

I. MEDIZINISCHE KLINIK UND POLIKLINIK DER TECHNISCHEN UNIVERSITÄT MÜNCHEN

KLINIKUM RECHTS DER ISAR
(DIREKTOR: UNIV.-PROF. DR. A. SCHÖMIG)

**THROMBOZYTENFUNKTION NACH FIBRINOGEN-
REZEPTORANTAGONISIERUNG BEI PATIENTEN
MIT KORONARER STENTIMPLANTATION**

FRAUKE HEDWIG HELLWEG

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. UNIV.-PROF. DR. M. P. GAWAZ,
EBERHARD-KARLS-UNIVERSITÄT TÜBINGEN
2. UNIV.-PROF. A. KASTRATI

Die Dissertation wurde am 30.06.2004 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät für Medizin am 11.05.2005 angenommen.

MEINEN LIEBEN ELTERN GEWIDMET

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Physiologie der Thrombozyten	1
1.1.1	Thrombozytenmorphologie	1
1.1.2	Thrombozytenaktivierung und primäre Hämostase	3
1.1.2.1	Adhäsion	3
1.1.2.2	Aggregation	6
1.1.3	Der Fibrinogenrezeptor (Glykoprotein IIb-IIIa)	6
1.1.4	Immunologische Marker der thrombozytären	
1.1.5	Membranglykoproteine	9
1.2	Antithrombozytäre Substanzen	11
1.2.1	Acetylsalicylsäure	12
1.2.2	Thienopyridine	12
1.2.3	Fibrinogenrezeptorantagonisten	12
2	Zielsetzung	18
3	Patienten und Methodik	19
3.1	Studienpopulation	19
3.2	Stentimplantation und Verabreichung der Studienmedikation	21
3.3	Probengewinnung	22
3.4	Probenaufbereitung	22
3.5	Aggregometrische Messung der Thrombozyten	23
3.6	Monoklonale Antikörper und Reagenzien	25
3.7	Durchflußzytometrische Messung der Thrombozyten	26
3.8	Statistische Auswertung	27
4	Ergebnisse	29
4.1	Aggregation	29
4.1.1	Einfluß auf die Steigung der Aggregation	29
4.1.2	Maximale Aggregation	30
4.2	Deaggregation	32

4.3	Thrombozytäre ATP-Freisetzung	33
4.3.1	Thrombozytäre ATP-Freisetzung nach 2,5 Minuten	33
4.3.2	Thrombozytäre ATP-Freisetzung nach fünf Minuten	34
4.3.3	Maximale thrombozytäre ATP-Freisetzung	35
4.4	Durchflusszytometrische Untersuchung	36
4.4.1	Bindung von FITC-c7E3 an zirkulierende Thrombozyten	36
4.4.2	Verfügbarkeit der Fibrinogenbindungsstellen und Pharmakonbindung	36
4.4.3	Degranulation und P-Selektin-Expression	37
4.4.4	Thrombozytenzahl	38
4.5	Korrelationen	40
4.6	Variabilität	45
4.6.1	Durchflußzytometrische Messung	45
4.6.2	Messung mit dem Aggregometer	49
5	Diskussion	52
5.1	Antithrombotische Therapie mit GPIIb-IIIa-Rezeptorantagonisten bei koronarer Stentimplantation	52
5.2	Aggregation und Deaggregation	53
5.3	Freisetzungsreaktion	54
5.4	Pharmakologisches Monitoring der GPIIb-IIIa-Rezeptorantagonistentherapie	55
5.5	Fibrinogenrezeptorantagonisten-induzierte Thrombozytopenie	58
5.6	Variabilität der Thrombozytenfunktion	59
5.7	Studienbeschränkungen	60
5.8	Therapeutische Ausblicke	61
6	Zusammenfassung	62
7	Abkürzungsverzeichnis	63
8	Literaturverzeichnis	65
9	Curriculum vitae	76
10	Danksagung	77

1 Einleitung

1.1 Physiologie der Thrombozyten

1.1.1 Thrombozytenmorphologie

Thrombozyten sind anukleäre, korpuskuläre Blutbestandteile und werden im Knochenmark aus Megakaryozyten gebildet. Mit einer physiologischen Anzahl von 150.000 bis 300.000 pro μl Blut zirkulieren sie für neun bis zehn Tage im peripheren Blut (Mackie 1988, Schrör 1993). Als kleinste korpuskuläre Blutbestandteile weisen die Blutplättchen im nichtaktivierten Zustand eine diskoide Form mit einem Durchmesser von 2-4 μm und einer Dicke von 0,75 μm auf. Dabei beträgt die durchschnittliche Überlebenszeit im peripheren Blut etwa sieben Tage. Der komplexe innere Aufbau der Thrombozyten läßt sich in vier morphologische Zonen mit jeweils spezifischen Funktionen gliedern (Mackie 1988):

Periphere Zone: Der Thrombozyt wird von einer trilaminären Zellmembran, bestehend aus einer äußeren Glykokalix, Glykoproteinen, Proteinen und Mukopolysacchariden, umgeben. Die Glykoproteine dienen als spezifische Oberflächenrezeptoren verschiedenster spezifischer und unspezifischer Stimuli (Mackie 1988).

Die **strukturelle Zone** enthält das Zytoplasma und dessen Matrix, die sich aus Mikrofilamenten, Mikrotubuli und submembranös gelagerten Filamenten zusammensetzt. Die Komponenten der strukturellen Zone sind für die diskoide Form der ruhenden Thrombozyten verantwortlich. Ebenso führt dieses kontraktile System bei Aktivierung der Thrombozyten zu Formveränderungen, Pseudopodienausbildung und Sekretion der Thrombozyten.

Die **Zone der Organellen** besteht aus Speichergranula (dichte Granula, α -Granula und Lysosomen), Mitochondrien, Ribosomen und Golgi-Apparaten. Am häufigsten sind α -Granula mit folgenden Inhaltsstoffen vertreten: Enzyme, adhäsive Proteine (Fibrinogen, Fibronectin, von-Willebrand-Faktor, Thrombospondin, Vitronectin, GPIIb-IIIa), Wachstumsfaktoren, zytokinähnliche Proteine, Koagulationsfaktoren. Die dichten Granula (elektronenoptisch dicht) enthalten niedermolekulare Substanzen wie Serotonin, ADP und ATP sowie Calcium, die den Aggregationsvorgang fördern. Die Inhaltsstoffe der lysosomalen Granula sind hydrolytische Enzyme (Gawaz 1999). Bei Aktivierung der Thrombozyten verschmelzen die Granula mit der Zellmembran und setzen die hämostaserelevanten Substanzen frei (Mackie 1988).

Das **Membransystem** besteht aus dem offenen kanalikulären System (surface-connected open canicular system, SCS) und dem dichten tubulären System (dense tubular system, DTS). Das offene kanalikuläre System bewirkt mit seinen bis weit ins Innere des Thrombozyten reichenden Kanälen eine starke Vergrößerung der Zelloberfläche. Es ermöglicht den Austausch von Substanzen zwischen dem Thrombozyteninneren und dem Extrazellulärraum. Im dichten tubulären System wird freies Calcium gespeichert, welches für den Plättchenmetabolismus und die Aktivierung des Thrombozyten unerlässlich ist. Zusätzlich findet hier der Arachidonsäuremetabolismus statt (Mackie 1988, Schrör 1993).

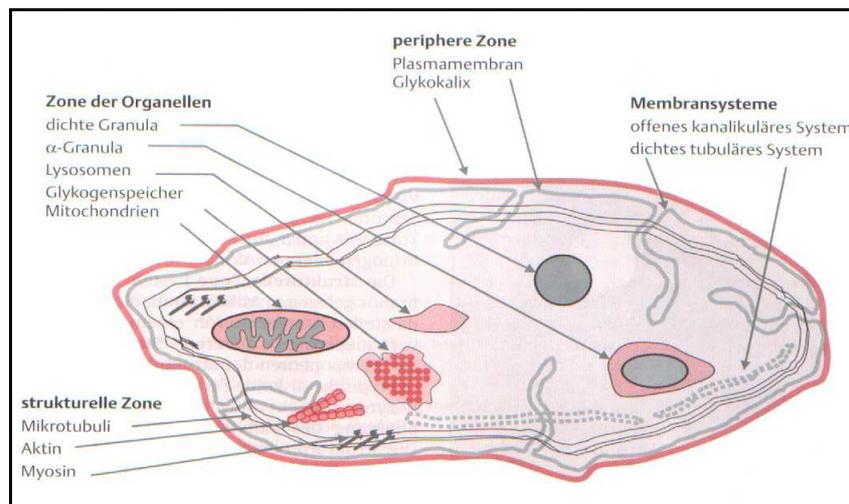


Abb. 1: Schematische Darstellung der Ultrastruktur ruhender Blutplättchen (nach Gawaz 1999)

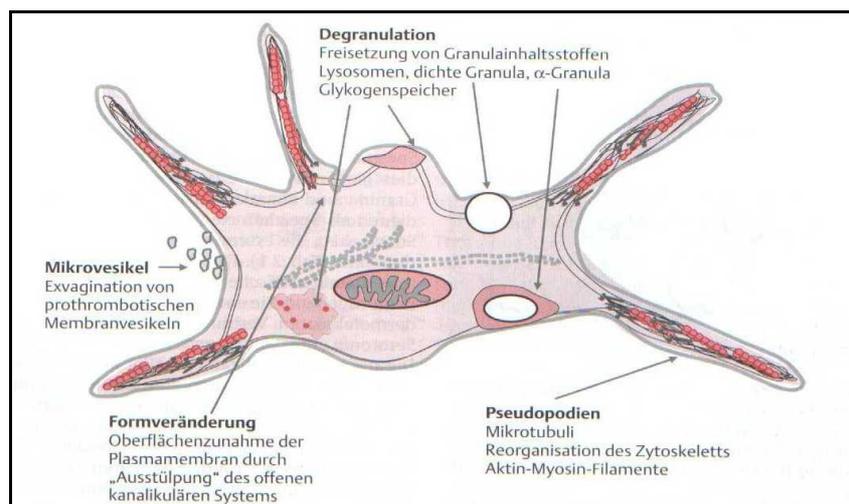


Abb. 2: Schematische Darstellung der Ultrastruktur aktivierter Blutplättchen (nach Gawaz 1999)

1.1.2 Thrombozytenaktivierung und primäre Hämostase

Während der primären Hämostase werden zwei Funktionsstadien unterschieden: Die Anreicherung von Thrombozyten an Strukturen im Bereich der Gefäßwandläsion wird Adhäsion bezeichnet. Die daraufhin stattfindende Aggregation ist durch die Interaktion mit weiteren Thrombozyten und Bildung eines primären hämostatischen Thrombus gekennzeichnet.

1.1.2.1 Adhäsion

Die Adhäsion von noch ruhenden Blutplättchen an die verletzte Gefäßwand ist der erste Schritt der primären Hämostase und wird primäre Adhäsion genannt. Während der sekundären Adhäsion kommt es zur Anlagerung von bereits aktivierten Thrombozyten an Strukturen des Subendothels (VanZanten, Ruggeri 1994). Der Adhäsionsvorgang wird durch thrombozytäre Membranglykoproteine gesteuert. Der erste Kontakt zirkulierender Thrombozyten mit der subendothelialen Oberfläche erfolgt über die Bindung des Glykoprotein Ib-V-IX-Komplexes an kollagen-immobilisierten von-Willebrand-Faktor (**Kontaktphase**) (Sixma 1994, Nurden 1994).

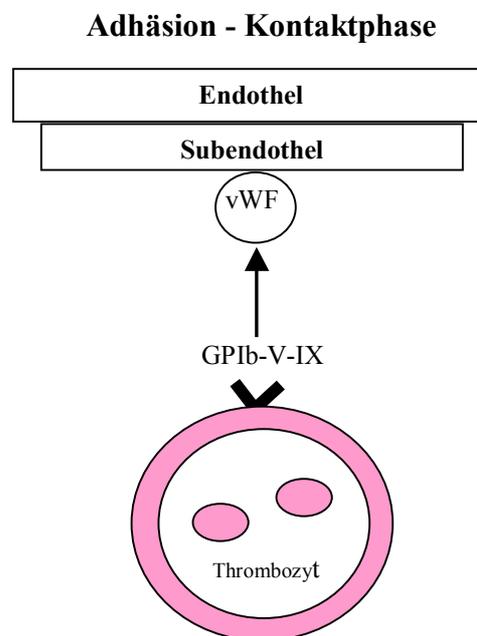


Abb. 3: Adhäsion - Kontaktphase; vWF = von - Willebrand - Faktor, GPIb-V-IX = vWF - Rezeptor

Um den Kontakt bei hohen Scherkräften zwischen Blutplättchen und Oberfläche aufrecht zu erhalten, sind weitere membranständige Adhäsionsrezeptoren wie der Kollagen-, Fibronektin- und Lamininrezeptor notwendig (**Phase der Stabilisierung**) (Nurden 1994, Van-Zanten).

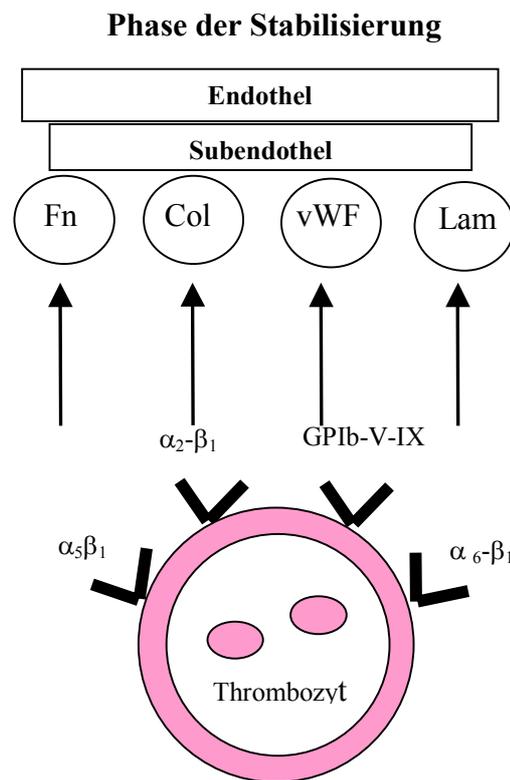


Abb. 4: Adhäsion – Phase der Stabilisierung: Fn = Fibronektin; Col = Kollagen; vWF = von-Willebrand-Faktor; Lam = Laminin; $\alpha_5\beta_1$ = Fibronektinrezeptor; $\alpha_2\beta_1$ = Kollagenrezeptor; $\alpha_6\beta_1$ = Lamininrezeptor; GPIb-V-IX = vWF-Rezeptor

Die Bindung des Kollagenrezeptors an Kollagen bewirkt die Aktivierung der Thrombozyten und folglich deren Formveränderung (shape change). Die dadurch hervorgerufene Induktion des GPIIb-IIIa-Rezeptors sichert den Kontakt der Thrombozyten mit der Oberfläche (**Phase der Aktivierung**) (Nurden 1994).

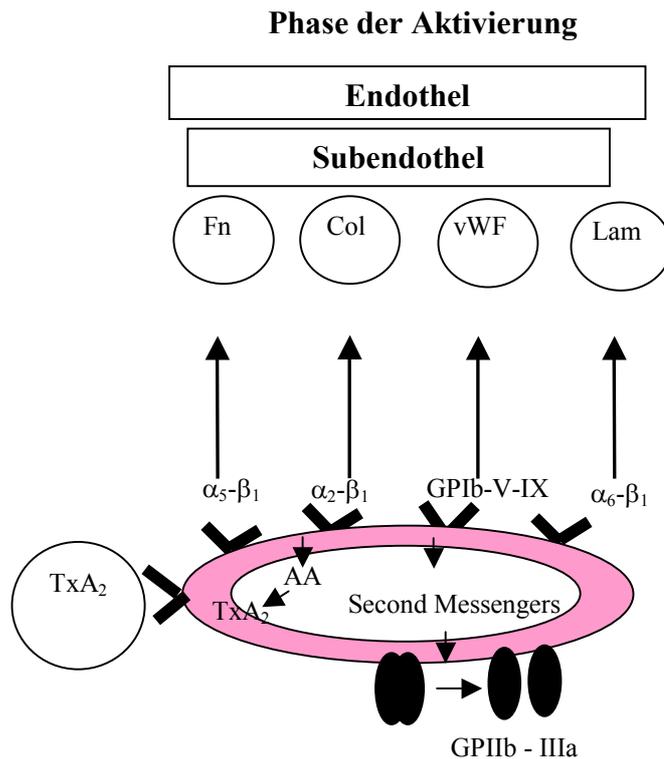


Abb. 5: Adhäsion – Phase der Aktivierung. TxA₂ = Thromboxan A₂; AA = Arachidonsäure; ADP = Adenosindiphosphat; GPIIb-IIIa = Fibrinogen-Rezeptor

Die Bildung von Pseudopodien und das Ausbreiten der Thrombozyten (durch Interaktion zwischen GPIIb-IIIa und von-Willebrand-Faktor oder Fibronectin) führt zu einer effektiven Abdichtung der Gefäßwandläsion (**Phase des Ausbreizens**) (Nurden 1994).

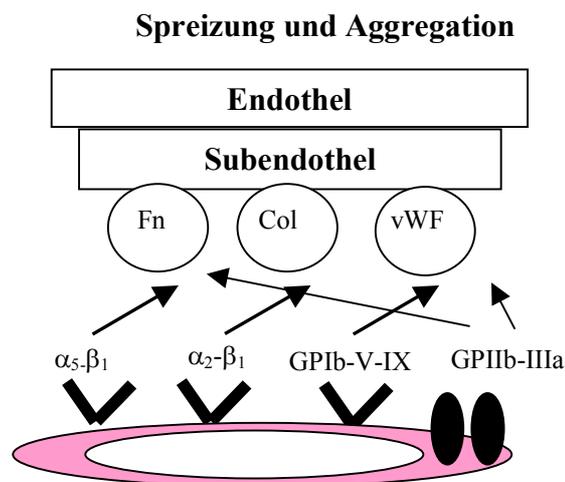


Abb. 6: Adhäsion – Spreizung und Aggregation

Aus freigesetzter Arachidonsäure (AA) bildet der Thrombozyt Thromboxan A₂, welches zusätzlich den Aktivierungsvorgang verstärkt. Des weiteren bewirkt die Aktivierung des Thrombozyten eine intrazelluläre Freisetzung von Granulainhaltsstoffen (Sekretion), welche sowohl autokrin den Aktivierungsvorgang verstärken als auch durch Stimulation noch ruhender Thrombozyten (parakrin) zur Aggregation mit schon adhärenen Plättchen anregen kann („Plättchenrekrutierung“) (Siess 1989). Dies erfolgt über aktivierte GPIIb-IIIa-Rezeptoren. Nach erfolgreicher Adhäsion sind die Thrombozyten vollkommen über dem Subendothel ausgespreizt und dichten die Läsion gegenüber dem Blutstrom ab.

1.1.2.2 Aggregation

Die Thrombozyten-Aggregation bedeutet die Interaktion zwischen Thrombozyten mit dem Ziel der Bildung eines hämostatischen Thrombus. Es ist bekannt, daß der Glykoprotein-IIb-IIIa-Komplex auf der Thrombozytenoberfläche ein essentieller Bestandteil der Aggregation ist. Lösliches plasmatisches Fibrinogen ist nicht in der Lage, mit ruhenden Plättchen in Kontakt zu treten. Erst nach Aktivierung durch Agonisten wie ADP, Thromboxan A₂ oder Thrombin kommt es im Bereich des Glykoprotein-IIb-IIIa-Komplexes zur Freilegung von Bindungsstellen für Fibrinogen (Gawaz 1999). Über die Bildung von Fibrinogenbrücken kommt es zur Anlagerung weiterer Thrombozyten und zur Entstehung von hämostatisch wirksamen, aber noch reversiblen Plättchenaggregaten (**primäre Aggregation**) (Siess 1989, Gawaz 1991). Dieser Vorgang, die Bindung von Fibrinogen an das GPIIb-IIIa, erfordert die Anwesenheit von freiem Calcium. Des weiteren ist Fibrinogen sowie die Scherkraft (Erhöhung der Kontaktwahrscheinlichkeit zwischen zwei Thrombozyten) notwendig. Die irreversible **sekundäre Aggregation** tritt nach Aggregationsbeginn verzögert auf und beginnt, sobald der Thrombozyt Granulainhaltsstoffe freisetzt.

1.1.3 *Der Fibrinogenrezeptor (Glykoprotein IIb-IIIa)*

Das membranständige Heterodimer, bestehend aus Glykoprotein IIb und IIIa, spielt eine zentrale Rolle im Aggregationsvorgang. Es gehört zu den β_3 -Integrinen und ist Bestandteil der thrombozytären Plasmamembran, des offenen kanalikulären Systems und der α -Granula. Integrine sind Adhäsionsrezeptoren, die Strukturen des Zytoskeletts mit der extrazellulären Matrix verbinden. Sie kommen ubiquitär vor. Das Glykoprotein IIb-IIIa ($\alpha_{IIb}\beta_3$) ist

mengenmäßig das am häufigsten vorkommende Membranglykoprotein der Thrombozyten mit einer durchschnittlichen Oberflächenbesetzung von 60.000 bis 100.000 Rezeptoren pro Thrombozyt (Gawaz 1999). 70 % der Rezeptoren liegen konstitutiv auf der Oberfläche vor, die restlichen 30 % werden nach der Thrombozytenaktivierung aus den intrazellulären Speichern (offenes kanalikuläres System und α -Granula) an der Oberfläche exprimiert. Das GPIIb-IIIa besteht wie alle Integrine aus einer β_3 -Kette (GPIIIa) mit einem Molekulargewicht von 90 kDa und einer α_{IIb} -Kette, die 145 kDa schwer ist. Diese setzt sich wiederum aus einer großen (heavy chain, 125 kDa) und einer kleinen (light chain, 23 kDa) Untereinheit zusammen. Der Komplex aus GPIIb und GPIIIa ermöglicht in seiner aktivierten Form die Thrombozytenaggregation durch Fibrinogenbindung.

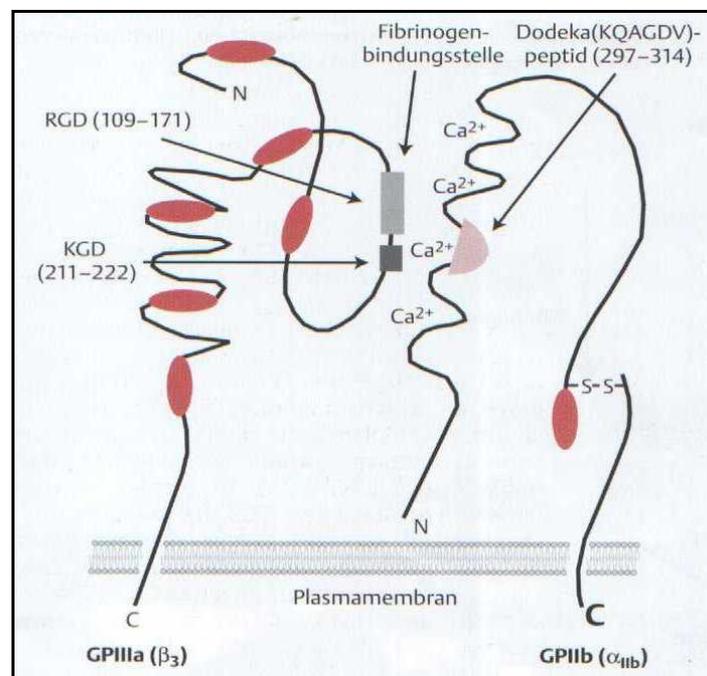


Abb. 7: Struktur des Glykoprotein-IIb-IIIa-Rezeptors (Fibrinogenrezeptor) (nach Gawaz 1999)

Um lösliches, plasmatisches Fibrinogen zu binden, muß der GPIIb-IIIa-Komplex aus einem **nichtaktivierten, niedrigaffinen Funktionszustand** in den aktivierten, hochaffinen Funktionszustand übergehen.

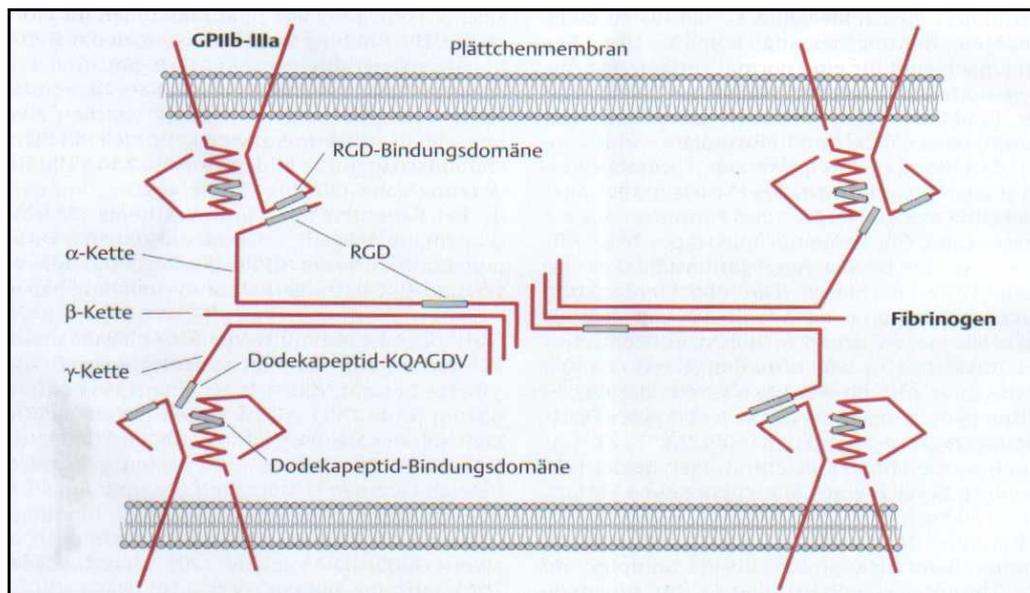


Abb. 8: Aggregation-Fibrinogenbrücke zwischen zwei GPIIb-IIIa-Molekülen (modifiziert nach Charo et al. 1994) (nach Gawaz 1999)

Dies bedeutet eine Konformationsänderung des GPIIb-IIIa-Komplexes mit einer Freilegung von hochaffinen Fibrinogenbindungsstellen. Die Bindung von löslichem Fibrinogen an die Thrombozytenoberfläche ist nun möglich (**ligandenbesetzter Funktionszustand**). Dies geschieht über bestimmte Aminosäuresignalsequenzen des Fibrinogens wie die RGD-Sequenz in der α -Kette (erkannt durch GPIIIa) und die KQAGDV-Sequenz am aminoterminalen Ende der γ -Kette (erkannt durch GPIIb). Die Bindung von Fibrinogen an den aktivierten GPIIb-IIIa-Rezeptor induziert eine weitere Konformationsänderung des Rezeptors mit der Freilegung spezifischer Bindungsstellen (LIBS = ligandeninduzierte Bindungsstellen) (Bennet 1988, Phillips 1988). Die ligandeninduzierte Konformationsänderung des Rezeptors vermittelt Mechanismen, die die irreversible Fibrinogenbindung an GPIIb-IIIa regulieren („postoccupancy events“) (Gawaz 1999). Ebenso verändert Fibrinogen bei Rezeptorbindung seine Konformation und exprimiert rezeptorinduzierte Bindungsstellen (RIBS). Andere RGD enthaltende Peptide wie der von-Willebrand-Faktor, Fibronectin und Vitronectin sind dabei in der Lage, die Fibrinogenbindung kompetitiv zu hemmen (Plow 1992). Des Weiteren können Peptide vom RGD- und KQAGDV-Typ an den nicht aktivierten GPIIb-IIIa-Rezeptor binden, ihn aktivieren und zur Konformationsänderung führen (intrinsische Aktivität von GPIIb-IIIa-Antagonisten) (Gawaz 1999).

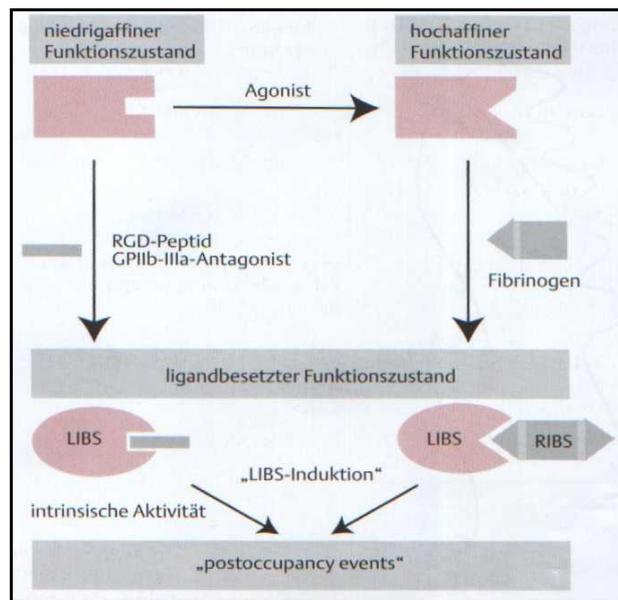


Abb. 9: Funktionszustände des thrombozytären Fibrinogenrezeptors GPIIb-IIIa (nach Gawaz 1999)

1.1.4 Immunologische Marker der thrombozytären Membranglykoproteine

Durch Inkubation spezifischer monoklonaler Antikörper kann der Funktionszustand des Rezeptors auf zirkulierenden Thrombozyten durchflußzytometrisch bestimmt werden. Dies erlaubt eine Beschreibung der Oberflächenexpression und des Konformationszustandes der thrombozytären Membranrezeptoren sowie deren Ligandenbindung (Michelson 1996; Shattil 1987).

Durch anti-CD41 wird die Oberflächendichte von GPIIb des Rezeptorkomplexes GPIIb-IIIa bestimmt. Für die Darstellung der Oberflächenexpression von GPIIIa wird anti-CD61 verwendet. Dies ist sowohl in aktiviertem als auch in ruhendem Funktionszustand möglich (Leytin 1996).

Weitere spezifische Antikörper erkennen den ligandenbestetzten Rezeptor (gerichtet gegen ligandenbesetzte Bindungsstellen = LIBS; LIBS-1 und PMI-1) (Ginsberg 1990). LIBS-Epitope befinden sich sowohl auf der GPIIb als auch auf der GPIIIa Untereinheit des Rezeptors. PMI-1 bindet aktivierungsabhängig am Carboxy-Ende der schweren Kette des GPIIb (Plow 1992). Anti-LIBS-monoklonale Antikörper wie LIBS-1 oder PMI-1 binden nur an den Rezeptor, wenn Fibrinogen gebunden ist.

Für die direkte quantitative Bestimmung des mit der aktivierten Thrombozytenmembran assoziierten Fibrinogens wurden Antikörper entwickelt, die gegen den Liganden Fibrinogen gerichtet sind (anti-Fibrinogen) (Warkentin 1990).

RIBS (rezeptor-induzierte Bindungsstelle) ist in der Lage, das in seiner Konformation veränderte Fibrinogen zu erkennen (Ginsberg 1990).

Anti-CD62P bindet ausschließlich an aktivierte Thrombozyten und ist ein Maß für die Degranulation der thrombozytären α -Granula (P-Selektin) (Hagberg 2000, Metcalfe 1997).

Anti-CD42b erkennt die Oberflächenexpression des Glykoproteins Ib (Tarnok 1999). Durch Echistatin (fluoreszenzkonjugierter RGD-haltiger Ligand) wird die Zugänglichkeit der GPIIb-IIIa-Bindungsstelle untersucht. Die Bindung von Echistatin an den GPIIb-IIIa-Rezeptorkomplex führt zu einer Konformationsänderung des Rezeptors und Thrombozytenaktivierung (Belisario 2000).

Um den Anteil des GPIIb-IIIa-Rezeptors zu ermitteln, der unter Therapie kein Abciximab gebunden hat, wurde in der vorliegenden Arbeit eine fluoreszenzkonjugierte Form von Abciximab benutzt (c7E3; ReoPro). c7E3 bindet sowohl an membranständige Rezeptoren als auch an Rezeptoren, die sich im offenen kanalikulären System (SCCS) und in den α -Granula befinden (Nurden 1999).

Einen Überblick über die thrombozytären Membranglykoproteine, ihre Bedeutung und rezeptorspezifischen monoklonalen Antikörper gibt Tabelle 1.

Glykoprotein	monoklonaler Antikörper	Vorkommen	Bedeutung
GPIb-V-IX	anti-CD42b	Thrombozytenmembran (25.000)	Adhäsionsrezeptor: aktivierungs- unabhängige Bindung von immobilisiertem vWF, Kollagen, Fibronectin, Laminin
GPIIb-IIIa		Thrombozytenmembran, kanalikuläres System, α -Granula (60.000-100.000)	Aggregationsrezeptor: aktivierungsabhängige Bindung von löslichem Fibrinogen, Fibronectin, Vitronectin, vWF
	anti-CD61		Oberflächenexpression der β 3-Kette
	anti-CD41		Oberflächenexpression der α IIb-Kette
	LIBS-1, PMI-1		Nachweis des ligandengebundenen GPIIb-IIIa
P-Selektin	CD62P	α -Granula der Thrombozyten, (12.000)	Degranulation von α -Granula

Tab. 1: Thrombozytäre Membranglykoproteine

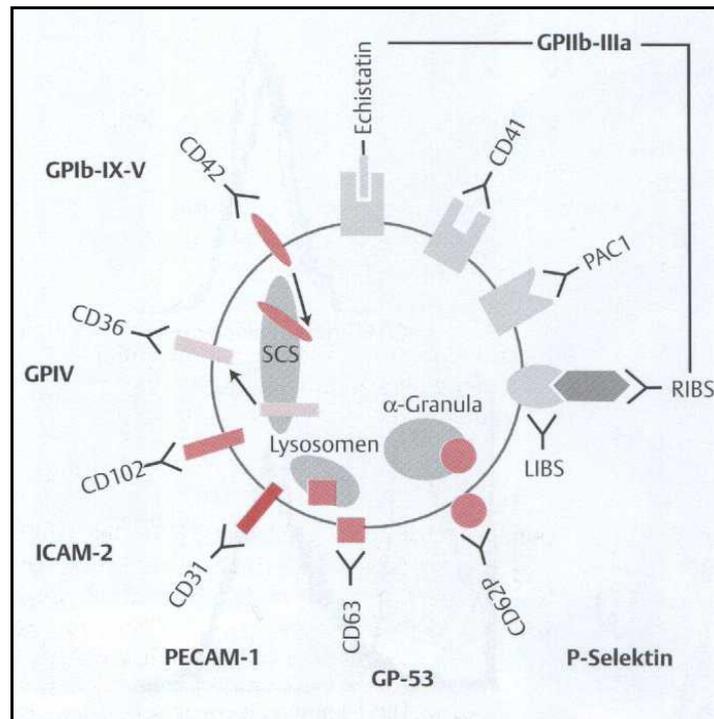


Abb. 10: Durchflußzytometrische Bestimmung immunologischer Oberflächenmarker. Mittels spezifischer Antikörper können Veränderungen der Membranglykoproteine auf der Thrombozytenoberfläche bestimmt werden. Antikörper, die gegen den Fibrinogenrezeptor gerichtet sind, können spezifische Funktionszustände des Rezeptors unterscheiden (anti-CD41 = komplexierter Fibrinogenrezeptor; PAC-1 = aktivierter Fibrinogenrezeptor; LIBS-1 = ligandenbesetzter Fibrinogenrezeptor). Antikörper gegen P-Selektin (anti-CD62P) und gegen GP53 (CD-63) erkennen die Degranulation der α -Granula bzw. der Lysosomen. Die Bindung von anti-CD42 an die Thrombozytenoberfläche nimmt durch Internalisierung des GPIb-Rezeptors nach Aktivierung ab (nach Gawaz 1999).

1.2 Antithrombozytäre Substanzen

In der Vergangenheit wurde eine Vielzahl von Medikamenten entwickelt, die diskrete Mechanismen der Thrombozyten beeinflussen. Einige derzeit gebräuchliche Substanzen greifen direkt in den intrazellulären Metabolismus der Thrombozyten ein, so z.B. durch Erhöhung der zyklischen Nukleotide oder durch Hemmung der Zyklooxygenase. Andere Substanzen beeinflussen über eine Interaktion mit membranständigen Rezeptoren (z.B. Blockierung des ADP-Rezeptors) diskrete Aktivierungswege oder inhibieren die Adhäsion (z.B. Blockierung des vWF-Rezeptors) bzw. Aggregation (Blockierung des Fibrinogenrezeptors) (Cannon 1995, Collier 1995, Schrör 1995).

1.2.1 *Acetylsalicylsäure*

Die erstmals 1887 durch den deutschen Chemiker F. Hoffmann synthetisierte Substanz wurde 1954 von Bounameaux in seiner Wirkung charakterisiert. Der inhibitorische Effekt auf die Thromboxan-Synthese wurde erst 1971 erkannt. Durch irreversible Acetylierung der thrombozytären Cyclo-Oxygenase hemmt Acetylsalicylsäure (ASS) die Bildung von Thromboxan A₂. Die antithrombotische Wirksamkeit bei kardiovaskulären Erkrankungen wurde in einer Vielzahl klinischer Studien unter Einschluß von insgesamt mehr als 30.000 Patienten belegt, weshalb die Gabe von ASS als „Goldstandard“ in der Therapie und Prophylaxe atherothrombotischer Krankheitsbilder gilt (Cohen 1976, Patrono 1994).

1.2.2 *Thienopyridine*

In experimentellen und klinischen Studien konnte die Bedeutung der ADP-induzierten Thrombozytenaktivierung für die arterielle Thrombose belegt werden. Die Thienopyridine Tiklopidin und Clopidogrel hemmen die ADP-induzierte Sekretion der α -Granula und verringern die scherkraftinduzierte Plättchenaggregation. Die Unterdrückung arterieller Thrombosen durch diese Substanzen ist seit mehr als 15 Jahren bekannt (Coukell 1997, Harker 1993).

1.2.3 *Fibrinogenrezeptorantagonisten*

In Anbetracht der zahlreichen Agonisten und Stoffwechselwege, die zur Thrombozytenaktivierung führen, sind pharmakologische Interventionen, die mit der Endstrecke der Thrombozytenfunktion interferieren, erfolgversprechender als therapeutische Ansätze zur Hemmung der Thrombozytenaktivierung. Die wichtigsten Thrombozytenfunktionen wie Adhäsion an die verletzte Gefäßwand, Aggregation und Interaktion mit anderen Blutzellen werden durch membranständige Glykoproteine vermittelt (Lefkovits 1995).

Coller et al. waren die ersten, die einen gegen den für Thrombozyten und Megakaryozyten spezifischen GPIIb-IIIa-Rezeptor gerichteten monoklonalen Mausantikörper (7E3) entwickelten (Coller 1983). Zur Minderung einer möglichen komplementaktivierenden und immunogenen Aktivität wurden das Fc-Fragment entfernt und die Fab-Fragmente mit konstanten Regionen humanen Immunglobulins zusammengebracht. Das hieraus entstandene c7E3 ist somit ein humanisiertes chimerisches Fab-Fragment, das nur noch die variable Region des ursprünglichen Mausantikörpers besitzt (Gawaz 1999).

c7E3 (Abciximab) führt nach Gabe zu einer sofortigen und beinahe vollständigen Blockade des GPIIb-IIIa-Rezeptors. Damit werden die Fibrinogenbindung an die Thrombozyten, deren Aggregation und die nachfolgende Thrombusbildung effektiv gehemmt, die ursächlich mit der Entstehung abrupter Gefäßokklusionen und ischämischer Ereignisse zusammenhängen.

Alle anderen GPIIb-IIIa-Rezeptorantagonisten beruhen auf den Peptidsequenzen RGD (Arg-Gly-Asp) oder KGD (Lys-Gly-Asp). Um sie vor enzymatischem Abbau zu schützen und ihre Wirkung zu verstärken, wurden zyklische Peptide hergestellt, von denen lediglich das auf der KGD-Sequenz beruhende Integrelin in Phase-III-Studien getestet wurde. Synthetische RGD-Mimetika wie das intravenös wirksame Tirofiban und Lamifiban sowie die oral wirksamen Antagonisten Xemilofiban, Fradafiban, Orbofiban und Sibrafiban wurden in Phase-II- und -III-Studien geprüft.

Eine Reihe von groß angelegten Studien zeigte die klinische Wirksamkeit der Therapie mit GPIIb-IIIa-Rezeptorantagonisten bei Koronarintervention.

Die erste groß angelegte Studie mit Glykoprotein-IIb-IIIa-Rezeptorantagonisten in der interventionellen Kardiologie war die EPIC-Studie („evaluation of c7E3 for the prevention of ischemic complications“) (The EPIC Investigators 1994). Es wurden 2.099 Patienten mit erhöhtem Risiko für eine Koronarintervention in die Studie eingeschlossen. Sie wurden drei Behandlungsplänen zugeteilt: Bolus plus zwölfstündige Infusion von Abciximab (0,25 mg/kg, 10µg/min), nur Bolus von Abciximab oder Placebo. Alle Patienten erhielten Acetylsalicylsäure vor der Intervention und Heparin während und für 12 bis 24 Stunden nach der Intervention. Der kombinierte Endpunkt von Tod, Myokardinfarkt, dringlicher Re-PTCA, koronarer Bypasschirurgie, abrupstem Gefäßverschluß oder intra-aortaler Gegenpulsation wegen erneuter Ischämie innerhalb von 30 Tagen wurde durch Bolus und Infusion von Abciximab um 35 % im Vergleich zur Placebogruppe gesenkt ($P = 0,008$) (The EPIC Investigators). Bei alleiniger Abciximabbolusgabe wurde diese Rate nur um 10 % gesenkt ($P = 0,43$) (The EPIC Investigators 1994). Zudem zeigte sich eine deutliche Reduktion von erneuten kardialen Ereignissen während der folgenden sechs Monate sowie nach ein und drei Jahren. Der gravierende Nachteil der EPIC-Studie bestand in Blutungskomplikationen. Zu schweren Blutungen kam es unter der Therapie mit Bolus und Infusion bei 14 % der Patienten. Dagegen betrug die Häufigkeit schwerer Blutungen in der Placebo-Gruppe nur sieben Prozent. Die meisten schweren Blutungen traten am femoralen Gefäßzugang oder nach koronarer Bypassoperation auf (The EPIC Investigators 1994).

Die Nachfolgestudie EPILOG („evaluation of PTCA to improve longterm outcome by c7E3 glycoprotein receptor blockade“), die 2.792 Patienten mit normalem PTCA-Risiko einschloß, zeigte, daß Blutungskomplikationen durch Dosisreduktion der begleitenden Heparintherapie unter Erhalt der Effektivität reduziert werden können. In der Therapie-Gruppe mit Abciximab plus Standardheparin war lediglich die Häufigkeit leichter Blutungen im Vergleich zur Placebo-Gruppe erhöht. Der unter Abciximabtherapie beobachtete Langzeiteffekt konnte jedoch nicht bestätigt werden (The EPILOG Investigators 1997).

In der CAPTURE- Studie („chimeric 7E3 anti-platelet therapy in refractory unstable angina treatment“) (1.265 Patienten) wurde gezeigt, daß bei instabiler Angina pectoris eine 18- bis 24-stündige Behandlung mit Abciximab vor PTCA innerhalb der ersten 30 Tage im Vergleich zur Therapie mit Aspirin und Heparin zu einer signifikanten Senkung der Gesamtrate von Tod, Myokardinfarkt und dringlicher Intervention von 15,9 % auf 11,3 % führte (P = 0,012) (The CAPTURE Investigators 1997, Van den Brand 1999).

Die RAPPORT-Studie („ReoPro in acute myocardial infarction and primary PTCA organization and randomized trial“) (483 Patienten) ergab bei Abciximabbolusgabe mit anschließender zwölfstündiger Abciximabinfusion im Vergleich zur Placebogabe bei direkter PTCA im akuten Myokardinfarkt in der akuten Phase (30 Tage) eine signifikante Reduktion der gemeinsamen Endpunkte Tod, Re-Infarkt oder dringliche Re-Intervention (P = 0,034) (The RAPPORT Investigators 1998).

Die EPISTENT-Studie („evaluation of platelet IIb/IIIa inhibitor for stenting“) schloß 2.399 Patienten ein, die für eine Stentimplantation geeignet waren (Topol 1999). Die Patienten wurden drei Behandlungsarmen zugeteilt: Standardheparin (100 IE/kg), Placebo und Stentimplantation; niedrigdosiertes Heparin (70 IE/kg), Abciximabbolus mit anschließender zwölfstündiger Abciximabinfusion und Stentimplantation; niedrigdosiertes Heparin (70 IE/kg), Abciximabbolus mit anschließender zwölfstündiger Abciximabinfusion und PTCA (Topol 1999, The EPISTENT Investigators 1998). Zusätzlich wurde allen Patienten Acetylsalicylsäure und Tiklopidin verabreicht. Stentimplantation und Abciximabgabe sowie PTCA und Abciximabgabe führten zu einer signifikanten Reduktion der Studienendpunkte wie Tod, Myokardinfarkt und Re-Angioplastie im Vergleich zur Stentimplantation mit alleiniger Heparin-gabe (10,8 %: Stentimplantation und alleinige Heparin-gabe versus 6,9 %: PTCA und Abciximab [P = 0,007] versus 5,3 %: Stentimplantation und Abciximabgabe [P = 0,001]) (Adgey 1998; Topol 1999, The EPISTENT Investigators 1998). Zusätzlich wurde bei Abciximabgabe bei Stentimplantation im Vergleich zur alleinigen Heparin-gabe bei Stentimplantation eine Reduktion der Mortalitätsrate von 57 % innerhalb der folgenden zwölf Monate verzeichnet (Topol 1999).

Peptidische GPIIb-IIIa-Rezeptorantagonisten wie die Eptifibatide (Integrelin) (IMPACT-II-Studie [“integrelin to manage platelet aggregation to combat thrombosis“], ESPRIT-Studie) (Ferguson 2000, The IMPACT-II Investigators 1997) weisen die Aminosäuresequenz KGD auf. Diese greifen im Bereich der RGD-Bindungsregion des GPIIb-IIIa-Rezeptors an. Die nicht-peptidischen Rezeptorantagonisten Lamifiban und Aggrastat (Tirofiban) (RESTORE-Studie [“randomized efficacy study of tirofiban for outcomes and restenosis“]) (The RESTORE-Investigators 1997) sind synthetische RGD-Mimetika. Sie imitieren die geometrischen, stereotaktischen und Oberflächenladungseigenschaften der RGD-Sequenz und hemmen so die Fibrinogenbindung (Coller 1995, Mousa 1996).

Zu den neueren GPIIb-IIIa-Rezeptorantagonisten zählen YM 337, ein Fab-Fragment eines humanisierten monoklonalen Antikörpers gegen GPIIb-IIIa, und EMD 122347, ein peptidähnlicher GPIIb-IIIa Rezeptorantagonist mit Benzamidinoxazolidinon-Struktur. Letzteres wird enteral resorbiert und ist somit für die orale Verabreichung geeignet (Kuwahara 1998, Kamm 1999).

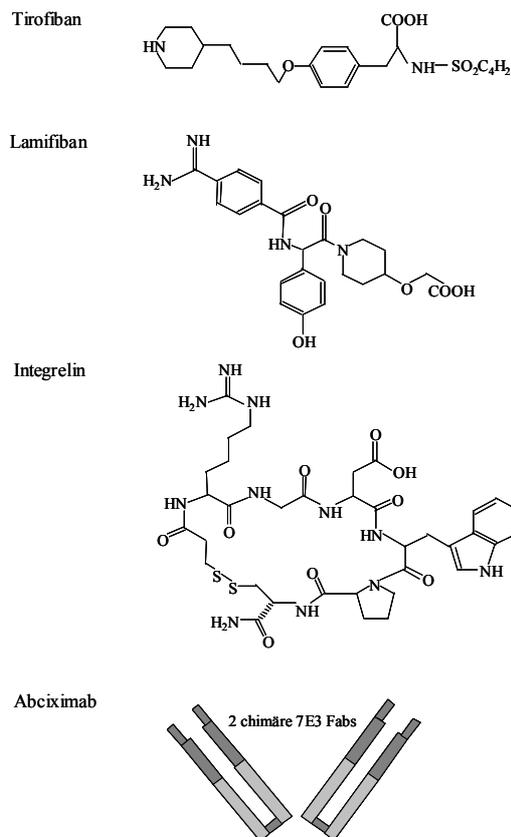


Abb. 11: Strukturformeln verschiedener GPIIb-IIIa-Antagonisten

Während das Wirkungsprinzip bei den derzeit verfügbaren Fibrinogenrezeptorantagonisten identisch ist, bestehen hinsichtlich struktureller Eigenschaften, Bindungsspezifität, Pharmakokinetik und Pharmakodynamik erhebliche Unterschiede (Coller 1995, Mousa 1996, Kereiakes 1999, Madan 1998).

Eptifibatide, Tirofiban und Lamifiban sind kleine Moleküle (500 Da bis 800 Da) und dadurch in der Lage, in die GPIIb-IIIa-Rezeptor-Bindungsfurche für Liganden vom RGD-Typ zu passen (Tcheng 1999). Abciximab dagegen (45.000 Da) bedeckt den gesamten GPIIb-IIIa-Komplex, wobei es mit einem komplexen Ligandenbindungsort der β_3 -Untereinheit des Fibrinogenrezeptors interferiert (Tcheng 1999). Somit besteht durch Abciximab auch eine Blockade des Vitronektinrezeptors ($\alpha_v\beta_3$), der die β_3 -Untereinheit des GPIIb-IIIa-Rezeptors enthält und vornehmlich auf Endothelzellen und glatten Muskelzellen exprimiert wird (Coller 1999). Der Vitronektinrezeptor spielt eine zentrale Rolle bei der Migration und Proliferation glatter Muskelzellen und bei der Neointimabildung nach Gefäßwandverletzung. Daher wird neben der Aggregationshemmung auch ein antiproliferativer Mechanismus von Abciximab diskutiert (Gawaz 1999, Kleiman 1999). Über Bindung an den MAC-1-Rezeptor verringert Abciximab die Adhäsion von Monozyten an die verletzte Gefäßwand und wirkt damit potentiell antiinflammatorisch. Eptifibatide, Tirofiban und Lamifiban sind kompetitive Rezeptorantagonisten. Ihre antiaggregatorische Wirkung ist proportional abhängig von der Plasmakonzentration. Maximale Plasmaspiegel werden fünf Minuten nach i.v.-Gabe gemessen. Es handelt sich um niedrigaffine Antikörper mit einer relativ langen Plasmahalbwertszeit ($\leq 2,5$ Stunden) und kurzer Wirkdauer am Fibrinogenrezeptor. Die Hemmung der Plättchenaggregation ist durchschnittlich in zwei bis vier Stunden wieder aufgehoben (Kleiman 1999).

Der hochaffine Antikörper Abciximab bindet innerhalb von Minuten an zirkulierende Thrombozyten mit einer GPIIb-IIIa-Rezeptorblockade von $< 80\%$ (Plasmahalbwertszeit $\cong 26$ Minuten) (Kleiman 1999). Aufgrund der hohen Antikörperaffinität besteht zwölf Stunden nach Abciximab-Gabe noch eine etwa 70% ige Rezeptorblockade.

Wie aus großen Studien hervorgeht, wird die Behandlung mit GPIIb-IIIa-Antagonisten im allgemeinen gut vertragen. Neben allgemeinen Nebenwirkungen wie Hypotension, Erbrechen und Kopfschmerzen mit einer Häufigkeit von $5 - 15\%$ existiert als Hauptnebenwirkung das Auftreten von unerwünschten Blutungen. Im Gegensatz zu konservativ behandelten Patienten muß bei Patienten mit der Notwendigkeit einer koronaren Intervention oder

Bypass-Operation bei gleichzeitiger Thrombozytopenie mit erhöhten Blutungskomplikationen gerechnet werden. So kam es in der EPIC-Studie unter gleichzeitiger Heparin-gabe zu signifikant vermehrten Blutungskomplikationen als in der Placebogruppe (14 % vs. 7 %). Wie die Nachfolgestudie EPILOG zeigte, war ein ausschlaggebender Faktor dafür die Verweildauer des Gefäßzuganges. Dagegen bestand hinsichtlich der Inzidenz von intrakraniellen Blutungen unter Abciximab-Therapie (EPIC, EPILOG und CAPTURE) im Vergleich zur Placebogruppe kein signifikanter Unterschied (0,19 % vs. 0,13 %). Ähnliche Ergebnisse ergaben sich für Eptifibatide, Tirofiban und Lamifiban (Gawaz 1999).

Eine weitere Hauptnebenwirkung von GPIIb-IIIa-Antagonisten besteht im Auftreten von vorwiegend sich akut (innerhalb der ersten 24 Stunden nach Therapiebeginn) entwickelnder Thrombozytopenien (> 100.000 Thrombozyten/ μl) (bis zu 5 % der behandelten Fälle) (Kereiakes 2000, Tcheng 2000). Insbesondere bei schweren Thrombozytopenien (< 20.000 Thrombozyten/ μl) in Verbindung mit GPIIb-IIIa-Antagonisten und zusätzlicher Antithrombotika wie ASS und Heparin stellt diese medikamenteninduzierte Thrombozytopenie einen potentiell lebensbedrohlichen Zustand dar. Die Therapie der Wahl besteht im Absetzen des Fibrinogenrezeptorantagonisten und Infusion von Plättchenkonzentraten, die im Regelfall zu einer raschen Normalisierung der Thrombozytenzahl führen (Jubelirer 1999).

Die Inzidenz signifikanter Thrombozytopenien hängt von der Art des GPIIb-IIIa-Rezeptorantagonisten ab (Abciximab: 0,4 % bis 5,6 %, Aggrastat: 1,2 % bis 1,8 %, Eptifibatide: 2,6 % bis 3,0 %, Lamifiban: 0,8 % bis 2,8 %) (Gawaz 1999, Tcheng 2000, Madan 1999).

2 Zielsetzung

Studien haben gezeigt, daß eine gesteigerte periinterventionelle Aktivierung von Thrombozyten für das Auftreten thromboembolischer Komplikationen bedeutsam ist. Trotz herkömmlicher antithrombotischer Therapien mit Acetylsalicylsäure und Heparin kommt es vornehmlich nach Implantation von Gefäßstützen zu einer gesteigerten Thrombozytenaktivierung. Durch die Entwicklung neuer antithrombozytärer Substanzen wie GPIIb-IIIa-Rezeptor-Antagonisten konnte in groß angelegten Studien gezeigt werden, daß präinterventionelle Abciximab-Gabe und anschließende zwölfstündige Abciximab-Infusion die peri- und postinterventionelle Rate ischämischer Komplikationen signifikant senken kann.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, den Funktions- und Konformationszustand thrombozytärer Membranglykoproteine unter Abciximabtherapie bei Patienten nach koronarer Stentimplantation zu beschreiben. Dabei wurden folgende Thrombozytenfunktionen gemessen:

- ✓ Thrombozytenaggregation
- ✓ Degranulation der Thrombozyten
- ✓ Exposition thrombozytärer Membranglykoproteine

Desweiteren stellt sich die Frage, ob unter Abciximab-Therapie ein Zusammenhang zwischen dem Funktionszustand der thrombozytären Membranglykoproteine und einer möglichen Entwicklung einer Thrombozytopenie besteht.

Zur Klärung dieser Fragestellungen untersuchten wir die Thrombozytenfunktion vor, während und nach Abciximab-Therapie durch aggregometrische und durchflußzytometrische Verfahren und bestimmten den Verlauf der Thrombozytenzahl im peripheren Blut.

3 Patienten und Methodik

3.1 Studienpopulation

In der Studie wurde der Einfluß der Fibrinogenrezeptorantagonisierung durch Abciximab auf die Thrombozytenfunktion, den Aktivierungszustand der thrombozytären Membranglykoproteine sowie die Aggregationsfähigkeit der Thrombozyten nach Stentimplantation untersucht. Die Studiengruppe bestand aus 20 konsekutiven Patienten mit symptomatischer ischämischer Herzerkrankung. Bei allen Patienten wurde eine koronare Ballonangioplastie mit Stentimplantation durchgeführt.

Von der Studie ausgeschlossen wurden Patienten mit Blutgerinnungsstörungen oder anderen die Thrombozytenfunktion beeinflussenden Erkrankungen wie z.B. Multiorganversagen, Sepsis, chronische Entzündungen, chronisches Nierenversagen, aktive Blutungen oder schwere Anämie (Gawaz 1994, Gawaz 1994, Gawaz 1995, Gawaz 1995). Als Ausschlusskriterien galten außerdem ein akuter Myokardinfarkt und Kontraindikationen für eine Antikoagulationstherapie.

Alle Patienten wurden vor Studienbeginn aufgeklärt und gaben eine schriftliche Einverständniserklärung bezüglich ihrer Studienteilnahme ab. Die Genehmigung des Studienprotokolls durch die Technische Universität München lag vor.

Eine Übersicht über die demographischen (Tab. 2) und angiographischen Daten (Tab. 3) sind in den folgenden Tabellen aufgeführt.

Geschlecht (M/W)	13/7
Alter (J) (Mittelwert+SD, Min.-Max)	66 ± 7 (45-79)
Koronares Risikoprofil, n (%)	
Arterieller Hypertonus	11 (55)
Hypercholesterinämie	13 (65)
Diabetes mellitus	5 (25)
Nikotinabusus	4 (20)
Anamnestischer Myokardinfarkt, n (%)	11 (55)
Eingeschränkte linksventrikuläre Funktion	3 (15%)
Instabile Angina pectoris, n (%)	2 (10)
Mehrfäßerkrankung	12 (60)
Frühere PTCA, n (%)	7 (35)
Angioplastiertes Koronargefäß, n (%)	
LAD	5 (25)
LCx	6 (30)
RCA	5 (25)
Bypass	4 (20)

Tab. 2: *Demographische Daten der Studienpatienten (n = 20); Abkürzungen: PTCA, perkutane transluminale Koronarangioplastie; LAD, left anterior descending coronary artery; LCx, left circumflex coronary artery; RCA, right coronary artery*

Referenzdurchmesser (mm)	3,0 ± 0,5
Minimal. Lumendurchmesser (mm):	
vorher	0,4 ± 0,2
nachher	2,9 ± 0,6
Stenosegrad (%):	
vorher	84,3 ± 8,7
nachher	7,6 ± 5,9
Maximaler Inflationsdruck (atm)	10,0 ± 3,8
Verhältnis Ballon/Gefäß	1,1 ± 0,1

Tab. 3: *Angiographische Daten der Studienpatienten (n = 20); dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung*

3.2 Stentimplantation und Verabreichung der Studienmedikation

Bei allen Studienpatienten wurde eine koronare Ballonangioplastie mit Stentimplantation durchgeführt (über transfemorale Zugang nach Judkins-Technik). Die Koronargefäße wurden mittels anionischem Kontrastmittel (Solustrast 370, Byk-Gulden) dargestellt. Die Entfernung des arteriellen Zugangs und Anlage eines Druckverbandes erfolgte vier Stunden nach Intervention.

Vor der koronaren Intervention erhielten die Studienpatienten intravenös einen Abciximabbolus (0,25 mg/kg Körpergewicht), einen gewichtsadaptierten Bolus unfraktioniertes Heparin (70 IE/kg Körpergewicht) und 500 mg Acetylsalicylsäure (Aspisol). Im Anschluß daran folgte eine zwölfstündige Abciximabinfusion (10 µg/min). Zusätzlich wurde noch am selben Tag sowie an den darauffolgenden Tagen den Patienten zweimal täglich 100 mg Acetylsalicylsäure (Aspirin, Bayer) und zweimal täglich 250 mg Tiklopidin (Tiklyd) oral appliziert.

3.3 Probengewinnung

Die Blutentnahmen fanden zu insgesamt sieben Zeitpunkten statt:

- ✓ kurz vor Gabe des Abciximabbolus
- ✓ kurz nach Gabe des Abciximabbolus
- ✓ nach zwölf Stunden (Insfusionsende von Abciximab)
- ✓ nach 24 Stunden
- ✓ nach 48 Stunden
- ✓ nach 72 Stunden
- ✓ nach 96 Stunden.

Bis zur Entfernung des arteriellen Zugangs wurden die Proben aus der Arteria femoralis entnommen (innerhalb der ersten vier Stunden). Daraufhin wurden die Blutproben aus einer peripheren Oberarmvene bei mäßiger Stauung entnommen. Für die durchflußzytometrische Messung wurden 0,5 ml Vollblut in ein mit 1 ml CyfixII gefülltes Polypropylenröhrchen entnommen. Nachdem dieses über zehn Minuten auf Eis lag (Fixationszeit), wurde der Inhalt mit 50 ml PBS verdünnt. Bis zur Weiterverarbeitung innerhalb der nächsten 24 Stunden wurden die Proben bei 4° Celsius unter Lichtausschluß konserviert. Weitere 2,5 ml EDTA-Blut wurden zur Bestimmung der Thrombozytenzahl entnommen. Bei Thrombozytopenie erfolgte eine Kontrollbestimmung im Zitratblut. Für die aggregometrische Messung wurden 20 ml mit 3,8 % Zitrat antikoaguliertes Blut abgenommen. Für die Bestimmung der Serumchemie verwendeten wir ein Serumröhrchen. Aus früheren Studien weiß man, daß diese Abnahmetechnik zu keiner meßbaren in-vitro-Aktivierung der Thrombozyten führt (Frelinger 1991).

3.4 Probenaufbereitung

Für die aggregometrische Messung benötigte man Plättchen-reiches-Plasma (PRP). Dieses wurde aus Zitrat-Blut durch Zentrifugation (900 Umdrehungen pro Minute bei 20° Celsius über 10 Minuten) gewonnen. Der PRP-haltige Überstand wurde daraufhin mit einer Eppendorf-Pipette (Fa. Eppendorf, Hamburg, Deutschland) vorsichtig in ein 15 ml Kunststoffgefäß (Falcon, Fa. Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland) abpipettiert und mit leichten Bewegungen vermisch. Für die Herstellung von Plättchen-armem-Plasma (PPP) wurde 1 ml PRP in ein 2 ml Eppendorf-Gefäß überführt und über drei Minuten mit 1300 Umdrehungen pro Minute bei 20° Celsius zentrifugiert. Von diesem Überstand dienten 500 µl PPP, die in eine silikonisierte Glasküvette (Fa. Bio/Data, Horsham, USA) pipettiert wurden,

als Null- und Referenzwert. In eine zweite Glasküvette wurden 450 µl PRP, vermischt mit 50 µl Chrono-Lume (Fa. Nobis, Endingen, Deutschland), gegeben. Gleich im Anschluß daran erfolgte die Messung der Aggregation.

Für die durchflußzytometrische Analyse wurden die mit CyfixII fixierten Thrombozyten mit fluorochrommarkierten plättchenspezifischen monoklonalen Antikörpern aufbereitet. In vorher beschrifteten Reagenzgläsern (FACS-Falcon-Röhrchen, Fa. Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland) wurden jeweils 40 µl CyfixII-Blut mit 5 µl spezifischem PE-gelabeltem anti-CD42b und 5 µl eines spezifischen FITC-markierten Antikörpers (anti-CD41, anti-CD61, anti-CD62P, c7E3) angesetzt, so daß man jeweils ein Gesamtvolumen von 50 µl erhielt. Nach einer Inkubationzeit von fünfzehn Minuten bei Raumtemperatur unter Lichtausschluß ohne Agitation wurde die Antikörperbindung durch Zugabe von jeweils 50 µl einer 0,5 %igen-Paraformaldehyd-PBS-Lösung (ph 7,4) (Fa. Sigma, Deisenhofen, Deutschland) gestoppt. Bis zur Messung im Durchflußzytometer (innerhalb von 24 Stunden) wurden die Proben unter Lichtausschluß bei 4° Celsius aufbewahrt.

Bereits in früheren Studien hat sich das hier verwendete Studienprotokoll als reproduzierbar und klinisch geeignet erwiesen (Gawaz 1991, Gawaz 1994, Gawaz 1995).

3.5 Aggregometrische Messung der Thrombozyten

Die Bestimmung der Thrombozytenaggregation ist die heute gebräuchlichste Methode für die Thrombozytenfunktionsdiagnostik. Sie erfolgt nach dem turbidimetrischen Verfahren nach Born (Born 1963).

Das Prinzip dieser Methode ist folgendes: PRP wird in silikonisierte Glasküvetten pipettiert und unter Verwendung eines Rührfisches mittels Magnetrührer durchmischt. Durch Photometrie wird die plättchenbedingte Trübung der Suspension anhand einer Referenzküvette (500 µl PPP) bestimmt. Der Grad der Trübungsänderung ist ein Maß der Aggregation, die als Funktion der Zeit mittels Schreiber in Form einer Kurvenform kontinuierlich aufgezeichnet wird. Nach Zugabe des stimulierenden Plättchenagonisten ADP zu PRP kommt es zu einer Formveränderung bzw. Aggregation der Thrombozyten. Beide Phänomene beeinflussen die Lichttransmission. Die zunächst eintretende Formveränderung der Plättchen äußert sich in einer Zunahme der Trübung bzw. Abnahme der Lichttransmission. Die daraufhin ansteigende Aggregationskurve ist bedingt durch eine Abnahme der Trübung und Zunahme der Lichttransmission (primäre, noch reversible Aggregation). Danach ist diese im weiteren Verlauf entweder wieder rückläufig (Deaggregation) oder geht nach vorübergehendem Erreichen eines Plateaus (biphasische Aggregation) in die zweite Phase der Aggregation über (sekundäre irreversible Aggregation). Ausgewertet werden die maximale Amplitude der Aggregati-

onskurve (in Prozent), die Aggregation nach fünf Minuten und die maximale Steigung der Kurve (größte Anstiegsgeschwindigkeit der Aggregationsreaktion). Die maximale Steigung der Kurve (slope) errechnet sich aus dem Quotienten a durch b.

Um die ATP-Freisetzung aus dichten Granula der Plättchen zu bestimmen, wurden gleichzeitig zur Aggregation dem PRP (450 μ l) 50 μ l Chrono-Lume-Reagenz hinzugefügt. Dabei handelt es sich um ein Luziferin-Luziferase-Reagenz, das durch Reaktion mit ATP luminesziert. Durch einen Photomultiplier ist es möglich, die Lumineszenz zu messen und über einen Schreiber kontinuierlich zu registrieren. Um dies auch quantitativ bestimmen zu können, wurden am Ende jeder Messung 5 μ l ATP-Standard (Fa. Sigma, Deisenhofen, Deutschland) hinzugegeben. Dies entspricht einer Stoffmenge von 2 μ mol ATP. Die Freisetzungsreaktion wurde nach 2,5 Minuten, 5 Minuten sowie in ihrer maximalen Freisetzung bestimmt.

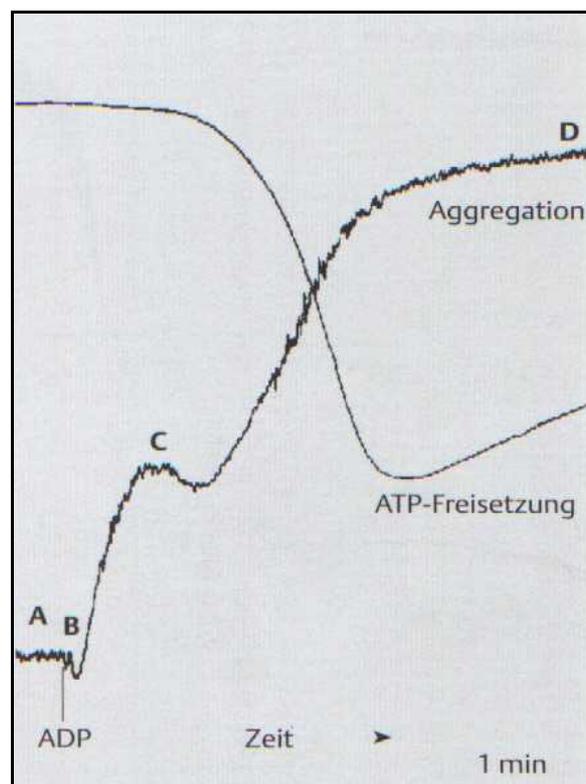


Abb. 12 : Lichtaggregometrie und Luminometrie: Anhand der Aggregationskurve wurde die Steigung (slope), maximale Aggregation und Aggregation nach fünf Minuten bestimmt. Bei der ATP-Freisetzung wurde der maximale Ausschlag, nach 2,5 Minuten und nach 5 Minuten bestimmt und ins Verhältnis zu einer Standard-Dosis von ATP gesetzt (nach Gawaz 1999)

Sowohl die Messung der Aggregation als auch der ATP-Freisetzung wurden am Zwei-Kanal-Chronolog-Aggregometer (Fa. Nobis, Endingen, Deutschland) bei 37° Celsius durchgeführt. Die Verstärkung für die Aggregation stand konstant auf 0,1 Volt, die Verstärkung der ATP-Freisetzung auf 0,5 Volt. Der Papiervorschub war auf 2 cm pro Minute eingestellt.

Als Agonist wurden den Messungen nach vorheriger Nulleinstellung jeweils 2 µmol ADP, 5 µmol ADP und 20 µmol ADP hinzugefügt. Nun wurde die Aggregationskurve über fünf Minuten registriert. Nach Ablauf wurden zur Konzentrationsbestimmung des freigesetzten ATP 5 µl ATP-Standard zugegeben.

3.6 Monoklonale Antikörper und Reagenzien

Durch Inkubation spezifischer monoklonaler Antikörper kann der Funktionszustand des Rezeptors auf zirkulierenden Thrombozyten durchflußzytometrisch bestimmt werden.

Die zur Beschreibung des Funktionszustandes der thrombozytären Glykoproteine verwendeten monoklonalen Antikörper lagen als direkte Fluorescein-Isothiocyanat-Konjugate (FITC) vor.

Durch anti-CD41 (Fa. Immunotech, Marseille, Frankreich) wird die Oberflächendichte von GPIIb-IIIa bestimmt, sowohl in aktiviertem als auch in ruhendem Funktionszustand.

Anti-CD62P (Fa. Immunotech, Marseille, Frankreich) bindet ausschließlich an aktivierte Thrombozyten und ist ein Maß für die Degranulation von α -Granula (P-Selektin).

Für die Darstellung der Oberflächenexpression von GPIIIa wurde anti-CD61 (Fa. Immunotech, Marseille, Frankreich) verwendet.

Um den Anteil des GPIIb-IIIa-Rezeptors zu ermitteln, der unter Therapie kein Abciximab gebunden hat, wurde eine fluoreszenzkonjugierte Form von Abciximab benutzt (c7E3; ReoPro). Es wurde in einer PD Sepharose Säule (Pharmacia) gefiltert und anschließend mit FITC markiert.

Zur Bestimmung der unspezifischen Membranfluoreszenz wurde ein irrelevanter FITC-markierter monoklonaler Antikörper (Fa. Dianova, Hamburg, Deutschland) verwendet.

Die Bestimmung der Thrombozytenzahl wurde freundlicherweise von der Abteilung für Klinische Chemie des Deutschen Herzzentrums (Dr. med. Braun) durchgeführt.

3.7 Durchflußzytometrische Messung der Thrombozyten

Die Durchflußzytometrie ermöglicht in Verbindung mit fluorochrommarkierten monoklonalen Antikörpern, spezifische Veränderungen der aktivierten Thrombozytenoberfläche zu charakterisieren. Sowohl der aktivierte als auch der inaktive Zustand können durch diese Methode bestimmt werden (Ginsberg 1990, Ruf 1995).

Eine der wichtigsten klinischen Aufgaben der Durchflußzytometrie ist der Nachweis thrombozytärer Membranglykoproteine zur Diagnose prothrombotischer Erkrankungen wie Angina pectoris, Myokardinfarkt, pAVK etc. (Abrams 1991, Gawaz 1994, Michelson 1996).

Die Analyse sämtlicher Blutproben wurde an einem Zwei-Watt-Argonlaser „FACScan-Durchflußzytometer“ (Fa. Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland) durchgeführt. Mittels Standard Fluoreszenz-Mikrobeads (Calibrite®, Fa. Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland) wurde das Gerät kalibriert.

Die „Zweifarbenvollblutmethode“ ist derzeit die Methode der Wahl zur durchflußzytometrischen Charakterisierung der Thrombozytenfunktion. Die Methode ermöglicht es, die Plättchen aufgrund ihrer Größe und Oberflächenbeschaffenheit anhand ihres charakteristischen Streulichtverhaltens sowie anhand ihrer spezifischen Fluoreszenz zu identifizieren. Jede einzelne Zelle wird in einem konstanten Fluß durch einen Laserstrahl detektiert. Das Streulicht und die Fluoreszenz werden durch spezifische Photodioden registriert.

Für die Untersuchung der Exposition thrombozytärer Membranglykoproteine werden die Blutplättchen mit spezifischen monoklonalen Antikörpern inkubiert. Die genannten Antikörper wurden im vielfachen Überschuß eingesetzt und lagen in gesättigten Konzentrationen vor. Um die Thrombozyten von Erythrozyten, Leukozyten und Detritus unterscheiden zu können, wurden sie mit der plättchenspezifischen CD42b-Phycoerythrin-Fluoreszenz (PE) markiert. Gleichzeitig wurden die Plättchen anhand ihrer spezifischen Lichtstreuung (Vorwärtsstreulicht) identifiziert (Zwei-Parameter-Darstellung). Dabei wurde der Registrierbereich vor jeder Meßreihe konstant darauf eingestellt (Ginsberg 1990, Shattil 1987).

Zur Beschreibung der Oberflächenexpression und des Funktionszustands waren die Blutproben zusätzlich mit einem Fluorescein-Isothiocyanat-konjugiertem Antikörper (FITC) inkubiert worden. Die Darstellung erfolgte in Form eines Histogramms (Ein-Parameter-Darstellung). Je Probe wurden 5.000 Fluoreszenzereignisse bei einer maximalen Flußrate von 60 Ereignissen pro Sekunde registriert. Die gemessene Fluoreszenzintensität wurde in einer Verteilungskurve dargestellt. Über deren Mittelwert war nun eine Aussage über die quantitative Antikörperbindung und damit über die Oberflächenexposition thrombozytärer Membranglykoproteine und deren Funktionszustand möglich. Die Immunfluoreszenzintensität der Antikörper, die nur in aktiviertem Zustand an Rezeptoren binden (anti-CD62P), wurde in Prozentpositiven (Prozentsatz nach Abzug der unspezifischen Fluoreszenz) angegeben.

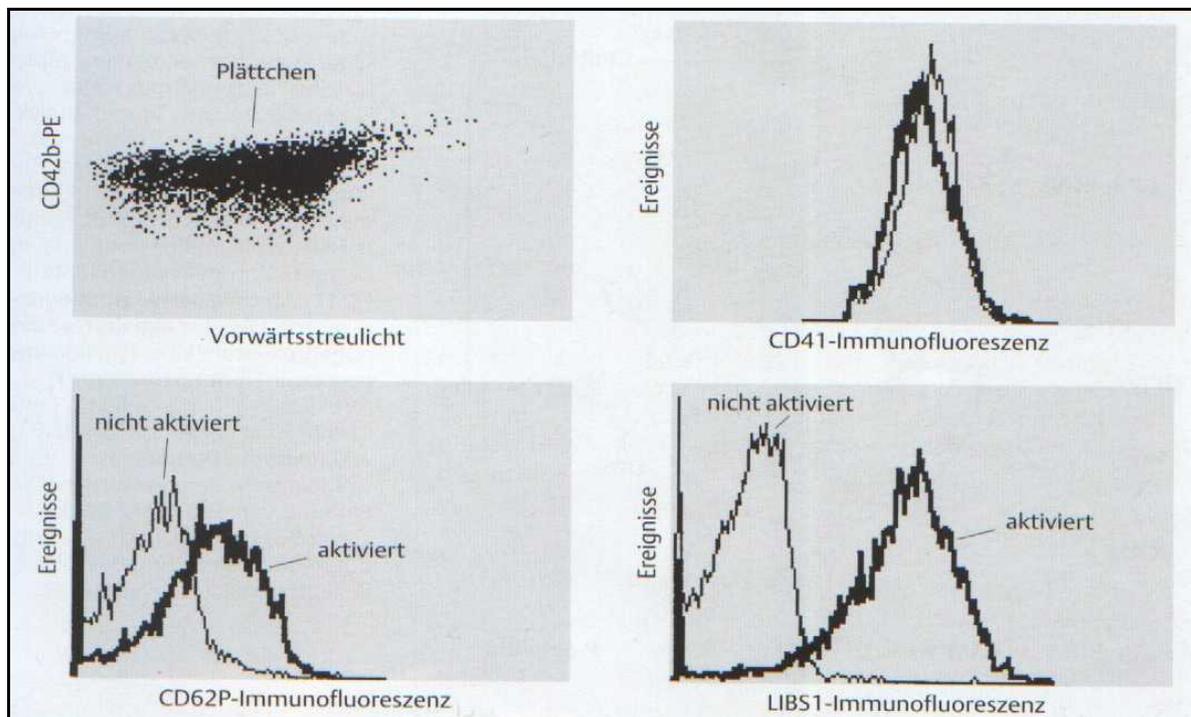


Abb. 13: Durchflußzytometrische Analyse der Blutplättchen ("Zweifarbenn"-Vollblutmethode). Die Blutplättchen werden anhand der plättchenspezifischen Immunreaktivität (CD42) und ihres charakteristischen Streulichtverhaltens identifiziert. Danach wird die Thrombozytenaktivierung immunologisch anhand der Bindung von aktivierungsabhängigen monoklonalen Antikörpern identifiziert.

3.8 Statistische Auswertung

Die Ergebnisse der Untersuchungen wurden mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test (mit Lilliefors-Korrektur) auf die Normalverteilung nach Gauß getestet. Daraufhin wurden statistische Tests angewandt, sog. nicht parametrische Testverfahren, die keine Normalverteilung voraussetzen.

Für die Korrelationsanalyse wurde der Korrelationskoeffizient nach Spearman, zur Bestimmung des Signifikanzniveaus für Vergleiche im Verlauf wurde der Wilcoxon- und Friedmann-Test für verbundene Stichproben benutzt.

Als Maßzahlen verwendeten wir Median, Maximum und Minimum. Mittelwert und Standardabweichung wurden dazu angegeben, um Vergleiche mit Literaturstellen, die keine Medianwerte angeben, zu ermöglichen.

Das Signifikanzniveau wurde auf 5 % festgelegt. Alle Tests wurden zweiseitig durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte mit „SPSS 10.1 for Windows“.

4 Ergebnisse

4.1 Aggregation

Bei der Thrombozytenaggregation untersuchten wir die Steigung der Aggregationskurve (Anstiegsgeschwindigkeit der Aggregation, slope), die maximale Aggregation und die Aggregation nach fünf Minuten. Diese Meßpunkte wurden unter Stimulation verschiedener ADP-Konzentrationen bestimmt (2 $\mu\text{mol/l}$, 5 $\mu\text{mol/l}$ und 20 $\mu\text{mol/l}$ ADP).

4.1.1 *Einfluß auf die Steigung der Aggregation*

Unter Stimulation mit 2 $\mu\text{mol/l}$ ADP zeigte sich während aller Zeitpunkte eine signifikante Abnahme der Steigung ($p < 0,05$). Die geringste mittlere Steigung wurde direkt nach Bolusgabe von Abciximab gemessen ($p = 0,001$). Nach Infusionsende stieg der Slope der Aggregationskurve wieder an, erreichte aber auch nach 96 Stunden nicht wieder den Ausgangswert (Steigung der Aggregation vor Bolusgabe: 3,0; nach Bolusgabe: 0,0; nach Infusionsende: 0,0 und nach 96 Stunden: 1,1).

Unter 5 $\mu\text{mol/l}$ ADP-Stimulation konnte bis 72 Stunden nach Bolusgabe eine signifikante Abnahme der Steigung beobachtet werden ($p < 0,05$). Die geringste mittlere Steigung war nach Infusionsende zu verzeichnen, stieg danach langsam an, erreichte aber nicht wieder das Ausgangsniveau (vor Bolusgabe: 4,0; nach Bolusgabe: 0,15; nach Infusionsende: 0,0; nach 96 Stunden: 2,6).

Unter 20 $\mu\text{mol/l}$ ADP-Stimulation konnte bis 72 Stunden nach Bolusgabe eine signifikante Abnahme der Steigung gemessen werden ($p < 0,05$). Nach der geringsten Steigung nach Infusionsende ($p = 0,001$) stieg diese wieder an, erreichte aber nicht das Ausgangsniveau (vor Bolusgabe: 4,3; nach Bolusgabe: 0,5; nach Infusionsende: 0,6; nach 96 Stunden: 2,9).

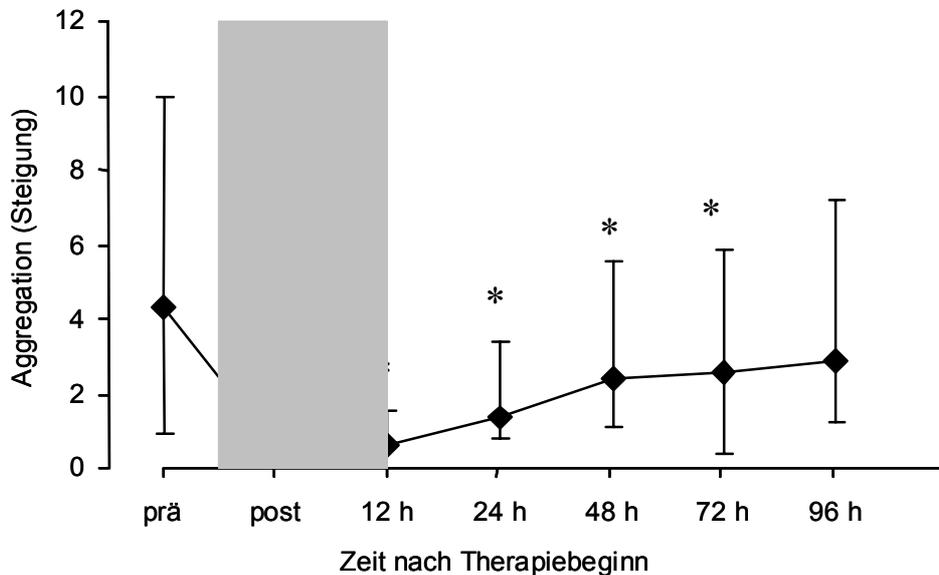


Abb. 14: Anstiegsgeschwindigkeit der Aggregation (slope) (mm/sec) unter 20 $\mu\text{mol/l}$ ADP-Stimulation; * signifikant unterschiedlich zum Ausgangswert ($p < 0,05$)

4.1.2 Maximale Aggregation

Unter 2 $\mu\text{mol/l}$ ADP Stimulation kam es während aller Zeitpunkte zu einem signifikanten Abfall der mittleren Thrombozytenaggregation im Vergleich zum Ausgangswert ($p < 0,05$). Kurz nach Bolusgabe von Abciximab bestand eine Aggregation von 0 %, die nach Infusionsende langsam wieder anstieg, jedoch auch nach 96 Stunden nicht wieder das Ausgangsniveau erreichte (25,4 %).

Zu allen Meßpunkten war während der Stimulation mit 5 $\mu\text{mol/l}$ ADP eine signifikante Verringerung der mittleren Aggregation zu verzeichnen ($p < 0,05$). Die geringste Plättchenaggregation bestand nach Bolusgabe (7,1 %), stieg dann langsam an, erreichte aber nicht den Ausgangswert (83,1 %). Die Aggregation wurde unter 5 $\mu\text{mol/l}$ ADP im Vergleich zu 2 $\mu\text{mol/l}$ ADP erheblich (bis 35 %) gesteigert.

Bei der Stimulation mit 20 $\mu\text{mol/l}$ ADP bestand zu allen Zeitpunkten eine signifikante Verringerung der Plättchenaggregation ($p < 0,05$). Die maximale Verringerung der ADP-induzierten Aggregation wurde nach Infusionsende beobachtet. Auch unter dieser ADP-

Konzentration wurde eine weitere Zunahme der Aggregationsfähigkeit der Thrombozyten im Vergleich zu 2 $\mu\text{mol/l}$ ADP und 5 $\mu\text{mol/l}$ ADP beobachtet.

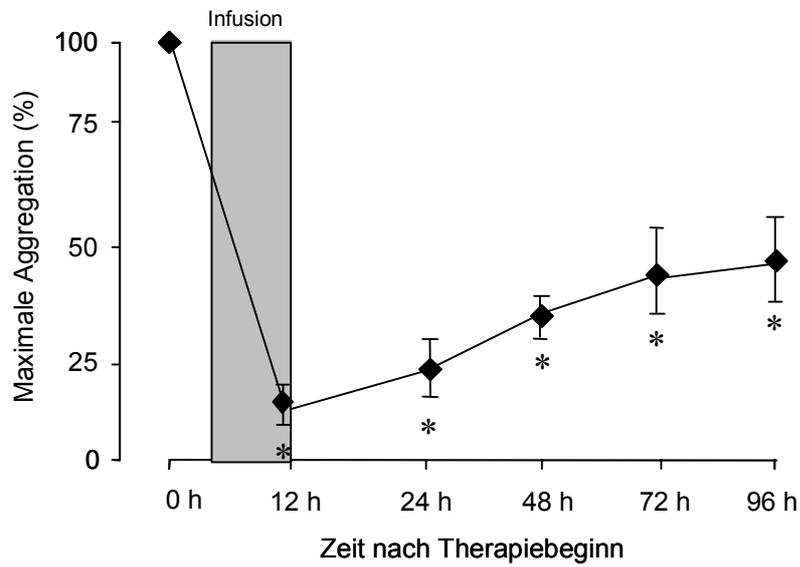


Abb. 15: Maximale Aggregation (in %) unter 20 $\mu\text{mol/l}$ ADP-Stimulation; * signifikant unterschiedlich zum Ausgangswert ($p < 0,05$)

4.2 Deaggregation

Um festzustellen, ob ein eventueller Rückgang der Deaggregationskurve unter GPIIb-IIIa-Rezeptor-Antagonisten besteht, untersuchten wir auch hier unter den verschiedenen ADP-Konzentrationen die entsprechenden Meßpunkte.

Unter der Stimulation mit 2 $\mu\text{mol/l}$ ADP konnte lediglich kurz nach Bolusgabe eine signifikante Abnahme der mittleren Deaggregation zum Ausgangswert ($p = 0,031$) verzeichnet werden. Danach stieg diese langsam an und erreichte nach 72 Stunden höhere Werte (24,7 %) als vor der Bolusgabe (4 %).

Nach 72 Stunden konnte unter der Stimulation mit 5 $\mu\text{mol/l}$ ADP eine signifikante Zunahme der Deaggregation im Vergleich zum Ausgangswert beobachtet werden ($p = 0,21$). Kurz nach Bolusgabe fiel die Deaggregation von 2,4 % auf 0,0 % ab, stieg dann langsam an und erreichte Werte über dem Ausgangsniveau (nach 72 Stunden die höchste Deaggregation mit 29,7 %).

Zu allen Zeitpunkten, bis auf den kurz nach der Bolusgabe, ist während der Stimulation mit 20 $\mu\text{mol/l}$ ADP eine signifikante Zunahme der Deaggregation zu beobachten ($p < 0,05$). Im ganzen Verlauf war eine stetig zunehmende Deaggregationsfähigkeit zu sehen. Die Abnahme der Deaggregationskurve betrug vor Bolusgabe 2,4 % und stieg bis 72 Stunden nach Bolugabe auf 14,8 % an.

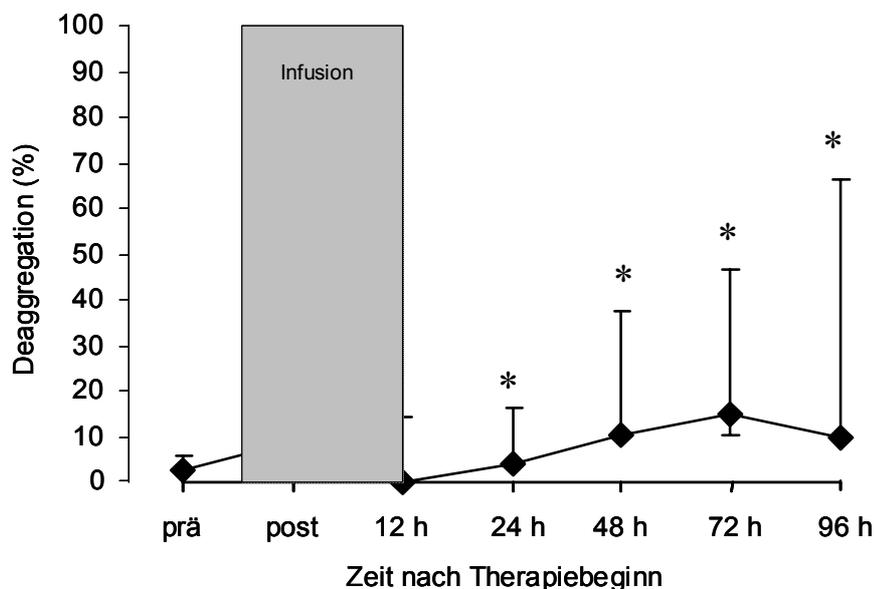


Abb. 16: Deaggregation unter 2 $\mu\text{mol/l}$ ADP-Stimulation (in %); * signifikant unterschiedlich zum Ausgangswert ($p < 0,05$)

4.3 Thrombozytäre ATP-Freisetzung

Um den Einfluß des GPIIb-IIIa-Antagonisten auf die Degranulation der Thrombozyten beurteilen zu können, bestimmten wir während der Aggregometrie die ATP-Freisetzung auf den dichten Granula nach 2,5 Minuten und 5 Minuten sowie die maximale ATP-Freisetzung.

4.3.1 Thrombozytäre ATP-Freisetzung nach 2,5 Minuten

Während der Stimulation mit 2 $\mu\text{mol/l}$ ADP konnte über den Zeitverlauf keine signifikante Zunahme bzw. Abnahme der ATP-Freisetzung beobachtet werden. Über den Zeitverlauf während der Stimulation mit 5 $\mu\text{mol/l}$ ADP konnte nach Infusionsende und 24 Stunden nach Bolusgabe eine signifikante Abnahme der ATP-Freisetzung verzeichnet werden ($p < 0,05$). Nach 24 Stunden war der Ausgangswert von 0,08 nmol auf 0,04 nmol gefallen. Dieser stieg dann langsam bis 0,09 nmol an, womit er über dem Ausgangswert liegt. Bei der Stimulation mit 20 $\mu\text{mol/l}$ ADP war es kurz nach Bolusgabe zu einem signifikanten Abfall der ATP-Freisetzung gekommen ($p = 0,017$). Im weiteren Verlauf zeigte sich eine weitere Abnahme bis 24 Stunden nach Bolusgabe, dann stieg die ATP-Freisetzung wieder an bis maximal 0,4 nmol, um dann nach 96 Stunden auf 0,3 nmol abzufallen.

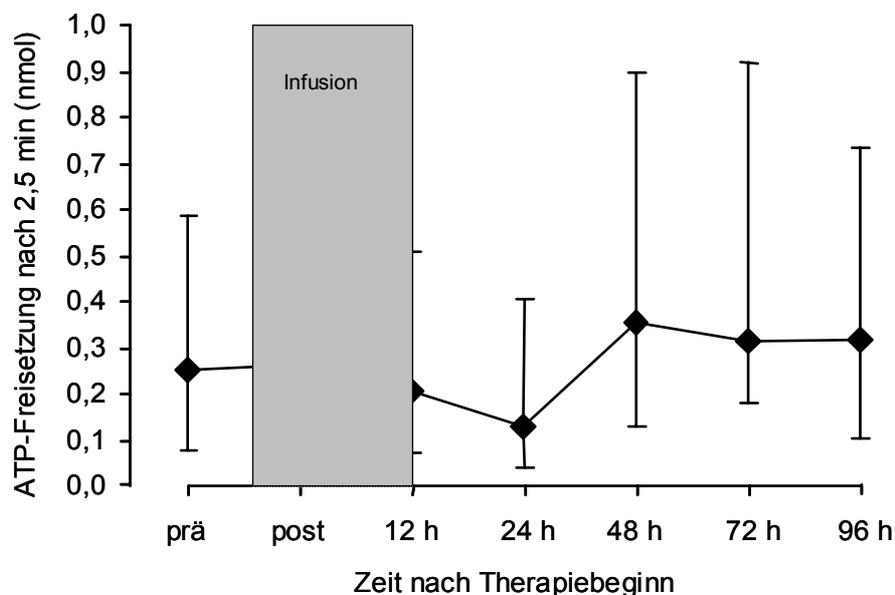


Abb. 17: ATP-Freisetzung nach 2,5 min (in nmol) unter 20 $\mu\text{mol/l}$ ADP-Stimulation; * signifikant unterschiedlich zum Ausgangswert ($p < 0,05$)

4.3.2 Thrombozytäre ATP-Freisetzung nach fünf Minuten

Während der Stimulation mit $2 \mu\text{mol/l}$ ADP konnte kurz nach Bolusgabe eine signifikante Zunahme der ATP-Freisetzung von $0,00 \text{ nmol}$ auf $0,02 \text{ nmol}$ ($p = 0,018$) beobachtet werden. Danach fiel die Degranulation wieder etwas ab (nach Infusionsende: $0,01 \text{ nmol}$) und stieg dann nach 72 Stunden langsam an. Nach 96 Stunden bestand eine Konzentration von $0,02 \text{ nmol}$ ATP.

Am Infusionsende und nach 24 Stunden kam es unter der $5 \mu\text{mol/l}$ ADP-Stimulation zu einem signifikantem Abfall der ATP-Freisetzung ($p < 0,05$). Die niedrigste ATP-Konzentration wurde nach 48 Stunden gemessen ($0,03 \text{ nmol}$), die dann wieder bis auf $0,1 \text{ nmol}$ nach 96 Stunden anstieg.

Über den Zeitverlauf ergab sich während der Stimulation mit $20 \mu\text{mol/l}$ ADP eine signifikante Abnahme der ATP-Freisetzung kurz nach Bolusgabe.

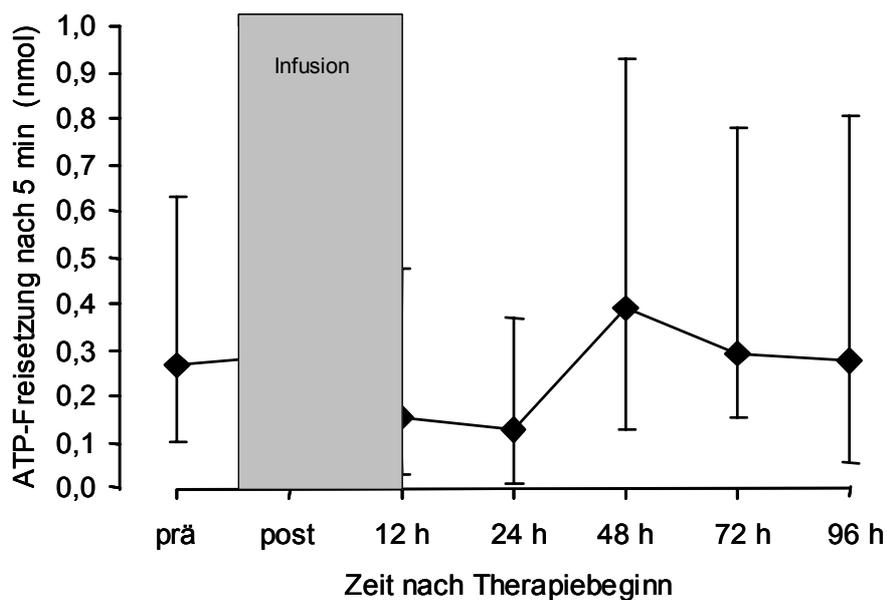


Abb. 18: ATP-Freisetzung nach 5 min (in nmol) unter $20 \mu\text{mol/l}$ ADP-Stimulation; * signifikant unterschiedlich zum Ausgangswert ($p < 0,05$)

4.3.3 Maximale thrombozytäre ATP-Freisetzung

Über den gesamten Zeitverlauf während der Stimulation mit 2 $\mu\text{mol/l}$ ADP ist keine signifikante Änderung zum Ausgangswert zu beobachten. Dahingegen ist während der Stimulation mit 5 $\mu\text{mol/l}$ ADP nach 24 Stunden eine signifikante Abnahme zum Ausgangswert der Degranulation (von 0,10 nmol auf 0,05 nmol) zu beobachten. Danach stieg diese bis auf 0,13 nmol nach 96 Stunden an. Während der Stimulation mit 20 $\mu\text{mol/l}$ ADP ist über den gesamten Verlauf kein signifikanter Unterschied bezüglich der ATP-Freisetzung festzustellen.

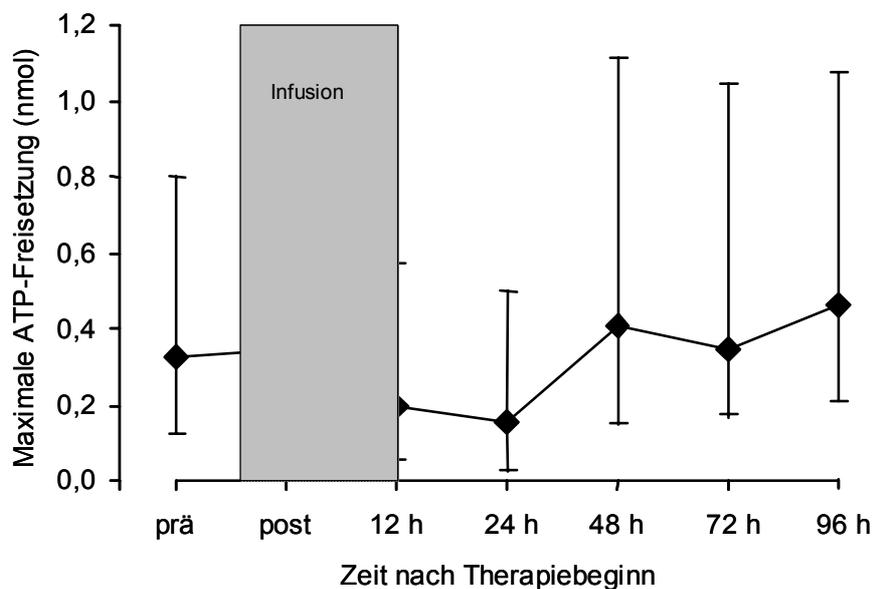


Abb. 19: Maximale ATP-Freisetzung (in nmol) unter 20 $\mu\text{mol/l}$ ADP-Stimulation; * signifikant unterschiedlich zum Ausgangswert ($p < 0,05$)

4.4 Durchflusszytometrische Untersuchung

4.4.1 Bindung von FITC-c7E3 an zirkulierende Thrombozyten

Mit einer fluoreszenzkonjugierten Form von Abciximab (FITC-c7E3) wurde der Anteil des Glykoprotein-IIb-IIIa-Komplexes untersucht, der kein Abciximab gebunden hatte. Zu allen Zeitpunkten wurde eine signifikante Abnahme der FITC-c7E3-Bindung gegenüber dem Ausgangswert registriert ($p < 0,05$). Vor Bolusgabe von Abciximab wurde eine relative mittlere Intensität von FITC-c7E3 von 24,1 beobachtet. Nach Infusionsende stieg der Wert wieder langsam an und erreichte nach 96h nicht wieder das Ausgangsniveau.

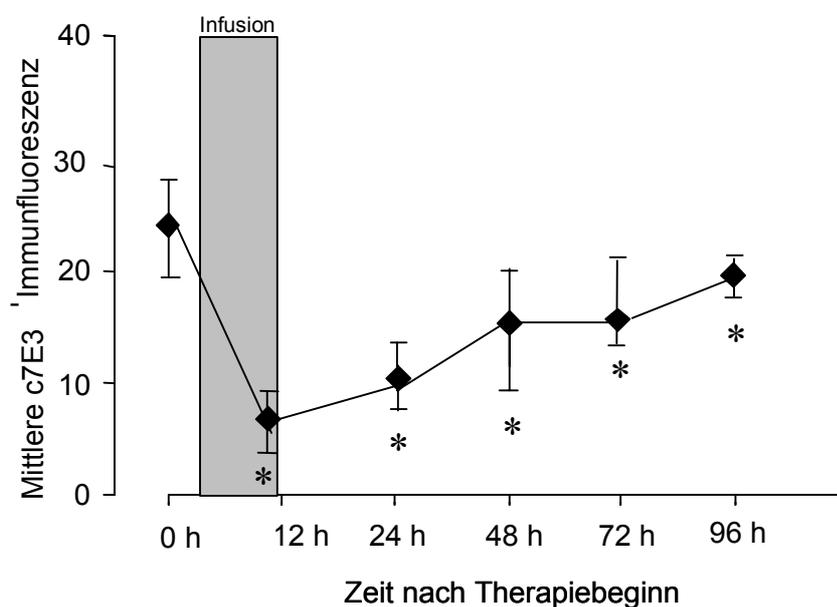


Abb. 20: FITC-c7E3-Bindung (mittlere Intensität) an zirkulierende Thrombozyten bei Patienten nach koronarer Stentimplantation; Zeitverlauf vor und nach Abciximab-Gabe; * signifikant unterschiedlich zum Ausgangswert ($p < 0,05$)

4.4.2 Verfügbarkeit der Fibrinogenbindungsstellen und Pharmakonbindung

Die Oberflächendichte von GPIIb unter Abciximabtherapie wurde durch den komplexspezifischen, monoklonalen Antikörper anti-CD41 untersucht, welcher gegen die α_{IIb} -Kette gerichtet ist. Bis auf den Wert nach 96 Stunden ist während aller Meßpunkte eine signifikante Abnahme der anti-CD41-Bindung an zirkulierende Thrombozyten zu beobachten ($p < 0,05$). Das Minimum der anti-CD41-Bindung wurde nach Infusionsende gemessen, die

dann wieder langsam anstieg, aber auch nach 96 Stunden nicht wieder den Ausgangswert erreichte.

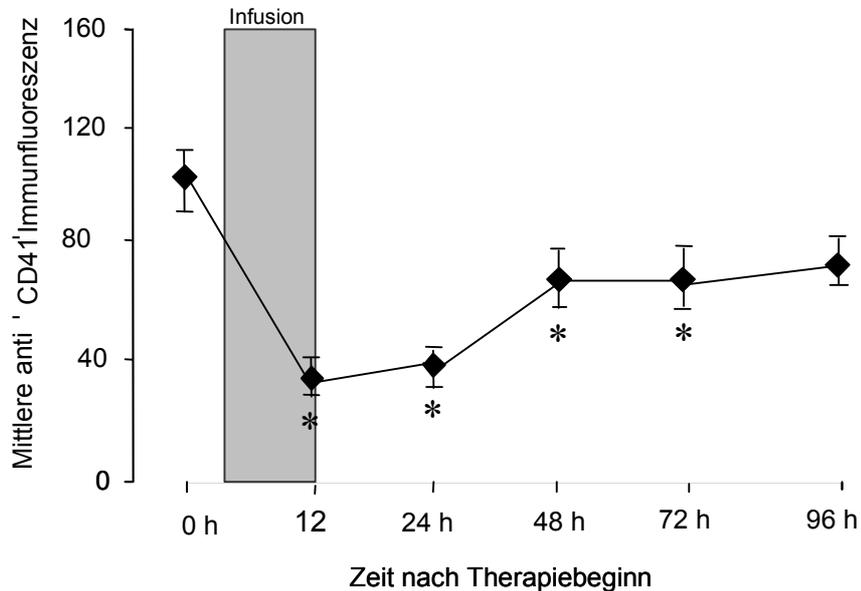


Abb. 21: Oberflächendichte von GP IIb auf zirkulierenden Thrombozyten; Zeitverlauf vor und nach Abciximab-Gabe; anti-CD41-Immunfluoreszenz (mittlere Intensität); * signifikant unterschiedlich zum Ausgangswert ($p < 0,05$)

4.4.3 Degranulation und P-Selektin-Expression

Um die Degranulation von alpha-Granula (P-Selektin) beurteilen zu können, verwendeten wir den monoklonalen Antikörper anti-CD62P, dessen zunehmende Bindung eine irreversible Degranulation der Thrombozyten bedeutet. Nach 48 Stunden konnte eine signifikante Zunahme der anti-CD62P-Bindung beobachtet werden ($p < 0,05$).

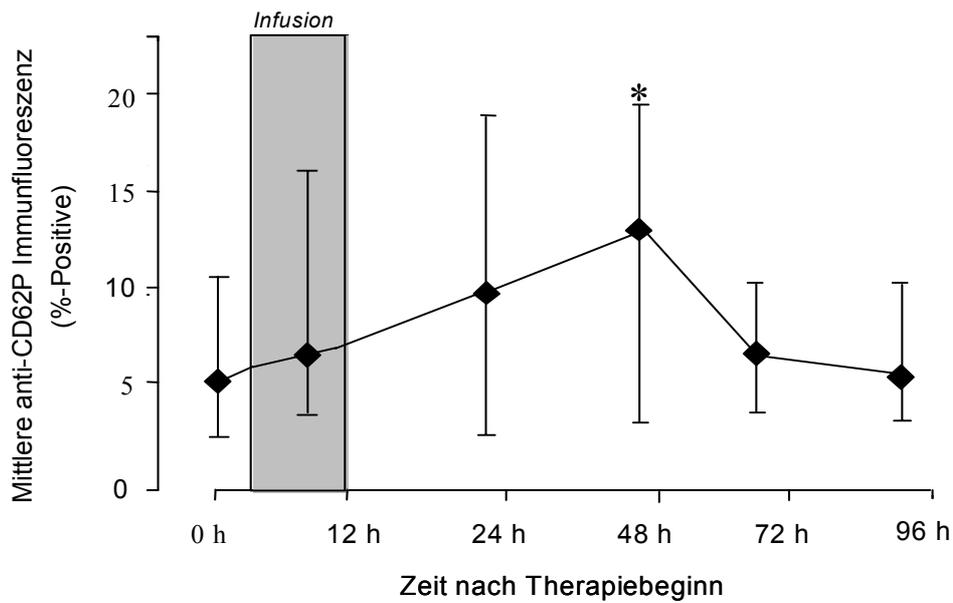


Abb. 22: P-Selektin-Freisetzung von zirkulierenden Thrombozyten; Zeitverlauf vor und nach Abciximab-Gabe; * signifikant unterschiedlich zum Ausgangswert ($p < 0,05$)

4.4.4 Thrombozytenzahl

Parallel zu den Veränderungen des Funktionszustandes des GPIIa-IIIb-Komplexes kam es zu einem Abfall der Thrombozytenzahl (nicht signifikant). Der tiefste Wert wurde nach Infusionsende erreicht. Dann stieg dieser langsam an und erreichte nach 96 Stunden nicht wieder das Ausgangsniveau. Bei zwei Patienten kam es zu akuten Thrombozytopenien (Tiefstwerte nach Infusionsende: 51,0 bzw. 26,0 Thrombozyten $\times 10^3/\mu\text{l}$). Auch in den folgenden Stunden und Tagen kam es nur zu einem leichten Anstieg der Thrombozytenzahl.

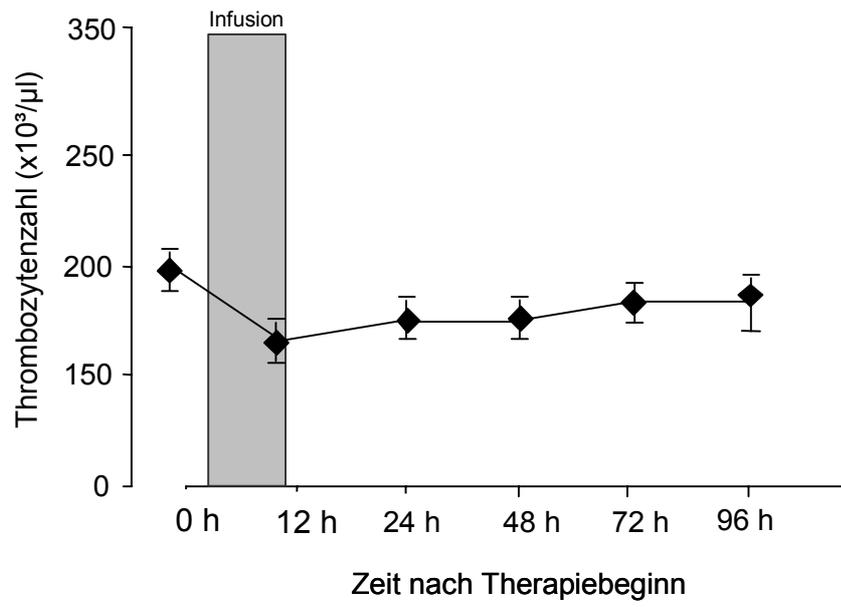


Abb. 23: Mittlere Thrombozytenzahl; Zeitverlauf vor und nach Abciximab-Gabe

4.5 Korrelationen

Für die Beurteilung eines möglichen Zusammenhangs bzw. Vergleiches zwischen der Aggregation und der durchflußzytometrischen Messung wurden folgende Korrelationen bestimmt:

Korrelationen zwischen der Aggregation und der c7E3-Immunfluoreszenz:

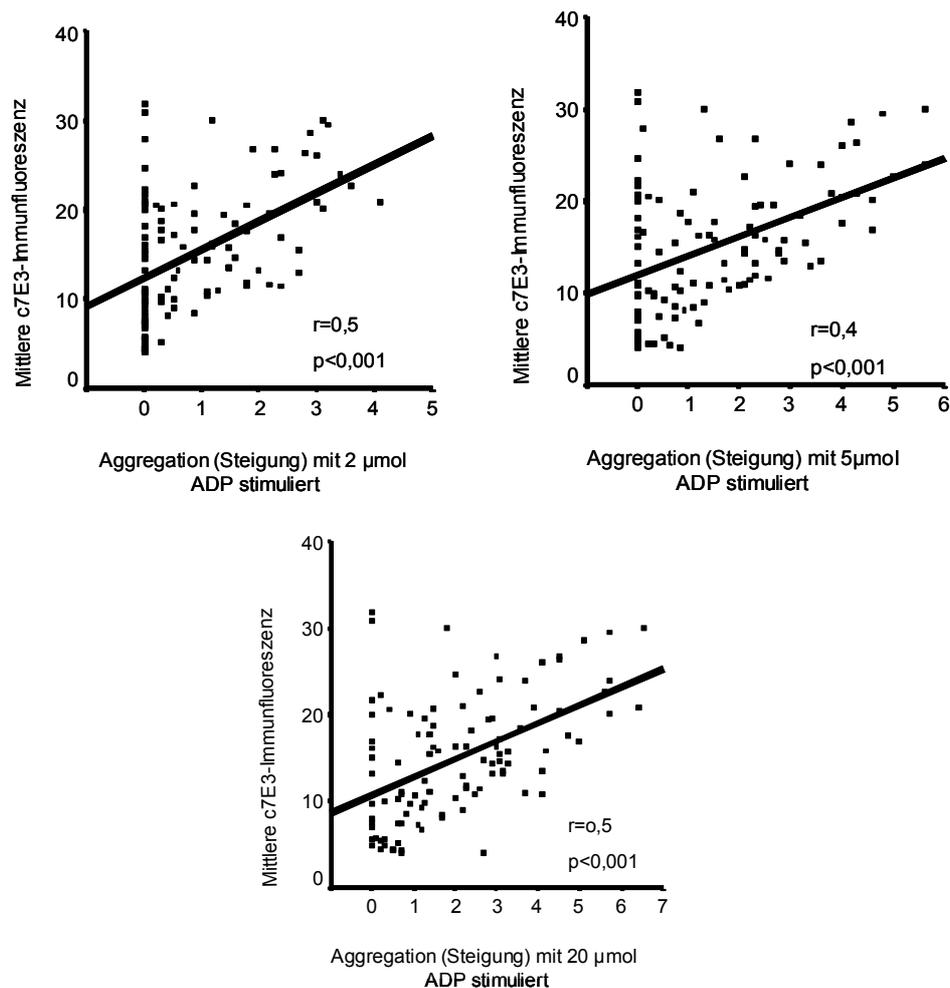


Abb. 24: Korrelationen der Aggregation (Steigung) mit der mittleren c7E3-Immunfluoreszenz

Anhand der obigen Grafiken zeigt sich bzgl. der Korrelation zwischen der c7E3-Immunfluoreszenz und der Aggregation (Steigung) unabhängig von der Konzentration der ADP-Stimulation ein signifikanter Zusammenhang ($p < 0,001$).

Korrelationen zwischen der Aggregation und der CD41-Immunfluoreszenz:

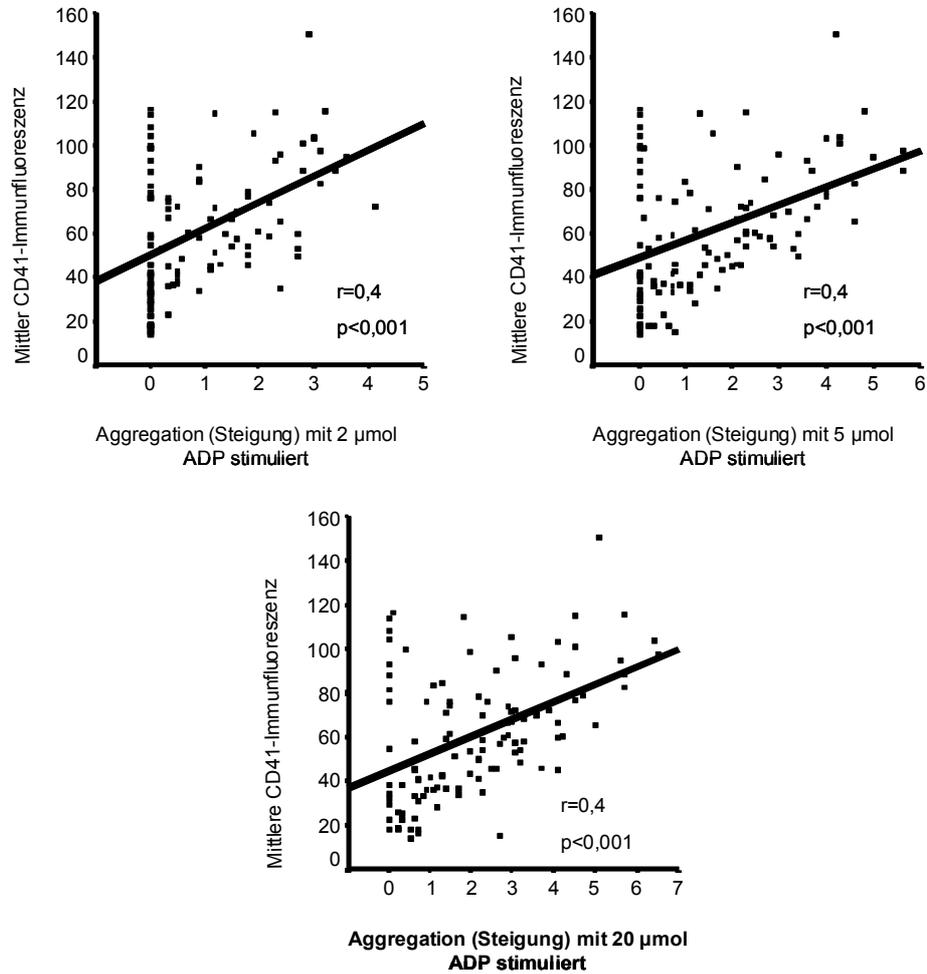


Abb. 25: Korrelationen zwischen der Aggregation (Steigung) und der mittleren CD41-Immunfluoreszenz

Während jeder der drei verschiedenen Konzentrationen der ADP-Stimulation besteht bzgl. der Korrelation zwischen der Aggregation (Steigung) und der CD41-Immunfluoreszenz ein signifikanter Zusammenhang.

Korrelationen zwischen der ATP-Freisetzung und der CD62P-Immunfluoreszenz:

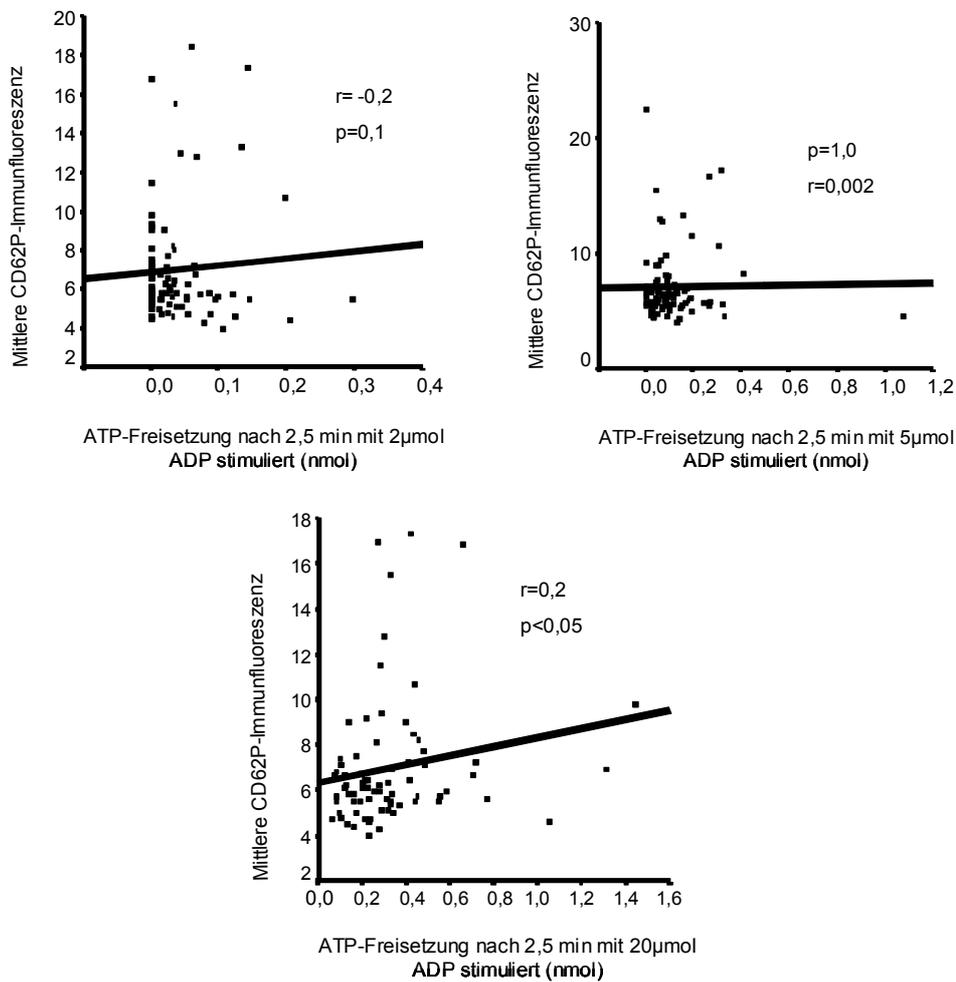


Abb. 26: Korrelationen zwischen der ATP-Freisetzung nach 2,5 min (nmol) (unter 2, 5 und 20 μ mol ADP-Stimulation) und der CD62P-Immunfluoreszenz

Die Abbildungen zeigen, abgesehen von der ADP-Stimulation mit 20 μ mol ($p < 0,05$), keinen signifikanten Zusammenhang zwischen der ATP-Freisetzung nach 2,5 Minuten und der CD62P-Immunfluoreszenz.

Korrelation zwischen der c7E3-Immunfluoreszenz und der CD41-Immunfluoreszenz:

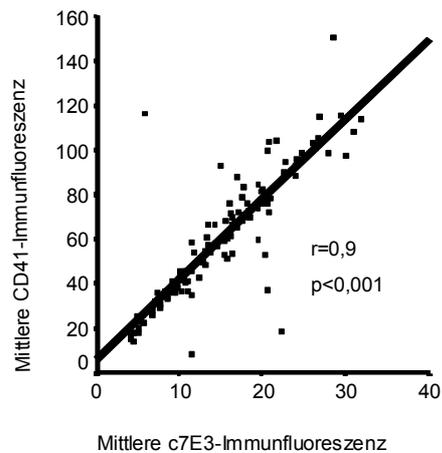


Abb. 27: Korrelation der mittleren c7E3-Immunfluoreszenz mit der mittleren CD41-Immunfluoreszenz

Zwischen der c7E3-Immunfluoreszenz und der CD41-Immunfluoreszenz besteht ein signifikanter Zusammenhang ($r = 0,9$; $p < 0,001$).

Korrelation zwischen der CD62P-Immunfluoreszenz und c7E3-Immunfluoreszenz:

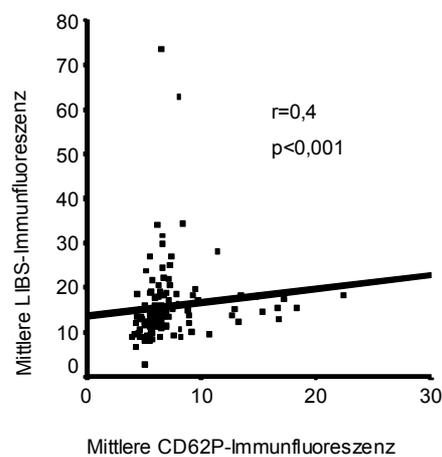


Abb. 28: Korrelation zwischen der mittleren CD62P-Immunfluoreszenz und der mittleren c7E3-Immunfluoreszenz

Zwischen der CD62P-Immunfluoreszenz und der c7E3-Immunfluoreszenz konnten wir ebenfalls eine positive Korrelation finden.

Korrelation zwischen LIBS-I-Bindung und der Thrombozytenzahl zum Zeitpunkt

Δ (0-10 h):

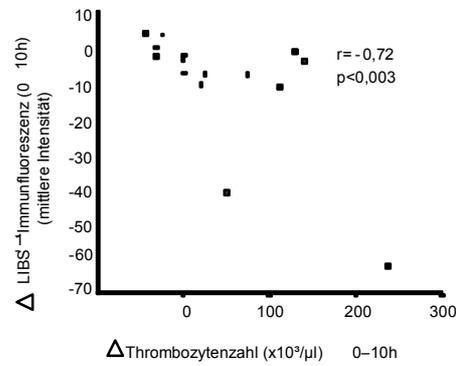


Abb. 29: Korrelation zwischen der mittleren LIBS-I-Immundefluoreszenz und der Thrombozytenzahl

Zwischen dem Anstieg der LIBS-I-Bindung und dem Abfall der Thrombozytenzahl 12 Stunden nach Abciximabgabe besteht eine signifikante, inverse Korrelation ($r = -0,72$; $p < 0,05$).

4.6 Variabilität

4.6.1 Durchflußzytometrische Messung

C7E3-Immunfluoreszenz:

Bei drei Patienten kam es erst 12 - 24 Stunden nach Bolusgabe von Abciximab zu einer deutlichen Abnahme der FITC-c7E3-Bindung. Zu allen anderen Zeitpunkten lagen die Patienten annähernd im gleichen Bereich der FITC-c7E3-Bindung.

c7E3	prä	post	12 h	24 h	48 h	72 h	96 h
Patient 1		4,5	8,7	11,5	12,9	15,5	
Patient 2		22,3	5,3	9	11,9	13,5	19,6
Patient 3	24	20,5	9,2	11,1		21,1	
Patient 4	20,9	7,4	9,7	12,4	14,6	19,5	16,5
Patient 5	20,1	4,4	8,2	13,2	18,5	13,5	16,4
Patient 6	30	4,1	20,7	10,3	16,4	16,3	14,4
Patient 7	17,8	4,2	10,8	10,3	10,8	11,5	14,7
Patient 8		5	10,2	15,9	13,3		12,5
Patient 9	29,5	5,6	11,1	15,5	17,2	16,3	17,7
Patient 10	30,1	11,6	7,5	8,5	13,5	14,4	17
Patient 11	26,1	4,4	9,9	8,4	10,9	11,6	
Patient 12	22,8	6,7	5,7	10,2	20,1	18,8	31,8
Patient 13	24		8	9,6	16,7	18,2	24,7
Patient 14	26,3	27,8	16,2	5,8	20,7	22,7	30,9
Patient 15	24,1	4,5	10,6	15,7	17,8	26,8	20,6
Patient 16		7,6	7,3	9,8	10,8	15,8	19,6
Patient 17	20,9		5,5	4,9	20,8		
Patient 18	28,5	5	15,1	17		21,8	
Patient 19	26,7	7	13,2	14,5	20		

Tab. 4: c7E3-Immunfluoreszenz (Intensität) zu den verschiedenen Zeitpunkten nach Therapiebeginn

CD 41-Immunfluoreszenz: Bei einem Patienten konnte zu allen Meßpunkten keine wesentliche Beeinflussung von Abciximab bezüglich der CD 41-Bindung beobachtet werden. Ein zweiter Patient stieg mit der CD 41-Bindung bereits nach 12 Stunden wieder rapide an.

CD 41	prä	post	12 h	24 h	48 h	72 h	96 h
Patient 1		18,4		34,9	49,7	52,9	59,5
Patient 2	88,6	18,9	23	41,1	54,3	66,9	74,2
Patient 3	88,8	53	36,8	36,3		78,1	
Patient 4	72,5	32,9	35,9	42,7	57,4	59,8	67
Patient 5	82,5	14,5	36,3	48,6	70,3	57,6	70,1
Patient 6	114	15,3	36,9	42,8	53,3	61,4	66,9
Patient 7	83,9	16,6	40	36,4	44,8	45,2	56,8
Patient 8		20,4	45,6	51,5	60,9	50	
Patient 9	115,3	22,7	41	58,8	72	71,8	78,9
Patient 10	97,5	8,4	30,9	33,3	54,2	58,1	65,7
Patient 11	103,3	18,2	37,8	33,8	45,8	58,4	
Patient 12	95	28,1	22,7	44,6	76,1	74,6	113,8
Patient 13	93,2		34,1	38,3	67,3	76	98,7
Patient 14	100,9	99	76,1	116,2	99,7	90,3	108,4
Patient 15	95,9	18	41,5	68,3	70,9	114,5	76,7
Patient 16		29,3	35,9	41,7	45,5	60,3	85,1
Patient 17	103,6		25,8	25,6	76,2		
Patient 18	150,2	18,2	93	88,3		104,1	
Patient 19	105,5	31,9	54,5	58,1	81,8		

Tab. 5: CD41-Immunfluoreszenz (Intensität) zu den verschiedenen Zeitpunkten nach Therapiebeginn

CD 61-Immunfluoreszenz: Zwei Patienten zeigen 12 Stunden nach Bolusgabe im Gegensatz zu den übrigen Patienten eine zunehmende anti-CD-61-Bindung.

CD61	prä	post	12 h	24 h	48 h	72 h	96 h
Patient 1		31,1		31,7	37,5	34,3	38,2
Patient 2	40,5	43,7	55,4	51,9	46,5	77	64,2
Patient 3	45,5	61,2	58,7	53,2	67,3		
Patient 4	41,5	40,5	58,2	56,1	72,4	72,4	97,4
Patient 5	25,7	27	27,2	29,5	38,8	28,4	30,6
Patient 6	60,2	52,6	45,9	43,2	46	41,8	47,3
Patient 7	40,9	39,1	39,4	44,3	42,2	42,8	40,9
Patient 8		46,4	44,6	53,4	49	40,4	
Patient 9	47,3	52,5	52,8	65,2	56,6	49,9	48,5
Patient 10	64,4	30	56,8	43,7	49,8	45,3	47,2
Patient 11	57,7	46,5	57,6	39,2	35	53,6	
Patient 12	39,3	41	33,1	43,6	69,2	62,2	85,1
Patient 13	41,8		45	55,1	55	78	95,6
Patient 14	41,8	46,5	78,2	68,2	65,5	68,1	84,6
Patient 15	54,3	61,4	54,5	56,4	62,1	56,3	52,9
Patient 16		30,5	21,7	23,8	24,4	24,4	37,6
Patient 17	45		35,9	39,1	56,7		
Patient 18	72,5	72,7	99	72,3		68,5	
Patient 19	28,9	24,5	42,5	41,2	43,7		

Tab. 6: CD 61-Immunfluoreszenz (Intensität) zu den verschiedenen Zeitpunkten nach Therapiebeginn

CD62P-Immunfluoreszenz: Bei zwei Patienten wurden 12 Stunden nach Bolusgabe kontinuierlich erhöhte Werte für die CD62-Bindung gemessen.

CD62P % Positive	prä	post	12 h	24 h	48 h	72 h	96 h
Patient 1		0,9		0,5	1,4	2,5	3,5
Patient 2	0,9	1,3	2,3	0,9	1,4	5,7	
Patient 3	1,4		8,7	6,9		6,1	
Patient 4	10,3	3,1	5,6	1,2	8,2	0,9	
Patient 5	13,7	2,7	2,6	1,5		4,4	1,6
Patient 6	3,5	5,5	25,1		10,1		
Patient 7	2,9	10,1	7,7	8,7	13	2,9	2
Patient 8		56,1	60,6	39	60,2	1,1	
Patient 9	2,5	2,9	3,5	3	26,8	9,3	4,9
Patient 10	1,6	20,8	3,1	42,8	2,7	4,9	5,7
Patient 11	10,2	9,3	3,5	25,9	13,3	10,3	3,3
Patient 12	4,3	2,5	35,6	6,7	5,1	8,9	12,7
Patient 13	6,6		4,5	4,4	13,6	6,5	8,4
Patient 14	5,5	5,3	7,9	4,5	19,1	6,3	10,1
Patient 15	10,2	8,8	3,9	8,8	7,5	7,8	5,3
Patient 16		6,8	78,9	82,3	82,3	5,9	14,5
Patient 17	10,1		9,2	10,7	19,2	32,9	5,7
Patient 18	10,6	21,8	11,8	16,4		10,3	
Patient 19							

Tab. 7: Darstellung der CD62 %-Positiven zu den verschiedenen Zeitpunkten nach Therapiebeginn

4.6.2 Messung mit dem Aggregometer

Slope (Anstiegsgeschwindigkeit der Aggregation) unter 20µmol ADP-Stimulation:

Ein Patient zeigte eine verzögerte Abnahme der Aggregation (Steigung) bis 12 Stunden nach Bolusgabe. Bei den übrigen individuellen Werten zeigten sich keine großen Unterschiede.

Slope unter 20 µmol ADP-St.	prä	post	12 h	24 h	48 h	72 h	96 h
Patient 1		0,2		2,3	2,2	3,1	4,1
Patient 2	4,2	0,2	0,6	2,2	2,3	4,1	2,9
Patient 3	4,3		1,2	1,4		2,2	
Patient 4	5,7	0,6	0,9	1,3	3,1	2,8	
Patient 5	3,9	0,5	1,7	3,2	3,6		2,3
Patient 6	5,7	2,7		2	2	1,5	2,9
Patient 7	1,8	0,7	0,7		4,1	2,6	2,7
Patient 8	1,1		0,6	1,6	2,9	2,2	
Patient 9		0,3	0,7	1,4	3,1	3	4,7
Patient 10	5,7		0,7	0,8	3,2	3,3	5
Patient 11	6,5	0,7	0,3	1,7	3,7	2,3	3
Patient 12	4,1	1,2	0	0,6	0,9	1,5	0
Patient 13	5,6	4,2	0	0	3	2,4	2
Patient 14	3,7		0	0,1	0,4	2,6	0
Patient 15	4,5	0,5	1	3,3	1,4	4,5	4,5
Patient 16	3,1	0	1,1	1,3	2,5	4,2	1,3
Patient 17			0,2	0,3	1,5		
Patient 18	6,4	0	0	0	0,8	0	
Patient 19	5,1	0	0	0,6	0		

Tab. 8: Steigung der Aggregation (slope; mm/sec) unter 20 µmol ADP-Stimulation

Maximale Aggregation unter 20µmol ADP-Stimulation:

Eine verzögerte Abnahme der maximalen Aggregation bis 12 Stunden nach Bolusgabe wurde bei einem Patienten gemessen.. Die restlichen Meßwerte zeigten bereits ab 48 Stunden nach Bolusgabe größere Unterschiede.

Maximale Aggregation	prä	post	12 h	24 h	48 h	72 h	96 h
Patient 1	100	23,3		55,3	47,6	44,7	73,8
Patient 2	100	6,1	7,3	45,1	74,4	93,9	78
Patient 3	100		34,7	26,6		26,6	
Patient 4	100	12,6	14,9	27,6	73,6	56,3	
Patient 5	100	5,5	17,2	57	58,6		46,9
Patient 6	100	65		99,9	93,3	95	
Patient 7	100						
Patient 8	100						
Patient 9	100	7,4	4,6	42,6	53,7	46,3	78,7
Patient 10	100		5,3	14	48,7	37,3	61,3
Patient 11	100	1,6	11,9	31	68,2	62,7	55,6
Patient 12	100	6,3	0	12,5	19,5	7,8	0
Patient 13	100	82,1	0	0	34,6	28,2	12,8
Patient 14	100		0	2,8	6,4	36,7	0
Patient 15	100	23,5	15,3	91,8	5,9	71,8	84,8
Patient 16	100						
Patient 17	100	0	9,2	10,3	10,3		
Patient 18	100	0	0	0	10	0	
Patient 19	100	0	0	21,8	0		

Tab. 9: Maximale Aggregation (in %) unter 20 µmol ADP-Stimulation

Aggregation nach 5 Minuten unter 20 µmol ADP-Stimulation:

Eine verzögerte Abnahme der maximalen Aggregation bis 12 Stunden nach Bolusgabe wurde bei einem Patienten gemessen. Die folgende Einzelpunkt Darstellung nach 24 Stunden zeigte eine größere Varianz innerhalb der Patientengruppe.

Aggregation nach 5 min	prä	post	12 h	24 h	48 h	72 h	96 h
Patient 1	100				32,4	29,4	67,6
Patient 2	100	3,8	6,3	36,3	65	91,3	50
Patient 3	100		34,7	22,3		20,7	
Patient 4	100	11,9	15,5	27,4	71,4	53,6	
Patient 5	100	4,8	12	55,2	56		12
Patient 6	100	65,5		55,2	72,4	62,1	
Patient 7	100						
Patient 8	100						
Patient 9	100	6,7	2,9	42,9	49,5	41,9	69,5
Patient 10	100		4,7	14,7	44,7	30	55,3
Patient 11	100	1,6	16,7	32,5	68,3	62,7	55,6
Patient 12	100	5,5	0	12,5	19,5	7,8	0
Patient 13	100	74,4	0	0	12,8	10,3	0
Patient 14	100		0	4,8	6,7	34,3	0
Patient 15	100	23,5	15,3	85,9	3,5	58,8	54,1
Patient 16	100						
Patient 17	100	0	9,6	10,8	6		
Patient 18	100	0	0	0	10,2	0	
Patient 19	100	0	0	21,8	0		

Tab. 10: Aggregation nach 5 Minuten (in %) im Zeitverlauf nach Therapiebeginn

5 Diskussion

5.1 Antithrombotische Therapie mit GPIIb-IIIa-Rezeptorantagonisten bei koronarer Stentimplantation

Membranständige Glykoproteine vermitteln zentrale Thrombozytenfunktionen, die in der Entstehung akuter Koronarsyndrome sowie ischämischer Komplikationen nach Koronarintervention eine entscheidende Rolle spielen. Mit der Entwicklung von GPIIb-IIIa-Rezeptorantagonisten konnte die Rate kardialer Komplikationen nach Koronarintervention aufgrund einer nahezu vollständigen Hemmung der Thrombozytenaggregation beträchtlich und anhaltend gesenkt werden. Groß angelegte Studien wie die EPIC-Studie und die EPILOG-Studie zeigen, daß die Abciximabbolusinjektion vor Koronarintervention mit anschließender zwölfstündiger Abciximabinfusion die Inzidenzrate peri- und postinterventioneller kardialer Ereignisse signifikant verringern. Dieser Trend zugunsten einer niedrigeren kardialen Komplikationsrate kann durch andere synthetische Antagonisten wie Eptifibatide (Integrilin, zyklisches Heptapeptid) in der IMPACT-II-Studie und in der ESPRIT-Studie oder durch Aggrastat (Tirofiban, nicht-peptidischer Antagonist) in der RESTORE-Studie bestätigt werden.

Die koronare Stentimplantation führt zu einer wesentlichen Verbesserung der Erfolgsrate der PTCA und reduziert die Rate kardialer Ereignisse nach PTCA (Schömig 1996). Indikationen für die koronare Stentimplantation sind eine unbefriedigende Gefäßdilatation nach PTCA (Restenose > 50 %), plötzlicher Gefäßverschluß sowie der angiographische Nachweis einer größeren Dissektion. Der Erfolg der Stentimplantation wird durch die ISAR-Studie belegt (Schömig 1994).

Trotz wirksamer antithrombotischer Therapien stellt die subakute Stentthrombose die häufigste ischämische Komplikation nach Stentimplantation dar. Die Therapie mit Heparin, oraler Antikoagulation und ASS konnte die Häufigkeit an subakuten Stentthrombosen, verbunden mit einem beträchtlichen Risiko an schweren Blutungen und vaskulären Komplikationen, nur ungenügend senken. Kombinierte antithrombotische Therapien mit ASS und Ticlopidin bzw. Clopidogrel zeigen eine Reduktion kardialer ischämischer Ereignisse nach Stentimplantation (Berger 2000, Bertrand 2000, Kolansky 2000). Jedoch entwickeln Ticlopidin oder Clopidogrel ihren maximalen Hemmeffekt erst Tage nach erstmaliger Gabe (Calver 2000, Gawaz 1999). Demzufolge ist die Effektivität einer Behandlung mit Aspirin und Ticlopidin für Hochrisikopatienten mit Myokardinfarkt und instabiler Angina pectoris ungenügend.

In der vorliegenden Arbeit können wir zeigen, daß die Verabreichung von Abciximab in Kombination mit Aspirin, Tiklopidin und / oder Clopidogrel bei Patienten mit koronarer Stentimplantation zu einer sofortigen Fibrinogenrezeptorblockade führt. Innerhalb von 96 Stunden kommt es zu einer allmählichen Abnahme der Rezeptorverfügbarkeit, die innerhalb dieses Zeitraumes unterhalb des Ausgangsniveaus bleibt. Wir schlußfolgern daraus, daß GPIIb-IIIa-Antagonisten das antithrombotische „Tiklopidin-Fenster“ schließen können und so zu einer weiteren Reduktion kardialer Komplikationen nach koronarer Stentimplantation beitragen. Diese Vermutung wird durch die kürzlich durchgeführte EPISTENT-Studie untermauert (The EPISTENT-Investigators). Hier konnte nach 30 Tagen eine 57 %-ige Verringerung von Tod, Myokardinfarkt und Re-Angioplastie durch die kombinierte Therapie von koronarer Stentimplantation und Abciximabgabe im Vergleich zur alleinigen Stentimplantation verzeichnet werden.

5.2 Aggregation und Deaggregation

Die Blockierung des GPIIb-IIIa Rezeptors durch Abciximab erfolgt dosisabhängig. Die maximale Rezeptorblockade wird innerhalb von 30 Minuten nach i.v.-Bolusgabe von 0,25 mg/kg Körpergewicht erreicht. Diese kann durch eine anschließende 12-stündige Abciximab-Infusion (10 µg/min) kontinuierlich aufrechterhalten werden.

Ein großer Teil der thrombozytären GPIIb-IIIa-Rezeptoren (30 %) liegt im Inneren des Blutplättchens, im „surface connected system“, und in den α -Granula gespeichert vor (Gawaz 1999). Nach Aktivierung werden diese Rezeptoren an die Oberfläche des Plättchens transportiert (Morgenstern 1992). In welchem Ausmaß die Rezeptoren freigesetzt werden, hängt von der Art der Aktivierung ab.

In unserer Studie können wir zeigen, daß die Stimulation mit ADP die Aggregation beinahe vollständig unbeeinflusst läßt. Auch die unterschiedlichen Stimulations-Konzentrationen (2, 5 und 20 µmol/l) zeigen hier keinen entscheidenden Einfluß. Die ADP-induzierte Aggregation kann somit unter der Standarddosierung von Abciximab effektiv gehemmt werden.

Die Untersuchung der Deaggregation ergab eine dosisabhängige Reaktion. Unter der Konzentration von 2 µmol/l ADP zeigt sich keine Zunahme der Deaggregation. Unter Erhöhung der Konzentration auf 5 und 20 µmol/l kann vor allem unter 20 µmol/l ADP eine kontinuierliche Zunahme der Deaggregation gemessen werden.

5.3 Freisetzungsreaktion

Die Effekte von Abciximab auf die Degranulation und Sekretion der Plättchen lassen sich zum einen anhand der ADP-induzierten gemessenen ATP-Freisetzung (dichte Granula), zum anderen über die P-Selektin Oberflächenexpression (α -Granula) bestimmen (Gawaz 1996; Michelson 1996). Der Zusammenhang zwischen der Oberflächenexpression von CD62 und der Freisetzungsreaktion ist jedoch noch unklar.

Die durchflußzytometrische Messung des Oberflächenmarkers P-Selektin ergibt in unserer Studie eine signifikant zunehmende anti-CD62P-Bindung innerhalb von 48 Stunden nach Infusionsbeginn. Die maximale Zunahme der P-Selektin-Expression zeigt sich innerhalb von 48 Stunden, nach 72 Stunden kann diese nicht mehr nachgewiesen werden. Daraus schließen wir auf eine irreversible Degranulation der Thrombozyten während dieses Zeitraumes. Eine Hemmung der P-Selektin-Degranulation können wir zu keinem Zeitpunkt messen.

Diese Tatsache läßt vermuten, daß eine potentiell zunehmende P-Selektin-Expression durch Abciximab bis ca. 48 Stunden nach Infusionsbeginn besteht. Ein möglicher kausaler Zusammenhang kann in einem partiellen agonistischen Effekt von Abciximab bestehen. So stellen Peter et al. vor allem bei geringfügigen Konzentrationen von Abciximab eine potentielle Aktivierung des GPIIb-IIIa-Rezeptors mit nachfolgender Fibrinogenbindung und Aggregation fest (Peter 1998). Folglich kann eine GPIIb-IIIa-Ligandenbindung eine Aktivierung der Plättchen induzieren. Diese Beobachtung könnte die über ca. 48 Stunden bestehende ADP-induzierte P-Selektin-Expression in unserer Studie teilweise erklären. Es unterstützt den von Peter et al. postulierten Mechanismus, daß Abciximab nach initialer Bindung an das oberflächliche GPIIb-IIIa zwischenzeitlich in die α -Granula transportiert wurde. Dieser Transportweg könnte eine Abschwächung des partiellen agonistischen Effektes von Abciximab zur Folge haben. Ähnliche Ergebnisse werden auch von Schneider et al. berichtet (Schneider 2000).

Im Aggregometer kommt es zu einer Abnahme bzw. Hemmung der ADP-induzierten ATP-Freisetzung bis 24 Stunden nach der Bolusgabe von Abciximab. Eine Beziehung zur ADP-Dosierung ergibt sich nicht. Somit ist Abciximab bis 24 Stunden nach Bolusgabe in der Lage, die ADP-induzierte ATP-Freisetzung, d.h. die Degranulation, zu unterbinden. Dieses Ergebnis könnte dadurch erklärt werden, daß die potentielle Aktivierung nicht generell alle, sondern speziell die α -Granula-Degranulation betrifft.

Die Sekretion vasoaktiver Substanzen spielt sowohl in der Entstehung der Atherosklerose (Ross 1999) als auch im Auftreten von Reokklusionen nach Koronarinterventionen eine wichtige Rolle (Chandrasekar and Tanguay 2000). Die durch Sekretion freigesetzten Wachstumsfaktoren wie „platelet-derived growth factor“ (PDGF) und „transforming growth factor β “ wirken in der Umgebung eines Plättchenthrombus mitogen für Fibroblasten und stimulieren proliferative und atherogene Prozesse im Bereich der Gefäßwandläsion (Heldin and Westermark 1999, Fuster 1990).

Ein wichtiger Zusammenhang besteht zwischen der Degranulation der Plättchen und dem Auftreten der subakuten Stentthrombose. Studien ergaben, daß thrombozytäre Aktivierungsmarker (P-Selektin) eine prädiktive Aussagekraft für die subakute Stentthrombose besitzen (Gawaz 1996 und 1997), die die Grundlage für die Weiterentwicklung neuer antithrombozytärer Therapien in der interventionellen Kardiologie darstellen.

Im Gegensatz zu ADP, das nur zu einer geringen Zunahme der oberflächlichen GPIIb-IIIa-Rezeptoren führt, konnte in anderen Studien gezeigt werden, daß die Thrombinaktivierung eine große Translokation von Fibrinogenrezeptoren bewirkt. Die Folge, besonders in klinischen Situationen mit erhöhter Thrombinaktivierung, wäre eine signifikante Restaggregation und intrakoronare Thrombusbildung trotz Gabe eines GPIIb-IIIa-Antagonisten. Die Möglichkeit der kombinierten Gabe eines Thrombinantagonisten in besonders thrombogenen Situationen bleibt in zukünftigen Studien zu überprüfen.

5.4 Pharmakologisches Monitoring der GPIIb-IIIa-Rezeptorantagonistherapie

Bei der Therapie mit GPIIb-IIIa-Antagonisten ist zu berücksichtigen, daß die Blockierung des Fibrinogenrezeptors ein reversibler Vorgang und von der aktuellen Plasmakonzentration abhängig ist. Um eine Thrombusbildung durch Hemmung des GPIIb-IIIa-Rezeptors zu verhindern, müssen > 80% der GPIIb-IIIa-Rezeptoren blockiert sein (The EPIC Investigators). Eine höhere Blockade (> 90%) erhöht das Risiko hämorrhagischer Komplikationen (Coller 1998). Da die Hemmung der Thrombozytenaggregation durch GPIIb-IIIa-Antagonisten sowie die Fibrinogenrezeptorblockade in einer steilen Dosis-Wirkungs-Beziehung stehen, ist die Dosierung der GPIIb-IIIa-Antagonisten erschwert. Bereits kleinste Unterschiede in der effektiven Plasmakonzentration des Inhibitors können zu großen Veränderungen in der Plättchenaggregation führen. Nicht zu vernachlässigen sind ferner der intraindividuelle Medikamentenmetabolismus, die periphere Thrombozytenzahl, die thrombozytäre Oberflächenrezeptorenanzahl sowie andere unbekannte Faktoren der Pharmakodynamik der

Fibrinogenrezeptorantagonisten (Coller 1998). Vor allem im Hinblick auf die Langzeittherapie mit oralen GPIIb-IIIa-Antagonisten ist die Überwachung der pharmakodynamischen Wirksamkeit dieser Therapie beim einzelnen Patienten anzustreben, was ein zuverlässiges pharmakologisches Monitoring erfordert.

Als technische Methode zur Untersuchung der GPIIb-IIIa-Rezeptor-Blockade anhand der ADP-induzierten Plättchenaggregation verwendeten wir das turbimetrische Verfahren. Diese in den sechziger Jahren erfundene Technik machte die Identifizierung und Bestimmung der Thrombozytenfunktion möglich und wurde der „Gold-Standard“ in der Thrombozytenfunktionsuntersuchung. Plättchenreichem Plasma (PRP) wird ein Agonist wie ADP zugegeben, woraufhin es zur Bildung von Plättchenaggregaten kommt, die durch zunehmende Lichttransmission detektiert und als Zeitfunktion nach Zugabe der Reagenz aufgezeichnet werden (Born 1962). Diese Methode erfordert einen hohen Arbeits- und Zeitaufwand, eine sorgfältige Qualitätskontrolle, große technische Sachkenntnis sowie exakte Interpretation der Ergebnisse. Trotz der Weiterentwicklung moderner Aggregometer mit der zusätzlichen Messung der ATP-Freisetzung via Lumineszenz steht diese Methode nur Speziallabors zur Verfügung. Vergleichende Tests deuten darauf hin, daß die Aggregometrie den Grad und die Dauer der GPIIb-IIIa-Rezeptor-Blockade unterschätzt (Mascelli 1997). Desweiteren konnte gezeigt werden, daß die Methode der Aggregometrie ungenügend sensitiv in der Detektierung von Thrombozytenmikroaggregaten oder der Überwachung der Plättchenfunktion ist (Born 1967, Frojmovic 1983). So geht man davon aus, daß mit dieser Technik Aggregate, die aus weniger als 100 Thrombozyten bestehen, nicht detektiert werden können (Thompson 1986). Die turbimetrische Methode ist somit zur Detektierung vorbestehender Plättchenaggregate bzw. Überwachung der frühen Phase der Aggregation relativ ungeeignet, was insbesondere bei Patienten mit einer Thrombozytenüberfunktion von Bedeutung ist.

Die Messung mit der Vollblutaggregometrie wurde im Hinblick auf die oben beschriebenen Schwierigkeiten der klassischen Aggregometrie entwickelt (Cardinal 1980), deren Ergebnisse denen der konventionellen Methode insbesondere bzgl. kleiner Plättchenaggregate ähnlich waren (Nicholson 1998, Storey 1999, Mascelli 1997).

Die GPIIb-IIIa-Rezeptor-Therapie kann ebenso durch die Messung der Thrombozytenaggregatbildung im Coulter Counter (Poullis 1999) oder der aktivierten Gerinnungszeit mit dem Hemostatus Test erfolgen (Coiffic 1999).

Die vermehrte Gabe von intravenösen und oralen GPIIb-IIIa-Antagonisten verlangt die Entwicklung einer einfachen, raschen und preisgünstigen Methode, die jederzeit in der Klinik als „bedside“-Bestimmungsmethode der Thrombozytenfunktion in standardisierter

Form zur Verfügung steht (Frelinger 1998, Smith 1999, Kereiakes 1999). Der Rapid Platelet Function Assay (RPFA) basiert auf dem Prinzip der zu der Anzahl der verfügbaren GPIIb-III-Rezeptoren proportionalen Agglutination von fibrinogenbedeckten Perlen (Coller 1997). Dieser Test ermöglicht sowohl die Messung der Plättchenaggregation als auch des Grades der GPIIb-IIIa-Rezeptor-Blockade. Da die Durchführung dieser Methode allerdings nicht standardisiert ist, wird sie nicht im Routinealltag angewendet.

In unserer Studie verwendeten wir die Durchflußzytometrie, um die Thrombozytenfunktion unter Abciximabtherapie mit fluoreszenzmarkierten monoklonalen Antikörpern zu bestimmen (Harrison 2000, Davis 1999, Kunz 2001). Während des gesamten Beobachtungszeitraumes unter Abciximabtherapie kann keine Veränderung des Immunfluoreszenzhistogramms von anti-CD41 bzw. des fluoreszenzkonjugierten c7E3 nachgewiesen werden. Dies bedeutet, daß alle zirkulierenden Thrombozyten während dieses Zeitraumes nachweisbare Mengen von Abciximab gebunden haben.

Das Verteilungsmuster der Abciximabbindung in der Thrombozytenpopulation läßt auf einen Zusammenhang zwischen der Wiederherstellung der Plättchenfunktion und des Langzeiteffektes von Abciximab in Hinsicht auf die Vermeidung ischämischer Komplikationen nach PTCA schließen.

Die mit der Durchflußzytometrie ermittelten Thrombozytenzahlen sind mit Abweichungen von weniger als fünf Prozent höchstgenau. Sie stellt eine zuverlässige und einfache Methode zur Therapieüberprüfung der GPIIb-IIIa-Rezeptorantagonisten dar und könnte eine international anerkannte Methode werden (Hezard 1999, Harrison 2000, Kunz 2001). Zusätzlich ist mit dieser Methode eine Unterscheidung zwischen abciximabbesetzten Rezeptoren und Rezeptoren, die von anderen synthetischen Rezeptorantagonisten blockiert sind, möglich (Quinn 1999). Auf diese Weise kann ein zuverlässiges pharmakologisches Monitoring bei Patienten durchgeführt werden, die von Abciximab auf einen niedermolekularen GPIIb-IIIa-Rezeptorantagonisten wie Eptifibatide umgestellt werden.

Niedermolekulare GPIIb-IIIa-Rezeptorantagonisten mit einer kurzen thrombozytenaggregationshemmenden Wirkung bis ca. 4 Stunden nach Gabe weisen im Gegensatz zu Abciximab, das noch Tage nach der Anwendung auf der Thrombozytenoberfläche nachweisbar ist, eine weniger effektive Fibrinogenrezeptorblockade auf. Hingegen können durch den Einsatz niedermolekularer Substanzen aufgrund der raschen Wiederherstellung der Thrombozytenfunktion innerhalb weniger Stunden nach Absetzen Blutungskomplikationen minimiert werden (Kleiman 1999, Tchong 1999).

5.5 Fibrinogenrezeptorantagonisten-induzierte Thrombozytopenie

Unter Abciximabtherapie können vermehrt hämorrhagischen Komplikationen mit nachfolgender Gabe von Bluttransfusionen beobachtet werden (Blankenship 1999, Juran 1999, The CAPTURE Investigators, The EPIC Investigators). Dieses erhöhte Blutungsrisiko wird überwiegend durch sich akut (wenige Stunden nach Therapiebeginn) entwickelnde Thrombozytopenien (bis zu fünf Prozent der Patienten) verursacht (Gawaz 1999, Kereiakes 2000). Besonders bei schweren Thrombozytopenien $< 20.000/\mu\text{l}$ unter einer antithrombozytären Therapie mit GPIIb-IIIa-Antagonisten, die die wenigen Plättchen in ihrer Funktion hemmen, sowie paralleler Gabe weiterer antithrombotischer Substanzen wie z.B. Acetylsalicylsäure und Heparin kann es zu lebensbedrohlichen Zuständen kommen. Die Therapie besteht in der Gabe von Thrombozytenkonzentraten, die innerhalb von 24 Stunden zu einem Anstieg der Thrombozyten führen. Abgesehen davon erholen sich die Thrombozyten nach Absetzen der Abciximabtherapie innerhalb von 12 Tagen ($> 100.000/\mu\text{l}$) (Jubelirer 1999).

Eine wichtige Differentialdiagnose stellt die Pseudothrombozytopenie im EDTA-Blut durch Bildung von Plättchenaggregaten dar (Moll 1999; Christopoulos 1994). Eine parallele Bestimmung der Thrombozyten im Zitratblut kann diese ausschließen.

Der der Thrombozytopenie zugrundeliegende Pathomechanismus ist noch nicht bekannt. Eine mögliche Erklärung zeigt ein Beispiel an der Maus. Natürlich vorkommende Antikörper erkennen Epitope auf IgG, die noch auf dem Fab-Fragment vorhanden sind. Die Immunkomplexbindung durch die Plättchen geschieht nach dem Kontakt mit dem retikuloendothelialen System und der Milz.

Ferner besteht die Möglichkeit, daß Immunglobuline Neoepitope auf GPIIb-IIIa erkennen, die durch die Bindung des GPIIb-IIIa-Antagonisten an seinen Rezeptor (LIBS-Induktion) freigelegt werden und so die Entstehung der Thrombozytopenie fördern (Cines 1998, Jennings 1998, Madan 1999).

So können wir in unserer Studie nach Abciximabgabe eine vermehrte LIBS-1-Oberflächenexpression der Thrombozyten feststellen, die mit der Thrombozytenzahl invers korreliert.

Peter et al. postulieren als weiteren Faktor der Thrombozytopenie die intrinsische Aktivität der GPIIb-IIIa-Rezeptorantagonisten (Peter 1999).

Desweiteren können durch Bindung von Abciximab Konformationsänderungen des Rezeptors bewirkt werden, wodurch ein hochaffiner, proaggregatorischer Funktionszustand des Fibrinogenrezeptors entsteht, der letztendlich zur Entwicklung einer Thrombozytopenie führt (Peter 1998).

5.6 Variabilität der Thrombozytenfunktion

Die in unserer Studie verwendete Dosierung von Abciximab bewirkt, wie bereits in früher durchgeführten Studien demonstriert, eine ≥ 80 %ige GPIIb-IIIa-Rezeptor-Blockade und hochgradige Inhibierung der Plättchenaggregation bei einem Großteil der Patienten (Ellis 1993; Collier 1989, Tcheng 1994). Zudem wird eine interindividuelle Variabilität bezüglich des Grades der erreichten GPIIb-IIIa-Rezeptor-Blockade unter der besagten Abciximab-Dosierung festgestellt (Tcheng 1994, Collier 1997). Erst kürzlich durchgeführte Studien zeigen, daß beinahe fünf Prozent der Patienten nach der erhaltenen Standarddosierung nicht die hohe GPIIb-IIIa-Inhibition erreichen (≥ 80 %) und bei 10-13 % die hochgradige Inhibierung während der 12-stündigen Infusion nicht aufrecht erhalten werden kann.

In unserer Studienpopulation zeigt ein Patient eine verminderte Abnahme der Aggregation bzw. unvollständige Hemmung bis zwölf Stunden nach der Bolusgabe von Abciximab, und zwar unabhängig von der Höhe der ADP-Stimulation (2, 5 oder 20 μmol ADP).

Es muß somit davon ausgegangen werden, daß einige Individuen sensitiver auf Abciximab ansprechen.

Dies wird erstmals von Casterella et al. in einer Studie gesehen, in der eine signifikante Patientenzahl eine ≥ 80 %ige Plättcheninhibition unter einer niedrigeren Dosierung als der bisherigen Standarddosierung von Abciximab aufzeigen.

Bezüglich der interindividuellen Ansprechrate auf Abciximab geht man von einem Zusammenhang zwischen der Plättchenfunktion und verschiedenen klinischen Erscheinungsbildern (z.B. Diabetes mellitus, Geschlecht, Zigarettenkonsum, akute koronare Syndrome) und der Thrombozytenzahl aus. Eine signifikante Abhängigkeit kann jedoch nicht nachgewiesen werden.

Andere Studien zeigen beträchtliche Unterschiede in der GPIIb-IIIa-Rezeptordichte auf (Phillips 1988). Es besteht somit ein möglicher Zusammenhang zwischen der unterschiedlichen Plättchenfunktion unter Abciximabtherapie und der Rezeptordichte auf der Thrombozytenoberfläche. Um dies zu belegen, sind weitere Studien erforderlich.

Die Vorteile einer niedrigeren Dosierung von Abciximab bestehen sowohl in einer Reduzierung der Blutungskomplikationen als auch in einer Kostenersparnis.

5.7 Studienbeschränkungen

Untersuchungen der Thrombozytenfunktion werden immer bei der Gewinnung oder Verarbeitung der Proben durch das Risiko einer artifiziellen Thrombozytenaktivierung *in vitro* beeinträchtigt. Zur Vermeidung fehlerhafter Ergebnisse hielten wir sämtliche methodischen Verfahren innerhalb der untersuchten Individuen konstant. Zudem wurden alle Proben innerhalb kürzester Zeit verarbeitet und analysiert.

Die durchflußzytometrische Untersuchung erlaubt nur Aussagen über noch zirkulierende Thrombozyten. Eine Beurteilung über Blutplättchen, die bereits sequestriert wurden, ist nicht möglich. Somit besteht die Möglichkeit, daß die thrombozytäre Aktivierung unterbewertet wird, was besonders bei Patienten mit schwerer Thrombozytopenie zum Tragen kommen könnte.

Ferner war die Studiengruppe hinsichtlich der Fallzahlen groß genug, um die Auswirkung des Therapieplanes auf die Plättchenfunktion zu untersuchen.

Bei hoher Thrombozytenzahl im plättchenreichen Plasma (> 350 K/ μ L) ist die gemessene Hemmung der Plättchenaggregation durch Abciximab vermindert (Kereiakes 2000). Somit stellt sich die Frage, ob unterschiedliche Thrombozytenzahlen die Meßwerte der Durchflußzytometrie und Aggregometrie signifikant beeinflusst und zu falschen Ergebnissen geführt haben.

Eine Antwort auf die Frage, ob ein Zusammenhang zwischen der erhöhten LIBS-1-Oberflächenexpression und einer Thrombozytopenie unter Abciximabgabe besteht und auf diese Weise pathophysiologische Konsequenzen mit sich bringt, konnten wir in unserer Studie nicht geben. Eine von McQueney et al. durchgeführte Studie zeigt, daß GPIIb-IIIa-Rezeptorantagonisten unterschiedliche Neoepitope auf dem Fibrinogenrezeptor induzieren und nur gewisse GPIIb-IIIa-Rezeptorantagonisten zu einer LIBS-1-Oberflächenexpression führen (McQueney, 1996). Um einen Zusammenhang zwischen der erhöhten LIBS-1-Oberflächenexpression und der Thrombozytopenie unter GPIIb-IIIa-Rezeptorantagonisten zu klären, müßten vergleichende Studien mit verschiedenen GPIIb-IIIa-Rezeptorantagonisten veranlaßt werden.

Desweiteren ergibt sich die Frage eines synergistischen Effektes anderer Thrombozytenhemmer wie Ticlopidin und Abciximab auf die Plättchenfunktion. So fanden Peter et al., daß Acetylsalicylsäure und Indomethacin nicht die intrinsischen Aktivierungsvorgänge von Abciximab blockieren, jedoch die von Abciximab induzierte Thrombozytenaggregation verhindern können (Peter 1998). Somit sind Cyclooxygenasehemmer in der Lage, die durch GPIIb-IIIa-Antagonisten verursachte Plättchenaggregation zu inhibieren.

5.8 Therapeutische Ausblicke

Die im Rahmen dieser Studie zusammengetragenen Ergebnisse der Wirkungsweise von Abciximab bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung können bei der Weiterentwicklung neuer Fibrinogenrezeptorantagonisten behilflich sein. So führt die Gabe von Abciximab zu einer LIBS-1-Induktion, die invers mit der peripheren Thrombozytenzahl korreliert. Der zugrundeliegende Pathomechanismus ist jedoch noch nicht geklärt. Berkowitz et al. postulieren, daß die Expression von LIBS-Neoepitopen eine Antikörperproduktion gegen die LIBS-Neoepitope veranlaßt und damit eine Immunthrombozytopenie nach sich ziehen könnte (Berkowitz 1997).

Die Tatsache, daß Abciximab eine LIBS-1-Oberflächenexpression und Induktion proaggregatorischer Effekte mit nachfolgender Thrombozytopenie hervorruft, wirft ebenfalls neue Fragen in der antithrombozytären Therapiestrategie auf (Peter 1998). Die weitere Untersuchung oraler GPIIb-IIIa-Rezeptorantagonisten bei Patienten mit akuten Koronarsyndromen kann die frühzeitige Erkennung einer Thrombozytopenie ermöglichen und somit eine therapeutische Anwendung limitieren.

LIBS-1-induzierte GPIIb-IIIa-Rezeptorantagonisten können eine Thromboxansynthese bewirken (Honda 1998). Das vasokonstriktorisch wirkende Thromboxan A₂ fördert zusätzlich die Aktivierung und Aggregation der Thrombozyten. Dies kann zu einer wesentlichen Beeinträchtigung des koronaren Durchflusses während thromboembolischer Ereignisse führen.

Ebenfalls werden unterschiedliche Effekte von Abciximab auf die Funktion weiterer Integrinrezeptoren beobachtet. Die Kreuzreaktion von Abciximab mit dem Vitronektinrezeptor, der eine zentrale Rolle bei der Migration und Proliferation glatter Muskelzellen und der Neointimabildung nach Gefäßwandverletzung spielt (Coller 1999), führt im Tiermodell zu einer Hemmung der Proliferation glatter Muskelzellen (Coller 1997). Somit besitzt Abciximab möglicherweise neben der aggregationshemmenden Aktivität auch einen positiven Effekt auf die Antiproliferation, was eine Reduktion der Restenosierung bewirken könnte. Eine potentiell antiinflammatorische Wirkung wird über die Bindung von Abciximab an den MAC-1-Rezeptor diskutiert, womit die Adhäsion von Monozyten an die verletzte Gefäßwand verhindert wird.

Unter Berücksichtigung der vielen unterschiedlichen Mechanismen der Thrombozytenaktivierung besteht die klinische Herausforderung nun darin, eine optimale Kombination antithrombozytärer Substanzen zur effizienten Hemmung einer Thrombusbildung zu finden. Zukünftige klinische Studien könnten auf den einzelnen Patienten und Krankheitsverlauf abgestimmte Dosierungen der synergistisch wirkenden Substanzen prüfen und damit das Risiko von Nebenwirkungen senken helfen. Denkbar wäre bei Patienten mit hohem koronarem Risiko eine kombinierte Therapie aus GPIIb-IIIa-Antagonisten, Acetylsalicylsäure und Clopidogrel (Gawaz 1999).

6 Zusammenfassung

GPIIb-IIIa-Rezeptorantagonisten inhibieren die Thrombozytenaggregation und werden zur Prävention ischämischer Komplikationen nach PTCA und koronarer Stentimplantation eingesetzt. Zahlreiche Studien können eine signifikante Reduktion postinterventioneller akuter Ereignisse verzeichnen.

Im Rahmen dieser Arbeit untersuchten wir in einer klinisch-experimentellen Studie die Auswirkung von Abciximab auf die Thrombozytenfunktion bei Patienten mit ischämischer Herzkrankheit, die eine PTCA mit Stentimplantation erhielten. Bei 20 Patienten wurden die Veränderungen der thrombozytären Membranrezeptoren, die Blockade von GPIIb-IIIa-Rezeptoren, die Aggregation, die Deaggregation sowie die Freisetzung von ATP in einem Beobachtungszeitraum von 96 Stunden aufgezeichnet. Zur Messung der Thrombozytenaggregation und Freisetzung von ATP bedienten wir uns der Technik der Aggregometrie und Luminometrie, zur Bestimmung des Aktivierungszustandes der thrombozytären Membranglykoproteine der Durchflußzytometrie.

Unter Abciximabtherapie zeigte sich eine nahezu vollständige Inhibierung der ADP-induzierten Plättchenaggregation. Die ADP-Stimulation ließ die Thrombozytenaggregation auch unter unterschiedlichen Dosierungen unbeeinflusst.

Eine maximale Zunahme der ADP-stimulierten P-Selektin-Expression sowie die durchflußzytometrisch gemessene gesteigerte P-Selektin-Freisetzung aus den α -Granula haben wir innerhalb von 48 Stunden nachgewiesen.

Desweiteren kam es unter Abciximabtherapie zu einer signifikanten Reduktion des GPIIb-IIIa-Rezeptoranteils, der für die Fibrinogenbindung zur Verfügung steht. Gleichzeitig konnte eine Thrombozytenaktivierung mit einer vermehrten LIBS-1-Induktion gemessen werden. Diese korreliert invers mit der verminderten Thrombozytenzahl.

Auch in unserer Arbeit wurde eine interindividuelle Variabilität bezüglich des Grades der erreichten GPIIb-IIIa-Rezeptor-Blockade unter der standardisierten Abciximab-Dosierung festgestellt.

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit ermittelten Ergebnisse zeigen, daß unter Abciximabtherapie eine rasche GPIIb-IIIa-Rezeptorblockade gewährleistet ist und so das „Tiklopidinfenster“ der antithrombozytären Therapie geschlossen werden kann, um eine weitere Reduktion kardialer Ereignisse nach PTCA und Stentimplantation zu erreichen.

7 Abkürzungsverzeichnis

AA	Arachidonsäure
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosin-diphosphat
ASS	Acetylsalicylsäure
ATP	Adenosin-triphosphat
CABG	coronary artery bypass graft
Capture	chimeric 7E3 antiplatelet in unstable angina refractory to standard treatment
CD	Cluster of Determinants
CLASSICS	clopidogrel aspirin stent international cooperative study
DTS	dense tubular system
EDTA	ethylene diamine tetraacetic acid
EPIC	evaluation of IIb-IIIa platelet receptor antagonist 7E3 in preventing ischemic complications
EPILOG	evaluation of PTCA to improve long term outcome by c7E3 GPIIb-IIIa receptor blockade
EPISTENT	evaluation of platelet IIb/IIIa inhibitor for stenting
ERASER	evaluation of ReoPro and stenting to eliminate restenosis
FACS	fluorescent activated cell sorter
Fg	Fibrinogen
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
Fn	Fibronektin
GP	Glykoprotein
IE	Internationale Einheiten
Ig	Immunglobulin
IMPACT	integrelin to manage platelet aggregation to combat thrombosis
ISAR	intracoronary stenting and antithrombotic regimen
i.v.	intravenös

LAD	left anterior descending coronary artery
LCx	left circumflex coronary artery
LIBS	ligandeninduzierte Bindungsstellen
M	mol/l
PBS	phosphate-buffered saline
p.o.	per os
PPP	platelet poor plasma
PRISM	platelet receptor inhibition for ischemic syndrome management
PRISM PLUS	platelet receptor inhibition for ischemic syndrome management plus
PRP	platelet rich plasma
PTCA	perkutane transluminale Coronarangioplastie
PTT	partielle Thromboplastinzeit
PURSUIT	platelet IIb-IIIa underpriming the receptor for suppression of unstable ischemic
RAPPORT	ReoPro in acute myocardial infarction and primary PTCA organization and randomized trial
RCA	right coronary artery
RESTORE	randomized efficacy study of tirofiban for outcomes and restenosis
RIBS	rezeptorinduzierte Bindungsstellen
Tab.	Tabelle
TARGET	do tirofiban and abciximab for revascularisation give equivalent outcomes trial?
TIMI	thrombolysis in myocardial infarction
vs	versus
vWF	von-Willebrand-Faktor

8 Literaturverzeichnis

- 1 Abrams C, Shattil SJ. Immunological detection of activated platelets in clinical disorders. *Thromb Haemost* 1991; 65: 467-473
- 2 Adgey AA. An overview of the results of clinical trials with glycoprotein IIb/IIIa inhibitors. *Am Heart J* 1998; 135: 43-55
- 3 Belisario MA, Tafuri S, Di Domenico C, Della Morte R, Squillacioti C, Lucisano A, Staiano N. Immobilised echistatin promotes platelet adhesion and protein tyrosine phosphorylation. *Biochem Biophys Acta* 2000; 1497: 227-236
- 4 Bennet JS, Shattil SJ, Power JW, Gartner TK. Interaction of fibrinogen with its platelet receptor. *J Biol Chem* 1988; 255: 12948-12953
- 5 Berger PB. Clopidogrel instead of ticlopidine after coronary stent placement: is the switch justified? *Am Heart J* 2000; 140: 354-358
- 6 Berkowitz SD, Harrington RA, Rund MM, Tcheng JE. Acute thrombocytopenia after c7E3 FAB therapy. *Circulation* 1997; 95: 809-813
- 7 Bertrand ME, Rupprecht HJ, Urban P, Gershlick AH, Investigators ft. 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* 2000; 102: 624-629
- 8 Blankenship JC. Bleeding complications of glycoprotein IIb-IIIa receptor inhibitors. *Am Heart J* 1999; 138: 287-296
- 9 Born GVR, Cross MJ. The aggregation of blood platelets. *J Physiol* 1963; 168: 178-196
- 10 Born GV, Hume M. Effects of the numbers and sizes of platelet aggregates on the optical density of plasma. *Nature* 1967; 215: 1027
- 11 Calver AL, Blows LJ, Harmer S, Dawkins KD, Gray HH, Morgan JH, Simpson IA. Clopidogrel for prevention of major cardiac events after coronary stent implantation: 30-day and 6-month results in patients with smaller stents. *Am Heart J* 2000; 140: 483-491
- 12 Cannon CP, Tracy R. Clotting for the clinician: an overview of thrombosis and antithrombotic therapy. *J Thrombosis and Thrombolysis* 1995; 2: 95-106

- 13 Cardinal DC, Flower RJ. The electronic aggregometer: a novel device for assessing platelet behavior in blood. *J Pharmacol Methods* 1980; 3: 135
- 14 Chandrasekar B and Tanguay JF: Platelets and restenosis. *J Am Coll Cardiol* 2000; 35: 555-562
- 15 Christopoulos CG, Machin SJ. A new type of pseudothrombocytopenia: EDTA-mediated agglutination of platelets bearing Fab fragments of a chimeric antibody. *Br J Haematol* 1994; 87: 650-652
- 16 Cines DB. Glycoprotein IIb/IIIa antagonists: potential induction and detection of drug-dependent antiplatelet antibodies. *Am Heart J* 1998; 135: S152-S159
- 17 Cohen LS. Clinical pharmacology of acetylsalicylic acid. *Sem Thromb Hemost* 1976; 2: 95-106
- 18 Coiffic A, Cazes E, Janvier G, Forestier F, Lanza F, Nurden A, Nurden P. Inhibition of platelet aggregation by abciximab but not by aspirin can be detected by a new point-of-care test, the hemostatus. *Thromb Res* 1999; 95: 83-91
- 19 Collier BS. Blockade of platelet GPIIb/IIIa receptors as an antithrombotic strategy. *Circulation* 1995; 92: 2373-2380
- 20 Collier BS. Platelet GPIIb/IIIa antagonist: the first anti-integrin receptor therapeutics. *J Clin Invest* 1997; 99: 1467-1471
- 21 Collier BS. Potential non-glycoprotein IIb/IIIa effects of abciximab. *Am Heart J* 1999; 138: 1-5
- 22 Collier BS. Monitoring platelet GP IIb/IIIa antagonist therapy. *Circulation* 1997; 96: 3828-3832
- 23 Collier BS. Monitoring platelet GP IIb/IIIa antagonist therapy. *Circulation* 1998; 97: 5-9
- 24 Collier BS, Folts JD, Smith SR, Scudder LE, Jordan R. Abolition of in vivo platelet thrombus formation in primates with monoclonal antibodies to the platelet GP IIb/IIIa receptor: correlation with bleeding time, platelet aggregation and blockade of GP IIb/IIIa receptor. *Circulation* 1989; 80: 1766-1774
- 25 Collier BS, Lang D, Scudder DE. Rapid and simple platelet function assay to assess glycoprotein IIb/IIIa receptor blockade. *Circulation* 1997; 95: 860
- 26 Collier BS, Peerschke EI, Scudder LE, Sullivan CA. A murine monoclonal antibody that completely blocks the binding of fibrinogen to platelets produces a thrombastenic-like state in normal platelets and binds to glycoproteins IIb and/or IIIa. *J Clin Invest* 1983; 72: 325-338

- 27 Coukell AJ, Markham A. Clopidogrel. *Drugs*. 1997; 54: 745-750
- 28 Davis B, Bigelow N. Indirect immunoplatelet counting by flow cytometry as a reference method for platelet count calibration. *Laboratory Hematology* 1999; 5: 15
- 29 Ellis SG, Tchong JE, Navetta FI, Muller DWM, Weisman HF, Smith C, Anderson KM, Califf RM, Topol EJ. Safety and antiplatelet effect of murine monoclonal antibody 7E3 Fab directed against platelet glycoprotein IIb/IIIa in patients undergoing elective coronary angioplasty: An initial experience. *Coron Art Dis* 1993; 4: 167-175
- 30 Ferguson JJ. What have we learned from ESPRIT? What will we learn from TARGET? *J Invasive Cardiol* 2000; 12: 317-319
- 31 Frelinger AL, Du X, Plow EF, Ginsberg MH. Monoclonal antibodies to ligand-occupied conformers of integrin alpha IIb beta 3 (glycoprotein IIb-IIIa) alter receptor affinity, specificity and function. *J Biol Chem*; 1991; 266: 17106-17111
- 32 Frelinger AL, Hillman RS. Novel methods for assessing platelet function. *Am Heart J* 1998; 136: S184
- 33 Frojmovic MM, Milton JG, Duchastel A. Microscopic measurements of platelet aggregation reveal a low ADP-dependent process distinct from turbidometrically measured aggregation. *J Lab Clin Med* 1983; 101: 964
- 34 Fuster V, Stein B, Ambrose JA, et al. Atherosclerotic plaque rupture and thrombosis. Evolving concepts. *Circulation* 1990; 82 suppl 3: II47-59
- 35 Gawaz M, Neumann FJ, Ott I, May A, Rüdiger S, Schömig A. Changes in membrane glycoproteins of circulating platelets after coronary stent implantation. *Heart* 1996; 76: 166-172
- 36 Gawaz M, Neumann FJ, Ott I, May A, Rüdiger S, Schömig A. Role of activation-dependent platelet membrane glycoproteins in development of subacute occlusive coronary stent thrombosis. *Coron Art Dis* 1997; 8: 121-128
- 37 Gawaz M. Antithrombozytäre Substanzen. In: Gawaz M (Ed.). *Das Blutplättchen*. Stuttgart-New York, Georg Thieme Verlag 1999: 54-79
- 38 Gawaz M. Thrombozytäre Membranglykoproteine. In: Gawaz M (Ed.). *Das Blutplättchen*. Stuttgart-New York, Georg Thieme Verlag 1999: 30-41
- 39 Gawaz M. Thrombozyten und primäre Hämostase. In: Gawaz: (Ed.). *Das Blutplättchen*. Stuttgart-New York, Georg Thieme Verlag 1999: 4-24

- 40 Gawaz M. Medikamenteninduzierte Thrombozytenopenie. In: Gawaz M (Ed.). Das Blutplättchen. Stuttgart-New-York, Georg Thieme Verlag 1999: 80-84
- 41 Gawaz MP, Dobos G, Späth M, Mujais SK. Platelet membrane glykoprotein IIb-IIIa function is impaired in end-stage renal disease. *J Am Soc Nephrol* 1994; 5: 36-46
- 42 Gawaz M, Fateh-Moghadam S, Pilz G, Gurland HJ, Werdan K. Platelet activation and interaction with leucocytes in patients with sepsis or multiple organ failure. *Eur J Clin Invest* 1995; 25: 843-851
- 43 Gawaz M, Fateh-Moghadam S, Pilz G, Gurland HJ, Werdan D. Severity of multiple organ failure but not of sepsis correlates with irreversible platelet degranulation. *Infection* 1995; 23: 16-27
- 44 Gawaz MP, Mujais SK, Schmid B, Gurland HJ. Platelet leukocyte aggregation during hemodialysis. *Kidney international* 1994; 46: 489-495
- 45 Gawaz MP, Ward RA. Effects of hemodialysis on platelet-derived thrombospondin. *Kidney intern* 1991; 40: 257-265
- 46 Gawaz M, Neumann FJ, Ott I, Schiessler A, Schömig A. Platelet function in acute myocardial infarction treated with direct angioplasty. *Circulation* 1996; 93: 229-237
- 47 Ginsberg MH, Frelinger AL, Lam SCT, Forsyth J, McMillan R, Plos EF, Shattil SJ. Analysis of platelet aggregation disorders based on flow cytometric analysis of platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa with conformation specific monoclonal antibodies. *Blood* 1990; 76: 2017-2023
- 48 Hagberg LA, Lyberg T. Blood platelet activation evaluated by flow cytometry: optimised methods for clinical studies. *Platelets* 2000; 11: 137-150
- 49 Harker LA, Bruno JJ. Ticlopidine mechanism of action on human platelets. Aus: Hass K, Easton JD (Hrsg). *Ticlopidine, Platelets and Vascular Disease*. New York, NY: Springer Verlag; 1993: 99-116
- 50 Harrison P, Horton A, Grant D, et al. Immunoplatelet counting: a proposed new reference procedure. *Br J Haematol* 2000; 108: 228
- 51 Heldin CH and Westermark B: Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. *Physiol Rev* 1999; 79: 1283-1316
- 52 Hezard N, Metz D, Nazeyrollas P, Nguyen P, Simon G, Daliphard S, Droulle D, Elaerts J, Potron G. Free and total platelet glycoprotein IIb/IIIa measurement in

- whole blood by quantitative flow cytometry during and after infusion of c7E3 Fab in patients undergoing PTCA. *Thromb Haemost* 1999; 81: 869-873
- 53 Honda S, Tomiyama Y, Aoki T, Shiraga M, Kurata Y, Seki J, Matsuzawa Y. Association between ligand-induced conformational changes of integrin α IIb β 3 and α IIb β 3-mediated intracellular Ca²⁺ signaling. *Blood* 1998; 92: 3675-3683
- 54 Jennings LK, White MM. Expression of ligand-induced binding sites on glycoprotein IIb/IIIa complexes and the effect of various inhibitors. *Am Heart J* 1998; 135: 179-183
- 55 Jubelirer SJ, Koenig BA, Bates MC. Acute profound thrombocytopenia following c7E3 Fab (Abciximab) therapy: case reports, review of the literature and implications for therapy. *Am J Hematol* 1999; 61: 205-208
- 56 Juran NB. Minimizing bleeding complications of percutaneous coronary intervention and glycoprotein IIb-IIIa antiplatelet therapy. *Am Heart J* 1999; 138: 297-306
- 57 Kamm W, Raddatz P, Gante J, Kissel T. Prodrug approach for alphaIIbbeta3-peptidomimetic antagonists to enhance their transport in monolayers of a human intestinal cell line (Caco-2): comparison of in vitro and in vivo data. *Pharm Res* 1999; 16: 1527-1533
- 58 Kereiakes DJ, Berkowitz SD, Lincoff AM, Tcheng JE, Wolski K, Achenbach R, Melsheimer R, Anderson K, Califf RM, Topol EJ. Clinical correlates and course of thrombocytopenia during percutaneous coronary in the era of abciximab platelet glycoprotein IIb/IIIa blockade. *Am Heart J* 2000; 140: 74-80
- 59 Kereiakes DJ, Broderick TM, Roth EM, Whang D, Shimshak T, Runyon JP, Hattemer C, Schneider J, Lacock P, Mueller M, Abbottsmith CW. Time course, magnitude and consistency of platelet inhibition by abciximab, tirofiban or eptifibatide in patients with unstable angina pectoris undergoing percutaneous coronary intervention. *Am J Cardiol* 1999; 84: 391-395
- 60 Kereiakes DJ, Broderick TM, Roth EM, Whang D, Mueller M, Lacock P, Anderson LC, Howard W, Blanck C, Schneider J, Abbottsmith CA. High platelet count in platelet-rich plasma reduces platelet inhibition by abciximab but not tirofiban nor eptifibatide glycoprotein IIb/IIIa receptor antagonists. *J Thromb Thrombolysis* 2000; 9: 149-155

- 61 Kereiakes DJ, Mueller M, Howard W, et al. Efficacy of abciximab induced platelet blockade using a rapid point of care assay. *J Thromb Thrombolysis* 1999; 7: 265
- 62 Kleiman NS. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of glycoprotein IIb-IIIa inhibitors. *Am Hear J* 1999; 138: S 263-S 275
- 63 Kolansky DM, Klugherz BD, Curran SC, Herrmann HC, Magness K, Wilensky RL, Hirshfeld JW Jr. Combination therapy with clopidogrel and aspirin after coronary stenting. *Catheter Cardiovasc Interv* 2000; 50: 276-279
- 64 Kunz D, Kunz WS, Scott CS, Gressner AM. Automated CD61 immunoplatelet analysis of thrombocytopenic samples. *Br J Haematol* 2001; 112: 584
- 65 Kuwahara M, Sugimoto M, Tsuji S, Miyata S, Nishio K, Kaku S, Suzuki K, Kawasaki T, Yoshioka A. Comparative studies on the antiplatelet effects of humanized anti-platelet glycoprotein IIb/IIIa antibody (YM 337) and ReoPro under flow conditions. *Thromb Haemost* 1998; 80: 28-31
- 66 Lefkovits J, Plow EF, Topol EJ: Platelet glycoprotein IIb/IIIa receptors in cardiovascular medicine. *New Engl J Med* 1995; 332: 1553-1559
- 67 Leytin V, Shapiro H, Novikov I, Radnay J. Flow cytometric analysis of the platelet surface area and surface density of glycoprotein IIb-IIIa of unactivated human platelets of various sizes. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 226: 94-100
- 68 Mackie IJ, Neal CR. *The Platelet. Platelet-vessel wall interactions (The Bloomsbury series in clinical science)*. Springer Verlag Berlin, Heidelberg; 1988: 1-32
- 69 Madan M, Berkowitz SD. Understanding thrombocytopenia and antigenicity with glycoprotein IIb-IIIa inhibitors. *Am Heart J* 1999; 138: 317-326
- 70 Madan M, Berkowitz SD, Tchong JE. Glycoprotein GPIIb-IIIa integrin blockade. *Circulation* 1998; 98: 2629-2635
- 71 Mascelli MA, Worley S, Veriabo NJ, et al. Rapid assessment of platelet function with a modified whole-blood aggregometer in percutaneous transluminal coronary angioplasty patients receiving anti-GP IIb/IIIa therapy. *Circulation* 1997; 96: 3860
- 72 McQueney PA, Bollag DM, Hartmann GD, Gould RJ, Bednar B. Characterization of ligand induced binding sites on GPIIb/IIIa upon binding of GPIIb/IIIa antagonists using monoclonal antibodies. *Circulation* 1996; 94: I-99

- 73 Metcalfe P, Williamson LM, Reutelingsperger CP; Swann I, Ouwehand WH, Goodall AH. Activation during preparation of therapeutic platelets affects deterioration during storage: a comparative flow cytometric study of different production methods. *Br J Haematol* 1997; 98: 86-95
- 74 Michelson AD, Barnard MR, Hechtmann HB, MacGregor H, Connolly RJ, Loscalzo J, Valerie CR: In vitro tracking of platelets circulating degranulated platelets rapidly lose surface P-selectin but continue to circulate and function. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 11877-11882
- 75 Michelson AD. Flow cytometry: a clinical test of platelet function. *Blood* 1996; 87: 4925-4936
- 76 Moll S, Poepping I, Hauck S, Gulba D, Dietz R. Images in cardiovascular medicine: pseudothrombocytopenia after abciximab (ReoPro) treatment. *Circulation* 1999; 100: 1460
- 77 Mousa SA, Bennett JS. Platelets in health and disease: Platelet GPIIb-IIIa structure and function: recent advances in antiplatelet therapy. *Drugs of the future* 1996; 21: 1141-1154
- 78 Morgenstern E, Ruf A, Patscheke H. Transport of anti-glykoprotein IIb/IIIa-antibodies into the alphagranulas of unstimulated human blood platelets. *Thromb Haemost* 1992; 67: 121-125
- 79 Nicholson NS, Panzer-Knodle SG, Haas NF, et al. Assessment of platelet function assays. *Am Heart J* 1998; 135: S170
- 80 Nurden P, Poujol C, Durrieu-Jais C, Winckler J, Combrie R, Macchi L, Bihour C, Wagner C, Jordan R, Nurden AT. Labeling of the internal pool of GPIIb-IIIa in platelets by c7E3 Fab fragments (abciximab): flow and endocytic mechanism contribute to the transport. *Blood* 1999; 93: 1622-1633
- 81 Peter K, Schwarz M, Ylänne J, Kohler B, Moser M, Nordt T, Salbach P, Kübler W, Bode C. Induction of fibrinogen binding and platelet aggregation as a potential intrinsic property of various glycoprotein IIb/IIIa (alphaIIbeta3) inhibitors. *Blood* 1998; 92: 3240-3249
- 82 Peter K, Straub A, Kohler B, Volkmann M, Schwarz M, Kübler W, Bode C. Platelet activation as a potential mechanism of GPIIb/IIIa inhibitor-induced thrombocytopenia. *Am J Cardio* 1999; 84: 519-524
- 83 Patrono C. Aspirin as an antiplatelet drug. *N Engl J Med* 1994; 330: 1287-1294

- 84 Phillips DR, Charo IF, Parise LV, Fitzgerald LA. The platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa complex. *Blood* 1988; 71: 831-843
- 85 Plow EF, D'Souza SE, Ginsberg MH. Ligand binding to GPIIb-IIIa: a status report. *Semin Thromb Hemost* 1992; 18: 324-332
- 86 Poullis M. A quick simple method of determining platelet aggregability following glycoprotein IIb/IIIa receptor inhibitor administration. *Cardiology* 1999; 91: 156-160
- 87 Quinn M, Deering A, Stewart M, Cox D, Foley B, Fitzgerald D. Quantifying GPIIb-IIIa receptor binding using 2 monoclonal antibodies: discriminating abciximab and small molecular weight antagonists. *Circulation* 1999; 17: 2231-2238
- 88 Ross R. Atherosclerosis-an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999; 340: 115-126
- 89 Ruf A, Patscheke H. Flow cytometric detection of activated platelets: comparison of determining shape change, fibrinogen binding, and P-selectin expression. *Semin Thromb Hemost* 1995; 21: 146-151
- 90 Ruggeri ZM. New insights into mechanisms of platelet adhesion and aggregation. *Sem Hematol* 1994; 31: 229-239
- 91 Schneider DJ, Douglas JT, Sobel BE. Paradoxical inhibition of fibrinogen binding and potentiation of α -granule release by specific types of inhibitors of glycoprotein IIb/IIIa. *Cardiov Res* 2000; 45: 437-446
- 92 Schömig A, Kastrati A, Mudra H, Blasini R, Schühlen 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* 1994; 90: 2716-2724
- 93 Schömig A, Neumann FJ, Kastrati A, Schühlen H, Blasini R, Hadamitzki M, Walter H, Zitzmann-Roth EM, Richardt G, Alt E, Schmitt C, Ulm K. A randomized comparison of antiplatelet and anticoagulant therapy after the placement of coronary stent. *N Engl J Med* 1996; 334: 1084-1089
- 94 Schrör K. Antiplatelets drugs. A comparative review. *Drugs* 1995; 50: 7-28
- 95 Schrör K. Thrombozyten. (Physis Spezial; 67). Verlag Urban und Vogel, München; 1993

- 96 Shattil SJ, Cunningham M, Hoxie JA. Detection of activated platelets in whole blood using activation-dependent monoclonal antibodies and flow cytometry. *Blood* 1987; 70: 307-315
- 97 Siess W. Molecular mechanisms of platelet activation. *Physiol Rev* 1989; 69: 50-178
- 98 Sixma JJ. Interactions of blood platelets with the vessel wall. In: Bloom A, Forbes CD, eds. *Haemostasis and Thrombosis*. 3rd ed. New York, NY: Churchill Livingstone; 1994: 259-285
- 99 Smith JW, Steinhubl SR, Lincoff AM, Coleman JC, Lee TT, Hillman RS, Collier BS. Rapid platelet-function assay: an automated and quantitative cartridge-based method. *Circulation* 1999; 99: 620-625
- 100 Storey RF, May FA, Wilcox RG, Heptinstall S. A whole blood assay of inhibition of platelet aggregation by glycoprotein IIb/IIIa antagonists: comparison with other aggregation methodologies. *Thromb Haemost* 1999; 82: 1307
- 101 Tarnok A, Mahnke A, Muller M, Zotz RJ. Rapid in vitro biocompatibility assay of endovascular stents by flow cytometry using platelet activation and platelet-leukocyte aggregation. *Cytometry* 1999; 38: 30-39
- 102 Tcheng JE, Ellis SG, Gerorge BS, Kereiakes DJ, Kleiman NS, Talley D, Wang AL, Wiesman HF, Califf RM, Topol EJ. Pharmacodynamics of chimeric glycoprotein IIb/IIIa integrin antiplatelet antibody Fab 7E3 in high risk coronary angioplasty. *Circulation* 1994; 90: 1757-1764
- 103 Tcheng JE. Clinical challenges of platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor inhibitor therapy: Bleeding, reversal, thrombocytopenia and retreatment. *Am Heart J* 2000; 140: 74-80
- 104 Tcheng JE. Differences among the parenteral platelet glycoprotein IIb/IIIa inhibitors and implications for treatment. *Am J Cardiol* 1999; 83: 7E-11E
- 105 The CAPTURE Investigators. Randomized placebo-controlled trial of abciximab before and during coronary intervention in refractory unstable angina: the CAPTURE study. *Lancet* 1997; 349: 1429-1435
- 106 The EPIC Investigators. Use of a monoclonal antibody directed against the platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor in high-risk coronary angioplasty. The EPIC investigation. *N Engl J Med* 1994; 330: 956-961

- 107 The EPILOG Investigators. Platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor blockade and low-dose heparine during percutaneous coronary revascularization. *N Engl J Med* 1997; 336: 1689-1696
- 108 The EPISTENT Investigators. Evaluation of platelet IIb/IIIa inhibitor for stenting. Randomised placebo-controlled and balloon-angioplasty-controlled trial to assess safety of coronary stenting with use of platelet glycoprotein IIb/IIIa blockade. *Lancet* 1998; 352: 87-92
- 109 The IMPACT-II Investigators. Randomised placebo-controlled trial of effect of eptifibatide on complications of percutaneous coronary intervention: IMPACT-II. *Lancet* 1997; 349: 1422-1428
- 110 The RAPPORT Investigators. Randomized, placebo-controlled trial of platelet glycoprotein IIb/IIIa blockade with primary angioplasty for acute myocardial infarction. *Circulation* 1998; 98: 734-741
- 111 The RESTORE Investigators. Effects of platelet glycoprotein IIb/IIIa blockade with tirofiban on adverse cardiac events in patients with unstable angina in acute myocardial infarction undergoing coronary angioplasty. *Circulation* 1997; 96: 1445-1453
- 112 Thompson NT, Scrutton MC, Wallis RB. Particle volume changes associated with light transmittance changes in the platelet aggregometer: dependence upon aggregating agent and effectiveness of stimulus. *Thromb Res* 1986; 41: 615
- 113 Topol EJ, Mark DB, Lincoff AM, Cohen E, Burton J, Kleiman N, Talley D, Sapp S, Booth J, Cabot CF, Anderson KM, Califf RM. Outcomes at 1 year and economic implications of platelet glycoprotein IIb/IIIa blockade in patients undergoing coronary stenting: results from a multicentre randomised trial. EPISTENT Investigators. Evaluation of Platelet IIb/IIIa Inhibitor for Stenting. *Lancet* 1999; 354: 2019-2024
- 114 Van den Brand M, Laarman GJ, Steg PG, De Scheerder I, Heyndrickx G, Beatt K, Kootstra J, Simoons ML. Assessment of coronary angiograms prior to and after treatment with abciximab, and the outcome of angioplasty in refractory unstable angina patients. Angiographic results from the CAPTURE trial. *Eur Heart J* 1999; 20: 1572-1578
- 115 VanZanten GH, De Groot PG, Sixma JJ: In: *Handbook of Experimental Pharmacology* ; volume 126; chapter 3: Platelet Adhesion: 61-81

- 116 Warkentin TE, Powling MJ, Hardisty MR. Measurement of fibrinogen binding to platelets in whole blood by flow cytometry: a micromethod for the detection of platelet activation. *Br J Haematol* 1990; 76: 387-394

9 Curriculum vitae

Name: Hellweg
Vorname: Frauke Hedwig
Geburtsdatum: 22.04.1971
Geburtsort: Düsseldorf
Familienstand: ledig

Schule: 1978-1982 Grundschule Schwangau
1982-1991 Gymnasium Füssen
1991 Abitur

Studium:
09/1991-07/1993 Sprachen- und Dolmetscher Institut München
1993-2000 Studium der Humanmedizin
WS 1993/94 Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
08/1995 Physikum, LMU München
08/1996 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, LMU München
03/1999 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, LMU München
1999-2000 Praktisches Jahr
05/2000 Ärztliche Prüfung

Facharztausbildung:
08/2000-01/2002 Ärztin im Praktikum, Krankenhaus der Barmherzigen Brüder München, Innere Abteilung, Akademisches Lehrkrankenhaus der Technischen Universität München, Chefarzt Prof. Dr. med. J.G. Wechsler
seit 04/2002 Assistenzärztin; Kinikum Landsberg am Lech, Innere Abteilung, Chefarzt Dr. med. R. Füllner
03-04/2004 Med. Einsatz im Projekt Manila und Mindoro (Philippinen) für „Ärzte für die Dritte Welt“

10 Danksagung

Bei Herrn Prof. Dr. med. Meinrad Paul Gawaz möchte ich mich für die Bereitstellung des interessanten Themas, die kompetente Führung sowie motivierende Betreuung bedanken.

Ebenso bedanke ich mich bei Frau Dr. med. Gisela Pogatsa-Murray und Frau Kirsten Langenbrink für die stets hilfsbereite Unterstützung meiner Laborarbeit.