIBS-1	233	234	244	245	251	256	255
% Abweichung	0	1	5	5	8	10	10

Lamifiban

Konzentrationen (in ng/ml)	0	10	25	50	100	500	1000
LIBS-1	233	233	235	238	242	246	253
% Abweichung	0	0	1	2	4	6	9

Tirofiban

Konzentrationen (ng/ml)	0	2,5	25	50	100	125	250
LIBS-1	253	254	276	282	290	288	296
% Abweichung	0	1	9	11	15	14	17

EMD

Konzentrationen (in mM)	0	0,2	0,75	1	2	5	10
LIBS-1	253	255	240	226	221	162	118
% Abweichung	0	1	-5	-11	-13	-36	-53

YM 337

Konzentrationen (in µg/ml)	0	5	10	20	40	60	100
LIBS-1	240	238	232	232	225	219	195
% Abweichung	0	-1	-3	-3	-6	-9	-19

H12

Konzentrationen (in mM)	0	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2
LIBS-1	238	238	250	257	261	267	278
% Abweichung	0	0	5	8	10	12	17

Tab 26: Werte zu Tabelle 16 (LIBS-1-Induktion bei CHO-Zellen)

GRGDSP

LIBS-1	0	1mM
	241 ± 8,5	278,8 ± 7,0

c7E3

LIBS-1	0	50µg/ml
	241 ± 8,5	366,8 ± 5,4

Integrelin

LIBS-1	0	2µg/ml
	241 ± 8,5	269,8 ± 9,3

Lamifiban

LIBS-1	0	500ng/ml
	241 ± 8,5	264,8 ± 13,5

Tirofiban

LIBS-1	0	125ng/ml
Mittelwert	241 ± 8,5	278,3 ± 7,7

EMD

LIBS-1	0	3,6µg/ml
Mittelwert	241 ± 8,5	173,5 ± 9,3

YM 337

LIBS-1	0	60µg/ml
	241 ± 8,5	216,0 ± 4,5

H12

LIBS-1	0	1mM
	241 ± 8,5	268,5 ± 3,1

Tab 27: Werte zu Abb. 15 (Aggregationsmessung, maximale Aggregation in mm)

c7E3

Konzentration in µg/ml	0	1	5	10	25	50	100
ADP-stimuliert	159	146	19	5	3	2	2
% Veränderung	100	91,6	12,1	3,1	1,7	1,3	1,3
TRAP-stimuliert	171	156	132	91	46	37	29
% Veränderung	100	91,6	77,3	53,5	26,7	21,9	16,9

Integrelin

Konzentration in ng/ml	0	40	100	200	400	2000	4000
ADP-stimuliert	148	139	90	8	0	0	0
% Veränderung	100	93,9	60,8	5,4	0	0	0
TRAP-stimuliert	150	143	135	95	58	30	28
% Veränderung	100	95,3	90	60	38,7	20	18,7

Lamifiban

Konzentration in ng/ml	0	10	25	50	100	500	1000
ADP-stimuliert	114	114	66	5	0	0	0
% Veränderung	100	100	57,9	4,4	0	0	0
TRAP-stimuliert	123	117	117	107	46	24	20
% Veränderung	100	95,1	95,1	86,9	37,4	19,5	16,3

Tirofiban

Konzentration in ng/ml	0	2,5	25	50	100	125	250
ADP-stimuliert	154	0	0	0	0	0	0
% Veränderung	100	0	0	0	0	0	0
TRAP-stimuliert	172	171	158	129	33	33	28
% Veränderung	100	99,4	91,9	75	19,2	19,2	16,3

EMD 122347

Konzentrationen in mM	0	0,2	0,75	1	2	5	10
ADP-stimuliert	136	126	88	0	0	0	0
% Veränderung	100	92,6	64,7	0	0	0	0
TRAP-stimuliert	146	128	112	74	60	43	36
% Veränderung	100	87,7	76,7	50,7	41,1	29,5	24,7

YM 337

Konzentration in µg/ml	0	5	10	20	40	60	100
ADP-stimuliert	160	133	42	0	0	0	0
% Veränderung	100	83,1	26,3	0	0	0	0
TRAP-stimuliert	184	171	164	90	95	19	16
% Veränderung	100	92,9	89,1	48,9	40,0	10,3	8,7

Tab 28: Werte zu Abbildung 17 (ATP-Freisetzung in mmol)

GRGDSP

ADP-stimuliert	0	1mM
	0,9 ± 0,1	0,2 ± 0,0
% Hemmung		78 ± 3,5

TRAP-stimuliert	0	1mM
	3,5 ± 1,1	2,0 ± 0,0
% Hemmung		39 ± 18,7

c7E3

ADP-stimuliert	0	50µg/ml
	1,3 ± 0,1	0,2 ± 0,0
% Hemmung		85 ± 1,7

TRAP-stimuliert	0	50µg/ml
	2,4 ± 0,3	2,5 ± 0,1
% Hemmung		1 ± 9,7

Integrelin

ADP-stimuliert	0	2µg/ml
	1,3 ± 0,2	0,2 ± 0,0
% Hemmung		84 ± 2,8

TRAP-stimuliert	0	2µg/ml
	2,3 ± 0,1	2,2 ± 0,4
% Hemmung		5 ± 12,7

Lamifiban

ADP-stimuliert	0	500ng/ml
	1,35 ± 0,2	0,15 ± 0,1
% Hemmung		85 ± 2,4

TRAP-stimuliert	0	500ng/ml
	2,2 ± 0,4	2,0 ± 0,2
% Hemmung		9 ± 5,1

Tirofiban

ADP-stimuliert	0	125ng/ml
	1,1 ± 0,1	0,2 ± 0,0
	0,1	-
% Hemmung	82	2,4

TRAP-stimuliert	0	125ng/ml
	3,0 ± 0,7	1,8 ± 0,1
	0,7	0,1
% Hemmung	39	9,7

EMD 122347

ADP-stimuliert	0	3,6µg/ml
	0,9 ± 0,3	0,25 ± 0,1
% Hemmung		77 ± 7,3

TRAP-stimuliert	0	3,6µg/ml
	2,0 ± 0,4	1,1 ± 0,1
% Hemmung		47 ± 7,8

YM 337

ADP-stimuliert	0	60µg/ml
	1,6 ± 0,2	0,2 ± 0,0
% Hemmung		88 ± 1,6

TRAP-stimuliert	0	60µg/ml
	2,4 ± 0,1	1,4 ± 0,4
% Hemmung		41 ± 16,3

Tab 29: Werte zu Abb. 19 (P-Selektin-Freisetzung, durchflusszytometrische Werte)

GRGDSP

ADP-stimuliert	0	1mM
	232,8 ± 22,1	224,8 ± 19,4
% Hemmung		3 ± 3,0

TRAP-stimuliert	0	1mM
	311,5 ± 6,8	316,3 ± 4,9
% Hemmung		-2 ± 3,6

c7E3

ADP-stimuliert	0	50µg/ml
	219 ± 10,3	212,5 ± 1,9
% Hemmung		3 ± 4,8

TRAP-stimuliert	0	50µg/ml
	312,5 ± 9,0	322,8 ± 12,7
% Hemmung		-3 ± 6,8

Integrelin

ADP-stimuliert	0	2µg/ml
	212 ± 8,8	220 ± 8,8
% Hemmung		-4 ± 4,0

TRAP-stimuliert	0	2µg/ml
	310 ± 5,5	325 ± 2,6
% Hemmung		-4 ± 4,0

Lamifiban

ADP-stimuliert	0	500ng/ml
	221,5 ± 14,5	228,8 ± 17,6
% Hemmung		-3 ± 2,3

TRAP-stimuliert	0	500ng/ml
	305,5 ± 7,9	331 ± 28,0
% Hemmung		-9 ± 10,9

Tirofiban

ADP-stimuliert	0	125ng/ml
	229 ± 28,7	248,5 ± 27,3
% Hemmung		-9 ± 8,1

TRAP-stimuliert	0	125ng/ml
	319,8 ± 22,7	337,8 ± 19,0
% Hemmung		-6 ± 2,3

EMD 122347

ADP-stimuliert	0	3,6µg/ml
	220 ± 11,9	184,5 ± 5,8
% Hemmung		16 ± 6,3

TRAP-stimuliert	0	3,6µg/ml
	305,5 ± 7,9	251,8 ± 16,1
% Hemmung		18 ± 4,8

YM 337

ADP-stimuliert	0	60µg/ml
	221,5 ± 14,5	222 ± 12,4
% Hemmung		-0,3 ± 2,2

TRAP-stimuliert	0	60µg/ml
	311 ± 6,7	297 ± 38,5
% Hemmung		4 ± 13,1

H12

ADP-stimuliert	0	1mM
	231 ± 10,6	217,5 ± 7,6
% Hemmung		6 ± 4,5

TRAP-stimuliert	0	1mM
	299,5 ± 6,5	313,8 ± 10,7
% Hemmung		-5 ± 5,8

Tab 30: Werte zu Tabelle 17

(Oberflächenexpression von CD 61, durchflusszytometrische Werte)

c7E3

unstimuliert	0	50µg/ml
	425,0 ± 40,1	417,0 ± 35,5

TRAP-stimuliert	0	50µg/ml
	463,8 ± 33,3	464,3 ± 33,4

GRGDSP

unstimuliert	0	1mM
	264,0 ± 78,3	270,5 ± 73,7

TRAP-stimuliert	0	1mM
	281,3 ± 92,1	288,8 ± 94,9

Integrelin

unstimuliert	0	2µg/ml
	444,5 ± 16,8	461,3 ± 19,1

TRAP-stimuliert	0	2µg/ml
	477,0 ± 14,1	485,8 ± 18,8

EMD 122347

unstimuliert	0	3,6µg/ml
	434,3 ± 34,0	395,8 ± 40,1

TRAP-stimuliert	0	3,6µg/ml
	469,0 ± 27,9	450,5 ± 1,3

H12

unstimuliert	0	1mM
	420,8 ± 27,0	397,0 ± 30,3

TRAP-stimuliert	0	1mM
	451,3 ± 32,8	446,5 ± 34,5

Lamifiban

unstimuliert	0	500ng/ml
	433,8 ± 29,2	432,3 ± 22,6

TRAP-stimuliert	0	500ng/ml
	462,0 ± 31,5	475,5 ± 17,9

Tirofiban

unstimuliert	0	125ng/ml
	433,3 ± 29,7	438,8 ± 33,9

TRAP-stimuliert	0	125ng/ml
	462,0 ± 31,5	473,0 ± 36,4

YM 337

unstimuliert	0	60µg/ml
	452,8 ± 27,5	435,3 ± 26,8

TRAP-stimuliert	0	60µg/ml
	483,8 ± 25,0	472,3 ± 26,6

Tab 31: Werte zu Abb. 20 (Echistatin-Bindung, durchflusszytometrische Werte)

GRGDSP

	0	1mM
	213,5 ± 9,1	198,8 ± 29,9
% Hemmung		7 ± 9,9

c7E3

	0	50µg/ml
	176,5 ± 36,4	109,5 ± 25,6
% Hemmung		38 ± 5,7

Integrelin

	0	2µg/ml
	211 ± 3,6	179 ± 24,9
% Hemmung		15 ± 10,4

Lamifiban

	0	500ng/ml
	215,8 ± 9,4	176,8 ± 17,7
% Hemmung		18 ± 5,6

Tirofiban

	0	125ng/ml
	215,8 ± 9,4	178,3 ± 8,3
% Hemmung		17 ± 2,9

EMD 122347

	0	3,6µg/ml
	214,3 ± 7,3	137,3 ± 9,2
% Hemmung		36 ± 4,4

YM 337

	0	60µg/ml
	232,3 ± 28,0	223 ± 31,9
% Hemmung		4 ± 3,6

H12

	0	1mM
	227 ± 10,9	158,5 ± 8,2
		30 ± 4,6

Tab 32: Werte zu Abbildung 21 (Thrombozytenadhäsion, unstimuliert)

Fibrinogen

Adhärierte Zellzahl
X 10⁵

	ohne	RGD	c7E3	Integrelin	Lamifiban	Tirofiban	EMD	YM 337	H12	EDTA
Mittelwert	4,4	1,1	1,1	1,6	1,4	1,5	0,8	1,2	1,9	0,9
Stabw.	2,2	0,3	0,2	0,2	0,3	0,4	0,2	0,3	0,7	0,2

% Adhäsionshemmung
(im Vergleich zu GRGDSP)

	c7E3	Integrelin	Lamifiban	Tirofiban	EMD	YM 337	H12
Mittelwert	0,5	-13,5	- 8,1	-11,4	6,6	-5,0	-19,7
Stabw.	2,8	9,1	8,5	13,6	4,5	8,5	16,2

Vitronektin

Adhärierte Zellzahl
X 10⁵

	ohne	RGD	c7E3	Integrelin	Lamifiban	Tirofiban	EMD	YM 337	H12	EDTA
Mittelwert	3,9	1,1	1,5	1,6	1,5	1,6	0,6	1,3	1,1	0,4
Stabw.	0,6	0,3	0,4	0,6	0,5	0,7	0,2	0,4	0,2	0,1

% Adhäsionshemmung
(im Vergleich zu GRGDSP)

	c7E3	Integrelin	Lamifiban	Tirofiban	EMD	YM 337	H12
Mittelwert	-8,9	-13,1	-12,5	-12,3	12,4	-1,9	-1,9
Stabw.	8,6	13,4	8,8	15,7	3,8	10,2	6,9

Fibronektin

Adhärierte Zellzahl
X 10⁵

	ohne	RGD	c7E3	Integrelin	Lamifiban	Tirofiban	EMD	YM 337	H12	EDTA
Mittelwert	16,1	9,9	10,6	9,7	9,9	9,7	1,7	7,7	17,4	1,9
Stabw.	4,2	1,0	1,2	1,4	1,3	1,1	0,5	1,2	7,0	0,4

% Adhäsionshemmung
(im Vergleich zu GRGDSP)

	c7E3	Integrelin	Lamifiban	Tirofiban	EMD	YM 337	H12
Mittelwert	-3,8	3,4	0,3	2,4	50,0	13,8	-32,7
Stabw.	6,4	11,8	6,6	7,8	15,7	8,7	18,0

Laminin

Adhärierte Zellzahl
X 10⁵

	ohne	RGD	c7E3	Integrelin	Lamifiban	Tirofiban	EMD	YM 337	H12	EDTA
Mittelwert	17,0	5,8	5,3	6,9	6,0	6,6	1,3	6,4	10,2	1,4
Stabw.	1,7	2,3	1,9	2,9	3,1	3,0	0,3	3,5	2,2	0,4

% Adhäsionshemmung
(im Vergleich zu GRGDSP)

	c7E3	Integrelin	Lamifiban	Tirofiban	EMD	YM 337	H12
Mittelwert	3,6	-6,7	-1,0	-4,7	27,9	-3,0	-25,4
Stabw.	10,4	10,2	11,6	10,2	16,0	13,8	16,0

Kollagen IV

Adhärierte Zellzahl
X 10⁵

	ohne	RGD	c7E3	Integrelin	Lamifiban	Tirofiban	EMD	YM 337	H12	EDTA
Mittelwert	16,7	7,5	9,9	7,3	7,0	7,9	2,0	6,0	7,5	3,2
Stabw.	2,6	2,3	3,7	3,5	3,7	3,7	0,4	3,3	3,0	0,9

% Adhäsionshemmung
(im Vergleich zu GRGDSP)

	c7E3	Integrelin	Lamifiban	Tirofiban	EMD	YM 337	H12
Mittelwert	-13,6	1,7	3,9	-1,3	35,8	10,0	0,6
Stabw.	15,6	12,4	15,7	19,3	19,4	13,1	14,6

Tab 33: Werte zu Abbildung 21 (Thrombozytenadhäsion, TRAP-stimuliert)

Fibrinogen

Adhärierte Thrombozyten
X 10⁶

	ohne	RGD	c7E3	Integrelin	Lamifiban	Tirofiban	EMD	YM 337	H12	EDTA
Mittelwert	6,4	1,1	0,9	1,4	1,4	1,3	0,7	1,2	1,3	0,7
Stabw.	1,9	0,3	0,3	0,3	0,6	0,2	0,3	0,2	0,5	0,1

% Adhäsionshemmung
(im Vergleich zu GRGDSP)

	c7E3	Integrelin	Lamifiban	Tirofiban	EMD	YM 337	H12
Mittelwert	1,5	-6,6	-5,3	-5,0	5,6	-2,7	-5,2
Stabw.	2,8	6,0	6,9	6,8	2,6	4,7	11,3

Vitronektin

Adhärierte Thrombozyten
X 10⁶

	ohne	RGD	c7E3	Integrelin	Lamifiban	Tirofiban	EMD	YM 337	H12	EDTA
Mittelwert	10,5	1,7	2,4	2,7	2,7	2,8	1,0	2,3	1,8	1,9
Stabw.	1,0	0,4	0,4	0,4	0,5	0,7	0,1	0,3	0,6	0,8

% Adhäsionshemmung
(im Vergleich zu GRGDSP)

	c7E3	Integrelin	Lamifiban	Tirofiban	EMD	YM 337	H12
Mittelwert	-7,0	-10,0	-9,7	-11,3	6,1	-6,1	-0,9
Stabw.	5,8	3,8	5,1	7,3	4,2	5,1	7,6

Fibronektin

Adhärierte Thrombozyten
X 10⁶

	ohne	RGD	c7E3	Integrelin	Lamifiban	Tirofiban	EMD	YM 337	H12	EDTA
Mittelwert	21,7	8,2	10,1	6,2	5,3	5,6	4,6	5,6	4,1	4,3
Stabw.	2,2	2,5	1,2	2,3	3,5	3,5	1,1	3,5	0,4	1,2

% Adhäsionshemmung
(im Vergleich zu GRGDSP)

	c7E3	Integrelin	Lamifiban	Tirofiban	EMD	YM 337	H12
Mittelwert	-10	7,8	11,5	10,1	16,1	10,2	28,3
Stabw.	17,5	19,3	26,0	26,7	8,7	25,7	9,3

Laminin

Adhärierte Thrombozyten
X 10⁶

	ohne	RGD	c7E3	Integrelin	Lamifiban	Tirofiban	EMD	YM 337	H12	EDTA
Mittelwert	20,8	2,9	7,8	6,2	4,1	5,4	1,0	7,0	8,4	1,9
Stabw.	1,4	1,2	1,6	3,0	3,0	3,1	0,1	4,6	4,3	0,5

% Adhäsionshemmung
(im Vergleich zu GRGDSP)

	c7E3	Integrelin	Lamifiban	Tirofiban	EMD	YM 337	H12
Mittelwert	-23,4	-15,8	-5,8	-12,5	9,8	-19,2	-14,6
Stabw.	7,9	13,0	10,2	12,8	7,0	22,1	22,5

Kollagen IV

Adhärierte Thrombozyten
X 10⁶

	ohne	RGD	c7E3	Integrelin	Lamifiban	Tirofiban	EMD	YM 337	H12	EDTA
Mittelwert	22,1	3,7	10,3	6,8	6,5	6,2	4,0	6,3	11,4	7,3
Stabw.	1,7	2,4	4,4	5,5	5,3	5,7	1,0	5,1	4,3	1,9

% Adhäsionshemmung
(im Vergleich zu GRGDSP)

	c7E3	Integrelin	Lamifiban	Tirofiban	EMD	YM 337	H12
Mittelwert	-29,2	-13,2	-12,0	-10,6	-1,8	-10,9	-33,9
Stabw.	8,9	13,4	13,5	14,5	8,1	11,6	12,1

Tab 34: Werte zu Abbildung 22 (CHO-Zell-Adhäsion)

Fibrinogen

Adhärierte Zellen
X 10⁵

	ohne	GRGDSP	c7E3	Integrelin	Lamifiban	Tirofiban	EMD	YM 337	H12	EDTA
Mittelwert	0,53	0,16	0,16	0,17	0,15	0,16	0,14	0,12	0,14	0,16
Stabw.	0,08	0,01	0,01	0,02	0,01	0,01	0,01	0,02	0,02	0,03

% Adhäsionshemmung
(im Vergleich zu GRGDSP)

	c7E3	Integrelin	Lamifiban	Tirofiban	EMD	YM 337	H12
Mittelwert	-0,6	-2,8	0,8	- 0,7	3,6	6,9	3,9
Stabw.	1,5	1,6	3,4	1,7	3,4	4,6	5,0

Vitronektin

Adhärierte Zellen
X 10⁵

	ohne	GRGDSP	c7E3	Integrelin	Lamifiban	Tirofiban	EMD	YM 337	H12	EDTA
Mittelwert	0,61	0,15	0,27	0,30	0,29	0,34	0,21	0,19	0,31	0,15
Stabw.	0,03	0,01	0,07	0,04	0,03	0,02	0,06	0,04	0,03	0,03

% Adhäsionshemmung
(im Vergleich zu GRGDSP)

	c7E3	Integrelin	Lamifiban	Tirofiban	EMD	YM 337	H12
Mittelwert	-19,4	-24,2	- 23,7	-30,9	-10,2	-6,9	-26,0
Stabw.	13,4	6,8	7,4	5,9	8,4	7,5	4,7