

Medizinische Klinik und Poliklinik der Technischen Universität

München, Klinikum rechts der Isar

(Direktor: Univ.-Prof. Dr. A. Schömig)

Wirkung von Bivalirudin auf die Thrombozyten- und Leukozytenaktivierung bei Patienten mit elektiver Koronarintervention

Alina Gietl

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. E. J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. I. V. Ott
2. Univ. – Prof. Dr. K.- L. Laugwitz

Die Dissertation wurde am 05.03.2012 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 16.10.2013 angenommen.

Meinen lieben Eltern und Schwester,

meinem lieben Mann Toni,

meinen lieben Kindern, Laura, Christian und Marie.

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	4
1. EINLEITUNG	7
1.1 Definition und Bedeutung der KHK	7
1.2 Pathophysiologische Zusammenhänge	8
1.3 Behandlungsmöglichkeiten der koronaren Herzerkrankung	10
1.3.1 Kontrolle der Risikofaktoren	10
1.3.2 Pharmakotherapie	11
1.3.3 Perkutane Interventionen	19
1.3.4 Chirurgische Revaskularisation	25
2. FRAGESTELLUNG	26
3. MATERIAL UND METHODEN	27
3.1 Auswahl der Studienpopulation	27
3.1.1 Einschlusskriterien	27
3.1.2 Ausschlusskriterien	27
3.1.3 Abbruchkriterien	28
3.2 Voruntersuchungen	29
3.3 Studienprotokoll	29
3.4 Laboruntersuchungen	30
3.4.1 Aggregometrie	30
3.4.2 Durchflusszytometrie	33
3.4.3 Durchführung der FACS-Färbungen	38
3.4.4 Cytometric Bead Array (CBA)	40
3.4.5 Messung löslicher Zytokine	43
3.4.6 Bestimmung des CRP	44
3.5 Statistik und Datenverarbeitung	44
4 ERGEBNISSE	46
4.1 Charakteristika der Studienpopulation	46
4.2 Angiographische Daten	46
4.3 Ergebnisse zur ADP- und TRAP-induzierten Thrombozytenaggregation	48
4.4 Ergebnisse zu Oberflächenmarkern der Thrombozytenaktivierung	49
4.5 MAC-1 (CD11b) positive Monozyten und polymorphnukleäre (PMN-) Zellen	50
4.6 Ergebnisse der Zytokinbestimmung	52

5.	DISKUSSION	53
5.1	Überlegungen zum Studiendesign	53
5.2	Thrombozytenaktivierung	54
5.2.1	Beeinflussung der Thrombozytenaktivierung durch Heparin	54
5.2.2	Beeinflussung der Thrombozytenaktivierung durch Bivalirudin	56
5.2.3	Vergleich mit bisherigen Untersuchungen	57
5.2.4	Zusammenfassung	59
5.3	CRP, Interleukine und Leukozytenaktivierung	60
5.3.1	Pathophysiologische Zusammenhänge	60
5.3.2	MAC-1 Expression	62
5.3.3	CRP und Interleukine	65
5.4	Diskussion einer möglichen klinischen Relevanz unserer Ergebnisse	66
5.4.1	Klinische Relevanz des Nachweises einer systemischen Entzündung nach PCI	66
5.4.2	Klinische Relevanz der Einflüsse von Bivalirudin und Heparin auf die Thrombozytenaktivierung	67
5.4.3	Klinische Relevanz der reduzierten P-Selektin- und MAC-1 Expression in der Bivalirudingruppe	68
5.5	Diskussion der Ergebnisse klinischer Studien zu Bivalirudin	70
5.6	Schlussfolgerung	73
6.	ZUSAMMENFASSUNG	74
7.	LITERATURVERZEICHNIS	76
8.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	98
9.	TABELLENVERZEICHNIS	99
10.	DANKSAGUNG	100

Abkürzungsverzeichnis

A

ACE-Hemmer	Angiotensin Converting Enzyme-Hemmer
ACT	Activated Clotting Time
ADP	Adenosindiphosphat
AK	Antikörper
APC	Allophycocyanin
aPTT	Activated Partial Thromboplastin Time, aktivierte partielle Thromboplastinzeit
ATL	Aspirin triggert Lipoxins

B

BAT	Bivalirudin Angioplasty Trial
BMS	Bare Metal Stent, unbeschichteter Metallstent

C

Ca ²⁺	Kalziumionen
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CBA	Cytometric Bead Array
CCS	Canadian Cardiovascular Society
CD	Cluster of Differentiation
cGMP	Zyklisches Guaninmonophosphat
CK	Kreatinkinase
CRP	C-reaktives Protein

D

d	Tag
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTI	Direkter Thrombininhibitor

E

EKG	Elektrokardiogramm
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EPC	Endotheliale Vorläuferzelle
EZM	Extrazelluläre Matrix

F

FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FSC	Forward Scatter, Vorwärtsstreulicht

G

g/dl	Gramm pro Deziliter
GP	Glykoprotein

H

h	Stunde
---	--------

Abkürzungsverzeichnis

I

ICAM	Interzelluläres Adhäsionsmolekül
IL	Interleukin
INR	International Normalized Ratio

J

JAM	Junktionales Adhäsionsmolekül
-----	-------------------------------

K

KHK	Koronare Herzerkrankung
-----	-------------------------

L

LDL	Low Density Lipoprotein
LMWH	Low Molecular Weight Heparin, niedermolekulares Heparin

M

MAC-1	Monocyte Integrin Receptor
MCP	Membrane Cofactor Protein
mg	Milligramm
mM	Millimolar
mmol/l	Millimol pro Liter
MP	Mikropartikel
MPO	Myeloperoxidase
μ M	Mikromolar
μ mol/l	Mikromol pro Liter

P

P2Y ₁₂ /P2Y ₁	Purin-Rezeptoren
PAC-1	Aktivierte GP IIIa-Untereinheit des Fibrinogenrezeptors
PAR	Protease Activated Receptor
PBS	Phosphat Buffered Saline
PC5	Konjugation von R-Phycoerythrin mit Cyanin 5
PCI	Percutaneous Coronary Intervention
PE	R-Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
pg	Pikogramm
PNA	Plättchen-Neutrophilen-Aggregate
PSC	Platelet Surface Coverage
PPP	Platelet Poor Plasma
PRP	Platelet Rich Plasma
PTCA	Perkutane transluminale Koronarangioplastie

S

s	Sekunde
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
SSC	Side Scatter, Seitwärtsstreulicht
STEMI	Herzinfarkt mit ST-Hebung

T

TF	Tissue Factor, Gewebsthromboplastin
TIA	Transitorisch ischämische Attacke

Abkürzungsverzeichnis

TMA Thrombozyten-Monozyten-Aggregate
TNF Tumor Nekrose Faktor
TRAP Thrombin Receptor Activating Peptide

U

U/kg Unit pro Kilogramm
U/min. Umdrehungen pro Minute
UFH Unfraktioniertes Heparin

V

vs versus
vWF von Willebrand Faktor

1. Einleitung

Im Bereich der Therapie der koronaren Herzerkrankung wurde in den letzten Jahren bedeutende Fortschritte erzielt. Neben der chirurgischen Revaskularisation mit Hilfe einer Bypass-OP ist hier vor allem die perkutane Koronarintervention (PCI) zu nennen. Der Erfolg dieser Intervention wird immer noch durch Komplikationen in Form von Blutungen, akuten Verschlüssen der Koronararterien und längerfristigen Restenosierungen limitiert. Bei der Restenosierung kommt Entzündungsvorgängen eine wichtige Bedeutung zu. Um diese Komplikationen zu minimieren ist ein optimales medikamentöses Therapieregime erforderlich, das alle diese Komplikationen berücksichtigt. In der vorliegenden Untersuchung wurde die Thrombozytenaktivierung unter Antikoagulation mit Bivalirudin oder Heparin, bei einer Koronarintervention untersucht.

Zum Verständnis dieser Untersuchung soll einleitend eine Übersicht über Pathophysiologie und mögliche Therapieoptionen der koronaren Herzerkrankung (KHK) gegeben werden.

Ein Hauptaugenmerk wird auf die Thrombozytenfunktion, deren therapeutische Beeinflussung sowie auf Erörterungen zur perkutanen transluminalen Koronarangioplastie (PTCA) gelegt, da diese Punkte für das Verständnis der vorliegenden Arbeit die größte Bedeutung aufweisen. Zudem wird die Interaktion zwischen Thrombozyten und Leukozyten in Bezug auf Entzündungsvorgänge näher beleuchtet.

1.1 Definition und Bedeutung der KHK

Atherosklerose ist eine fortschreitende Erkrankung, die durch die Ansammlung von Fetten und Vermehrung von Bindegewebe zu einer zunehmenden Stenosierung von Gefäßen führt (Lusis, 2000)

Bei der KHK handelt es sich um eine Manifestation der Atherosklerose an den das Herz versorgenden Arterien. Klinische Folgeerscheinung ist zum Beispiel der Myokardinfarkt, mit der Gefahr des plötzlichen Herztodes. Sie kann aber auch in eine terminale Herzinsuffizienz münden. Trotz einer, wahrscheinlich durch verbesserte therapeutische Versorgung bedingten Abnahme am Anteil der Gesamtmortalität seit 1980, stellt sie in der Todesursachenstatistik des Bundesgesundheitsamtes

(Schuthase et. al. 2004) mit 79 363 verstorbenen Frauen und 73 296 verstorbenen Männern weiterhin die häufigste Todesursache in der Bundesrepublik Deutschland dar.

1.2 Pathophysiologische Zusammenhänge

Bluthochdruck, Dyslipidämie, Adipositas, Rauchen oder körperliche Inaktivität sind bekannte und wichtige Risikofaktoren für die Entwicklung der koronaren Herzerkrankung (Chobanian et al., 2003)

Auf der Makroebene führen diese, über eine Begünstigung der Atherosklerose der Herzkranzgefäße und eine linksventrikuläre Hypertrophie, zur Myokardischämie und häufig, begleitet von einer koronaren Thrombose, zum Myokardinfarkt.

Dieser kann, über ein akutes Herzversagen durch ausgedehnten Verlust an Myokard oder über ein Pumpversagen durch eine Herzrhythmusstörung, zum Herztod führen.

Wird das akute Ereignis überlebt, kann es infolge von Umbauvorgängen am Herzmuskel zur chronischen und möglicherweise zur terminalen Herzinsuffizienz kommen. (Dzau et al., 2006).

Auf der Mikroebene steht, nach der "Response to Injury" Hypothese (Ross et al., 1976), eine Läsion des Gefässendothels im Zentrum der pathophysiologischen Vorgänge mit Bildung einer atherosklerotischen Läsion. Im Zusammenspiel verschiedenster Zellen (z.B: Thrombozyten und Makrophagen) kommt es zu Entzündungsreaktionen, vaskulären Umbauprozessen und erneuten Verletzungen, die dann zur Bildung ausgeprägter atherosklerotischer Plaques führen können (Lusis, 2000).

Mittlerweile wird vermutet, dass bereits eine endotheliale Dysfunktion ohne manifeste Läsion, bei der die extrazelluläre Matrix mit dem Blutstrom in Kontakt kommt, über die Bindung von Blutplättchen an die Gefässwand die atherosklerotische Plaquebildung einleiten kann (Gawaz et al., 2007).

Ein erster wichtiger Schritt zur Plaquebildung ist die Einwanderung von Monozyten in die Gefässwand, diese nehmen dann oxidiertes LDL auf und werden so zu den sogenannten Schaumzellen (Dzau, 2001). An diesem Schritt sind Thrombozyten auf unterschiedliche Weise beteiligt. Die Adhäsion von Thrombozyten an das Endothel setzt eine Reihe von Gewebefaktoren frei, die sowohl die Einwanderung von Monozyten in die Gefässwand, als auch deren Differenzierung zu Makrophagen, die später zu Schaumzellen werden, fördern. (Lindemann, 2007). Andererseits wurde

auch gezeigt, dass aktivierte Thrombozyten oxidiertes LDL aufnehmen, und in der Folge rasch von den Schaumzellen phagozytiert werden (Daub et al., 2006).

Begleitend zu diesen Prozessen kommt es in den Gefässen zu Umbauvorgängen, die zu Wandverdickungen, Minderung des Gefässlumens und schliesslich eine Minderperfusion des Endorgans (Herzmuskel) bedingen können (Gibbons et Dzau 1994).

Ein intermittierender oder vorübergehender Gefässverschluss im Bereich der Plaqueruptur kann sich klinisch als akutes Koronarsyndrom manifestieren.

Abhängig vom Schweregrad der Okklusion und vom Vorhandensein möglicher Kollateralgefässe kann sich ein Myokardinfarkt entwickeln. Zudem kann es durch Embolisation thrombotischen Materials zu weiteren kleineren Myokardinfarkten kommen.

Thrombozyten bilden einen zentralen Angelpunkt dieser Vorgänge beim akuten Koronarsyndrom. Über Freisetzung von Serotonin und Thromboxan A₂ können sie einen Vasospasmus mit der Folge einer zunehmenden Ischämie induzieren. Ebenso haben sie eine Hauptrolle im engen Zusammenspiel verschiedenster thrombozytärer und koagulatorischer Prozesse an der Thrombusbildung im Bereich der rupturierten Plaques (Gawaz, Das Blutplättchen, S.94 ff).

Nicht erst in Folge eines Infarktes kommt es auch zu Umbauvorgängen am Herzen. An diesen ist ein komplexes Zusammenspiel aus verschiedenen Hormonen wie zB. Angiotensin II, Vasopressin, Peptide growth factor, natriuretische Faktoren, aber auch verschiedene Zytokine und Stickstoffmonoxid beteiligt (Hwang et al., 2001).

Die Umbauvorgänge am Herzen bewirken gemeinsam mit der zunehmenden Minderperfusion des Myokards, falls es nicht vorher zum akuten Herztod kommt, eine zunehmende und letztendlich terminale Herzinsuffizienz (Wagoner et al., 1996).

Dzau et al. (2006) stellen in ihrem Übersichtsartikel dar, wie auch die kardiovaskulären Risikofaktoren in einander greifen und somit zur Initiation, aber auch zur Accelleration des Krankheitsgeschehen führen können.

Eine artrielle Hypertonie begünstigt sowohl eine endotheliale Dysfunktion als auch kardiale Umbauvorgänge im Sinne einer linksventrikulären Hypertrophie. Ebenso führt das Rauchen, durch einen vermehrten Anfall reaktiver Sauerstoffspezies (zB. Wasserstoffperoxid), zur Inaktivierung des, für wichtige gefässregulatorische Mechanismen essentiellen, Stickstoffmonoxid. Hier wirkt sich auch ein vermehrter Anfall oxidierter LDL im Rahmen einer atherogenen Dyslipidämie aus (Steinberg et

Witztum, 2002), wobei auch der beschriebenen Beteiligung der oxidierten LDL an der Bildung atherosklerotischer Plaques, eine wichtige Bedeutung zukommt.

Körperliche Inaktivität kann das Risiko für die Ausbildung eines metabolischen Syndroms und eines Diabetes mellitus Typ II erhöhen. Es wird vermutet, dass die Hyperinsulinämie, infolge der peripheren Insulinresistenz, ebenfalls eine endotheliale Dysfunktion und möglicherweise auch eine Hyperplasie der Intima der Gefäße mitbedingen kann. Auch scheint das überschüssige Fettgewebe bei Adipösen vermehrt Faktoren zu synthetisieren, die eine Thromboseneigung und eine Entzündungsreaktion begünstigen (Grundy, 2002 /Libby et al. 2002).

1.3 Behandlungsmöglichkeiten der koronaren Herzerkrankung

Ein wesentlicher Bestandteil der Behandlung der KHK ist die Kontrolle der kardiovaskulären Risikofaktoren durch Änderung des Lebensstils oder durch pharmakologische Beeinflussung. Diese wird ergänzt durch die direkte medikamentöse, aber auch interventionelle Therapie der koronaren Atherosklerose.

1.3.1 Kontrolle der Risikofaktoren

Viele Studien zeigen, dass eine Änderung des Lebensstils die Progression der koronaren Herzerkrankung verzögern kann. Einen günstigen Einfluss zeigt hier möglicherweise eine mediterrane Diät, die sich durch einen hohen Anteil an ungesättigten Fettsäuren und Faserreichtum (Ballaststoffe) auszeichnet (De Lorgeril et al., 1999/ Knoops et al., 2004).

Sportliche Aktivität kann die Entwicklung eines metabolischen Syndroms verhindern, reduziert das Risiko an Diabetes mellitus Typ II zu erkranken und verbessert im Rahmen eines Solchen die Insulinresistenz (Gaede et al., 2003).

Der Verzicht auf Rauchen scheint das relative Risiko einen Myokardinfarkt zu erleiden um 32% zu senken (Critchley et Capewell, 2004).

Für viele blutdrucksenkende Medikamente (ACE- Hemmer, β -Blocker, Diuretika, Angiotensinrezeptorantagonisten, Kalziumkanalblocker) wurde neben einer effektiven Blutdrucksenkung auch eine Verringerung gravierender Folgen der KHK nachgewiesen (Blood Pressure Lowering Treatment Trialists`, 2003). Das relative Risiko für einen Myokardinfarkt verringert sich durch eine effektive Blutdrucksenkung um ca. 25 % (Chobanian et al., 2003).

Cholesterinsenkende Substanzen (z.B.: Statine oder Fibrate) zeigten bei einer effektiven Senkung des LDL (Low-density-Lipoprotein) Cholesterin um 1 mmol/l über 5 Jahre eine 33% Risikoreduktion für die Manifestation einer KHK (Law et al., 2003). Interessanterweise zeigte eine Metaanalyse, die über 90000 mit einem Statin behandelte Patienten einschloss (Cholesterol Treatment Trialists Collaborators, 2005), dass es neben einer Risikoverminderung für Myokardinfarkte durch die Cholesterinsenkung auch zu einem Absinken des Blutdruckes kam, was die wechselseitige Beeinflussung der Risikofaktoren noch einmal verdeutlicht. Daher muss auch beim Typ II Diabetiker, neben einer Kontrolle des Blutzuckerspiegels z.B.: durch Metformin, die eine Senkung der kardiovaskulären Mortalität mit sich brachte (UK Prospektive Diabetes Study Group, 1998), ein besonderer Wert auf eine effektive Cholesterin- und Blutdrucksenkung gelegt werden.

1.3.2 Pharmakotherapie

Im Folgenden werden pharmakotherapeutische Behandlungsmöglichkeiten der koronaren Herzerkrankung über Beeinflussung der primären und sekundären Hämostase erläutert.

1.3.2.1 Physiologie und Pathophysiologie der Thrombozyten

Thrombozyten sind anukleäre, korpuskuläre Blutbestandteile und werden im Knochenmark aus Megakaryozyten gebildet (Mackie 1988). Unter physiologischen Bedingungen zirkulieren, ohne dass es zu einer Aggregation oder Adhäsion kommt, ca. 1.5×10^{12} Thrombozyten in unserem Organismus (Cines et al., 1998). Die mittlere Lebenszeit der Thrombozyten beträgt ca. 7-9 Tage (Harker et al., 2000).

Bei einer Gefäßläsion kommen Proteine der extrazellulären Matrix (EZM) mit dem Blutstrom in Kontakt, was als erster Schritt der Bildung eines Thrombus betrachtet wird (Gawaz et al., 2005). Die Thrombozyten binden über den Glykoproteinkomplex Ib-IX-V (von Willebrand Rezeptorkomplex) an den, in der EZM gebundenen, von Willebrand Faktor (Ruggeri, 2002) oder über den GPVI an Kollagen (Nieswand et Watson, 2003). Daraus resultiert eine Plättchenaktivierung und Aktivierung des Integrinrezeptors $\alpha\text{IIb}\beta_3$ (GPIIb/IIIa, Fibrinogenrezeptor) (Arya et al., 2003) und des $\alpha_2\beta_1$ (Kollagenrezeptor), über den die Plättchen stark an die jeweilige Komponente der EZM gebunden werden. Die an Kollagen gebundenen Plättchen setzen Arachidonsäure frei, die durch das Enzym Cyclooxygenase 1/Thromboxan-Synthase

in Thromboxan A₂ umgewandelt wird (Kawai, 1994), welches vasokonstriktive Eigenschaften besitzt und den Prozess der Thrombozytenaktivierung weiterhin verstärkt. Auch werden granuläre Komponenten, wie Adenosindiphosphat, freigesetzt. Über die Bindung von ADP an die G-Protein gekoppelten Purinrezeptoren P₂Y₁₂ und P₂Y₁ werden weitere Plättchen aktiviert, die daraufhin schon mit den, an der Gefäßwand anhaftenden, Thrombozyten interagieren (Gurbel et al., 2004). Dies geschieht in Gegenwart von Kalziumionen (Ca²⁺) und Fibrinogen über den aktivierten αIIbβ₃-(GPIIb/IIIa) -Fibrinogenrezeptorkomplex. Vor allen Dingen trägt die Bindung von Adenosin an P₂Y₁₂ zur Aktivierung von αIIbβ₃- Glykoprotein bei. (Dorsam et Kunapuli, 2004).

Die Vorgänge aus Adhäsion, Aktivierung und Aggregation der Thrombozyten werden auch als primäre Hämostase bezeichnet (Bigalke et al., 2007). Durch Freisetzung weiterer Signalstoffe z.B. Phosphatidylserin wird dann, im Rahmen der sekundären Hämostase, die Koagulationskaskade eingeleitet, an deren Ende die Bildung des Prothrombinase-Komplexes steht, welcher wiederum Fibrinogen zu Fibrin umwandelt, welches den Thrombus weiter vernetzt und stabilisiert (Gawaz, 2004). Das Zusammenspiel der primären Hämostase mit der sekundären Hämostase wird unter Punkt 2.3.4 näher erläutert.

Neben dieser klassischen Rolle bei der Thrombusbildung sind Thrombozyten aber auch an der Regulation der Endothelfunktion und bei Entzündungsvorgängen von Bedeutung (Tan et al., 2004).

Es wurde gezeigt, dass eine Plättchenadhäsion auch an intaktem, aber entzündlich aktiviertem Gefässendothel stattfindet (Gawaz et al., 1996). Der initiale, noch lose Kontakt, das sogenannte "Platelet Rolling", wird über Selektine (P-Selektin, E-Selektin) auf den Endothelzellen und den Thrombozyten vermittelt (Frenette et al., 2000). An der späteren festen Adhäsion sind das Glykoprotein IIb/IIIa, Fibrinogen, Fibronectin, vWF und GP Ib beteiligt (May et al., 2008). Durch die nun mögliche Interaktion mit dem Endothel werden die Thrombozyten ähnlich wie bei der Gefäßläsion aktiviert.

Thrombozyten besitzen, trotz des Fehlens eines Zellkerns, durch Mechanismen der Translation, die Fähigkeit zur Proteinbiosynthese (Lindemann et al, 2001). In ihrem Aufbau besitzen sie diverse Zellkomponente, wie zum Beispiel α-Granula, Lysosomen und dichte Granula. Diese ermöglichen ihnen, wenn sie aktiviert werden, innerhalb kurzer Zeit die Ausschüttung einer Vielzahl von Faktoren, wie die Adhäsion

vermittelnde Proteine (z.B.: vWF, Fibrinogen, P-Selektin, GP IIb/IIIa), Wachstumsfaktoren (z.B.: Platelet Derived Growth Faktor, Transforming Growth Faktor- β), Chemokine (z.B.: RANTES), Cytokine (z.B.: CD40L, IL 1- β) und Gerinnungsfaktoren (z.B.: Faktor V, IX, Plasminogen, Protein S) auszuschütten (Weber, 2005). Somit sind sie befähigt eine Reihe von Entzündungsvorgängen, wie Vorgänge der Zellmigration (Adhäsion, Aggregation, Chemotaxis), Proliferation, Zellüberleben und Zelltod zu steuern.

Thrombozyten begünstigen so die Adhäsion von Leukozyten an die Gefäßwand, was, wie bereits ausgeführt, als wichtiger pathogenetischer Faktor der Atherosklerose angesehen wird (Gawaz et al., 2005). Auch Monozyten und polymorphkernige Zellen docken über einen MAC1 (MAC-1/CD18, α M β 2) abhängigen Mechanismus an Thrombozyten an (Pitsiolos et al., 2003). Auf thrombozytärer Seite sind hier möglicherweise GP Iba, CD40L, GP IIb/IIIa gebundenes Fibrinogen oder auch das Junktionale Adhäsionsmolekül C beteiligt (May et al., 2008)

In der Folge werden im wechselseitigen Zusammenspiel, weitere Entzündungsvorgänge gesteuert.

Neben dieser Begünstigung von Entzündungsprozessen wird neuerdings auch ein Effekt der Thrombozyten auf das Einwandern und die Differenzierung von endothelialen Vorläuferzellen (EPC) und somit eine regenerative Funktion der Thrombozyten auf das Gefäßendothel diskutiert (Langer et Gawaz, 2008).

Als entscheidend für die Wirkungsweise der Thrombozytenaggregationshemmer wurde bislang jedoch die Attenuierung der akuten Thrombosierung im Rahmen der Ruptur einer atherosklerotischen Plaque angesehen.

1.3.2.2 Wirkungsprinzipien und Einsatz der Thrombozytenaggregationshemmer

Der am längsten eingesetzte und weiterhin am häufigsten verwendete Thrombozytenaggregationshemmer ist Aspirin® (Acetylsalicylsäure). Aspirin hemmt selektiv und irreversibel die Arachidonat-Cyclooxygenase und in der Folge die Biosynthese von Thromboxan A₂, einem potenten Auslöser für die Thrombozytendegranulation und Aggregation (Patrano, 1994). Neben diesem Mechanismus, der die Plättchenaggregation beeinflusst, hat Aspirin aber noch einige andere Effekte, die sich günstig im Rahmen der Pathogenese der KHK auswirken können (Yasuda et al., 2008). Aspirin scheint die Adhäsion von Makrophagen an das Endothel und glatte Muskelzellen des Gefäßes zu verhindern (Pierce et al., 1996).

Aspirin ist an der Bildung so genannter "Aspirin triggered lipoxins" (ATL) (Serhan et Chiang, 2002) beteiligt, die unter anderem lokale Entzündungsreaktionen mildern. Außerdem führt Aspirin, über noch nicht vollständig geklärte Mechanismen, zu einer Freisetzung von Stickstoffmonoxid (Taubert et al., 2004), welches die Aufrechterhaltung einer intakten Endothelfunktion begünstigt. Aufgrund dieser vielfältigen Effekte könnte Acetylsalicylsäure sowohl das Risiko intrakoronarer Thrombosen vermindern, als auch die Langzeitprognose der KHK über Modulation von Entzündungsprozessen und Endothelfunktion günstig beeinflussen.

Tatsächlich wurde gezeigt, dass Aspirin die Häufigkeit kardiovaskulärer Ereignisse bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung senkt (Antithrombotic Trialists' Collaboration, 2002). Auch bei Patienten mit instabiler Angina pectoris konnte es das Risiko für einen plötzlichen Herztod und einen Myokardinfarkt signifikant senken (Lewis, 1983), wie auch die Mortalität im Rahmen eines akuten Myokardinfarktes (ISIS-2 Collaboration Group, 1988).

Die aktiven Metabolite der Thienopyridine (Ticlopidin, Clopidogrel, Prasugrel) binden irreversibel an den P2Y₁₂ Rezeptor, was eine effektive Blockade der ADP induzierten Plättchenaktivierung und Aggregation zur Folge hat (Ding et al., 2003). Dabei wird auch die Expression von P-Selektin und CD 40 Ligand gemindert, was möglicherweise einen zusätzlichen antiinflammatorischen Effekt ausmacht (Hermann et al., 2001). Zudem wurde ein direkter hemmender Effekt auf die Thrombinbildung beschrieben (Di Nisio et al., 2005/ van der Meijden et al., 2005).

Auch ein neuer, kompetitiver und gleichzeitig reversibler ADP-P2Y₁₂ Antagonist (Cangrelor) zeigte eine gute Hemmung der Plättchenaggregation bei Patienten mit PCI (Greenbaum et al., 2006). Während Ticlopidin, aufgrund seines ungünstigen Nebenwirkungsprofils, dem relativ häufigen Auftreten von Neutro- und Thrombozytopenien (Noble et Goa, 1996), seltener eingesetzt wird, zeigte sich Clopidogrel als echte Alternative zu Aspirin und war, in einer Studie zur Prävention vaskulärer Ereignisse, sogar leicht überlegen (CAPRIE Steering Committee, 1996).

Bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom zeigte sich die Kombination aus Aspirin und Clopidogrel im Vergleich zu einer Monotherapie mit Aspirin leicht überlegen (Reduktion des Risikos des Herztodes, eines Schlaganfalles oder eines Myokardinfarktes von 11.4% auf 8.1%).

Dipyridamol hemmt die Adenosinaufnahme in Erythrozyten und Endothelzellen. Dadurch steigt der Adenosinspiegel im Plasma an, so dass mehr Adenosin an den

Adenosinrezeptor des Thrombozyten gebunden werden kann. So wird die Freisetzung des Enzyms Adenylat-Cyclase stimuliert, welche zyklisches Adenosintriphosphat in zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) umwandelt. Auch wird der Abbau von zyklischem Guaninmonophosphat (cGMP) über eine Phosphodiesterase gehemmt. Ein erhöhter Spiegel von cAMP und cGMP hat im Thrombozyten einen aggregationshemmenden Einfluss (Behan et Storey, 2004). Eine Kombinationstherapie mit Aspirin, zur Reduktion schwerer vaskulärer Ereignisse, erbrachte jedoch keine signifikant besseren Ergebnisse gegenüber einer Monotherapie mit Aspirin (Antithrombotic Trialists Collaboration, 2002).

Es wurden drei Klassen von $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ -Antagonisten entwickelt. Abciximab ist ein Antikörper gegen das Glykoprotein, Eptifibatide, als zyklisches Heptapeptid, ein kompetitiver Inhibitor und Tirofiban ein Tyrosinanalogon, welches die Bindung von Fibrinogen an das Integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ beeinträchtigt (Coller, 2001). Diese Substanzen unterbrechen die Bindung von aktiviertem Integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ an den vWF und an Fibrinogen und blockieren so die gemeinsame Endstrecke der Thrombozytenaggregation. Während die orale Verabreichung dieser Substanzen aufgrund eines erhöhten Blutungsrisikos aktuell nicht empfohlen wird (Cannon et al., 2000), zeigte sich ein guter Nutzen begleitend zu revaskularisierenden Maßnahmen wie perkutaner transluminaler Coronarangioplastie (PTCA) (EPILOG Investigators, 1997) oder Stenting (Topol et al., 1999).

Zusammenfassend haben sich, neben ihrer Wirksamkeit beim akuten Koronarsyndrom in der Langzeit-Sekundärprophylaxe, vor allem Acetylsalicylsäure und Clopidogrel als Alternative bewährt. Eine Kombination aus Aspirin und Clopidogrel zeigte sich beim akuten Koronarsyndrom leicht überlegen.

$\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ -Antagonisten haben ihren Einsatzpunkt vor allem in der Akutbehandlung des Koronarsyndroms und im Rahmen revaskularisierender Massnahmen. Einige neueren Studien zeigen jedoch keinen zusätzlichen Benefit von $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ -Antagonisten nach einem Loading mit Clopidogrel (Stone et al., 2008/ Metaanalyse: De Luca et al., 2009)

1.3.2.3 Sekundäre Hämostase

Die Trennung der Beeinflussung der sekundären von der Beeinflussung der primären Hämostase ist künstlich, da diese Prozesse im Organismus eng miteinander verflochten sind. So ist zum Beispiel Thrombin, ein Schlüsselenzym der Koagulation,

ein potenter Aktivator der Thrombozyten. Aktivierte Plättchen fördern wiederum den Koagulationsprozess (Hirsh et al., 2001).

Im Rahmen der KHK werden Antikoagulantien vor allem in der Therapie des akuten Koronarsyndroms und im Rahmen interventioneller Therapien (siehe auch Punkt 2.3.5) eingesetzt. Im Folgenden soll kurz eine Übersicht über die Abläufe bei der Koagulation, sowie auf die Möglichkeit der therapeutischen Beeinflussung dieser Vorgänge durch Heparin und Bivalirudin, eingegangen werden.

Koumarinderivate und andere neuere Antikoagulantien (Weitz et Bates, 2005) sowie die sekundäre Hämostase im Rahmen venöser Thromben werden aufgrund ihrer, eher untergeordneten Bedeutung für die vorliegende Arbeit, ausgeklammert.

1.3.2.3.1 Physiologie der sekundären Hämostase im arteriellen System

Die sekundäre Hämostase beginnt mit der Aktivierung der Gerinnungskaskade. Traditionell wird zwischen dem intrinsischen und dem extrinsischen System unterscheiden (MacFarlane et al., 1964)

Die Komponenten des intrinsischen Systems befinden sich alle im Blutplasma und beinhalten die Gerinnungsfaktoren XII, XI, IX, VIII, Kininogen und Präkallikrein. Das intrinsische System wird durch die Bindung der Kontaktfaktoren (Faktor XII, XI, Kininogen und Präkallikrein) an negative Ladungen der subendothelialen Matrix und der aktivierten Thrombozytenoberfläche aktiviert, was wiederum zu einer Aktivierung von Faktor X führt.

Faktor X ist der Beginn der gemeinsamen Endstrecke des intrinsischen und des extrinsischen Systems und wird extrinsisch über den Faktor VII und Gewebsthromboplastin ("Tissue Factor") aktiviert.

Der "Tissue Factor" ist ein integrales Membranprotein, das vorwiegend auf Gefäßwandzellen, jedoch auch auf zirkulierenden Monozyten, vorkommt. Die gemeinsame Endstrecke der Gerinnungsfaktoren besteht aus Aktivierung von Faktor X, Bildung von Thrombin aus Prothrombin und Fibrinogenspaltung zu Fibrin.

Der Ablauf der Gerinnungskaskade wird durch Inhibitoren (Antithrombin, Protein C und S, "Tissue Factor Pathway Inhibitor") reguliert.

Die prokoagulatorische Aktivität der Thrombozyten wird über negativ geladene Phospholipide vermittelt, die im Rahmen der Thrombozytenaktivierung auf der Thrombozytenoberfläche exponiert werden.

In den Thrombozyten sind ca. 25 % des im Blut enthaltenen Faktor V erhalten, der in der Umgebung aktivierter Thrombozyten somit vermehrt freigesetzt wird. Faktor V bildet zusammen mit dem Plättchenfaktor, aktivem Faktor X und Prothrombin den Prothrombinasekomplex. Zusätzlich kann über den Plättchenfaktor der Tenase - Komplex gebildet werden (IXa, VIIIa, Ca²⁺, Plättchenfaktor 3).

Letztendlich wird durch diese Vorgänge die Bildung von Thrombin generiert, welches einerseits, wiederum selbst ein starker Plättchenaktivator ist, andererseits aber auch die Bildung von Fibrin aus Fibrinogen im Plättchenaggregat katalysiert, wodurch dieses verfestigt wird (Gawaz, Das Blutplättchen, S 25 ff).

1.3.2.3.2 Wirkungsweise und Einsatz von Heparin

Der Wirkmechanismus des Heparin besteht darin, dass es sich an Lysinreste des Enzyms Antithrombin anlagert, und somit dessen katalytische Aktivität für die Inaktivierung diverser Gerinnungsfaktoren (Thrombin, Xa, IXa, XIa, XIIa) stark heraufsetzt (Hirsh et al., 2001). Vor allem die Hemmung von Faktor Xa und Thrombin sind von Bedeutung. Für die Inaktivierung von Thrombin muss Heparin sowohl an Antithrombin als auch gleichzeitig an Thrombin gebunden werden. Für die Inaktivierung von Faktor Xa ist vor allem die Bindung an Antithrombin entscheidend (Casu et al., 1981). Heparinmoleküle mit weniger als 18 Sachariden können die simultane Bindung nicht mehr bewerkstelligen und Thrombin daher nicht mehr inaktivieren. Allerdings unterstützen kleinere Heparinmoleküle dafür effektiver die Inaktivierung von Faktor Xa durch Antithrombin (Oosta et al., 1981).

Heparine variieren stark in ihrem Molekulargewicht, wobei höhermolekulares Heparin schneller aus der Blutbahn eliminiert wird. Dieser Effekt ist dafür verantwortlich, dass es zu Unterschieden in der Beziehung zwischen der Heparinkonzentration im Plasma (gemessen in Faktor X inaktivierenden Einheiten) und der Messung der aktivierten partiellen Thromboplastinzeit kommt.

Heparin scheint, neben der gut belegten Beeinflussung der Blutgerinnung durch Bindung an Antithrombin III, noch andere biologische Effekte zu haben.

Dadurch, dass primäre und sekundäre Hämostase Hand in Hand gehen, wird zusätzlich auch die primäre Hämostase, zum Beispiel über eine Inhibition der thrombinabhängigen Plättchenaktivierung, beeinflusst (Hirsh et al., 2001).

Heparin scheint das Wachstum glatter Muskelzellen zu hemmen (Clowes et Karnowsky, 1977) und zeigt zudem einen günstigen Effekt auf den Reperfusionsschaden nach kardialer Ischämie (Black et al., 1995).

Es wurde gezeigt, dass Heparin antientzündliche Eigenschaften besitzt (Nelson et al., 1993). Im Körper findet es sich physiologischerweise im Gastrointestinaltrakt und in der Lunge, den Organen, die neben der Haut, in Kontakt mit der Außenwelt stehen. Einige Studien zeigten in vitro einen Effekt auf die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies und die Cytokinsekretion durch Leukozyten in vitro (Itho et al., 1995/ Attanasio et al., 1998). Heparin reduzierte die Adhäsion von Leukozyten an Endothelzellen in vitro (Lever et al., 2000). Es wurde gezeigt, dass es die Chemotaxis neutrophiler Granulozyten (Dwarakanath et al., 1995) und die Migration eosinophiler Granulozyten hemmen kann (Texeira et Hellewel 1993). Auf Grund dieser antiinflammatorischen Eigenschaften werden bereits Studien zum Einsatz von Heparin bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen durchgeführt. Auch ein möglicher Einsatzpunkt zur Behandlung von Tumorerkrankungen durch Hemmung der Angiogenese wird diskutiert. (Mousa, 2007).

Im Zusammenhang mit der koronaren Herzerkrankung wird Heparin vor allem beim akuten Koronarsyndrom und im Rahmen revaskularisierender Verfahren eingesetzt (Hirsh et al., 2001).

Oler et al. (1996) stellten in einer Metaanalyse fest, dass die Kombination aus Aspirin und Heparin bei der instabilen Angina Pectoris, der Monotherapie mit Aspirin bezüglich der Risikoreduktion für Herztod oder Myokardinfarkt überlegen ist, so dass hier, meist wenn keine interventionelle Therapie angewendet wird, die Kombination zur Anwendung kommt. Der ergänzende Einsatz zur Thrombolyse beim akuten Myokardinfarkt ist kontrovers (Hirsh et al., 2001). Der Einsatz im Rahmen der PCI wird unter Punkt 2.3.5.3 abgehandelt.

1.3.2.3.3 Wirkungsweise und Einsatz von Bivalirudin

Bei Bivalirudin handelt es sich um einen direkten Thrombininhibitor (DTI), im Gegensatz zu Heparin, welches die Inaktivierung von Thrombin nur über eine Interaktion mit Antithrombin III bewerkstelligt.

Thrombin kann an drei Bindungsstellen inaktiviert werden. Erstens im aktiven katalytischen Zentrum, zweitens an der Exosite 1 nahe der Bindungsdomäne für Fibrin und drittens an der Exosite 2, der so genannten Heparin Bindungsdomäne

(Tulinsky et al., 1996). Bei Bivalirudin handelt es sich um einen reversiblen bivalenten Thrombininhibitor (Parry et al., 1994), der an das aktive Zentrum und an die Exosite 1 von Thrombin bindet. Während indirekte Thrombininhibitoren (Heparin) nur zirkulierendes Thrombin inaktiviert, können die DTI auch bereits an einen Thrombus gebundenes Thrombin inaktivieren (Weitz et al., 1998)

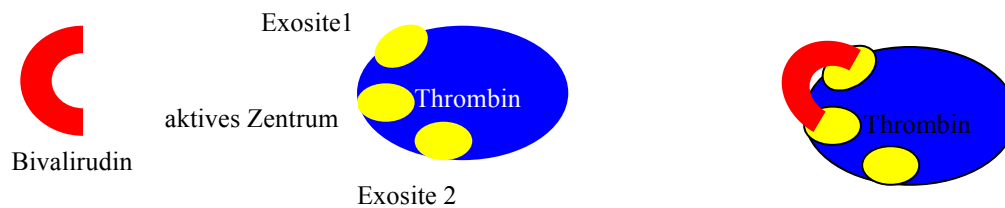


Abbildung 1: Bivalente Bindung von Bivalirudin an das aktive Zentrum und an Exosite1 von Thrombin.

Auch werden sowohl unfraktioniertes als auch niedermolekulares Heparin durch eine, aus Thrombozyten freigesetzte Substanz (Plättchenfaktor 4), inaktiviert (Eitzman et al., 1994), was bei den DTI nicht der Fall ist. Der Heparin-Plättchenfaktor 4 - Komplex spielt eine Rolle bei der durch Heparin induzierten Thrombozytopenie Typ II (Chong, 2003) so, dass hier Bivalirudin als therapeutische Alternative in Frage kommt (Mahaffey et al., 2003).

Im Rahmen der KHK wurde es bislang nur als ergänzende medikamentöse Therapie im Rahmen endovaskulärer Revaskularisationstechniken eingesetzt.

1.3.3 Perkutane Interventionen

1.3.3.1 Technik

1977 wurde erstmalig von Andreas Gruntzig die Technik der Koronarangioplastie als nicht operatives Verfahren zur Revaskularisation einer Koronararterie eingesetzt (Gruntzig et al., 1979). Das Verfahren besteht in Grundzügen darin, dass ein Katheter, an dessen Spitze sich ein Ballon befindet, zum Beispiel über einen Zugang in die Leistenarterie bis in eine Verengung der Koronararterie, eingeführt wird. Durch Aufpumpen des Ballons wird diese Verengung aufgedehnt. Seit dieser Zeit wurde die PTCA mit geschätzten zwei Millionen Eingriffen, die jährlich weltweit stattfinden, ein

Standardverfahren zur Behandlung der koronaren Herzerkrankung mit verschiedenen Indikationen. Die Grundtechnik wurde durch verschiedene weitere Techniken, wie zum Beispiel die Einbringung von Stents (reine Metallstents sowie mit Medikamenten beschichtete Stents), Techniken zur endoluminalen Atherektomie bis hin zur endoluminalen radiologischen Brachytherapie zur Reduktion von Stentthrombosen, ergänzt.

1.3.3.2 Erfolgskriterien und Komplikationen

Als Erfolgskriterien werden der Erfolg der Intervention an sich und der klinische Erfolg unterschieden.

Von einer erfolgreichen Intervention wird gesprochen, wenn eine Reduktion der Stenose auf unter 20 % erfolgte, ohne dass es im Rahmen der Intervention zu Komplikationen kam.

Bezüglich der Komplikationen werden Hauptkomplikationen wie Tod, Myokardinfarkt oder Schlaganfälle von Nebenkomplikationen wie z.B.: transiente ischämische Attacken (TIA), Wundheilungsstörungen im Bereich des Katheterzugangs, Niereninsuffizienz oder andere Kontrastmittelunverträglichkeitsreaktionen unterschieden.

Als sogenannte spezifische Reaktionen werden eine Koronar thrombose, Koronarperforation mit nachfolgender Tamponade und Herzrhythmusstörungen gewertet (Smith et al., 2005).

Neuere Studien zeigen eine sogenannte Krankenhaussterblichkeit von 0.68-1.4% (Anderson et al., 2002/ Hannan et al., 2005), wobei die Sterblichkeit stark von den klinischen Umständen abhängt unter denen die PCI durchgeführt wurde.

So zeigte sich beispielsweise, beim Einsatz als primäre Reperfusionstherapie im Rahmen eines Herzinfarktes mit ST-Hebung (STEMI), die kurzfristige Sterblichkeit mit 7% deutlich erhöht, wobei hier der Tod möglicherweise eher der kardialen Grunderkrankung als der PCI zuzuordnen ist (Keeley et al., 2003).

Ein Herzinfarkt im Rahmen einer PCI kann durch den akuten Verschluss einer Koronararterie oder durch eine intrakoronare Embolie ausgelöst werden, was versucht wird durch den Einsatz potenter antithrombozytärer und antikoagulatorisch wirksamer Substanzen zu verhindern. Das, mit diesem Einsatz verbundene, Blutungsrisiko muss ebenfalls als mögliche Komplikation im Rahmen der PCI beachtet werden (Antman et al., 1999).

Von klinischem Erfolg kann man sprechen, wenn es neben einer erfolgreichen Intervention auch zu einer deutlichen Abnahme des Beschwerdebildes kommt. Dauert dieser Erfolg länger als 6 Monate nach dem Eingriff an, kann dies als langfristiger Erfolg bezeichnet werden (Smith et al., 2005).

Der langfristige Erfolg wird vor allem durch die Restenoserate beeinträchtigt.

Es wurde gezeigt, dass sich durch ein elastisches Zusammenziehen des Gefäßes ("elastic recoil"), das unmittelbar nach dem Aufblasen des Ballons beginnt, bis zu 50% des Lumengewinns wieder eingebüsst werden (Rodriguez et al., 1995).

Unmittelbar nach der Frakturierung einer atherosklerotischen Plaque im Rahmen der PCI kommt es zur Freisetzung thrombogener Plaquebestandteile. Die hat eine Thrombozytenadhäsion, Aktivierung sowie Aggregation zur Folge. Die aktivierten Thrombozyten setzen diverse Substanzen frei, die unter anderem auch das Wachstum und die Migration glatter Muskelzellen triggern. Das Einwandern dieser glatten Muskelzellen an den Ort, der durch die PCI gesetzten Gefäßverletzung und die vermehrte Synthese extrazellulärer Matrix durch diese Zellen, wird als wesentlich für den, an der Restenosierung beteiligten Prozess der Neointima- Hyperplasie angesehen (Wilcox et al., 2001/ Weintraub,2007). Die Thrombozyten interagieren in diesem Prozess wiederum mit diversen Entzündungszellen die, wenn sie in die Gefäßwand einwandern, dort ebenfalls eine lokale Entzündungsreaktion unterhalten und ebenso das Wachstum und die Synthese extrazellulärer Matrix begünstigen, so dass dieser Prozess auch als entzündliche Wundheilung bezeichnet wurde (Forrester et al.,1991).

Es gibt Hinweise, dass durch eine Stentimplantation (BMS, Bare Metal Stent = unbeschichteter Metallstent) ebenfalls über die Initiierung von Entzündungsvorgängen eine Restenosierung gefördert wird (Toutouzas et al., 2004).

So wurde gezeigt, dass im Gegensatz zu Gefäßen, die nur ballondilatiert wurden und in denen sich lediglich eine vermehrte Neutrophileneinwanderung fand, besonders in der Neointima gestenteter Arterien, sich eine verlängerte und massive Ansammlung von Makrophagen zeigte (Welt et al., 2003). Zusammengefasst führen, neben dem "Elastic Recoil", den Gefäßreaktionen auf das, während der Intervention gesetzte Trauma oder die Stenteinlage zu einer Restenosierung.

Diese Reaktionen bestehen aus Vorgängen der Thrombosierung, Entzündung, Zellproliferation und Vermehrung der extrazellulären Matrix, die meist über einen

Zeitraum von sechs Monaten zu einem fortschreitenden Lumenverlust führt. (Nikol et al., 1996).

1.3.3.3 Medikamentöse Beeinflussung der Komplikationen

Bei der einfachen Ballonangioplastie spielt der "Elastic Recoil" eine große Rolle beim, unmittelbar im Anschluss an die Läsion, auftretenden Lumenverlust. Durch das Einbringen eines BMS (Bare Metal Stent = unbeschichteter Metallstent) kann dieser Mechanismus und der Mechanismus einer Einengung, durch externe Gefäßumbauvorgänge, reduziert werden (Smith et al., 2005). In der BENESTENT Studie konnten Serruys et al. (1994) zeigen, dass durch die Stenteinlage das Risiko einer Restenose reduziert wird (von 32% auf 22%). Unbeeinflusst bleiben jedoch die Vorgänge, die über die Ausbildung einer Intimahyperplasie, zu einer Restenosierung innerhalb des Stents führen können. Hier haben sich zum einen die lokale Radiotherapie (Popma et al., 2002), aber auch der Einsatz von Stents bewährt, die Substanzen frei setzen, welche die Zellmigration, das Zellwachstum und Entzündungsvorgänge im weiteren Sinne hemmen. Gebräuchlich sind hier zum Beispiel Rapamycin (Sirolimus) und Paclitaxel. In der TAXUS IV Studie zeigte sich durch den Einsatz von, mit Polymer gebundenen Paclitaxel-Stents, eine Reduktion der angiographischen Restenoserate von 26.6% auf 7.9% (Stone et al., 2004). In der SIRIUS Studie wurde eine deutliche Abnahme von schwerwiegenden Komplikationen (MACE), vor allem der Notwendigkeit zu einer erneuten Revaskularisierung (von 18.9% auf 7.1%), beschrieben (Moses et al., 2003).

Um periprozedurale Komplikationen zu verringern, aber auch um möglicherweise den Langzeiterfolg zu verbessern, werden auch diverse medikamentöse Strategien der Thrombozytenaggregationshemmung eingesetzt.

Bezüglich der Thrombozytenaggregationshemmung kommen im Wesentlichen dieselben Substanzen wie zur medikamentösen Beeinflussung der KHK zum Einsatz.

Aspirin (Acetylsalicylsäure) reduziert das Auftreten von ischämischen Komplikationen nach einer PCI, so dass bei Patienten, die nicht ohnehin schon Aspirin einnehmen, eine Dosis von (300-325 mg) 2 - 24h vor einer PCI empfohlen wird (Popma et al., 2004). Durch eine duale Thrombozytenaggregationshemmung (Acetylsalicylsäure und Thienopyridine z.B.: Clopidogrel) konnte die Häufigkeit der subakuten Stentthrombose auf ca. 1 % abgesenkt werden (Cutlip et al., 2001).

In der ISAR Studie (Schömig et al., 1996) zeigte sich eine duale Thrombozytenaggregationshemmung in der Verhinderung von Ereignissen wie Herztod, Herzinfarkt oder Notwendigkeit einer erneuten revaskularisierenden Maßnahme, einer Marcoumarisierung oder Heparinisierung überlegen (1.5% vs. 6.2%). In der STARS Studie zeigte sich die Kombination aus Aspirin und Ticlopidin gegenüber einer Kombination aus Aspirin und Warfarin (Vitamin-K-Antagonist), bezüglich des Auftretens oben genannter Komplikationen, über einen Zeitraum von 30 Tagen, signifikant überlegen. Möglicherweise hat eine höhere sogenannte Ladedosis von Clopidogrel einen zusätzlich günstigen Einfluss auf das postinterventionelle Outcome (Patti et al., 2005).

Die CREDO Studie, in der alle Patienten für 12 Monate entweder Aspirin und Clopidogrel oder Aspirin und Placebo erhielten, zeigte für die Kombination aus Aspirin und Clopidogrel eine 27 % Reduktion des relativen Risikos zu versterben, einen Schlaganfall oder einen Herzinfarkt zu erleiden (Steinhubl et al., 2002).

Zusammenfassend können sowohl Acetylsalicylsäure als auch Clopidogrel sowohl das Auftreten von Komplikationen im Rahmen oder nach der PCI absenken. Eine langfristige Gabe verbessert die Prognose zusätzlich (Smith et al., 2005).

Ebenso scheint der Einsatz von α IIb β 3 - Antagonisten einen günstigen Einfluss zu haben. In einer Metaanalyse, in der die Mortalität nach einer PCI mit oder ohne Stenting untersucht wurde, zeigte sich ein günstiger Einfluss auf die Sterblichkeit innerhalb der ersten 30 d nach PCI und nach 6 Monaten (Karvouni et al., 2003), wobei sich die Effekte relativ unabhängig von den klinischen Umständen, unter denen die PCI durchgeführt wurde und von der Technik (mit oder ohne Stent), zeigte. Am besten untersucht in diesem Zusammenhang ist Abciximab.

In der EPIC- (8.3% vs. 12.8%) (EPIC Investigators, 1994), in der EPILOG- (5.7% vs 11.7%) (EPILOG Investigators, 1997) und in der CAPTURE-Studie (11.3% vs. 15.9%) (CAPTURE-Investigators, 1997) fand sich jeweils eine signifikante Reduktion des Risikos für solche Ereignisse wie Tod, Herzinfarkt oder die Notwendigkeit zu einer erneuten Revaskularisierung im Zeitraum von 30 d nach PCI. Ein solch günstiger Effekt konnte auch bei PCI mit Stenteinlage nachgewiesen werden (Topol et al., 1999). In der ERASER Studie konnte jedoch nicht nachgewiesen werden, dass Abciximab tatsächlich eine In-Stent-Stenosierung verhindert (ERASER Investigators, 1999). Interessanterweise scheint der Effekt auch von der Begleitmedikation abzuhängen. So fanden Kastrati et al. (2004) in der ISAR-REACT Studie, dass nach

einer höher dosierten (600mg) Clopidogrel-Gabe kein zusätzlich günstiger Effekt von Abciximab nachzuweisen war.

Während der PCI wird meist unfraktioniertes Heparin verabreicht, um das Risiko einer Thrombenbildung im Rahmen der arteriellen Verletzung (Topol et al., 1993) oder im Bereich des Katheters (Grayburn et al., 1991) zu vermindern. Zur Überwachung einer adäquaten Dosierung wird die aktivierte Gerinnungszeit bestimmt. Ist die Dosis zu hoch, besteht, insbesondere bei der Kombinationstherapie mit Acetylsalicylsäure oder α II β 3-Antagonisten, ein erhöhtes Blutungsrisiko (Popma et al., 1994). Nach einer unkomplizierten PCI wird der Einsatz von unfraktioniertem Heparin nicht mehr empfohlen.

Als Alternative zu unfraktioniertem Heparin kristallisierte sich der Einsatz von Bivalirudin heraus. In der BAT Studie (Bivalirudin Angioplasty Trial) zeigte sich der Einsatz von Bivalirudin, dem Einsatz von Heparin, im Rahmen einer Ballonangioplastie zur Verminderung von schweren Komplikationen (Herzinfarkt, Tod während des Klinikaufenthaltes, notfallmässige Revaskularisierung zum Beispiel durch Bypass-OP), ebenbürtig, allerdings mit weniger Blutungskomplikationen (Bittl et al., 1995). In der REPLACE II Studie wurden 6010 Patienten untersucht, die eine PCI bei akutem Koronarsyndrom ohne ST -Streckenhebung erhielten. Es wurden Gruppen gebildet in denen die Patienten, die meist mit einer Kombination aus Acetylsalicylsäure und Clopidogrel vorbehandelt waren, entweder eine Kombination aus Heparin und α II β 3-Antagonisten oder Bivalirudin alleine, verglichen wurden. (Kombination mit α II β 3-Antagonisten in 7.2% der Fälle, wenn dies klinisch erforderlich erschien).

Den Endpunkt der Studie stellten entweder Tod, Myokardinfarkt, notfallmässige Wiederholung einer revaskularisierenden Maßnahme oder schwere Blutungskomplikationen dar. Die Gruppen unterschieden sich nach 30 Tagen nicht bezüglich ischämischer Komplikationen. In der Bivalirudingruppe zeigte sich eine signifikante Reduktion schwerer Blutungskomplikationen (2.4% vs 4.1%) (Lincoff et al., 2003). Nach 6 Monaten zeigte sich kein Unterschied bezüglich ischämischer Komplikationen. Nach einem Jahr schnitt die Bivalirudin Gruppe tendenziell (nicht signifikanter Trend) leicht besser ab (Lincoff et al., 2004).

In der ACUITY Studie wurden ebenfalls, in Kombination mit Aspirin und häufig auch Clopidogrel, 3 Patientengruppen mit akutem Koronarsyndrom untersucht. Eine erhielt einen α II β 3-Antagonisten und Heparin, eine zweite einen α II β 3-Antagonisten und

Bivalirudin und eine dritte Gruppe Bivalirudin alleine, wobei bei thrombotischen Komplikationen während der Intervention auch ein α II β 3-Antagonist eingesetzt werden konnte. Es zeigte sich wiederum keine Unterlegenheit der Bivalirudin-Monotherapie- Strategie zur Prävention ischämischer Ereignisse im Vergleich zu den anderen Patientengruppen. Allerdings zeigte sich erneut eine Überlegenheit von Bivalirudin bezüglich möglicher Blutungskomplikationen (Stone et al., 2006).

Zusammenfassend wurde bisher gezeigt, dass die Komplikationsrate der perkutanen koronaren Intervention durch Medikamente deutlich gesenkt wird. Die Kombination einer dualen antithrombozytären Strategie, mit entweder Heparin oder Bivalirudin, hat sich bewährt (Smith et al., 2005).

1.3.4 Chirurgische Revaskularisation

Neben den Techniken zur endovaskulären Revaskularisation haben sich früh die chirurgischen Verfahren zur Revaskularisierung bewährt. Dabei werden entweder Stenosen direkt mit Hilfe der Patch Graft Technik oder indirekt über einen Bypass, zum Beispiel über die Arteria throacica interna, überbrückt. (Favaloro, 1998). In einem systematischen Review kommen Bravata et al. 2007 zum Ergebnis, dass die 10-Jahres-Ueberlebensrate nach PCI oder BYPASS Operation keine signifikanten Unterschiede aufweist. Bezüglich der Verbesserung der Symptomatik der Angina Pectoris zeigte sich eine leichte Überlegenheit der chirurgischen Verfahren, die allerdings mit einem leicht erhöhten Schlaganfallrisiko (1.2% vs 0.6%) und mit einer stärkeren periinterventionellen Invalidisierung einhergehen.

2. Fragestellung

Der direkte Thrombininhibitor Bivalirudin stellt eine therapeutische Alternative zu Heparin zur Prophylaxe einer arteriellen Thrombenbildung während einer perkutanen Koronarintervention (PCI) dar.

Erste Studien zeigen, dass Bivalirudin sowohl bezüglich periinterventioneller Komplikationen (Blutung, Gefäßverschluss) als auch bezüglich langfristiger ischämischer Komplikation im Vergleich zu Heparin ebenbürtig erscheint.

Längerfristige ischämische Komplikationen werden durch Restenosierungsprozesse begünstigt. An diesen Prozessen sind wiederum Entzündungsvorgänge beteiligt, die bereits während der Angioplastie angestossen und über Thrombozyten und Leukozyten vermittelt werden.

Wir möchten an Patienten, die eine PCI erhalten, die Fragestellung untersuchen, ob sich Bivalirudin und Heparin unterschiedlich auf die Thrombozytenaktivierung, die Leukozytenaktivierung sowie die Interleukin- und CRP Freisetzung auswirken.

Dies geschieht unter Hypothese, dass eine günstige Beeinflussung von Thrombozytenaggregation und von Entzündungsvorgängen eine Erklärung für das gute Abschneiden von Bivalirudin in den Studien sein könnte.

Als Methoden kommen die Aggregometrie (Thrombozyten), die FACS-Analyse (Leukozytenoberflächenmarker/Thrombozytenoberflächenmarker) und der Cytometric Bead Array (Interleukine) zum Einsatz.

3. Material und Methoden

3.1 Auswahl der Studienpopulation

3.1.1 Einschlusskriterien

Eine Untergruppe (n=46) der ISAR-REACT-3 Studie mit stabiler Angina pectoris und elektiver perkutaner Koronarintervention (PCI) wurden in dieser randomisierten, doppelblinden Studie eingeschlossen.

Die Diagnose stützte sich auf typische klinische Symptome (reversibles belastungsabhängiges thorakales Druckgefühl oder Brennen), elektrokardiographische (keine spezifischen Veränderungen im Ruhe-EKG, keine Anzeichen einer instabilen Angina pectoris wie zum Beispiel ST- Strecken und T-Wellen- Veränderungen oder eines Myokardinfarktes mit zusätzlichen Veränderungen des QRS-Komplexes) und angiographische Veränderungen (interventionsbedürftige Koronarstenose).

3.1.2 Ausschlusskriterien

Patienten mit akutem koronarem Syndrom sowie Patienten, die unfraktioniertes Heparin (UFH) 6 Stunden bzw. niedermolekulares Heparin (LMWH) 8 Stunden oder orale Antikoagulation 7 Tage vor Intervention erhalten haben, konnten aufgrund einer möglichen Beeinflussung des Studienergebnisses nicht an der Studie teilnehmen.

Die komplette Liste der Ausschlusskriterien zeigt folgende Tabelle:

Tabelle 1: Ausschlusskriterien

Alter	<18 Jahre
kardiovaskuläre Ereignisse	<ul style="list-style-type: none"> • Myokardinfarkt mit ST-Erhöhung innerhalb 48 Stunden • Kardiogener Schock • Perikarditis • V.a. Aortendissektion • unkontrollierbare arterielle Hypertension >180/110mmHg • perkutane Koronarintervention in den letzten 30 Tagen • geplante perkutane Koronarintervention in den nächsten 30 Tagen
gerinnungshemmende Medikation:	Einnahme von Bivalirudin 24 Stunden zuvor, orale Antikoagulation in den letzten 7 Tagen, Gabe von unfraktioniertem Heparin (UFH) in den letzten 6 Stunden bzw. niedermolekularem Heparin (LMWH) in den letzten 8 Stunden
renale Erkrankungen	Glomeruläre Filtrationsrate (GFR) < 30ml/min., Serum Creatinin > 30mg/l, renale Dialyse
Blutbildveränderungen	Hämoglobin <100 g/l, Thrombozyten < 100 x 10 ⁹ Zellen/l oder >600 x 10 ⁹ Zellen/l
Blutungen	aktive Blutung, bekannte gastrointestinale, genitouretrale oder intrakranielle Blutungen, Hämophilie
Trauma oder Operation einen Monat zuvor	
andere Erkrankungen	maligne oder andere Erkrankungen mit einer Lebenserwartung von weniger als einem Jahr
Allergie gegen die Studienmedikation:	Aspirin, Clopidogrel, unfraktioniertes Heparin, Bivalirudin
Schwangerschaft	
Teilnahme an andere klinische Studien	
Ablehnung einer möglichen Bluttransfusion	

3.1.3 Abbruchkriterien

Die Studie konnte jederzeit vom Patienten ohne Angabe von Gründen und ohne Nachteil für seine weitere Behandlung abgebrochen werden.

Der Studienarzt brach die Studie ab, sobald eine relevante Nebenwirkung auf die Studienmedikation oder Erkrankungen bzw. Zustände der Ausschlusskriterien auftraten.

3.2 Voruntersuchungen

Vor der randomisierten Aufteilung der Patienten in den zwei verschiedenen Studiengruppen erhielten alle Teilnehmer die gleichen Voruntersuchungen:

Eine körperliche Untersuchung inklusive der Bestimmung von Gewicht, Größe, Puls und Blutdruck, die Darstellung eines 12-Kanal Elektrokardiogramms (EKG) und das Erfassen der Routine-Laborparameter: u.a. der Leukozyten, Hämoglobin, Hämatokrit, Thrombozytenzahl, Serum Creatinin, activated clotting time (ACT), aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT), international normalized ratio (INR), Kreatinkinase (CK), CK-MB, Troponin T oder Troponin I.

Vor der anschließenden Koronarangiographie und linken Ventrikulographie erhielten die Teilnehmer ein orales Loading von 600mg Clopidogrel.

3.3 Studienprotokoll

Das Studienprotokoll wurde von der Ethikkommission der Institution genehmigt und alle Patienten erteilten nach ausführlicher Beschreibung der Studie ihre schriftliche Einverständniserklärung.

Im Rahmen des Studienprotokolls wurden den Patienten zu drei verschiedenen Zeitpunkten 15 ml peripher venöses Blut abgenommen. Die erste Entnahme erfolgte unmittelbar vor Gabe von Acetylsalicylsäure und dem randomisierten Medikamentenbolus, die Zweite sofort nach Ende der Intervention und zuletzt nach 24 Stunden. Die gewonnenen Blutproben wurden sofort nach unten beschriebenem Protokoll verarbeitet.

Das Ziel war die ADP- und TRAP -induzierte Thrombozytenaggregation mittels Aggregometrie und die Expression verschiedener Oberflächenmarker, die eine Thrombozytenaktivierung widerspiegeln (CD62p, CD42b, PAC-1) mittels Durchflusszytometrie zu analysieren, sowie die Bestimmung inflammatorischer Zytokine mit Hilfe des Cytometric Bead Array.

Studienprotokoll

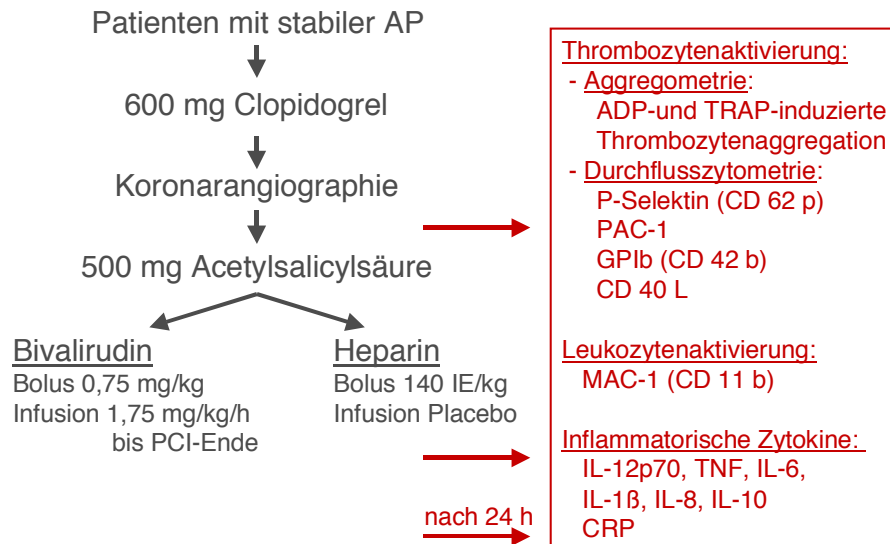


Abbildung 2: Studienprotokoll

Nach der Intervention erhielten alle Patienten zwei Mal täglich 100 mg Aspirin und 75 mg Clopidogrel für drei Tage gefolgt von 75 mg Clopidogrel täglich für mindestens 30 Tage.

3.4 Laboruntersuchungen

3.4.1 Aggregometrie

Um die Frage zu beantworten, ob die Thrombozytenaktivität nach erfolgter Therapie mit Bivalirudin bzw. unfraktioniertem Heparin unterschiedlich ist, wurde mit Hilfe der Aggregometrie sowohl die ADP (Adenosin-5`-diphosphat) - als auch die TRAP (Thrombinrezeptor aktivierendes Peptid) - induzierte Thrombozytenaggregation bestimmt.

ADP ist ein löslicher Agonist, der nach Freisetzung aus bereits aktivierten Thrombozyten, eine wichtige Rolle bei der weiteren Aktivierung der Thrombozyten spielt. Über die Hemmung der Adenylatzyklase reduziert es die intrazelluläre Konzentration des in Thrombozyten aggregationshemmenden Signalmoleküls cAMP (cyclisches Adenosinmonophosphat). Durch die Aktivierung der Phospholipase C

führt ADP zur Freisetzung von Kalzium. Dieses bewirkt über weitere Zwischenschritte die Aktivierung von Thrombozyten.

3.4.1.1 Grundlagen der Aggregometrie

Die Messung der thrombozytären Aggregation wurde 1964 durch Born (Born et al., 1964) etabliert. Seitdem dient sie in der klinischen Routinediagnostik zum Nachweis erworbener, angeborener oder medikamentös induzierter Funktionsstörungen der Thrombozyten.

Das Messprinzip beruht auf einer Änderung der Lichtdurchlässigkeit, welche durch Formwandel der Thrombozyten mit Ausbildung von Pseudopodien ("shape change") und anschließender Aggregation der Thrombozyten verursacht wird.

Die Initiierung der Aggregation erfolgte mit Hilfe der Plättchenaktivatoren ADP oder TRAP. Diese binden an spezifische thrombozytäre Membranrezeptoren, die eine Kaskade an Aktivierungsreaktionen (Shape Change, Sekretion granulärer Inhaltsstoffe, Aggregation) bewirken. Durch die Aggregatbildung kommt es zu einer Zunahme der Lichtdurchlässigkeit der Suspension. Dabei wird immer die Aggregation zwischen plättchenreichem (PRP) und plättchenarmem Plasma (PPP) verglichen.

Der Aggregometer misst photometrisch die plättchenbedingte Trübung bzw. die Lichtdurchlässigkeit. Polychromatisches Licht aus einer Niederspannungsglühbirne trifft auf das Plasma und misst den Grad der Trübungsänderung bzw. der Lichtdurchlässigkeit (Transmission). So führt die Bildung von Plättchenaggregaten zu einer Abnahme der Partikelzahl und dementsprechend zu einer Erhöhung der Lichtdurchlässigkeit.

Mit Hilfe einer Photozelle wird das transmittierte Licht umgewandelt und zu einem elektronischen Signal verarbeitet. Anschließend nimmt ein integrierter Drucker den zeitabhängigen Verlauf der Aggregation auf und gibt sowohl die Endaggregation in Prozent als auch die Reaktionskinetik in Form einer Kurve an.

Das Gerät wurde für die Proben mit PRP bzw. PPP auf 0% und auf 100% Lichtdurchlässigkeit geeicht.

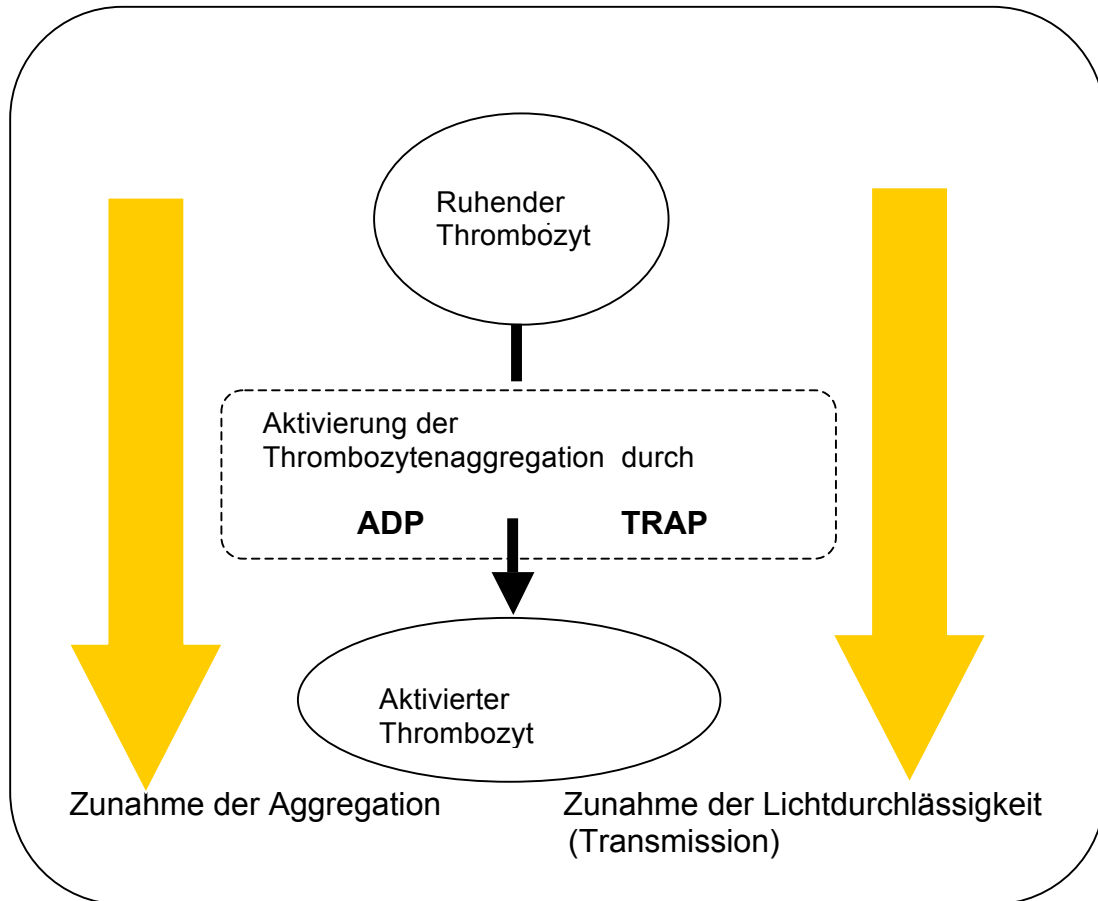


Abbildung 3: Prinzip der aggregometrischen Messung. Überführung ruhender Thrombozyten in den aktivierten Zustand durch Zugabe von Thrombozytenaktivatoren (ADP, TRAP).

Für die aggregometrischen Messungen wurden die zwei Aktivatoren ADP und TRAP verwendet.

ADP bindet an die purinergen Rezeptoren P_2X_1 , P_2Y_1 und P_2Y_{12} auf der Thrombozytenmembran. P_2Y_1 induziert eine intrazelluläre Kalziumfreisetzung und bewirkt die Aggregation mit einer vorausgehenden Formveränderung (Shape Change) der Thrombozyten. Die Induktion des P_2Y_{12} Rezeptors bewirkt die Aggregation über den Phosphatidylinositol-Stoffwechselweg. Der aktive Fibrinogenrezeptor (GP IIb/IIIa) wird exprimiert und es kommt zur Membranveränderung der Thrombozyten (Wilde 2000, Cattaneo 2002, Fontana 2003, Rozalski 2005).

3.4.1.2 Probenaufbereitung

Für die aggregometrischen Messungen wurde venöses Vollblut entnommen und aufbereitet. Die Aufbereitung erfolgte durchgehend bei 37°C. Die Vollblutproben

wurden bei 1000 U/min. (Umdrehungen pro Minute) für 15 Minuten zentrifugiert, um die Thrombozyten im Plasma anzureichern und somit PRP herzustellen. Der Überstand wurde vorsichtig mit einer weitlumigen Pipettenspitze entfernt, um eine Aktivierung der Thrombozyten, sowie eine Mitnahme roter Blutkörperchen zu vermeiden. Der Rückstand wurde erneut bei 13000 U/min. 3 Minuten zentrifugiert. Der neu gewonnene Überstand diente als PPP.

3.4.1.3 Messung der Thrombozytenaggregation

Die Messung der Thrombozytenaggregation erfolgte an PRP mit einem Lumi-Aggregometer der Firma Chronolog Corporation (Havertown, PA, USA).

PRP wurde in Glasküvetten gegeben und unter Verwendung eines Rührmagneten konstant bei 1000 U/min. durchmischt.

Die Lichtdurchlässigkeit (Transmission) des PRP lag zu Beginn bei 0%. Durch Zugabe der Aktivatoren ADP (Endkonzentration 5 μ M) bzw. TRAP (Endkonzentration 25 μ M) wurde die Aggregation gestartet und die Transmission sukzessiv erhöht. Nach Einstellung der Nulllinie und nach Aktivierung der Thrombozytenaggregation erfolgte die Messung für die Dauer von 5 Minuten. PPP diente als Referenzwert für 100% Transmission.

3.4.2 Durchflusszytometrie

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie war es möglich spezifische Veränderungen der aktivierten Plättchenoberfläche in Verbindung mit fluorochrommarkierten monoklonalen Antikörpern zu charakterisieren. So konnten qualitative und quantitative Aussagen über den Funktionszustand bestimmter thrombozytärer Oberflächenrezeptoren gemacht werden.

Dabei waren die Oberflächenproteine P-Selektin, GPIIb α , CD40L, und PAC-1 von besonderem Interesse.

P-Selektin und GPIIb α , beide thrombozytäre Membranglykoproteine, welche die Interaktion von Thrombozyten mit Leukozyten bzw. mit der subendothelialen Matrix vermitteln, erlauben Aussagen über die Adhäsionsbereitschaft der Thrombozyten. CD40-L wird aus aktivierten Thrombozyten freigesetzt und spielt bei der Entzündungsreaktion eine wichtige Rolle, indem es die adhäsiven und chemotaktischen Eigenschaften der Gefäßwandzellen verändert.

Die Bestimmung des PAC-1- Expression, als Teil des Fibrinogenrezeptors, erlaubt Aussagen über dessen Aktivierung.

3.4.2.1 Grundlagen der Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie hat in den letzten dreißig Jahren eine schnelle Verbreitung sowohl in der Forschung als auch im klinischen Alltag erfahren und lässt sich aus diesen Bereichen nicht mehr weg denken. Ihre großen Vorteile liegen einerseits in ihrer hohen Analysegeschwindigkeit von 400-4000 Zellen/Sekunde sowie in ihrer hohen sensitiven und objektiven Quantifizierung, die sie zu einem benutzerunabhängigen Messverfahren macht. Andererseits macht sie ihre breiten Anwendungsmöglichkeiten vielseitig nutzbar.

Sie bedient sich eines optischen Messsystems, das Fluoreszenz- und Streulichtsignale einzelner Zellen analysiert. Die Ergebnisse beruhen auf der gleichzeitigen Messung mehrerer biochemischer und physikalischer Parameter einer einzelnen Zelle. Dabei lassen sich Zellen jeder Herkunft analysieren, solange sie als Suspension von Einzelzellen vorliegen.

Der Durchflusszytometer misst optische Signale wie die Fluoreszenz und Lichtstreuung, die beim Kontakt einer Zelle mit einem Lichtstrahl (Laser) entstehen und ermöglicht somit eine relativ exakte Differenzierung verschiedener Zelltypen anhand deren charakteristischer Signalmuster. Als Grundlage für die Zellanalyse dient die Antigen-Antikörper-Reaktion, für die spezifische Antikörper gegen Oberflächenmoleküle mit Fluoreszenzfarbstoff markiert werden. Nach Inkubation mit Blutzellen binden sich die markierten Antikörper an ein bestimmtes Oberflächenmolekül (Antigen). Die nun markierten Zellen werden in einer monodispersen Suspension durch die laminare Strömung perlschnurartig aufgereiht, zum Analysenpunkt geleitet und dort einzeln vom fokussierten Lichtstrahl eines Argonlasers beleuchtet (hydrodynamische Fokussierung). Sobald eine Zelle den Analysepunkt, den Schnittpunkt zwischen Flüssigkeits- und Laserstrahl, erreicht, kommt es zu einer Streuung des Laserstrahls. Diese Lichtstreuung wird von verschiedenen Zelleigenschaften beeinflusst. So spielen Zellgröße, Querschnittsfläche, Struktur der Membran und Zelloberfläche sowie intrazelluläre Bestandteile wie Vakuolen und Granula eine entscheidende Rolle.

Gemessen wird einerseits die Intensität des Lichtes, welches in Vorwärtsrichtung (Forward Scatter, FSC) entlang des einfallenden Lichtstrahls mit einem kleinen Ablenkungswinkel von $0.5-2^\circ$ streut. Diese sogenannte Vorwärtslichtstreuung ist in erster Linie ein Maß für die Zellgröße.

Andererseits wird noch die Intensität des Lichtes, welches in Seitwärtsrichtung (Side Scatter, SSC) mit einem Ablenkungswinkel von 90° streut, gemessen. Dieses so genannte Seitwärtsstreulicht ist ein Maß für die Granularität und Membranfaltung.

Mit Hilfe dieser beiden Komponenten lassen sich die Thrombozyten, sowie die drei Leukozytengruppen, bestehend aus den polymorphnukleären Granulozyten, sowie den mononukleären Lymphozyten und Monozyten voneinander unterscheiden. Dabei können diese Zellen mittels des "Gating", also der Selektion einer spezifischen Zellpopulation, eingegrenzt werden. Das Gating ist die Vorgehensweise beim Messen bzw. bei der Auswertung der Daten bestimmte Filter zu definieren. Es lassen sich sowohl die Zellgröße als auch das Fluoreszenzverhalten festlegen.

Tabelle 2: Bedeutung des Streulichtes

Messverfahren	Information über
Vorwärtsstreulicht (FSC)	Zellgröße
Seitwärtsstreulicht (SSC)	Granularität, Membranfaltung

Für die Charakterisierung unterschiedlicher Zelleigenschaften spielt nicht nur die beschriebene Lichtstreuung eine wichtige Rolle, sondern auch bestimmte Farbstoffe womit Zellen mit Hilfe von Antikörpern markiert werden. Diese Farbstoffe werden als fluoreszierende Verbindungen eingesetzt. Sie absorbieren Lichtenergie in einem für den Fluoreszenzfarbstoff charakteristischen Wellenlängenbereich. Dadurch werden Elektronen in ein höheres Energieniveau gehoben, fallen anschließend in das Ausgangsniveau zurück und emittieren dabei Licht höherer Wellenlänge. Dieser Strahlungsübergang wird als Fluoreszenz bezeichnet.

Man unterscheidet Farbstoffe zur Kennzeichnung konjugierter monoklonaler Antikörper, zum Nachweis von Zellbestandteilen wie der DNA sowie zur Bestimmung von Zelleigenschaften z.B. von Enzymaktivitäten, intrazellulärem Calcium usw.

Es besteht die Möglichkeit eine simultane Messung mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen durchzuführen, da sich die einzelnen Farbstoffe bei einer gemeinsamen Wellenlänge (in diesem Fall bei 488nm) anregen lassen, aber über unterschiedliche, für den jeweiligen Farbstoff charakteristische Emmissionsspektren verfügen:

Tabelle 3: Absorption, Emission und Detektion verschiedener Fluorochrome

Fluorochrom	Exzitation/Absorption (nm)	Emission (nm)	Detektor
Fluorescein - Isothiocyanat (FITC)	488	515-545	FL-1
R-Phycoerythrin(PE)	488	564-606	FL-2
PE/Cy5 (PC5)	488	>650	FL-3
Allophycocyanin (APC)	635	653-669	FL-4

Die nun entstandenen Fluoreszenz- und Streulichtemissionen jeder einzelnen Zelle werden in elektronische Signale umgewandelt und dadurch quantifiziert.

3.4.2.2 Beschreibung des Messvorgangs

Die Grundlage der durchflusszytometrischen Untersuchungen der vorliegenden Studie bildet das Durchflusszytometer FACSCalibur™ der Firma Becton Dickinson, Heidelberg. Dieser ist mit einem 488nm Argon-Laser mit einer Leistung von 15Milliwatt (mW) ausgestattet.

Bevor die Messungen am Durchflusszytometer durchgeführt werden konnten, musste zunächst die Geräteempfindlichkeit optimiert und kalibriert werden.

Zu diesem Zweck wurden FITC- (Fluoresceinisothiocyanat), PE- (R-Phycoerythrin), PC5- (Konjugation von R-Phycoerythrin mit Cyanin 5.1) und APC- (Allophycocyanin) markierte Beads zusammen mit isotoner Kochsalzlösung in ein Analyseröhrchen gegeben. Nun konnte die Justierung der optischen Einheit zur Optimierung der Parameter Vorwärtsstreulicht, Seitwärtsstreulicht und Fluoreszenzintensität erfolgen. Die Fluoreszenzen der FITC-, PE-, APC- und Cy5-markierten Antikörper wurden bei Wellenlängen von 530nm, 585nm, 661nm bzw. 650nm auf einer logarithmischen Skala von 1 bis 1026 Kanälen gemessen.

In der Vorwärts-Seitwärts-Streulicht-Darstellung wurde ein Schwellenwert (Diskriminator) gesetzt, der alle Impulse darunter ausschließt, um Verunreinigungen oder nicht erwünschte Partikel z.B. tote Zellen zu vermeiden.

3.4.2.3 Auswertung und Darstellung der Messergebnisse

Die Datenanalyse und quantitative Auswertung erfolgte mit der Cell Quest Research Software (Becton Dickinson, San Jose, USA). Diese ermöglicht das Erstellen von Quadranten- und Histogrammstatistiken und erlaubt somit die optimale

Differenzierung einzelner Zellpopulationen, sowie die Berechnung der entsprechenden prozentualen Verteilung von Subpopulationen.

Die Zellpopulation der Leukozyten sowie der Thrombozyten wurden durch das Eingrenzen (Gating) auf die CD 45- sowie CD 11b- positiven bzw. CD 42b - sowie CD 62P - positiven Zellen und anhand des typischen Forward- und Sideward-Scatters identifiziert.

So konnten die Thrombozyten anhand ihres charakteristischen Vorwärtsstreulichts und die Anfärbarkeit des vWF-Rezeptors mit anti - CD42b PE aus allen registrierten Partikeln fokussiert und gleichzeitig andere zelluläre Bestandteile wie Erythrozyten oder Zelldetritus ausgegrenzt werden.

Um die Leukozytensubpopulationen voneinander unterscheiden zu können, wurden die polymorphnukleären Leukozyten (PMN) mittels dem Eingrenzen der CD 11b - und CD15 - positiven Zellen und die Monozyten durch die CD 11b - und CD 14 - positiven Zellen identifiziert.

Die Messergebnisse lassen sich in Form von Histogrammen (als Einparameterdarstellung) oder als korrelierte Zweiparameterdarstellung (Dot Plot) bzw. Diagrammen darstellen und analysieren.

Für einen besseren Vergleich der unterschiedlichen Befunde zwischen beiden untersuchten Gruppen wurden graphische Darstellungen in Form von Balkendiagrammen angewandt.

3.4.3 Durchführung der FACS-Färbungen

Tabelle 4: Verwendete Antikörper

Antikörper	Oberflächenprotein	Färbung
CD 11b	α_M -Kette des MAC-1 auf Leukozyten (Rezeptor für Leukozytenadhäsion)	FITC
CD 14	Protein auf Monozyten, Makrophagen und polymorphnukleären Leukozyten (Funktion noch nicht vollständig geklärt, unter anderem Rezeptor für Endotoxine)	PE
CD 15	auf neutrophile und eosinophile Leukozyten sowie Monozyten (Leukozytenadhäsion)	PE/Cy5
CD 40L	TRAP, Expression auf Thrombozyten CD4- und CD8-pos.-Zellen	FITC
CD 42b	GP Ib α -Untereinheit des GP Ib-IX-V (von-Willebrand-Faktor Rezeptor)	PE
CD 45	auf alle Leukozyten (Tyrosinphosphatase)	APC
CD 61	GP IIIa-Untereinheit des Fibrinogenrezeptors (unabhängig vom Aktivierungszustand)	FITC
CD62P	P-Selektin, Adhäsionsmolekül, Expression auf Thrombozyten und vaskuläre Endothelzellen	FITC
PAC-1	Bindungsstelle für Fibrinogen auf aktivierter GP IIIa-Untereinheit des Fibrinogenrezeptors	FITC

3.4.3.1 Oberflächenfärbung der Thrombozyten

Für die durchflusszytometrische Bestimmung der thrombozytären Oberflächenantigene wurde mit Citrat antikoaguliertes Vollblut gewonnen.

10 μ l des Blutes wurden mit 490 μ l PBS (Phosphat Buffered Saline) zu einem Gesamtvolumen von 500 μ l verdünnt, wovon anschließend jeweils 35 μ l in zehn verschiedene FACS-Röhrchen zugegeben wurden.

Der durch Konjugation mit Phycoerythrin (PE) rot fluoreszierende Antikörper gegen den thrombozytenspezifischen CD 42 b-Rezeptor wurde in jeweils drei Röhrchen mit einem durch Fluoreszeinisothiocyanat (FITC) grün fluoreszierenden Antikörper gegen PAC-1, CD 40L sowie CD 62P kombiniert.

In je ein Röhrchen der drei Antikörperreihen wurden 5 μ l PBS für die Referenzmessung bzw. zur Thrombozytenaktivierung 5 μ l ADP bzw. 5 μ l TRAP dazugegeben.

Die direkt markierten Antikörper (AK) wurden in den unten angegebenen Volumina zugegeben und gut gemischt:

5 µl anti - CD 42b PE AK (Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland)
10 µl Phosphat Buffered Saline (PBS, Fa. GIBCO, Life Technologies, Leopoldshafen, Deutschland)

5 µl anti - CD 42b PE AK (Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland)
5 µl anti - PAC1 FITC AK (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland)
5 µl PBS

5 µl anti - CD 42b PE AK (Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland)
5 µl anti - PAC1 FITC AK (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland)
5 µl ADP (200 µM)

5 µl anti - CD 42b PE AK (Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland)
5 µl anti - PAC1 FITC AK (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland)
5 µl TRAP (250 µM)

5 µl anti - CD 42b PE AK (Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland)
5 µl anti - CD 40L FITC AK (Calbiochem, Darmstadt, Deutschland)
5 µl PBS

5 µl anti - CD 42b PE AK (Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland)
5 µl anti - CD 40L FITC AK (Calbiochem, Darmstadt, Deutschland)
5 µl ADP (200 µM)

5 µl anti - CD 42b PE AK (Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland)
5 µl anti - CD 40L FITC AK (Calbiochem, Darmstadt, Deutschland)
5 µl TRAP (250 µM)

5 µl anti - CD 42b PE AK (Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland)
5 µl anti - CD 62P FITC AK (Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland)
5 µl PBS

5 µl anti - CD 42b PE AK (Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland)
5 µl anti - CD 62P FITC AK (Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland)
5 µl ADP (200 µM)

5 µl anti - CD 42b PE AK (Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland)
5 µl anti - CD 62P FITC AK (Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland)
5 µl TRAP (250 µM)

Die Blutproben wurden anschließend für 30 Minuten bei Zimmertemperatur unter Lichtausschluss inkubiert. Zur Fixierung der Zellen wurden 300µl einer 0,5% Paraformaldehyd (PFA)- Lösung dazugegeben. Die Messung erfolgte möglichst sofort oder aber mindestens innerhalb der nächsten 24 Stunden. Bis dahin wurden die Proben im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt.

3.4.3.2 Oberflächenfärbung MAC-1 positiver Monozyten und polymorphnukleärer (PMN-) Zellen

Zur Anfärbung der MAC-1 positiven Monozyten und der polymorphnukleären (PMN-) Zellen mit ihren spezifischen fluoreszenz-markierten Antikörpern wurde in einer EDTA-Spritze gewonnenes Vollblut verwendet und nach folgendem Schema in zwei FACS-Röhrchen pipettiert:

1,25 µl anti - CD 45 APC AK (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland)
48,75 µl Vollblut

5 µl anti - CD 11b FITC AK (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland)
5 µl anti - CD 14 PE AK (Dako, Hamburg, Deutschland)
2,5 µl anti - CD 15 PC5 AK (Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland)
1,25 µl anti - CD 45 APC AK (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland)
36,25 µl Vollblut

Die Blutproben wurden gut gemischt und für 30 Minuten unter Lichtausschluss auf Eis inkubiert. Um die Erythrozyten zu lysieren wurden jeweils 500µl FACS Lysing-Solution (Becton Dickinson, San Jose, USA) in einer mit destilliertem Wasser erzeugten Verdünnung von 1:10 zugegeben und die zwei Röhrchen für 10 Minuten bei Zimmertemperatur inkubiert. Anschließend folgte ein Waschschrift mit 2 ml Phosphat Buffered Saline (PBS) Puffer (145 mM NaCl, 10 mM Kaliumphosphat, pH 7,2, Fa. GIBCO, Life Technologies, Leopoldshafen, Deutschland) und eine 5 minütige Zentrifugation bei 1700 Umdrehungen/Minute (U/min). Der entstandene Überstand wurde abgesaugt und verworfen. Das verbliebene Zellpellet wurde in 300 µl einer 1% Paraformaldehyd (PFA)-Lösung resuspendiert und bis zur Durchflusszytometriemessung, für maximal 12 Stunden, im Kühlschrank bei 4°C gelagert.

3.4.4 Cytometric Bead Array (CBA)

Die Cytometric Bead Array (CBA), auch multiplexed bead Assay genannt, ist ein auf Beads basierendes immunologisches Nachweisverfahren zur Bestimmung der Konzentration verschiedener Zytokine im Serum oder Zellüberstand. Sie ist eine neu entwickelte Variante des Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA).

Mit deren Hilfe wurde die Serumkonzentration der inflammatorischen Zytokine IL-12 p70, Tumornekrose Faktor (TNF), IL-8, IL-6 und IL-1β sowie des anti -

Inflammationszytokin IL-10, sowohl für die Bivalirudin- als auch für die Heparin-Gruppe, vor und nach PCI bestimmt.

3.4.4.1 Grundzüge des Cytometric Bead Array (CBA):

Das Cytometric Bead Array (CBA) ist eine Methode zur Bestimmung von löslichen Substanzen, wie z.B. Zytokinen aus Serum oder Zellüberständen.

Dabei werden diese löslichen Substanzen ähnlich einem "Sandwich-ELISA" mittels Antikörperbindung an ein Trägermedium gebunden und mit einem weiteren Nachweisantikörper markiert. Im Unterschied zum ELISA handelt es sich bei dem Trägermedium jedoch um suspendierte Glasperlen (Capture-Beads) und nicht um eine Mikrotiterplatte. Dies hat den Vorteil, dass die anschließende Messung mittels Durchflusszytometer erfolgen kann, der Fluoreszenz- und Streulichtsignale einzelner Zellen analysiert.

Die Glasperlen (Capture-Beads) sind mit Antikörpern beschichtet gegen bis zu sechs verschiedene gelöste Antigene (in diesem Fall Zytokine) mit unterschiedlicher Fluoreszenzintensität. Der neu entstandene Zytokin- Capture Bead- Komplex bindet wiederum einen spezifischen Detektions-Antikörper mit einer anderen Fluoreszenzintensität.

Die Capture-Beads lassen sich alle gleichzeitig messen und bei der Analyse der Daten mittels einer speziellen Software voneinander unterscheiden.

Die Quantifizierung der Zytokine erfolgt, indem eine Standardkurve mit bekannten Zytokinkonzentrationen angelegt und mit der Fluoreszenzintensität der Nachweisantikörper verglichen wird.

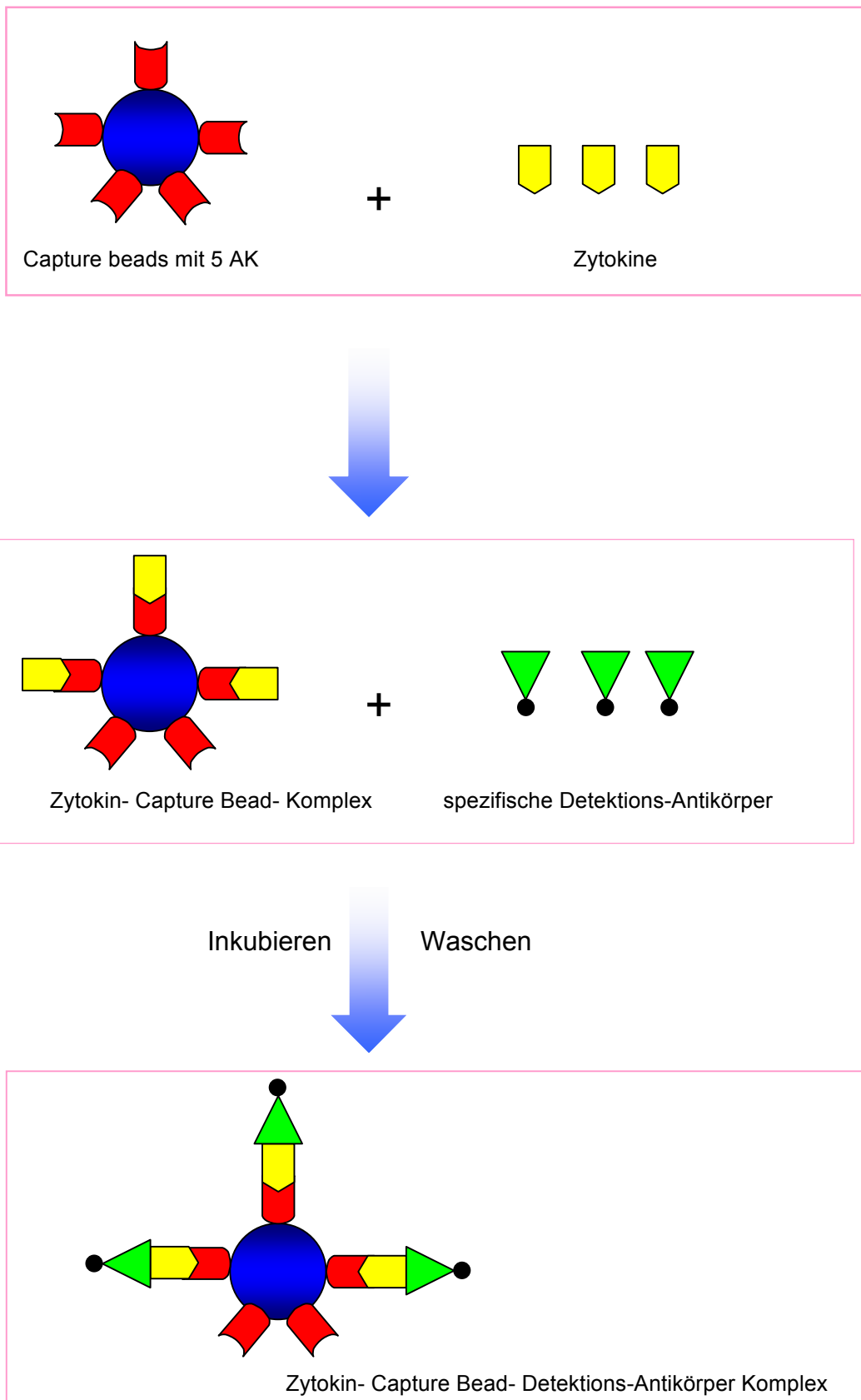


Abbildung 4: Funktionsprinzip des Cytometric Bead Array

3.4.4.2 Testprinzip des CBA

Das Testprinzip beruht auf die "Sandwich Assay"-Technik des ELISA. Im Vergleich zum ELISA können viele verschiedene lösliche Produkte wie z.B. Zytokine gleichzeitig, also "multiplexed" erfasst werden.

Bei dem verwendeten Cytometric Bead Array Inflammation Kit (CBA, BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) wurden sechs verschiedene *bead*-Gruppen unterschiedlicher Fluoreszenzintensität mit, für diese sechs Zytokine, jeweils spezifischen und markierten Antikörpern gekoppelt.

Alle sechs *bead*-Gruppen, PE-konjugierte Antikörper sowie die zu bestimmenden Proben wurden miteinander vermischt, um die Bildung von *Sandwich*-Komplexen zu ermöglichen.

Anschließend konnten die Ergebnisse mit Hilfe des Durchflusszytometers analysiert und bildlich dargestellt werden.

3.4.4.3 Vorteile der CBA im Vergleich zum ELISA

Durch die gleichzeitige Messung verschiedener Zytokine in ein und derselben Reagenz ist die Vergleichbarkeit zwischen den Mengen der unterschiedlichen Zytokine größer.

Zur gleichzeitigen Bestimmung mehrerer Zytokine wird nur ein kleines Probenvolumen benötigt.

Dadurch dass Falcons die Mikroplatten des ELISA ersetzen und die Messung mit Hilfe des Durchflusszytometers erfolgt, kann der Einsatz des Testvolumens flexibler gehandhabt werden. Dies kommt vor allem Proteinen mit geringer in vivo Konzentration zugute.

3.4.5 Messung löslicher Zytokine

Die Messung der Zytokinkonzentrationen IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 (IL-12 p70) und des Tumor necrosis factor (TNF) erfolgte mit dem Cytometric Bead Array Inflammation Kit (CBA, BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) und wurde entsprechend den detaillierten Vorgaben des Herstellers durchgeführt.

Zu Beginn wurde das Cytometer Setup erstellt, indem jeweils 50 μ l Cytometer Setup Beads in die Röhrrchen A, B und C pipettiert wurden. In Röhrrchen B kamen 50 μ l FITC -positiv Kontrolle, in Röhrrchen C PE -positiv Kontrolle hinzu. Nach 30 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte die Zugabe von 450 μ l Waschpulver in

Röhrchen A und je 400 µl in Röhrchen B und C. Anhand dieser Mischungen konnte die Cytometer -Einstellung erfolgen.

Zur Quantifizierung der Zytokine war es zusätzlich erforderlich, eine Verdünnungsreihe der Zytokinstandards zu erstellen. Hierfür wurde lyophilisiertes human Inflammation Standard mit 2,0 ml Assay Diluent rekonstituiert und nach 15 Minuten Inkubation ein Top Standard mit Assay Diluent mit einer Konzentration von 5 ng/ml hergestellt. Anschliessend wurde eine Verdünnungsreihe bis 1:256 sowie eine Negativ- Kontrolle angelegt.

Für die Präparation der Studienproben wurden zuerst 50 µl des Mastermix aus den einzelnen Capture Beads hergestellt. Danach wurden jeweils 50 µl der Proben dazu pipettiert und für 1,5 Stunden im Dunkeln inkubiert. Nach Zugabe von je 50 µl PE-Detektionsreagenz erfolgte eine erneute Inkubation für 1,5 Stunden im Dunkeln.

Zuletzt wurden die Proben mit 1 ml Waschpulver gewaschen und zentrifugiert.

Für die anschließende Messung am Durchflusszytometer wurde das Bead Pellet in 300 µl Waschpulver resuspendiert. Die untere Nachweisgrenze lag zwischen 10 und 20 pg/ml.

3.4.6 Bestimmung des CRP

Die Bestimmung der Serumkonzentration des C-reaktiven Proteins (CRP) erfolgte im Routinelabor der klinischen Chemie der Institution.

3.5 Statistik und Datenverarbeitung

Um mit einer Power von 90% und einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 0,05 einen Unterschied in der ADP-induzierten Thrombozytenaggregation von 10% nachzuweisen, sind mindestens 23 Patienten pro Gruppe erforderlich (nQuery Advisor, Version 5.0).

Die Datenanalyse durch den "Kolmogorov-Smirnov-Test" zeigte, dass die Ergebnisse der Untersuchungen nicht der Gauß` schen Normalverteilung entsprachen.

Unterschiede zwischen den zwei Gruppen wurden mittels dem "Mann-Whitney-Wilcoxon Rangsummen-Test" analysiert. Dabei handelt es sich um einen Test für unabhängige Stichproben. Dieser kann auch bei kleinen Stichproben ohne Normalverteilung angewandt werden. Der Test untersucht, ob zwei Stichproben aus der gleichen Grundgesamtheit stammen. Hierfür werden die Messwerte beider Stichproben zusammengefasst, der Grösse nach geordnet und Rangzahlen verteilt.

Danach erfolgt mit den Rangzahlen der Werte die Bestimmung der Rangsumme. Daraus wird anschliessend eine entsprechende Prüfgrösse ermittelt.

Unterschiede zwischen mehr als zwei Proben aus derselben Gruppe wurden zuerst mit dem "Friedmann-Test", gefolgt vom "Wilcoxon`s Paarvergleichs- Rang Test" analysiert.

Ein p- Wert kleiner als 0,05 ($P < 0,05$) im zweiseitigen Test wurde als signifikant betrachtet.

Die Ergebnisse wurden als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben.

4 Ergebnisse

4.1 Charakteristika der Studienpopulation

In der Studie wurden insgesamt 46 Patienten, 17 Frauen und 29 Männer, im Alter von 44 bis 89 Jahren mit stabiler, belastungsabhängiger Angina pectoris CCS Klasse II aufgenommen.

Alle Patienten wiesen in der Angiographie Stenosierungen der Herzkranzgefäße auf.

21 Patienten, davon 9 Frauen und 12 Männer wurden der Heparin - Gruppe und 25 Patienten, 8 Frauen und 17 Männer, der Bivalirudin - Gruppe zugeordnet.

Es wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen in Bezug auf Alter, Geschlecht, Risikofaktoren, linksventrikulärer Ejektionsfraktion und Anzahl der betroffenen Herzkranzgefäße gefunden.

Die klinischen Daten beider Gruppen sind in der Tabelle Patientencharakteristika zusammengefasst.

4.2 Angiographische Daten

Die Anzahl der Interventionen der Koronararterien war gleich verteilt, bis auf den Ramus circumflexus der linken Koronararterie (Lcx), der in der Heparin-Gruppe öfters betroffen war.

Sowohl die Zeit zwischen Verabreichung der Ladedosis und dem Beginn der Intervention, als auch die Dauer der Intervention zeigte in beiden Gruppen keinen signifikanten Unterschied. So erhielt die Heparin-Gruppe 600 mg Clopidogrel Ladedosis 14.3 ± 1.9 Stunden vor der Intervention und die Bivalirudin -Gruppe erhielt sie 12.6 ± 1.6 Stunden davor ($p=0.2$).

Die Dauer der Intervention wurde definiert als Zeitpunkt ab der Verabreichung des Heparin- bzw. Bivalirudin-Bolus bis zum Infusionsende. Die mittlere Interventionsdauer betrug in der Heparin-Gruppe 33 ± 4.7 Minuten und in der Bivalirudin - Gruppe 27.3 ± 3.3 Minuten ($p=0.2$).

Die angiographischen Daten werden in Tabelle Patientencharakteristika gezeigt.

Tabelle 5: Patientencharakteristika Demographische und angiographische Daten der Studienteilnehmer. *HS*= Hauptstamm; *LAD*= left anterior descending coronary artery; *LCx*= left circumflex coronary artery; *RCA*= right coronary artery

	Heparin	Bivalirudin	P
	(n=21)	(n=25)	
Geschlecht (W/M)	9/12	8/17	0.45
Alter (J), Mittelwert (Streuung)	66.0 (44-85)	68.0 (49-89)	0.73
Risikofaktoren			
Aktive Raucher, n (%)	9 (43)	11 (44)	0.94
Hypercholesterinämie, n (%)	16 (76)	23 (92)	0.22
Arterielle Hypertonie, n (%)	18 (86)	25 (100)	0.09
Diabetes mellitus, n (%)	7 (33)	7 (28)	0.70
Familiäre Vorbelastung, n (%)	7(33)	15 (60)	0.07
Anzahl betroffener Gefäße			
1- Gefässerkrankung	3 (14)	6 (24)	0.48
2- Gefässerkrankung	4 (19)	4 (16)	1.00
3- Gefässerkrankung	14 (67)	15 (60)	0.64
Betroffenes Gefäß			
HS	7	2	0.06
LAD	9	13	0.54
LCx	11	5	0.02
RCA	7	8	0.92
Linker Ventrikel			
Ejektionsfraktion (%),Mittelwert (Streuung)	52.6 (19-65)	56.0 (40-66)	0.38
Loading time (h), Mittelwert ± SEM	14.3 ± 1.9	12.6 ± 1.6	0.2
Dauer der Intervention (Min.), Mittel ± SEM	33 ± 4.7	27.3 ± 3.3	0.2

4.3 Ergebnisse zur ADP- und TRAP-induzierten Thrombozytenaggregation

Um der Frage nachzugehen, ob es Unterschiede in der Thrombozytenaktivität nach erfolgter Therapie mit Bivalirudin bzw. unfraktioniertem Heparin gibt, wurde sowohl die ADP- als auch die TRAP- induzierte Thrombozytenaggregation beider Gruppen mit Hilfe der Aggregometrie bestimmt. Zu Beginn des Versuchs betrug die Lichtdurchlässigkeit in Abwesenheit der Aktivatoren ADP und TRAP noch 0%. Diese wurde allerdings nach deren Zugabe und somit nach Beginn der Aktivierung der Thrombozytenaggregation sukzessiv erhöht.

In der Bivalirudingruppe konnte nach perkutaner Koronarintervention eine signifikant reduzierte ADP-induzierte Thrombozytenaggregation festgestellt werden.

Im Gegensatz dazu blieb die Thrombozytenaggregation in der HeparinGruppe unverändert.

Die TRAP-induzierte Thrombozytenaggregation nach PCI wurde in beiden Gruppen reduziert, wobei dieser Effekt in der Bivalirudingruppe nur als Tendenz erfasst werden konnte.

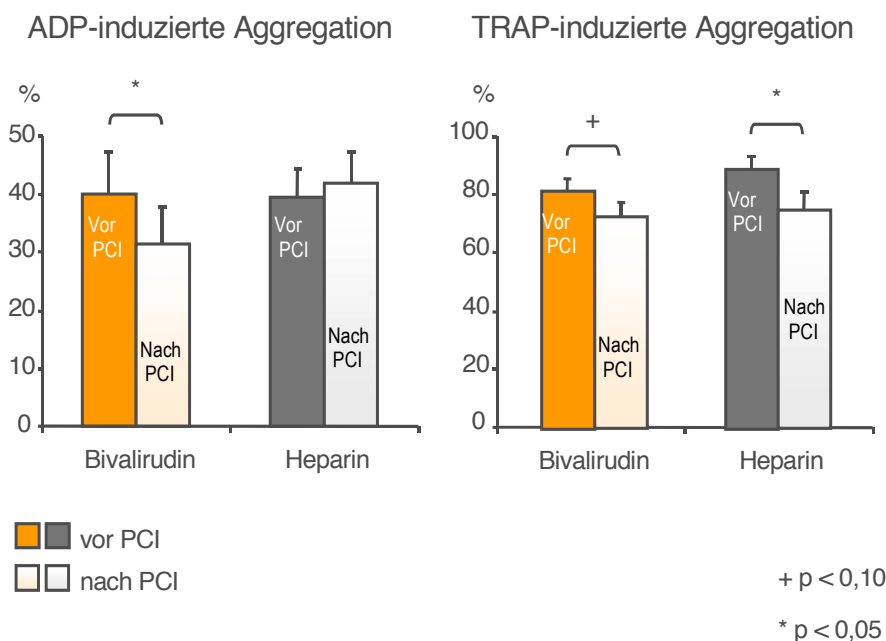


Abbildung 5: ADP- und TRAP-induzierte Thrombozytenaggregation

4.4 Ergebnisse zu Oberflächenmarkern der Thrombozytenaktivierung

Zur Bestimmung der Expression verschiedener Oberflächenmarker, die eine Thrombozytenaktivierung widerspiegeln (PAC-1, P-Selektin und GPIIb α), fanden im experimentellen Teil der Arbeit durchflusszytometrische Analysen statt. Nach Zusammenfassung der erhaltenen Messwerte beider Gruppen erfolgte die weitergehende Auswertung. Zur Verdeutlichung der unterschiedlichen Befunde zwischen beiden Gruppen wurden graphische Darstellungen in Form von Balkendiagrammen angewandt.

Die Erfassung der Thrombozytenaktivierung erfolgte über die durchflusszytometrische Bestimmung der Oberflächenproteine PAC-1 und P-Selektin. Beide Oberflächenmarker zeigten nach ADP-induzierter Thrombozytenaggregation eine signifikant geringere Expression nach PCI und der gleichzeitigen Gabe von Bivalirudin. Wohingegen die Administration von Heparin keine Veränderung dieser Oberflächenmarker bewirken konnte.

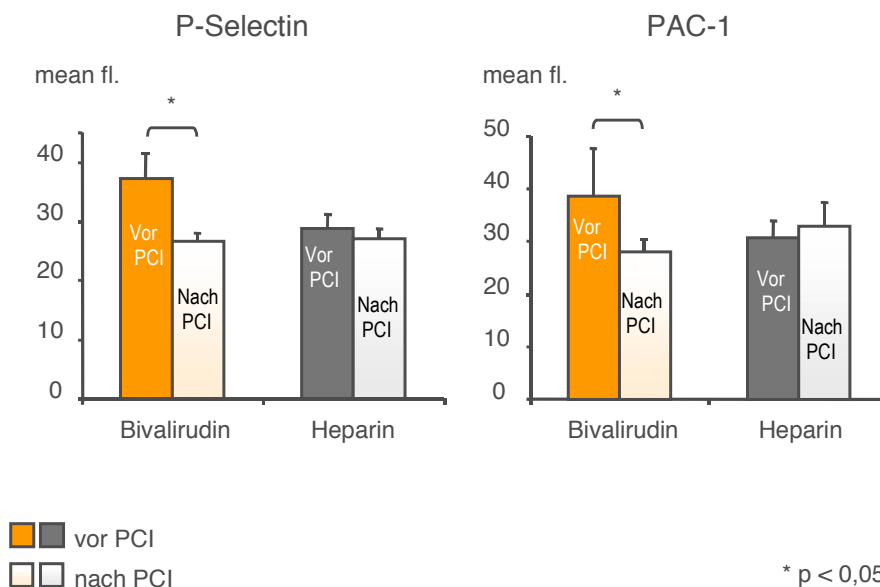


Abbildung 6: Expression von P-Selectin und PAC-1

Auch die Oberflächenproteine GPIIb α (CD 42 b) und CD40L (TRAP) wurden auf die gleiche Art und Weise wie PAC-1 und P-Selektin durchflusszytometrisch gemessen.

Die Oberflächenexpression von GPIIb/IIIa zeigte zwar einen kleinen, aber dennoch signifikanten Abfall nach PCI in der Bivalirudingruppe im Gegensatz zur Heparin-Gruppe.

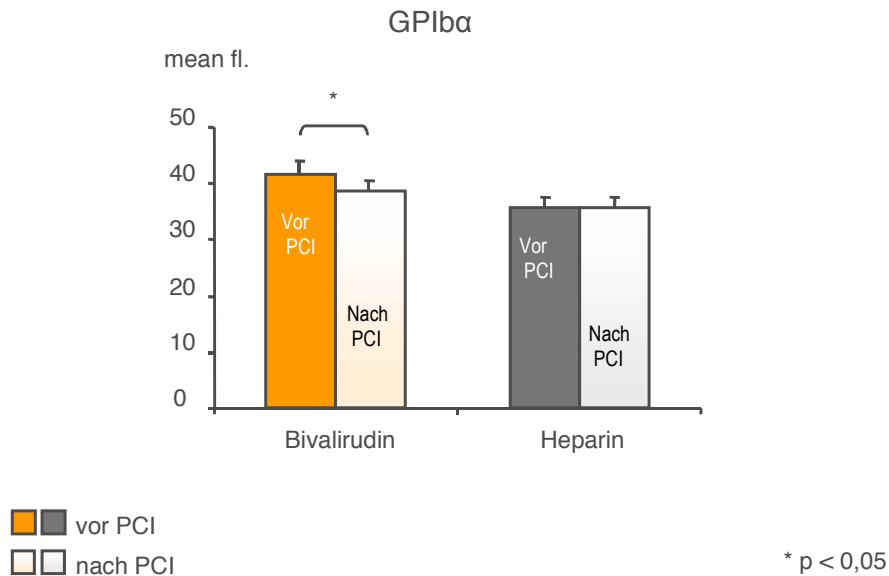


Abbildung 7: Expression von GPIIb/IIIa

Eine Veränderung der Oberflächenexpression von CD40L auf Thrombozyten konnte nicht festgestellt werden.

4.5 MAC-1 (CD11b) positive Monozyten und polymorphnukleäre (PMN-) Zellen

Die Bestimmung der MAC-1 (CD11b) positiven Monozyten und der polymorphnukleären (PMN-) Zellen fand anhand von Messungen am Durchflusszytometer statt. Nach dem Anfärben der Zellen mit spezifischen fluoreszenzmarkierten Antikörpern und deren Gating erfolgte deren durchflusszytometrische Erfassung.

Durch die Zugabe von Bivalirudin kam es zu einer signifikanten Abnahme der MAC-1-Monozyten nach der perkutan koronaren Intervention, wohingegen die Gabe von Heparin keine signifikante Veränderung bewirkte.

Die MAC-1 –positiven polymorphnukleären Zellen wurden weder durch Bivalirudin noch durch Heparin in signifikanter Weise beeinflusst.

Ergebnisse

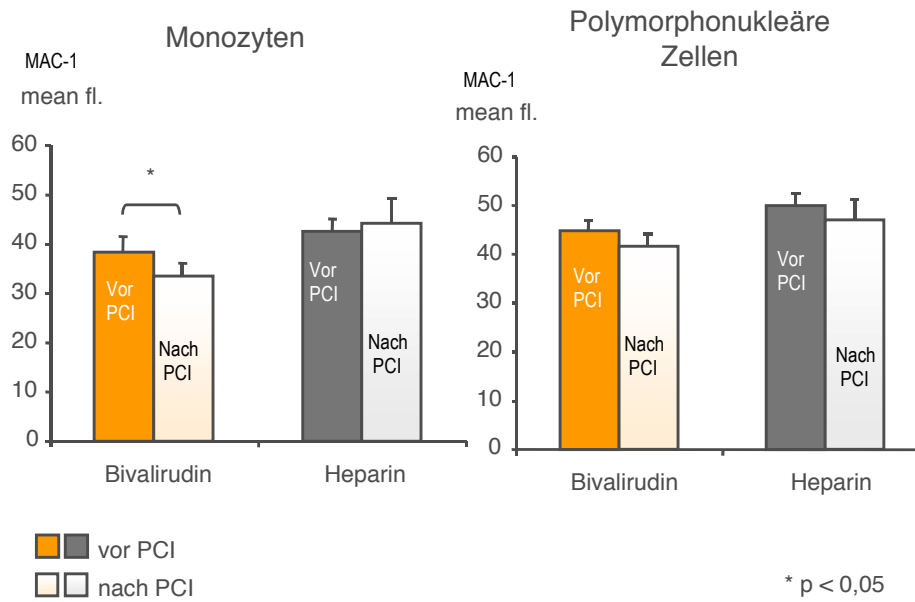


Abbildung 8: Einfluss von Bivalirudin bzw. Heparin auf die CD11b Monozyten und polymorphnukleäre Zellen.

4.6 Ergebnisse der Zytokinbestimmung

Die Serumkonzentration der inflammatorischen Zytokine IL-12 p70, Tumornekrose Faktor (TNF), IL-8, IL-6 und IL-1 β sowie des anti - Inflammationszytokin IL-10 wurde nach der oben beschriebenen Methode des Cytometric Bead Array bestimmt.

Es konnte kein signifikanter Unterschied der Zytokinkonzentration zwischen der Gruppe mit Bivalirudin und Heparin, weder vor noch nach der perkutanen Koronarintervention, festgestellt werden.

Die Tabelle Zytokine zeigt die Zytokinkonzentration in pg/ml als Mittelwert und Standardfehler des Mittelwertes (SEM).

Tabelle 6: Zytokine (pg/ml), Mittelwert \pm SEM

	Heparin		Bivalirudin	
	vor Intervention	nach Intervention	vor Intervention	nach Intervention
IL-12p70	6.9 \pm 1.5	9.5 \pm 1.3	8.9 \pm 2.3	10.0 \pm 2.8
TNF	5.1 \pm 1.2	6.8 \pm 0.9	6.0 \pm 1.2	7.1 \pm 1.5
IL-10	5.7 \pm 1.5	7.1 \pm 1.9	3.9 \pm 0.7	5.2 \pm 0.8
IL-6	3.6 \pm 0.5	4.3 \pm 0.6	4.1 \pm 0.6	4.5 \pm 0.6
IL-1 β	4.4 \pm 0.9	6.4 \pm 0.6	6.3 \pm 0.9	6.9 \pm 1.1
IL-8	11.3 \pm 1.3	11.4 \pm 1.0	15.3 \pm 1.5	17.0 \pm 2.1

5. Diskussion

Die vorliegende Arbeit wurde mit dem Ziel durchgeführt, im Rahmen einer klinischen Studie unterschiedliche Einflüsse von Heparin und Bivalirudin auf die Plättchenaktivierung und auf mögliche Marker einer Entzündungsreaktion im Rahmen einer elektiven perkutanen koronaren Intervention zu untersuchen.

5.1 Überlegungen zum Studiendesign

Dies konnte aus ethischen Gründen nur in Kombination, nach vorheriger Gabe von Acetylsalicylsäure und Clopidogrel geschehen, da eine duale Hemmung der Plättchenaggregation mittlerweile zum Standard der Thromboseprophylaxe im Rahmen einer solchen Intervention gehört und die akute Stentthrombose reduziert (Smith et al., 2005). Die Blutentnahmen erfolgten zu drei Zeitpunkten, einmal vor Beginn der Intervention, der konstitutionellen Gabe von einem weiteren Bolus (500mg) Acetylsalicylsäure, sowie der alternativen Gabe von, entweder Bivalirudin oder unfraktioniertem Heparin. Eine zweite Blutentnahme erfolgte unmittelbar nach der Intervention, eine dritte nach 24 Stunden. Bivalirudin wurde in derselben Konzentration wie in der REPLACE II Studie zur vergleichenden Wirksamkeit mit Heparin eingesetzt (Lincoff et al., 2004). Heparin wurde mit einem Bolus von 140 U/kg Körpergewicht mehr als doppelt so hoch dosiert wie in REPLACE II (65 U/kg), so dass ein fehlender Nachweis von Heparineffekten nicht auf eine Unterdosierung zurück zu führen ist.

Bezüglich der Geschlechts- und Altersverteilung, des kardiovaskulären Risikoprofils, der linksventrikulären Auswurffraktion, und der Häufigkeit der betroffenen Gefäße gab es keine signifikanten Unterschiede in der Heparin- und in der Bivalirudingruppe. Allerdings zeigte sich in der Bivalirudingruppe ein Trend für eine familiäre Häufung der KHK (60% vs. 33% $P=0.07$) und einer systemischen Hypertonie (100% vs. 86 % $P=0.09$). Dennoch ist es unwahrscheinlich, dass diese Faktoren für die beobachteten Zusammenhänge ursächlich wären.

Ebenso gab es zwischen den Gruppen keine signifikanten Unterschiede in der Zeitspanne zwischen Verabreichung von Clopidogrel und erster Blutentnahme vor Beginn der Intervention. Dies ist insofern wichtig, da die Response der

Thrombozyten auf die Einnahme von Clopidogrel möglicherweise vom Abstand zur Einnahmezeit abhängt (Gurbel et Tantry, 2006).

Es gab keine signifikanten Unterschiede in der Dauer der Gesamtintervention in der Heparin- und der Bivalirudingruppe.

Ein signifikanter Unterschied zeigte sich lediglich darin, dass in der HeparinGruppe mehr Interventionen in der linken Arteria cricumflexa stattfanden.

5.2 Thrombozytenaktivierung

5.2.1 Beeinflussung der Thrombozytenaktivierung durch Heparin

In der vorliegenden Untersuchung zeigte sich in der Aggregometrie eine Abnahme der, durch das Thrombin Receptor Activating Peptide (TRAP), induzierten Plättchenaggregation in der HeparinGruppe. TRAP entsteht physiologisch als Spaltprodukt des Thrombinrezeptors (Gawaz, Das Blutplättchen, S.20)

TRAP aktiviert den Thrombozyten über den Protease-aktivierten Rezeptor PAR 1 und PAR 4 (Xiao et Theroux, 2004) und kann so die Plättchenaggregation begünstigen.

In unserem Fall würde also Heparin in Kombination mit Acetylsalicylsäure und Clopidogrel eine hemmende Wirkung auf die Plättchenaggregation entfalten.

Eine mögliche Erklärung hierfür wurde von De Candia et al. (1999) vorgeschlagen. Sie vermuteten, dass die Bindung von Thrombin an das Glykoprotein Ib über seine so genannte heparinbindende Exosite zu Stande kommt und, dass diese Bindung durch Heparin gehemmt werden kann. Für die Induktion eines prokoagulant (aktivierten) Zustand der Thrombozyten ist jedoch, neben der Bindung von Thrombin an die Rezeptoren PAR 1 und 4 (Coughlin, 1999), auch die Bindung an GP Ib erforderlich (Dörmann et al., 2000).

Möglich ist auch, dass durch die Hemmung der Thrombinbildung durch UFH in vivo eine Voraktivierung der Thrombozyten durch Thrombin unterdrückt wurde, was sich dann in einer reduzierten TRAP abhängigen Aggregation in vitro äußerte.

Diverse Studien legen, im Gegensatz zu unseren Ergebnissen, eine Verstärkung der Plättchenaktivierung durch diverse Aktivatoren wie TRAP oder ADP durch unfraktioniertes Heparin nahe (Salzman et al., 1980; Xiao et Theroux, 1998). Xiao et Theroux fanden unter UFH eine erhöhte Plättchenaggregation, P-Selektin Expression und Aktivierung des Integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ (GP IIb/IIIa) nach Aktivierung mit TRAP und ADP. Aus einer Zusammenschau mehrerer Untersuchungen, die

entweder eine Potenzierung oder eine Reduktion der Plättchenaktivierung durch Heparin beschrieben, folgerten sie, dass eine Potenzierung der Plättchenaktivierung eher bei Einsatz niedrigerer Konzentrationen von ADP (0.32 $\mu\text{mol/l}$) oder TRAP (0.625 $\mu\text{mol/l}$) gemessen werden kann. Bei höheren Konzentrationen der zugesetzten Aktivatoren (3-5 $\mu\text{mol/l}$ für ADP/ 2.5 -10 $\mu\text{mol/l}$ für TRAP) sei der Effekt weniger gut nachzuweisen, da er neben der, dann ohnehin starken Plättchenaktivierung kaum noch eine Rolle spiele. In der vorliegenden Untersuchung wurde ADP in einer 5 μM Konzentration und TRAP in einer 25 μM Konzentration eingesetzt, was eine mögliche Ursache dafür sein könnte, dass kein proaggregatorischer Effekt von Heparin nachzuweisen war.

Dies würde jedoch nicht erklären, dass es durch UFH sogar zu einer Abnahme der TRAP induzierten Thrombozytenaggregation kam. Eine mögliche Erklärung findet sich in der Co-medikation mit Clopidogrel. Storey et al. (2005) fanden, dass Heparin sowohl die durch TRAP, als auch durch ADP ausgelöste Plättchenaggregation potenziert. Im Falle der durch ADP ausgelösten Plättchenaggregation konnte dieser Effekt durch eine kombinierte Blockade eines P2Y1-Antagonisten und eines P2Y12-Antagonisten wieder abgeschwächt werden. Im Falle der durch TRAP ausgelösten Plättchenaggregation konnte der potenzierende Effekt durch die Gabe von Cangrelor (P2Y12 Antagonist) komplett aufgehoben werden.

Clopidogrel ist ebenfalls ein P2Y12-Antagonist, der möglicherweise einen proaggregatorischen Effekt von UFH auf die TRAP abhängige Thrombozytenaktivierung aufhob.

Die Abnahme der TRAP induzierten Plättchenaggregation ließe sich dann, wie bereits oben erwähnt, durch eine Hemmung der Thrombin induzierten Plättchenaktivierung durch Heparin in vivo erklären.

Unklar bleibt jedoch weshalb dieser Effekt nicht für die ADP abhängige Plättchenaktivierung nachweisbar war. Zum einen könnte es aufgrund der Daten von Storey et al. (2005) sein, dass die Potenzierung der ADP abhängigen Plättchenaktivierung durch Heparin weniger effektiv antagonisiert wird, als die Potenzierung der TRAP abhängigen Aktivierung. Zum anderen könnte die ADP abhängige Plättchenaktivierung bereits vor der Zugabe von Heparin durch den ADP Antagonisten (P2Y12) Clopidogrel so weit vermindert gewesen sein, dass Heparin hier keinen zusätzlichen Effekt mehr entfalten konnte. Dies könnte auch die Erklärung dafür sein, dass wir sowohl in der Heparin- als auch in der

Bivalirudingruppe keine signifikante Zunahme der Oberflächenexpression von CD 40 L nachweisen konnten. CD 40 L ist ein Transmembranprotein, das zur Tumornekrose Faktor (TNF) Familie gehört (van Kooten et Banchereau, 2000), welches ähnlich wie P-Selektin nach Thrombozytenaktivierung an der Zelloberfläche nachweisbar ist (Henn et al., 1998). Die Bindung von CD 40 L, an zum Beispiel von Endothelzellen exprimiertes CD 40, kann Entzündungsprozesse triggern (Henn et al., 1999) und führt dazu, dass CD 40 L von der Thrombozytenoberfläche als lösliche Form (sCD 40 L) ins Plasma gelangt (Henn et al., 2001). Es könnte also möglich sein, dass wir im Rahmen unserer Untersuchung den optimalen Nachweiszeitpunkt für einen Anstieg des oberflächengebundenen CD 40 L nicht getroffen haben. Da die lösliche Form des CD 40 L nicht bestimmt wurde, können wir hierzu keine Aussage machen.

5.2.2 Beeinflussung der Thrombozytenaktivierung durch Bivalirudin

Für Bivalirudin, einen bivalenten direkten Thrombininhibitor, fanden wir in Kombination mit der Prämedikation mit Acetylsalicylsäure und Clopidogrel sowohl eine zusätzliche Abnahme der TRAP induzierten Thrombozytenaggregation (statistisch als Trend) als auch eine signifikante Abnahme der ADP induzierten Thrombozytenaggregation. Konsistent dazu zeigte sich eine Abnahme weiterer Aktivierungsmarker wie der Oberflächenexpression von aktiviertem $\alpha 2\beta 3$ Integrin (nachgewiesen durch den PAC-1 Antikörper) und P-Selektin (nachgewiesen durch den anti-CD 62 p Antikörper). In der HeparinGruppe konnte eine solche Abnahme weiterer Aktivierungsmarker nicht nachgewiesen werden.

Nicht ganz ins Bild passt die beobachtete Abnahme der Expression von GP Iba in der Bivalirudingruppe, die in der HeparinGruppe nicht nachweisbar war. GP Iba wird durch Thrombinaktivierung der Plättchen internalisiert (Michelson, 1996), so dass die Abnahme der Oberflächenexpression von GP Iba bislang als Ausdruck einer gesteigerten Aktivierung der Plättchen durch Thrombin in vivo gewertet wurde (Gawaz et al., 1999). Daher wäre durch den Einsatz des Thrombininhibitors Bivalirudin keine Abnahme der Oberflächenexpression von GP Iba zu erwarten gewesen.

Es muss jedoch berücksichtigt werden, dass zwischen den Messpunkten (Expression GP Iba vor der PCI und nach der PCI) eine gewisse Zeit verstreicht so, dass es möglicherweise zu einer fortschreitenden thrombinabhängigen

Plättchenaktivierung kommt, die ohne den Zusatz von Bivalirudin noch ausgeprägter gewesen wäre. Dieses Erklärungsmodell würde allerdings implizieren, dass Heparin in der Hemmung der thrombinabhängigen Plättchenaktivierung effektiver war als Bivalirudin. Da in der vorliegenden Studie keine Kontrollgruppe ohne Heparin oder Bivalirudin vorgesehen war, können wir diese Vermutung jedoch nicht belegen.

Eine andere sehr interessante Möglichkeit wäre, dass Bivalirudin über einen anderen, bislang unbekanntem Mechanismus die Oberflächenexpression von GP Iba herabsetzt. GP Iba spielt über Bindung an den von Willebrand Faktor eine entscheidende Rolle bei der primären Adhäsion von Thrombozyten in kleinlumigen Gefäßen, in denen hohe Scherkräfte herrschen (Jura et Kehlen, 2008). Zudem ist für die Induktion eines prokoagulanten Zustandes im Thrombozyten neben der Bindung an PAR 1 und 4 auch noch eine Bindung an GP Iba notwendig (Coughlin, 1999).

Sollte nun also Bivalirudin tatsächlich, auf einem alternativem Weg die Oberflächenexpression von GP Iba verringern, könnte dies neben der direkten Thrombininaktivierung einen zusätzlichen, bislang unerkannten therapeutischen Effekt durch Hemmung der Thrombozytenaggregation in Gefäßen mit hohen Scherkräften und durch eine Verminderung der thrombinabhängigen Plättchenaktivierung haben.

5.2.3 Vergleich mit bisherigen Untersuchungen

Es gibt einige Studien, die in ähnlichen Settings den Einfluss von UFH und direkten Thrombininhibitoren auf die Thrombozytenaktivierung untersucht haben. Die Ergebnisse sind mit den unseren im Wesentlichen kongruent. Xiao et Theroux (1998) zeigten für UFH an Patienten mit nicht stabiler Angina Pectoris eine gesteigerte Oberflächenexpression von α IIb3-Integrin in vivo. Ein DTI (Argatroban) wurde hier nur in vitro eingesetzt und verursachte keine gesteigerte TRAP aktivierte Aggregation. Die ADP aktivierte Aggregation wurde sogar leicht (nicht signifikant) vermindert. Aggarwal et al. (2002) untersuchten die Fibrinogenbindungskapazität als ein Marker der Plättchenaktivierung und die P-Selektin-Expression nach Zusatz von unfraktioniertem Heparin, niedermolekularem Heparin sowie von Bivalirudin zu Blutproben von Patienten mit koronarer Herzerkrankung in vitro. Sie zeigten, dass sowohl die Fibrinogenbindungskapazität als auch die P-Selektin-Expression, in mit UFH behandeltem Blut, signifikant höher war, als in mit Bivalirudin behandeltem Blut.

In Kombination mit dem α IIb β 3 (Glykoprotein-IIb/IIIa) Antagonisten Tirofiban zeigte sich, neben der zu erwartenden Reduktion der Fibrinogenbindungskapazität (Wirkungsmechanismus von Tirofiban), eine verminderte P-Selektin-Expression in der Bivalirudingruppe im Vergleich zu der UFH Gruppe.

Keating et al (2005) untersuchten 60 Patienten, von denen der Großteil eine elektive PCI aufgrund einer stabilen KHK erhielt. Alle Patienten waren mit Aspirin vorbehandelt, fünfzig Prozent zusätzlich mit Clopidogrel. Es wurde dann zwischen Bivalirudin und UFH + Eptifibatide (α IIb β 3 (Glykoprotein-IIb/IIIa-Antagonist) randomisiert. Es zeigte sich, dass die P-Selektin-Expression in der UFH +Eptifibatide Gruppe signifikant höher war als in der Bivalirudingruppe. Dieser Effekt trat jedoch nicht mehr auf, als nur die Patienten mit Clopidogrel als Begleitmedikation verglichen wurden.

Eine weitere Studie nahm die, durch P- Selektin vermittelte Bildung von Aggregaten aus Thrombozyten und Monozyten als Indikator für eine Thrombozytenaktivierung. Sie verglichen konstitutionell mit Aspirin vorbehandelte Patienten, die während einer PCI entweder Bivalirudin oder UFH erhielten (Harding et al., 2006). Sie fanden, dass die Heparinmedikation im Gegensatz zur Bivalirudinmedikation die Häufigkeit von Plättchen-Monozyten-Aggregaten erhöhte. Als möglichen Wirkmechanismus schlugen sie eine Bindung von Heparin an das α IIb β 3-Integrin (Glykoprotein-IIb/IIIa) und eine daraus resultierende Plättchenaktivierung vor. Auf die Implikationen dieser Untersuchung für Entzündungsvorgänge wird an anderer Stelle eingegangen.

Anand et al. (2007) untersuchten 50 Patienten mit PCI. 35 erhielten Bivalirudin in derselben Dosierung wie in unserer Studie, von diesen 35 erhielten wiederum 15 Patienten 300 mg Clopidogrel als Vormedikation. 15 Patienten erhielten UFH (40-50 U/kg). Alle Patienten waren mit Acetylsalicylsäure vorbehandelt. Zusätzlich war der Einsatz von α IIb β 3 (Glykoprotein-IIb/IIIa) Antagonisten in der Bivalirudingruppe erlaubt. Keiner der mit Clopidogrel vorbehandelten Patienten erhielt jedoch einen α IIb β 3 - (Glykoprotein-IIb/IIIa) Antagonisten. In der HeparinGruppe erhielten alle eine solche Medikation. Als Marker der Plättchenfunktion in vivo wurden die Adhäsion und Aggregation der Thrombozyten an Polystyren-Platten ("Platelet surface coverage" nachfolgend PSC) unter Scherkräften von 1.875 s^{-1} erfasst. Bivalirudin ohne Clopidogrel reduzierte die PSC um durchschnittlich 29 %, dagegen erhöhte UFH in Kombination mit α IIb β 3 - (Glykoprotein-IIb/IIIa) Antagonisten die PSC um durchschnittlich 29%. In Kombination mit Clopidogrel, das alleine die PSC um

durchschnittlich 23% absenkte, gelang es die PSC um durchschnittlich 40% abzusenkten. Zusätzlich inkubierten sie das Blut gesunder Kontrollprobanden entweder mit Heparin oder mit Bivalirudin. In der nachfolgenden elektronenmikroskopischen Untersuchung zeigte sich keine Änderung der diskoiden Form der Thrombozyten in der Bivalirudingruppe. Im Gegensatz dazu verloren die, mit Heparin inkubierten Thrombozyten, ihre diskoide Form und bildeten Pseudopodien aus.

Eine Studie die ebenfalls in unserer Institution, jedoch an anderen Patienten durchgeführt wurde (Sibbing et al., 2008) schloss 100 Patienten ein, die eine elektive PCI erhielten. Wie in der vorliegenden Studie erhielten alle Patienten 600 mg Clopidogrel vor der Intervention, danach wurde entweder UFH oder Bivalirudin in derselben Dosierung, wie in der vorliegenden Studie, verwendet. Die Bestimmung der ADP - abhängigen Plättchenaggregation erfolgte sowohl mit Hilfe der Licht-Transmissions-Aggregometrie als auch der Aggregometrie mit multiplen Elektroden. Ebenso wie in der vorliegenden Untersuchung zeigte sich eine zusätzliche Hemmung der ADP induzierten Plättchenaggregation. Die ADP induzierte Plättchenaggregation blieb durch Heparin unbeeinflusst.

5.2.4 Zusammenfassung

Zusammen mit den zuvor genannten Ergebnissen lassen unsere Ergebnisse folgende zwei Hauptaussagen zur Plättchenaktivierung zu.

Erstens konnte der postulierte potenzierende Effekt von unfraktioniertem Heparin auf die Plättchenaggregation in unserer Studie nicht nachgewiesen werden. Neben einer möglichen Auswirkung der Methodik durch den Einsatz hoher Dosen von ADP und TRAP zur Aktivierung (Xiao et Theroux, 1998) kommt als Erklärung hierfür, eine Aufhebung der proaggregatorischen Wirkung von UFH durch die Begleitmedikation mit Clopidogrel in Frage. Dafür sprechen die Daten von Keating et al. (2005) und Sibbing et al. (2008), die bei den Patienten, die sowohl mit Clopidogrel als auch mit UFH behandelt waren, einen proaggregatorischen Effekt von UFH nicht nachweisen konnten, sowie die Daten von Storey et al. (2005), die eine deutliche Abschwächung der Heparin induzierten Potenzierung der TRAP- und ADP- abhängigen Plättchenaggregation durch Cangrelor, welches wie Clopidogrel über eine P2Y12 Blockade wirkt, nachweisen konnten.

Klinisch ist dies dahingehend von Bedeutung, als dass unsere Ergebnisse theoretisch dafür sprechen UFH im Rahmen einer PCI nicht ohne Kombination mit einem höher dosierten P2Y₁₂ Antagonisten einzusetzen.

Die zweite wichtige Aussage ist, dass Bivalirudin eine zu Clopidogrel additive hemmende Wirkung auf die Plättchenaktivierung hat, die sich in unserer Studie durch Abnahme der ADP abhängigen Aggregation in der Aggregometrie, und durch die Abnahme der P-Selektin-Expression und der Expression von aktiviertem α IIb β 3 (Glykoprotein-IIb/IIIa) zeigt. Dies wird sowohl durch die Ergebnisse von Sibbing et al. (2008) als auch von Anand et al. (2007) untermauert.

Wie der zusätzliche hemmende Einfluss auf die Plättchenaktivierung zu Stande kommt, ist noch nicht geklärt. Anand et al. (2007) schlugen vor, dass die durch Thrombin ausgelöste Freisetzung von vWF aus dem Endothel (Storck et al., 1995) durch Bivalirudin inhibiert wird. So würde weniger vWF für eine Plättchenadhäsion durch vWF- GP Iba Interaktion zur Verfügung stehen. Als weiteren möglichen Mechanismus sahen sie, dass eine direkte Aktivierung von Thrombin auf die Plättchen durch PAR 1 und PAR 4 durch Bivalirudin antagonisiert wird und so die Plättchenaktivierung herabgesetzt wird.

Sibbing et al. (2008) vermuteten ebenfalls, dass die thrombinabhängige Stimulation von PAR 1 und PAR 4 durch Bivalirudin herabgesetzt sein könnte. Somit käme es zu einer verminderten PAR abhängigen ADP-Sekretion aus den dichten Granula der Thrombozyten und damit über eine verminderte autokrine Aktivierung zu einer Abnahme der ADP abhängigen Plättchenaktivierung.

Klinisch könnte sich ein zusätzlicher Effekt von Bivalirudin auf die Thrombozytenaktivierung günstig auf das Risiko einer koronaren Thrombose im Rahmen einer PCI auswirken.

5.3 CRP, Interleukine und Leukozytenaktivierung

5.3.1 Pathophysiologische Zusammenhänge

Neben einer akuten Thrombosierung, zum Beispiel im Rahmen einer durch die PCI ausgelösten Plaqueruptur, oder einer Blutung sind durch die Intervention induzierte Entzündungsvorgänge einer der Hauptfaktoren, die den klinischen Erfolg einer PCI beeinträchtigen, da sie zu Restenosierungen führen können (Toutouzas et al., 2004). Während der "Elastic recoil" einen entscheidenden Anteil bei der Restenosierung nach Ballonangioplastie hat, wird bei der Stent Restenosierung die intimale

Hyperplasie, im Rahmen der Neubildung einer Intima im Stent als der entscheidende Prozess gesehen (Kornowsky et al., 1998). Ca. 15 Minuten nach einer Stenteinlage kann in dem betroffenen Segment der Koronararterie eine Einwanderung von Leukozyten nachgewiesen werden, die von einer massiven Ablagerung von aktivierten Thrombozyten begleitet wird (Farb et al., 2003). Hier zeigt sich nochmals eindrucksvoll das Zusammenspiel von Thrombozyten und Leukozyten im Rahmen von Entzündungsvorgängen. In einem Zeitraum, der meist weniger als 4 Wochen dauert, zeigt sich eine den Stent bedeckende neue Intima (Grewe et al., 2000).

Die Entzündungsvorgänge sind von einer Reihe von Freisetzungsreaktionen von Botenstoffen, so zum Beispiel von Zytokinen wie das Interleukin 1 oder 6 begleitet (Welt et al., 2003). Auch wurde gezeigt, dass eine systemische Entzündungsreaktion, die sich in einer erhöhten Plasmakonzentration des C-reaktiven Proteins (CRP) zeigte, durch eine PCI ausgelöst werden kann (Almagor et al., 2003).

Es war das Ziel der vorliegenden Studie, mögliche Einflüsse von Bivalirudin oder UFH auf den klinischen Erfolg einer PCI zu untersuchen. Daher untersuchten wir auch Marker für Entzündungsvorgänge.

In unserer Studie zeigte sich eine signifikante Reduktion MAC-1 positiver Monozyten in der Bivalirudingruppe beim Vergleich der Messzeitpunkte vor der Gabe von Bivalirudin und nach der PCI. Eine Coexpression von CD15 und MAC1 als Marker für polymorphkernige Leukozyten zeigte sich unbeeinflusst.

In der HeparinGruppe blieb die MAC-1 Expression unverändert.

Nach 24 Stunden zeigte sich in beiden Gruppen ein Anstieg von MAC-1 positiven Monozyten und polymorphkernigen Leukozyten.

MAC-1 (CD11b/CD18) ist ein β -Integrin welches die Bindung von Leukozyten an aktivierte Plättchen über eine Reihe von Gegenrezeptoren wie GP Iba (Simon et al., 2000), junktionales Adhäsionsmolekül C (JAM-C/JAM-3) (Santoso et al., 2002), CD 40 Ligand (Zirlik et al., 2007) oder interzelluläres Adhäsionsmolekül 2 (ICAM-2) (Diacovo et al., 1994) direkt vermitteln können. Auch eine indirekte Bindung über Fibrinogen, welches eine Brücke zwischen MAC-1 und Integrin α IIb β 3 (GP IIb/IIIa) bildet (Altieri et al., 1988) oder hochmolekularem Kininogen, welches MAC-1 und GP Iba verbindet (Chavakis et al., 2003), ist möglich. Hierbei spielt die Interaktion mit P-Selektin eine Rolle, die über den P-Selektin Ligand der Leukozyten vermittelt wird.

Hierdurch wird der erste Kontakt hergestellt, der erst das Ausbilden einer zweiten festeren Verbindung über MAC-1 ermöglicht.

Diese Möglichkeit ist für Entzündungsvorgänge in mehrfacher Hinsicht von Bedeutung.

Aktiviert Thrombozyten binden sowohl an Leukozyten als auch an die Gefäßwand. Diese Interaktion kann auf verschiedene Weise vor sich gehen. Erstens können Leukozyten und Thrombozyten Koaggregate ausbilden. Die Koaggregation ermöglicht dann eine weitere gegenseitige Aktivierung. In den Leukozyten werden so zum Beispiel Adhäsions-Proteine aktiviert, welche die Bindung an die Gefäßwand erleichtern, oder aber die Bindung entsteht über das Plättchen als so genannte Brücke. Zweitens können bereits an der Gefäßwand anhaftende Plättchen über Chemokine Leukozyten anlocken und über P-Selektin, sowie später über die Gegenrezeptoren zu MAC-1 eine griffige Oberfläche, für den Halt von Leukozyten an die Gefäßwand, schaffen.

Während des Adhäsionsprozesses kommt es über ein kompliziertes Zusammenspiel aus leukozytären und thrombozytären Botenstoffen zu einer Reihe von Prozessen, wie der weiteren Expression und Aktivierung monozytärer Adhäsionsmoleküle (z.B.: MAC-1), Cytokine und Interleukinfreisetzung (IL-1 β , IL-8, TNF α , MCP-1), monozytischer Freisetzung von "Tissue factor" und die Induktion einer massiven Freisetzung hochreaktiver Sauerstoffspezies ("oxidative Burst") in den neutrophilen Granulozyten (May et al., 2008).

5.3.2 MAC-1 Expression

In unserer Studie wurde nach der Intervention in der Bivalirudingruppe eine verminderte MAC-1 Expression in Leukozyten, aber auch eine verminderte P-Selektin Expression in Thrombozyten nachgewiesen, was nahe legt, dass es zu einer verminderten Ausbildung von Monozyten-Plättchenaggregaten und somit zu einer vorübergehenden Abschwächung der Entzündungsreaktionen gegenüber der HeparinGruppe kam. Vorübergehend deshalb, weil es nach 24 h zu einem Anstieg von MAC-1 positiven Leukozyten und polymorphkernigen Granulozyten in beiden Gruppen kam. Auch unterschied sich die CRP-Konzentration, die in beiden Gruppen nach 48 h signifikant erhöht war, nicht zwischen den beiden Gruppen.

Dabei ist zu beachten, dass es sich hier wiederum um einen additiven Effekt zur Basismedikation mit Aspirin und Clopidogrel handelte, welche selbst, wie die

folgenden Ausführungen zeigen werden, einen Einfluss auf die MAC-1 Expression und die Ausbildung von Thrombozyten-Monozytenaggregaten und Plättchen-Neutrophilenaggregate haben.

Es wurde an Patienten mit generalisierter Atherosklerose und peripheren Verschlüssen gezeigt, dass eine Kombinationstherapie mit Clopidogrel und Aspirin sowohl die Expression von MAC-1 in Leukozyten, auf Stimulation mit ADP oder TRAP, als auch die Expression von P-Selektin sowie die Bildung von Thrombozyten-Monozytenaggregaten (TMA) hemmt. Clopidogrel zeigte hier, im Gegensatz zu Aspirin als Monotherapie, deutliche Effekte. Den deutlichsten Effekt jedoch zeigte die Kombination beider Substanzen (Klinkhardt et al., 2003). Eine andere Studie fand an 23 Patienten mit akutem Koronarsyndrom ein deutlich erhöhtes Auftreten an spontanen TMA und Plättchen-Neutrophilenaggregaten (PNA). Durch Gabe von Clopidogrel (300 mg) wurde dieser Effekt aufgehoben. Auch wurde die Ausbildung von TMA und PNA nach Stimulation mit TRAP oder ADP signifikant reduziert. Als interessanter Nebenbefund zeigte sich, dass TMA bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom dreimal so häufig vorkamen wie PNA. (Xiao et Theroux, 2004).

Bivalirudin hat also im Gegensatz zu UFH noch einen zusätzlichen Effekt auf die Ausbildung der MAC-1 Expression und die Ausbildung solcher Aggregate. Es gibt mehrere Untersuchungen, die zu einem ähnlichen Ergebnis kamen.

Keating et al (2005) untersuchten 60 Patienten, von denen der Großteil eine elektive PCI aufgrund einer stabilen KHK erhielt. Alle Patienten waren mit Aspirin vorbehandelt, fünfzig Prozent zusätzlich mit Clopidogrel. Es wurde dann zwischen Bivalirudin und UFH+Eptifibatide (α IIb β 3/Glykoprotein-IIb/IIIa-Antagonist) randomisiert.

Zehn Minuten nach Beginn der PCI zeigten sich zwischen der UFH + Eptifibatide und der Bivalirudingruppe eine signifikant geringere Ausbildung von sowohl PNA und TMA, die nach der PCI Untersuchung nicht mehr nachweisbar war. Allerdings blieb die Plasmakonzentration der Myeloperoxidase (MPO), die als Marker für eine Aktivierung der Leukozyten verstanden wurde, auch nach der PCI in der UFH + Eptifibatide Gruppe im Vergleich zur Bivalirudingruppe signifikant erhöht. Wurden die Patienten mit Clopidogrel (keine einheitliche Dosierung) vorbehandelt, schwächten sich diese Unterschiede wiederum ab.

Harding et al. (2006) verglichen konstitutionell mit Aspirin vorbehandelte Patienten, die während einer PCI entweder Bivalirudin oder UFH erhielten und fanden, dass die

Heparinmedikation, im Gegensatz zur Bivalirudinmedikation, die Häufigkeit von Thrombozyten-Monozyten-Aggregaten erhöhte.

Diese Ergebnisse entsprechen unseren in dem Sinne, dass gezeigt wurde, dass Bivalirudin sich im Vergleich zu Heparin günstiger auf Entzündungsvorgänge auswirkt. Allerdings wird in diesen Studien die Ursache vielmehr in einer Erhöhung der Thrombozyten-Leukozytenaggregate durch Heparin angenommen. Dies ist eine Haltung, die auch durch die Ergebnisse von Li et al. (2007) unterstützt wird.

Sie wiesen nach, dass unmittelbar nach einer PCI die Myeloperoxidasekonzentration in der Gruppe mit Heparin und Eptifibatide um den Faktor 2.3 Anstieg, im Vergleich zu der Konzentration vor der Intervention. In der Bivalirudingruppe war ein solcher Anstieg nicht nachweisbar. In anschließenden in vitro Experimenten konnten sie nachweisen, dass nur Heparin, wenn es mit einer Neutrophilensuspension zusammen inkubiert wurde, die MPO-Freisetzung erhöhte. Ein solcher Effekt konnte weder für Eptifibatide noch für Bivalirudin nachgewiesen werden. Sie zeigten, dass Heparin die Bindung von MPO an Neutrophile begünstigte. Zusammen mit den Ergebnissen von Lau et al. (2005), die zeigten, dass MPO über Bindung an MAC-1 Neutrophile weiter aktivieren kann, vermuteten sie, dass Heparin, über eine Verstärkung der zytokinähnlichen Effekte von MPO, eine Aktivierung und die Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies aus Neutrophilen begünstigt.

In unserer Studie zeigte sich kein Effekt auf die Expression von MAC-1 in Monozyten und polymorphkernigen Zellen durch Heparin. Möglicherweise wurden solche proinflammatorischen Effekte von Heparin durch die Kombination mit Clopidogrel und Aspirin soweit abgeschwächt, dass sie nicht mehr nachweisbar waren, was auch in der Studie von Keating et al. (2005) in Ansätzen zu sehen war.

Wir untersuchten jedoch nur MAC-1 als Marker einer Leukozytenaktivierung. Vielleicht hätten wir Unterschiede gefunden, wenn wir stattdessen die Myeloperoxidasekonzentration oder die Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies aus Neutrophilen gemessen hätten.

Unsere Ergebnisse legen jedoch nahe, dass Bivalirudin über die Beeinflussung der P-Selektin Sekretion und der MAC-1 Expression einen, zu Aspirin und Clopidogrel, zusätzlichen abschwächenden Effekt auf Entzündungsreaktionen aufweisen könnte, der nicht nur durch die Abwesenheit der ungünstigen Effekte von Heparin zu erklären ist.

5.3.3 CRP und Interleukine

In der vorliegenden Studie zeigte sich ein Anstieg der CRP Konzentration im Plasma in beiden Gruppen. Die UFH und die Bivalirudingruppe unterschieden sich hier nicht signifikant. Damit unterstützen unsere Ergebnisse die Aussage aus mehreren Vorbefunden, dass durch eine PCI mit Stenteinlage eine systemisch nachweisbare Entzündungsreaktion ausgelöst wird. So fand eine Studie (Gasparone et al., 1998) bei Patienten mit stabiler Angina Pectoris einen starken Anstieg des CRP nach einer erfolgreichen Stenteinlage, wobei ein stärkerer Anstieg hier mit einem schlechteren klinischen Erfolg assoziiert war. Ähnliche Ergebnisse finden sich, zum Beispiel bei Almagor et al. (2002), die bei Patienten, mit elektiver PCI aufgrund einer stabilen KHK, bereits nach 6 h und maximal nach 24 h eine CRP-Erhöhung nachweisen konnte. Auch in dieser Gruppe waren die Patienten mit Aspirin, Clopidogrel und Heparin behandelt, so dass diese Therapie scheinbar nicht ausreicht Entzündungsvorgänge komplett zu unterdrücken.

Keating et al. (2005) verglichen den CRP Anstieg an einer Gruppe von 63 Patienten, die entweder mit Bivalirudin oder mit Heparin in Kombination mit Eptifibatide, im Rahmen einer PCI bei stabiler KHK (73% der Fälle) durchgeführt wurde. Alle Patienten erhielten Aspirin als Vormedikation, 59 % in der Heparin + Eptifibatide Gruppe und 50 % in der Bivalirudingruppe erhielten Clopidogrel. Sie konnten einen CRP Anstieg nach 24 h sowohl in der Bivalirudingruppe als auch in der HeparinGruppe nachweisen, der jedoch nur in der HeparinGruppe signifikant war. Interessanterweise zeigte sich nach 30 Tagen eine signifikant höhere CRP-Konzentration in der HeparinGruppe als in der Bivalirudingruppe, was einen günstigeren Einfluss von Bivalirudin auf Entzündungsvorgänge nahe legt. Der Unterschied zu unserer Studie ist jedoch, dass nur ein Teil der Patienten mit Clopidogrel behandelt wurde. In unserer Studie wurde CRP nur nach 48 h bestimmt, so dass wir solche möglichen Langzeiteffekte nicht erfassen konnten. Klinisch sind diese Resultate von Bedeutung, da sie zeigen, dass auch der nur vorübergehende Einsatz eines Medikamentes langfristige Auswirkungen hat. Dies kann intuitiv am besten erklärt werden, wenn man sich den Entzündungsvorgang als Lawine sich selbst beeinflussender Mechanismen erklärt, je mehr Schnee am Anfang in Bewegung gerät, umso stärker wird dann die Lawine.

Wir untersuchten weiterhin die Konzentrationen von IL-12p70, TNF, IL-10, IL6, IL1 β , IL8 in der Heparin und in der Bivalirudingruppe, vor der Gabe der Medikation, zu

Beginn der PCI und nach der PCI. Obwohl wir durchgängig einen Anstieg der Interleukinkonzentrationen beobachten konnten, erreichte keiner dieser Anstiege statistische Signifikanz. Auch unterschieden sich Heparin-Gruppe und Bivalirudin-Gruppe bezüglich des Anstieges untereinander nicht. Diese Ergebnisse waren entgegen unserer Erwartung, dass es im Rahmen, der durch die PCI ausgelösten Vorgänge aus Plättchen und Leukozytenaktivierung, zu einem Anstieg der Interleukinkonzentrationen kommt. Unsere Ergebnisse sind jedoch auf einer Linie mit denen von Keating et al (2005), die keinen signifikanten Anstieg von IL-6 und IL-1-Rezeptorantagonist unmittelbar nach einer PCI nachweisen konnten. Auch Ott et al. (1998), welche die Änderung von Interleukinen nach PCI während dem akuten Myokardinfarkt und bei elektiver PCI untersuchten, fanden nur bei den Infarktpatienten einen Anstieg von Interleukin 6. IL-1 β , IL-8, TNF, blieben in beiden Gruppen unbeeinflusst von der Intervention.

Unsere Ergebnisse legen zusammen mit den genannten Nahe, dass es in der Frühphase nach einer PCI unter einer Medikation mit Aspirin, Clopidogrel und Heparin zu keiner massiven Freisetzung der untersuchten Interleukine kommt. Dies könnte Ausdruck einer guten Abschwächung der Entzündungsreaktion durch die Kombinationstherapie sein oder zur Aussage verleiten, dass diese Interleukine im Rahmen der Entzündungsvorgänge nach elektiver PCI bei stabiler KHK eine untergeordnete Rolle spielen. Allerdings müssen die Ergebnisse mit Vorsicht interpretiert werden, da nur zwei Messpunkte (vor und nach der PCI) zur Verfügung stehen. Daher ist es gut möglich, dass wir den optimalen Nachweiszeitpunkt für einen Anstieg der Interleukine nicht getroffen haben.

5.4 Diskussion einer möglichen klinischen Relevanz unserer Ergebnisse

5.4.1 Klinische Relevanz des Nachweises einer systemischen Entzündung nach PCI

Ein wichtiges Ergebnis der vorliegenden Arbeit ist, dass durch unsere Befunde die Hypothese gestützt wird, dass durch eine PCI eine Entzündungsreaktion ausgelöst werden kann, was auch durch die bisherige Standardmedikation nicht verhindert werden kann. Da erhöhte CRP-Werte nach einer PCI mit einem schlechteren klinischen Verlauf verknüpft sind, (Gasparone et al., 1998) wäre es wünschenswert

noch effektivere Therapieschemata zur Unterdrückung dieser Entzündungsreaktion zu finden.

5.4.2 Klinische Relevanz der Einflüsse von Bivalirudin und Heparin auf die Thrombozytenaktivierung

In der Replace II Studie zeigte sich Bivalirudin bezüglich ischämischer Komplikationen im Rahmen der Intervention und nach 30 Tagen einer Kombination aus UFH und α IIb β 3 (Glykoprotein-IIb/IIIa)-Antagonisten ebenbürtig. Dies war überraschend, da durch den Einsatz des indirekten Thrombininhibitors Heparin und durch den Einsatz, eines Fibrinogenrezeptorantagonisten zwei potente Wirkmechanismen zur Beeinflussung der Hämostase eingesetzt wurden, gegenüber dem direkten Thrombininhibitor Bivalirudin.

Einige Untersucher sahen die Ursache hierfür in einer möglichen Plättchenaktivierung durch Heparin in Kombination mit α IIb β 3 (Glykoprotein-IIb/IIIa)-Inhibitoren.

Unsere Ergebnisse (Hemmung der ADP und TRAP abhängigen Plättchenaktivierung) geben jedoch Hinweise darauf, dass Bivalirudin zusätzlich zur Beeinflussung der sekundären Hämostase durch die Thrombininhibition, auch modulierende Einflüsse auf die Plättchenfunktion, zusätzlich zur dualen Thrombozytenhemmung mit Clopidogrel und Aspirin, aufweist. Mögliche Mechanismen wie dies geschehen kann, wurden bereits unter Punkt 6.2.4 diskutiert. Dieser zusätzliche günstige Einfluss könnte sich positiv auf peri- und postinterventionelle Komplikationen auswirken.

Jedoch zeigte auch Heparin eine Hemmung der TRAP abhängigen Plättchenaktivierung. Die in der Literatur beschriebenen proaggregatorischen Eigenschaften ließen sich in unserer Untersuchung nicht nachweisen.

Dies ist insofern von klinischer Relevanz, als die, in unserer Studie praktizierte duale Thrombozytenaggregationshemmung mit 600 mg Ladedosis Clopidogrel in kombinierter Gabe mit Aspirin, möglicherweise in der Lage ist, ungünstige Wirkungen von Heparin zu antagonisieren, und so eine weitere Rationale für diese Kombinationstherapie bietet.

5.4.3 Klinische Relevanz der reduzierten P-Selektin- und MAC-1 Expression in der Bivalirudingruppe

Vorgänge der Blutstillung und Entzündung beeinflussen einander wechselseitig. Dies macht biologisch Sinn, da in der Evolution des Menschen Verletzungen zum Beispiel nach einem Biss durch ein Tier, neben einer Blutstillung auch eine rasche Bekämpfung einer möglichen Infektion erfordern (Wagner, 2005).

Schnittstellen zwischen diesen Prozessen könnten daher, sowohl für das Ausmass von Entzündungsreaktionen als auch für die Blutstillung von Bedeutung sein.

Die Bindung von P-Selektin auf Plättchen und Endothelzellen kann über den P-Selektin Liganden in Leukozyten eine erste lockere Verbindung zwischen den unterschiedlichen Zellen knüpfen. In der Folge bildet sich durch Verknüpfung von leukozytärem MAC-1 mit unterschiedlichen Gegenrezeptoren im Plättchen oder in den Endothelzellen eine festere Verbindung aus, die zur wechselseitigen Aktivierung und somit zur Verstärkung von Prozessen der Hämostase und Entzündungsvorgängen beiträgt (May et al., 2008).

Bivalirudin scheint nun tatsächlich eine solche Schnittstelle durch Verminderung der P-Selektin und der MAC-1 Expression zu beeinflussen, was möglicherweise den guten klinischen Erfolg im Vergleich mit einer Kombination aus Heparin und einem $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ (Glykoprotein-IIb/IIIa)-Antagonisten mit erklärt.

Es gibt Befunde die P-Selektin, neben der Vermittlung einer ersten losen Bindung von Plättchen an diverse Zelltypen, noch einen weiteren wichtigen Einfluss auf die Blutgerinnung zuweisen. Im Blut zirkulieren Mikropartikel (MP), die nach der Apoptose oder Aktivierung bestimmter Zelltypen, ins Plasma abgegeben werden (Morel, et al., 2004). Diese MP präsentieren auf ihrer Oberfläche negativ geladene Phospholipide und wirken so prokoagulatorisch. Ein geringer Anteil trägt jedoch auch sogenanntes endogenes Gewebsthromboplastin (Tissue Faktor). P-Selektin scheint, über Bindung an den P-Selektin Liganden im Monozyten, die Bildung solcher Mikropartikel zu verstärken und somit Hämostaseprozesse zusätzlich zu beeinflussen (Wagner et al., 2005 B). Auch MAC-1 ist, noch zusätzlich zu seiner Funktion als Adhäsionsprotein, an Hämostaseprozessen beteiligt. Die Bindung von Faktor X an MAC-1 führt zu einer vermehrten Konversion zu Faktor Xa, was dann weitere Gerinnungsprozesse einleitet (Altieri et al., 1988). Wenn Bivalirudin tatsächlich die P-Selektin und die MAC-1 Expression beeinflusst, könnten diese

Mechanismen ebenfalls einen mildernden Einfluss auf frühe Stadien der Kettenreaktion Thrombusbildung haben und sich so günstig auf akute ischämische Komplikationen auswirken.

Die Daten von Keating et al. (2005) mit der stärkeren CRP-Erhöhung in der Heparin-Gruppe nach 30 Tagen legen nahe, dass sich Bivalirudin im Vergleich zu Heparin günstiger auf Entzündungsvorgänge nach einer PCI auswirkt.

Heparin werden eine Reihe antiinflammatorischer Eigenschaften zugeschrieben (Nelson et al., 1993). Es scheint die Bindung von Liganden an MAC-1 zu hemmen (Peter et al., 1999) und die Adhäsion von Leukozyten an das Endothel in vitro zu vermindern (Lever et al., 2000). Ebenso wurde gezeigt, dass die Rekrutierung von Leukozyten an einen experimentell erzeugten Entzündungsfokus gemildert wurde (Tyrrel et al., 1999) und die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies aus Granulozyten reduziert wurde (Teixeira et Hellewell, 1993). Heparin wird teilweise bereits erfolgreich bei der Behandlung chronisch entzündlicher Darmerkrankungen eingesetzt (Mousa, 2007).

Daher ist es schwer nachvollziehbar, weshalb Bivalirudin, für welches diese Eigenschaften nicht in dem Umfang beschrieben sind, einen ähnlichen oder sogar noch günstigeren Effekt im Rahmen von Entzündungsvorgängen nach einer PCI aufweisen soll.

Eine mögliche Ursache hierfür ist, dass die Datenlage zu Heparin nicht völlig konsistent ist, wie die bereits beschriebenen Befunde von Li et al. (2007) zeigen. Auch ist Bivalirudin im Vergleich zu Heparin eine junge Substanz, deren Effekte erst noch weiter erforscht werden müssen. Der Hauptgrund ist jedoch aus Sicht der Verfasserin, das besondere Setting einer PCI, in der die antiinflammatorischen Effekte einer Substanz vor dem Hintergrund einer Komedikation mit zwei potenten Medikamenten wie Acetylsalicylsäure und Clopidogrel beurteilt wird. Hier spielen Effekte aus Medikamentenwechselwirkungen sowie Wechselwirkungen zwischen Plättchenaktivierung, Leukozytenaktivierung und der Sekretion von Entzündungsmediatoren eine Rolle, die in Experimenten oder auch den klinischen Situationen, unter denen die antiinflammatorischen Effekte von Heparin beschrieben werden, so nicht anzutreffen sind.

Unsere Ergebnisse geben, mit der verminderten Expression von MAC-1 und P-Selektin in der Bivalirudin-Gruppe, einen möglichen Hinweis darauf, weshalb Bivalirudin in diesem speziellen Setting einer PCI, Heparin in Bezug auf ein

Abmildern der Entzündungsreaktion, überlegen sein könnte. Der Effekt war jedoch nur vorübergehend. Er könnte jedoch, wenn man den Entzündungsprozess als sich fortsetzende Kettenreaktion begreift, dennoch langfristige Einflüsse haben.

Inoue et al. (2003) untersuchten die Expression von MAC-1 und einen Marker für ein aktivierungsspezifisches Neoepitop von MAC-1 (Antikörper 8B2) an 62 Patienten, die mit Aspirin und Ticlopidin vor der PCI und während der PCI mit UFH behandelt wurden. Sie fanden entsprechend unseren Ergebnissen erst nach 24 h einen signifikanten Anstieg der MAC-1 Expression in Leukozyten, der 48 h nach der Stenteinlage maximal war. Eine Erhöhung des aktivierungsspezifischen Antikörpers zeigte sich bereits nach 10 Minuten. Interessanterweise korrelierte die MAC-1 Expression zum Zeitpunkt 48 h nach PCI, sowie die Expression des Neoepitops stark mit einem Lumenverlust in einer Nachfolgeangiografie. Zusammen mit Ergebnissen aus Tiermodellen, in denen eine Blockade der MAC-1 Funktion durch Antikörper (Rogers et al., 1998) oder die Absenz von MAC-1 in Knockout-Mäusen (Simon et al., 2000) die Neointimabildung und Hyperplasie nach Stenteinlage oder Angioplastie reduzierten, legen diese Ergebnisse nahe, dass einer Verminderung der MAC-1 Expression auch eine klinische Relevanz, in Form eines verbesserten klinischen Erfolges (geringere Restenoserate) zukommt.

5.5 Diskussion der Ergebnisse klinischer Studien zu Bivalirudin

In der BAT Studie (Bivalirudin Angioplasty Trial) zeigte sich der Einsatz von Bivalirudin dem Einsatz von Heparin, im Rahmen einer Ballonangioplastie zur Verminderung von schweren Komplikationen (Herzinfarkt, Tod während des Klinikaufenthaltes, notfällmässige Revaskularisierung zum Beispiel durch Bypass-OP) ebenbürtig, allerdings mit weniger Blutungskomplikationen (Bittl et al., 1995).

In der CACHET Studie (Lincoff et al., 2002) wurden 268 Patienten entweder zu Monotherapie mit Bivalirudin (in besonderen Fällen war der Einsatz von α II β 3-Antagonisten erlaubt, was 24 % der Fälle entsprach), Kombinationstherapie aus Bivalirudin und α II β 3-Antagonisten, oder α II β 3-Antagonisten in Kombination mit gewichtsangepasstem Heparin untersucht. Es zeigte sich ein geringeres Auftreten der zusammengesetzten Studienendpunkte (Tod, Herzinfarkt, Notwendigkeit einer erneuten revaskularisierenden Massnahme, oder schwere Blutungskomplikationen).

In der REPLACE II Studie wurden 6010 Patienten untersucht, die eine perkutane koronare Intervention (PCI) bei akutem Koronarsyndrom ohne ST Streckenhebung

erhielten. Es wurden Gruppen gebildet, in denen die Patienten, die meist mit einer Kombination aus Acetylsalicylsäure und Clopidogrel vorbehandelt waren, entweder eine Kombination aus Heparin und α II β 3-Antagonisten oder Bivalirudin alleine verglichen wurden (Kombination mit α II β 3-Antagonisten in 7.2% der Fälle, wenn dies klinisch erforderlich erschien). Den Endpunkt der Studie stellte entweder Tod, Myokardinfarkt, notfallmässige Wiederholung einer revaskularisierenden Massnahme oder schwere Blutungskomplikationen dar. Die Gruppen unterschieden sich nach 30 Tagen nicht bezüglich ischämischer Komplikationen. In der Bivalirudingruppe zeigte sich eine signifikante Reduktion schwerer Blutungskomplikationen (2.4% vs 4.1%) (Lincoff et al.,2003). Nach 6 Monaten zeigte sich kein Unterschied bezüglich ischämischer Komplikationen, nach einem Jahr schnitt die Bivalirudin Gruppe tendenziell (nicht signifikanter Trend) leicht besser ab (Lincoff et al.,2004).

In der ACUTY Studie wurden ebenfalls, in Kombination mit Aspirin und häufig auch Clopidogrel, 3 Patientengruppen mit akutem Koronarsyndrom untersucht. Eine Gruppe erhielt einen α II β 3-Antagonisten und Heparin, eine zweite Gruppe einen α II β 3-Antagonisten und Bivalirudin und eine dritte Gruppe Bivalirudin alleine, wobei im Fall thrombotischer Komplikationen während der Intervention auch ein α II β 3-Antagonist eingesetzt werden konnte. Es zeigte sich wiederum keine Unterlegenheit der Bivalirudin- Monotherapie- Strategie zur Prävention ischämischer Ereignisse im Vergleich zu den anderen Patientengruppen. Allerdings zeigte sich erneut eine Überlegenheit von Bivalirudin bezüglich möglicher Blutungskomplikationen (Stone et al.,2006).

Ebrahimi et al. (2005) untersuchten die zusammengefassten Daten zu mehreren klinischen Studien. Es wurden die Daten von 5861 Patienten mit Bivalirudin und 5777 Patienten mit Heparin verglichen. Sowohl Bivalirudin als auch Heparin wurden zusammen mit unterschiedlicher Komedikation eingesetzt. Zu einem Zeitpunkt von 48 h nach der PCI zeigte sich in der Bivalirudingruppe sowohl eine signifikante Reduktion von Blutungskomplikationen (2.7% vs 5.8%), als auch für die Ereignisse Tod (0.01% vs 0.02%) und der Notwendigkeit zu einer notfallmässigen Revaskularisierung (2% vs 2.7%).

Unsere Ergebnisse sind mit denen dieser klinischen Studien gut vereinbar, da sie Wege aufzeigen wie Bivalirudin im Vergleich zu Heparin günstige Effekte auf Prozesse der Hämostase und Entzündungsvorgänge haben kann, und so die günstige Wirkung von Bivalirudin in den Studien mit erklären können.

Ein wichtiger Faktor, der das günstige Abschneiden von Bivalirudin mit erklärt, wurde jedoch in unserer Untersuchung nicht erfasst. Bivalirudin besitzt im Vergleich zu Heparin eine günstige Pharmakokinetik, mit einem geringen Verteilungsvolumen und einer kurzen Halbwertszeit von 25 Minuten (White, 2005). Der Abbau erfolgt vor allem über intrazelluläre Proteolyse des synthetischen Polypeptides und nur zu einem geringen Anteil von ca 20 % über renale Exkretion (Reed et al., 2002). Diese Eigenschaften machen es leichter steuerbar. Unfraktioniertes Heparin ist dagegen ein Gemisch aus Glykoproteinen mit unterschiedlichem Molekulargewicht, wobei die niedermolekularen Heparine einen unterschiedlichen Einfluss besitzen als die höhermolekularen. Es wird zu einem grossen Teil an Plasmaproteine gebunden, ebenso wie an Makrophagen und Endothelzellen. Der Abbau erfolgt über Depolymerisation an Makrophagen und Endothelzellen sowie über renale Exkretion. Aufgrund dieser Kinetik zeigt sich keine lineare Dosis Wirkungskurve, so dass mit zunehmender Dosierung der Effekt auf die Blutgerinnung und die Wirkungsdauer disproportional zunimmt (Hirsh et al., 2001).

Diese Unterschiede können für das erhöhte Blutungsrisiko unter Heparin mit verantwortlich sein, wobei in den grossen Studien als Endpunkt vor allem schwere Blutungskomplikationen nach der TIMI Klassifikation erfasst wurden (TIMI Study Group, 2007). Nach dieser Definition werden intrakranielle Blutungen oder Blutungen mit einem Absinken des Hämoglobins um 5g/dl als schwer (Major Bleeding) und Blutungen mit einem Absinken des Hämoglobins um 3-5 g/dl als weniger schwer (Minor Bleeding) bezeichnet. Nderpepa et al. (2008) werteten die Daten von vier, vom deutschen Herzzentrum, koordinierten Studien aus und stellten fest, dass sowohl Major als auch Minor Bleeding innerhalb von 30 d nach der PCI ein starker Prädiktor der Mortalität innerhalb eines Jahres nach der PCI war. Der prädiktive Wert war dabei denen eines Herzinfarktes oder der Notwendigkeit zu einer notfallmässigen revaskularisierenden Massnahme vergleichbar. Diese Ergebnisse waren insofern erstaunlich, dass der Grossteil der Todesfälle (79%) ausserhalb des 30 Tage Zeitraums, und somit mit erheblichem zeitlichen Abstand zur Intervention oder zur Blutungskomplikation, auftrat. Die Autoren kommen in Zusammenschau mit Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen (Feit et al., 2007, Segev et al., 2005) , zur Schlussfolgerung, dass Blutungskomplikationen im Rahmen einer PCI mit rezidivierenden ischämischen Komplikationen und einer erhöhten Langzeitsterblichkeit assoziiert sind.

Diese Befunde geben den geringeren Blutungskomplikationen unter Bivalirudin ein zusätzliches Gewicht im Hinblick auf einen möglichen besseren klinischen Langzeiterfolg, der sich in einer reduzierten Mortalität ausdrückt.

5.6 Schlussfolgerung

Unsere Ergebnisse zeigen, dass Bivalirudin sowohl die Thrombozytenfunktion als auch Entzündungsvorgänge beeinflusst, die im Rahmen einer PCI mit Stenteinlage auftreten.

Dabei scheint es sich um einen Effekt zu handeln, der additiv zu den Effekten der Medikation mit Clopidogrel und Aspirin auftritt.

Die Mechanismen auf welchem Weg dies geschieht, sind noch nicht vollständig geklärt. Möglicherweise spielen dabei eine Interaktion von P-Selektin auf der Thrombozytenoberfläche mit MAC-1 auf der Oberfläche von Leukozyten eine Rolle. Diese Ergebnisse müssen jedoch noch verifiziert werden.

Unsere Ergebnisse passen gut zur klinischen Beobachtung, dass Bivalirudin im Rahmen einer PCI, Heparin bezüglich ischämischer Komplikationen gleichwertig ist.

Die günstige Auswirkung auf die Blutungskomplikationen würden Bivalirudin gegenüber UFH favorisieren, zumal sonst das Nebenwirkungsprofil ähnlich ist und das Risiko einer heparininduzierten Thrombopenie wegfällt.

Da Blutungskomplikationen mit einer erhöhten Langzeitmortalität verknüpft sind, könnte sich der routinemässige Einsatz von Bivalirudin im Rahmen einer PCI langfristig auch günstig auf die Gesamtprognose auswirken.

6. Zusammenfassung

Der Erfolg der perkutanen Koronarangioplastie wird immer noch durch Komplikationen in Form von Blutungen, akuten Verschlüssen der Koronararterien und längerfristigen Restenosierungen limitiert. Neben Acetylsalicylsäure und Clopidogrel wurde meist unfraktioniertes Heparin zur Prophylaxe einer intraarteriellen Thrombenbildung eingesetzt. Eine therapeutische Alternative stellt hier der direkte Thrombininhibitor Bivalirudin dar, der in Studien bezüglich dem längerfristigen Therapieerfolg Heparin ebenbürtig erscheint.

Wir untersuchten an Patienten, die eine PCI erhielten, die Fragestellung, ob sich Bivalirudin und Heparin, die in Kombination mit Acetylsalicylsäure und Clopidogrel eingesetzt wurden, unterschiedlich auf die Thrombozytenaktivierung, die Leukozytenaktivierung sowie die Interleukin- und CRP Freisetzung auswirken.

Für UFH in Kombination mit Acetylsalicylsäure und Clopidogrel fanden wir eine Abnahme in der TRAP-, jedoch nicht der ADP-induzierten Plättchenaggregation.

Es zeigte sich kein Einfluss von Heparin auf Marker der Thrombozytenaktivierung. Mögliche Ursachen hierfür sind in der Methodik (proaggregatorische Wirkung, der in der Studie verwendeten Konzentrationen, nicht nachweisbar) und in der Kombination mit Clopidogrel (antagonisiert proaggregatorischen Effekt von UFH) zu suchen. Spekulativ bleibt ein zusätzlich antiaggregatorischer Effekt von UFH durch Hemmung der Bindung von Thrombin an GP IIb/IIIa.

Für Bivalirudin konnten wir eine Abnahme der TRAP- und ADP-induzierten Thrombozytenaggregation und eine Abnahme von Markern der Thrombozytenaktivierung zeigen. Diese Ergebnisse lassen einen bislang unerkannten therapeutischen Effekt von Bivalirudin durch Hemmung der Thrombozytenaggregation vermuten. Eine mögliche Erklärung wäre, dass dieser Effekt über eine, ebenfalls durch uns nachweisbare, verminderte Oberflächenexpression von GP IIb/IIIa zu Stande kommt. Ein Mechanismus ist hierfür jedoch bislang nicht bekannt. Klinisch könnte sich ein zusätzlicher Effekt von Bivalirudin auf die Thrombozytenaktivierung günstig auf das Risiko einer koronaren Thrombose im Rahmen einer PCI auswirken.

Bezüglich der Entzündungsvorgänge zeigte sich unmittelbar nach Ende der Intervention eine signifikante Reduktion MAC-1 positiver Monozyten in der

Bivalirudingruppe im Vergleich zum Messzeitpunkt vor der Gabe von Bivalirudin. Für UFH war kein solcher Effekt nachweisbar. Dies legt zusammen mit der verminderten P-Selektin-Expression in den Thrombozyten eine verminderte Ausbildung von Monozyten-Plättchenaggregation und somit eine vorübergehende Abschwächung der Entzündungsreaktionen gegenüber der HeparinGruppe nahe. Nach 24 Stunden kam es jedoch in beiden Gruppen zu einem signifikanten Anstieg von CRP und MAC-1 positiver Monozyten. Die gemessenen Interleukinkonzentrationen stiegen ebenfalls an, ohne dass der Anstieg jedoch statistisch signifikant war. Zwischen den Gruppen gab es hier ebenfalls keine Unterschiede.

Unsere Befunde unterstützen hier die Aussage, dass durch eine PCI mit Stenteinlage eine systemisch nachweisbare Entzündungsreaktion ausgelöst werden kann. Kurzfristig scheint diese Entzündungsreaktion durch Gabe von Bivalirudin abgeschwächt. Als Ursache sehen wir hier die Beeinflussung der Thrombozyten-Leukozyteninteraktion im Rahmen von Entzündungsvorgängen. Ob diese Abschwächung in Bezug auf langfristige ischämische Komplikationen von Bedeutung ist, kann durch unsere Untersuchung nicht geklärt werden.

Zusammenfassend legen unsere Befunde eine günstige Beeinflussung von Thrombozytenaggregation und Entzündungsvorgängen durch Bivalirudin nahe. Dies könnte mit ein Grund für das, im Vergleich zum unfraktionierten Heparin, günstige Abschneiden bezüglich akuter und langfristiger ischämischer Komplikationen sein. Ein entscheidender Vorteil von Bivalirudin scheint jedoch in geringeren Blutungskomplikationen zu bestehen.

7. Literaturverzeichnis

Aggarwal A, Blum A, Schneider DJ, Sobel BE, Dauerman HL. Soluble CD40 ligand is an early initiator of inflammation after coronary intervention. *Coron Artery Dis.* 2004 Dec;15(8):471-5.

Aggarwal A, Sobel BE, Schneider DJ. Decreased platelet reactivity in blood anticoagulated with bivalirudin or enoxaparin compared with unfractionated heparin: implications for coronary intervention. *J Thromb Thrombolysis.* 2002 Jun;13(3):161-5.

Almagor M, Keren A, Banai S. Increased C-reactive protein level after coronary stent implantation in patients with stable coronary artery disease. *Am Heart J.* 2003 Feb;145(2):248-53.

Altieri DC, Morrissey JH, Edgington TS. Adhesive receptor MAC-1 coordinates the activation of factor X on stimulated cells of monocytic and myeloid differentiation: an alternative initiation of the coagulation protease cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988 Oct;85(20):7462-6.

Altieri DC, Bader R, Mannucci PM, Edgington TS. Oligospecificity of the cellular adhesion receptor MAC-1 encompasses an inducible recognition specificity for fibrinogen. *J Cell Biol.* 1988 Nov;107(5):1893-900.

Anand SX, Kim MC, Kamran M, Sharma SK, Kini AS, Fareed J, Hoppensteadt DA, Carbon F, Cavusoglu E, Varon D, Viles-Gonzalez JF, Badimon JJ, Marmur JD. Comparison of platelet function and morphology in patients undergoing percutaneous coronary intervention receiving bivalirudin versus unfractionated heparin versus clopidogrel pretreatment and bivalirudin. *Am J Cardiol.* 2007 Aug 1;100(3):417-24.

Anderson HV, Shaw RE, Brindis RG, Hewitt K, Krone RJ, Block PC, McKay CR, Weintraub WS. A contemporary overview of percutaneous coronary interventions. The American College of Cardiology-National Cardiovascular Data Registry (ACC-NCDR). *J Am Coll Cardiol.* 2002 Apr 3;39(7):1096-103.

Antman EM, Giugliano RP, Gibson CM, McCabe CH, Coussement P, Kleiman NS, Vahanian A, Adgey AA, Menown I, Rupprecht HJ, Van der Wieken R, Ducas J, Scherer J, Anderson K, Van de Werf F, Braunwald E. Abciximab facilitates the rate and extent of thrombolysis: results of the thrombolysis in myocardial infarction (TIMI) 14 trial. The TIMI 14 Investigators. *Circulation.* 1999 Jun 1;99(21):2720-32.

Antithrombotic Trialists' Collaboration. Collaborative meta-analysis of randomised trials of antiplatelet therapy for prevention of death, myocardial infarction, and stroke in high risk patients. *BMJ.* 2002 Jan 12;324(7329):71-86.

Arya M, López JA, Romo GM, Cruz MA, Kasirer-Friede A, Shattil SJ, Anvari B. Glycoprotein Ib-IX-mediated activation of integrin alpha(IIb)beta(3): effects of receptor clustering and von Willebrand factor adhesion. *J Thromb Haemost.* 2003 Jun;1(6):1150-7.

- Atalar E , Aytemir K, Haznedaroğlu I, Aksöyek S, Ovünç K, Kirazli S, Ozmen F. Platelet and leukocyte deactivation after intracoronary stent placement in patients receiving combined antiplatelet therapy. *Clin Appl Thromb Hemost*. 2001 Apr;7(2):116-21.
- Attanasio M, Gori AM, Giusti B, Pepe G, Comeglio P, Brunelli T, Prisco D, Abbate R, Gensini GF, Neri Serneri GG. Cytokine gene expression in human LPS- and IFN γ -stimulated mononuclear cells is inhibited by heparin. *Thromb Haemost*. 1998 May;79(5):959-62.
- Baigent C, Keech A, Kearney PM, Blackwell L, Buck G, Pollicino C, Kirby A, Sourjina T, Peto R, Collins R, Simes R; Cholesterol Treatment Trialists' (CTT) Collaborators. Efficacy and safety of cholesterol-lowering treatment: prospective meta-analysis of data from 90,056 participants in 14 randomised trials of statins. *Lancet*. 2005 Oct 8;366(9493):1267-78.
- Behan MW, Storey RF. Antiplatelet therapy in cardiovascular disease. *Postgrad Med J*. 2004 Mar;80(941):155-64.
- Bigalke B, Lindemann S, Gawaz M. Aktivierungszustand der Thrombozyten beim akuten Koronarsyndrom und in der interventionellen Therapie. *Hämostaseologie*. 2007 (5):1-7.
- Bittl JA, Chaitman BR, Feit F, Kimball W, Topol EJ. Bivalirudin versus heparin during coronary angioplasty for unstable or postinfarction angina: Final report reanalysis of the Bivalirudin Angioplasty Study. *Am Heart J*. 2001 Dec;142(6):952-9.
- Bittl JA. Comparative safety profiles of hirulog and heparin in patients undergoing coronary angioplasty. The Hirulog Angioplasty Study Investigators. *Am Heart J*. 1995 Sep;130(3 Pt 2):658-65.
- Bittl JA, Strony J, Brinker JA, Ahmed WH, Meckel CR, Chaitman BR, Maraganore J, Deutsch E, Adelman B. Treatment with bivalirudin (Hirulog) as compared with heparin during coronary angioplasty for unstable or postinfarction angina. Hirulog Angioplasty Study Investigators. *N Engl J Med*. 1995 Sep 21;333(12):764-9.
- Black SC, Gralinski MR, Friedrichs GS, Kilgore KS, Driscoll EM, Lucchesi BR. Cardioprotective effects of heparin or N-acetylheparin in an in vivo model of myocardial ischaemic and reperfusion injury. *Cardiovasc Res*. 1995 May;29(5):629-36.
- Blum A, Sclarovsky S, Shohat B. T lymphocyte activation in stable angina pectoris and after percutaneous transluminal coronary angioplasty. *Circulation*. 1995 Jan 1;91(1):20-2.
- Born GV, Cross MJ. Effects of inorganic ions and of plasma proteins on the aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate. *J Physiol*. 1964 Mar;170:397-414.
- Braunersreuther V, Mach F. Leukocyte recruitment in atherosclerosis: potential targets for therapeutic approaches? *Cell Mol Life Sci*. 2006 Sep;63(18):2079-88.

Bravata DM, Gienger AL, McDonald KM, Sundaram V, Perez MV, Varghese R, Kapoor JR, Ardehali R, Owens DK, Hlatky MA. Systematic review: the comparative effectiveness of percutaneous coronary interventions and coronary artery bypass graft surgery. *Ann Intern Med.* 2007 Nov 20;147(10):703-16.

Cannon CP. Learning from the recently completed oral glycoprotein IIb/IIIa receptor antagonist trials. *Clin Cardiol.* 2000 Nov;23 Suppl 6:VI-14-7.

CAPRIE Steering Committee. A randomised, blinded, trial of clopidogrel versus aspirin in patients at risk of ischaemic events (CAPRIE). *Lancet.* 1996 Nov 16;348(9038):1329-39.

The CAPTURE Study.

Randomised placebo-controlled trial of abciximab before and during coronary intervention in refractory unstable angina: *Lancet.* 1997 May 17;349(9063):1429-35.

Carr J. The anti-inflammatory action of heparin: heparin as an antagonist to histamine, bradykinin and prostaglandin E1. *Thromb Res.* 1979;16(3-4):507-16.

Casu B, Oreste P, Torri G, Zoppetti G, Choay J, Lormeau JC, Petitou M, Sinäy P. The structure of heparin oligosaccharide fragments with high anti-(factor Xa) activity containing the minimal antithrombin III-binding sequence. Chemical and ¹³C nuclear-magnetic-resonance studies. *Biochem J.* 1981 Sep 1;197(3):599-609.

Cattaneo M. Aspirin and clopidogrel: efficacy, safety, and the issue of drug resistance. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004 Nov;24(11):1980-7.

Cattaneo M, Gachet C, Cazenave JP, Packham MA. Adenosine diphosphate (ADP) does not induce thromboxane A₂ generation in human platelets. *Blood.* 2002 May 15;99(10):3868-9; author reply 3869-70.

Charo IF, Kieffer N, Phillips DR. Platelet membrane glycoproteins. Aus: Colman RW, Hirsh J, Marder V, Salzman EW (Hrsg.): *Hemostasis and Thrombosis: Basic principles and clinical practice.* Philadelphia, JB Lippincott, 3. Auflage 1994 (489-507).

Chavakis T, Santoso S, Clemetson KJ, Sachs UJ, Isordia-Salas I, Pixley RA, Nawroth PP, Colman RW, Preissner KT. High molecular weight kininogen regulates platelet-leukocyte interactions by bridging MAC-1 and glycoprotein Ib. *J Biol Chem.* 2003 Nov 14;278(46):45375-81.

Chobanian AV, Alexander RW. Exacerbation of atherosclerosis by hypertension. Potential mechanisms and clinical implications. *Arch Intern Med.* 1996 Sep 23;156(17):1952-6.

Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, Cushman WC, Green LA, Izzo JL Jr, Jones DW, Materson BJ, Oparil S, Wright JT Jr, Roccella EJ. Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. National Heart, Lung, and Blood Institute; National High Blood Pressure Education Program Coordinating Committee. Seventh report of the Joint National Committee on

Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. Hypertension. 2003 Dec;42(6):1206-52.

Chong BH. Heparin-induced thrombocytopenia. J Thromb Haemost. 2003 Jul;1(7):1471-8.

Cines DB, Pollak ES, Buck CA, Loscalzo J, Zimmerman GA, McEver RP, Pober JS, Wick TM, Konkle BA, Schwartz BS, Barnathan ES, McCrae KR, Hug BA, Schmidt AM, Stern DM. Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. Blood. 1998 May 15;91(10):3527-61.

Clowes AW, Karnowsky MJ. Suppression by heparin of smooth muscle cell proliferation in injured arteries. Nature. 1977 Feb 17;265(5595):625-6.

Cohen DJ, Lincoff AM, Lavelle TA, Chen HL, Bakhai A, Berezin RH, Jackman D, Sarembock IJ, Topol EJ. Economic evaluation of bivalirudin with provisional glycoprotein IIB/IIIa inhibition versus heparin with routine glycoprotein IIB/IIIa inhibition for percutaneous coronary intervention: results from the REPLACE-2 trial. J Am Coll Cardiol. 2004 Nov 2;44(9):1792-800.

Coller BS. Anti-GPIIb/IIIa drugs: current strategies and future directions. Thromb Haemost. 2001 Jul;86(1):427-43.

Coughlin SR. Protease-activated receptors and platelet function. Thromb Haemost. 1999 Aug;82(2):353-6. Review. No abstract available.

Crawley JT, Zanardelli S, Chion CK, Lane DA. The central role of thrombin in hemostasis. J Thromb Haemost. 2007 Jul;5 Suppl 1:95-101.

Critchley J, Capewell S. Smoking cessation for the secondary prevention of coronary heart disease. Cochrane Database Syst Rev. 2004;(1):CD003041.

Cutlip DE, Baim DS, Ho KK, Popma JJ, Lansky AJ, Cohen DJ, Carrozza JP Jr, Chauhan MS, Rodriguez O, Kuntz RE. Stent thrombosis in the modern era: a pooled analysis of multicenter coronary stent clinical trials. Circulation. 2001 Apr 17;103(15):1967-71.

Daub K, Langer H, Seizer P, Stellos K, May AE, Goyal P, Bigalke B, Schönberger T, Geisler T, Siegel-Axel D, Oostendorp RA, Lindemann S, Gawaz M. Platelets induce differentiation of human CD34+ progenitor cells into foam cells and endothelial cells. FASEB J. 2006 Dec;20(14):2559-61.

Davi G, Ferroni P. CD40-CD40L interactions in platelet activation. Thromb Haemost. 2005 Jun;93(6):1011-2.

Day JR, Landis RC, Taylor KM. Heparin is much more than just an anticoagulant. J Cardiothorac Vasc Anesth. 2004 Feb;18(1):93-100.

De Candia E, De Cristofaro R, Landolfi R. Thrombin-induced platelet activation is inhibited by high- and low-molecular-weight heparin. Circulation. 1999 Jun 29;99(25):3308-14.

De Luca G, Navarese E, Marino P. Risk profile and benefits from Gp IIb-IIIa inhibitors among patients with ST-segment elevation myocardial infarction treated with primary angioplasty: a meta-regression analysis of randomized trials. *Eur Heart J*. 2009 Nov;30(22):2705-13. Epub 2009 Oct 28.

Devereux RB, Roman MJ. Left ventricular hypertrophy in hypertension: stimuli, patterns, and consequences. *Hypertens Res*. 1999;22:1-9.

De Lorgeril M, Salen P, Martin JL, Monjaud I, Delaye J, Mamelle N. Mediterranean diet, traditional risk factors, and the rate of cardiovascular complications after myocardial infarction: final report of the Lyon Diet Heart Study. *Circulation*. 1999 Feb 16;99(6):779-85.

Diacovo TG, deFougerolles AR, Bainton DF, Springer TA. A functional integrin ligand on the surface of platelets: intercellular adhesion molecule-2. *J Clin Invest*. 1994 Sep;94(3):1243-51.

Di Nisio M, Bijsterveld NR, Meijers JC, Levi M, Büller HR, Peters RJ. Effects of clopidogrel on the rebound hypercoagulable state after heparin discontinuation in patients with acute coronary syndromes. *J Am Coll Cardiol*. 2005 Oct 18;46(8):1582-3.

Ding Z, Kim S, Dorsam RT, Jin J, Kunapuli SP. Inactivation of the human P2Y₁₂ receptor by thiol reagents requires interaction with both extracellular cysteine residues, Cys17 and Cys270. *Blood*. 2003 May 15;101(10):3908-14.

Dörmann D, Clemetson KJ, Kehrel BE. The GPIIb thrombin-binding site is essential for thrombin-induced platelet procoagulant activity. *Blood*. 2000 Oct 1;96(7):2469-78.

Dorsam RT, Kunapuli SP. Central role of the P2Y₁₂ receptor in platelet activation. *J Clin Invest*. 2004 Feb;113(3):340-5.

Dwarakanath AD, Yu LG, Brookes C, Pryce D, Rhodes JM. 'Sticky' neutrophils, pathergic arthritis, and response to heparin in pyoderma gangrenosum complicating ulcerative colitis. *Gut*. 1995 Oct;37(4):585-8.

Dzau VJ, Antman EM, Black HR, Hayes DL, Manson JE, Plutzky J, Popma JJ, Stevenson W. The cardiovascular disease continuum validated: clinical evidence of improved patient outcomes: part I: Pathophysiology and clinical trial evidence (risk factors through stable coronary artery disease). *Circulation*. 2006 Dec 19;114(25):2850-70.

Dzau VJ. Theodore Cooper Lecture: Tissue angiotensin and pathobiology of vascular disease: a unifying hypothesis. *Hypertension*. 2001 Apr;37(4):1047-52.

Ebrahimi R, Lincoff AM, Bittl JA, Chew D, Wolski K, Wadhan N, Toggart EJ, Topol EJ. Bivalirudin vs heparin in percutaneous coronary intervention: a pooled analysis. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*. 2005 Dec;10(4):209-16.

Eika C. Inhibition of thrombin-induced aggregation of human platelets by heparin and antithrombin 3. *Scand J Haematol.* 1971;8(4):250-6.

Eitzman DT, Chi L, Saggin L, Schwartz RS, Lucchesi BR, Fay WP. Heparin neutralization by platelet-rich thrombi. Role of platelet factor 4. *Circulation.* 1994 Apr;89(4):1523-9.

The EPIC Investigators. Use of a monoclonal antibody directed against the platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor in high-risk coronary angioplasty. *N Engl J Med.* 1994 Apr 7;330(14):956-61.

The EPILOG Investigators. Platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor blockade and low-dose heparin during percutaneous coronary revascularization. *N Engl J Med.* 1997 Jun 12;336(24):1689-96.

The ERASER Investigators. Acute platelet inhibition with abciximab does not reduce in-stent restenosis (ERASER study). *Circulation.* 1999 Aug 24;100(8):799-806.

Farb A, Burke AP, Kolodgie FD, Virmani R. Pathological mechanisms of fatal late coronary stent thrombosis in humans. *Circulation.* 2003 Oct 7;108(14):1701-6. Epub 2003 Sep 22

Favaloro RG. Landmarks in the development of coronary artery bypass surgery. *Circulation.* 1998 Aug 4;98(5):466-78.

Feit F, Voeltz MD, Attubato MJ, Lincoff AM, Chew DP, Bittl JA, Topol EJ, Manoukian SV. Predictors and impact of major hemorrhage on mortality following percutaneous coronary intervention from the REPLACE-2 Trial. *Am J Cardiol.* 2007 Nov 1;100(9):1364-9.

Fontana P, Dupont A, Gandrille S, Bachelot-Loza C, Reny JL, Aiach M, Gaussem P. Adenosine diphosphate-induced platelet aggregation is associated with P2Y12 gene sequence variations in healthy subjects. *Circulation.* 2003 Aug 26;108(8):989-95.

Forrester JS, Fishbein M, Helfant R, Fagin J. A paradigm for restenosis based on cell biology: clues for the development of new preventive therapies. *J Am Coll Cardiol.* 1991 Mar 1;17(3):758-69.

Frenette PS, Denis CV, Weiss L, Jurk K, Subbarao S, Kehrel B, Hartwig JH, Vestweber D, Wagner DD. P-Selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL-1) is expressed on platelets and can mediate platelet-endothelial interactions in vivo. *J Exp Med.* 2000 Apr 17;191(8):1413-22.

Frenette PS, Moyna C, Hartwell DW, Lowe JB, Hynes RO, Wagner DD. Platelet-endothelial interactions in inflamed mesenteric venules. *Blood.* 1998 Feb 15;91(4):1318-24.

Frenette PS, et al. Platelets roll on stimulated endothelium in vivo: an interaction mediated by endothelial P-selectin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995 Aug 1;92(16):7450-4.

Gaede P, Johnson RC, Hynes RO, Wagner DD. Multifactorial intervention and cardiovascular disease in patients with type 2 diabetes. *N Engl J Med.* 2003 Jan 30;348(5):383-93.

Gawaz M, Stellos K, Langer HF. Platelets modulate atherogenesis and progression of atherosclerotic plaques via interaction with progenitor and dendritic cells. *J Thromb Haemost.* 2008 Feb;6(2):235-42. Epub 2007 Dec 10.

Gawaz M. Role of platelets in coronary thrombosis and reperfusion of ischemic myocardium. *Cardiovasc Res.* 2004 Feb 15;61(3):498-511.

Gawaz M, Langer H, May AE. Platelets in inflammation and atherogenesis. *J Clin Invest.* 2005 Dec;115(12):3378-84.

Gawaz M, Neumann FJ, Schomig A. Evaluation of platelet membrane glycoproteins in coronary artery disease : consequences for diagnosis and therapy *Circulation.* 1999 Jan 5;99(1):E1-E11.

Gawaz Meinrad. *Das Blutplättchen.* Thieme, Stuttgart 1999.

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 Aug;76(2):166-72.

Geisler T, , Grass D, Bigalke B, Stellos K, Drosch T, Dietz K, Herdeg C, Gawaz M. The Residual Platelet Aggregation after Deployment of Intracoronary Stent (PREDICT) score. *J Thromb Haemost.* 2008 Jan;6(1):54-61.

Gibbons GH, Dzau VJ. The emerging concept of vascular remodeling. *N Engl J Med.* 1994 May 19;330(20):1431-8.

Gorchakova O, von Beckerath N, Gawaz M, Mocz A, Joost A, Schömig A, Kastrati A. Antiplatelet effects of a 600 mg loading dose of clopidogrel are not attenuated in patients receiving atorvastatin or simvastatin for at least 4 weeks prior to coronary artery stenting. *Eur Heart J.* 2004 Nov;25(21):1898-902.

Grayburn PA, Willard JE, Brickner ME, Eichhorn EJ. In vivo thrombus formation on a guidewire during intravascular ultrasound imaging: evidence for inadequate heparinization. *Cathet Cardiovasc Diagn.* 1991 Jun;23(2):141-3.

Greenbaum AB, Grines CL, Bittl JA, Becker RC, Kereiakes DJ, Gilchrist IC, Clegg J, Stankowski JE, Grogan DR, Harrington RA, Emanuelsson H, Weaver WD. Initial experience with an intravenous P2Y12 platelet receptor antagonist in patients undergoing percutaneous coronary intervention: results from a 2-part, phase II, multicenter, randomized, placebo- and active-controlled trial. *Am Heart J.* 2006 Mar;151(3):689.e1-689.e10.

Grewe PH, Deneke T, Machraoui A, Barmeyer J, Müller KM. Acute and chronic tissue response to coronary stent implantation: pathologic findings in human specimen. *J Am Coll Cardiol.* 2000 Jan;35(1):157-63.

Grundy SM, Benjamin IJ, Burke GL, Chait A, Eckel RH, Howard BV, Mitch W, Smith SC Jr, Sowers JR.

Diabetes and cardiovascular disease: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association. *Circulation*. 1999 Sep 7;100(10):1134-46.

Grundy SM. Obesity, metabolic syndrome, and coronary atherosclerosis. *Circulation*. 2002;105:2696-2698.

Grüntzig AR, Senning A, Siegenthaler WE. Nonoperative dilatation of coronary-artery stenosis: percutaneous transluminal coronary angioplasty. *N Engl J Med*. 1979 Jul 12;301(2):61-8.

Guggenmoos-Holzmann I, W.K (1995). *Medizinische Statistik*. Berlin/Wien, Blackwell Wissenschaftsverlag.

Gurbel PA, Becker RC, Mann KG, Steinhubl SR, Michelson AD.

Platelet function monitoring in patients with coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol*. 2007 Nov 6;50(19):1822-34.

Gurbel PA, Tantry US. Drug insight: Clopidogrel nonresponsiveness. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*. 2006 Jul;3(7):387-95.

Gurbel PA, Bliden KP, Hayes KM, Yoho JA, Herzog WR, Tantry US.

The relation of dosing to clopidogrel responsiveness and the incidence of high post-treatment platelet aggregation in patients undergoing coronary stenting. *J Am Coll Cardiol*. 2005 May 3;45(9):1392-6.

Gurbel PA, Bliden KP, Hayes KM, Tantry U.

I. Platelet activation in myocardial ischemic syndromes. *Expert Rev Cardiovasc Ther*. 2004 Jul;2(4):535-45.

Hannan EL, Racz MJ, Walford G, Jones RH, Ryan TJ, Bennett E, Culliford AT, Isom OW, Gold JP, Rose EA. Long-term outcomes of coronary-artery bypass grafting versus stent implantation. *N Engl J Med*. 2005 May 26;352(21):2174-83.

Harding SA, Din JN, Sarma J, Josephs DH, Fox KA, Newby DE. Promotion of proinflammatory interactions between platelets and monocytes by unfractionated heparin. *Heart*. 2006 Nov;92(11):1635-8.

Harker LA, Roskos LK, Marzec UM, Carter RA, Cherry JK, Sundell B, Cheung EN, Terry D, Sheridan W. Effects of megakaryocyte growth and development factor on platelet production, platelet life span, and platelet function in healthy human volunteers. *Blood*. 2000 Apr 15;95(8):2514-22.

Hartley PS, Savill J, Brown SB. The death of human platelets during incubation in citrated plasma involves shedding of CD42b and aggregation of dead platelets. *Thromb Haemost*. 2006 Jan;95(1):100-6.

Heinrich D, Görg T, Schulz Effects of unfractionated and fractionated heparin on platelet function. *Haemostasis*. 1988;18 Suppl 3:48-54.

Henn V, Steinbach S, Büchner K, Presek P, Kroczeck RA. The inflammatory action of CD40 ligand (CD154) expressed on activated human platelets is temporally limited by coexpressed CD40. *Blood*. 2001 Aug 15;98(4):1047-54.

Henn V, Slupsky JR, Gräfe M, Anagnostopoulos I, Förster R, Müller-Berghaus G, Kroczeck RA. CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature*. 1998 Feb 5;391(6667):591-4.

Hennan JK, Swillo RE, Morgan GA, Leik CE, Brooks JM, Shaw GD, Schaub RG, Crandall DL, Vlasuk GP. Pharmacologic inhibition of platelet vWF-GPIb alpha interaction prevents coronary artery thrombosis. *Thromb Haemost*. 2006 Mar;95(3):469-75.

Hermann A, Rauch BH, Braun M, Schrör K, Weber AA. Platelet CD40 ligand (CD40L)--subcellular localization, regulation of expression, and inhibition by clopidogrel. *Platelets*. 2001 Mar;12(2):74-82.

Hirsh J, Anand SS, Halperin JL, Fuster V; American Heart Association. Guide to anticoagulant therapy: Heparin : a statement for healthcare professionals from the American Heart Association. *Circulation*. 2001 Jun 19;103(24):2994-3018.

Hochholzer W, Trenk D, Bestehorn HP, Fischer B, Valina CM, Ferenc M, Gick M, Caputo A, Büttner HJ, Neumann FJ. Impact of the degree of peri-interventional platelet inhibition after loading with clopidogrel on early clinical outcome of elective coronary stent placement. *J Am Coll Cardiol*. 2006 Nov 7;48(9):1742-50.

Hojo Y, Ikeda U, Katsuki T, Mizuno O, Fukazawa H, Kurosaki K, Fujikawa H, Shimada K. Interleukin 6 expression in coronary circulation after coronary angioplasty as a risk factor for restenosis. *Heart*. 2000 Jul;84(1):83-7.

Hwang J-J, Dzau VJ, Liew C-C. Genomics and the pathophysiology of heart failure. *Curr Cardiol Rep*. 2001;3:198-207.

Inoue T, Sakai Y, Hoshi K, Yaguchi I, Fujito T, Morooka S. Lower expression of neutrophil adhesion molecule indicates less vessel wall injury and might explain lower restenosis rate after cutting balloon angioplasty. *Circulation*. 1998 Jun 30;97(25):2511-8.

Inoue T, Uchida T, Yaguchi I, Sakai Y, Takayanagi K, Morooka S. Stent-induced expression and activation of the leukocyte integrin MAC-1 is associated with neointimal thickening and restenosis. *Circulation*. 2003 Apr 8;107(13):1757-63.

ISIS-2 (Second International Study of Infarct Survival) Collaborative Group. Randomised trial of intravenous streptokinase, oral aspirin, both, or neither among 17,187 cases of suspected acute myocardial infarction: ISIS-2. *Lancet*. 1988 Aug 13;2(8607):349-60.

Itoh K, Nakao A, Kishimoto W, Takagi H. Heparin effects on superoxide production by neutrophils. *Eur Surg Res*. 1995;27(3):184-8.

Jackson SP. The growing complexity of platelet aggregation. *Blood*. 2007 Jun 15;109(12):5087-95. Epub 2007 Feb 20.

Jin J, Daniel JL, Kunapuli SP. Molecular basis for ADP-induced platelet activation. II. The P2Y1 receptor mediates ADP-induced intracellular calcium mobilization and shape change in platelets. *J Biol Chem*. 1998 Jan 23;273(4):2030-4.

Jurk K., Kehrel B.E. Die Rolle von Thrombozyten bei Hämostase, Thrombose, Immunabwehr und Entzündung. *Dtsch Med Wochenschr* 2008;133:1130-1135.

Karvouni E, Katriasis DG, Ioannidis JP. Intravenous glycoprotein IIb/IIIa receptor antagonists reduce mortality after percutaneous coronary interventions. *J Am Coll Cardiol*. 2003 Jan 1;41(1):26-32.

Kastrati A, Mehilli J, Schühlen H, Dirschinger J, Dotzer F, ten Berg JM, Neumann FJ, Bollwein H, Volmer C, Gawaz M, Berger PB, Schömig A. Intracoronary Stenting and Antithrombotic Regimen-Rapid Early Action for Coronary Treatment Study Investigators. A clinical trial of abciximab in elective percutaneous coronary intervention after pretreatment with clopidogrel. *N Engl J Med*. 2004 Jan 15;350(3):232-8.

Kastrati A, Koch W, Berger PB, Mehilli J, Stephenson K, Neumann FJ, von Beckerath N, Böttiger C, Duff GW, Schömig A. Protective role against restenosis from an interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphism in patients treated with coronary stenting. *J Am Coll Cardiol*. 2000 Dec;36(7):2168-73.

Kastrati A, Mehilli J, Schühlen H, Dirschinger J, Dotzer F, ten Berg JM, Neumann FJ, Bollwein H, Volmer C, Gawaz M, Berger PB, Schömig A; Intracoronary Stenting and Antithrombotic Regimen-Rapid Early Action for Coronary Treatment Study Investigators. A clinical trial of abciximab in elective percutaneous coronary intervention after pretreatment with clopidogrel. *N Engl J Med*. 2004 Jan 15;350(3):232-8.

Katzen BT, Ardid MI, MacLean AA, Kovacs MF, Zemel G, Benenati JF, Powell A, Samuels S. Bivalirudin as an anticoagulation agent: safety and efficacy in peripheral interventions. *J Vasc Interv Radiol*. 2005 Sep;16(9):1183-7;

Kawai C. Pathogenesis of acute myocardial infarction. Novel regulatory systems of bioactive substances in the vessel wall. *Circulation*. 1994 Aug;90(2):1033-43.

K.-D. Wernecke. *Angewandte Statistik für die Praxis*. Addison-Wesley, Bonn, 1995.

Keating FK, Dauerman HL, Whitaker DA, Sobel BE, Schneider DJ. The effects of bivalirudin compared with those of unfractionated heparin plus eptifibatide on inflammation and thrombin generation and activity during coronary intervention. *Coron Artery Dis*. 2005 Sep;16(6):401-5.

Keating FK, Dauerman HL, Whitaker DA, Sobel BE, Schneider DJ. Increased expression of platelet P-selectin and formation of platelet-leukocyte aggregates in blood from patients treated with unfractionated heparin plus eptifibatide compared with bivalirudin. *Thromb Res*. 2006;118(3):361-9.

Keeley EC, Boura JA, Grines CL. Primary angioplasty versus intravenous thrombolytic therapy for acute myocardial infarction: a quantitative review of 23 randomised trials. *Lancet*. 2003 Jan 4;361(9351):13-20.

Kent KM, Bentivoglio LG, Block PC, Cowley MJ, Dorros G, Gosselin AJ, Gruntzig A, Myler RK, Simpson J, Stertzer SH, Williams DO, Fisher L, Gillespie MJ, Detre K, Kelsey S, Mullin SM, Mock MB. Percutaneous transluminal coronary angioplasty: report from the Registry of the National Heart, Lung, and Blood Institute. *Am J Cardiol*. 1982 Jun;49(8):2011-20.

Klinkhardt U, Bauersachs R, Adams J, Graff J, Lindhoff-Last E, Harder S. Clopidogrel but not aspirin reduces P-selectin expression and formation of platelet-leukocyte aggregates in patients with atherosclerotic vascular disease. *Clin Pharmacol Ther*. 2003 Mar;73(3):232-41.

Knoops KT, de Groot LC, Kromhout D, Perrin AE, Moreiras-Varela O, Menotti A, van Staveren WA. Mediterranean diet, lifestyle factors, and 10-year mortality in elderly European men and women: the HALE project. *JAMA*. 2004 Sep 22;292(12):1433-9.

Kong DF, Topol EJ, Bittl JA, White HD, Thérroux P, Hasselblad V, Califf RM. Clinical outcomes of bivalirudin for ischemic heart disease. *Circulation*. 1999 Nov 16;100(20):2049-53.

Kornowski R, Hong MK, Tio FO, Bramwell O, Wu H, Leon MB. In-stent restenosis: contributions of inflammatory responses and arterial injury to neointimal hyperplasia. *J Am Coll Cardiol*. 1998 Jan;31(1):224-30.

Kowalski J, Kośmider M, Pawlicki L, Głowacka E, Banasik M, Baj Z, Cieciewicz J, Paśnik J. Complement activates neutrophils during PTCA procedure in patients with unstable angina pectoris. *Int J Cardiol*. 1997 Feb;58(3):229-40.

Koyama H, Maeno T, Fukumoto S, Shoji T, Yamane T, Yokoyama H, Emoto M, Shoji T, Tahara H, Inaba M, Hino M, Shioi A, Miki T, Nishizawa Y.. Platelet P-selectin expression is associated with atherosclerotic wall thickness in carotid artery in humans. *Circulation*. 2003 Aug 5;108(5):524-9.

Kozek-Langenecker SA: Direkte Thrombininhibitoren. *Der Anaesthesist* 2008. Springer Medizin Verlag. S1-10.

Langer HF, Gawaz M. Platelet-vessel wall interactions in atherosclerotic disease. *Thromb Haemost*. 2008 Mar;99(3):480-6.

Lau D, Mollnau H, Eiserich JP, Freeman BA, Daiber A, Gehling UM, Brümmer J, Rudolph V, Münzel T, Heitzer T, Meinertz T, Baldus S. Myeloperoxidase mediates neutrophil activation by association with CD11b/CD18 integrins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Jan 11;102(2):431-6.

Law MR, Wald NJ, Rudnicka AR. Quantifying effect of statins on low density lipoprotein cholesterol, ischaemic heart disease, and stroke: systematic review and meta-analysis. *BMJ*. 2003 Jun 28;326(7404):1423.

Lehman SJ, Chew DP. Bivalirudin in percutaneous coronary intervention. *Vasc Health Risk Manag.* 2006;2(4):357-63.

Lever R, Hoult JR, Page CP. The effects of heparin and related molecules upon the adhesion of human polymorphonuclear leucocytes to vascular endothelium in vitro. *Br J Pharmacol.* 2000 Feb;129(3):533-40.

Lewis HD Jr, Davis JW, Archibald DG, Steinke WE, Smitherman TC, Doherty JE 3rd, Schnaper HW, LeWinter MM, Linares E, Pouget JM, Sabharwal SC, Chesler E, DeMots H. Protective effects of aspirin against acute myocardial infarction and death in men with unstable angina. Results of a Veterans Administration Cooperative Study. *N Engl J Med.* 1983 Aug 18;309(7):396-403.

Li G, Sanders JM, Bevard MH, Sun Z, Chumley JW, Galkina EV, Ley K, Sarembock IJ. CD40 ligand promotes MAC-1 expression, leukocyte recruitment, and neointima formation after vascular injury. *Am J Pathol.* 2008 Apr;172(4):1141-52.

Li G, Keenan AC, Young JC, Hall MJ, Pamuklar Z, Ohman EM, Steinhubl SR, Smyth SS. Effects of unfractionated heparin and glycoprotein IIb/IIIa antagonists versus bivalirudin on myeloperoxidase release from neutrophils. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007 Aug;27(8):1850-6.

Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation.* 2002 Mar 5;105(9):1135-43.

Lincoff AM, Kleiman NS, Kereiakes DJ, Feit F, Bittl JA, Jackman JD, Sarembock IJ, Cohen DJ, Spriggs D, Ebrahimi R, Keren G, Carr J, Cohen EA, Betriu A, Desmet W, Rutsch W, Wilcox RG, de Feyter PJ, Vahanian A, Topol EJ REPLACE-2 Investigators. Long-term efficacy of bivalirudin and provisional glycoprotein IIb/IIIa blockade vs heparin and planned glycoprotein IIb/IIIa blockade during percutaneous coronary revascularization: REPLACE-2 randomized trial. *JAMA.* 2004 Aug 11;292(6):696-703.

Lincoff AM, Bittl JA, Kleiman NS, Sarembock IJ, Jackman JD, Mehta S, Tannenbaum MA, Niederman AL, Bachinsky WB, Tift-Mann J 3rd, Parker HG, Kereiakes DJ, Harrington RA, Feit F, Maierson ES, Chew DP, Topol EJ REPLACE-1 Investigators. Comparison of bivalirudin versus heparin during percutaneous coronary intervention (the Randomized Evaluation of PCI Linking Angiomax to Reduced Clinical Events [REPLACE]-1 trial). *Am J Cardiol.* 2004 May 1;93(9):1092-6.

Lincoff AM, Bittl JA, Harrington RA, Feit F, Kleiman NS, Jackman JD, Sarembock IJ, Cohen DJ, Spriggs D, Ebrahimi R, Keren G, Carr J, Cohen EA, Betriu A, Desmet W, Kereiakes DJ, Rutsch W, Wilcox RG, de Feyter PJ, Vahanian A, Topol EJ REPLACE-2 Investigators. Bivalirudin and provisional glycoprotein IIb/IIIa blockade compared with heparin and planned glycoprotein IIb/IIIa blockade during percutaneous coronary intervention: REPLACE-2 randomized trial. *JAMA.* 2003 Feb 19;289(7):853-63.

Lincoff AM, Kleiman NS, Kottke-Marchant K, Maierson ES, Maresh K, Wolski KE, Topol EJ. Bivalirudin with planned or provisional abciximab versus low-dose heparin and abciximab during percutaneous coronary revascularization: results of the Comparison of Abciximab Complications with Hirulog for Ischemic Events Trial (CACHET). *Am Heart J.* 2002 May;143(5):847-53.

Lindemann S, Krämer B, Daub K, Stellos K, Gawaz M. Molecular pathways used by platelets to initiate and accelerate atherogenesis. *Curr Opin Lipidol.* 2007 Oct;18(5):566-73.

Lindemann S, Tolley ND, Dixon DA, McIntyre TM, Prescott SM, Zimmerman GA, Weyrich AS. Activated platelets mediate inflammatory signaling by regulated interleukin 1beta synthesis. *J Cell Biol.* 2001 Aug 6;154(3):485-90.

Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature* 2000; 407:233-241.

Mackie, IJ, Neal, CR. *The Platelet. Platelet-vessel wall interactions (The Bloomsbury series in clinical science).* Springer Verlag Berlin, Heidelberg; 1988: 1-32.

Mahaffey KW, Lewis BE, Wildermann NM, Berkowitz SD, Oliverio RM, Turco MA, Shalev Y, Ver Lee P, Traverse JH, Rodriguez AR, Ohman EM, Harrington RA, Califf RM; ATBAT Investigators. The anticoagulant therapy with bivalirudin to assist in the performance of percutaneous coronary intervention in patients with heparin-induced thrombocytopenia (ATBAT) study: main results. *J Invasive Cardiol.* 2003 Nov;15(11):611-6.

Manoukian SV, Feit F, Mehran R, Voeltz MD, Ebrahimi R, Hamon M, Dangas GD, Lincoff AM, White HD, Moses JW, King SB 3rd, Ohman EM, Stone GW. Impact of major bleeding on 30-day mortality and clinical outcomes in patients with acute coronary syndromes: an analysis from the ACUITY Trial. *J Am Coll Cardiol.* 2007 Mar 27;49(12):1362-8.

Massberg S, Brand K, Grüner S, Page S, Müller E, Müller I, Bergmeier W, Richter T, Lorenz M, Konrad I, Nieswandt B, Gawaz M. A critical role of platelet adhesion in the initiation of atherosclerotic lesion formation. *J Exp Med.* 2002 Oct 7;196(7):887-96.

May AE, Seizer P, Gawaz M. Platelets: inflammatory firebugs of vascular walls. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008 Mar;28(3):s5-10.

Mehta SR, Yusuf S, Peters RJ, Bertrand ME, Lewis BS, Natarajan MK, Malmberg K, Rupprecht H, Zhao F, Chrolavicius S, Copland I, Fox KA; Clopidogrel in Unstable angina to prevent Recurrent Events trial (CURE) Investigators. Effects of pretreatment with clopidogrel and aspirin followed by long-term therapy in patients undergoing percutaneous coronary intervention: the PCI-CURE study. *Lancet.* 2001 Aug 18;358(9281):527-33.

Michelson AD. Flow cytometry: a clinical test of platelet function. *Blood.* 1996 Jun 15;87(12):4925-36.

Morel O, Toti F, Hugel B, Freyssinet JM. Cellular microparticles: a disseminated storage pool of bioactive vascular effectors. *Curr Opin Hematol*. 2004 May;11(3):156-64.

Moses JW, Leon MB, Popma JJ, Fitzgerald PJ, Holmes DR, O'Shaughnessy C, Caputo RP, Kereiakes DJ, Williams DO, Teirstein PS, Jaeger JL, Kuntz RE; SIRIUS Investigators. Sirolimus-eluting stents versus standard stents in patients with stenosis in a native coronary artery. *N Engl J Med*. 2003 Oct 2;349(14):1315-23.

Mousa SA. Heparin, low molecular weight heparin, and derivatives in thrombosis, angiogenesis, and inflammation: emerging links. *Semin Thromb Hemost*. 2007 Jul;33(5):524-33.

Murray CJ, Lopez AD. Mortality by cause for eight regions of the world: Global Burden of Disease Study. *Lancet*. 1997 May 3;349(9061):1269-76.
Ndrepepa G, Berger PB, Mehilli J, Seyfarth M, Neumann FJ, Schömig A, Kastrati. Periprocedural bleeding and 1-year outcome after percutaneous coronary interventions: appropriateness of including bleeding as a component of a quadruple end point. *J Am Coll Cardiol*. 2008 Feb 19;51(7):690-7.

Nelson RM, Cecconi O, Roberts WG, Aruffo A, Linhardt RJ, Bevilacqua MP. Heparin oligosaccharides bind L- and P-selectin and inhibit acute inflammation. *Blood*. 1993 Dec 1;82(11):3253-8.

Nieswandt B, Watson SP. Platelet-collagen interaction: is GPVI the central receptor? *Blood*. 2003 Jul 15;102(2):449-61.

Nikol S, Huehns TY, Höfling B. Molecular biology and post-angioplasty restenosis. *Atherosclerosis*. 1996 Jun;123(1-2):17-31.

Noble S, Goa KL. Ticlopidine. A review of its pharmacology, clinical efficacy and tolerability in the prevention of cerebral ischaemia and stroke. *Drugs Aging*. 1996 Mar;8(3):214-32.

Oler A, Whooley MA, Oler J, Grady D. Adding heparin to aspirin reduces the incidence of myocardial infarction and death in patients with unstable angina. A meta-analysis. *JAMA*. 1996 Sep 11;276(10):811-5.

Oosta GM, Gardner WT, Beeler DL, Rosenberg RD. Multiple functional domains of the heparin molecule. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1981 Feb;78(2):829-33.

Ott I, Neumann FJ, Kenngott S, Gawaz M, Schömig A. Procoagulant inflammatory responses of monocytes after direct balloon angioplasty in acute myocardial infarction. *Am J Cardiol*. 1998 Oct 15;82(8):938-42.

Parry MA, Maraganore JM, Stone SR. Kinetic mechanism for the interaction of Hirulog with thrombin. *Biochemistry*. 1994 Dec 13;33(49):14807-14.

Patrono C. Aspirin as an antiplatelet drug. *N Engl J Med*. 1994 May 5;330(18):1287-94.

Patti G, Colonna G, Pasceri V, Pepe LL, Montinaro A, Di Sciascio G. Randomized trial of high loading dose of clopidogrel for reduction of periprocedural myocardial infarction in patients undergoing coronary intervention: results from the ARMYDA-2 (Antiplatelet therapy for Reduction of MYocardial Damage during Angioplasty) study. *Circulation*. 2005 Apr 26;111(16):2099-106.

Patti G, Di Sciascio G, D'Ambrosio A, Dicuonzo G, Abbate A, Dobrina A. Prognostic value of interleukin-1 receptor antagonist in patients undergoing percutaneous coronary intervention. *Am J Cardiol*. 2002 Feb 15;89(4):372-6.

Penz SM, Reininger AJ, Toth O, Deckmyn H, Brandl R, Siess W. Glycoprotein Ibalpha inhibition and ADP receptor antagonists, but not aspirin, reduce platelet thrombus formation in flowing blood exposed to atherosclerotic plaques. *Thromb Haemost*. 2007 Mar;97(3):435-43.

Peter K, Schwarz M, Conradt C, Nordt T, Moser M, Kübler W, Bode C. Heparin inhibits ligand binding to the leukocyte integrin MAC-1 (CD11b/CD18). *Circulation*. 1999 Oct 5;100(14):1533-9.

Petri B, Phillipson M, Kubes P. The physiology of leukocyte recruitment: an in vivo perspective. *J Immunol*. 2008 May 15;180(10):6439-46.

Pierce JW, Read MA, Ding H, Luscinskas FW, Collins T. Salicylates inhibit I kappa B-alpha phosphorylation, endothelial-leukocyte adhesion molecule expression, and neutrophil transmigration. *J Immunol*. 1996 May 15;156(10):3961-9.

Pietersma A, Kofflard M, de Wit LE, Stijnen T, Koster JF, Serruys PW, Sluiter W. Late lumen loss after coronary angioplasty is associated with the activation status of circulating phagocytes before treatment. *Circulation*. 1995 Mar 1;91(5):1320-5.

Pitsiolos S, Hunt J, Mohler ER, Prabhakar AM, Poncz M, Dawicki J, Khalapyan TZ, Wolfe ML, Fairman R, Mitchell M, Carpenter J, Golden MA, Cines DB, Sachais BS. Platelet factor 4 localization in carotid atherosclerotic plaques: correlation with clinical parameters. *Thromb Haemost*. 2003 Dec;90(6):1112-20.

Polgar J, J, Matuskova J, Wagner DD. The P-selectin, tissue factor, coagulation triad. *J Thromb Haemost*. 2005 Aug;3(8):1590-6.

Popma JJ, Satler LF, et al. Vascular complications after balloon and new device angioplasty. *Circulation*. 1993 Oct;88(4 Pt 1):1569-78.

Popma JJ, Berger P, Ohman EM, Harrington RA, Grines C, Weitz JI. Antithrombotic therapy during percutaneous coronary intervention: the Seventh ACCP Conference on Antithrombotic and Thrombolytic Therapy. *Chest*. 2004 Sep;126(3 Suppl):576S-599S.

Popma JJ, Suntharalingam M, Lansky AJ, Heuser RR, Speiser B, Teirstein PS, Massullo V, Bass T, Henderson R, Silber S, von Rottkay P, Bonan R, Ho KK, Osattin A, Kuntz RE; Stents And Radiation Therapy (START) Investigators. Randomized trial of ⁹⁰Sr/⁹⁰Y beta-radiation versus placebo control for treatment of in-stent restenosis. *Circulation*. 2002 Aug 27;106(9):1090-6.

Popma JJ, Satler LF. Early and late clinical outcome following coronary angioplasty performed with platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor inhibition: the EPIC Trial results. *J Invasive Cardiol*. 1994;6 Suppl A:19A-28A; discussion 45A-50A.

Quinn MJ, Bhatt DL, Zidar F, Vivekananthan D, Chew DP, Ellis SG, Plow E, Topol EJ. Effect of clopidogrel pretreatment on inflammatory marker expression in patients undergoing percutaneous coronary intervention. *Am J Cardiol*. 2004 Mar 15;93(6):679-84.

Rafael A., N.C.T., Valet G. (1994), Grundlagen der Durchflußzytometrie. Durchflußzytometrie in der klinischen Zelldiagnostik. Stuttgart, Schattauer. 1:3-94.

Reed MD, Bell D. Clinical pharmacology of bivalirudin. *Pharmacotherapy*. 2002 Jun;22(6 Pt 2):105S-111S.

Ridker PM, Cushman M, Stampfer MJ, Tracy RP, Hennekens CH. Inflammation, aspirin, and the risk of cardiovascular disease in apparently healthy men. *N Engl J Med*. 1997 Apr 3;336(14):973-9.

Rodriguez AE, Santaera O, Larribau M, Fernandez M, Sarmiento R, Perez Baliño, Newell JB, Roubin GS, Palacios IF. Coronary stenting decreases restenosis in lesions with early loss in luminal diameter 24 hours after successful PTCA. *Circulation*. 1995 Mar 1;91(5):1397-402.

Rogers C, Welt FG, Karnovsky MJ, Edelman ER. Monocyte recruitment and neointimal hyperplasia in rabbits. Coupled inhibitory effects of heparin. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1996 Oct;16(10):1312-8.

Rosenberg RD, Bauer KA. The heparin-antithrombin system: a natural anticoagulant mechanism. In: Colman RW, Hirsh J, Marder VJ, Salzman EW, eds. *Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice*. 3rd ed. Philadelphia, Pa: JB Lippincott Co; 1994:837-860.

Ross R. Atherosclerosis: an inflammatory disease. *N Engl J Med*. 1999;340:115-126.

Ross R, Glomset JA. The pathogenesis of atherosclerosis (first of two parts). *N Engl J Med*. 1976 Aug 12;295(7):369-77.

Ross R, Glomset JA. The pathogenesis of atherosclerosis (second of two parts). *N Engl J Med*. 1976 Aug 19;295(8):420-5.

Rozalski M, Nocun M, Watala C. Adenosine diphosphate receptors on blood platelets - potential new targets for antiplatelet therapy. *Acta Biochim Pol*. 2005;52(2):411-5.

Ruggeri ZM. Platelets in atherothrombosis. *Nat Med.* 2002 Nov;8(11):1227-34.

Salzman EW, Rosenberg RD, Smith MH, Lindon JN, Favreau L. Effect of heparin and heparin fractions on platelet aggregation. *J Clin Invest.* 1980 Jan;65(1):64-73.

Santoso S, Sachs UJ, Kroll H, Linder M, Ruf A, Preissner KT, Chavakis T. The junctional adhesion molecule 3 (JAM-3) on human platelets is a counterreceptor for the leukocyte integrin MAC-1. *J Exp Med.* 2002 Sep 2;196(5):679-91.

Saucedo JF, Aude W, Pacheco R, Thorn B, Matin Z, Husain K, Garza L. Inhibition of platelet aggregation with eptifibatid, bivalirudin, and heparin in patients undergoing percutaneous coronary intervention receiving clopidogrel pretreatment (The Pharmacodynamic Evaluation of Angiomax, Clopidogrel with or without INtegrilin [DEACON] study). *Am J Cardiol.* 2005 Jun 15;95(12):1453-6.

Saw J, Lincoff AM, eSmet W, Betriu A, Rutsch W, Wilcox RG, Kleiman NS, Wolski K, Topol EJ; REPLACE-2 Investigators. Lack of clopidogrel pretreatment effect on the relative efficacy of bivalirudin with provisional glycoprotein IIb/IIIa blockade compared to heparin with routine glycoprotein IIb/IIIa blockade: a REPLACE-2 substudy. *J Am Coll Cardiol.* 2004 Sep 15;44(6):1194-9.

Schömig A, Neumann FJ, Kastrati A, Schühlen H, Blasini R, Hadamitzky 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-artery stents. *N Engl J Med.* 1996 Apr 25;334(17):1084-9.

Schrör K. Thrombozyten. (Physis Spezial;67). Verlag Urban und Vogel, München; 1993.

Schwienhorst A. Direct thrombin inhibitors - a survey of recent developments. *Cell Mol Life Sci.* 2006 Dec;63(23):2773-91.

Segev A, Strauss BH, Tan M, Constance C, Langer A, Goodman SG. Canadian Acute Coronary Syndromes Registries Investigators. Predictors and 1-year outcome of major bleeding in patients with non-ST-elevation acute coronary syndromes: insights from the Canadian Acute Coronary Syndrome Registries. *Am Heart J.* 2005 Oct;150(4):690-4.

Serhan CN, Chiang N. Lipid-derived mediators in endogenous anti-inflammation and resolution: lipoxins and aspirin-triggered 15-epi-lipoxins. *ScientificWorldJournal.* 2002 Jan 22;2:169-204.

Serruys PW, de Jaegere P, Kiemeneij F, Macaya C, Rutsch W, Heyndrickx G, Emanuelsson H, Marco J, Legrand V, Materne P, et al. A comparison of balloon-expandable-stent implantation with balloon angioplasty in patients with coronary artery disease. Benestent Study Group. *N Engl J Med.* 1994 Aug 25;331(8):489-95.

Serrano CV Jr, Ramires JA, Venturinelli M, Arie S, D'Amico E, Zweier JL, Pileggi F, da Luz PL. Coronary angioplasty results in leukocyte and platelet activation with adhesion molecule expression. Evidence of inflammatory responses in coronary angioplasty. *J Am Coll Cardiol.* 1997 May;29(6):1276-83.

Sibbing D, Busch G, Braun S, Jawansky S, Schömig A, Kastrati A, Ott I, von Beckerath N. Impact of bivalirudin or unfractionated heparin on platelet aggregation in patients pretreated with 600 mg clopidogrel undergoing elective percutaneous coronary intervention. *Eur Heart J*. 2008 Jun;29(12):1504-9.

Sibbing D, Braun S, Jawansky S, Vogt W, Mehilli J, Schömig A, Kastrati A, von Beckerath N. Assessment of ADP-induced platelet aggregation with light transmission aggregometry and multiple electrode platelet aggregometry before and after clopidogrel treatment. *Thromb Haemost*. 2008 Jan;99(1):121-6.

Siegel-Axel DI, Gawaz M. Platelets and endothelial cells. *Semin Thromb Hemost*. 2007 Mar;33(2):128-35.

Simon DI, Chen Z, Xu H, Li CQ, Dong J, McIntire LV, Ballantyne CM, Zhang L, Furman MI, Berndt MC, López JA. Platelet glycoprotein Iba1 is a counterreceptor for the leukocyte integrin MAC-1 (MAC-1/CD18). *J Exp Med*. 2000 Jul 17;192(2):193-204.

Smith SC Jr, Feldman TE, Hirshfeld JW Jr, Jacobs AK, Kern MJ, King SB 3rd, Morrison DA, O'Neil WW, Schaff HV, Whitlow PL, Williams DO, Antman EM, Adams CD, Anderson JL, Faxon DP, Fuster V, Halperin JL, Hiratzka LF, Hunt SA, Nishimura R, Ornato JP, Page RL, Riegel B; American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines; ACC/AHA/SCAI Writing Committee to Update 2001 Guidelines for Percutaneous Coronary Intervention. ACC/AHA/SCAI 2005 guideline update for percutaneous coronary intervention: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (ACC/AHA/SCAI Writing Committee to Update 2001 Guidelines for Percutaneous Coronary Intervention). *Circulation*. 2006 Feb 21;113(7):e166-286.

Snoep JD, Hovens MM, Eikenboom JC, van der Bom JG, Jukema JW, Huisman MV. Clopidogrel nonresponsiveness in patients undergoing percutaneous coronary intervention with stenting: a systematic review and meta-analysis. *Am Heart J*. 2007 Aug;154(2):221-31.

Steinberg D, Witztum JL. Is the oxidative modification hypothesis relevant to human atherosclerosis? Do the antioxidant trials conducted to date refute the hypothesis? *Circulation*. 2002 Apr 30;105(17):2107-11.

Steinhubl SR, Charnigo R. Clopidogrel treatment prior to percutaneous coronary intervention: when enough isn't enough. *JAMA*. 2006 Apr 5;295(13):1581-2.

Steinhubl SR, Berger PB, Mann JT 3rd, Fry ET, DeLago A, Wilmer C, Topol EJ; CREDO Investigators. Clopidogrel for the Reduction of Events During Observation. Early and sustained dual oral antiplatelet therapy following percutaneous coronary intervention: a randomized controlled trial. *JAMA*. 2002 Nov 20;288(19):2411-20.

Stone GW, Witzenbichler B, Guagliumi G, Peruga JZ, Brodie BR, Dudek D, Kornowski R, Hartmann F, Gersh BJ, Pocock SJ, Dangas G, Wong SC, Kirtane AJ, Parise H, Mehran R; HORIZONS-AMI Trial Investigators. Bivalirudin during primary PCI in acute myocardial infarction. *N Engl J Med*. 2008 May 22;358(21):2218-30.

Stone GW, White HD, Ohman EM, Bertrand ME, Lincoff AM, McLaurin BT, Cox DA, Pocock SJ, Ware JH, Feit F, Colombo A, Manoukian SV, Lansky AJ, Mehran R, Moses JW; Acute Catheterization and Urgent Intervention Triage strategy (ACUITY) trial investigators. Bivalirudin in patients with acute coronary syndromes undergoing percutaneous coronary intervention: a subgroup analysis from the Acute Catheterization and Urgent Intervention Triage strategy (ACUITY) trial. *Lancet*. 2007 Mar 17;369(9565):907-19.

Stone GW, McLaurin BT, Cox DA, Bertrand ME, Lincoff AM, Moses JW, White HD, Pocock SJ, Ware JH, Feit F, Colombo A, Aylward PE, Cequier AR, Darius H, Desmet W, Ebrahimi R, Hamon M, Rasmussen LH, Rupprecht HJ, Hoekstra J, Mehran R, Ohman EM; ACUITY Investigators. Bivalirudin for patients with acute coronary syndromes. *N Engl J Med*. 2006 Nov 23;355(21):2203-16.

Storck J, Küsters B, Zimmermann ER. The tethered ligand receptor is the responsible receptor for the thrombin induced release of von Willebrand factor from endothelial cells (HUVEC). *Thromb Res*. 1995 Feb 1;77(3):249-58.

Storey RF, May JA, Heptinstall S. Potentiation of platelet aggregation by heparin in human whole blood is attenuated by P2Y12 and P2Y1 antagonists but not aspirin. *Thromb Res*. 2005;115(4):301-7.

Storey RF. The P2Y12 receptor as a therapeutic target in cardiovascular disease. *Platelets*. 2001 Jun;12(4):197-209.

Storey RF, Sanderson HM, White AE, May JA, Cameron KE, Heptinstall S. The central role of the P(2T) receptor in amplification of human platelet activation, aggregation, secretion and procoagulant activity. *Br J Haematol*. 2000 Sep;110(4):925-34.

Subramaniam M, Frenette PS, Saffaripour S, Johnson RC, Hynes RO, Wagner DD. Defects in hemostasis in P-selectin-deficient mice. *Blood*. 1996 Feb 15;87(4):1238-42.

Tan KT, Watson SP, Lip GY. The endothelium and platelets in cardiovascular disease: potential targets for therapeutic intervention. *Curr Med Chem Cardiovasc Hematol Agents*. 2004 Apr;2(2):169-78.

Taubert D, Berkels R, Grosser N, Schröder H, Gründemann D, Schömig E. Aspirin induces nitric oxide release from vascular endothelium: a novel mechanism of action. *Br J Pharmacol*. 2004 Sep;143(1):159-65.

Teixeira MM, Hellewell PG. Suppression by intradermal administration of heparin of eosinophil accumulation but not oedema formation in inflammatory reactions in guinea-pig skin. *Br J Pharmacol*. 1993 Dec;110(4):1496-500.

The Persantine-aspirin reinfarction study. The Persantine-aspirin Reinfarction Study (PARIS) research group. *Circulation*. 1980 Dec;62(6 Pt 2):V85-8.

Thomson C, Forbes CD, Prentice CR. The potentiation of platelet aggregation and adhesion by heparin in vitro and in vivo. *Clin Sci Mol Med*. 1973 Oct;45(4):485-94.

Topol EJ, Bonan R, Jewitt D, Sigwart U, Kakkar VV, Rothman M, de Bono D, Ferguson J, Willerson JT, Strony J, et al. Use of a direct antithrombin, hirulog, in place of heparin during coronary angioplasty. *Circulation*. 1993 May;87(5):1622-9.

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 Dec 11;354(9195):2019-24.

Toutouzas K, Colombo A, Stefanadis C. Inflammation and restenosis after percutaneous coronary interventions. *Eur Heart J*. 2004 Oct;25(19):1679-87.

Trumel C, Payraastre B, Plantavid M, Hechler B, Viala C, Presek P, Martinson EA, Cazenave JP, Chap H, Gachet C. A key role of adenosine diphosphate in the irreversible platelet aggregation induced by the PAR1-activating peptide through the late activation of phosphoinositide 3-kinase. *Blood*. 1999 Dec 15;94(12):4156-65.

Tulinsky A. Molecular Interactions of Thrombin. *Semin Thromb Hemost*. 1996;22(2):117-24.

Turnbull F; Blood Pressure Lowering Treatment Trialists' Collaboration. Effects of different blood-pressure-lowering regimens on major cardiovascular events: results of prospectively-designed overviews of randomised trials. *Lancet*. 2003 Nov 8;362(9395):1527-35.

Tyrrell DJ, Horne AP, Holme KR, Preuss JM, Page CP. Heparin in inflammation: potential therapeutic applications beyond anticoagulation. *Adv Pharmacol*. 1999;46:151-208.

U.K. prospective diabetes study (UKPDS) group. Effect of intensive blood-glucose control with metformin on complications in overweight patients with type 2 diabetes (UKPDS 34). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. *Lancet*. 1998 Sep 12;352(9131):854-65.

Van der Meijden PE, Feijge MA, Giesen PL, Huijberts M, van Raak LP, Heemskerk JW. Platelet P2Y₁₂ receptors enhance signalling towards procoagulant activity and thrombin generation. A study with healthy subjects and patients at thrombotic risk. *Thromb Haemost*. 2005 Jun;93(6):1128-36.

Van Kooten C, Banchereau J. CD40-CD40 ligand. *J Leukoc Biol*. 2000 Jan;67(1):2-17.

Wagner DD. New links between inflammation and thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005 Jul;25(7):1321-4.

Wagoner LE, Walsh RA. The cellular pathophysiology of progression to heart failure. *Curr Opin Cardiol.* 1996 May;11(3):237-44.

Wang K, Zhou Z, Zhou X, Tarakji K, Topol EJ, Lincoff AM. Prevention of intimal hyperplasia with recombinant soluble P-selectin glycoprotein ligand-immunoglobulin in the porcine coronary artery balloon injury model. *J Am Coll Cardiol.* 2001 Aug;38(2):577-82.

Weber C. Platelets and chemokines in atherosclerosis: partners in crime. *Circ Res.* 2005 Apr 1;96(6):612-6.

Weintraub WS. The pathophysiology and burden of restenosis. *Am J Cardiol.* 2007 Sep 3;100(5A):3K-9K. Epub 2007 Jun 26. Review

Weitz JI. Emerging anticoagulants for the treatment of venous thromboembolism. *Thromb Haemost.* 2006 Sep;96(3):274-84.

Weitz JI, Bates SM. New anticoagulants. *J Thromb Haemost.* 2005 Aug;3(8):1843-53.

Weitz JI, Hirsh J, Samama MM. New anticoagulant drugs: the Seventh ACCP Conference on Antithrombotic and Thrombolytic Therapy. *Chest.* 2004 Sep;126(3 Suppl):265S-286S.

Weitz JI, Buller HR. Direct thrombin inhibitors in acute coronary syndromes: present and future. *Circulation.* 2002 Feb 26;105(8):1004-11.

Weitz JI, Leslie B, Hudoba M. Thrombin binds to soluble fibrin degradation products where it is protected from inhibition by heparin-antithrombin but susceptible to inactivation by antithrombin-independent inhibitors. *Circulation.* 1998 Feb 17;97(6):544-52.

Welt FG, Tso C, Edelman ER, Kjelsberg MA, Paolini JF, Seifert P, Rogers C. Leukocyte recruitment and expression of chemokines following different forms of vascular injury. *Vasc Med.* 2003;8(1):1-7.

White CM. Thrombin-directed inhibitors: pharmacology and clinical use. *Am Heart J.* 2005 Jan;149(1 Suppl):S54-60.

White H; Hirulog and Early Reperfusion or Occlusion (HERO)-2 Trial Investigators. Thrombin-specific anticoagulation with bivalirudin versus heparin in patients receiving fibrinolytic therapy for acute myocardial infarction: the HERO-2 randomised trial. *Lancet.* 2001 Dec 1;358(9296):1855-63.

Wilcox JN, Okamoto EI, Nakahara KI, Vinten-Johansen J. Perivascular responses after angioplasty which may contribute to postangioplasty restenosis: a role for circulating myofibroblast precursors? *Ann N Y Acad Sci.* 2001 Dec;947:68-90

Wilde JI, Retzer M, Siess W, Watson SP. ADP-induced platelet shape change: an investigation of the signalling pathways involved and their dependence on the method of platelet preparation. *Platelets.* 2000 Aug;11(5):286-95.

Willoughby S, Holmes A, Loscalzo J. Platelets and cardiovascular disease. *Eur J Cardiovasc Nurs*. 2002 Dec;1(4):273-88.

Wiviott SD, Antman EM, Gibson CM, Montalescot G, Riesenmeyer J, Weerakkody G, Winters KJ, Warmke JW, McCabe CH, Braunwald E; TRITON-TIMI 38 Investigators. Evaluation of prasugrel compared with clopidogrel in patients with acute coronary syndromes: design and rationale for the TRial to assess Improvement in Therapeutic Outcomes by optimizing platelet Inhibition with prasugrel Thrombolysis In Myocardial Infarction 38 (TRITON-TIMI 38). *Am Heart J*. 2006 Oct;152(4):627-35.

Xiao Z, Thérroux P. Clopidogrel inhibits platelet-leukocyte interactions and thrombin receptor agonist peptide-induced platelet activation in patients with an acute coronary syndrome. *J Am Coll Cardiol*. 2004 Jun 2;43(11):1982-8.

Xiao Z, Thérroux P. Platelet activation with unfractionated heparin at therapeutic concentrations and comparisons with a low-molecular-weight heparin and with a direct thrombin inhibitor. *Circulation*. 1998 Jan 27;97(3):251-6.

Yasuda O, Takemura Y, Kawamoto H, Rakugi H. Aspirin: recent developments. *Cell Mol Life Sci*. 2008 Feb;65(3):354-8.

Zirlik A. CD40 ligand mediates inflammation independently of CD40 by interaction with MAC-1. *Circulation*. 2007 Mar 27;115(12):1571-80.

8. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Bivalente Bindung von Bivalirudin an das aktive Zentrum und an Exosite1 von Thrombin.

Abbildung 2: Studienprotokoll

Abbildung 3: Prinzip der aggregometrischen Messung. Überführung ruhender Thrombozyten in den aktivierten Zustand durch Zugabe von Thrombozytenaktivatoren (ADP, TRAP).

Abbildung 4: Funktionsprinzip des Cytometric Bead Array

Abbildung 5: ADP- und TRAP-induzierte Thrombozytenaggregation

Abbildung 6: Expression von P-Selectin und PAC-1

Abbildung 7: Expression von GPIIb/IIIa

Abbildung 8: Einfluss von Bivalirudin bzw. Heparin auf Monozyten und polymorphnukleäre Zellen.

9. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Ausschlusskriterien

Tabelle 2: Bedeutung des Streulichtes

Tabelle 3: Absorption, Emmission und Detektion verschiedener Fluorochrome

Tabelle 4: Verwendete Antikörper

Tabelle 5: Patientencharakteristika, Demographische und angiographische Daten der Studienteilnehmer

Tabelle 6: Zytokine (pg/ml)

10. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. med. Ilka Ott, die es mir ermöglicht hat, in der Forschungsgruppe der experimentellen Kardiologie des Deutschen Herzzentrums München, mitzuarbeiten und meine wissenschaftliche Dissertation betreut hat. Ihr ausdauernder Glaube an mich und geduldige Unterstützung war eine unerlässliche Stütze, diese Arbeit erfolgreich zum Abschluss zu bringen. Vielen herzlichen Dank dafür.

Herrn Prof. Dr. med. A. Schömig danke ich für die Möglichkeit diese Arbeit im Deutschen Herzzentrum, Klinik der Technischen Universität München, erstellen zu können.

Ebenso danke ich allen Mitgliedern der Forschungsgruppe, insbesondere der medizinisch technischen Assistentinnen, für ihre gute Zusammenarbeit und Unterstützung während meiner Doktorarbeit.

Ein herzlicher Dank geht vor allem an meine Mutter, ohne deren Hartnäckigkeit diese Arbeit kein Ende gefunden hätte, sowie an meinen lieben Mann, der durch sein Engagement und Unterstützung zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat und an Alle, die mich durch ihre aufmunternden Worte unterstützt haben.