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

Antithrombozytärer Effekt von Abciximab, Tirofiban und Eptifibatide bei Patienten nach koronarer Stentimplantation

Willibald Hochholzer

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. Honorar-Prof. Dr. F.-J. M. Neumann,
   Albert-Ludwigs-Universität Freiburg
2. Univ.-Prof. A. Kastrati

Die Dissertation wurde am 14. 10. 2002 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 28. 5. 2003 angenommen.

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung 1

1.1 Die koronare Herzerkrankung 1
1.2 Morphologie der Thrombozyten 2
1.2.1 Plasmamembran 2
1.2.2 Zytoskelett 3
1.2.3 Granula und Organellen 4
1.2.4 Membranrezeptoren des Thrombozyten 5
1.3 Physiologie der Thrombozyten 8
1.3.1 Primäre Hämostase 8
1.3.2 Thrombozyten-Leukozyten-Interaktionen 10
1.4 Aggregationshemmer 11
1.4.1 Acetylsalicylsäure 11
1.4.2 Ticlopidin und Clopidogrel 12
1.4.3 Fibrinogenrezeptorantagonisten 13
1.4.3.1 Abciximab 15
1.4.3.2 Tirofiban 17
1.4.3.3 Eptifibatide 18

2. Zielsetzung 20

3. Patienten und Methodik 21

3.1 Studienpatienten 21
3.1.1 Ausschlußkriterien 22
3.1.2 Dosierung der Medikamente 23
3.1.2.1 ASS, Ticlopidin und Heparin 23
3.1.2.2 Fibrinogenrezeptorantagonisten 23
3.2 Probengewinnung 24
3.2.1 Abnahme und Material 24
3.2.2 Cyfix-Konservierung 25
3.2.3 Antikoagulation mit Hirudin 26
3.3 Rapid Platelet-Function Assay 27
3.3.1 Funktionsprinzip des RPFA 27
3.3.2 Messung der Aggregation 28

3.4 Aggregometer 29
3.4.1 Funktionsprinzip eines Aggregometers 29
3.4.2 Probenaufbereitung 29
3.4.3 Messung der Aggregation 30
3.4.4 Auswertung der Aggregationskurven 31
3.5 Durchflußzytometer 32
3.5.1 Funktionsprinzip eines Durchflußzytometers 32
3.5.2 Verwendete Antikörper 33
3.5.3 Probenaufbereitung 34
3.5.3.1 Zweifachfärbung 34
3.5.3.2 Dreifachfärbung 35
3.5.4 Durchflußzytometrische Messung 36
3.5.4.1 Thrombozyten 36
3.5.4.2 Thrombozyten-Monozyten-Interaktionen 37
3.6 Vergleich von Hirudin- und Citrat-Proben 38
3.7 Cell Counter 39
3.8 Statistik 39

4. Ergebnisse 40

4.1 Rapid Platelet-Function Assay 40
4.2 Aggregometer 42
4.2.1 ADP-induzierte Aggregation 42
4.2.2 TRAP-induzierte Aggregation 43
4.3 Durchflußzytometer 44
4.3.1 Glykoprotein IIb/IIIa 44
4.3.1.1 CD61 44
4.3.1.2 PAC-1 45
4.3.2 P-Selektin-Degranulation 47
4.3.3 Thrombozyten-Monozyten-Interaktionen 48
4.4 Thrombozytenzahl 49
4.5 Nebenwirkungen 50

5. Diskussion 51

5.1 Thrombozytenaggregation 51
5.2 Agonisteninduzierte Thrombozytenaktivierung 52
5.3 Fibrinogenrezeptor 52
5.4 Thrombozyten-Monozyten-Interaktionen 53
5.5 Studienbeschränkung 54
5.6 Konsequenzen 55

6. Zusammenfassung 56

7. Anhang 57

7.1 Abkürzungsverzeichnis 57
7.2 Tabellenverzeichnis 59
7.3 Abbildungsverzeichnis 60
7.4 Literaturverzeichnis 61

8. Curriculum Vitae 71

9. Danksagung 72

1. Einleitung

1.1 Die koronare Herzerkrankung

Nach wie vor stellen die Erkrankungen des Kreislaufsystems in Deutschland – wie auch in anderen Wirtschaftsstaaten – die häufigste Todesursache dar. Dabei steht die koronare Herzerkrankung (KHK) neben den Erkrankungen der Hirngefäße an vorderster Stelle (61,62,86).

Als Auslöser der symptomatischen koronaren Herzerkrankung gilt die oberflächliche Erosion oder – viel häufiger – die Ruptur der fibrinösen Kappe eines arteriosklerotischen Plaques. Durch diesen Prozeß werden subendotheliale Matrixproteine freigesetzt (zum Beispiel der von-Willebrand-Faktor oder Kollagen). Zusammen mit weiteren Prozessen – unter anderem der Freisetzung von Thrombin – führt dies zur Aktivierung, Adhäsion und Aggregation von Thrombozyten. Als Folge kann es zu einer deutlichen Einengung des Gefäßes bis hin zum Infarkt kommen (15,24,33-35,53).

Aber nicht nur nach Verletzungen des bereits bestehenden Plaques, auch bei dessen Entstehung spielen Thrombozyten eine zentrale Rolle. Durch kleine Endothelschäden oder Monozyten aktivierte Plättchen sezernieren Zytokine und Wachstumsfaktoren. Diese führen zur Proliferation von glatten Muskelzellen und zum Einwandern von Monozyten, welche sich zu LDL-speichernden Makrophagen umwandeln (33,34,79,82).

Darüber hinaus scheinen Thrombozyten auch an der Auslösung von entzündlichen Reaktionen am Gefäß, deren Folgen noch nicht alle vollständig bekannt sind, mitzuwirken (3,36,50,54,60,64,67).

Es ist daher nicht verwunderlich, daß antithrombozytäre Medikamente wie zum Beispiel Acetylsalicylsäure (ASS), Ticlopidin oder Abciximab zu einer deutlichen Senkung der Komplikationsraten bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit führen (4,14,35)

Die antithrombozytäre Therapie ist deshalb ein elementarer Bestandteil der Therapie der KHK (11,91).

1.2 Morphologie der Thrombozyten

Thrombozyten entstehen durch Aufspaltung von sogenannten Prothrombozyten („proplatelets“), welche von Megakaryozyten gebildet werden. Als Bildungsort scheinen neben dem Knochenmark auch die Lungengefäße eine Rolle zu spielen (23,41,46).

Etwa 150.000 bis 400.000 dieser bikonvex geformten, zellkernfreien Zellen zirkulieren pro µl Blut durch den Körper eines Erwachsenen. Ihr Durchmesser beträgt durchschnittlich 2 µm, ihr Volumen zwischen 7 und 9 fl und die durchschnittliche Lebensdauer 8 bis 12 Tage (23).

Der Aufbau der Plättchen läßt sich in drei Teile mit unterschiedlichen Funktionen gliedern (10,23):

- ***Plasmamembran***: intra- und extrazelluläre Interaktionen
- ***Zytoskelett***: Bewegung und Formänderung
- ***Granula und Organellen***: Sekretion und weitere Funktionen

1.2.1 Plasmamembran

Wie die meisten Zellen sind auch die Thrombozyten von einer trilaminären Membran umgeben, die etwa 20 nm dick ist. Sie besteht vor allem aus Cholesterin und Phospholipiden. In dieser Schicht befinden sich auch Glykolipide und Glykoproteine, welche auf der Außenseite eine Glykokalyxstruktur aufbauen, und verschiedene Enzymsysteme wie zum Beispiel Phospholipasen, Kalzium-ATPase und Adenylatzyklase. Die Glykoproteine (GP) dienen als Rezeptoren zur Interaktion mit anderen Zellen oder Stoffen. Auf diese soll in Kapitel 1.2.4 genauer eingegangen werden (10,23,38,40).

Die Plasmamembran setzt sich im *surface-connected canalicular system* (SCCS) ins Zellinnere fort, was zu einer deutlichen Vergrößerung der Zelloberfläche führt. Das SCCS spielt unter anderem bei der Sekretion von Granula und der Umverteilung des Rezeptors für den von-Willebrand-Faktor (vWF) nach der Plättchenaktivierung eine Rolle (7,10,23,47).

In unmittelbarer Nachbarschaft des SCCS liegt das *dense tubular system* (DTS). SCCS und DTS werden zusammen auch als Membrankomplex oder Membransystem bezeichnet. Vergleichbar mit dem sarkoplasmatischen Retikulum der Muskelzellen speichert das DTS Kalziumionen, die nach Thrombozytenaktivierung freigesetzt werden und zu Formveränderungen des Zytoskeletts führen. Die für diese Funktion nötige Kalzium-ATPase ist in der Membran des DTS vorhanden. Darüber hinaus finden sich hier auch Enzyme des Arachidonsäurestoffwechsel wie die Zyklooxigenase II. Das von ihr gebildete Thromboxan A_2 spielt bei der Plättchenaktivierung und -aggregation eine Rolle (10,23,42).

1.2.2 Zytoskelett

Das Zytoskelett besteht hauptsächlich aus drei Komponenten, die für verschiedene Funktionen zuständig sind:

Mikrotubuli haben einen Durchmesser von 25 nm, bestehen vor allem aus Tubulin und bilden eine ringförmige Struktur unter der Zelloberfläche. Sie geben damit dem ruhenden Thrombozyten die bikonvexe Form und zerfallen, wenn der Thrombozyt nach Aktivierung in seine spheroide Form übergeht (23,31).

Mikrofilamente haben einen Durchmesser von 5 bis 6 nm und bestehen hauptsächlich aus Aktin. Sie stellen den Motor der Plättchen dar, wenn diese nach Aktivierung ihren Formwandel („shape change“) vollziehen. Man findet sie nicht nur im Zellinneren, sondern auch zwischen Zellmembran und Mikrotubuli, wo sie nach Zellaktivierung Pseudopodien ausbilden und den Zerfall der Mikrotubuli auslösen (23,31).

Intermediäre Filamente haben einen Durchmesser von 10 bis 12 nm und bestehen vor allem aus Desmin und Vementin. Sie sind mit den Mikrotubuli verbunden und fangen auf die Zelle einwirkende Spannungen ab. Auch mit den Aktinfilamenten stehen sie in engem Kontakt. Dieser Zellinnenraum mit Strukturen aus intermediären Filamenten und Aktin wird wegen der wechselnden Konsistenz auch als die *Sol-Gel Zone* bezeichnet (23,31).

1.2.3 Granula und Organellen

Wie die meisten anderen Zellen verfügt der Thrombozyt auch über verschiedene Zellorganellen wie zum Beispiel Mitochondrien, Golgi-Apparate oder Granula. Letztere werden unterteilt in α-Granula, Dense Granula, Lysosomen und Peroxisomen (23,41).

α-Granula stellen mit einer Anzahl von 50 bis 80 pro Plättchen die häufigste Zellorganelle des Thrombozyten dar. Sie sind 200 bis 500 nm groß und speichern vor allem Proteine, die durch endogene Synthese, Pinozytose oder rezeptorvermittelte Endozytose aufgenommen werden. TABELLE 1 gibt einen Überblick über die gespeicherten Proteine (23,32,41).

Dense Granula sind 200 bis 300 nm groß und erscheinen, wie ihr Name schon sagt (dense [englisch] = dicht), als dichte Strukturen, die von einem hellen Hof umgeben sind. Sie speichern eher kleine Moleküle und Ionen (siehe TABELLE 1) (23,41).

Die Funktion von ***Lysosomen*** in Plättchen ist noch nicht ganz geklärt, da sie für den internen Stoffwechsel nicht benötigt werden. Sie scheinen vielmehr eine Rolle bei der Wundheilung durch Abbau von Gefäßmatrix und Gerinnseln zu spielen (23,32,41).

Peroxisomen dienen unter anderem zum Abbau von freien Radikalen (41).

TABELLE 1: Granula und die in ihnen gespeicherten Stoffe (Auswahl)

α-Granula	*Dense Granula*	*Lysosomen*	*Peroxisomen*
α_1-Antitrypsin	ADP	Glukosidasen	Peroxidasen
α_2-Makroglobulin	ATP	Phospholipase A_2	
Albumin	GDP	Proteinasen	
Faktor V	GTP	saure Phosphatase	
Fibrinogen	Kalzium		
Fibronektin	Magnesium		
GP IIb/IIIa	Serotonin		
Plasminogen			
Plättchenfaktor 4			
P-Selektin			
vWF			

Abkürzungen: ADP = Adenosindiphosphat, ATP = Adenosintriphosphat, GDP = Guanindiphosphat, GTP = Guanintriphosphat, GP = Glykoprotein, vWF = von-Willebrand-Faktor

1.2.4 Membranrezeptoren des Thrombozyten

Die Zellmembran des Thrombozyten enthält zahlreiche Glykoproteine, die für die Aktivierung, Adhäsion, Aggregation und Interaktion mit anderen Zellen eine wichtige Rolle spielen (10,23,36,37).

TABELLE 2 gibt einen kurzen Überblick über die wichtigsten Rezeptoren:

TABELLE 2: Glykoproteine der Thrombozytenmembran (Auswahl)

Glykoprotein	*Ligand*	*CD-Bezeichnung*	*Anzahl*
GP Ib-IX-V	vWF	CD42	12.000 – 25.000
GP IIb/IIIa	vWF Fibrinogen Fibronektin Vitronektin	CD41/CD61	40.000 – 80.000
GP IV	Kollagen Thrombospondin	CD36	15.000 – 25.000
GP Ia/IIa	Kollagen	CD49b/CD29	1.000
GP Ic/IIa	Fibronektin	CD49c/CD29	1.000
GP Ic*/IIa	Laminin	CD49f/CD29	1.000
PECAM-1	?	CD31	5.000
P-Selektin	αMb2/Sialyl-Le.	CD62P	20.000

Abkürzung: PECAM-1 = platelet-endothelial cell adhesion molecule 1

Defekt von: GP Ib/IX/V bei Bernard-Soulier-Syndrom
GP IIb/IIIa bei Glanzmann-Naegeli-Syndrom

Nachfolgend sollen nun die für diese Doktorarbeit relevanten Rezeptoren näher erläutert werden.

Das ***GP Ib-IX-V*** spielt bei der Adhäsion der Thrombozyten, wenn diese in Kontakt mit der subendothelialen Matrix gelangen (zum Beispiel nach einer Läsion der Gefäßwand), die entscheidende Rolle. Es kann unabhängig vom Aktivierungszustand des Plättchens an von-Willebrand-Faktor, der immobilisiert im Subendothel vorliegt, binden und trägt damit neben der Adhäsion auch zur Aktivierung des Thrombozyten bei (23,41,82).

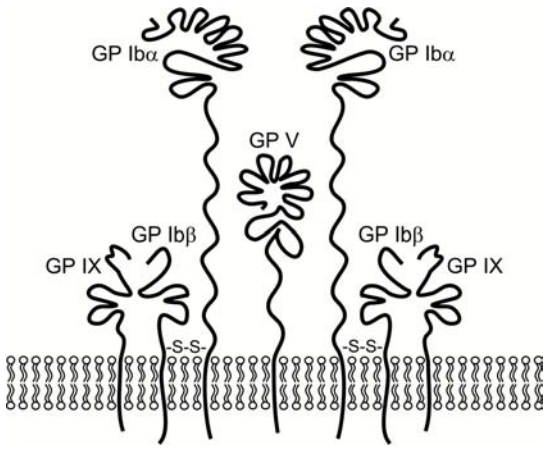


ABBILDUNG 1: GP Ib-IX-V

Wie aus ABBILDUNG 1 ersichtlich, besteht dieser Rezeptor aus mehreren Glykoproteinen, von denen die Spitze des GP Ibα die Bindungsstelle für vWF darstellt. Wie neuere Studien zeigen, scheint darüber hinaus in diesem Bereich auch eine der Hauptbindungsstellen für Thrombin auf der Thrombozytenoberfläche lokalisiert zu sein (8,23).

Das GP Ib-IX-V ist vor allem auf inaktiven Plättchen mit einer Häufigkeit von 12.000 bis 25.000 Rezeptoren pro Zelle zu finden. Nach der Aktivierung des Thrombozyten erfolgt eine rasche Elimination von der Zelloberfläche und Umverteilung in das SCCS (8,23,81,82).

Das ***GP IIb/IIIa*** ist für die Aggregation der Thrombozyten verantwortlich. Nach Aktivierung des Plättchens kommt es zu einer Konformationsänderung des Rezeptors, wodurch hochaffine Bindungsstellen für lösliches Fibrinogen freigelegt werden. Die dadurch entstehenden Brücken aus Fibrinogen zwischen den Thrombozyten stellen die Endstrecke der Aggregation dar, unabhängig von der Art, wie die Zelle aktiviert wurde (41,52,73).

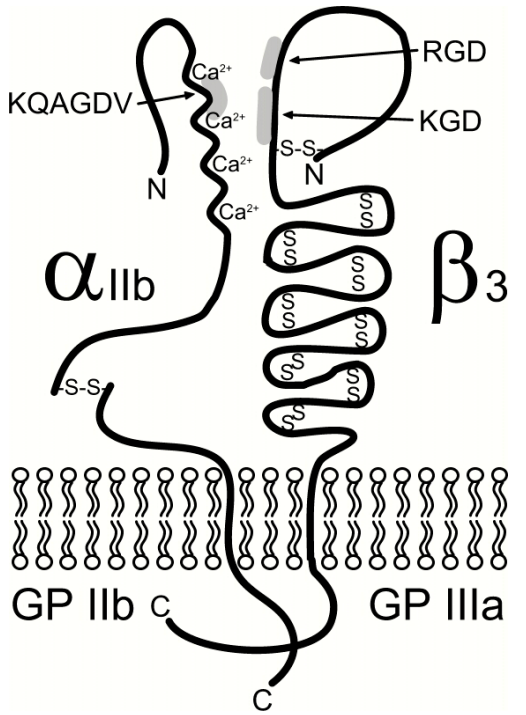


ABBILDUNG 2: GP IIb/IIIa

Wie aus ABBILDUNG 2 deutlich wird, ist das GP IIb/IIIa ein heterodimeres Integrin, das aus einer α_{IIb}- und einer β_3-Kette besteht. Auf der α_{IIb}-Untereinheit (GP IIb) befinden sich vier Bindungsstellen für Kalziumionen, welche sowohl für die Ligandenbindung als auch für die Aufrechterhaltung der nicht-kovalenten Bindung zwischen den Untereinheiten benötigt werden. Darüber hinaus liegt in diesem Abschnitt des Rezeptors die Bindungsstelle, an welche spezifisch die KQAGDV-Sequenz der γ-Kette des Fibrinogens bindet. Auf der β_3-Untereinheit liegen zwei weitere Bindungsstellen des Fibrinogens, an welche die RGD- und die KGD-Sequenz der Aα-Kette binden. Die RGD-Sequenz kommt auch in anderen Molekülen vor und ermöglicht es so auch vWF, Fibronektin und Vitronektin an das GP IIIa zu binden (23,41,73).

Mit 40.000 bis 60.000 Kopien auf der Oberfläche ist das GP IIb/IIIa der häufigste Rezeptor des Thrombozyten. Nach Aktivierung kann die Zahl noch um etwa 30 % auf über 80.000 Kopien ansteigen indem α-Granula, in denen GP IIb/IIIa gespeichert ist, mit der Zelloberfläche verschmelzen (41).

P-Selektin stellt die Schnittstelle zwischen Thrombozyten und Leukozyten dar. Am ruhenden Plättchen kommt es auf der Zelloberfläche so gut wie nicht vor. Nach Aktivierung wird das in α-Granula gespeicherte P-Selektin an die Zelloberfläche befördert. Hier vermittelt es die Adhäsion an Monozyten und neutrophile Granulozyten. Etwa 20.000 Kopien sind durchschnittlich auf der Oberfläche von aktivierten Thrombozyten zu finden (56,64,69,94).

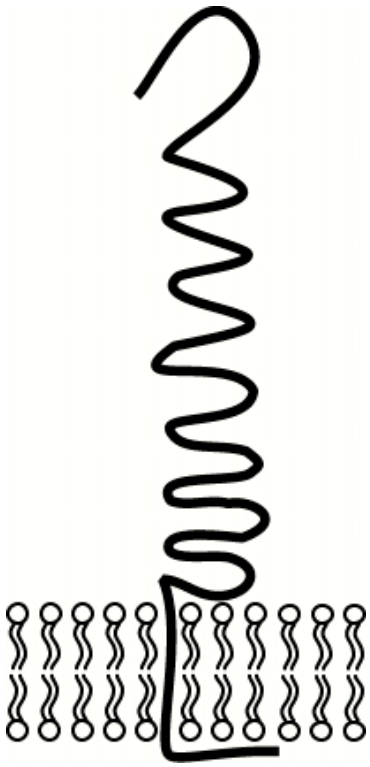


ABBILDUNG 3: P-Selektin

1.3 Physiologie der Thrombozyten

1.3.1 Primäre Hämostase

Am gesunden Gefäß wird der ungestörte Blutfluß durch das Endothel aufrechterhalten. Es bildet nicht nur eine Barriere zwischen den Blutzellen und den hochgradig prokoagulativen Elementen der Gefäßwand, sondern produziert auch Stoffe, welche die Blutgerinnung hemmen. Dazu zählen unter anderem Stickstoffmonoxid (NO), Prostacyclin und die ADPase, welche das thrombozytenaktivierende ADP spaltet (22).

Kommt es zu einer Verletzung des Endothels, werden subendotheliale Matrixproteine freigelegt, die zur Aktivierung von Thrombozyten und zur Bildung eines primären Thrombus führen. Dieser Vorgang wird als primäre Hämostase bezeichnet und – wie aus ABBILDUNG 3 ersichtlich - in folgende zwei Schritte eingeteilt (10,22,35):

- *Adhäsion*
- *Aggregation*

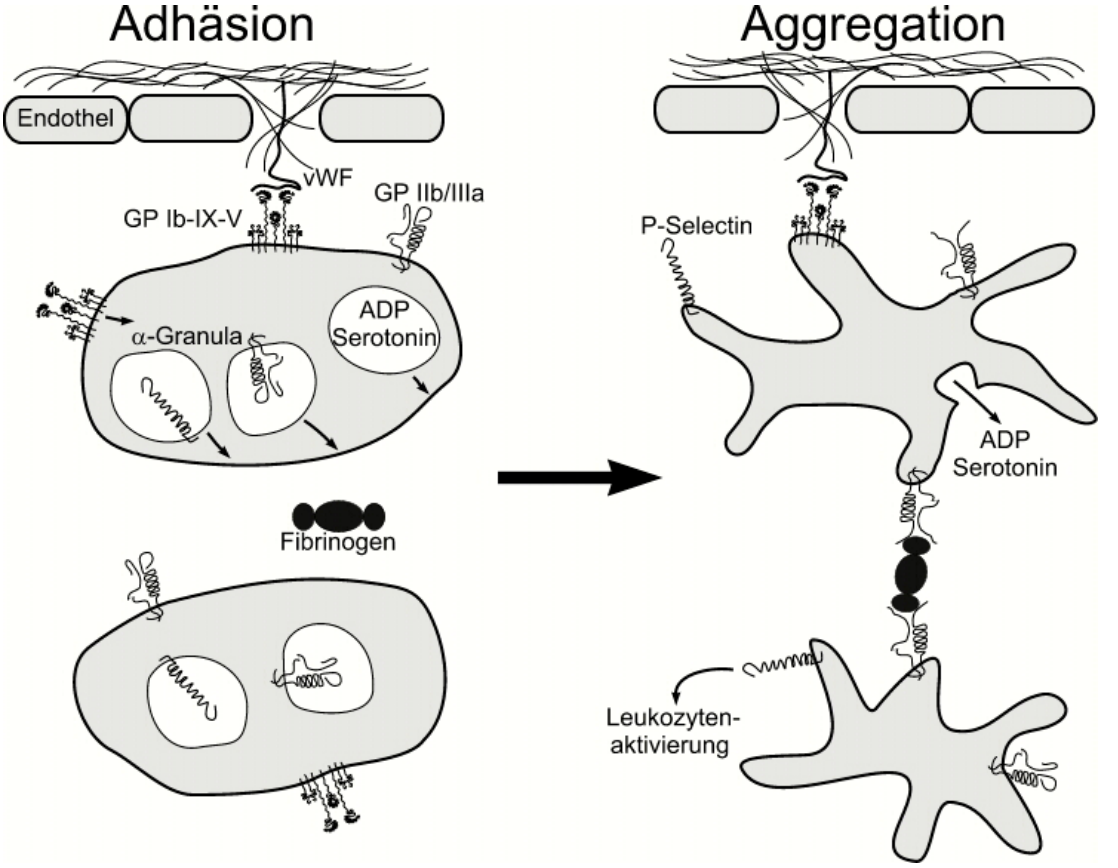


ABBILDUNG 4: Adhäsion und Aggregation

Mit der ***Adhäsion*** (Anlagerung) von noch nicht aktivierten Thrombozyten an subendotheliale Matrixproteine unter hohen Schergeschwindigkeiten beginnt die primäre Hämostase. Das zentrale Molekül ist dabei in der Gefäßwand verankerter von-Willebrand-Faktor (vWF). Er wird aktivierungsunabhängig von der Ib-Untereinheit des GP Ib-IX-V gebunden (10,22,35).

Die entscheidende Bedeutung dieses ersten Schrittes für die Hämostase zeigt sich bei Patienten mit einem Defekt des GP Ib-IX-V (Bernard-Soulier-Syndrom) oder des vWF (von-Willebrand-Jürgens-Syndrom). Beide leiden unter einer deutlich erhöhten Blutungsneigung (8).

Nach dem initialen Kontakt durch das GP Ib-IX-V wird die Bindung durch weitere Rezeptor-Matrixprotein-Interaktionen stabilisiert. Dazu zählen vor allem GP Ia/IIa mit Kollagen, GP Ic/IIa mit Fibronektin und GP Ic*/IIa mit Laminin (23).

Vor allem durch die Interaktion von GP Ia/IIa mit Kollagen kommt es zur Aktivierung des Thrombozyten. Dies hat drei entscheidende Folgen (10,22,35):

- Die ***Entleerung von Speichergranula*** führt einerseits zur Freisetzung von Stoffen, die das Gefäß verengen (ADP / ATP / Serotonin) und den sezernierenden Thrombozyten und andere Plättchen aktivieren (ADP / ATP). Andererseits werden Rezeptoren auf die Zelloberfläche transportiert (und auch aktiviert – zum Beispiel GP IIb/IIIa), die für die nachfolgenden Prozesse benötigt werden (P-Selektin, GP IIb/IIIa) (22,32).
- Der Thrombozyt vollzieht eine ***Formveränderung,*** auch als „shape change“ bezeichnet. Durch die Aktivierung von Mikrofilamenten verliert das Plättchen seine diskoide Form und bildet Pseudopodien (= längliche Zellausziehungen). Dadurch wird die Zelloberfläche deutlich vergrößert (23).
- Darüber hinaus wird der ***Arachidonsäurestoffwechsel*** in Gang gesetzt, wodurch unter anderem Thromboxan A_2 gebildet wird, welches thrombozytenaktivierend und vasokonstriktorisch wirkt (22).

Am Ende der Adhäsion ist der Thrombozyt vollständig über der Endothelläsion ausgespreizt und aktiviert (10,22,35).

In der folgenden ***Aggregation*** binden die nun aktivierten Thrombozyten mittels im Plasma vorliegenden Fibrinogen, das vom GP IIb/IIIa gebunden wird, Brücken zwischeneinander. Damit dies erfolgen kann, sind außer funktionstüchtigen Plättchen noch ausreichend Fibrinogen, Kalziumionen und hohe Scherkräfte (= hohe Kontaktwahrscheinlichkeit zwischen den Zellen) nötig. Durch die Freisetzung von Speichergranula bringt der Thrombozyt bereits Fibrinogen und Kalziumionen mit. Die Aggregation ist anfangs noch reversibel. Durch weitere Degranulation (vor allem ADP und Thromboxan A_2) kommt es allerdings nach einigen Minuten zu einer irreversiblen Bindung von Fibrinogen an das GP IIb/IIIa (10,22,35,73).

Nach Abschluß der primären Hämostase wird auch die sekundäre Hämostase, bei welcher der noch instabile Plättchenthrombus durch Fibrin fixiert wird, durch Thrombozyten mit eingeleitet (22).

1.3.2 Thrombozyten-Leukozyten-Interaktionen

Nicht nur in der Physiologie und Pathophysiologie der Hämostase spielen Thrombozyten eine zentrale Rolle – auch an entzündlichen Reaktionen, die auf die Bildung eine Thrombus folgen können, sind sie beteiligt (40,56,69).

Nach Aktivierung des Thrombozyten kommt es zur Präsentation von P-Selektin auf der Zelloberfläche, das an Monozyten und neutrophile Granulozyten binden und diese aktivieren kann (56,64,69,94).

In Monozyten wird dadurch die Bildung von Entzündungsmediatoren induziert. Dazu zählen Interleukin-8, das „monocyte-chemoattractant-protein-1“ und das Zytokin IL-1β. Die dadurch aktivierten Entzündungsprozesse können den Verlauf der KHK ungünstig beeinflussen (56,64,69).

1.4 Aggregationshemmer

1.4.1 Acetylsalicylsäure

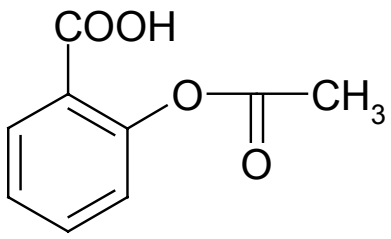


ABBILDUNG 5: ASS

Obwohl die Acetylsalicylsäure (ASS) bereits seit dem 19. Jahrhundert als Medikament bekannt ist, wurde ihr Einfluß auf die Thrombozytenaggregation erst 1967 entdeckt und ihr Wirkmechanismus erstmals 1971 beschrieben (35,95,96).

ASS inaktiviert durch irreversible Acetylierung die thrombozytäre Zyklooxigenase und verhindert so die Bildung von Thromboxan A_2. Dieser Effekt ist bei anderen Zellen (zum Beispiel Endothelzellen) nicht so gravierend, da diese – im Gegensatz zu den Plättchen – in der Lage sind, dieses Enzym neu zu synthetisieren (35,53,58,95).

Als Nebenwirkungen einer Behandlung mit ASS sind vor allem gastrointestinale Reizungen bis hin zur Bildung von Magenulzera und Blutungen beschrieben. Das Auftreten dieser Nebenwirkungen ist von Dosis und Dauer der Therapie abhängig. Darüber hinaus tritt bei etwa 0,2 % der Patienten eine Neutropenie auf. Bei Kindern sollte ASS wegen der Gefahr des Reye-Syndroms vermieden werden (13,58).

Obwohl Aspirin in zahlreichen Studien seine Wirksamkeit unter Beweis gestellt hat und heute als Standard bei der Therapie der KHK gilt, ist seine Wirkung auf die Thrombozytenaktivierung dennoch als relativ schwach einzustufen. So wird beispielsweise der Effekt so potenter Agonisten wie ADP oder Thrombin kaum beeinflußt (35,58,70).

1.4.2 Ticlopidin und Clopidogrel

Die Thienopyridine Ticlopidin und Clopidogrel blockieren einen der wichtigsten Aktivierungswege der Thrombozytenaggregation: die ADP-induzierte Plättchenaktivierung. Dabei binden nicht die Substanzen selbst, sondern in der Leber gebildete, bislang noch nicht näher identifizierte Metabolite vermutlich irreversibel an den ADP-Rezeptor der Thrombozyten (58).

Trotz der – wie aus ABBILDUNG 6 ersichtlich – ähnlichen Struktur beider Substanzen unterscheiden sie sich in der Häufigkeit der Nebenwirkungen erheblich. Während Blutungen bei beiden etwa genauso häufig wie bei ASS auftreten, kommt es unter Ticlopidin deutlich häufiger zu Diarrhoe (22 % / Clopidogrel: 5 %) und Hautausschlägen (12 % / Clopidogrel: 6 %). Dies führt dazu, daß etwa 12 % der Patienten die Therapie mit Ticlopidin abbrechen. Außerdem werden unter Ticlopidin bei etwa 2 % der Patienten Neutropenien beschrieben, während diese unter Clopidogrel deutlich seltener auftreten (ca. 0,1 %) (6,9,13,58).

Obwohl die Thienopyridine gezeigt haben, daß sie auch als Monotherapie eine deutliche Risikoreduktion bei Patienten mit arteriellen Verschlußkrankheiten bewirken können, ist dieser Vorteil im Vergleich zu Aspirin nicht allzu groß (13,58). Die Kombinationstherapie mit ASS hat sich in Studien als deutlich effektiver als die Monotherapien erwiesen. Daher wird die Kombination beider Substanzgruppen von vielen Autoren als Standardtherapie der koronaren Herzerkrankung angesehen (9,58).

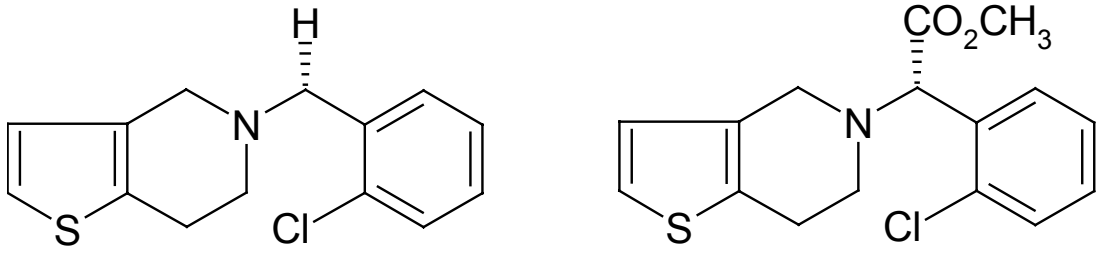


ABBILDUNG 6: Ticlopidin (Tiklyd®) und Clopidogrel (Iscover®)

1.4.3 Fibrinogenrezeptorantagonisten

Im Gegensatz zu ASS und den Thienopyridinen verhindern Fibrinogenrezeptorantagonisten nicht über eine Hemmung der Thrombozytenaktivierung, sondern – unabhängig von der Art der Zellaktivierung – die Aggregation der Plättchen. Dies wird durch eine Blockierung des Fibrinogenrezeptors bewirkt, der dadurch nicht mehr in der Lage ist, Fibrinogen zu binden (58,63,66).

TABELLE 3 gibt einen Überblick über die derzeit zugelassenen und in dieser Studie verwendeten GP IIb/IIIa-Blocker.

TABELLE 3: Übersicht GP IIb/IIIa-Blocker

	Abciximab	*Tirofiban*	*Eptifibatide*
Typ	Fab-Fragment	Tyrosinderivat	zyklisches Peptid
Molekulargewicht	ca. 45.000	495	832
Bindungsort	?	RGD-Sequenz	KGD-Sequenz
Rezeptorbindung	irreversibel	reversibel	reversibel
Halbwertszeit	= Plättchen-HWZ	1,5 Stunden	1 – 1,5 Stunden
Klinische Studien (Auswahl)	EPIC EPILOG CAPTURE EPISTENT	PRISM RESTORE PRISM-PLUS	PURSUIT IMPACT-II

Abkürzungen:

Fab = fragment antigen binding
HWZ = Halbwertszeit
CAPTURE = chimeric c7E3 anti-platelet therapy in refractory unstable angina treatment
EPIC = evaluation of c7E3 for the prevention of ischemic complications
EPILOG = evaluation of PTCA to improve longterm outcome by c7E3
EPISTENT = evaluation of platelet GP IIb/IIIa inhibitor for stenting
IMPACT-II = Integrelin to minimize platelet aggregation and to prevent coronary thrombosis
PRISM = platelet receptor inhibition for ischemic syndrome management
PRISM-PLUS = platelet receptor inhibition for ischemic syndrome management – patients limited by unstable signs and symptoms
PURSUIT = platelet GP IIb/IIIa in unstable angina receptor suppression using Integrilin therapy
RESTORE = randomized efficacy study of Tirofiban for outcomes and restenosis

Neben allgemeinen Nebenwirkungen wie Kopfschmerz oder Übelkeit werden bei GP IIb/IIIa-Blockern vor allem Blutungen beobachtet. Diese beginnen meist mit petechialen Hautblutungen, Nasen- und Zahnfleischbluten und können bis zu schweren, Hb-wirksamen Blutungen gehen. In den verschiedenen Studien wurde die Häufigkeit für schwere Blutungskomplikationen bei Abciximab mit 3,5 bis 14,0 %, bei Tirofiban mit 4,0 bis 5,3 % und bei Eptifibatide mit 5,1 % bis 10,8 % beschrieben und war dabei jeweils höher als in der Placebogruppe. Am häufigsten traten die Blutungen am femoralen Gefäßzugang für die Herzkatheteruntersuchung auf. Die Inzidenz für intrakranielle Blutungen war allerdings nicht erhöht (14,25,26,48,74-76,78).

Darüber hinaus können alle drei Medikamente Thrombozytopenien (< 100.000 / µl) verursachen. Die Häufigkeit hierfür lag bei Abciximab zwischen 0,4 und 5,6 %, bei Tirofiban zwischen 1,2 und 1,8 % und bei Eptifibatide zwischen 2,6 und 3,0 % (14,25,26,48,74-76,78).

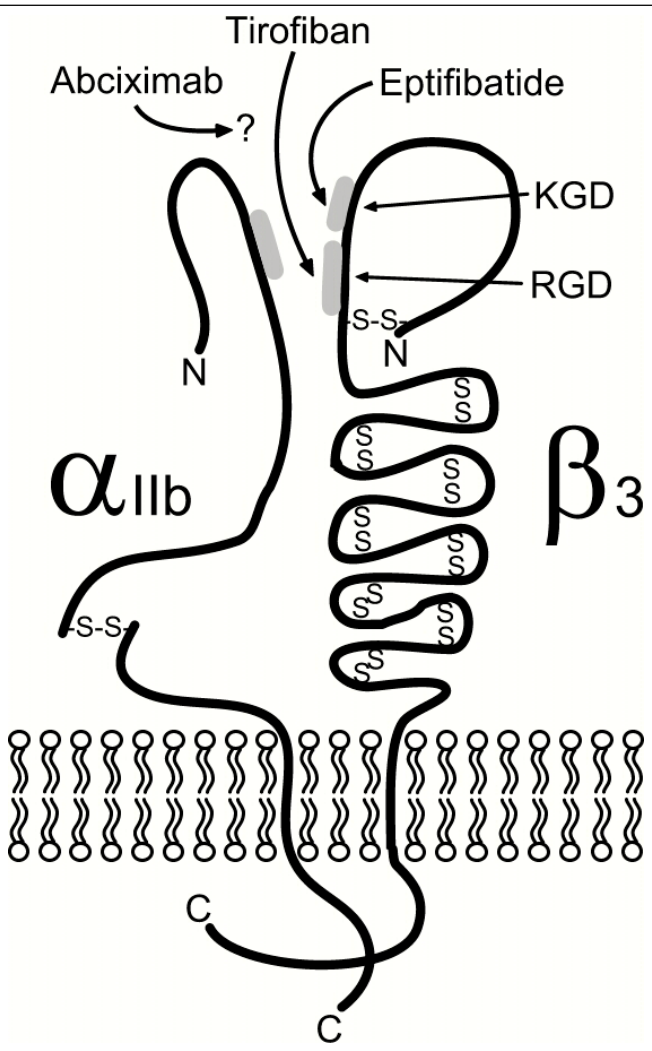


ABBILDUNG 7: Bindungsstellen der Antagonisten am GP IIb/IIIa

1.4.3.1 Abciximab

Abciximab (ReoPro®) ist ein von Coller und Mitarbeitern in den 80er Jahren entwickeltes Fab-Fragment eines chimären Antikörpers und stellt den ersten zur Therapie zugelassenen Fibrinogenrezeptorantagonisten dar. Wie aus ABBILDUNG 7 ersichtlich, wurde die variable Region eines Mausantikörpers (dunkelgrau) mit der konstanten Region eines menschlichen Antikörpers (hellgrau) kombiniert und – um durch die Fc-Region vermittelte unerwünschte Reaktionen wie zum Beispiel Komplementaktivierung zu vermeiden – nur die Fab-Region als Medikament verwendet (19,20,58,63,65).

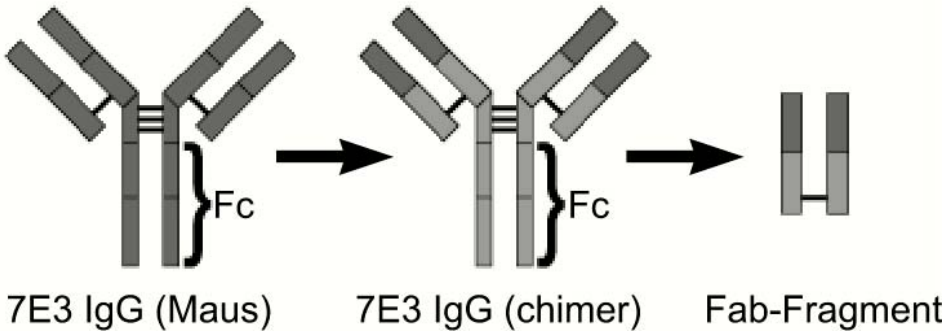


ABBILDUNG 8: Abciximab (ReoPro®)

Der Wirkstoff hat ein Molekulargewicht von etwa 45.000 und bindet irreversibel an einen bislang nicht näher identifizierten Abschnitt des Fibrinogenrezeptors. Wegen der irreversiblen Bindung entspricht die Halbwertszeit von Abciximab in vivo der Halbwertszeit der Thrombozyten. Darüberhinaus kreuzreagiert das Fab-Fragment mit dem Vitronektinrezeptor auf Endothel- und glatten Muskelzellen und mit dem MAC-1-Rezeptor auf Leukozyten. Eine Bildung von Antikörpern gegen das Medikament ist möglich (30,58).

Die ***EPIC-Studie*** (evaluation of c7E3 for the prevention of ischemic complications), die 2099 Patienten mit erhöhtem Risiko für eine Koronarintervention untersuchte, konnte zeigen, daß der primäre Endpunkt (Tod, Myokardinfarkt, dringende Re-PTCA, Bypass, plötzlicher Gefäßverschluß) nach einem Bolus mit anschließender 12stündiger Infusion von Abciximab um 35 % seltener auftrat als in der Kontrollgruppe, die ein Placebo erhielt (Abciximab 8,3 % / Placebo 12,8 %). Des weiteren zeigte sich, daß es in der Abciximabgruppe auch noch nach 6 Monaten, 1 Jahr und 3 Jahren eine hochsignifikante Reduktion kardialer Ereignisse gegeben war. Zusätzlich zur Studienmedikation erhielten alle Patienten ASS und Heparin (25,92).

Da es in der EPIC-Studie bei 14 % der Patienten unter Abciximab zu schweren Blutungskomplikationen gekommen war, prüfte die Nachfolgestudie ***EPILOG*** (evaluation of PTCA to improve longterm outcome by c7E3) noch einen dritten Behandlungsarm mit Abciximab in Kombination mit niedrig dosiertem Heparin (70 U/kg statt 100 U/kg). An der Studie nahmen 2792 Patienten mit einem normalem PTCA-Risiko teil. Da sich ein deutlicher Vorteil von Abciximab gegenüber dem Placebo zeigte, wurde die Studie aus ethischen Gründen vorzeitig beendet. Der primäre Endpunkt (siehe oben) nach 30 Tagen trat unter Abciximab über 50 % seltener auf (Placebo 11,7 %, Abciximab mit Standardheparin 5,4 %, Abciximab mit reduziertem Heparin 5,2 %). Mit der erniedrigten Heparindosis konnte darüber hinaus auch das Risiko für leichte wie auch für schwere Blutungen um gut die Hälfte gesenkt werden und war damit nicht mehr signifikant anders als das Blutungsrisiko in der Placebogruppe (26).

Die ***CAPTURE-Studie*** (chimeric c7E3 anti-platelet therapy in refractory unstable angina treatment) untersuchte, ob eine Vorbehandlung mit Abciximab von Patienten, die eine therapierefraktäre instabile Angina pectoris mit Veränderungen im Ruhe-EKG hatten, vor der PTCA für 17 bis 25 Stunden und 1 Stunde nach PTCA einen Vorteil gegenüber der alleinigen Behandlung mit ASS und Heparin erbringt. Auch diese Studie wurde, nachdem die Daten der ersten 1265 Patienten ausgewertet waren, aus ethischen Gründen abgebrochen, da sich ein deutlicher Vorteil der Therapie mit Abciximab zeigte. Die Gesamtrate von Tod, Myokardinfarkt und dringender Revaskularisierung konnte von 15,9 % in der Placebogruppe auf 11,3 % in der Abciximabgruppe gesenkt werden. Allerdings unterschieden sich die Häufigkeiten für kardiale Komplikationen nach 6 Monaten nicht mehr signifikant (14).

Die ***EPISTENT-Studie*** (evaluation of platelet GP IIb/IIIa inhibitor for stenting) zeigte den Nutzen von Abciximab bei Patienten, die eine PTCA mit oder ohne Stentimplantation erhielten, im Vergleich zu Patienten mit PTCA und Stentimplantation ohne Abciximab. Dafür wurden 2399 Patienten, die eine PTCA erhielten und keinen akuten Myokardinfarkt hatten, rekrutiert. Neben der Studienmedikation erhielten die Patienten ASS, Ticlopidin und Heparin (in den Gruppen mit Abciximab 70 U/kg, sonst 100 U/kg). Der primäre Endpunkt nach 30 Tagen (Tod, Myokardinfarkt und dringende Revaskularisierung) trat bei den mit Abciximab behandelten Patienten hochsignifikant seltener auf (nur Stent: 10,8 % / Abciximab + PTCA: 6,9 % / Abciximab + Stent: 5,3 %). Ein ähnliches Bild zeigte sich auch noch nach 6 Monaten. Interessanterweise waren schwere Blutungskomplikationen in Gruppen mit Abciximab deutlich seltener als in der Gruppe ohne (nur Stent: 2,2 % / Abciximab + PTCA: 1,4 % / Abciximab + Stent: 1,5 %) (27).

1.4.3.2 Tirofiban

Tirofiban (Aggrastat®) ist – wie aus ABBILDUNG 9 erkennbar – ein Derivat der Aminosäure Tyrosin mit einem Molekulargewicht von 495 und bindet spezifisch und reversibel an die RGD-Sequenz des Fibrinogenrezeptors. Es zeichnet sich außerdem durch eine kurze Halbwertszeit von etwa 1,5 Stunden aus. Kreuzreaktionen mit anderen Oberflächenproteinen oder eine Antikörperbildung wie bei Abciximab sind nicht beschrieben (55,58,63,65).

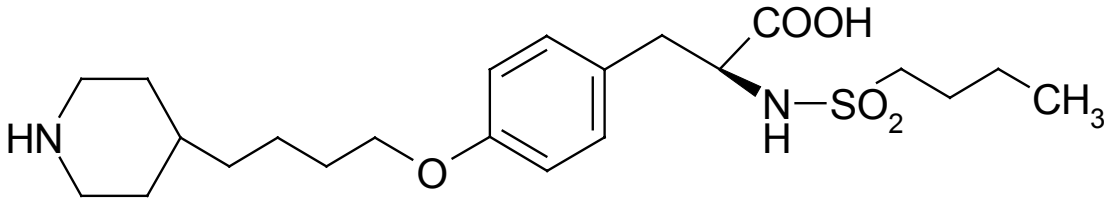


ABBILDUNG 9: Tirofiban (Aggrastat®)

Die ***PRISM-Studie*** (platelet receptor inhibition for ischemic syndrome management) untersuchte 3232 Patienten mit instabiler Angina pectoris. In der doppelt geblindeten Studie erhielten alle Patienten ASS, Heparin und für 48 Stunden entweder Tirofiban oder ein Placebo. Der primäre Endpunkt (Tod, Myokardinfarkt, anhaltende Ischämie) trat in der Tirofibangruppe signifikant seltener auf (3,8 %, Placebo: 5,6 %). Allerdings zeigte sich nach 7 Tagen nicht mehr dieser deutliche Unterschied. Die Mortalität nach 30 Tagen war unter Tirofiban deutlich niedriger (2,3 %, Placebo: 3,6 %) (74).

In die ***PRISM-PLUS-Studie*** (platelet receptor inhibition for ischemic syndrome management – patients limited by unstable signs and symptoms) wurden 1912 Patienten mit instabiler Angina pectoris und Ischämiezeichen im EKG aufgenommen. Die Medikation war der in der PRISM-Studie vergleichbar, nachdem der Behandlungsarm mit Tirofiban ohne Heparin wegen einer hohen Mortalität nach 7 Tagen gestoppt wurde. Tirofiban wurde durchschnittlich für etwa 72 Stunden und – falls eine PTCA erforderlich wurde – während und nach der Intervention verabreicht. Im Gegensatz zur PRISM-Studie wurde der primäre Endpunkt nach 7 Tagen unter Tirofiban und Heparin signifikant seltener erreicht (12,9 %, Placebo: 17,9 %). Auch noch nach 30 Tagen und 6 Monaten zeigte sich dieser deutliche Unterschied (75).

Die ***RESTORE-Studie*** war eine doppelt geblindete Untersuchung, in der Patienten mit instabiler Angina pectoris, die eine PTCA erhielten, für 36 h mit Tirofiban oder einem Placebo behandelt wurden. Beim primären Endpunkt (Tod, Myokardinfarkt und komplette Revaskularisierung) nach 7 Tagen zeigte sich ein signifikanter Vorteil von Tirofiban (7,6 %, Placebo: 10,4 %). Dieser war zwar auch noch nach 30 d erkennbar, eine Signifikanz ließ sich allerdings nur noch in Untergruppen errechnen (78).

1.4.3.3 Eptifibatide

Das dritte in dieser Dissertation untersuchte Medikament Eptifibatide (Integrilin®) ist ein selektiver Antagonist der KGD-Sequenz des Fibrinogenrezeptors. Es besitzt ein Molekulargewicht von 832 und wurde zum Schutz vor enzymatischem Abbau als zyklisches Peptits entwickelt. Die Halbwertszeit wird mit 1 bis 1,5 Stunden angegeben. Kreuzreaktionen mit anderen Oberflächenproteinen oder eine Antikörperbildung wie bei Abciximab sind nicht beschrieben (44,58,63,65).

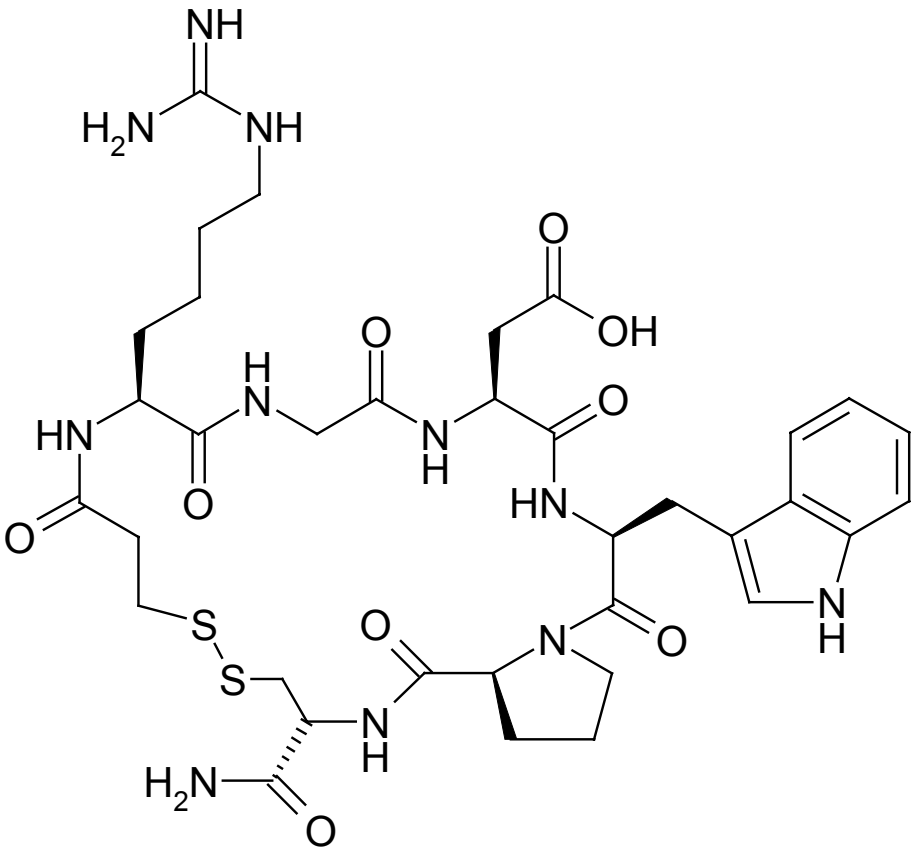


ABBILDUNG 10: Eptifibatide (Integrilin®)

In der ***IMPACT-II-Studie*** (Integrelin to minimize platelet aggregation and to prevent coronary thrombosis) wurden doppelt geblindet an 4010 Patienten, die eine PTCA erhielten, zwei unterschiedliche Dosierungen von Eptifibatide (0,5 beziehungsweise 0,75 µg/kg/min. nach Bolus für 20 bis 24 Stunden) gegen ein Placebo getestet. Es zeigte sich aber nur unter der niedrigen Dosierung ein signifikanter Unterschied in Bezug auf akute Ischämien nach 30 Tagen im Vergleich zur Placebogruppe (48).

Wegen des Mißerfolges der IMPACT-II-Studie wählte man in der ***PURSUIT-Studie*** (platelet GP IIb/IIIa in unstable angina receptor suppression using Integrilin therapy) eine deutlich höhere Dosierung (2 µg/kg/min. nach Bolus). Eingeschlossen wurden 10.948 Patienten mit akutem Koronarsyndrom ohne ST-Streckenhebungen. Doppelblind erhielten sie über 72 Stunden entweder Eptifibatide oder ein Placebo. Falls eine PTCA gegen Ende der 72 Stunden erfolgte wurde die Infusion bis 96 Stunden fortgesetzt. Dieses mal zeigte sich nun eine signifikante Abnahme des primären Endpunktes (Tod oder akuter Myokardinfarkt) nach 30 Tagen in der Eptifibatidegruppe (14,2 %, Placebo: 15,7 %). Dieser Effekt ließ sich auch noch nach 6 Monaten nachweisen (76).

2. Zielsetzung

Ein wichtiger Bestandteil der Therapie der koronaren Herzkrankheit mittels Ballonangioplastie (PTCA) und Stentimplantation ist die antithrombozytäre Medikation. Neben den bisher üblicherweise eingesetzten Substanzen ASS und Ticlopidin (beziehungsweise seit einigen Jahren auch Clopidogrel) finden die hochpotenten Fibrinogenrezeptorblocker immer mehr Verwendung.

Dabei haben die Wirkstoffe Abciximab (ReoPro®), Tirofiban (Aggrastat®) und Eptifibatide (Integrilin®) in Laborversuchen wie auch in großen klinischen Studien ihre Wirksamkeit unter Beweis gestellt. Allerdings sind diese Ergebnisse weder gut miteinander vergleichbar, noch wurden die drei Substanzen bislang in einer klinischen Studie direkt am Patienten miteinander verglichen.

Das Ziel unserer prospektiven und randomisierten Studie war es daher, den Einfluß dieser Medikamente auf die Thrombozytenfunktion bei Patienten nach Implantation eines koronaren Stents zu untersuchen. Unser Interesse galt dabei nicht nur der Intensität der Thrombozytenaggregationshemmung und deren Abklingen nach Ende der Medikation. Es wurden darüber hinaus auch die Aktivierung der Thrombozyten durch diese Substanzen, die Zellinteraktionen zwischen Plättchen und weißen Blutzellen und der Einfluß auf die Monozytenfunktion untersucht.

3. Patienten und Methodik

3.1 Studienpatienten

Für diese prospektive und randomisierte Studie zum Vergleich von Abciximab, Tirofiban und Eptifibatide wurden 60 Patienten, aufgeteilt in drei Gruppen, untersucht. Eingeschlossen wurden Patienten, die wegen einer symptomatischen Erkrankung der Koronararterien eine PTCA (perkutane, transluminale, koronare Angioplastie) mit anschließender Implantation eines koronaren Stents erhielten, und keines der unter 3.1.1 aufgezählten Ausschlußkriterien aufwiesen.

Alle Patienten wurden vor Studienbeginn aufgeklärt und gaben eine Einverständniserklärung bezüglich ihrer Teilnahme ab. Die Genehmigung des Studienprotokolls durch die Ethikkommission lag vor.

Wenn sich während der Untersuchung mittels Linksherzkatheter die Indikation zur PTCA mit Stentimplantation ergab, wurden die Patienten mittels eines computergenerierten Randomisierungsschemas einen der drei Behandlungsarme, die unter 3.1.2 näher erläutert werden, zugeordnet. Die Indikation zur Stentimplantation wurde wie in der von Schömig und Mitarbeitern 1994 publizierten Arbeit gestellt (83).

Wie aus TABELLE 3 und TABELLE 4 ersichtlich, waren die Patientengruppen hinsichtlich ihrer demographischen und angiographischen Daten vergleichbar.

TABELLE 4: Demographische Daten der Patientengruppen

	Abciximab (n = 20)	*Tirofiban (n = 20)*	*Eptifibatide (n = 20)*	*p*
Alter (Jahre)	67 ± 10	64 ± 12	65 ± 12	0.77
Frauenanteil	4	3	2	0.68
Thrombozyten (10^9/l)	253 ± 89	235 ± 77	242 ± 64	0.77
Koronares Risikoprofil:				
Aktive Raucher	8	8	9	0.93
Hypercholesterinämie	15	18	15	0.40
Arterielle Hypertonie	15	16	13	0.55
Diabetes mellitus	6	4	3	0.50
Instabile Angina pectoris	7	6	8	0.80

Angaben in absoluter Patientenzahl oder Mittelwert ± Standardabweichung, falls nicht anders angegeben

TABELLE 5: Angiographische Daten der Patientengruppen

	Abciximab (n = 20)	*Tirofiban (n = 20)*	*Eptifibatide (n = 20)*	*p*
Eingeschränkte LV-Funktion	6	7	9	0.61
Mehrgefäßerkrankung	17	16	18	0.73
Läsion im Bypass	2	2	2	1.00
Komplexe Läsion	17	18	16	0.68
Chronischer Gefäßverschluß	2	3	4	0.94
Gefäßgröße (mm)	3.06 ± 0,58	3,21 ± 0,70	3,19 ± 0,56	0,69
Stenosegrad vor PTCA (%)	77,4 ± 9,8	74,2 ± 16,2	73,6 ± 15,6	0,66
Verhältnis Ballon/Gefäß	1,11 ± 0,12	1,10 ± 0,13	1,10 ± 0,12	0,62
Ballondruck (atm)	13,6 ± 2,3	13,8 ± 2,7	13,3 ± 2,5	0,85
Gestenteter Abschnitt (mm)	23,0 ± 8.1	21,3 ± 9,7	21,8 ± 6,2	0,86
Stenose nach Stent (%)	3,1 ± 11,1	4,4 ± 10,4	5,9 ± 8,8	0,69

Angaben in absoluter Patientenzahl oder Mittelwert ± Standardabweichung, falls nicht anders angegeben
Abkürzungen: LV = linker Ventrikel / atm = Atmosphäre (≈ 101 kPa)

3.1.1 Ausschlußkriterien

Folgende Kriterien führten zu einem Ausschluß von der Studie:

- Kontraindikationen für eine Therapie mit ASS, Ticlopidin, Heparin oder Fibrinogenrezeptorblockern
- länger als 24 h laufende Therapie mit Ticlopidin
- bereits begonnene Therapie mit einem Fibrinogenrezeptorblocker
- zwingende Indikation zur Antikoagulation
- akuter Myokardinfarkt
- Serumkreatinin ≥ 2,0 mg/dl
- Gerinnungs-, Thrombozytenfunktionsstörungen oder Thrombozytopenie
- schwerwiegende Systemerkrankungen

3.1.2 Dosierung der Medikamente

3.1.2.1 ASS, Ticlopidin und Heparin

Alle Patienten erhielten zweimal täglich 100 mg ASS und 250 mg Ticlopidin (beziehungsweise für die ersten 3 Dosen 500 mg Ticlopidin). Dieses Therapieschema wurde 1 bis 8 Stunden vor der Intervention begonnen und mindestens bis zum Ende der Studienteilnahme fortgeführt.

Vor der Intervention erhielten alle Patienten niedermolekulares Heparin in einer Dosierung von 70 U/kg in der Abciximabgruppe und 100 U/kg in den beiden anderen Gruppen.

3.1.2.2 Fibrinogenrezeptorantagonisten

Die Dosierung der Fibrinogenrezeptorblocker erfolgte wie in großen klinischen Studien vorbeschrieben (27,76,78).

Abciximab wurde wie in der EPISTENT-Studie beschrieben dosiert. Nach einem Bolus von 0,25 mg/kg wurden für 12 Stunden kontinuierlich 10 µg pro Minute appliziert (27).

Tirofiban wurde wie in der RESTORE-Studie beschrieben dosiert. Nach einem Bolus von 10 µg/kg wurden für 72 Stunden kontinuierlich 0,15 µg/kg pro Minute infundiert (78).

Eptifibatide wurde wie in der PURSUIT-Studie beschrieben dosiert. Nach einem Bolus von 180 µg/kg wurden für 72 Stunden kontinuierlich 2 µg/kg pro Minute verabreicht (76).

TABELLE 5 faßt die Dosierungen nochmals zusammen:

TABELLE 6: Dosierung der Fibrinogenrezeptorantagonisten

	Abciximab	*Tirofiban*	*Eptifibatide*
Bolus	250 µg/kg	10 µg/kg	180 µg/kg
Erhaltungsdosis	10 µg/min	0,15 µg/kg/min	2 µg/kg/min
Dauer der Infusion	12 h	72 h	72 h

3.2 Probengewinnung

3.2.1 Abnahme und Material

Den Patienten wurde in einem Zeitraum von 96 Stunden insgesamt siebenmal Blut abgenommen (sechsmal in der Abciximabgruppe). Die erste Abnahme (0 h) erfolgte nach der Entscheidung zur PTCA mit Stentimplantation im Rahmen der Herzkatheteruntersuchung noch vor PTCA und Beginn der Therapie mit dem Fibrinogenrezeptorantagonisten.

Das Blut wurde nach dem in TABELLE 6 angegeben Schema aus einer mäßig gestauten Oberarmvene durch Punktion mit einer 19 Gauche-Kanüle (Sarstedt AG&Co., Deutschland) entnommen. Die ersten 2 ml Blut wurden verworfen.

Im folgenden werden die einzelnen Entnahmen mit Verwendung näher vorgestellt:

- *2,7 ml Kalium-EDTA* (1,6 mg/ml) s-Monovette® (Sarstedt AG&Co., Deutschland) für Cellcounter
- *3 ml Natrium-Citrat* (3,8 %) s-Monovette® (Sarstedt AG&Co., Deutschland) für RPFA (Rapid Platelet-Function Assay)
- *10 ml Natrium-Citrat* (3,8 %) s-Monovette® (Sarstedt AG&Co., Deutschland) für Chronolog Aggregometer und FACS
- *7,5 ml Serum-Gel* s-Monovette® (Sarstedt AG&Co., Deutschland) für Gewinnung von Serum, das für spätere Untersuchungen tiefgefroren wurde

TABELLE 7: Blutentnahmeschema

Zeitpunkt	*Abnahme*
0 h	2,7 ml EDTA 10 ml Citrat 3 ml Citrat 7,5 ml Serum 0,5 ml Cyfix
2 h	2,7 ml EDTA 10 ml Citrat 3 ml Citrat 0,5 ml Cyfix
24 h	2,7 ml EDTA 10 ml Citrat 3 ml Citrat 7,5 ml Serum 0,5 ml Cyfix
48 h	2,7 ml EDTA 10 ml Citrat 3 ml Citrat 7,5 ml Serum
72 h	2,7 ml EDTA 10 ml Citrat 3 ml Citrat
74 h nicht bei Abciximab	2,7 ml EDTA 10 ml Citrat 3 ml Citrat
96 h	2,7 ml EDTA 10 ml Citrat 3 ml Citrat 7,5 ml Serum 0,5 ml Cyfix

EDTA=Ethylen-Diamin-Tetra-Acetat

- 2 ml-Spritze (B.Braun, Melsungen, Deutschland) zur Blutentnahme für Cyfix-Konservierung, wie unter 3.2.2 näher erläutert

Für die Eptifibatidegruppe wurden statt Citratröhrchen selbstgefertigte 10 ml-Abnahmeröhrchen mit 1 ml rekombinantem Hirudin (= Desirudin, Revasc®, Rhône-Poulenc Rorer S.A., Frankreich) in einer Konzentration von 0,5 mg/ml verwendet. Die Gründe hierfür werden unter 3.2.3 näher erläutert.

3.2.2 Cyfix-Konservierung

Wie sich in vorangegangenen Forschungsarbeiten gezeigt hatte, eignet sich eine Metacrolein enthaltende Lösung, um Thrombozyten und insbesondere Interaktionen von Thrombozyten mit anderen Zellen für Messungen mit einem Durchflußzytometer zu konservieren (39,67). Die verwendete Fixierlösung war Cyfix II (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Andreas Ruf, Karlsruhe, Deutschland).

Zur Fixierung wurden 0,5 ml Blut mit einer Spritze (B.Braun, Melsungen, Deutschland) entnommen, sofort in ein steriles 50 ml-Plastikgefäß (BD Falcon™, Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland) mit 1 ml Cyfix II gegeben und für exakt 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 48,5 ml kühles PBS (phosphate buffered saline, Sigma, Deisenhofen, Deutschland) dazugegeben, um die Reaktion zu stoppen. Die fixierte Blutprobe wurde bis zur Weiterverarbeitung kühl und vor Licht geschützt gelagert.

3.2.3 Antikoagulation mit Hirudin

Wie bereits in Kapitel 1.2.4 dargestellt spielen Kalziumionen bei den Interaktionen von GP IIb/IIIa mit Liganden eine wichtige Rolle (23,41,73). Zur Messung der Wirkung von Fibrinogenrezeptorantagonisten wird meist mit Citrat antikoaguliertes Blut eingesetzt. Citrat jedoch reduziert den Gehalt an Kalziumionen im Blut deutlich (72). Es stellte sich daher die Frage, ob Citrat zu Meßfehlern bei der Bestimmung der Wirkstärke dieser Medikamente führt.

Tatsächlich konnte in mehreren Arbeiten gezeigt werden, daß bei einigen Fibrinogenrezeptorantagonisten ein signifikanter Unterschied bei Messungen zwischen mit Citrat antikoaguliertem Blut und Blut, das mit Stoffen ohne Einfluß auf den Kalziumspiegel wie PPACK oder Hirudin antikoaguliert wurde, besteht. Während bei Abciximab und Tirofiban keine oder nur sehr geringe Unterschiede gefunden werden konnten, zeigte sich bei Eptifibatide eine signifikante Wirkverstärkung um etwa den Faktor 4 in mit Citrat antikoaguliertem Blut (59,72,89).

Im Rahmen dieser Dissertation wurde daher für die RPFA-, Aggregometer- und einen Teil der Durchflußzytometermessungen in der Eptifibatidegruppe mit rekombinantem Hirudin (= Desirudin, Revasc®, Rhône-Poulenc Rorer S.A., Frankreich) antikoaguliertes Blut verwendet. Dazu wurden 9 ml Blut in ein Plastikgefäß (BD Falcon™, Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland) mit 1 ml Hirudinlösung in einer Konzentration von 0,5 mg/ml gegeben.

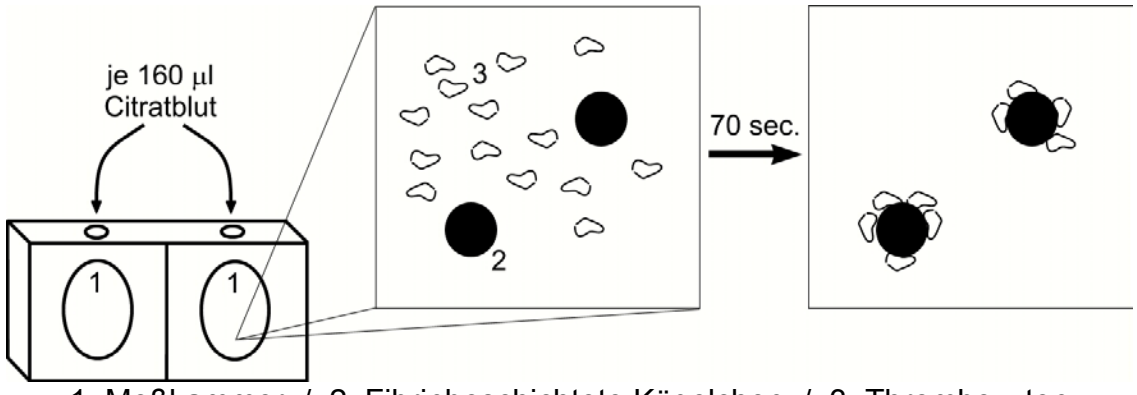
Zuvor wurde nachgewiesen, daß es zwischen mit Hirudin beziehungsweise Citrat versetzten Blutproben von Patienten unter Abciximab- oder Tirofibantherapie keine signifikanten Unterschiede bei den Messungen gab (siehe 3.6).

3.3 Rapid Platelet-Function Assay

3.3.1 Funktionsprinzip des RPFA

Der Rapid Platelet-Function Assay (RPFA) basiert auf einer 1997 von Barry Coller entwickelten Methode, die Aggregationsfähigkeit von Thrombozyten zu testen, und wurde 1998 von der Firma Accumetrics (San Diego, USA) als computergesteuertes Meßgerät auf den Markt gebracht. Das Gerät arbeitet mit Testpatronen, die bereits alle benötigten Reagenzien enthalten. In mehreren Studien konnte gezeigt werden, daß die Ergebnisse des RPFA mit denen der konventionellen Aggregometrie eng korrelieren (17,18,85).

Der RPFA besteht aus einem Laptopcomputer, an dem ein Photometer angeschlossen ist. Die Testpatronen setzt sich aus zwei Testkammern zusammen, die jeweils mit Fibrin beschichtete Kügelchen, eine Metallkugel zum Mischen und als Aktivator Thrombin-Rezeptor-Aktivierendes-Peptid (TRAP – 4 µmol/l [iso-S]FLLRN) enthalten. Nach einer Aufwärmphase wird in beide Testkammern mit Citrat antikoaguliertes Blut gegeben und der Test gestartet. Während die durch einen Magneten bewegte Metallkugel das Blut durchmischt, binden die aktivierten Plättchen an die mit Fibrin beschichteten Kügelchen. Die dadurch veränderte sich Lichtdurchlässigkeit des Blutes wird über 70 Sekunden registriert. Der Meßwert wird vom Computer zu einem vor Therapiebeginn bestimmten Basalwert (= 100 % Aggregation) in Relation gesetzt und in „% der initialen Aggregationsfähigkeit“ und in „% der initialen Aggregationsgeschwindigkeit (= Slope)“ angegeben. Unter Therapie mit Fibrinrogenrezeptorantagonisten verringert sich die Fähigkeit der Thrombozyten, an die Kügelchen zu binden. Demzufolge wird der Prozentwert kleiner. ABBILDUNG 10 stellt das Funktionsprinzip nochmals graphisch dar (18,85).



1. Meßkammer / 2. Fibrinbeschichtete Kügelchen / 3. Thrombozyten

ABBILDUNG 11: Funktionsprinzip des RPFA

3.3.2 Messung der Aggregation

Für diese Messung wurden 3 ml Blut, die in eine s-Monovette® (Sarstedt AG&Co., Deutschland) mit 3,8 % Natrium-Citrat abgenommen wurden, verwendet. Für die Messungen in der Eptifibatidegruppe wurde mit Hirudin antikoaguliertes Blut benutzt.

Bevor bei einem Patienten mit der Studientherapie begonnen wurde, mußte erst der Basalwert (= 100 %) bestimmt werden. Dazu wurde am noch unbehandelten Blut zweimal die unten beschriebene Messung durchgeführt und das Ergebnis, falls die Differenz zwischen den zwei Messungen kleiner 10 % war, als 100 %-Wert definiert. Andernfalls mußte der Basalwertes erneut ermittelt werden.

Nach Einschalten des Meßgerätes dauerte es einige Minuten, bis sich das Photometer auf 37° C erwärmt hatte. Dann wurden die Blutproben für 15 Minuten in einer ins Photometer eingelassenen Halterung vorgewärmt. Die Testpatronen, die sonst vor Licht geschützt bei 4° C gelagert wurden, hatten sich auch erst auf Raumtemperatur zu erwärmen und durften dann bis maximal acht Stunden verwendet werden.

Zu Beginn der Messung wurden in die Metallfolie, die den Zugang zu den Meßkammern versiegelte, zwei Löcher mit einer Pipettenspitze gestochen. Dann wurde die Testpatrone in das Photometer eingelegt und das Testprogramm gestartet. Erst wurden die Meßkammern für etwa 60 Sekunden auf 37° C erwärmt und anschließend mittels einer geeichten Pipette mit je 160 µl des Testblutes befüllt. Dieser Vorgang durfte maximal 20 Sekunden dauern. Anschließend zeichnete das Gerät für 70 Sekunden die Lichtdurchlässigkeit auf und gab anschließend einen Meßwert an, falls der Unterschied zwischen den beiden Meßkammern kleiner als 15 % war. Andernfalls wurde eine Fehlermeldung angezeigt. Der Meßwert wurde in „% des Basalwertes“ angegeben (gleichbedeutend mit „% der initialen Aggregationsfähigkeit“ beziehungsweise „% der initialen Aggregationsgeschwindigkeit (= Slope)“).

3.4 Aggregometer

3.4.1 Funktionsprinzip eines Aggregometers

Für die photometrischen Aggregationsmessungen wurde ein zweikanalfähiges Chronolog Aggregometer der Firma Nobis (Endingen, Deutschland) verwendet. Wie beim RPFA kam auch hier mit Citrat beziehungsweise Hirudin antikoaguliertes Blut zum Einsatz.

Die photometrische Aggregometrie beruht auf dem Prinzip, daß plättchenreiches Plasma (PRP = Platelet Rich Plasma) mit vielen frei im Plasma schwimmenden Thrombozyten trüb ist. Wird jedoch die Aggregation der Plättchen ausgelöst, verbessert sich die Lichtdurchlässigkeit des Plasmas deutlich, da nun im klaren Plasma nur noch einzelne Thrombozytenklumpen schwimmen. Diese Veränderung des Trübheitsgrades wird vom Photometer gemessen und auf einem Schreiber in Form einer Kurve dargestellt (12).

Weil das Meßgerät die Trübung des Plasmas mißt, wird dieses Verfahren auch Turbidimetrie genannt (turbid [englisch] = trüb).

Darüber hinaus ist das Chronolog Aggregometer in der Lage, die ATP-Freisetzung aus Thrombozyten zu ermitteln. Es mißt dazu mit dem zweiten Kanal des Photometers die Farbveränderung eines zugegebenen Farbstoffes (Luziferin/Luziferase-Extrakt), der mit ATP reagiert und dabei sein Farbverhalten ändert.

3.4.2 Probenaufbereitung

Zur Herstellung des PRP wurde das abgenommene Citrat- beziehungsweise Hirudinblut über 10 Minuten bei 1000 U/min. zentrifugiert. Anschließend wurde der trübe Überstand (= PRP) abpipetiert.

Plättchenarmes Plasma (PPP = Platelet Poor Plasma) wurde gewonnen, indem PRP für 3 Minuten bei 13.000 U/min. zentrifugiert und der klare Überstand abpipetiert wurde.

3.4.3 Messung der Aggregation

Zuerst wurden 500 µl PPP in eine Testküvette (Nobis, Endingen, Deutschland) gegeben. Es diente als Referenz bei der Aggregationsmessung (= maximal mögliche Aggregation).

Anschließend wurden 445 µl PRP in eine Testküvette mit einem Rührstäbchen und 50 µl Chrono-Lume-Reagenz (Luziferin/Luziferase-Extrakt – alle drei von Nobis, Endingen, Deutschland) gegeben. Beide Testküvetten wurden zum Aufwärmen auf 37° C für mindestens 10 Minuten in das Wärmfach des Aggregometers gestellt.

Das Gerät war folgendermaßen eingestellt: Meßtemperatur 37° C, Rührstäbchen bei 1000 U/min., Verstärkung für Aggregation am Schreiber 0,1 V, Verstärkung für ATP-Freisetzung am Schreiber 0,2 V, Papiervorschub 2 cm/min.

Zur Messung wurden beide Testküvetten in den dafür vorgesehenen Meßkanal gestellt, der Schreiber gestartet und eine Eichzacke aufgezeichnet, welche der maximal möglichen Aggregation entsprach.

Wenn die Kurve für mindestens zwei Minuten horizontal verlief, wurde mit der Stimulation begonnen. Andernfalls wurde die Probe verworfen, da die Aggregation möglicherweise schon begonnen hatte (zum Beispiel durch Verunreinigungen et cetera).

Stimuliert wurde mit je 5 µl 2 mM ADP- oder 5 mM TRAP-Lösung (beide von Sigma, Deisenhofen, Deutschland). Die Aminosäuresequenz des TRAP von Sigma lautet: SFLLRNPNDKYEPF.

Die Aggregation wurde über fünf Minuten aufgezeichnet. Dann wurde als Referenz für die ATP-Freisetzung 5 µl ATP-Standard (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) zugegeben, was einer Menge von 2 nmol ATP entspricht.

Zum Pipettieren wurden Eppendorf-Pipetten (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) geeigneter Größe verwendet.

3.4.4 Auswertung der Aggregationskurven

Anhand der Meßkurven wurde die *maximale Aggregations-geschwindigkeit (Slope)* berechnet. Dazu wurde an der steilsten Stelle der Aggregationskurve die Steigung bestimmt (siehe auch ABBILDUNG 12).

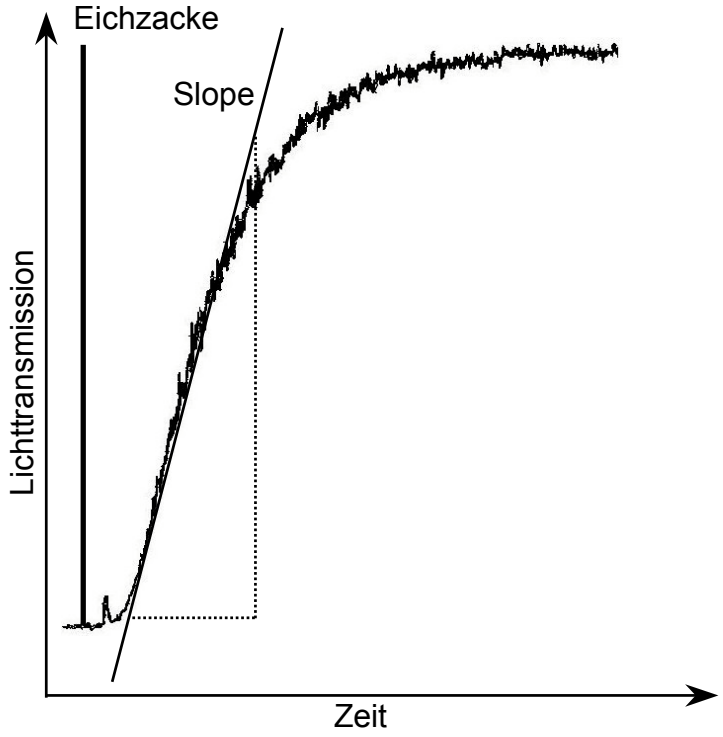


ABBILDUNG 12: Auswertung der Aggregometerkurven

Nach Abschluß aller Messungen eines Patienten wurden alle Meßwerte in „% des Wertes zum Zeitpunkt 0 h“ umgerechnet. Der Zeitpunkt „0 h“ war dabei als 100 % definiert.

3.5 Durchflußzytometer

3.5.1 Funktionsprinzip eines Durchflußzytometers

Für die Messung von Oberflächenproteinen und Zellinteraktionen wurde ein mit einem Argonlaser (488 nm / 0,5 W) ausgestattetes Durchflußzytometer vom Typ „FACScan“ (Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland) verwendet. Gemessen wurde mit Citrat- beziehungsweise Hirudinblut zur Bestimmung von Thrombozytenoberflächenproteinen und mit Blut, das mit Cyfix konserviert worden war, zur Bestimmung von Zellinteraktionen und Leukozytenoberflächenproteinen.

In zahlreichen Studien konnte gezeigt werden, daß die Durchflußzytometrie geeignet ist, um reproduzierbare Aussagen über die Thrombozyten- und Leukozytenfunktion in vivo machen zu können (2,5,29,43,57,80).

Das Durchflußzytometer ermöglicht es dem Untersucher, verschiedene Aussagen über die untersuchten Zellen zu machen. Zum einen erhält er Informationen über Größe und Granularität, zum anderen bekommt er – nach geeigneter Färbung der Zellen – auch Daten über das Fluoreszenzverhalten der Zellen. Um dies zu ermöglichen, werden die Zellen vor der Messung mit spezifischen monoklonalen Antikörpern (mAK) gegen Oberflächenproteine der Zellen markiert. An diese Antikörper ist ein Fluoreszenzfarbstoff gebunden. Eine Auswahl von solchen Antikörpern mit Farbstoffen ist in TABELLE 10 zu finden.

Die inkubierten Zellen werden in einer Trägerlösung verdünnt vom Durchflußzytometer angesaugt und passieren in einem Kapillarröhrchen den Analysepunkt, damit die Zellen möglichst einzeln gemessen werden können. An diesem Analysepunkt kreuzt ein Laserstrahl den Zellstrom. Anhand des dabei entstehenden Streulichtes können nun Aussagen über die Zellmorphologie gemacht werden. Hauptsächlich wird das Licht in Verlaufsrichtung des Lasers gestreut. Dieses Vorwärtsstreulicht (FSC = Forward Light Scatter) gibt vor allem Auskunft über die Zellgröße – je größer die Zelle, desto mehr Licht wird gestreut. Licht, das in einem rechten Winkel vom Laserstrahl aus gestreut wird, wird als Rechtwinkelstreulicht bezeichnet (SSC = Side Light Scatter). Es gibt vor allem Informationen über die Granularität der Zelle – je mehr Granula desto mehr Streuung.

Des weiteren kann das Durchflußzytometer die Fluoreszenz der Zellen messen. Das für diese Studie verwendete Gerät konnte bis zu drei verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe gleichzeitig registrieren.

Um die Meßergebnisse auswerten zu können, ist das Durchflußzytometer mit einem Computer verbunden. Für diese Studie wurde dabei die Auswertungssoftware „FACScan“ des Herstellers verwendet.

3.5.2 Verwendete Antikörper

TABELLE 10 gibt einen Überblick über die verwendeten Antikörper, ihre Bindungsstellen an der Zelloberfläche und ihre Färbungen.

TABELLE 10: Verwendete Antikörper

Antikörper	*Oberflächenprotein*	*Färbung*
CD11b	α_M-Kette des MAC-1 auf Leukozyten (Rezeptor für Leukozytenadhäsion)	FITC
CD14	Protein auf Monozyten, Makrophagen und polymorphonukläre Leukozyten (Funktion noch nicht vollständig geklärt, unter anderem Rezeptor für Endotoxine)	PC5
CD42b	GP Ibα-Untereinheit des GP Ib-IX-V (von-Willebrand-Faktor Rezeptor)	PE
CD61	GP IIIa-Untereinheit des Fibrinogenrezeptors (unabhängig vom Aktivierungszustand)	FITC
CD62P	P-Selektin	FITC
PAC-1	Bindungsstelle für Fibrinogen auf aktivierter GP IIIa-Untereinheit des Fibrinogenrezeptors	FITC

Färbungen: FITC = Fluorescein Isothiocyanat
PC5 = Phycoerythrin mit kovalent gebundenem Cyanin 5
PE = Phycoerythrin

Die Antikörper CD11b, CD14, CD42b und CD61 stammen von Immunotech (Marseille, Frankreich), CD62P von Dianova (Hamburg, Deutschland) und PAC-1 von Becton-Dickinson Immunocytometry Systems (San Jose, USA).

3.5.3 Probenaufbereitung

3.5.3.1 Zweifachfärbung

Zur Messung von Oberflächenproteinen auf Thrombozyten wurden die Zellen im Vollblut (mit Citrat beziehungsweise Hirudin antikoaguliert) im Überschuß mit Antikörpern inkubiert. Dazu wurden zuerst die Antikörper mit einer feinen Pipette in spezielle FACs-Röhrchen (Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland) für das Durchflußzytometer (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) gegeben. Bei den stimulierten Proben wurden 5 µl 0,5 mM TRAP (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) hinzugegeben. Zur besseren Durchmischung wurde in jedes Röhrchen noch phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS = phosphate buffered saline) ad 45 µl gegeben. Das genaue Pipettierschema ist in TABELLE 11 dargestellt:

TABELLE 11: Zweifachfärbungen

	unstimuliert	*stimuliert*
CD61	5 µl CD42b-PE 5 µl CD61- FITC 35 µl PBS	5 µl CD42b-PE 5 µl CD61-FITC 30 µl PBS 5 µl TRAP (0,5 mM)
CD62P	5 µl CD42b-PE 5 µl CD62P- FITC 35 µl PBS	nicht durchgeführt
PAC-1	5 µl CD42b-PE 5 µl PAC1- FITC 35 µl PBS	5 µl CD42b-PE 5 µl PAC1- FITC 30 µl PBS 5 µl TRAP (0,5 mM)

Färbungen: FITC = Fluorescein Isothiocyanat
PE = Phycoerythrin

Nach Fertigstellung dieser Lösungen wurden in jedes Röhrchen 5 µl Vollblut gegeben und anschließend für 30 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dieser Zeit wurde die Inkubation durch Zugabe von 300 µl Para-Formaldehyd (PFA, 0,5% / Sigma, Deisenhofen, Deutschland) gestoppt. Bis zur Messung wurden die Proben vor Licht geschützt im Kühlschrank bei konstant 4° C gelagert.

3.5.3.2 Dreifachfärbung

Für die Messung von Oberflächenproteinen von Leukozyten und Zellinteraktionen zwischen Thrombozyten und Monozyten wurde mit Cyfix konserviertes Blut verwendet (siehe 3.2.2).

Zuerst wurde das 50 ml-Plastikgefäß (BD Falcon™, Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland) mit der Blutprobe für 10 Minuten bei 1600 U/min. zentrifugiert. Der flüssige Überstand über dem Pellet (Bodensatz aus Zellen) wurde abgesaugt. Anschließend wurden 40 µl des Pellets in ein FACs-Röhrchen (Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland) mit je 5 µl CD11b-FITC, CD14-PC5 und CD42b-PE gegeben und für 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert.

Während dieser Zeit wurden 625 µl einer Reagenz zur Lyse von Erythrozyten (Coulter Clone® Immuno-Lyse, Coulter, Miami, USA) in 15 ml PBS verdünnt und im Wasserbad auf 37° C erwärmt.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden 500 µl des verdünnten Lyse-Reagenz zugegeben und das FACs-Röhrchen kurz geschwenkt. Nach exakt 70 sec. wurde die Lyse mittels 125 µl einer Fixierlösung gestoppt (Coulter Clone® Fixative, Coulter, Miami, USA).

Anschließend wurden zum Auswaschen 3 ml PBS hinzupipettiert und das Röhrchen bei 1600 U/min. für 10 Minuten zentrifugiert. Erneut wurde der Überstand abgesaugt und die Zellen mit 200 µl PFA 1 % (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) fixiert. Bis zur Messung wurden die Proben vor Licht geschützt bei 4° C im Kühlschrank gelagert.

3.5.4 Durchflußzytometrische Messung

3.5.4.1 Thrombozyten

Das Durchflußzytometer registriert Zellen und andere Partikel, die den Meßpunkt passieren. Um selektiv eine spezielle Zellgruppe (zum Beispiel Thrombozyten) zu messen, muß diese erst in der Software ausgewählt werden. Plättchen lassen sich dabei gut in einer Zweiparameterdarstellung – auch Dot Plot genannt – auswählen, in der FSC gegen SSC oder besser noch gegen einen thrombozyten-spezifischen Antikörper wie CD42b aufgetragen ist. Die Thrombozyten ordnen sich dabei in einer typischen Wolke an, um die ein Auswahlrahmen gelegt werden kann (siehe ABBILDUNG 13).

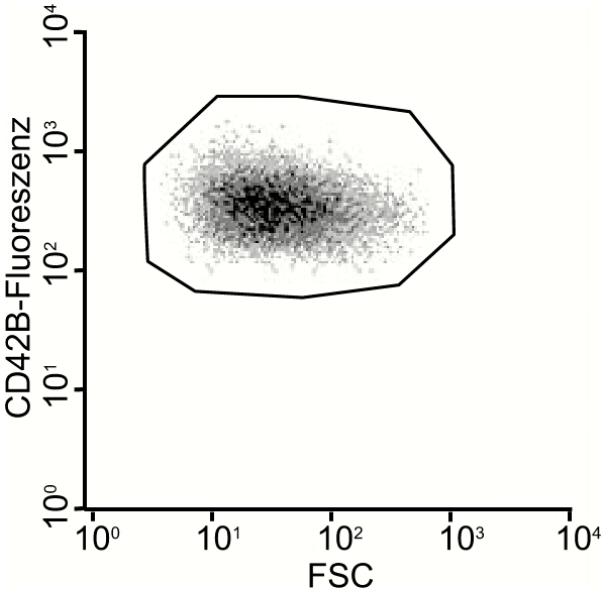


ABBILDUNG 13: FSC-CD42b-Dot Plot

Für die Ergebnisse bei den Zweifachfärbungen wurden jeweils 50.000 events (einzelne Zellsignale) gemessen.

Da bei der Färbung der Zellen die Antikörper im Überschuß zugegeben wurden, korreliert die gemessene Immunfluoreszenz mit der Expression der markierten Oberflächenproteine. Daher genügte es für die Messungen mit CD61 und PAC-1, die Gesamtfluoreszenz in der Thrombozytengruppe zu messen.

Bei der Bestimmung der CD62P-Fluoreszenz galt neben der Gesamtfluoreszenz ein besonderes Interesse dem Anteil der CD62P-positiven Plättchen. Um diese messen zu können, wurde eine Einparameter-Darstellung für CD62P – auch Histiogramm genannt – verwendet. Dabei werden alle Meßwerte sortiert nach Stärke des Signals angeordnet. Die Grenze zwischen positiven und negativen Zellen zieht man dabei am Scheitel zwischen den meist in Form einer Normalverteilung vorliegenden Gruppen der CD62P-negativen und -positiven Zellen. ABBILDUNG 14 verdeutlicht diesen Vorgang.

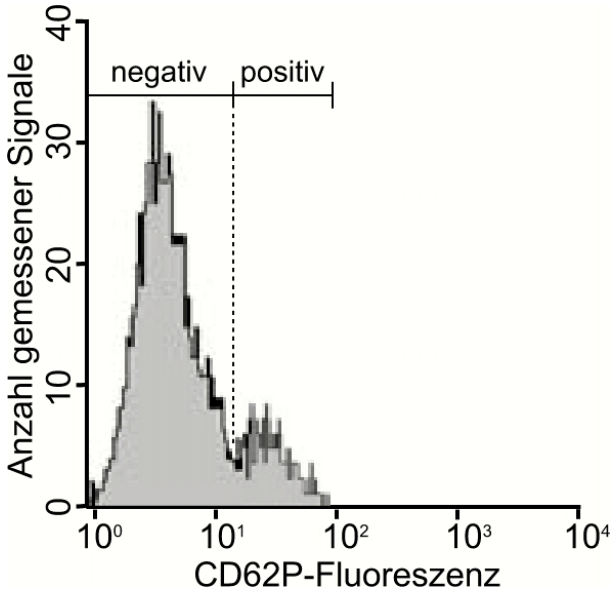


ABBILDUNG 14: CD62P-Histiogramm

3.5.4.2 Thrombozyten-Monozyten-Interaktionen

Zur Identifizierung der Monozyten wurde abermals eine Zweiparameterdarstellung verwendet. Dabei wurden diese Zellen als CD11b-positive (= Leukozyten) und deutlich CD14-positive Zellen definiert und mit einem Auswahlrahmen versehen. ABBILDUNG 15 zeigt nochmals die Zellpopulationen.

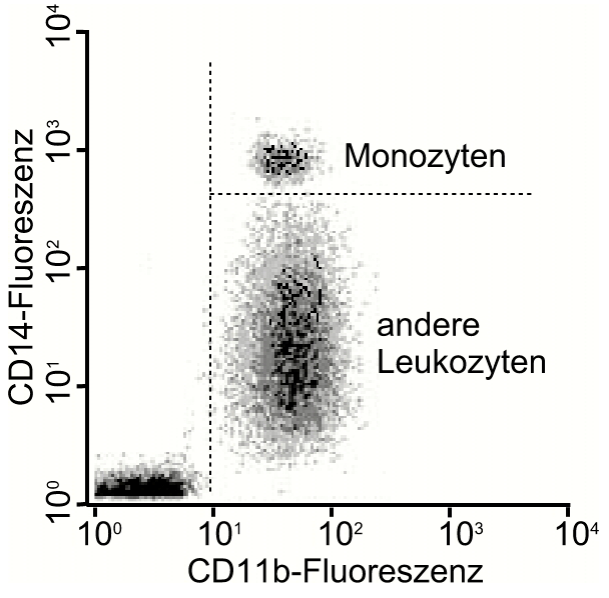


ABBILDUNG 15: CD11b-CD14-Dot Plot

Wie unter 3.5.4.1 bereits für CD62P beschrieben, wurden in der Monozytengruppe die CD42b-positiven Zellen (= Monozyten, an die Plättchen gebunden haben) identifiziert und ebenfalls mit einem Auswahlrahmen versehen.

Nun wurde sowohl für alle Monozyten wie auch für die CD42b-positiven die CD11b- und die CD42b-Fluoreszenz gemessen.

3.6 Vergleich von Hirudin- und Citrat-Proben

Zum Nachweis, daß bei Messung von Patienten, die Abciximab oder Tirofiban erhielten, keine Unterschiede zwischen mit Citrat und Hirudin antikoaguliertem Blut auftraten, wurden bei je drei Patienten aus jeder Gruppe alle Messungen sowohl mit Citrat- als auch mit Hirudinblut durchgeführt. Dabei zeigten sich - wie aus TABELLE 7 und 8 ersichtlich - zwischen den Blutproben nur geringe, nicht signifikante Differenzen, die durch Varianzen bei der Probenaufbereitung und Messung leicht erklärt werden können.

Da das Aufführen aller Vergleiche den Umfang dieser Arbeit sprengen würde, soll für die Aggregometermessungen beispielhaft der Verlauf des Slope unter einer Stimulation mit 20 µmol/l ADP und für die Messungen mit dem Durchflußzytometer der Verlauf des PAC-1 unter einer Stimulation mit 50 µmol TRAP/l dargestellt werden.

TABELLE 8: Vergleich des Slopes von Citrat- und Hirudinproben

	Abciximab Citrat	*Abciximab Hirudin*	*p*		*Tirofiban Citrat*	*Tirofiban Hirudin*	*p*
0 h	7,6 ± 1,2	6,4 ± 3,9	0,66	0 h	5,3 ± 1,3	5,9 ± 2,3	0,70
2 h	3,6 ± 0,9	3,8 ± 1,1	0,82	2 h	3,9 ± 3,7	2,1 ± 1,6	0,47
24 h	5,2 ± 1,6	5,5 ± 0,8	0,78	24 h	2,3 ± 1,5	3,1 ± 1,7	0,59
48 h	5,8 ± 1,1	5,6 ± 0,3	0,74	48 h	4,6 ± 2,9	2,0 ± 0,9	0,21
72 h	6,2 ± 0,6	5,6 ± 0,9	0,77	72 h	1,6 ± 0,5	2,1 ± 1,2	0,47
74 h	-	-	-	74 h	3,1 ± 1,1	3,4 ± 1,0	0,73
96 h	6,8 ± 0,5	6,9 ± 1,5	0,89	96 h	6,1 ± 3,7	5,6 ± 2,4	0,87

Angaben in Mittelwert ± Standardabweichung

TABELLE 9: Vergleich des PAC-1 von Citrat- und Hirudinproben

	Abciximab Citrat	*Abciximab Hirudin*	*p*		*Tirofiban Citrat*	*Tirofiban Hirudin*	*p*
0 h	277 ± 68	294 ± 75	0,79	0 h	372 ± 50	377 ± 53	0,90
2 h	158 ± 68	156 ± 49	0,97	2 h	247 ± 61	274 ± 66	0,64
24 h	162 ± 43	147 ± 38	0,68	24 h	178 ± 38	185 ± 23	0,78
48 h	198 ± 36	185 ± 33	0,68	48 h	224 ± 39	236 ± 33	0,71
72 h	208 ± 46	188 ± 50	0,64	72 h	200 ± 19	206 ± 18	0,74
74 h	-	-	-	74 h	205 ± 77	203 ± 45	0,97
96 h	225 ± 71	212 ± 63	0,82	96 h	355 ± 22	329 ± 26	0,26

Angaben in Mittelwert ± Standardabweichung

3.7 Cell Counter

Zur Bestimmung der Thrombozytenzahl der Studienpatienten wurde ein Cell Counter des Typs „Coulter Counter“ (Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland) benutzt. Für die Messungen wurde mit EDTA antikoaguliertes Blut verwendet.

Die Untersuchungen wurden vom Labor des Institutes für Laboratoriumsmedizin im Deutschen Herzzentrum München durchgeführt. Die Bestimmung der Thrombozytenzahl erfolgte bei jeder Blutentnahme im Rahmen dieser Dissertation.

3.8 Statistik

Die statistischen Auswertungen wurden mit der Software „SPSS 10.0 for Windows“ durchgeführt.

Als primärer Endpunkt wurde die Hemmung der Aggregation nach 2 Stunden Infusionsdauer definiert. Abciximab wurde als Referenzmedikament betrachtet, da es zum Zeitpunkt des Studienstartes der einzige Fibrinogenrezeptorblocker war, bei dem die klinische Wirksamkeit bei Patienten mit koronarer Stentimplantation nachgewiesen war (27).

Wir planten eine Teststärke von 80 % um einen Unterschied von 10 % in der Plättchenaggregation zwischen Abciximab und einem der beiden anderen Wirkstoffe bei einem Signifikanzniveau (P-Wert) < 0,05 festzustellen. Nach den Erfahrungen aus früheren Studien nahmen wir eine Standardabweichung von 10 % bei den Messungen der Plättchenaggregation an (39). Aus diesen Werten ergab sich eine Testgruppengröße von 20 Patienten je Gruppe.

Diskrete Variablen (Zahlen) wurden mit dem *Fisher Exact Test* geprüft. Fortlaufende Variablen wurden als Mittelwert ± Standardabweichung angegeben. Sie wurden mittels *Varianzanalyse* und gegebenenfalls mittels *Scheffé Test* geprüft. Um mögliche Abweichungen von der Normalverteilung herauszufinden, bestätigten wir diese Analysen mit nichtparametrischen Tests (*Krusal-Wallis Test* und gegebenenfalls *Mann-Whitney U Test*). Falls nicht anders angegeben bestätigten die nicht parametrischen Tests die Ergebnisse der parametrischen Tests.

P-Werte kleiner 0,05 wurden als signifikant definiert.

HINWEIS: Im folgenden sind alle Werte – falls nicht anders vermerkt – als Mittelwert ± Standardabweichung angegeben.

4. Ergebnisse

4.1 Rapid Platelet-Function Assay

Bei der Auswertung der Daten des RPFA zeigte sich, daß die Meßwerte „% der initialen Aggregationsfähigkeit“ und „% der initialen Aggregationsgeschwindigkeit (= Slope)“ zu fast 100 % korrelierten. Daher werden im folgenden nur die Werte des Slopes behandelt.

Wie aus ABBILDUNG 16 ersichtlich, erzielten alle drei Substanzen nach 2 Stunden eine Hemmung des Slope von deutlich über 80 %, die sich zwischen den einzelnen Studienmedikamenten nicht signifikant unterschied ($p = 0,42$ / siehe ABBILDUNG 17). Während Tirofiban und Eptifibatide diese Wirkung über 72 Stunden (= Dauer der Infusion) aufrechterhalten konnten, ging in dieser Zeit die Wirkung von Abciximab (12 h-Infusion) bereits zurück. Ab dem Zeitpunkt 24 h ergab sich ein signifikanter Unterschied zwischen Abciximab und den beiden anderen Medikamenten ($p < 0,001$).

Nach Beendigung der Applikation von Tirofiban und Eptifibatide reduzierte sich deren Wirkung innerhalb von 2 Stunden bereits deutlich und ließ innerhalb von 24 Stunden fast vollständig nach, während unter Abciximab noch immer eine Hemmung von fast 40 % meßbar war.

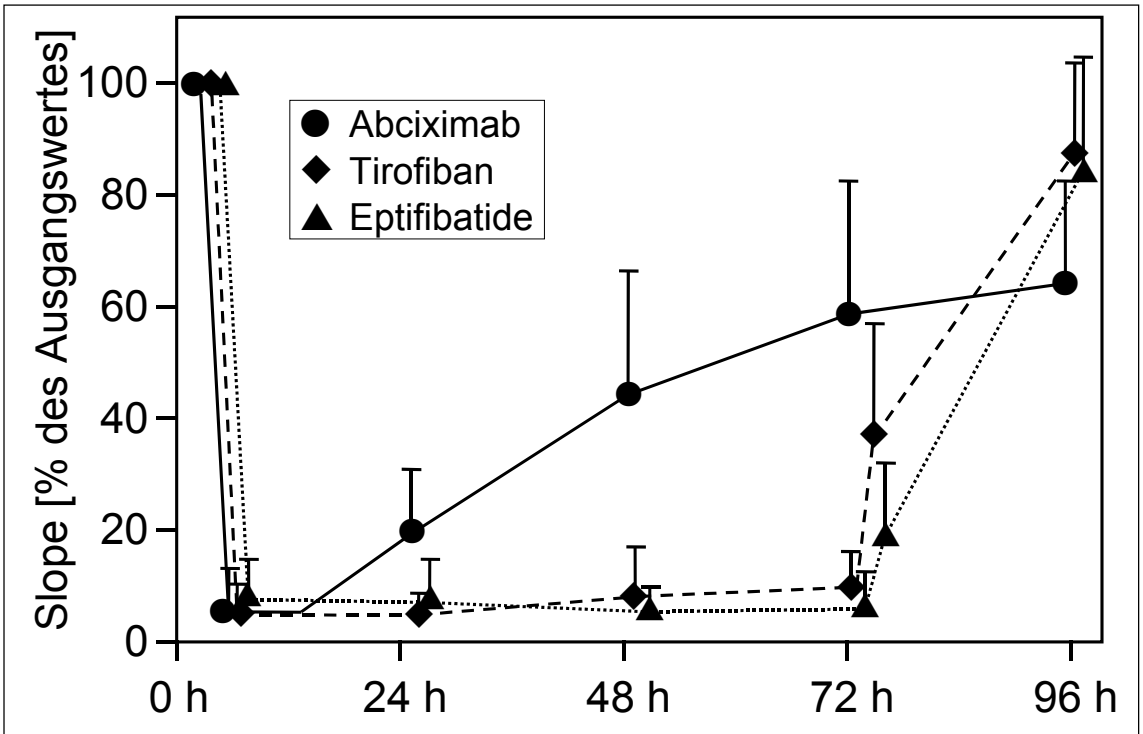


ABBILDUNG 16: Verlauf des Slope – RPFA

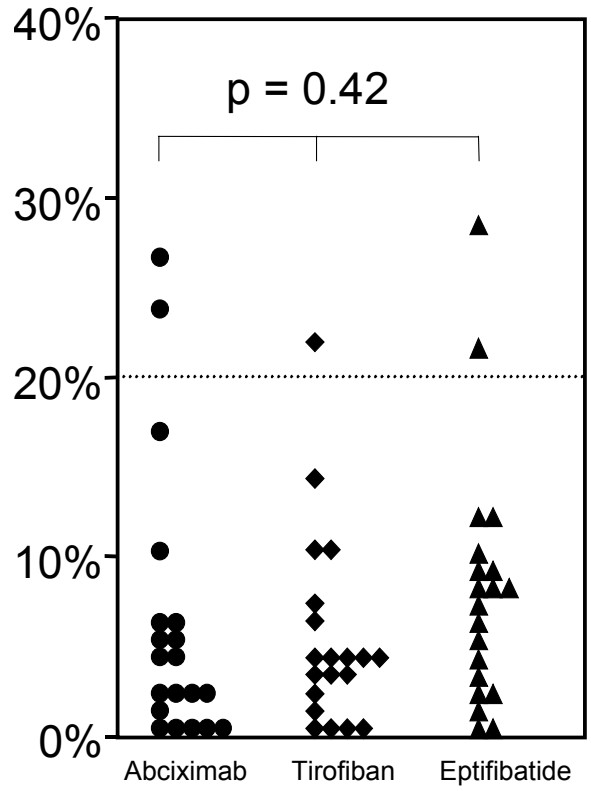


ABBILDUNG 17: Gruppenvergleich nach 2 h – RPFA

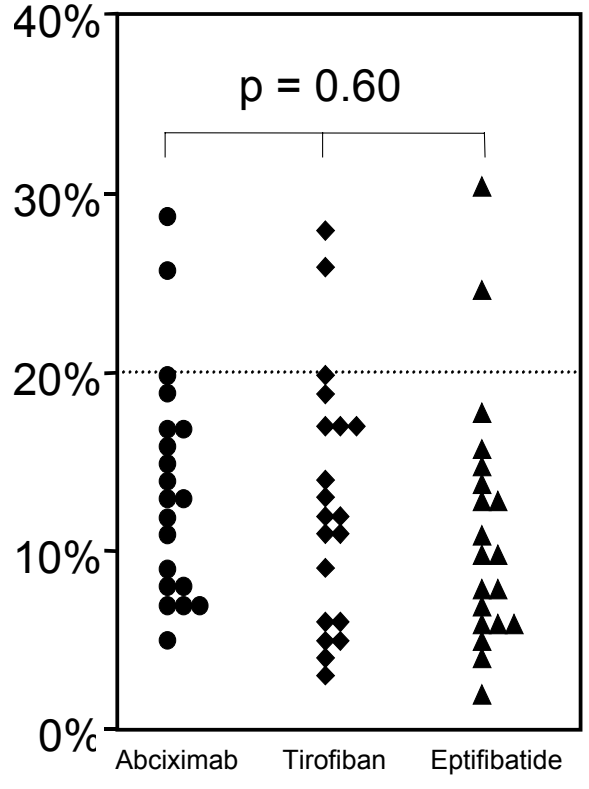


ABBILDUNG 18: Gruppenvergleich nach 2 h bei 20 µM ADP – Aggregometer

4.2 Aggregometer

4.2.1 ADP-induzierte Aggregation

Die photometrische Aggregometrie zeigte bei den Messungen mit einer Stimulation von 20 µmol/l ADP ein den RPFA-Messungen sehr ähnliches Bild, obwohl beim RPFA mit 4 µmol/l iso-TRAP stimuliert wurde.

Auch hier erzielten alle Substanzen nach 2 Stunden eine Hemmwirkung über 80 %, die sich zwischen den Medikamenten nicht signifikant unterschied ($p = 0{,}60$ / siehe ABBILDUNG 18). Abermals zeigte sich, daß Tirofiban und Eptifibatide ihre Wirkung über 72 Stunden aufrecht erhalten konnten, während im Vergleich dazu die Wirkung von Abciximab ab dem Zeitpunkt 24 h signifikant zurückging ($p < 0{,}034$ / siehe ABBILDUNG 19).

Nach Beendigung der Infusionen von Tirofiban und Eptifibatide ließ die Wirkung innerhalb von 2 Stunden schon deutlich nach. Dies war vor allem bei einigen Patienten in der Tirofibangruppe – wie die große Standardabweichung erahnen läßt – erheblich stärker erkennbar als beim RPFA. 24 Stunden später war bei beiden Medikamenten die Wirkung weitgehend abgeklungen.

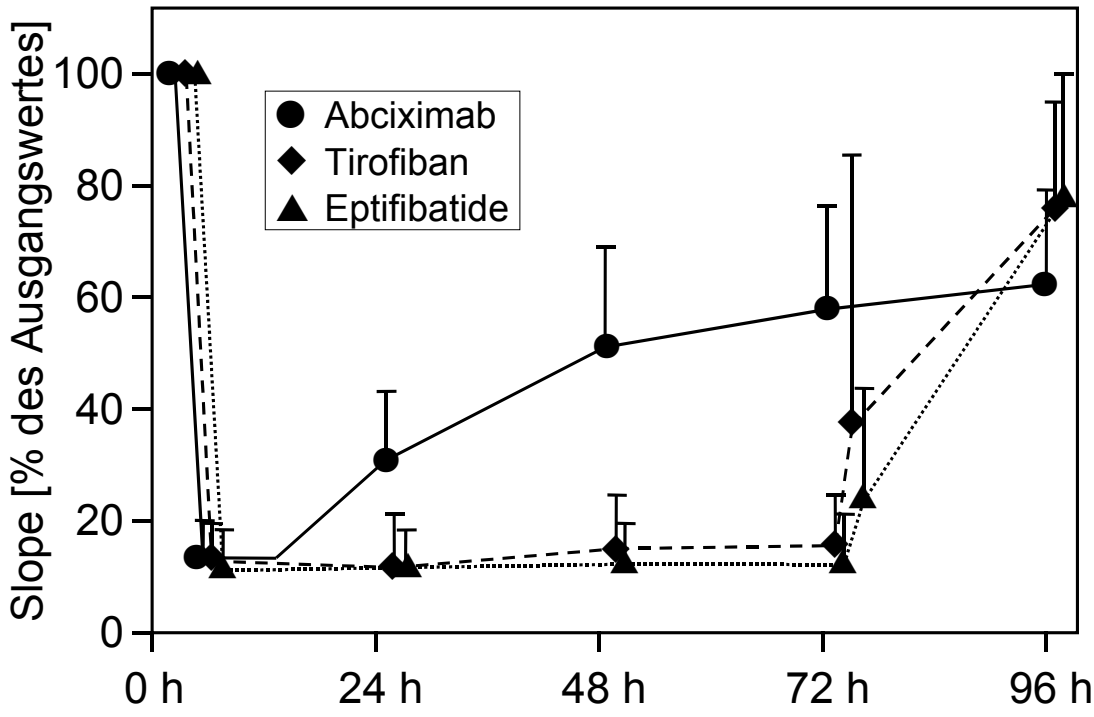


ABBILDUNG 19: Verlauf des Slope – Aggregometer (20 µM ADP)

4.2.2 TRAP-induzierte Aggregation

Bei den Aggregationsmessungen mit hohen Dosen TRAP (50 µmol/l) erzielten alle drei Substanzen nur eine Hemmwirkung von etwa 50 % nach 2 Stunden. Dabei zeigten sich keine signifikanten Unterschiede am Zeitpunkt 2 h ($p = 0,34$). Allerdings unterschied sich die Wirkung von Abciximab, die nach 24 Stunden rasch zurückging, an den Zeitpunkten 24 h, 48 h und 72 h signifikant von Tirofiban und Eptifibatide, deren Wirkung während der gesamten Zeit der Infusion erhalten blieb ($p < 0,002$).

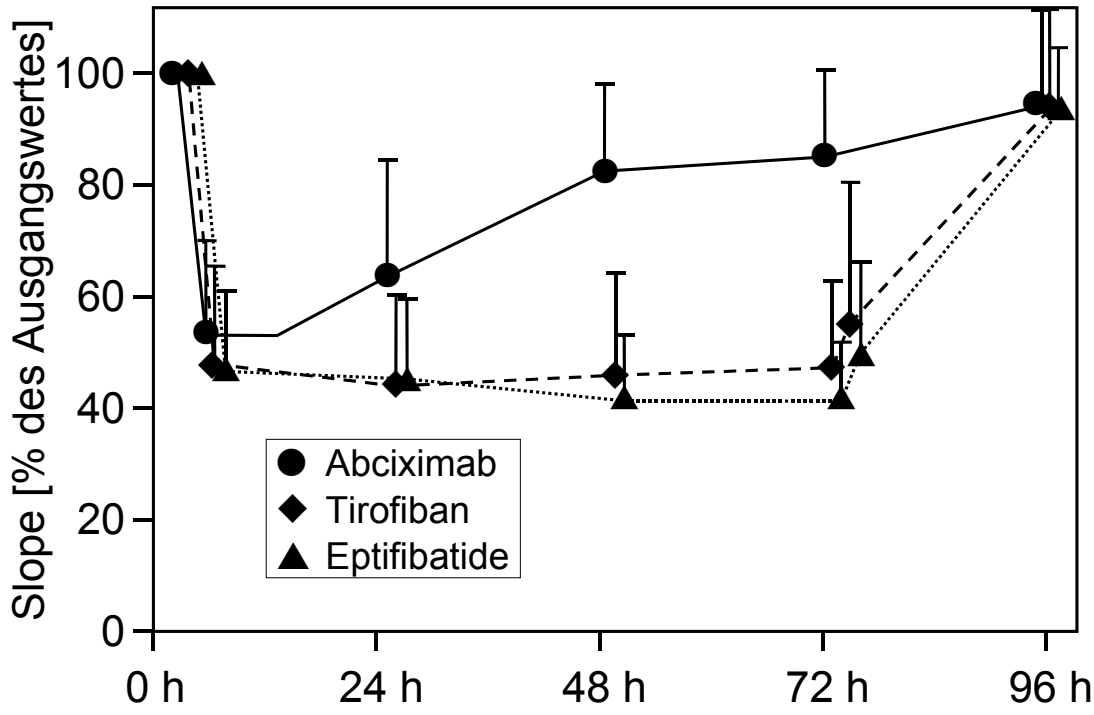


ABBILDUNG 20: Verlauf des Slope – Aggregometer (50 µM TRAP)

4.3 Durchflußzytometer

4.3.1 Glykoprotein IIb/IIIa

4.3.1.1 CD61

Die Fluoreszenz von CD61, das als von Fibrinogenrezeptorblockern unabhängiger Marker für die Oberflächenexpression von GP IIb/IIIa verwendet wird, zeigte an allen Meßpunkten bei den Messungen mit nicht aktivierten Thrombozyten keinen signifikanten Unterschied zwischen den Studienmedikamenten ($p > 0,80$).

Im Verlauf ergab sich bei allen drei Gruppen ein leichter Anstieg der CD61-Fluoreszenz, für die sich allerdings nur in der Tirofiban- und Eptifibatidegruppe eine Signifikanz ab dem Meßpunkt 48 h nachweisen ließ ($p < 0,049$).

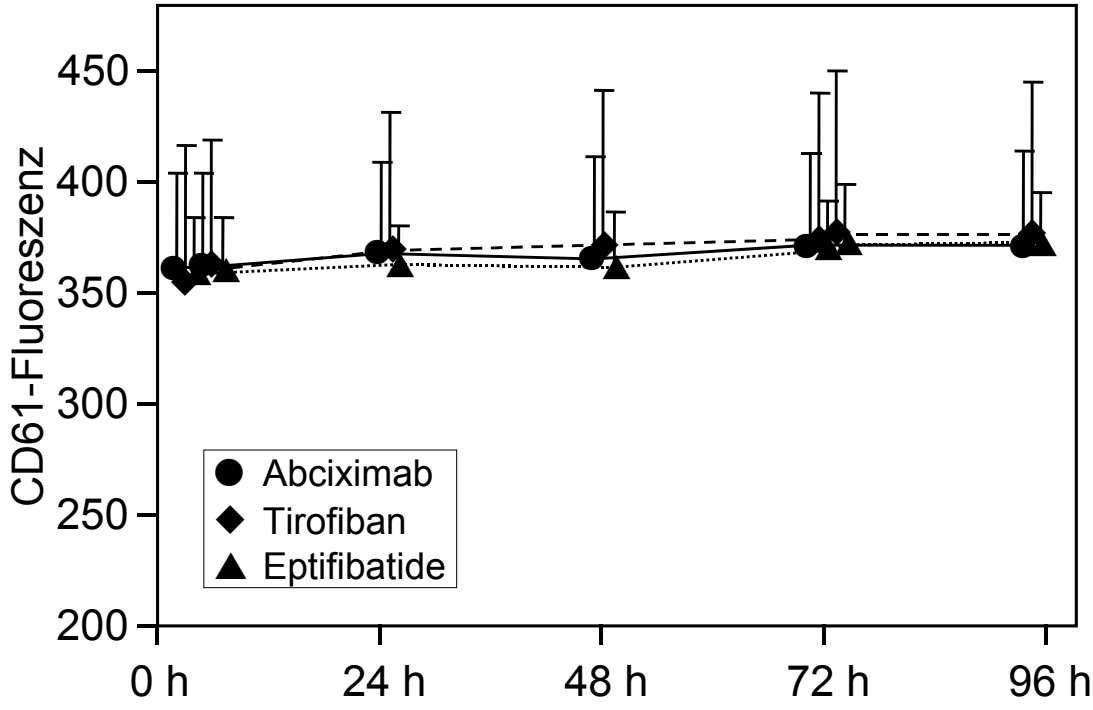


ABBILDUNG 21: Verlauf der CD61-Fluoreszenz (unstimuliert)

Bei den mit 50 µmol/l TRAP stimulierten Messungen zeigte sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen ($p > 0,87$). Die Fluoreszenzwerte waren durch die von der Zellaktivierung bedingte Degranulation von Fibrinogenrezeptoren im Mittel um etwa 15 % höher als bei den unstimulierten Messungen. Allerdings war hier kein Anstieg im Verlauf feststellbar.

4.3.1.2 PAC-1

Die Fluoreszenz von PAC-1, das an die Bindungsstelle für Fibrinogen auf der aktivierten GP IIIa-Untereinheit des Fibrinogenrezeptors bindet, zeigte bei allen drei Studienmedikamenten einen signifikanten Abfall nach 2 Stunden ($p < 0,001$).

In der Abciximabgruppe blieb die Fluoreszenz während des gesamten Meßzeitraumes sowohl bei unstimulierten wie auch bei mit 50 µmol/l TRAP stimulierten Messungen signifikant unter dem Anfangswert ($p < 0,001$).

Abgesehen vom 96 h-Wert zeigte sich das gleiche Ergebnis auch in der Tirofiban- und Eptifibatidegruppe ($p < 0,001$). Am Zeitpunkt 96 h unterschieden sich die Werte bei den unstimulierten Messungen unter Tirofiban ($p = 0,82$) und Eptifibatide ($p = 0,07$) nicht mehr signifikant vom Ausgangswert. Für Tirofiban galt dies auch bei der mit 50 µmol/l TRAP stimulierten Meßreihe ($p = 0,19$).

Die Unterschiede zwischen den Gruppen sind in ABBILDUNG 23 und 24 angegeben. Es zeigte sich, daß am Zeitpunkt 2 h Abciximab eine signifikant niedrigere PAC-1-Fluoreszenz als die beiden anderen Medikamente aufwies ($p < 0,02$), die dieses niedrige Level etwa erst zum Zeitpunkt 24 h erreichten. Des weiteren erzielten alle drei Substanzen zu den Zeitpunkten 24 h und 48 h vergleichbare Ergebnisse ($p > 0,18$). Die Hemmung durch Abciximab ließ nur langsam nach, während sich die Fluoreszenz der beiden anderen Substanzen nach Ende der Infusion bis zum Zeitpunkt 96 h deutlicher erholte ($p = 0,001$).

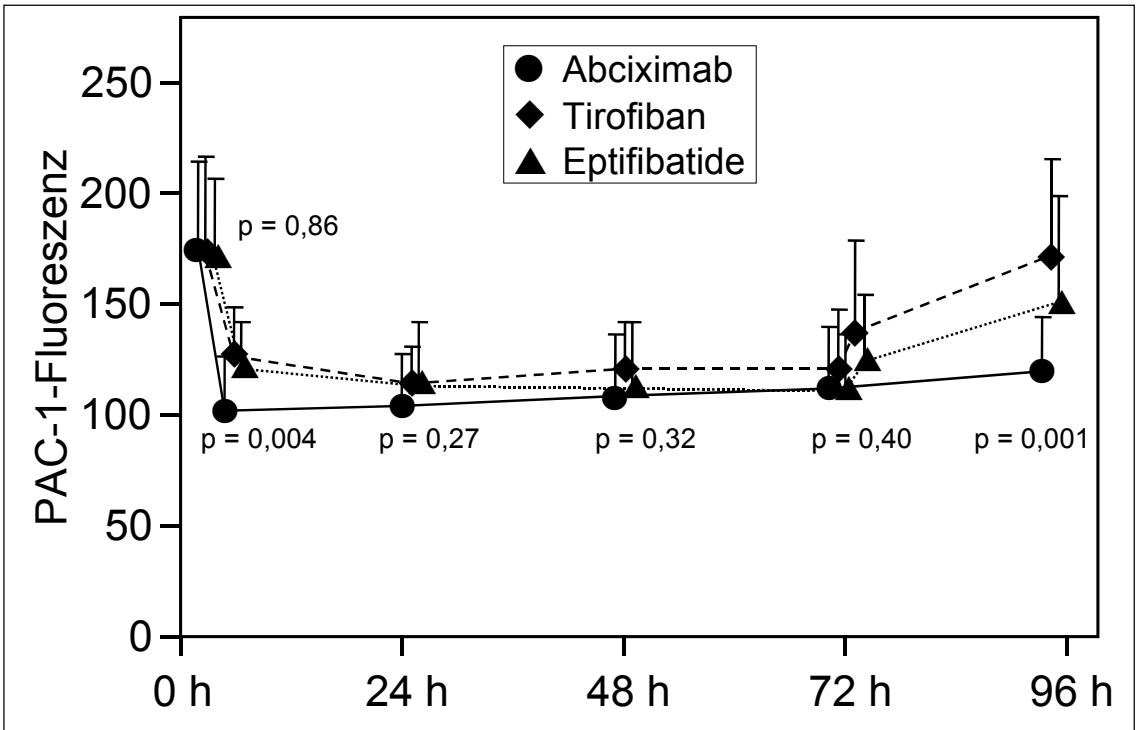


ABBILDUNG 22: Verlauf der PAC-1-Fluoreszenz (unstimuliert)

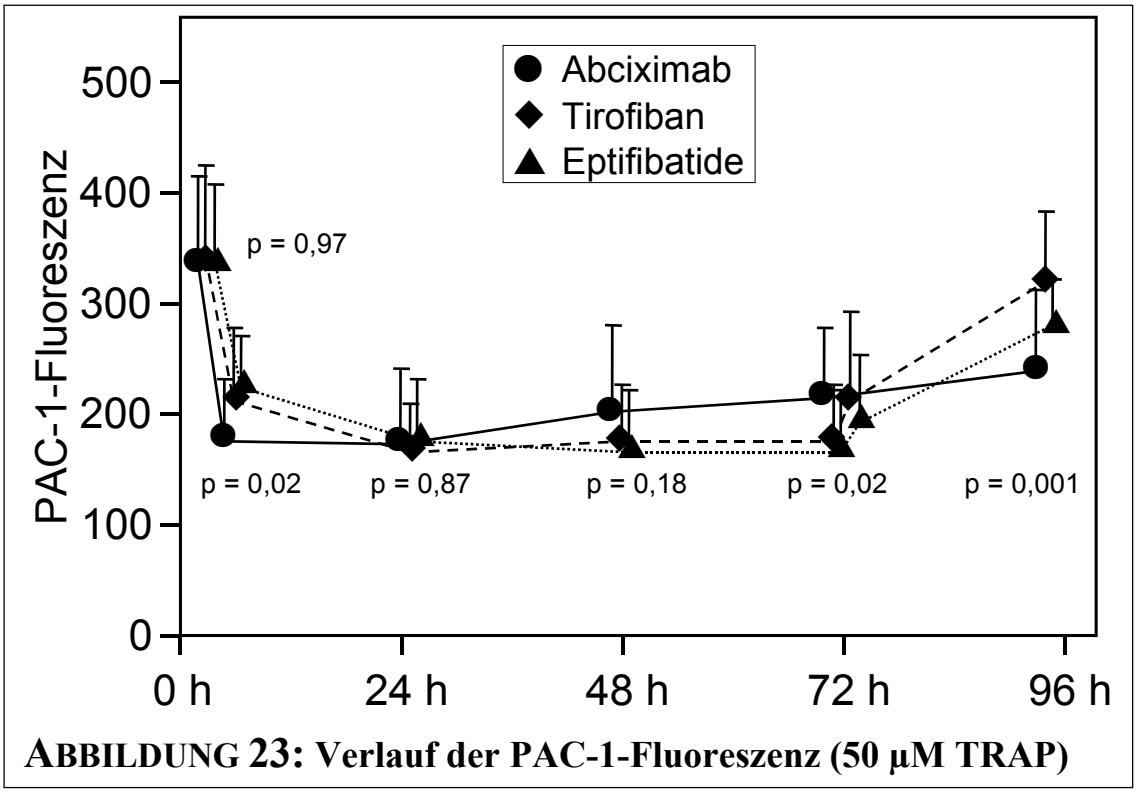


ABBILDUNG 23: Verlauf der PAC-1-Fluoreszenz (50 µM TRAP)

4.3.2 P-Selektin-Degranulation

Bei der Bestimmung des Anteils der CD62P-positiven Thrombozyten zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen ($p = 0,55$ bei 0 h / $p = 0,98$ bei 2h / $p = 0,87$ bei 24 h).

Am Zeitpunkt 2 h konnte ein signifikanter Anstieg zwischen 44 bis 67 % im Vergleich zum Ausgangswert gemessen werden ($p < 0,041$). Nach 24 Stunden zeigte sich der Anteil der CD62P-positiven Zellen immer noch leicht erhöht. Allerdings war hier ein signifikanter Unterschied zum Ausgangswert nicht mehr nachweisbar.

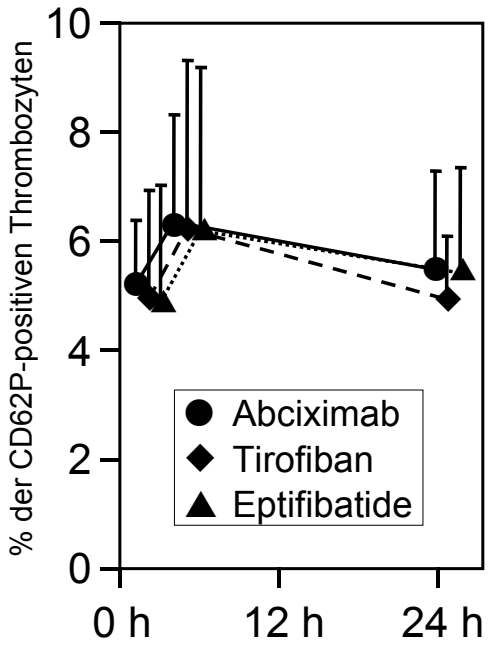


ABBILDUNG 24: P-Selektin-Degranulation

4.3.3 Thrombozyten-Monozyten-Interaktionen

Die CD42b-Fluoreszenz in der Monozytenpopulation zeigte ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen ($p > 0,95$). Die Messungen ergaben, daß die Fluoreszenz unter den Studienmedikamenten signifikant um etwa 20 % abnahm ($p < 0,011$ bei 2 h / $p < 0,005$ bei 24 h). Wie aus TABELLE 12 ersichtlich, zeigte dabei aber der Verlauf der CD42b-positiven Monozyten keine signifikanten Schwankungen ($p > 0,11$ bei 2h / $p > 0,40$ bei 24 h). Die in der Tabelle angegeben P-Werte stammen aus dem Vergleich der Gruppen miteinander und zeigen keine signifikanten Unterschiede.

TABELLE 12: % der CD42b-positiven Monozyten

	0 h	*2 h*	*24 h*
Abciximab	7,7±4,7	7,4±3,2	7,6±6,2
Tirofiban	7,5±3,9	7,0±3,3	7,0±4,9
Eptifibatide	7,6±4,8	7,1±3,7	7,3±2,5
	p = 0,98	p = 0,41	p = 0,71

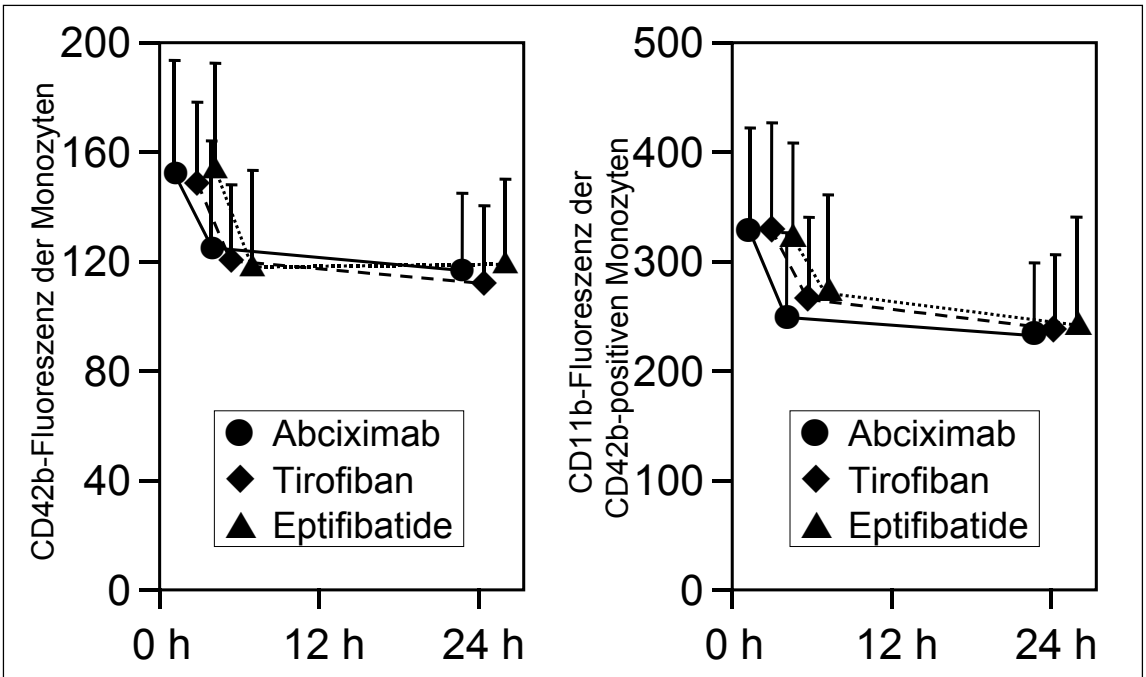


ABBILDUNG 25: Fluoreszenzverhalten der Monozyten

Während die CD11b-Fluoreszenz in der gesamten Monozytenpopulation nahezu unverändert blieb, kam es in der kleineren Population der CD42b-positiven Monozyten zu einer Abnahme der CD11b-Fluoreszenz um etwa 25 %, die nach 24 Stunden auch signifikant wurde ($p < 0,21$ bei 2 h / $p < 0,006$ bei 24 h). Erneut zeigten sich beim Vergleich zwischen den Gruppen an den drei Zeitpunkten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Studienmedikamenten ($p > 0,90$).

4.4 Thrombozytenzahl

Die Thrombozytenzahlen in den drei Patientengruppen unterlagen während des Meßzeitraumes keinen signifikanten Veränderungen und pendelten im Mittelwert zwischen 230 bis 260*10^9/l. Lediglich in der Abciximabgruppe kam es nach Infusionsbeginn zu einem geringen Abfall der Thrombozytenzahlen. Dieser wurde verursacht von dem bereits in 3.1.3 beschriebenem Patienten, dessen Thrombozytenzahlen von 186 auf 16*10^9/l unter Infusion von ReoPro abfielen, und von zwei weiteren Patienten, bei denen die Plättchenzahlen allerdings nicht so dramatisch sanken (225 auf 126*10^9/l und 235 auf 137*10^9/l).

Zwischen den drei Gruppen kam es zu keinen signifikanten Unterschieden. Die größte Abweichung zeigte sich bei 24 h (p = 0,46).

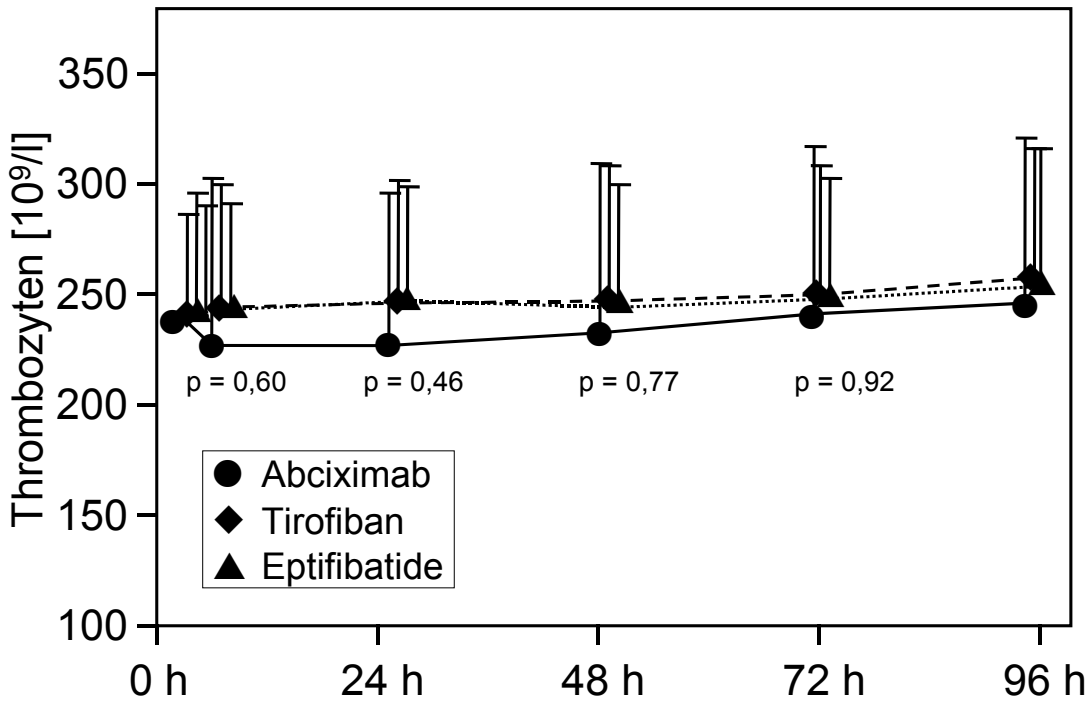


ABBILDUNG 26: Thrombozytenverläufe

4.5 Nebenwirkungen

Bei einem mit *Abciximab* behandelten Patienten kam es zu einem signifikanten Abfall der Thrombozytenzahl von $186*10^9$/l vor Therapiebeginn auf $16*10^9$/l nach 24 h. Nach Infusionsende erholte sich die Plättchenzahl aber innerhalb von 96 h wieder auf $104*10^9$/l. Der Patient zeigte keinerlei klinische Zeichen der Thrombozytopenie wie etwa petechiale Blutungen et cetera.

In der *Tirofibangruppe* wurden keine relevanten Nebenwirkungen beobachtet.

Bei neun Patienten der *Eptifibatidegruppe* kam es zu milden Blutungskomplikationen, meist in Form von anhaltendem Zahnfleischbluten. Zwei Patienten klagten zusätzlich über mehrere Stunden anhaltendes Nasenbluten. Zu einem signifikantem Abfall des Hämoglobinspiegels kam es nur bei einem Patienten (12,1 g/dl auf 9,3 g/dl).

5. Diskussion

Ziel unserer Studie war es herauszufinden, inwieweit die beiden niedermolekularen Fibrinogenrezeptorblocker Tirofiban und Eptifibatide von ihrer Wirkung mit Abciximab als Standardsubstanz vergleichbar sind. Falls sich zwischen den Medikamenten kein signifikanter Unterschied zeigen sollte hätte dies sicher Einfluß auf zukünftigen Überlegungen zur Indikationsstellung – nicht nur wegen der erheblichen Preisunterschiede zwischen den Präparaten. Vielmehr spräche auch die Steuerbarkeit und die niedrigere Thrombozytopenierate für die neueren Substanzen.

5.1 Thrombozytenaggregation

Die Messungen mit dem photometrischen Aggregometer bei einer Stimulation mit einer relativ hohen Konzentration von ADP (20 µmol/l) ergaben ähnliche Ergebnisse wie die Messungen mit dem RPFA bei einer schwachen Stimulation des Thrombinrezeptors (4 µmol/l iso-TRAP). Diese Korrelation zeigte sich bereits in vorangegangenen Studien (85,90).

Beide Testverfahren zeigten, daß die Thrombozytenaggregation nach zwei Stunden Therapie mit einem der drei Studienmedikamente um über 80 % gehemmt wurde, und daß sich dabei zwischen den drei Präparaten kein signifikanter Unterschied ergab.

Im Gegensatz zur ADP-induzierten Aggregation wurde die durch Stimulation des Thrombinrezeptor ausgelöste Aggregation deutlich schwächer gehemmt. Wie bereits eine andere Studie zu Abciximab zeigen konnte, war am Zeitpunkt 2 h die Hemmung etwa 50 % (49). In unserer Studie erzielten Tirofiban und Eptifibatide unter diesen Bedingungen einen vergleichbaren antithrombozytären Effekt.

Der Unterschied zwischen ADP- und TRAP-induzierter Aggregation kann mit der Freisetzung von nicht blockierten GP IIb/IIIa durch den hochpotenten Plättchenaktivator Thrombin erklärt werden (49,68).

Auch wenn bislang der optimale Bereich für die Hemmung der Aggregation an verschiedenen Zeitpunkten noch nicht in prospektiven Studien definiert wurde, so existiert doch die weitgehend akzeptierte Richtlinie, daß zur Vermeidung von thrombotischen Ereignissen nach koronaren Interventionen die ADP-induzierte Plättchenaggregation um mindestens 80 % gehemmt sein sollte (21,25,87,88). Daher wurde in dieser Studie geprüft, ob bei den Patienten dieses Ausmaß an Aggregationshemmung erreicht wurde. Es zeigte sich dabei kein signifikanter Unterschied zwischen den drei Medikamenten.

Es muß allerdings angemerkt werden, daß – auch wenn bei den meisten Patienten eine Blockade von über 80 % gemessen werden konnte – dennoch bei einigen Probanden dieses Ziel nicht erreicht wurde (RPFA: 8 % / Aggregometer: 10 %). Dies läßt noch Raum für weitere Untersuchungen in Bezug auf die beste Dosierung der Studienmedikamente wie zum Beispiel die in 2000 publizierte ESPRIT-Studie (enhanced suppression of the platelet GP IIb/IIIa receptor with Integrilin) (28).

5.2 Agonisteninduzierte Thrombozytenaktivierung

Interaktionen des GP IIb/IIIa mit seinen physiologischen Liganden wie auch mit Antagonisten führen zu einer Aktivierung des Thrombozyten (38,51,71). In einer kürzlich publizierten Studie konnte gezeigt werden, daß es bei mit Abciximab behandelten Patienten zu einer agonisteninduzierten Plättchenaktivierung kommt. Dies wurde durch einen Anstieg der Oberflächenexpression von P-Selektin nachgewiesen (39).

In dieser Dissertation konnte nun gezeigt werden, daß dieser Effekt bei allen drei Fibrinogenrezeptorblockern auftrat, und daß es zwischen den Medikamenten in diesem Bereich keine signifikanten Unterschiede gab.

5.3 Fibrinogenrezeptor

Da sowohl der Fibrinogenrezeptor wie auch P-Selektin in α-Granulas des Thrombozyten gespeichert wird, stellt sich die Frage, ob die Oberflächenexpression dieses Rezeptors unter Therapie mit GP IIb/IIIa-Blockern ebenso ansteigt wie die des P-Selektins (41,94). Dieselbe Studie, welche bereits den Anstieg des P-Selektins unter Abciximab beschrieben hatte, konnte ebenfalls eine signifikante, wenn auch träge Fluoreszenzerhöhung der GP IIIa-Untereinheit des GP IIb/IIIa nachweisen (39).

Daß es unter Tirofiban und Eptifibatide wie auch unter Abciximab zu einer Erhöhung der Oberflächenexpression des Fibrinogenrezeptors kommt, die keine signifikanten Unterschiede zwischen den Medikamenten aufwies, konnte nun in dieser Arbeit gezeigt werden. Allerdings war dieser Anstieg nur bei den niedermolekularen Präparaten signifikant.

Unter Stimulation mit TRAP, das eine Degranulation des Thrombozyten auslöst, konnte hingegen keine Vermehrung des Fibrinogenrezeptors auf der Plättchenoberfläche im Verlauf mehr beobachtet werden. Auch hier zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Studienmedikamenten.

Die Blockierung der Bindungsstelle für Fibrinogen des GP IIb/IIIa zeigte erstmals signifikante Unterschiede zwischen den getesteten Medikamenten. Sowohl bei den unstimulierten wie auch bei den stimulierten Messungen war die Hemmwirkung des Abciximab nach 2 Stunden signifikant stärker als bei Tirofiban und Eptifibatide, die diese Wirkung erst nach 24 Stunden erreichten. Zu den Zeitpunkten 24 h und 48 h zeigten sich keine deutlichen Unterschiede zwischen den drei Gruppen. Darüber hinaus war der Wirkungsrückgang nach Infusionsende vor allem bei Abciximab deutlicher verzögert, als es die Ergebnisse der Aggregationsmessungen hatten vermuten lassen.

Die Werte der drei Studienmedikamente unterschieden sich nach 2 Stunden zwar signifikant, allerdings waren diese Differenzen dennoch so gering, daß sie keinen Einfluß auf die Aggregation hatten.

5.4 Thrombozyten-Monozyten-Interaktionen

Heterotope Adhäsion von Thrombozyten an Monozyten scheint eine Rolle bei der Regulation von entzündlichen Reaktionen im Rahmen von ischämischen Herzerkrankungen zu spielen (64,67,69).

Es konnte in einer anderen Studie nachgewiesen werden, daß Abciximab die Anzahl von an myeloiden Leukozyten gebundenen Plättchen bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt reduzieren kann, und daß dies mit einer Abnahme der Oberflächenexpression von Mac-1 auf den weißen Blutzellen assoziiert war. Mac-1 ist eines der wichtigsten Adhäsionsmoleküle der Leukozyten (67).

Die Reduktion der Interaktion zwischen Thrombozyten und neutrophilen Granulozyten unter Tirofiban wurde von Xiao und Mitarbeitern 1999 beschrieben. In dieser Arbeit wurde der Einfluß auf die Mac-1-Expression nicht untersucht (98).

In unserer Studie konnte nun gezeigt werden, daß alle drei Studienmedikamente vergleichbar wirksam die Thrombozyten-Monozyten-Interaktionen hemmen und dabei zu einer Reduzierung der Mac-1-Expression auf den Aggregaten zwischen Plättchen und Leukozyten führen. Diese Ergebnisse zeigten erneut keine signifikanten Unterschiede zwischen den Medikamenten.

5.5 Studienbeschränkung

Von der Probengewinnung bis zur Messung wurden die Thrombozyten mehrfach physikalischen Einflüssen wie zum Beispiel hoher Schwerkraft bei der Zentrifugation ausgesetzt. Eine artifizielle Plättchenaktivierung ist daher nicht auszuschließen. In dieser Studie ging es in erster Linie um den Vergleich der Studienmedikamente. Außerdem wurden die Blutproben immer gleich und in der selben Zeit verarbeitet. Deshalb sollten die oben genannten Einwirkungen die Ergebnisse nicht allzu deutlich beeinflussen.

Da in dieser Studie die drei Fibrinogenrezeptorblocker in den derzeit empfohlenen Dosierungen – auch der Begleitmedikamente – verwendet wurden, unterschied sich die applizierte Menge an Heparin unter Behandlung mit Abciximab von der unter Tirofiban oder Eptifibatide. Heparin kann allerdings zu einer direkten Thrombozytenaktivierung führen und auch die Thrombin-induzierte Aktivierung beeinflussen (22,53). Daher kann nicht ausgeschlossen werden, daß dies einen Einfluß auf die Meßergebnisse hatte.

Darüber hinaus kreuzreagiert Abciximab mit dem Vitronektinrezeptor auf Endothel- und glatten Muskelzellen und mit dem MAC-1-Rezeptor auf Leukozyten (30,58). Es ist beschrieben, daß es unter Abciximab, aber nicht unter Tirofiban und Eptifibatide, zu einer Abnahme der Expression von MAC-1 auf Thrombozyten-Monozyten-Aggregaten durch direkte MAC-1-Blockade kommt (84). Dieser Einfluß wurde in dieser Arbeit nicht berücksichtigt.

Eine weitere Limitation besteht darin, daß die Thrombozytenfunktion nicht zu beliebig vielen Zeitpunkten untersucht werden konnte. Insbesondere liegen keine Messungen der Aggregation unmittelbar nach Therapiebeginn im Katheterlabor vor. Den Ergebnissen der erst nach Abschluß dieser Forschungsarbeit publizierten TARGET-Studie (do Tirofiban and ReoPro give similar efficacy outcomes trial) zufolge zeigen sich im klinischen Vergleich die Unterschiede zwischen den Präparaten aber vor allem bereits im periinterventionellen Verlauf (93).

5.6 Konsequenzen

In dieser Studie konnte gezeigt werden, daß Abciximab, Tirofiban und Eptifibatide zwei Stunden nach Applikation vergleichbare Wirkungen in Bezug auf Aggregationshemmung, Thrombozyten- und Monozyten-aktivierung haben.

Diese Befunde stehen in Kontrast zur kürzlich publizierten *TARGET-Studie* (do Tirofiban and ReoPro give similar efficacy outcomes trial). In dieser von Topol und Mitarbeitern veröffentlichen Arbeit wurden 4809 Patienten, die eine PTCA mit Stentimplantation erhalten sollten, untersucht. Der primäre Endpunkt (Tod, Myokardinfarkt, dringende Revaskularisierung) nach 30 Tagen trat unter Abciximab signifikant seltener auf als unter Tirofiban (Abciximab: 6,0 % / Tirofiban: 7,6 %) (93).

Dies könnte darauf hindeuten, daß möglicherweise die Interaktionen von Abciximab mit anderen Rezeptoren als dem GP IIb/IIIa eine bislang unterschätzte Rolle spielen.

Allerdings beruht der Unterschied zwischen den beiden Patientengruppen im Wesentlichen auf einer Senkung der Infarktrate im Katheterlabor (93). Man kann daraus schließen, daß insbesondere der rasche Wirkungseintritt und das frühzeitige Erreichen des maximalen Hemmeffekts für die klinische Wirkung von größerer Bedeutung sind als die Aufrechterhaltung des Effekts über die folgenden Tage.

Unsere Studie konnte zeigen, daß alle drei Fibrinogenrezeptorblocker die gleiche Wirkpotenz aufweisen. In zukünftigen Studien muß nun gezeigt werden, welche Dosierung der Präparate nötig ist, um diesen entscheidenden frühen Wirkungseintritt zu erreichen.

6. Zusammenfassung

Diese prospektive und randomisierte Studie prüfte den Einfluß der drei bislang klinisch zugelassenen Fibrinogenrezeptorblockern Abciximab, Tirofiban und Eptifibatide auf Thrombozyten bei Patienten, die eine PTCA und eine koronare Stentimplantation erhielten.

Es wurden drei Gruppen mit je 20 Patienten untersucht, die sich in ihren demographischen und angiographischen Eigenschaften nicht unterschieden. Dazu wurden pro Patient über einen Untersuchungszeitraum von 96 Stunden insgesamt siebenmal Blutproben entnommen.

Neben den Studienmedikamenten erhielten alle Patienten ASS, Ticlopidin und Heparin. Abciximab wurde als Infusion über 12 Stunden, Tirofiban und Eptifibatide über 72 Stunden verabreicht.

Neben Aggregationsmessungen mit einem photometrischen Aggregometer und einem RPFA-Aggregometer wurden mittels Durchflußzytometrie Veränderungen am Fibrinogenrezeptor, α-Degranulation der Thrombozyten und Zellinteraktionen zwischen Plättchen und Monozyten gemessen. Darüber hinaus wurde untersucht, wie sich der Aktivierungszustand der Monozyten durch den Einfluß auf die Thrombozyten ändert. Außerdem wurde die Anzahl der Thrombozyten im Blutbild während der Therapie beobachtet.

Die wichtigsten Ergebnisse dieser Studie sind, daß zwischen den drei Substanzen in den klinisch empfohlenen Dosierungen keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf folgende Eigenschaften vorliegen:

- Hemmung der maximalen Aggregationsrate unter ADP- oder Thrombinrezeptor-Stimulation nach zwei Stunden Infusion
- Hemmung der α-Degranulation, die als Maß für die agonisteninduzierte Plättchenaktivierung gesehen werden kann
- Anstieg der Oberflächenexpression des Fibrinogenrezeptors
- Hemmung der Interaktion von Thrombozyten und Monozyten
- Verminderung der Mac-1-Expression auf den gemessenen Thrombozyten-Leukozyten-Aggregaten
- Thrombozytenzahl im Blutbild

Somit waren Abciximab, Tirofiban und Eptifibatide zwei Stunden nach Beginn der Therapie in ihrer Wirkung auf die Thrombozytenfunktion ex vivo vergleichbar.

7. Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
ADPase	Adenosindiphosphatspaltendes Enzym
ASS	Acetylsalicylsäure
atm	Atmosphäre
ATP	Adenosintriphosphat
Ca^{2+}	Kalzium (Ion)
CAPTURE	chimeric 7E3 antiplatelet in unstable angina refractory to standard treatment trial
CAPTURE	chimeric c7E3 anti-platelet therapy in refractory unstable angina treatment
DTS	dense tubular system
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetra-Acetat
EPIC	evaluation of c7E3 for the prevention of ischemic complications
EPILOG	evaluation of PTCA to improve longterm outcome by c7E3
EPISTENT	evaluation of platelet GP IIb/IIIa inhibitor for stenting
ESPRIT	enhanced suppression of the platelet IIb/IIIa receptor with Integrilin therapy
Fab	fragment antigen binding
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
fl	Femtoliter (= 10^{-15} l)
FSC	forward light scatter
GDP	Guanindiphosphat
GP	Glykoprotein
GTP	Guanintriphosphat
Hb	Hämoglobin
HWZ	Halbwertszeit
IMPACT-II	Integrelin to minimize platelet aggregation and to prevent coronary thrombosis
KGD	Lys-Gly-Asp
KHK	koronare Herzkrankheit
KQAGDV	Lys-Gln-Ala-Gly-Asp-Val

LDL	low density lipoprotein
LV	linker Ventrikel
mAK	monoklonale Antikörper
min.	Minute(n)
NO	Stickstoffmonoxid
PBS	phosphate buffered saline
PC5	Phycoerythrin mit kovalent gebundenem Cyanin 5
PE	Phycoerythrin
PFA	Para-Formaldehyd
PPP	platelet poor plasma
PRISM	platelet receptor inhibition for ischemic syndrome management
PRISM-PLUS	platelet receptor inhibition for ischemic syndrome management – patients limited by unstable signs and symptoms
PRP	platelet rich plasma
PTCA	perkutane, transluminale, koronare Angioblastie
PURSUIT	platelet GP IIb/IIIa in unstable angina receptor suppression using Integrilin therapy
RAPPORT	ReoPro and primary PTCA organization and randomized trial
RESTORE	randomized efficacy study of Tirofiban for outcomes and restenosis
RGD	Arg-Gly-Asp
RPFA	Rapid Platelet-Function Assay
SCCS	surface-connected canalicular system
sec.	Sekunde(n)
SSC	side light scatter
TARGET	do Tirofiban and ReoPro give similar efficacy outcomes trial
TIMI	thrombolysis in myocardial infarction
TRAP	Thrombin-Rezeptor-Aktivierendes-Peptid
vWF	von-Willebrand-Faktor

7.2 Tabellenverzeichnis

TABELLE 1: Granula und die in ihnen gespeicherten Stoffe (Auswahl) 4
TABELLE 2: Glykoproteine der Thrombozytenmembran (Auswahl) 5
TABELLE 3: Übersicht GP IIb/IIIa-Blocker 13
TABELLE 4: Demographische Daten der Patientengruppen 21
TABELLE 5: Angiographische Daten der Patientengruppen 22
TABELLE 6: Dosierung der Fibrinogenrezeptorantagonisten 23
TABELLE 7: Blutentnahmeschema 25
TABELLE 8: Vergleich des Slopes von Citrat- und Hirudinproben 28
TABELLE 9: Vergleich des PAC-1 von Citrat- und Hirudinproben 28
TABELLE 10: Verwendete Antikörper 35
TABELLE 11: Zweifachfärbungen 36
TABELLE 12: % der CD42b-positiven Monozyten 50

7.3 Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1: GP Ib-IX-V 5
ABBILDUNG 2: GP IIb-IIIa 6
ABBILDUNG 3: P-Selektin 7
ABBILDUNG 4: Adhäsion und Aggregation 8
ABBILDUNG 5: ASS 11
ABBILDUNG 6: Ticlopidin und Clopidogrel 12
ABBILDUNG 7: Bindungsstellen der Antagonisten am GPIIb/IIIa 14
ABBILDUNG 8: Abciximab (ReoPro) 15
ABBILDUNG 9: Tirofiban (Aggrastat) 17
ABBILDUNG 10: Eptifibatide (Integrilin) 18
ABBILDUNG 11: Funktionsprinzip des RPFA 29
ABBILDUNG 12: Auswertung der Aggregometerkurven 33
ABBILDUNG 13: CD42b-FSC-Dot Plot 38
ABBILDUNG 14: CD62P-Histiogramm 39
ABBILDUNG 15: CD11b-CD14-Dot Plot 39
ABBILDUNG 16: Verlauf des Slope - RPFA 41
ABBILDUNG 17: Gruppenvergleich nach 2 h – RPFA 42
ABBILDUNG 18: Gruppenvergleich nach 2 h bei 20 µM ADP – Aggregometer 42
ABBILDUNG 19: Verlauf des Slope – Aggregometer (20 µM ADP) 43
ABBILDUNG 20: Verlauf des Slope – Aggregometer (50 µM TRAP) 44
ABBILDUNG 21: Verlauf der CD61-Fluoreszenz (unstimuliert) 45
ABBILDUNG 22: Verlauf der PAC-1-Fluoreszenz (unstimuliert) 47
ABBILDUNG 23: Verlauf der PAC-1-Fluoreszenz (50 µM TRAP) 48
ABBILDUNG 24: P-Selektin-Degranulation 49
ABBILDUNG 25: Fluoreszenzverhalten der Monozyten 50
ABBILDUNG 26: Thrombozytenverläufe 51

7.4 Literaturverzeichnis

1. Abciximab in Ischemic Stroke Investigators. Abciximab in acute ischemic stroke: a randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation study. Stroke 31 (2000) 601-9
2. Abrams C, Shattil SJ. Immunological detection of activated platelets in clinical disorders. Thromb Haemost 65 (1991) 467-73
3. Badimon JJ, Fuster V, Chesebro JH, Badimon L. Coronary atherosclerosis. A multifactorial disease. Circulation 87 (1993) II3-16
4. Balsano F, Rizzon P, Violi F, Scrutinio D, Cimminiello C, Aguglia F, Pasotti C, Rudelli G. Antiplatelet treatment with ticlopidine in unstable angina. A controlled multicenter clinical trial. Circulation 82 (1990) 17-26
5. Becker RC, Tracy RP, Bovill EG, Mann KG, Ault K. The clinical use of flow cytometry for assessing platelet activation in acute coronary syndromes. TIMI-III Thrombosis and Anticoagulation Group. Coron Artery Dis 5 (1994) 339-45
6. Bellavance A. Efficacy of ticlopidine and aspirin for prevention of reversible cerebrovascular ischemic events. The Ticlopidine Aspirin Stroke Study. Stroke 24 (1993) 1452-7.
7. Berger G, Quark R, Tenza D, Levy-Toledano S, de Gunsburg J, Cramer EM. Ultrastructural localisation of the small GTP-bindung protein Rapl in human platelets and megacaryocytes. Br J Haematol 88 (1994) 372-82
8. Berndt MC, López JA. Platelet Glycoprotein Ib-IX-V Complex and Platelet Adhesion. In: Hemostasis and thrombosis: basic principles and clinical practice. Colman RW, Hirsh J, Marder VJ, Clowes AW, George JN (Ed.), Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia (2001) 4th ed., 493-504
9. Bertrand ME, Rupprecht HJ, Urban P, Gershlick AH for the Investigators. Double-blind study of the safety of clopidogrel with and without a loading dose in combination with aspirin compared with ticlopidine in combination with aspirin after coronary stenting : the clopidogrel aspirin stent international cooperative study (CLASSICS). Circulation 102 (2000) 624-9.
10. Bick RL. Physiology of Hemostasis. In: Disorders of thrombosis and hemostasis: clinical and laboratory practice. Bick RL (Ed.), ASCP Press, Chicago (1992) 1-26

11. Boden WE, O´Rourke RA, Crawford MH, Blaustein AS, Deedwania PC, Zoble RG, Wexler LF, Kleiger RE, Pepine CJ, Ferry DR, Chow BK, Lavon PW. Outcomes in patients with acute non-Q-wave myocardial infarction randomly assigned to an invasive as compared with a conservative management strategy. N Engl J Med 338 (1998) 1785-92

12. Born GVR, Cross GP. Effect of inorganic ions and of plasma proteins on the aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate. J Physiol 170 (1964) 397-414

13. CAPRIE Steering Committee. A randomised, blinded, trial of clopidogrel versus aspirin in patients at risk of ischaemic events (CAPRIE). Lancet 348 (1996) 1329-39.

14. CAPTURE Investigators. Randomised placebo-controlled trial of abciximab before and during coronary intervention in refractory unstable angina. Lancet 349 (1997) 1429-35

15. Clemeston KJ, J.M. C. Platelet GPIb-V-IX complex. Structure, function, physiology, and pathology. Semin. Thromb. Hemost. 21 (1995) 130-6

16. Cohen SA, Trikha M, Mascelli MA. Potential Future Clinical Applications for the GPIIb/IIIa Antagonist, Abciximab in Thrombosis, Vascular and Oncological Indications. Pathol Oncol Res 6 (2000) 163-74

17. Coller BS. Monitoring platelet GP IIb/IIIa antagonist therapy. Circulation 97 (1998) 5-9

18. Coller BS, Lang D, Scudder LE. Rapid and simple platelet function assay to assess glycoprotein IIb/IIIa receptor blockade. Circulation 95 (1997) 860-7

19. Coller BS, Peerschke EI, Seligsohn U, Scudder LE, Nurden AT, Rosa JP. Studies on the binding of an alloimmune and two murine monoclonal antibodies to the platelet glycoprotein IIb-IIIa complex receptor. J Lab Clin Med 107 (1986) 384-92

20. Coller BS, Scudder LE. Inhibition of dog platelet function by in vivo infusion of F(ab')2 fragments of a monoclonal antibody to the platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor. Blood 66 (1985) 1456-9

21. Coller BS, Scudder LE, Beer J, Gold HK, Folts JD, Cavagnaro J, Jordan R, Wagner C, Juliucci J, Knight D. Monoclonal antibodies to platelet glycoprotein IIb/IIIa as antithrombotic agents. Ann N Y Acad Sci 614 (1991) 193-213

22. Colman RW, Clowes AW, George JN, Hirsh J, Marder VJ. Overview of Hemostasis. In: Hemostasis and thrombosis: basic principles and clinical practice. Colman RW, Hirsh J, Marder VJ, Clowes AW, George JN (Ed.), Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia (2001) 4th ed., 3-16

23. Cramer EM. Platelets and Megakaryocytes: Anatomy and Structural Organisation. In: Hemostasis and thrombosis: basic principles and clinical practice. Colman RW, Hirsh J, Marder VJ, Clowes AW, George JN (Ed.), Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia (2001) 4th ed., 411-28

24. Davies MJ, Thomas AC. Plaque fissuring--the cause of acute myocardial infarction, sudden ischaemic death, and crescendo angina. Br Heart J 53 (1985) 363-73

25. EPIC Investigators. Use of a monoclonal antibody directed against the platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor in high-risk coronary angioplasty. N Engl J Med 330 (1994) 956-61

26. EPILOG Investigators. Platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor blockade and low-dose heparin during percutaneous coronary revascularization. N Engl J Med 336 (1997) 1689-96

27. EPISTENT Investigators. Randomised placebo-controlled and balloon-angioplasty-controlled trial to assess safety of coronary stenting with use of platelet glycoprotein- IIb/IIIa blockade. Lancet 352 (1998) 87-92

28. ESPRIT Investigators. Novel dosing regimen of eptifibatide in planned coronary stent implantation: a radomized placebo-controlled trial. Lancet 356 (2000) 2037-44

29. Faraday N, Goldschmidt-Clermont P, Dise K, Bray PF. Quantitation of soluble fibrinogen binding to platelets by fluorescence- activated flow cytometry. J Lab Clin Med 123 (1994) 728-40

30. Faulds D, Sorkin EM. Abciximab (c7E3 Fab). A review of its pharmacology and therapeutic potential in ischaemic heart disease. Drugs 48 (1994) 583-98

31. Fox JEB. Platelet Cytoskeleton. In: Hemostasis and thrombosis: basic principles and clinical practice. Colman RW, Hirsh J, Marder VJ, Clowes AW, George JN (Ed.), Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia (2001) 4th ed., 429-46

32. Fukami MH, Holmsen H, Kowalska MA, Niewiarowski S. Platelet Secretion. In: Hemostasis and thrombosis: basic principles and clinical practice. Colman RW, Hirsh J, Marder VJ, Clowes AW, George JN (Ed.), Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia (2001) 4th ed., 561-73

33. Fuster V, Badimon L, Badimon JJ, Chesebro JH. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes (1). N Engl J Med 326 (1992) 242-50

34. Fuster V, Badimon L, Badimon JJ, Chesebro JH. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes (2). N Engl J Med 326 (1992) 310-8

35. Fuster V, Jang IK. Role of Platelet-Inhibitor Agents in Coronary Artery Disease. In: Textbook of interventional cardiology. Topol EJ (Ed.), W. B. Saunders Company, Philadelphia (1994) 2th ed., 3-22

36. Gawaz M, Neumann FJ, Dickfeld T, Koch W, Lauwitz 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 [see comments]. Circulation 98 (1998) 1164-71

37. Gawaz M, Neumann FJ, Ott I, May A, Rudiger S, Schomig A. Changes in membrane glycoproteins of circulating platelets after coronary stent implantation. Heart 76 (1996) 166-72

38. Gawaz M, Neumann FJ, Schomig A. Evaluation of platelet membrane glycoproteins in coronary artery disease : consequences for diagnosis and therapy. Circulation 99 (1999) E1-E11

39. Gawaz M, Ruf A, Neumann FJ, Pogatsa-Murray G, Dickfeld T, Zohlnhöfer D, Schömig A. Effect of glycoprotein IIb-IIIa receptor antagonism on platelet membrane glycoproteins after coronary stent placement. Thromb Haemost 80 (1998) 994-1001

40. Gawaz MP, Mujais SK, Schmidt B, Gurland HJ. Platelet-leukocyte aggregation during hemodialysis. Kidney Int 46 (1994) 489-95

41. George JN, Colman RW. Overview of Platelet Structure and Funktion. In: Hemostasis and thrombosis: basic principles and clinical practice. Colman RW, Hirsh J, Marder VJ, Clowes AW, George JN (Ed.), Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia (2001) 4th ed., 382-6

42. Gerrad JM, White JG, Rao GH, Townsend D. Localisation of platelet prostaglandin production in the platelet dense tubular system. Am J Pathol 83 (1976) 283-98

43. Ginsberg MH, Frelinger AL, Lam SC, Forsyth J, McMillan R, Plow EP, Shattil SJ. Analysis of platelet aggregation disorders based on flow cytometric analysis of membrane glycoprotein IIb-IIIa with conformation-specific monoclonal antibodies. Blood 76 (1990) 2017-23

44. Goa KL, Noble S. Eptifibatide: a review of its use in patients with acute coronary syndromes and/or undergoing percutaneous coronary intervention. Drugs 57 (1999) 439-62

45. Harker LA. Therapeutic inhibition of platelet function in stroke. Cerebrovasc Dis 8 (1998) 8-18

46. Hershock D, Gewirtz AM. Megakaryocytopoiesis. In: Hemostasis and thrombosis: basic principles and clinical practice. Colman RW, Hirsh J, Marder VJ, Clowes AW, George JN (Ed.), Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia (2001) 4th ed., 387-410

47. Hourdille P, Heilmann E, Combrie R, Winckler J, Clemetson KJ, Nurden AT. Thrombin induces a rapid redistribution of glycoprotein Ib-IX complexes within the membrane system of activated human platelets. Blood 76 (1990) 1503-13

48. IMPACT-II Investigators. Randomised placebo-controlled trial of effect of eptifibatide on complications of percutaneous coronary intervention. Lancet 349 (1997) 1422-8

49. Kleiman NS, Raizner AE, Jordan R, Wang AL, Norton D, Mace KF, Joshi A,Coller BS, Weisman HF. Differential inhibition of platelet aggregation induced by adenosine diphosphate or a thrombin receptor-activating peptide in patients treated with bolus chimeric 7E3 Fab: implications for inhibition of the internal pool of GPIIb/IIIa receptors. J Am Coll Cardiol 26 (1995) 1665-71

50. Larsen E, Celi A, Gilbert GE, Furie BC, Erbon JK, Bonfanti R, Wagner DD, Furie B. PADGEM protein: a receptor that mediates the interaction of activated platelets with neutrophils and monocytes. Cell 59 (1989) 305-12

51. Law DA, DeGuzman FR, Heiser P, Ministri-Madrid K, Killeen N, Phillips DR. Integrin cytoplasmic tyrosine motif is required for outside-in alphaIIbbeta3 signalling and platelet function. Nature 401 (1999) 808-11

52. Lefkovits J, Plow EF, Topol EJ. Platelet glycoprotein IIb/IIIa receptors in cardiovascular medicine. N Engl J Med 332 (1995) 1553-9

53. Libby P, Simon DI. Thrombosis and Atherosclerosis. In: Hemostasis and thrombosis: basic principles and clinical practice. Colman RW, Hirsh J, Marder VJ, Clowes AW, George JN (Ed.), Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia (2001) 4th ed., 743-52

54. May AE, Neumann FJ, Gawaz M, Ott I, Walter H, Schomig A. Reduction of monocyte-platelet interaction and monocyte activation in patients receiving antiplatelet therapy after coronary stent implantation. Eur Heart J 18 (1997) 1913-20

55. McClellan KJ, Goa KL. Tirofiban. A review of its use in acute coronary syndromes. Drugs 56 (1998) 1067-80

56. McEver RP. Properties of GMP-140, an inducible granule membrane protein of platelets and endothelium. Blood Cells 16 (1990) 73-80

57. Michelson AD. Flow cytometry: a clinical test of platelet function. Blood 87 (1996) 4925-36

58. Monrad ES. Antithrombotic and Fibrinolytic Management of Patients with Unstable Coronary Artery Disease. In: Hemostasis and thrombosis: basic principles and clinical practice. Colman RW, Hirsh J, Marder VJ, Clowes AW, George JN (Ed.), Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia (2001) 4th ed., 1431-59

59. Mousa SA, Bozarth JM, Forsythe MS, Slee A. Differential antiplatelet efficacy for various GPIIb/IIIa antagonists. Role Of plasma calcium levels [In Process Citation]. Cardiovasc Res 47 (2000) 819-26

60. Nagata K, Tsuji T, Todoroki N, Katagiri Y, Tanoue K, Yamazaki H, Hanai N, Irimura T. Activated platelets induce superoxide anion release by monocytes and neutrophils through P-selectin (CD62). J Immunol 151 (1993) 3267-73

61. National Center for Health Statistics. United States, 1990. DHHS Pub. No. (HS) 91-1232. U.S. Government Printing Office. Washington (1991).

62. National Heart, Lung und Blood Institute. Morbidity and Mortality Chartbook on Cardiovascular, Lung, and Blood Diseases 1990. U.S. Department of Health and Human Services. Washington (1990).

63. Neumann FJ, Gawaz M, Schomig A. Glykoproteine der Thrombozytenmembran als Angriffspunkte für pharmakologische Interventionen in der Therapie der koronaren Herzkrankheit. Dtsch. med. Wschr. 122 (1997) 1224-30

64. Neumann FJ, Marx N, Gawaz M, Ott I, Koch W, Pinkau T, Schömig A. Induction of cytokine expression in leukocytes by binding of thrombin- stimulated platelets. Circulation 95 (1997) 2387-94

65. Neumann FJ, Schomig A. Glycoprotein IIb/IIIa receptor blockade with coronary stent placement. Semin Interv Cardiol 3 (1998) 81-90

66. Neumann FJ, Schomig A. New developments in therapy of unstable angina pectoris. Internist (Berl) 39 (1998) 1223-31

67. Neumann FJ, Zohlnhofer D, Fakhoury L, Ott I, Gawaz M, Schomig A. Effect of glycoprotein IIb/IIIa receptor blockade on platelet-leukocyte interaction and surface expression of the leukocyte integrin Mac-1 in acute myocardial infarction. J Am Coll Cardiol 34 (1999) 1420-6

68. Nurden P, Poujol C, Durrieu-Jais C, Winckler J, Combrie R, Mucchi L, Bihour C, Wagner C, Jordan R, Nurden AT. Labeling of the internal pool of GP IIb-IIIa in platelets by c7E3 Fab fragments (abciximab): flow and endocytic mechanisms contribute to the transport. Blood 93 (1999) 1622-33

69. Ott I, Neumann FJ, Gawaz M, Schmitt M, Schomig A. Increased neutrophil-platelet adhesion in patients with unstable angina. Circulation 94 (1996) 1239-46

70. Patrono C. Aspirin as an antiplatelet drug. New Engl. J. Med. 330 (1994) 1287-94

71. Peter K, Schwarz M, Ylanne J, Kohler B, Moser M, Nordt T, Sulbuch P, Kubler W, Bode C. Induction of fibrinogen binding and platelet aggregation as a potential intrinsic property of various glycoprotein IIb/IIIa inhibitors. Blood 92 (1998) 3240-9

72. Phillips DR, Teng W, Arfsten A, Nunnizzi-Alaimo L, White MM, Longhunt C, Shattil SJ, Randolph A, Jakubowski JA, Jennings LK, Scarborough RM. Effect of Ca2+ on GP IIb-IIIa interactions with integrilin: enhanced GP IIb-IIIa binding and inhibition of platelet aggregation by reductions in the concentration of ionized calcium in plasma anticoagulated with citrate. Circulation 96 (1997) 1488-94

73. Plow EF, Shattil SJ. Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ and Platelet Aggregation. In: Hemostasis and thrombosis: basic principles and clinical practice. Colman RW, Hirsh J, Marder VJ, Clowes AW, George JN (Ed.), Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia (2001) 4th ed., 479-92

74. PRISM Investigators. A comparison of aspirin plus tirofiban with aspirin plus heparin for unstable angina. N Engl J Med 338 (1998) 1498-505

75. 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 338 (1998) 1488-97

76. PURSUIT Investigators. Inhibition of platelet glycoprotein IIb/IIIa with eptifibatide in patients with acute coronary syndromes. N Engl J Med 339 (1998) 436-43

77. Qureshi AI, Suri MF, Khan J, Fessler RD, Guterman LR, Hopkins LN. Abciximab as an adjunct to high-risk carotid or vertebrobasilar angioplasty: preliminary experience. Neurosurgery 46 (2000) 1316-24; discussion 24-5

78. 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 96 (1997) 1445-53

79. Ross R. Atherosclerosis - an inflammatory disease. N Engl J Med 340 (1999) 115-26

80. Ruf A, Patscheke H. Flow cytometric detection of activated platelets: comparison of determining shape change, fibrinogen binding, and P-selectin expression. Semin Thromb Hemost 21 (1995) 146-51

81. Ruggeri ZM. The platelet glycoprotein Ib-IX complex. Prog Hemost Thromb 10 (1991) 35-68

82. Ruggeri ZM. Platelet-Vessel Wall Interactions in Flowing Blood. In: Hemostasis and thrombosis: basic principles and clinical practice. Colman RW, Hirsh J, Marder VJ, Clowes AW, George JN (Ed.), Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia (2001) 4th ed., 683-98

83. Schomig A, Kastrati A, Mudra H, Blasini R, Schuhlen H, Klauss V, Richardt G, Neumann FJ. Four-year experience with Palmaz-Schatz stenting in coronary angioplasty complicated by dissection with threatened or present vessel closure. Circulation 90 (1994) 2716-24

84. Simon DI, Xu H, Ortlepp S, Rogers C, Rao NK. 7E3 monoclonal antibody directed against the platelet glycoprotein IIb/IIIa cross-reacts with the leukocyte integrin Mac-1 and blocks adhesion to fibrinogen and ICAM-1. Arterioscler Thromb Vasc Biol 17 (1997) 528-35

85. Smith JW, Steinhubl SR, Lincoff AM, Coleman JC, Lee TT, Hillman RS, Coller BS. Rapid platelet-function assay: an automated and quantitative cartridge- based method. Circulation 99 (1999) 620-5

86. Statistisches Bundesamt. Todesursachenstatistik 1999 (vorläufiges Ergebnis) Deutschland. WWW: http://www.statistik-bund.de/presse/deutsch/pm2000/p3620092.htm (2000)

87. Steinhubl SR, Kottke-Marchant K, Moliterno DJ, Rosenthal ML, Godfrey NK, Coller BS, Topol EJ, Lincoff AM. Attainment and maintenance of platelet inhibition through standard dosing of abciximab in diabetic and nondiabetic patients undergoing percutaneous coronary intervention. Circulation 100 (1999) 1977-82

88. Steinhubl SR, Talley D, Kereiakes D, Coller BS. A prospective multicenter study to determine the optimal level of platelet inhibition with GP IIb/IIIa inhibitors in patients untergoing coronary intervention. J Am Coll Cardiol 35 (2000) Suppl:44A

89. Storey RF, Wilcox RG, Heptinstall S. Differential effects of glycoprotein IIb/IIIa antagonists on platelet microaggregate and macroaggregate formation and effect of anticoagulant on antagonist potency. Implications for assay methodology and comparison of different antagonists. Circulation 98 (1998) 1616-21

90. Theroux P, Gosselin G, Nasmith J. The Accumetrics rapid platelet-function analyzer (RPFA) to monitor platelet aggregation during oral administration of a GP IIb/IIIa antagonist. J Am Coll Cardiol 33 (1999) Suppl:330A

91. TIMI IIIB Investigator. Effects of tissue plasminogen activator and a comparison of early invasive and conservative strategies in unstable anging and non-Q-wave myocardial infarction. Results of the TIMI IIIB trial. Thrombolysis in myocardial ischemia. Circulation 89 (1994) 1514-56

92. Topol EJ, Califf RM, Weisman HF, Ellis SG, Tcheng JE, Worby S, Ivanhoe R, George BS, Fintel D, Weston M. Randomised trial of coronary intervention with antibody against platelet IIb/IIIa integrin for reduction of clinical restenosis: results at six months. Lancet 343 (1994) 881-6

93. Topol EJ, Moliterno DJ, Herrmann HC, Power ER, Grines CL, Cohen DJ, Cohen EA, Bertrand M, Neumann FJ, Stone GW, DiBattiste PM, Demopoulosn L. Comparison of two platelet glycoprotein IIb/IIIa inhibitors, Tirofiban and Abciximab, for the prevention of ischemic events with percutaneous coronary revascularization. N Engl J Med 344 (2001) 1888-94

94. Tracy PB. Role of Platelets and Leukocytes in Coagulation. In: Hemostasis and thrombosis: basic principles and clinical practice. Colman RW, Hirsh J, Marder VJ, Clowes AW, George JN (Ed.), Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia (2001) 4th ed., 575-96

95. Vane JR. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action of aspirin-like drugs. Nature 231 (1971) 232-5

96. Weiss HJ, Aledort LM. Impaired platelet-connective-tissue reaction in man after aspirin ingestion. Lancet 2 (1967) 495-7

97. Winkley JM, Adams HP, Jr. Potential role of abciximab in ischemic cerebrovascular disease. Am J Cardiol 85 (2000) 47C-51C

98. Xiao Z, Theroux P, Frojmovic M. Modulation of platelet-neutrophil interaction with pharmacological inhibition of fibrinogen binding to platelet GPIIb/IIIa receptor. Thromb Haemost 81 (1999) 281-5

8. Curriculum Vitae

PERSÖNLICHE DATEN

Name:	Willibald Hochholzer
Geburtsdatum:	12. August 1975
Geburtsort:	Altötting
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Familienstand:	ledig
Eltern:	Adelheid und Adolf Hochholzer
Geschwister:	Martin und Rupert Hochholzer

SCHULBILDUNG

1981 - 1985	**Grundschule** in Winhöring (Landkreis Altötting)
1985 - 1994	**König-Karlmann-Gymnasium** in Altötting Abschluß mit dem Abitur (Allgemeine Hochschulreife)
1994 - 1995	**Rettungsdienstschule des Malteser Hilfsdienst** Straubing Abschluß als Rettungssanitäter

HOCHSCHULBILDUNG

1996 - 2002	Studium an der **Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München**
1998	Ärztliche Vorprüfung
1999	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2001	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2001 - 2002	Praktisches Jahr: *Kinderchirurgie* (Universität Basel, Schweiz) *Innere Medizin* (Krankenhaus Harlaching, München, und Raigmore Hospital Inverness, Großbritannien) *Anästhesie* (Klinikum Großhadern, München)
2002	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

9. Danksagung

Zuerst gilt mein Dank Prof. Dr. Franz-Josef Neumann – nicht nur für die Bereitstellung des Themas und die außerordentlich kompetente Führung während der Forschungsarbeit, sondern auch für die stets persönliche Betreuung und Unterstützung über die Doktorarbeit hinaus.

Des weiteren möchte ich mich bei PD Dr. Meinrad Gawaz für die Erlaubnis zur Arbeit in seinem Labor und die zahlreichen Ratschläge bedanken.

Den MTAs Tanja Breustedt und Kirsten Langenbrink schulde ich Dank für die Einführung in die Laborarbeit und die Bestellung der benötigten Materialien.

Einen nicht unerheblichen Anteil am Gelingen dieser Doktorarbeit haben meine Mitdoktoranten Beate Wolf und Oliver Meier. Herzlichen Dank nicht nur für die tatkräftige Unterstützung, sondern v. a. auch für die moralische Unterstützung und Motivation, wenn sie am nötigsten war.

Zuletzt möchte ich mich bei den Ärztinnen und Ärzten, den Schwestern und MTAs des Deutschen Herzzentrums München und besonders bei Frau Gisela Pogatsa-Murray bedanken. Ohne ihre tatkräftige Mithilfe wären die Patientenrekrutierung, das Sammeln der klinischen Informationen und manche Blutentnahmen nicht möglich gewesen.