

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

**Inhibition des Fibrinogenrezeptors  
und Auswirkungen auf die Thrombozytenfunktion  
- Experimentelle und klinische Befunde -**

Hans-Jörg Fischer

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

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier  
Prüfer der Dissertation: 1. apl. Prof. Dr. M. P. Gawaz  
2. Univ.-Prof. Dr. B. Gänsbacher

Die Dissertation wurde am 14.04.2003 bei der Technischen Universität  
München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 15.10.2003  
angenommen.

**Meinen Eltern gewidmet**

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	1
1.1	Bedeutung der Thrombozyten für die primäre Blutstillung.....	1
1.2	Physiologie der Thrombozyten.....	2
1.2.1	Thrombozytenmorphologie.....	2
1.2.2	Funktionsstadien der Plättchenaktivierung.....	3
1.2.3	Thrombozytäre Membranglykoproteine.....	7
1.2.4	Immunologische Marker der Plättchenaktivierung.....	11
1.3.	Pathophysiologie der Thrombozyten.....	14
1.3.1	Atherogenese und Progression der Atherosklerose.....	14
1.3.2	Akutes Koronarsyndrom und Myokardinfarkt.....	15
1.3.3	Fibrinolyse im akuten Myokardinfarkt.....	17
1.3.4	Reperfusion und Mikrozirkulation.....	19
1.3.5	Interventionelle Therapie.....	19
1.4	Antithrombozytäre Substanzen.....	20
1.5	Pharmakologisches Monitoring der antithrombozytären Therapie.....	24
1.6	Antithrombozytäre Therapie und Koronare Herzerkrankung.....	26
1.6.1	Therapie der akuten Koronarsyndrome.....	26
1.6.2	Thrombolyse im akuten Myokardinfarkt.....	28
1.6.3	Interventionelle Therapie.....	28
<b>2</b>	<b>Zielsetzung</b> .....	31
<b>3</b>	<b>Patienten und Methodik</b> .....	32
3.1	Differentielle Effekte von Abciximab auf die Thrombozytenfunktion.....	32
3.1.1	Charakteristika der Studienpopulation.....	32
3.1.2	Antithrombozytäre Therapie der Studienpatienten.....	35
3.1.3	Probengewinnung.....	37

3.1.4	Probenaufbereitung.....	38
3.1.5	Aggregometrische Untersuchung der Blutplättchen.....	39
3.1.6	Thrombozytäre Oberflächenmarker.....	43
3.1.7	Durchflußzytometrische Untersuchung der Blutplättchen.....	43
3.1.8	Statistische Auswertung.....	46
3.2	Einfluß von c7E3 auf die Thrombozytenfunktion <i>in vitro</i> .....	47
3.2.1	Aggregometrische Untersuchung von Thrombozyten.....	47
3.2.2	Probengewinnung.....	47
3.2.3	Probenaufbereitung.....	47
3.2.4	Messung.....	48
3.2.5	Durchflußzytometrische Untersuchung von Thrombozyten.....	48
3.2.6	Probengewinnung.....	48
3.2.7	Probenaufbereitung.....	49
3.2.8	Monoklonale Antikörper.....	51
3.2.9	Messung.....	51
3.3	Einfluß von c7E3 auf die Adhäsion von Thrombozyten.....	51
3.3.1	Herstellung von gewaschenen Thrombozyten.....	51
3.3.2	Herstellung der Mikrotiterplatten.....	52
3.3.3	Versuchsdurchführung.....	53
3.3.4	Statistische Auswertung.....	55
<b>4</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>56</b>
4.1	Differentielle Effekte von Abciximab auf die Thrombozytenfunktion.....	56
4.1.1	Einfluß auf die Aggregation.....	56
4.1.2	Einfluß auf die Degranulation und P-Selektin-Expression.....	59
4.1.3	Korrelation zwischen Aggregation und Fluoreszenz.....	63
4.2	Einfluß auf die Thrombozytenfunktion <i>in vitro</i> .....	64
4.2.1	Einfluß von verschiedenen c7E3 Konzentrationen <i>in vitro</i> .....	64
4.2.2	Einfluß verschiedener Inkubationszeiten <i>in vitro</i> .....	66
4.2.3	Oberflächendichte von GPIIb-IIIa-Rezeptoren.....	68
4.2.4	Degranulation und P-Selektin-Expression <i>in vitro</i> .....	71
4.2.5	Hirudin und Heparin als Zusatztherapie <i>in vitro</i> .....	74

4.3	Einfluß von c7E3 auf die Adhäsion von Thrombozyten.....	76
4.3.1	Primäre Adhäsion.....	76
4.3.2	Sekundäre Adhäsion.....	77
<b>5</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>78</b>
5.1	Differentielle Effekte von Abciximab auf die Thrombozytenfunktion bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt und <i>in vitro</i> .....	78
5.1.1	Interner Speicher von GPIIb-IIIa und Aggregation.....	79
5.1.2	Freisetzungsreaktion.....	80
5.2	Einfluß von Abciximab auf die Adhäsion von Thrombozyten.....	81
5.3	Studienbeschränkungen.....	82
5.4	Therapeutische Ausblicke.....	83
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>84</b>
<b>7</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>86</b>
7.1	Abkürzungsverzeichnis.....	86
7.2	Literaturverzeichnis.....	89
7.3	Abbildungsverzeichnis.....	97
7.4	Curriculum Vitae.....	100
7.5	Danksagung.....	102

### 1 Einleitung

#### 1.1 Bedeutung der Thrombozyten für die primäre Blutstillung

Blutplättchen spielen eine zentrale Rolle bei der primären Blutstillung, der Atherogenese, der Entwicklung von akuten Thrombosen und bei ischämischen Komplikationen (Harker *et al* 1987). Die komplexen Mechanismen der physiologischen Blutstillung ermöglichen bei ausreichender Funktion ihrer einzelnen Komponenten einen wirksamen Schutz gegen größere Blutverluste. Der Vorgang der Blutstillung ist dabei durch ein enges Zusammenspiel von vaskulären, zellulären und plasmatischen Vorgängen gekennzeichnet. Wichtigster Bestandteil der zellulären Komponente sind die Thrombozyten. Eine gestörte Funktion der Thrombozyten oder eine zu geringe Anzahl bergen das Risiko schwerer Blutungen. Unter physiologischen Bedingungen zirkulieren Blutplättchen in einem ruhenden Zustand, ohne miteinander zu aggregieren oder mit der Gefäßwand in Kontakt zu treten (Coller 1991, Fitzgerald *et al* 1987, Gawaz *et al* 1995). Bei einer Schädigung oder Verletzung der schützenden Endothelschicht werden subendotheliale Strukturen wie Kollagen oder der "von-Willebrand-Faktor" freigelegt und somit die Adhäsion der Plättchen ans Endothel ermöglicht (Ruggeri 1994, Sixma 1994). Die Adhäsion führt zur Aktivierung und Formveränderung der Thrombozyten. Gleichzeitig kommt es zu einer Veränderung an der Thrombozytenoberfläche und zur Anlagerung weiterer Thrombozyten, zur Aggregation (Sixma 1994). Während des Vorgangs der Aggregation kommt es zur Freisetzung von biologisch aktiven Substanzen (z.B. ADP), welche wiederum weitere Thrombozyten aktivieren und zur Aggregation anregen (Ruggeri 1994). Außerdem werden chemotaktische Stoffe freigesetzt, welche Leukozyten anlocken und zur Anlagerung an das Plättchenaggregat anregen. Die Interaktion zwischen zirkulierenden Thrombozyten mit Zellen der Gefäßwand kann durch die Freisetzung von Zytokinen, Wachstumsfaktoren und anderen biologisch aktiven Substanzen eine weitere Progression der thrombotischen Veränderungen bewirken. So kann es im geschädigten Bereich durch unkontrollierte Plättchenaktivierung und Aggregatbildung zu einem transienten thrombotischen Gefäßverschluß, oder durch permanenten Verschluß, zum Untergang des versorgten Myokardgewebes mit nachfolgendem Myokardinfarkt kommen.

## **1.2 Physiologie der Thrombozyten**

### **1.2.1 Thrombozytenmorphologie**

Thrombozyten sind kernlose, korpuskuläre Blutbestandteile und entstehen im Knochenmark aus Megakaryozyten. Sie zirkulieren mit einer durchschnittlichen Anzahl von 150.000 bis 400.000/ $\mu\text{l}$  für neun bis zehn Tage im peripheren Blut. Im ruhenden Zustand haben sie eine diskoidale Form und ein durchschnittliches Volumen von  $9,5 \mu\text{m}^3$ . Thrombozyten zeigen einen komplexen inneren Aufbau, den man nach Mackie (Mackie 1988) aufgrund morphologischer Kriterien in vier unterschiedliche Zonen einteilen kann:

#### **a) Periphere Zone**

Dieser Bereich besteht aus der trilaminären Zellmembran, die reich an Glykoproteinen ist. Diese Glykoproteine, die sich elektrophoretisch trennen lassen übernehmen als Oberflächenrezeptoren spezifische Funktionen.

#### **b) Strukturelle Zone**

Sie enthält das Zytoplasma und das Zytoskelett, das sich aus Mikrofilamenten, Mikrotubuli und submembranös gelagerten Aktinfilamenten zusammensetzt. Die Verankerung dieses fibrillären, kontraktiven Systems mit der Zellmembran ermöglicht dem stimulierten Thrombozyt aktive Formveränderungen und die Ausbildung von Pseudopodien.

#### **c) Zone der Zellorganellen**

In diesem Bereich befinden sich vor allem Mitochondrien, Golgi-Apparate, Ribosomen und eine höhere Anzahl an Granula. Bei den Granula werden Lysosomen, Alpha-Granula und Dichte Granula, welche elektronenmikroskopisch als dicht erscheinen, unterschieden. Alle Typen verschmelzen nach Aktivierung der Thrombozyten mit der Zellmembran und setzen zahlreiche hämostaserelevante Substanzen frei.

### **d) Membransysteme**

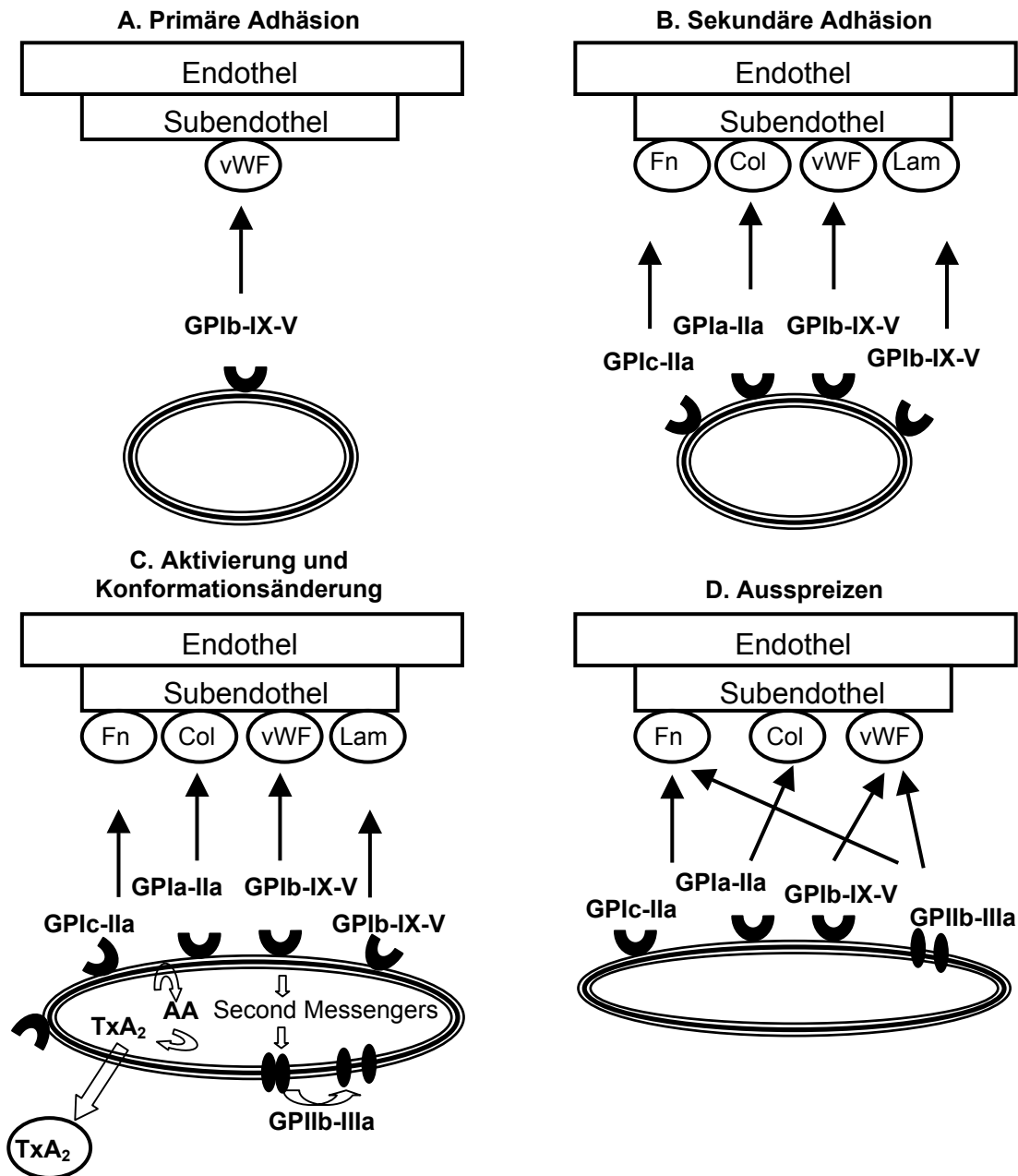
Es wurden bisher zwei verschiedene Membransysteme beschrieben, welche sich in Aufbau und Funktion unterscheiden. Das „Surface Connecting System“ bewirkt eine starke Vergrößerung der Zelloberfläche, während im „Dense Tubular System“ der Arachidonsäure-Metabolismus des Blutplättchens stattfindet. Zusätzlich bilden transzelluläre Membranstapel ein kanalikuläres System, welches mit der Plättchenoberfläche und mit dem Zellinneren verbunden ist und so dem Stoffaustausch dienen kann. Darüber hinaus kann es nach Aktivierung des Thrombozyten mit der Zellmembran verschmelzen, dadurch gelangen Glykoproteine, die als Membranrezeptoren fungieren können, an die Zelloberfläche. Dieses kanalikuläre System stellt somit ein Reservepotential an Glykoproteinen dar, den sogenannten Inneren Speicher der Glykoproteine (Charo *et al* 1987).

### **1.2.2 Funktionsstadien der Plättchenaktivierung**

Grundsätzlich lassen sich bei der Plättchenaktivierung zwei Funktionsstadien unterscheiden: die Adhäsion und die Aggregation. Die Adhäsion noch ruhender Blutplättchen an die verletzte Gefäßwand ist der erste Schritt der primären Hämostase und wird primäre Adhäsion genannt. Die primäre Adhäsion führt zur Formveränderung, Spreizung und Aktivierung der Plättchen mit nachfolgender Freisetzung der gespeicherten Sekrete aus Granula und der Bildung von Plättchenaggregaten. Die Anlagerung von bereits aktivierten Thrombozyten an die Strukturen des Subendothels wird als sekundäre Adhäsion bezeichnet (DeGroot *et al* 1990, Ruggeri 1994, Andrews *et al* 1997). Der Adhäsionsvorgang wird durch thrombozytäre Membranglykoproteine gesteuert. Dabei besitzen Blutplättchen eine Reihe von membranständigen Adhäsionsrezeptoren, welche spezifische Strukturkomponenten der extrazellulären Matrix erkennen. Durch den ersten Kontakt zirkulierender Thrombozyten mit der Oberfläche des Subendothels im Bereich einer Verletzung der Gefäßwand bindet der Glykoprotein-Ib/V/IX-Komplex mit kollagen-immobilisiertem „Von-Willebrand-Faktor“. Es kommt zur Anheftung der Blutplättchen an die Gefäßwand, zur sogenannten Kontaktphase (Nurden 1994). Über weitere membranständige Adhäsionsrezeptoren wie den Kollagen,



Fibronektin-, oder Lamininrezeptor (Rezeptorfamilie der Integrine) erfolgt eine Stabilisierung der Plättchenadhäsion. Der Kollagen-Rezeptor  $\alpha_2\beta_1$  ist ein bedeutender sekundärer Rezeptor für die Plättchen-Adhäsion.

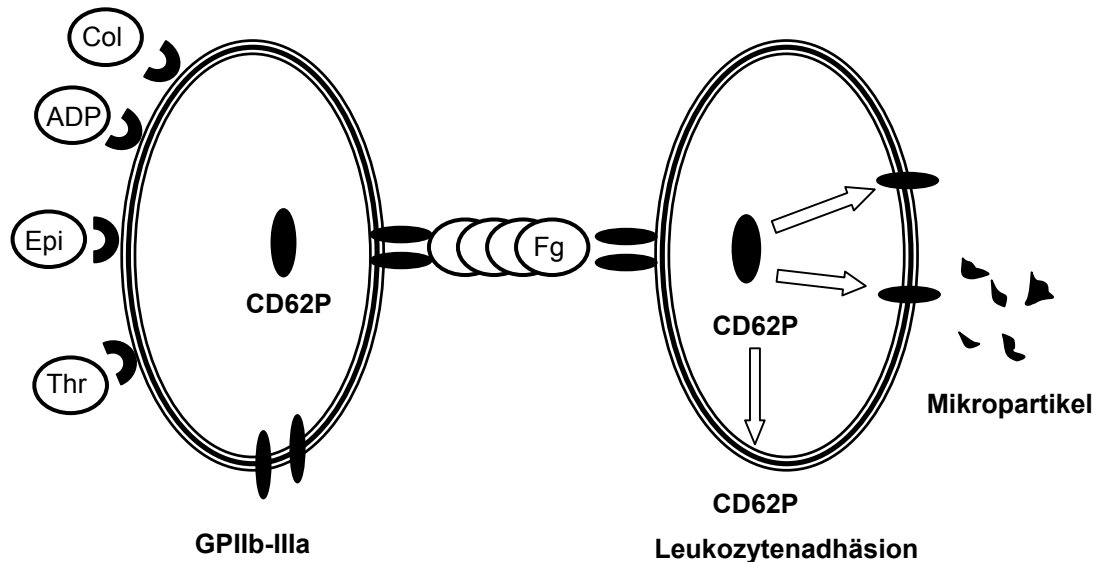


**Abbildung 1: Thrombozytenadhäsion**

Die Adhäsion findet über die abgebildeten unterschiedlichen Membranrezeptoren statt: Fn: Fibronektin; Kol: Kollagen; Lam: Laminin; vWF: von Willebrand-Faktor;  $TxA_2$ : Thromboxan  $A_2$ ; AA: Arachidonsäure

Die Interaktion zwischen  $\alpha_2\beta_1$  und Kollagen führt zur Aktivierung des Blutplättchens und zu dessen Formveränderung ("shape change") bis hin zur Ausbreitung über die verletzte Stelle. Während dieses Prozesses wird auch der Fibrinogen-Rezeptor GPIIb-IIIa aktiviert und stellt den engen Kontakt des ausgebreiteten Blutplättchens mit der Oberfläche sicher (Nurden 1994, Gawaz *et al* 1995). Dieser Vorgang bezeichnet die Phase der Aktivierung. Während der Formveränderung kommt es zur Bildung von Pseudopodien und zur Ausspreizung der Thrombozyten, dadurch wird eine effektive Abdichtung des Defektes der Gefäßwand gewährleistet. Der adhärenente und aktivierte Thrombozyt bildet aus freigesetzter Arachidonsäure (AA) den Botenstoff Thromboxan  $A_2$  ( $TxA_2$ ), welcher nach Abgabe in den Extrazellularraum über die Bindung an einen spezifischen Thromboxan-Rezeptor den Aktivierungsvorgang verstärkt. Außerdem werden bei der Aggregation Inhaltsstoffe freigesetzt, welche sowohl autokrin den Aktivierungsvorgang verstärken, als auch parakrin durch Stimulation noch ruhender Thrombozyten diese aus der Zirkulation rekrutieren und im Vorgang der "Plättchenrekrutierung" zur Aggregation an bereits adhärenente Blutplättchen anregen (Siess 1989). Die Interaktion von noch zirkulierenden Blutplättchen und schon adhärenenten Thrombozyten erfolgt über aktivierte GPIIb-IIIa-Rezeptoren. Das Endstadium der Adhäsion ist erreicht, wenn der Thrombozyt vollständig über dem Subendothel ausgespreizt ist (Nurden 1994). Aggregation nennt man den Vorgang der Koadhäsion zwischen zwei Thrombozyten. Lösliche Agonisten wie ADP oder  $TxA_2$  binden an Aktivierungsrezeptoren und induzieren, analog zur Adhäsion, über bestimmte Signaltransduktionswege eine Aktivierung und Formveränderung der Blutplättchen. Ein bedeutender Rezeptor für die Aggregation ist der Fibrinogen-Rezeptor GPIIb-IIIa. Die Aggregation kommt erst durch eine Konformationsänderung des GPIIb-IIIa zustande, die durch verschiedene Stimulanzien wie ADP, Thrombin oder Adrenalin bewirkt wird. Diese Konformationsänderung ermöglicht die Bindung von löslichem Fibrinogen an den GPIIb-IIIa-Rezeptor und damit an die Membran der Thrombozyten (Gawaz *et al* 1999). Im weiteren Verlauf bewirken Fibrinogenbrücken die Ausbildung von Plättchen-Aggregaten (Siess 1989, Ginsberg *et al* 1995, Gawaz *et al* 1991, Plow 1992). Es werden zwei Phasen der Aggregation unterschieden: die primäre und die sekundäre Aggregation. Während der primären Phase werden Thrombozyten über Fibrinogenbrücken in einem reversiblen Vorgang locker miteinander verbunden. Die

irreversible sekundäre Aggregation tritt verzögert nach Aggregationsbeginn auf. Sie beginnt, sobald der Thrombozyt Inhaltsstoffe aus Sekretgranula freisetzt (Siess 1997).



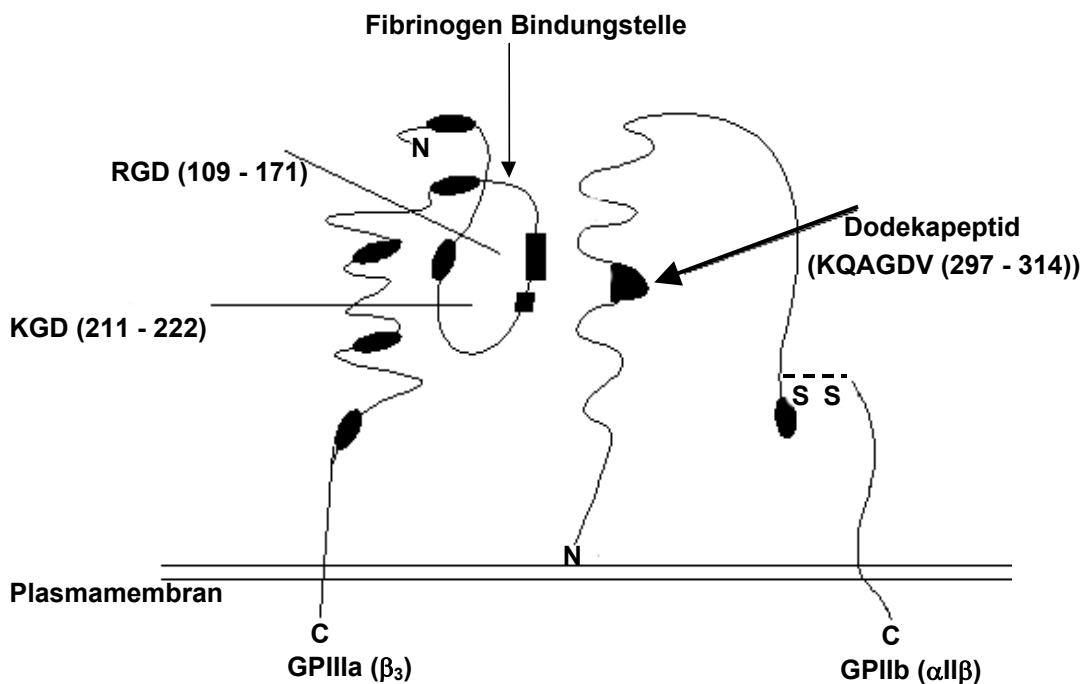
**Abbildung 2: Thrombozytenaggregation**

*Epi: Epinephrin; Kol: Kollagen; Thr: Thrombin; ADP: Adenosindiphosphat; Fg: Fibrinogen*

Die Adhäsion und die Aggregation lösen intrazelluläre Signalwirkungen aus, welche z.B. die Bildung und Sekretion von Thromboxan A<sub>2</sub>, Serotonin und ADP zur Folge haben. Diese Substanzen bewirken wiederum die Rekrutierung von weiteren Blutplättchen, eine Verengung der Blutgefäße und eine Verlangsamung des Blutflusses (Willerson *et al* 1989). Dadurch wird die Interaktion der Blutplättchen untereinander und auch die Anheftung der Thrombozyten an die Gefäßwand gesteigert (Siess 1989, Siess 1997). Zentrale Bedeutung für die Aggregation kommt dabei dem GPIIb-IIIa-Komplex auf der Thrombozytenoberfläche zu. Im ruhenden Zustand kann kein lösliches plasmatisches Fibrinogen an die Thrombozytenoberfläche binden. Erst nach Aktivierung des Blutplättchens kommt es im Bereich des GPIIb-IIIa-Komplexes zur Freilegung von Bindungsstellen für Fibrinogen.

### 1.2.3 Thrombozytäre Membranglykoproteine

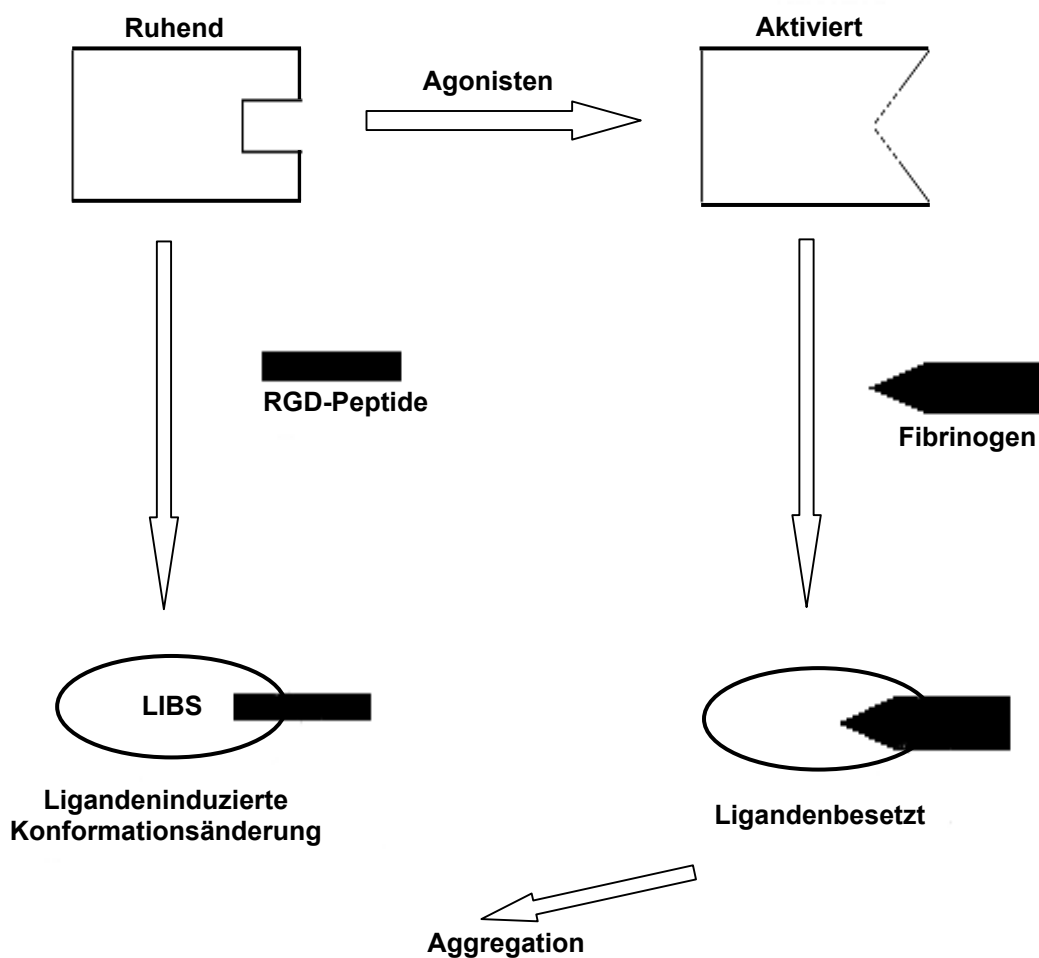
Die Mechanismen der Hämostase und Thrombose erfordern ein enges Zusammenspiel zwischen Thrombozyten, Endothel, plasmatischen Gerinnungs-faktoren und Strukturen der Gefäßwand. Adhäsionsvorgänge, die durch eine Vielzahl von spezifischen Adhäsions-rezeptoren reguliert werden, spielen dabei eine wesentliche Rolle. Das bedeutendste Membranglykoprotein ist der Fibrinogenrezeptor GPIIb-IIIa. Es befinden sich zwischen 60000 und 100 000 dieser Rezeptoren auf einem Blutplättchen (Gawaz *et al* 1991). 70-80% des GPIIb-IIIa sind im Ruhezustand auf der Plättchenoberfläche exprimiert, die restlichen 20-30% befinden sich im „surface connecting system“ (SCS) und in den intrazellulären  $\alpha$ -Granula (Nurden 1994, Morgenstern 1997). Bei Aktivierung der Blut- plättchen gelangt dieser innere Speicher an die Zelloberfläche (Woods *et al* 1986).



**Abbildung 3: Struktur des GPIIb-IIIa (Fibrinogenrezeptor)**

Der GPIIb-IIIa-Rezeptor ist ein Heterodimer und besteht aus einer  $\alpha$ -Untereinheit (GPIIb) und einer  $\beta$ -Untereinheit (GPIIIa) (Plow *et al* 1992). Bestimmte Aminosäure-

sequenzen, wie RGD oder KQAGDV, welche z.B. Bestandteil des Fibrinogen Moleküls sind, binden an spezifische Regionen des GPIIb-IIIa-Komplexes. RGD und KQAGDV enthaltende Peptide konkurrieren dabei mit Fibrinogen um eine gemeinsame Bindungsstelle (Plow *et al* 1992, Lefkovitz *et al* 1995). Es werden diskrete Funktionszustände des GPIIb-IIIa-Komplexes unterschieden: Unter physiologischen Verhältnissen tragen zirkulierende Blutplättchen einen ruhenden und nicht aktivierten GPIIb-IIIa-Rezeptor an der Oberfläche (= niedrigaffiner Funktionszustand).



**Abbildung 4: Aktivierungsstadien des Fibrinogenrezeptors GPIIb-IIIa**

*Dargestellt sind die beiden Möglichkeiten der LIBS-Induktion auf den GP I Ib-IIIa, sowie die RIBS-Induktion auf dem Fibrinogenmolekül.*

Im nichtaktivierten niedrigaffinen Zustand kann GPIIb-IIIa nur immobilisiertes, nicht aber lösliches plasmatisches Fibrinogen binden. Aktivierung der Thrombozyten führt zur raschen Konformationsänderung des GPIIb-IIIa-Komplexes und zur Freilegung von hochaffinen Fibrinogenbindungsstellen (= aktivierter, hochaffiner Zustand). Dadurch wird die Bindung von löslichem Fibrinogen an die Thrombozytenoberfläche ermöglicht (= ligandenbesetzter Funktionszustand). Andererseits können kleine, RGD-enthaltende Peptide auch aktivierungsunabhängig direkt an den GPIIb-IIIa-Komplex binden (Plow *et al* 1992). Beide Bindungsmöglichkeiten führen zu einer weiteren Konformationsänderung des GPIIb-IIIa und somit zum ligandenbesetzten Funktionszustand. Die RGD-Sequenz in Liganden verursacht demnach sowohl die Bindung, als auch eine sekundäre Konformationsänderung, die zur Expression von zusätzlichen Liganden-induzierten-Bindungsstellen (LIBS) führt (Plow *et al* 1992, Phillips *et al* 1991). Die ligandeninduzierte Konformationsänderung des Rezeptors reguliert Mechanismen, welche an der transmembranen Signaltransduktion und der irreversiblen Fibrinogenbindung an GPIIb-IIIa beteiligt sind. Kleine Peptide vom RGD- und KOAGDV-Typ oder synthetische Fibrinogenrezeptor-antagonisten, welche die sterischen Eigenschaften der Peptide imitieren, können an den nichtaktivierten GPIIb-IIIa-Rezeptor binden und zur Konformationsänderung führen (intrinsische Aktivität von GPIIb-IIIa-Antagonisten). Weitere Membranglykoproteine der Thrombozyten sind die  $\beta$ 1-Integrine, die als Rezeptoren für Kollagen, Fibronectin und Laminin fungieren (Plow *et al* 1992). Zwei weitere nicht-Integrin Rezeptoren, welche auch eine Rolle bei der Plättchenadhäsion spielen, sind das Leucin-reiche Glykoprotein GPIb/IX/V (Rezeptor für den "von-Willebrand-Faktor") und das Glykoprotein GPIV (GPIIIb), ein Rezeptor für Kollagen und Thrombospondin (Plow *et al* 1992). Ein angeborener Defekt des GPIb, das "Bernard-Soulier-Syndrom", führt zu einem funktionellen Defekt der Plättchenadhäsion und zu einer erhöhten Blutungsneigung. P-Selektin (GMP-140, PADGEM, CD62P) ist ein Membranglykoprotein, das in den  $\alpha$ -Granula der Blutplättchen und in den Weibel-Palade Körperchen der Endothelzellen lokalisiert ist. Durch Aktivierung der Plättchen kommt es zu einer Verschmelzung der  $\alpha$ -Granula mit dem SCS und zur Expression von P-Selektin auf der Thrombozytenoberfläche. P-Selektin ist ein wichtiger Oberflächenrezeptor für die Interaktion von aktivierten Blutplättchen mit neutrophilen Granulozyten und Monozyten.

Tabelle 1: Thrombozytäre Membranglykoproteine

Klassifikation	Elektrophoretische Einteilung	CD-Einteilung	Anzahl der Rezeptoren	
<b>Integrine</b>				
$\alpha_2\beta_1$	GPIa/IIa	CD49b	1000	Kollagen
$\alpha_5\beta_1$	GPIc/IIa	CD49c	1000	Fibronektin
$\alpha_6\beta_1$	GPIc/IIa	CD49f	1000	Laminin
$\alpha_{IIb}\beta_3$	GPIIb/IIIa	CD41-CD61	60000-100 000	Fibronektin Fibrinogen vWF Vitronektin
$\alpha_v\beta_3$	GP $\alpha_v$ /IIIa	CD51-CD61	100	Vitronektin Fibrinogen Fibronektin
<b>Leucinreiche Glykoproteine</b>				
	GPIb/V/IX	CD42a, b, c	25000	vWF
	GPIV	CD36	15000–25000	Kollagen
<b>Selektine</b>				
	P-Selektin	CD62P	12000	PSGL-1
<b>Immunglobulinähnliche Adhäsions-Rezeptoren</b>				
	ICAM-2	CD102	5000	LFA-1
	PECAM-1	CD31	3000	?
<b>Lysosomale Membranproteine</b>				
	GP53	CD63	3000	?

### 1.2.4 Immunologische Marker der Plättchenaktivierung

Die Markierung der Blutplättchen mit monoklonalen Antikörpern und ihre durchfluß-zytometrische Messung, erstmals beschrieben von Shattil (*Shattil et al* 1987), erlaubt die Beurteilung von thrombozytären Membranglykoproteinen und ist die derzeitige Methode der Wahl, um die funktionellen Aspekte der Thrombozyten zu überprüfen (Michelson 1996). Entgegen anderen Markern der Plättchenaktivierung erlaubt die Durchflußzytometrie die Erkennung von spezifischen aktivierungsabhängigen Veränderungen auf der thrombozytären Membranoberfläche (*Gawaz et al* 1999). Im einzelnen kann man die folgenden Marker unterscheiden:

#### - Marker für GPIIb-IIIa

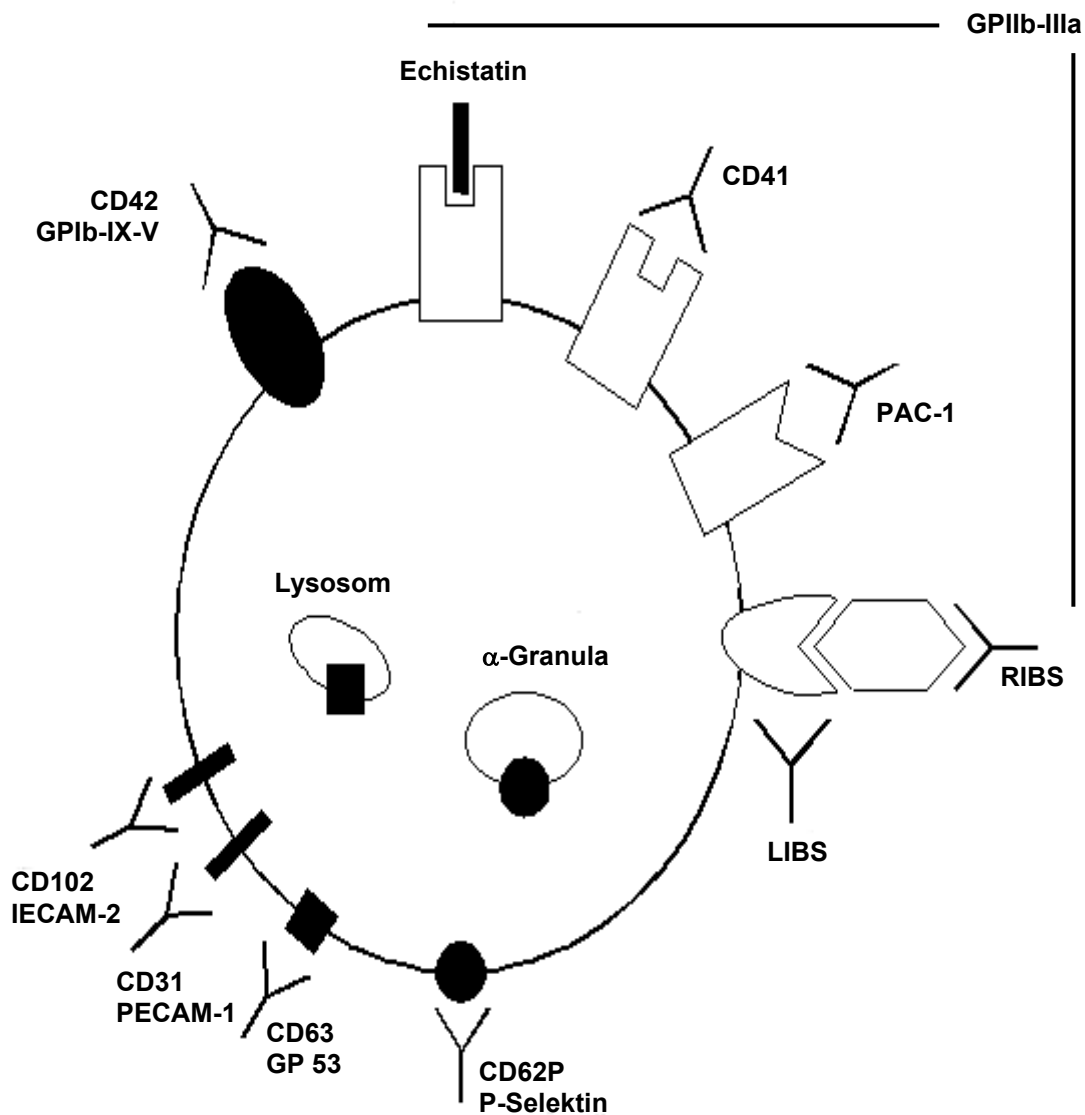
Durch Verwendung von spezifischen monoklonalen Antikörpern, die gegen den Glykoprotein Iib-IIIa-Komplex gerichtet sind, kann der Funktionszustand des Rezeptors – ruhend, aktiviert oder ligandenbesetzt – auf zirkulierenden Thrombozyten definiert werden. Spezifische Antikörper können sowohl im Ruhezustand, als auch im aktivierten oder ligandenbesetzten Zustand, an den Fibrinogenrezeptor GPIIb-IIIa binden. Die Oberflächendichte von GPIIb-IIIa kann durch monoklonale Antikörper vom Typ anti-CD41 evaluiert werden. Dieser Antikörper bindet unabhängig vom Aktivierungszustand des Rezeptorkomplexes. Durch die Verwendung von Fluorochrom-markierten RGD-enthaltenden Polypeptiden, wie Echistatin-FITC, kann die Zugänglichkeit der Fibrinogen-Bindungsstelle innerhalb des GPIIb-IIIa-Komplexes überprüft werden (*Gawaz et al* 1999). Anti-CD41 bindet dagegen von außen an die GPIIb-Untereinheit.

#### - Marker für GP Ib/IX/V

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



**Thrombozytäre Oberflächenmarker:**



**Abbildung 5: Durchflußzytometrische Bestimmung immunologischer Oberflächenmarker**

**- Degranulationsmarker**

Die Bindung von anti-P-Selektin Antikörpern zeigt spezifisch die Freisetzung aus den thrombozytären  $\alpha$ -Granula an. Die Bindung von anti-GP53 dient dagegen der Beurteilung der Sekretion aus den Lysosomen (Nurden 1994).

**Tabelle 2: Monoklonale Antikörper zur durchflußzytometrischen Bestimmung immunologischer Aktivierungsmarker**

Oberflächenantigen	monoklonaler Antikörper	Aussage
<b>GPIIb-IIIa</b>	4F10, 2G12	Bestimmung der Oberflächenexpression des intakten GPIIb-IIIa-Komplexes
	anti-CD61	Oberflächenexpression der $\beta_3$ -Kette
	anti-CD41	Oberflächenexpression der $\alpha_{IIb}$ -Kette
	PAC-1	Nachweis des aktivierten Fibrinogen-rezeptors
	LIBS-1, LIBS-2, LIBS-6	Nachweis des ligandengebundenen GPIIb-IIIa
<b>Fibrinogen</b>	PMI-1	Nachweis des gebundenen Fibrinogen an GPIIb-IIIa
	RIBS	
<b>GPIb-V-IX</b>	anti-CD42	Internalisierung nach Thrombin-Aktivierung
<b>P-Selektin</b>	anti-CD62P	Degranulation aus $\alpha$ -Granula
<b>GP53</b>	anti-CD63	Degranulation von Lysosomen

**Tabelle 3: Thrombozytäre Degranulationsprodukte**

Alpha-Granula	Dichte Granula	Lysosomale Granula
Fibrinogen	Serotonin	Saure Hydrolasen
Albumin	Kalzium	GP53
Von Willebrand-Faktor	Magnesium	

## **Tabelle 2: Fortsetzung**

Fibrinogen	ADP
Thrombospondin	<b>ATP</b>

### **P-Selektin**

Plättchenfaktor 4

$\beta$ TG

CD40L

(Die **fett** gekennzeichneten Substanzen wurden im Rahmen der Studie gemessen)

---

## **1.3 · Pathophysiologie der Thrombozyten**

### **1.3.1 Atherogenese und Progression der Atherosklerose**

Zahlreiche Studien belegen, daß Thrombozyten an der Entwicklung koronarischämischer Syndrome beteiligt sind (Becker *et al* 1993, Fuster *et al* 1992, Willerson *et al* 1989). Aufgrund ihrer Fähigkeit zur Exkretion zahlreicher biologisch aktiver Substanzen sind Thrombozyten in der Lage, einen fördernden Effekt auf die Atherogenese auszuüben (White 1994). In den Blutplättchen liegen biologisch aktive Verbindungen (Zytokine, Wachstumsfaktoren) in großer Konzentration vor, die bei Aktivierung im Bereich der Thrombusbildung freigesetzt werden (Fuster *et al* 1994). Kardiovaskuläre Risikofaktoren wie Hypercholesterinämie, arterielle Hypertonie, Diabetes melitus oder Nikotinabusus sind assoziiert mit einer erhöhten basalen Aktivierung und Hyperaggregabilität zirkulierender Blutplättchen (Tschoepe *et al* 1993). Besonders im Bereich von Gefäßaufzweigungen, z.B. der Karotisgabelung, kann ein kurzfristiger Kontakt der aktivierten Thrombozyten mit der Endotheloberfläche zu Aktivierung der Endothelzellen durch Freisetzung inflammatorischer Substanzen führen. Die  $\alpha$ -Granula der Blutplättchen enthalten eine Vielzahl von mitotischen Wachstumsfaktoren, wie z.B. „platelet-derived growth factor“ (PDGF) und „transforming growth factor“ (TGF) (Siess 1989). Diese Wachstumsfaktoren bewirken eine Einwanderung und Proliferation von glatten Muskelzellen und eine Intima-

proliferation der Blutgefäße an Stellen mit erhöhter Aktivität der Blutplättchen (Ross 1993). Die Veränderung der Plättchenfunktion bei Diabetikern resultiert wahrscheinlich aus einer primären Freisetzung von größeren Blutplättchen mit erhöhter Oberflächendichte an thrombozytären Membranglykoproteinen (Tschoepe *et al* 1993). Eine Hypercholesterinämie ist verbunden mit einem Anstieg der Fibrinogenbindung an aktivierte Blutplättchen und einer angestiegenen Degranulation des P-Selektins (Ross 1993). Die koronaren Risikofaktoren könnten so durch einen systemischen Anstieg von Aktivierung und Degranulation von zirkulierenden Blutplättchen frühe Mechanismen der Atherogenese induzieren (Gawaz *et al* 1999).

### 1.3.2 Akutes Koronarsyndrom und Myokardinfarkt

Der Begriff des akuten Koronarsyndroms umfaßt ein klinisches Spektrum akuter oder rasch fortschreitender Symptome einer myokardialen Ischämie. Das Spektrum reicht dabei von der instabilen Angina pectoris über den nicht-transmuralem Myokardinfarkt (Nicht-Q-Zacken-Infarkt) bis zum akuten transmuralen Myokardinfarkt (Q-Zacken-Infarkt), wobei die Übergänge fließend sind (Theroux *et al* 1998).

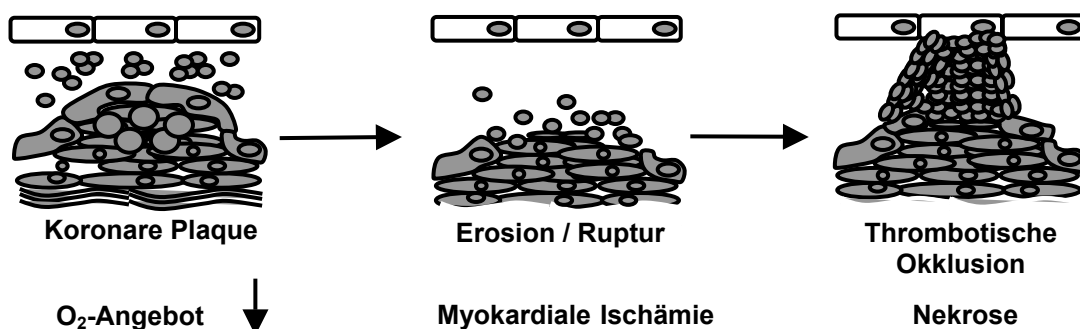
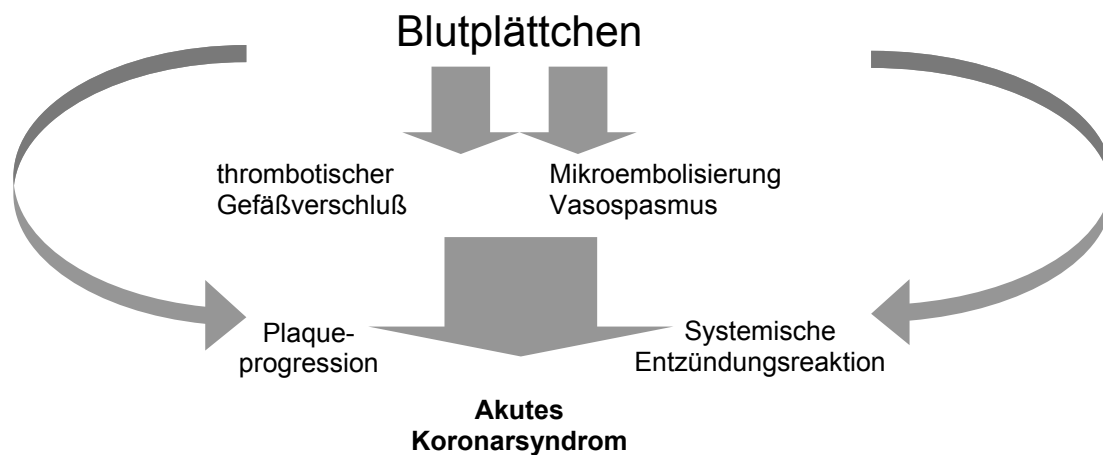


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Plaqueruptur mit Thrombusbildung

Im Gegensatz zur stabilen Angina pectoris, die im allgemeinen durch eine unzureichende Sauerstoffversorgung des myokardialen Gewebes, bedingt durch eine stabile artherosklerotische Gefäßverengung, hervorgerufen wird, liegt dem akuten Koronarsyndrom pathophysiologisch eine akute Ruptur eines artherosklerotischen Plaques mit nachfolgender Thrombozytenaggregation und Thrombusbildung zugrunde. Ein intermittierender oder vorübergehender thrombotischer Gefäßverschluss im Bereich der Plaqueruptur kann sich klinisch als typische instabile Angina pectoris manifestieren. In Abhängigkeit vom Schweregrad und der Dauer des Gefäßverschlusses und vom Vorhandensein von Kollateralgefäßen kann sich ein akuter Myokardinfarkt entwickeln.



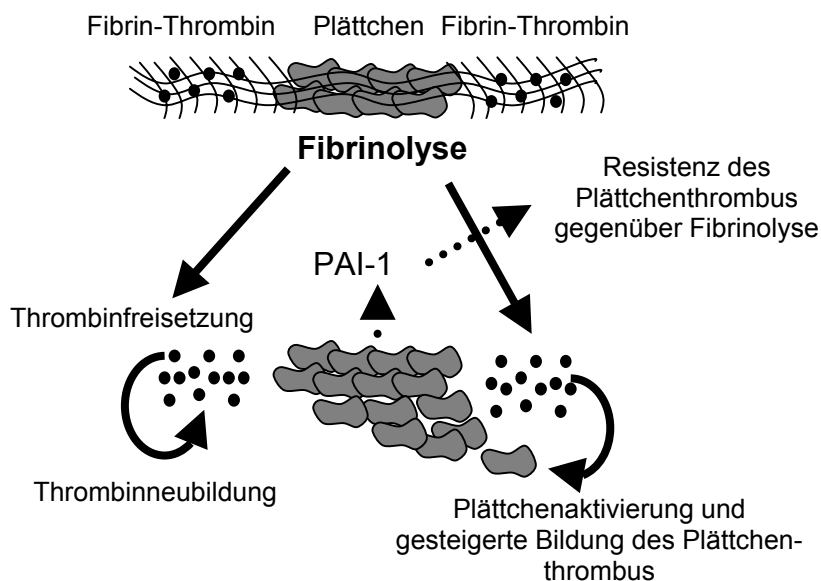
**Abbildung 7: Akutes Koronarsyndrom und Blutplättchen**

Nach unterschiedlicher langer Latenzzeit kann es durch akute Veränderungen im atherosklerotisch veränderten Blutgefäß, z.B. durch Einrisse eines atheromatösen Plaques, zur Freilegung subendothelialer thrombogener Strukturen kommen (White 1989). Die dadurch bedingte Plättchenaktivierung kann zur plötzlichen Stenosenbildung oder zu Gefäßverschlüssen durch intravasale Thrombosierung führen. Dies bildet die pathophysiologische Grundlage für akute koronare Herzerkrankungen wie der instabilen Angina pectoris und dem akuten Myokardinfarkt (White 1989). Neben der Bildung des thrombotischen Gefäßverschlusses sind Blutplättchen auch an Mikroembolisierung und

Vasokonstriktion, Plaqueprogression und systemischer Entzündungsreaktion beteiligt. Diese Mechanismen haben entscheidenden Einfluß auf die Prognose akuter Koronarsyndrome (Fuster *et al* 1992).

### 1.3.3 Fibrinolyse im akuten Myokardinfarkt

Die intravenöse Thrombolyse ist die Standardtherapie des akuten Myokardinfarktes und führt zu einer signifikanten Reduktion der Sterblichkeit. Bei bis zu 50% der Patienten mit akutem Myokardinfarkt kommt es jedoch nicht zu einer ausreichenden Reperfusion des verschlossenen Gefäßes. Ebenso kommt es in bis zu 20% der Fälle trotz initial erfolgreicher Wiedereröffnung des Infarktgefäßes zum Reverschluß verbunden mit einer erhöhten Mortalitätsrate.



**Abbildung 8: Fibrinolyse des koronaren Thrombus**

Eine erhöhte intravasale Plättchenaktivierung scheint den Erfolg der fibrinolytischen Reperfusion und das Auftreten von Reokklusionen entscheidend zu beeinflussen (Bihour *et al* 1999). In ihren Arbeiten konnten Fitzgerald und Mitarbeiter zeigen, daß es während und nach der Thrombolyse zur gesteigerten Bildung von Thromboxan A<sub>2</sub> und

zur Freisetzungsreaktion aktivierter Thrombozyten kommt (Fitzgerald *et al* 1986). Durch Antagonisten von Thromboxan A<sub>2</sub> und von Serotonin kann die Wirkung der Thrombolyse gesteigert und die Reokklusionsrate gesenkt werden. Während der Fibrinolyse kommt es zur Auflösung der Fibrinquervernetzungen des Koronarthrombus mit Freisetzung von freiem Thrombin, freies Thrombin wiederum führt zur verstärkten Plättchenaktivierung in der Umgebung des lysierten Thrombus. Thrombozyten beinhalten hohe Konzentrationen an "Plasminogen Activator Inhibitor-1" (PAI-1), der stärksten natürlich vorkommenden antifibrinolytischen Substanz. PAI-1 wird von aktivierten Plättchen freigesetzt und bewirkt die Inaktivierung von Fibrinolytika in unmittelbarer Umgebung des Thrombus. Fibrinolytika wie Streptokinase oder rekombinanter "tissue plasminogen activator" (rtPA) führen auch direkt zur Aktivierung von Thrombozyten. Jüngste Untersuchungen zeigen, daß während der ersten 24 Stunden nach Thrombolyse die Plättchenaggregation und die Fibrinogenrezeptorexpression erhöht ist (Gurbel *et al* 1998). Diese Untersuchungen machen wahrscheinlich, daß eine adjuvante antithrombozytäre Therapie innerhalb der ersten 24 Stunden den Erfolg der Thrombolyse unterstützen kann (Patrono 1994). Seit langem ist bekannt, daß Acetylsalicylsäure (ASS) den Erfolg der Thrombolysebehandlung entscheidend verbessert und deshalb auch derzeit die antithrombozytäre Standardtherapie bei der Thrombolyse darstellt. ASS besitzt jedoch eine verhältnismäßig schwache antiaggregatorische Wirkung und beeinflusst die Freisetzungsreaktion und Fibrinogenrezeptoraktivierung der Thrombozyten nur wenig (Braun 1994, Patrono 1994). Neuere antithrombozytäre Substanzen wie die GPIIb-IIIa-Antagonisten und Clopidogrel weisen eine deutlich stärkere Hemmung der Thrombozytenaggregation auf. In dieser Studie wird die Wirksamkeit der adjuvanten Gabe von Fibrinogenrezeptorantagonisten bei interventioneller Therapie im akuten Myokardinfarkt untersucht.

### **1.3.4 Reperfusion und Mikrozirkulation**

Durch den schnellen Einsatz von Fibrinolytika und direkte Angioplastie im akuten Myokardinfarkt kann der thrombotische Verschuß wiedereröffnet und die Reperfusion

des Infarktgefäßes erzielt werden. Experimentelle Befunde belegen, daß in der Reperfusionphase eine gesteigerte Adhäsion von Thrombozyten an die Endothelschicht stattfindet. Dadurch kann es theoretisch zur nachhaltigen Störung der Mikrozirkulation und damit der Perfusion des Infarktareals trotz Offenheit der Großen Gefäße kommen (Scharf *et al* 1992). Die Thrombozytenadhäsion an Endothelzellen kann durch Fibrinogenrezeptorantagonisten wie 7E3-Fab oder RGD gehemmt werden (Gawaz *et al* 1996, Gawaz *et al* 1997). Erste Hinweise für die Bedeutung dieser Prozesse zeigt die randomisierte Münchner Studie von Neumann und Mitarbeitern, in der gezeigt wurde, daß die Gabe von Abciximab als Begleittherapie zur direkten PTCA und Stenting im akuten Myokardinfarkt die Wiederherstellung der mikrovaskulären Koronardurchblutung und die funktionelle Erholung des gefährdeten Myokardareals begünstigt (Neumann *et al* 1998).

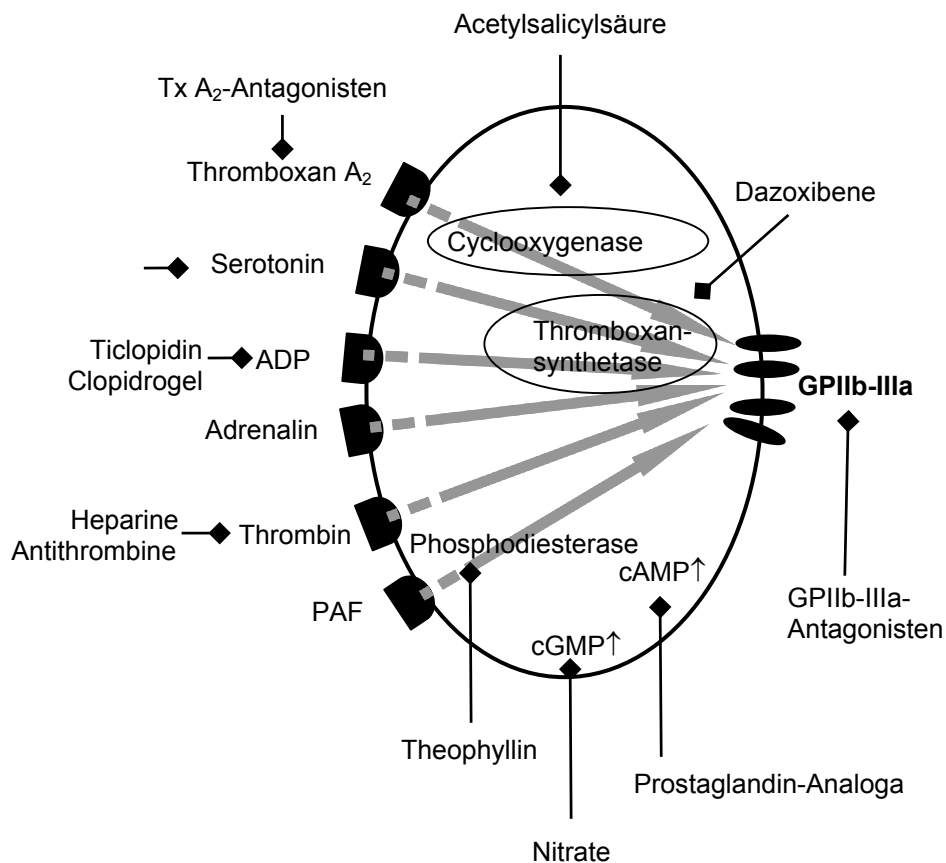
### 1.3.5 Interventionelle Therapie

Die interventionelle Therapie hat in den letzten Jahren enorme Bedeutung in der Behandlung der akuten koronaren Herzerkrankung erlangt. Neben der Verabreichung von Substanzen wie nicht-ionischem Kontrastmittel, hochdosierter Gabe von unfraktioniertem Heparin während des Eingriffs – Substanzen, welche zur Aktivierung von Blutplättchen führen können – kommt es im Bereich des angioplastierten Plaque zur Plättchenaktivierung (Gawaz *et al* 1996, Gawaz *et al* 1999). Im Verlauf der koronaren Angioplastie kommt es trotz Verabreichung von ASS zur gesteigerten Aktivierung von Fibrinogenrezeptoren und zur Degranulation von Thrombozyten (Scharf 1992). Ebenso konnte nachgewiesen werden, daß eine erhöhte systemische Plättchenaktivierung vor dem Eingriff das Risiko postinterventioneller ischämischer Komplikationen signifikant steigert (Tschoepe *et al* 1993). Eine erhöhte GPIIb-IIIa-Rezeptordichte vor Intervention ist assoziiert mit einem gesteigerten Risiko der subakuten Stentthrombose, unabhängig von interventionell bedingten angiographischen Faktoren (Neumann *et al* 1998).



## 1.4 Antithrombozytäre Substanzen

In der Vergangenheit wurden eine Vielzahl von Medikamenten entwickelt, die diskrete Mechanismen der Thrombozyten beeinflussen. Eine Vielzahl derzeit gebräuchlicher Pharmaka beeinflussen intrazelluläre Aktivierungsschritte und erzeugen dadurch eine Hemmwirkung auf die Plättchenfunktion. Andere Substanzen greifen direkt im Bereich der Thrombozytenoberfläche an und verhindern so diskrete Aktivierungswege oder die Aggregation (Cannon *et al* 1995, Collier 1995, Coukell *et al* 1997, Schrör 1995).



**Abbildung 9: Wirkungsweise antithrombozytärer Substanzen**

### a) Acetylsalicylsäure:

1954 wurde erstmals die Wirkung von ASS auf die Thrombozyten beschrieben, 1971 der inhibitorische Effekt auf die Thromboxan-Synthese erkannt. Der Einsatz von ASS gilt als Goldstandard in der Therapie und Prophylaxe artherothrombotischer

Krankheitsbilder (Cohen 1976, Patrono 1994). ASS hemmt selektiv und irreversibel die Zyklooxygenase, die die Biosynthese von Prostaglandinen und anderen Eikosanoiden katalysiert. Im Blutplättchen entsteht aus den Prostaglandinen hauptsächlich Thromboxan A<sub>2</sub>, welches vasokonstriktorisch wirkt und die Thrombozytenaggregation fördert. Bereits nach einmaliger Einnahme von ASS durch gesunde Probanden kommt es zur Verlängerung der Blutungszeit, zur Hemmung der durch Kollagen oder Arachidonsäure induzierten Aggregation und zur verminderten Freisetzungsreaktion mit Hemmung der zweiten Aggregationsphase nach ADP- oder Adrenalinstimulation (Motz 1994).

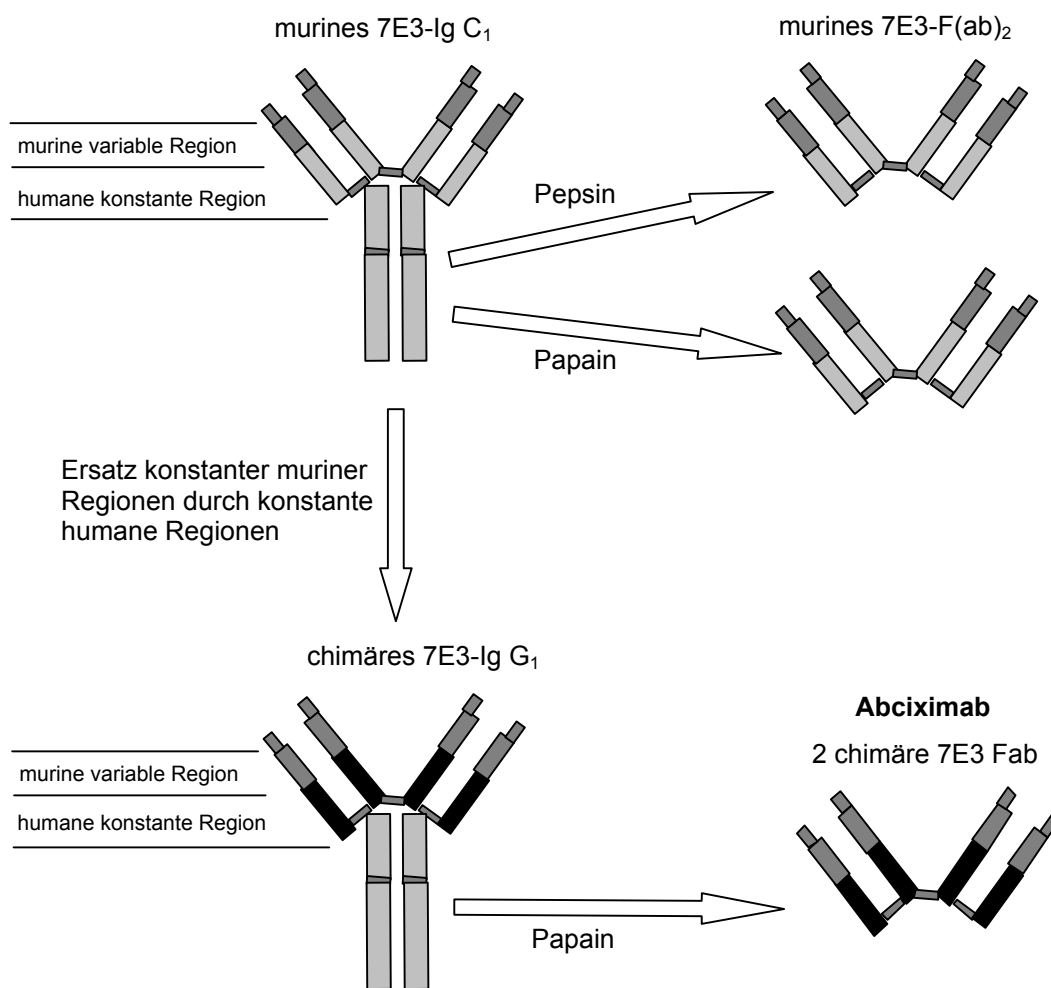
### **b) Thienopyridine (Ticlopidin, Clopidogrel):**

Thrombozyten besitzen große Mengen ADP in ihren Speichergranula. Es wird während der Sekretion freigesetzt und verstärkt die Thrombozytenaggregation. Experimentelle und klinische Studien belegen die Bedeutung der ADP-induzierten Thrombozytenaktivierung für die arterielle Thrombose, besonders unter hohen Strömungsbedingungen und bei gestörter Endothelfunktion (Coukell *et al* 1997). Bisher nur unvollständig charakterisierte Metaboliten der Thienopyridine interferieren mit der ADP-induzierten Thrombozytenaktivierung und hemmen ebenso wie ASS die Thrombozytenaktivierung irreversibel, dabei blockieren sie spezifische ADP-Rezeptoren, welche über inhibitorische G-Proteine die Adenylatzyklase regulieren und bewirken so eine Hemmung der ADP-induzierten Senkung des thrombozytären cAMP-Spiegels. Wie andere antithrombozytäre Substanzen verringern Thienopyridine indirekt durch Hemmung der Fibrinogenrezeptoraktivierung die Bindung von plasmatischen Fibrinogen an den Fibrinogenrezeptor GPIIb-IIIa. Sie haben keinen direkten blockierenden Effekt am GPIIb-IIIa-Komplex. Studien haben ergeben, daß eine einmalige Verabreichung von 400 mg Clopidogrel bei gesunden Probanden schon nach 2 Stunden eine deutliche Hemmung der ADP-induzierten Aggregation bewirkt (Coukell *et al* 1997, Harker 1993, Herbert *et al* 1993

### **c) Antagonisten des Fibrinogenrezeptors:**

Durch die Blockierung des GPIIb-IIIa-Rezeptors besteht die Möglichkeit, die Thrombozytenaggregation selektiv zu hemmen und damit der Bildung von

plättchenreichen Thromben in einem frühen Stadium entgegenzuwirken. Fibrinogenrezeptorantagonisten hemmen die Fibrinogenbindung an den thrombozytären Fibrinogenrezeptor GPIIb-IIIa und somit den zentralen Schritt der Thrombozytenaggregation. Fibrinogen bindet vornehmlich über die RGD-Aminosäuresequenz an GPIIb-IIIa. Die Blockade der Fibrinogenbindungsstelle durch GPIIb-IIIa-Antagonisten führt daher unabhängig von der Art der Aktivierung zur effektiven Hemmung der Fibrinogenbindung am Rezeptor und dadurch zur Hemmung der Aggregation.



**Abbildung 10: Strukturformel von Abciximab**

Während das Wirkprinzip aller derzeit verfügbaren GPIIb-IIIa-Antagonisten identisch ist, unterscheiden sich die strukturellen und pharmakologischen Eigenschaften, sowie

die Spezifität der einzelnen Pharmaka erheblich (Coller 1995, Mousa *et al* 1996, Madan *et al* 1998). Die vorliegende Studie befaßt sich mit dem GPIIb-IIIa Antagonist Abciximab (c7E3-Fab, ReoPro®). Abciximab ist ein chimäres Derivat des monoklonalen Antikörpers 7E3, welcher gegen den GPIIb-IIIa-Komplex gerichtet ist. Um eine mögliche komplementaktivierende und immunogene Aktivität des Antikörpers (7E3 ist ein Antikörper der Maus) zu reduzieren, wurde das Fc-Fragment vom kompletten Antikörper abgespalten, so daß Abciximab nur den Fab-Anteil aufweist. Zusätzlich wurde größte Teil des unspezifischen murinen Fab-Anteils durch einen menschlichen Fab-Anteil ersetzt, um die unerwünschten immunologischen Reaktionen auf Fremdeiweiß weiter zu senken. Abciximab ist somit ein humanisiertes chimerisches Fab-Fragment, das nur noch die variable Region des ursprünglichen Mausantikörpers besitzt.

**Tabelle 4: Pharmakologische Klassifizierung antithrombozytärer Substanzen**

Mechanismus	Inhibitoren
<p><b>1. Erhöhung der zyklischen Nukleotide</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Aktivierung der Adenylatzyklase</li> <li>- Hemmung der Phosphodiesterase</li> <li>- Hemmung der Guanylzyklase</li> </ul>	<p>PGE<sub>1</sub> (Alprostadil)                      PGE<sub>2</sub> (Epoprostenol)                      Prostaglandin-Analoga (Iloprost)                      Theophyllin, Dipyridamol                      NO, Nitratderivate,                      Isosorbiddinitrat, Molsidomin</p>
<p><b>2. Interaktion mit Arachnidonsäuremetabolismus</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Hemmung der Zyklooxygenase</li> <li>- Hemmung der Thromboxansynthese</li> <li>- Antagonisierung des TxA<sub>2</sub>-Rezeptors</li> </ul>	<p>ASS, Sulphinpyrazon,                      Indomethazin,                      Omega-3-Fettsäuren                      Dazoxibene, Ozagrel                      Ridogrel, Nidogrel</p>

**Tabelle 4: Fortsetzung**

<b>3. Interaktion mit Aktivierungsrezeptoren</b>	
- Blockierung des ADP-Rezeptors	Ticlopidin, Clopidogrel
- Hemmung des Thrombinrezeptors	Peptidantagonisten
- Hemmung des Serotoninrezeptors	Ketanserin
<b>4. Hemmung der Aggregation</b>	
- Blockierung des Fibrinogenrezeptors	Abciximab (ReoPro®) Integrilin (Eptifibatide®) Tirofiban (Aggrastat®) Lamifiban Xemilofiban
<b>5. Inhibition der Adhäsion</b>	
- Blockierung des GPIIb-IIIa-Rezeptors (vWF-Rezeptor)	Rekombinantes-vWF-Fragment
- Blockierung des Kollagenrezeptors ( $\alpha_2\beta_1$ )	Antikörper, Peptide

## 1.5 Pharmakologisches Monitoring der antithrombozytären Therapie

Eine wirkungsvolle antithrombozytäre Therapie ist ein wesentliches Behandlungsziel der koronaren Herzerkrankung. Hilfreich bei der Entwicklung neuer antithrombozytärer Substanzen ist ein zuverlässiges pharmakologisches Monitoring. Neben klassischen aggregatorischen Funktionsuntersuchungen haben sich zur Beurteilung der pharmakologischen Wirksamkeit antithrombozytärer Behandlungsformen durchflußzytometrische Nachweisverfahren etabliert (Coller 1998, Cox 1991). ASS stellt gegenwärtig die antithrombozytäre Standardtherapie in der Sekundärprophylaxe der koronaren Herzerkrankung dar. Trotz regelmäßiger Einnahme kommt es jedoch bei einem nicht unerheblichen Teil der Patienten zum Reinfarkt. Dies

läßt vermuten, daß eine unzureichende Hemmung der Thrombozytenfunktion durch ASS bei wiederholten koronarthrombotischen Ereignissen vorliegt. Man spricht von ASS-Resistenz („Aspirin-non-responder“). Durch Bestimmung der kollagen- und arachidonsäureinduzierten Aggregation, welche normalerweise besonders sensitiv auf die Verabreichung von ASS reagiert, kann die individuelle Wirksamkeit von ASS überprüft werden und Aspirin non-responder aufgedeckt werden. Die Thienopyridine sind wirkungsvolle antithrombotische Substanzen und stellen eine Alternative zu ASS in der Sekundärprophylaxe dar. Insbesondere der kombinierte Einsatz von ASS und Ticlopidin hat die antithrombotische Therapie nach koronaren Interventionen wesentlich verbessert (Gawaz *et al* 1998). Im Gegensatz zu ASS oder den Thienopyridinen, welche irreversibel die Funktion der Thrombozyten über deren gesamte Lebenszeit hinweg blockieren, ist die Blockade des Fibrinogenrezeptors durch die überwiegende Zahl der GPIIb-IIIa-Antagonisten ein reversibler Vorgang und somit abhängig von der aktuellen Plasmakonzentration (Patrono 1994, Coukell *et al* 1997, Mousa *et al* 1996). Um einen effektiven antithrombotischen Schutz durch Hemmung der GPIIb-IIIa-Rezeptoren zu erhalten, müssen daher ständig mehr als 80% der Rezeptoren blockiert sein. Eine niedrigere Blockade zeigt keine sichere antithrombozytäre Wirksamkeit. Höhere Rezeptorblockierungen von über 90% erhöhen dagegen signifikant die Gefahr von Blutungskomplikationen (Mascelli *et al* 1997). Die Hemmung der Plättchenaggregation durch niedermolekulare Fibrinogenrezeptorantagonisten korreliert mit dem Grad der GPIIb-IIIa-Rezeptorblockade in einer steilen Dosis-Wirkungs-Beziehung, welche die Dosierung der Medikamente erschwert (Coller 1998, Cox 1998). Bei den meisten GPIIb-IIIa-Antagonisten führen kleine Veränderungen der effektiven Plasmakonzentration des Inhibitors zu großen Variationen der Aggregation (Coller 1998). Aus diesem Grund wird der zunehmende Einsatz von Antagonisten des GPIIb-IIIa-Rezeptors, insbesondere in der Langzeittherapie mit oralen Antikoagulantien, ein zuverlässiges pharmakologisches Monitoring erfordern. Es wurde die Wirksamkeit der Therapie mit GPIIb-IIIa-Antagonisten anhand der ADP-induzierten Aggregation im Aggregometer überprüft. Die Gabe eines GPIIb-IIIa-Antagonisten führt dabei zu einer raschen Hemmung der ADP-induzierten Aggregation (Cox 1998). Der Grad der Aggregationshemmung ist abhängig von der GPIIb-IIIa-Rezeptorblockade, welche durchflusszytometrisch mittels fluoreszeinkonjugierten GPIIb-IIIa-Antagonisten wie

z.B. c7E3-FITC oder fluoreszeinkonjugierten GPIIb-IIIa-Liganden, z.B. Echistatin-FITC bestimmt werden kann (Cox 1998, Gawaz *et al* 1998). Während die ADP-induzierte Aggregation fast vollständig durch z.B. Abciximab gehemmt werden kann, läßt sich die TRAP-induzierte Aggregation nur sehr unvollständig hemmen. Dies könnte klinisch von Bedeutung sein bei Patienten mit erhöhter Thrombinaktivität, z.B. im Verlauf einer Fibrinolyse-Therapie.

## 1.6 Antithrombozytäre Therapie und koronare Herzerkrankung

### 1.6.1 Therapie der akuten Koronarsyndrome

Den therapeutischen Nutzen von ASS bei instabiler Angina pectoris belegen im wesentlichen vier große plazebokontrollierte Studien:

- die "Veterans Administration Cooperative Study" (Lewis *et al* 1983)
- die "Kanadische Multizenterstudie" (Cairns *et al* 1985)
- die "Montreal Heart Institute Study" (Theroux *et al* 1988)

und die RISC-Studie (The RISC Group 1990).

Die Ergebnisse dieser Studien zeigen, daß bei Patienten mit instabiler Angina pectoris ein hochsignifikanter kardioprotektiver Effekt von ASS vorliegt. Den überzeugendsten Nachweis des präventiven Nutzens von ASS erbrachte die große internationale Studie ISIS-2 (ISIS-2 Colaborative Group 1988). Die Ergebnisse zeigen, daß die frühzeitige Gabe von ASS die Letalität und die Reinfarkthäufigkeit bei akutem Myokardinfarkt senkt. Trotz nachgewiesener Wirksamkeit von ASS in der Behandlung akuter Koronarsyndrome bleibt ein großer Teil behandelter Patienten, bei denen unter der konventionellen antithrombotischen Therapie kein zufriedenstellender Therapieerfolg zu erzielen ist. Die Entwicklung potenter Aggregationshemmer in Form der Fibrinogenrezeptorantagonisten hat das Spektrum der zur Verfügung stehenden antithrombozytären Substanzen erweitert und die Behandlung akuter Koronarsyndrome in jüngster Zeit entscheidend verbessert. In klinischen Studien der Phase II konnte für die GPIIb-IIIa-Antagonisten Abciximab, Lamifiban und Eptifibatide gezeigt werden, daß eine gute Verträglichkeit der Substanzen vorliegt und bei Patienten mit instabiler

Angina pectoris ischämische Komplikationen deutlich reduziert werden können. Aus den Studien mit Integrelin (PRISM-Studie und PRISM-PLUS-Studie, The PRISM Investigators 1998, The PRISM-PLUS Investigators 1998) ergibt sich, daß durch zusätzliche Gabe des GPIIb-IIIa-Antagonisten zur Standardtherapie aus ASS und Heparin unabhängig von der weiteren Therapie (konservativ-medikamentös, PTCA, Bypass-Operation) das Mortalitäts- und Morbiditätsrisiko von Patienten mit akutem Koronarsyndrom günstig beeinflusst werden kann. In der CAPTURE-Studie (The CAPTURE Investigators 1997) wurde die Wirksamkeit von Abciximab bei Patienten mit refraktärer instabiler Angina pectoris untersucht. Eine Übersicht über Studien zur Wirksamkeit von GPIIb-IIIa-Rezeptorantagonisten beim akuten Koronarsyndrom gibt Tabelle 5.

**Tabelle 5: Wirksamkeit von GPIIb-IIIa-Rezeptorantagonisten beim akuten Koronarsyndrom**

Studie	Patientenzahl	Ereignisse (%)	Ereignisse (%)	Tod (30 Tage)	Tod (30 Tage)	Relative Reduktion (%)
		Plazebo	Verum	Plazebo	Verum	
<b>PRISM</b>	3232	5,9	3,8*	7,1	5,8	18
<b>PRISM-PLUS</b>	1915	17,9	12,9*	11,9	8,7*	27
<b>PARAGON</b>	2282	11,7	10,6	11,7	10,6	9
<b>PURSUIT</b>	10948	15,7	14,2	15,7	14,2*	10
<b>gesamt</b>	18276	13,3	11,4	13,3	11,7	13

\* p < 0,05 versus Plazebo

Die Ergebnisse zeigen ähnlich der PRISM-PLUS-Studie, daß die Verabreichung von Abciximab für 18-24 Stunden vor PTCA die Inzidenz akuter Myokardinfarkte um 70% reduziert. In der PURSUIT-Studie (The PURSUIT Investigators 1997), der bisher größten Studie über GPIIb-IIIa-Antagonisten, wurde die Wirksamkeit von Eptifibatide überprüft: eine kontinuierliche Infusionsbehandlung von Eptifibatide über 72-96 Stunden reduzierte im Vergleich zu Plazebo die Ereignisrate signifikant nach 30 Tagen. Die PARAGON-Studie kontrollierte die Wirksamkeit von Lamifiban bei akuten Koronarsyndromen. Nach zusammenfassender Analyse dieser Studien zeigt sich, daß



durch den Einsatz von GPIIb-IIIa-Antagonisten beim akuten Koronarsyndrom eine signifikante Verbesserung der medikamentösen Therapie erzielt werden kann.

### **1.6.2 Thrombolyse im akuten Myokardinfarkt**

Die antithrombozytäre Therapie besitzt einen herausragenden Stellenwert in der Fibrinolysetherapie des akuten Myokardinfarkts. Trotz nachgewiesener Wirksamkeit von ASS in Verbindung mit Fibrinolytika besteht weiterhin das Problem, daß sich der Koronarfluß unter herkömmlicher Therapie nur unzureichend wiederherstellen läßt. Da die am Myokardinfarkt beteiligten Thromben einen sehr hohen Gehalt an Thrombozyten aufweisen, könnte durch den Einsatz von potenten GPIIb-IIIa-Rezeptorantagonisten in Kombination mit Fibrinolytika ein zusätzlicher Nutzen erwartet werden. In Tierversuchen konnte gezeigt werden, daß die adjuvante Verabreichung von GPIIb-IIIa-Antagonisten zur fibrinolytischen Therapie die Zeit bis zur Reperfusion beschleunigt und die Reokklusion verhindert. Selbst die alleinige Gabe von GPIIb-IIIa-Antagonisten besitzt in Abwesenheit von exogenen Fibrinolytika thrombolytische Wirkung. Diese Befunde waren Ausgangspunkt für die weiterführenden klinischen Patientenstudien TIMI-8-Pilotstudie, IMPACT-AMI, PARADIGM und TIMI-14-Studie (The IMPACT-AMI Investigators 1997, The PARADIGM Investigators 1998). Aus den Studien ergibt sich, daß GPIIb-IIIa-Antagonisten die Thrombolyse beschleunigen und eine Reduzierung der Fibrinolytikumdosis ermöglichen.

### **1.6.3 Interventionelle Therapie**

Die perkutane transluminale Koronarangioplastie (PTCA) hat sich als effektives und risikoarmes Verfahren zu Behandlung der symptomatischen koronaren Herzerkrankung etabliert. Unter Berücksichtigung großer randomisierter klinischer Studien ist die Wirksamkeit von ASS zur Prävention akut thrombotischer Komplikationen bei PTCA gesichert und führt zur Reduktion ischämischer

Komplikationen um bis zu zwei Drittel. Zur Verhinderung späterer Restenosen ist ASS jedoch nicht wirksam (Bertrand *et al* 1996, Antiplatelet Trialists Collaboration 1994).

**Tabelle 6: Wirksamkeit von GPIIb-IIIa-Antagonisten bei koronarer Intervention**

Studie	Zahl	% akutes Koronarsyndrom	GPIIb-IIIa- Inhibitor	Endpunkt		p-Wert
				Verum	Placebo	
<b>EPIC</b>	2099	43%	Abciximab	12,80%	8,30%	0,009
<b>EPILOG</b>	2792	68%	Abciximab	11,75%	5,20%	0,001
<b>EPISTENT</b>	2399	33%	Abciximab	10,80%	5,30%	0,001
<b>IMPACT II</b>	4010	41%	Eptifibatide	11,40%	9,30%	0,06
<b>RESTORE</b>	2212	100%	Aggrastat	12,20%	10,30%	0,16
<b>CAPTURE</b>	1265	100%	Abciximab	15,90%	11,30%	0,12
<b>RAPPORT</b>	483	100%	Abciximab	10,30%	4,90%	0,034
<b>gesamt</b>	15189	60%		12,10%	7,80%	<0,001

Die EPIC-Studie war der Wegbereiter der Untersuchung nach der Wirksamkeit von Abciximab bei PTCA (The EPIC Investigators 1994). Sowohl die Häufigkeit von Myokardinfarkten, als auch die Häufigkeit dringlicher Revaskularisationsmaßnahmen wurde durch Bolus und Infusion von Abciximab signifikant gesenkt. Der positive Effekt von Abciximab war auch noch nach 6 Monaten und nach 1 und 3 Jahren nachweisbar. Die Nachfolgestudie EPILOG stellte fest, daß sich die Ergebnisse der EPIC-Studie auch auf Patienten mit geringerem Risiko übertragen lassen (The EPILOG Investigators 1997). Es folgten die Studien CAPTURE, RESTORE und RAPPORT (The CAPTURE Investigators 1997, The RESTORE Investigators 1997, The RAPPORT Investigators 1998), mit dem Ergebnis, daß der Einsatz von Fibrinogenrezeptorantagonisten zu einer erheblichen Verbesserung der Ergebnisse nach koronarer Intervention führt (Kong *et al* 1998). Die CAPTURE-Studie (The CAPTURE Investigators 1997) testete die Hypothese, daß bei einer therapierefraktären Angina pectoris eine 17-25 stündige Vorbehandlung mit Abciximab den Erfolg einer späteren PTCA im Vergleich zur Vorbehandlung mit Heparin verbessert. In dieser Studie erhielten die Patienten mit therapierefraktärer Angina pectoris und Ruhe-EKG-Veränderungen zusätzlich zur

Standardtherapie mit ASS und Heparin entweder Abciximab (Bolus 0,25 mg/kg plus Infusion 10 µg/min) oder Placebo. Die Restore-Studie (The RESTORE-Investigators, 1997) untersuchte die Wirksamkeit von Aggrastat bei Patienten, die mit PTCA innerhalb von 72 Stunden nach einem Myokardinfarkt behandelt wurden. Nach 30 Tagen zeigte sich tendenziell eine Reduktion des gemeinsamen Endpunktes in der Verumgruppe. In der RAPPORT-Studie wurde die Wirksamkeit von Abciximab bei direkter PTCA im akuten Myokardinfarkt getestet. Die Patientne wurden entweder mit einem Abciximab Bolus und einer Infusion für 12 Stunden nach Intervention behandelt, oder sie erhielten Placebo. Auch diese Studie zeigte über die Reduzierung der Endpunkte hinaus eine signifikante Reduktion der Ereignisse nach 30 Tagen.

## 2 Zielsetzung

Die Einführung von GlykoproteinIIb-IIIa-Rezeptorantagonisten hat die Therapiemöglichkeiten von Patienten mit koronarer Intervention wie z.B. PTCA oder Lysetherapie bei akutem Koronarsyndrom in den letzten Jahren entscheidend erweitert. Thrombozyten sind wesentlich an pathophysiologischen Mechanismen bei der Entstehung der zugrundeliegenden Erkrankungen beteiligt. Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Auswirkungen der Blockade von GPIIb-IIIa-Rezeptoren auf die thrombozytären Membranglykoproteine zu untersuchen. Dabei sollen sowohl der Grad der Aktivierung, als auch der zeitliche Ablauf bestimmt werden. Die verschiedenartige Beeinflussung soll mit folgenden etablierten Methoden überprüft werden:

- Messung der Plättchenaggregation
- Untersuchung der Degranulation von Blutplättchen
- Analyse der Exposition thrombozytärer Membranglykoproteine
- Untersuchung der Adhäsion von Thrombozyten

Es sollen dabei die Auswirkungen des GPIIb-IIIa-Antagonisten Abciximab (c7E3-Fab, ReoPro®) auf unterschiedliche Aspekte der Funktion von Blutplättchen untersucht werden:

- 1.) Die Untersuchung der differentiellen Effekte von Abciximab auf die Thrombozyten-Funktion im Rahmen einer klinischen Studie, sowie in einer *in vitro*-Studie die Analyse des Aktivierungszustandes der thrombozytären Membranglykoproteine nach koronarer Intervention
- 2.) Die Beurteilung von Abciximab in Bezug auf die Expression thrombozytärer Membranglykoproteine und die Aggregationsfähigkeit der Plättchen
- 3.) Die vergleichende Beobachtung der Aktivität thrombozytärer Membranglykoproteine im Verlauf der PTCA bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt
- 4.) Beurteilung der Adhäsionsfähigkeit von Thrombozyten nach Vorinkubation mit Abciximab

Im Vordergrund steht dabei die Rolle des internalisierten Pool an GPIIb-IIIa-Rezeptoren unter Abciximab-Therapie. Abschließend soll eine Aussage gemacht werden über die Möglichkeiten und Wirkungen von Abciximab auf die Thrombozytenfunktion, sowie antithrombotische, bzw. antithrombozytäre Therapiemöglichkeiten.

### **3. Patienten und Methodik**

#### **3.1 Differentielle Aspekte von Abciximab auf die Thrombozytenfunktion**

##### **3.1.1 Charakteristika der Studienpopulation**

In die Patientenstudie zur Untersuchung der differenzierten Aspekte von Abciximab auf die Thrombozytenfunktion und die Analyse des Aktivierungszustands der thrombozytären Membranglykoproteine nach koronarer Intervention, sowie die Beurteilung von Abciximab in Bezug auf die Expression thrombozytärer Membranglykoproteine und die Aggregationsfähigkeit der Plättchen wurden Patienten aufgenommen, die im Rahmen von Kontrolluntersuchungen oder als elektive Eingriffe in unserer Klinik mit einer perkutanen transluminalen Angioplastie (PTCA) therapiert wurden. Es wurden bis zum Erreichen von aussagekräftigen Ergebnissen insgesamt 13 Patienten in die Studie aufgenommen. Die Patienten mußten mindestens eines der nachstehenden Kriterien erfüllen:

- Zunehmende Beschwerden durch Angina pectoris hinsichtlich Häufigkeit und Stärke bei körperlicher Belastung
- Elektrokardiographische Hinweise auf eine Myokardischämie: Die myokardiale Ischämie wurde definiert als transiente ST-Strecken-Senkung von mindestens 0,1 mV in zwei benachbarten Ableitungen, vorübergehende T-Negativierungen, sowie passagere ST-Strecken-Hebungen für weniger als 20 Minuten über 0,1 mV in zwei benachbarten Ableitungen. Von der Studie ausgeschlossen wurden Patienten mit Blutgerinnungsstörungen oder Erkrankungen, welche mit einer Störung der Thrombozytenfunktion einhergehen.

**Tabelle 7: Demographische Daten der PTCA-Patienten (n=13)**

---

<b>Geschlecht (M/W)</b>	. 10/3
<b>Alter (Mittelwert <math>\pm</math> SD)</b>	60,9 $\pm$ 10,4

**Tabelle 7: Fortsetzung**

**Koronare Herzkrankheit, n (%)**

1-Gefäß	4 (31)
2-Gefäße	5 (38)
3-Gefäße	4 (31)

**Koronares Risikoprofil, n (%)**

Hypercholesterinämie	10 (77)
Hypertonus	10 (77)
Nikotinabusus	4 (31)
Diabetes melitus	7 (54)
Adipositas	7 (54)

**Anamnestischer Myokardinfarkt, n (%)**

Frühere PTCA, n (%)	2 (15)
---------------------	--------

**Frühere Stentimplantation, n (%)**

	--
--	----

**Prä-Medikation, n (%)**

ASS	13 (100)
β-Blocker	5 (38)
Nitrate	5 (38)
Ticlopidin	13 (100)
Clopidogrel	13 (100)

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

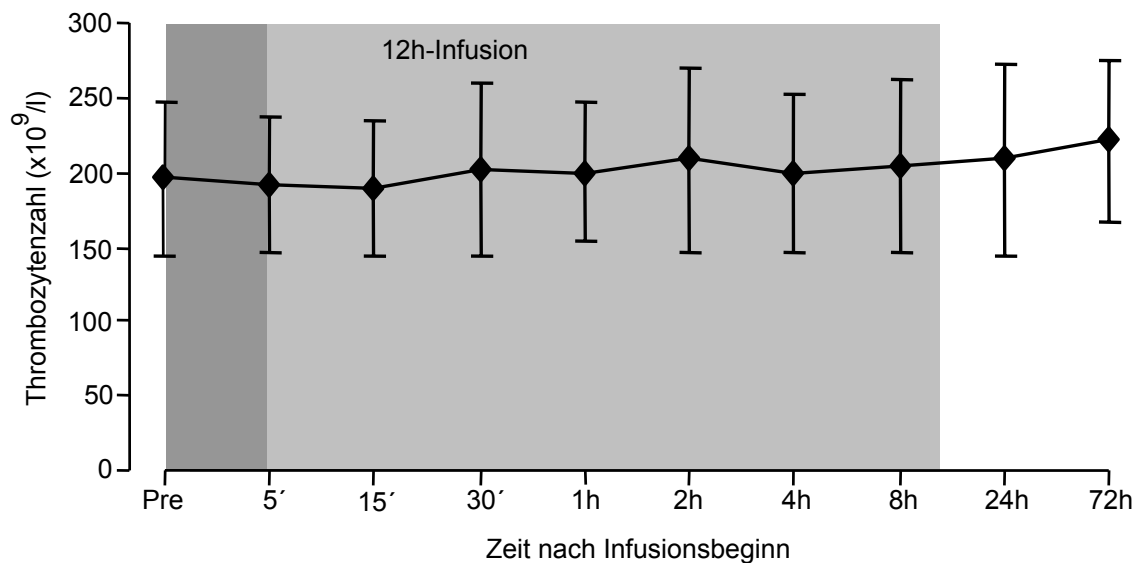
Diagnostik mit primär mechanischer Rekanalisation der Koronargefäße durch direkte Angioplastie, teilweise gefolgt von einer Stentimplantation. Die Patienten waren hinsichtlich ihrer demographischen Daten nicht auffällig gegenüber der Normalbevölkerung. Die Tabelle 8 zeigt die wichtigsten Merkmale des Patientenkollektivs. Die Laborparameter zeigen eine Verteilung im Mittel innerhalb der physiologischen Grenzen, ohne daß dabei größere Ausreißer nach oben oder unten vorliegen. Hinsichtlich der Laborwerte ergab sich folgende Tabelle:

**Tabelle 8: Laborparameter der Patientengruppe (n=13)**

---

	Mittelwert $\pm$ SD	(Referenzwerte)
Leukozyten ( $10^9/l$ )	9,4 $\pm$ 1,3	4-10
Hämoglobin (g/dl)	13,1 $\pm$ 1,6	13-18
Thrombozyten ( $10^9/l$ )	217 $\pm$ 65	150-450
GOT (ASAT) (U/l)	47,7 $\pm$ 17,2	<18
LDH (U/l)	391,4 $\pm$ 127,6	80-240
CRP (mg/dl)	2,7 $\pm$ 2,3	<0,5
Fibrinogen(mg/dl)	396,5 $\pm$ 102	200-450
Kreatinkinase (U/l)	344,4 $\pm$ 155,9	<80
CK max.(U/l)	862,2 $\pm$ 427,8	

Den zeitlichen Verlauf der Thrombozytenzahl über den Beobachtungszeitraum zeigt die Abbildung 11. Hier beobachtet man konstante Thrombozytenzahlen, welche nachweislich nicht von der Studienmedikation beeinflusst werden.



**Abbildung 11: Thrombozytenzahlen während des Beobachtungszeitraums**

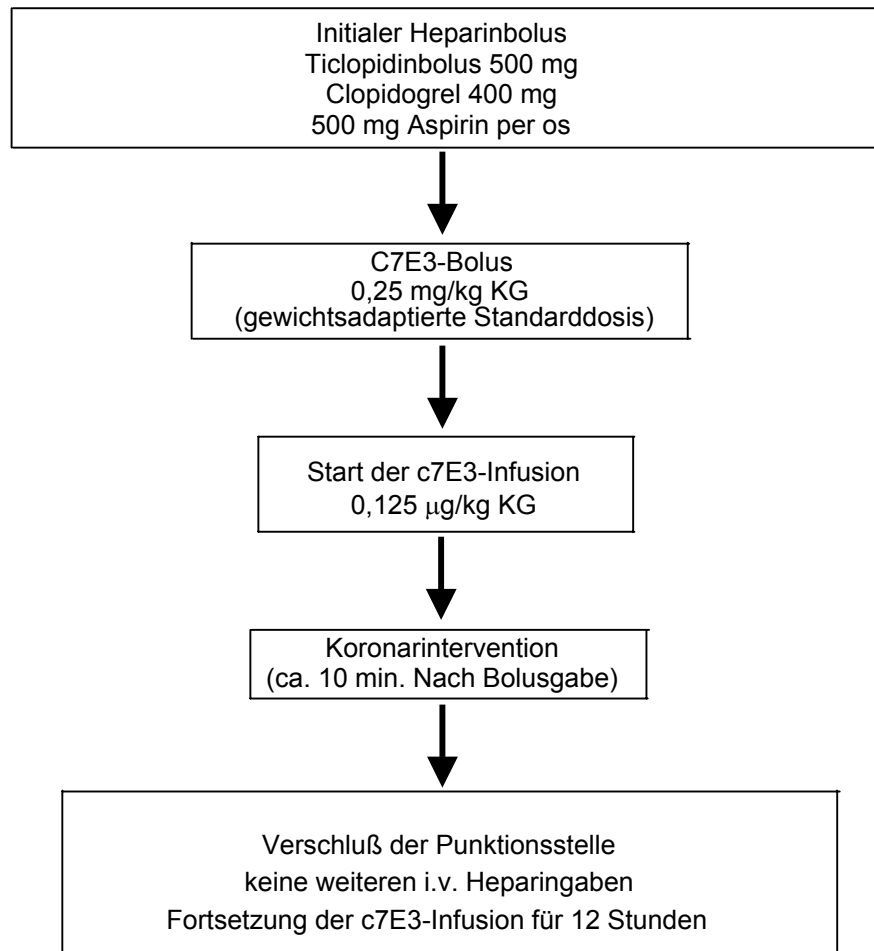
#### 3.1.2 Antithrombozytäre Therapie der Studienpatienten

Alle Patienten erhielten folgende antithrombozytäre Medikation:

- einen gewichtsadaptierten Bolus unfraktioniertes Heparin (70 I.E. pro kg Körpergewicht) intravenös
- 500 mg Acetylsalicylsäure
- Ticlopidin (Tyklid<sup>®</sup>) als Bolus von 500 mg vor Intervention, gefolgt von 2x 250 mg/d über 4 Wochen nach dem Eingriff
- Clopidogrel (Plavix<sup>®</sup>, Iscover<sup>®</sup>) in einer Dosis von 400 mg 2 Stunden vor Intervention
- und den Fibrinogenrezeptorantagonisten c7E3 als im Handel erhältliches Präparat ReoPro<sup>®</sup>, Abciximab, der Firma Lilly (Gießen, Deutschland).

ReoPro<sup>®</sup> (c7E3) wurde als Initialbolus in gewichtsadaptierter Standarddosis mit 0,25 mg/kg Körpergewicht gegeben. Darauf folgte eine 12-stündige c7E3-Infusionsperiode über einen intravenösen Zugang mit 10 µg/min. Die Koronarintervention erfolgte etwa 10min. nach Bolusgabe. Einen Überblick über den Ablauf der Therapie bei koronarer Intervention gibt Abbildung 12.





**Abbildung 12: Konzept zur elektiven Therapie mit c7E3 während koronarer Intervention**

Bei keinem der Patienten traten Nebenwirkungen in Form von Blutungskomplikationen auf. Die koronare Intervention verlief bei allen Patienten erfolgreich, bei keinem der Patienten kam es innerhalb des Beobachtungszeitraums zu einer Restenose des eröffneten Gefäßes mit akuter koronarer Ischämie, die eine Rekoronarangiographie erfordert hätte.

### 3.1.3 Probengewinnung

Den Patienten wurde insgesamt zu 10 Zeitpunkten Blut abgenommen:

- vor Gabe des c7E3-Bolus
- nach 5 Minuten, unmittelbar zu Beginn der Eingriffs
- nach 15-, 30-, 60-, und 120 Minuten
- nach 4-, und 8 Stunden
- nach 1 Tag und nach 3 Tagen

Durch dieses Protokoll war es möglich, besonders in der Phase der größten Veränderungen eine engmaschige Kontrolle der Thrombozytenparameter zu erhalten und Veränderungen im peripheren Blut über einen längeren Zeitraum zu messen. Die Proben wurden bis zum Entfernen des arteriellen Zugangs aus der Arteria femoralis entnommen. Die Entfernung des arteriellen Zugangs erfolgte zwischen ein- und drei Stunden nach dem Eingriff bei einer PTT von unter 60 Sekunden. Die weiteren Proben wurden aus einer peripheren Oberarmvene nach mäßiger Stauung entnommen. Dabei nahm man für die durchflußzytometrische Messung in ein mit 0,4 ml CPDA (Firma Greiner, Nürtingen, Deutschland) gefülltes Polypropylenröhrchen 1,6 ml Vollblut ab, zur Messung der Lichtaggregometrie und der Vollblutaggregometrie wurden 15 ml mit 3,8% Zitrat antikoaguliertes Blut entnommen (Zitrat-Blut). Ein 2 ml EDTA-Röhrchen (Firma Greiner, Nürtingen, Deutschland) wurde zur Bestimmung von Thrombozytenzahl, Hämoglobin, Hämatokrit und weiteren Laborparametern entnommen. Wie in früheren Studien beschrieben wurde, führt diese Abnahmetechnik zu keiner meßbaren Aktivierung der Thrombozyten (Frelinger 1991). Die CPDA-Röhrchen wurden nach der Abnahme sofort auf Eis gelegt und innerhalb von 60 Minuten weiterverarbeitet. Die Zitrat-Blut-Röhrchen wurden unmittelbar weiterverarbeitet. Die Bestimmungen der Laborparameter wurde freundlicherweise von der Abteilung für Klinische Chemie unserer Klinik durchgeführt.

#### 3.1.4 Probenaufbereitung

Bereits in früheren Untersuchungen hat sich das verwendete Studienprotokoll als reproduzierbar und klinisch geeignet erwiesen (Gawaz *et al* 1995). Das für die lichtaggregometrischen Untersuchungen benötigte Plättchen-reiche Plasma (PRP) wurde aus Zitrat-Blut durch Zentrifugation hergestellt (900 Umdrehungen pro Minute bei 20°C für 10 Minuten). Der PRP-haltige Überstand wurde daraufhin mit einer Eppendorf-Pipette (Fa. Eppendorf, Hamburg, Deutschland) abgenommen, vorsichtig in ein 15 ml Kunststoffgefäß (Falcon, Fa. Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland) umgefüllt und dort durch leichte Bewegungen vermischt. Um Plättchen-armes Plasma (PPP) herzustellen wurde ca. 2 ml PRP in ein 2 ml Eppendorf-Gefäß umgefüllt und bei 1300 U/min für 3 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde die Thrombozytenzahl des PRP im Zählgerät (Fa. Sysmex, Norderstadt, Deutschland) bestimmt und durch Zugabe von PPP auf eine konstante Plättchenzahl von  $2 \times 10^8$  Thrombozyten pro  $\mu\text{l}$  eingestellt. Von dem gewonnenen plättchenreichem Plasma konnten 20  $\mu\text{l}$  für die Durchflußzytometrie verwendet werden, der Rest war für die aggregometrische Untersuchung bestimmt. Für die Aggregometrie wurden jeweils 450  $\mu\text{l}$  PRP in silikonisierte Glasküvetten (Fa. Bio/Data, Horsham, USA) gegeben und 50  $\mu\text{l}$  der Reagenz Chrono-Lume (Fa. Chrono-Log, Haverton, USA) beigefügt. Als Referenzwert diente eine zweite Glasküvette, die mit 500  $\mu\text{l}$  PPP gefüllt wurde. Die Messung der Aggregation erfolgte sofort im Anschluß an die Herstellung der Reagenz. Für die Vollblutaggregometrie wurde Zitrat-Blut mit PBS-Puffer ("Phosphate-buffered saline") (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) im Verhältnis 1:1 verdünnt. Um zusätzlich zur Aggregationsmessung die ATP-Freisetzung mit Hilfe der Luminometrie zu bestimmen, wurden 400  $\mu\text{l}$  PBS-Puffer und 100  $\mu\text{l}$  Chrono-Lume verwendet und mit 500  $\mu\text{l}$  Vollblut versetzt. Für die Durchflußzytometrie wurden 20  $\mu\text{l}$  des PRP mit 1980  $\mu\text{l}$  PBS-Puffer verdünnt (Verdünnung 1:100). In ein Kunststoffröhrchen (Fa. Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland) gibt man zur Herstellung der benötigten Reagenz 5  $\mu\text{l}$  des spezifischen Antikörpers (z.B. CD40L-PE oder CD42-PE), dazu 5  $\mu\text{l}$  eines spezifischen FITC-gefärbten Antikörpers und 35  $\mu\text{l}$  verdünntes PRP. Jeder Probe wurde entweder ein Agonist in Form von 5  $\mu\text{l}$  ADP (100  $\mu\text{mol/L}$ ), 5  $\mu\text{l}$  TRAP (250  $\mu\text{mol/L}$ ) oder 5  $\mu\text{l}$

Thrombin (2,2 U/ml) zugegeben, beim unstimulierten Referenzwert dienten 5 µl PBS-Puffer zur Auffüllung des Volumens. Auf diese Weise erhielt man ein konstantes Geamtreaktionsvolumen von 50 µl. Anschließend wurden die Proben unter Lichtausschluß bei Raumtemperatur und ohne Agitation für 15 Minuten inkubiert.

**Tabelle 9: Verwendete Antikörper und Agonisten**

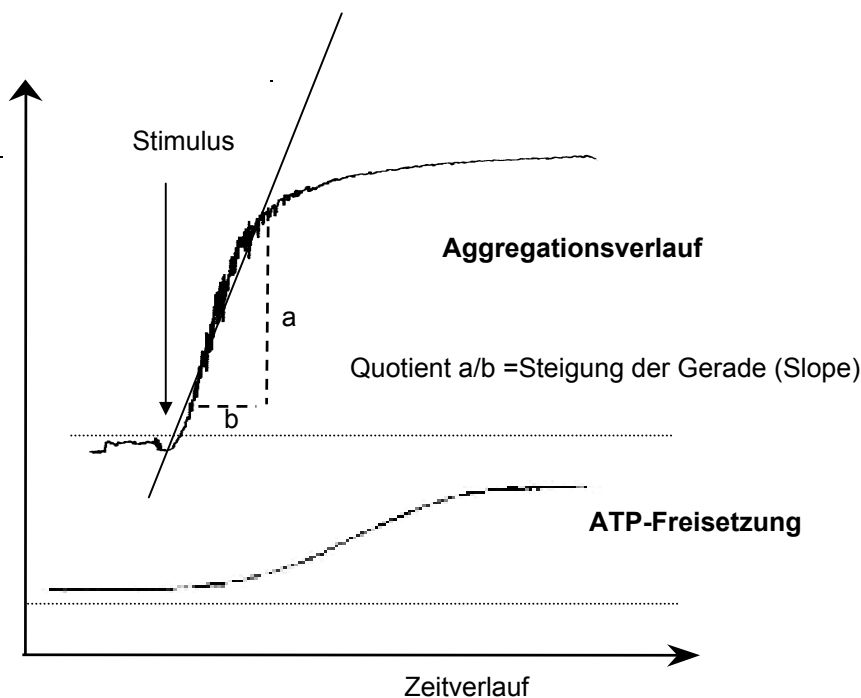
<b>PE-Antikörper</b>	<b>FITC-Antikörper</b>	<b>Antigen</b>	<b>Agonisten</b>
CD 42b-PE	CD 41-FITC CD 61-FITC CD 62P-FITC c7E3-FITC	<b>GPIIb-IIIa</b> <b>GPIIb-IIIa</b> <b>P-Selektin</b> <b>GPIIb-IIIa</b>	PBS, ADP, TRAP, Thrombin

Die Antikörperbindung wurde nach der Inkubationsphase durch Zugabe von jeweils 300 µl einer 0,5%-Paraformaldehyd-PBS-Lösung mit ph 7,4 (Fa. Sigma, Deisenhofen, Deutschland) gestoppt. Bis zur durchflußzytometrischen Analyse innerhalb von 24 Stunden wurden die Proben unter Lichtausschluß bei 4<sup>0</sup> Celsius aufbewahrt.

#### **3.1.5 Aggregometrische Untersuchung der Thrombozyten**

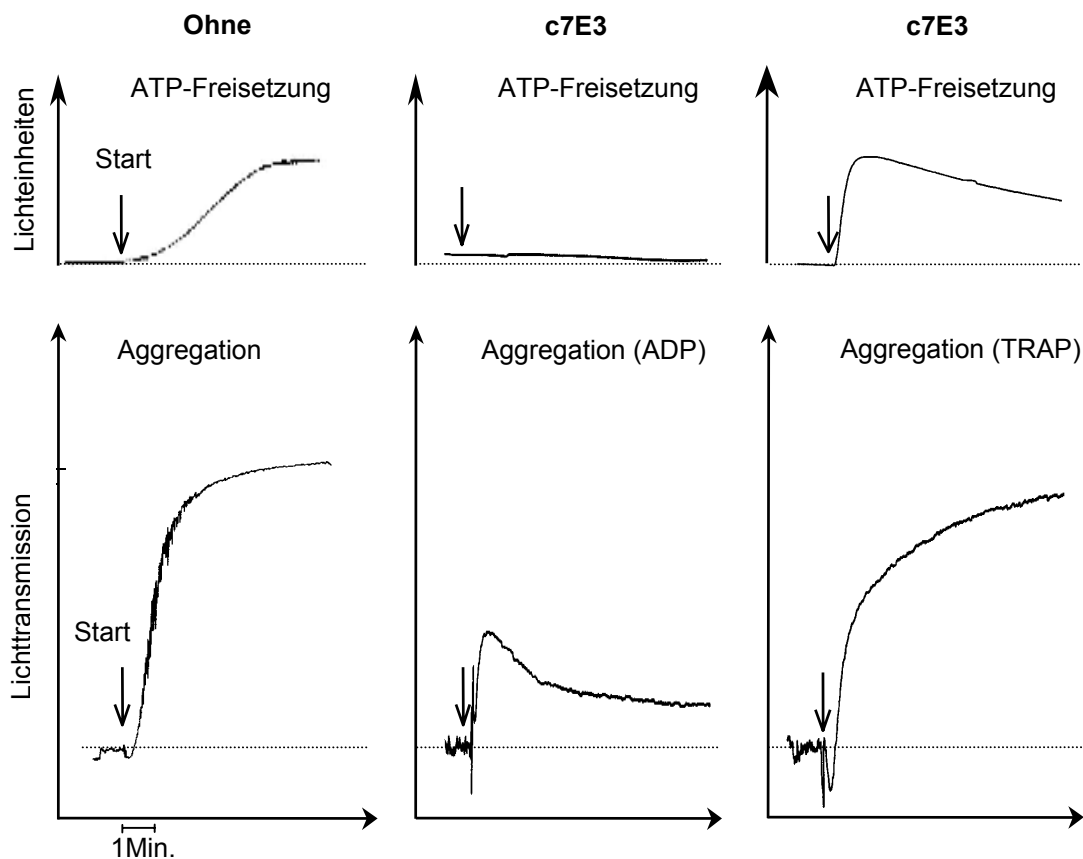
Die heute gebräuchlichste Methode für die Thrombozytenfunktionsdiagnostik ist die Bestimmung der Plättchenaggregation. Die Bestimmung der Aggregation erfolgt gemäß der Methode nach Born (Born 1964). Das Verfahren beruht auf der Eigenschaft, daß die optische Dichte einer Partikelsuspension abhängig von der Partikelzahl und nicht von deren Größe ist. PRP wird hierbei in silikonisierte Glasküvetten gegeben und unter Verwendung eines Rührstäbchens (konstant 1000 Umdrehungen pro Minute) mittels Magnetrührer durchmischt. Durch ein photometrisches Verfahren wird die plättchenbedingte Trübung der Suspension anhand einer Referenzküvette, die 500 µl PPP enthält und den 100%-Wert der Lichttransmission darstellt, bestimmt. Durch Zugabe eines Plättchenstimulus in die mit PRP gefüllte Küvette kommt es zur

Aggregatbildung und damit zur Abnahme der Trübung und zur Zunahme der Lichttransmission. Der Grad der Trübungsänderung ist ein Maß für die Aggregation, welche als Funktion der Zeit mittels Schreiber in Form einer Aggregationskurve aufgezeichnet wird. Bei Zusatz von ADP als Plättchenstimulus stellt sich zunächst die Formveränderung der Thrombozyten ("shape change") ein, was an der Aggregationskurve anhand der Abnahme der Lichttransmission erkannt werden kann. Danach steigt die Aggregationskurve durch Zunahme der Lichttransmission an (primäre, noch reversible Aggregation), die entweder im weiteren Verlauf wieder rückgängig ist (Deaggregation) oder nach vorübergehendem Erreichen eines Plateaus (biphasische Aggregation) in eine zweite Aggregationsphase übergeht (sekundäre, irreversible Aggregation). Bei Zusatz von Adrenalin fehlt der shape change bei sonst identischem Kurvenverlauf. Eine weitere Methode zur Bestimmung der Aggregation ist die Vollblutaggregometrie. Die Methode basiert auf der elektrischen Impedanzmessung. Im Gegensatz zum lichtaggregometrischen Verfahren erfolgt der Nachweis der Thrombozytenaggregation bei der Vollblutaggregometrie in einer weitgehendst physiologischen Umgebung der Blutplättchen. Nach Zusatz der Agonisten bildet sich auf einer Platinelektrode ein Monolayer von Plättchen aus, der zu einer Erhöhung des elektrischen Widerstands führt. Die Veränderung des Widerstandes dient als Prinzip der Impedanzmessung. Die Ergebnisse sind denen der optischen Messung vergleichbar. Die Methode erfordert jedoch keine weitere Aufarbeitung der Blutproben (keine Zentrifugation). Auch hierbei ist wie bei der Lichtaggregometrie eine Kombination mit der Luminometrie möglich. Es konnten dadurch die entsprechenden Parameter wie bei der Lichtaggregometrie ausgewertet werden. Vollblut wird dabei durch Zugabe von 3,8% Zitrat antikoaguliert und mit physiologischer Kochsalzlösung (0,9% NaCl) im Verhältnis 1:1 verdünnt. Nach Einsetzen der Platinelektrode wird der Agonist zugegeben und die Veränderung der Impedanz (Angabe in Ohm) im Zeitverlauf registriert. Parallel zur Messung der Aggregation war am verwendeten 2-Kanal Chronolog Aggregometer (Nobis, Deutschland) auch eine Bestimmung des freigesetzten ATP aus den dichten Granula der Thrombozyten möglich. Die Lumineszenz wird durch die Reaktion von ATP mit einem Luciferin-Luciferase-Reagenz erzeugt.



**Abbildung 13: Auswertung der Lichtaggregometrie und Luminometrie**

Anhand der erzeugten Lichtreaktion und nach Zugabe einer definierten Menge an ATP-Standard (Fa. Sigma, Deisenhofen, Deutschland), welches einer Stoffmenge von 2 mmol entspricht, kann die Freisetzungsmenge von ATP quantifiziert werden. Nach Stimulation der Plättchen mit ADP kommt es verzögert in der zweiten Aggregationsphase zur ATP-Freisetzung, während stärkere Stimuli wie Thrombin eine sofortige ATP-Freisetzung auslösen. Wie in Abbildung 13 dargestellt konnten auf diese Weise sowohl die größte Amplitude (maximale Aggregation), die Aggregation nach 5 Minuten, die größte Steigung („Slope“), als auch die ATP-Freisetzung (im Vergleich zum ATP-Standard) bestimmt werden. Die Plättchenaggregation sowie die ATP-Freisetzung wurden bei 37°C gemessen. Die Verstärkung für die Aggregation war konstant auf 0,1 Volt eingestellt, die Verstärkung der ATP-Freisetzung auf 0,5 Volt, der Papiervorschub beträgt 2 cm/Minute. Im Rahmen der Studie wurde zu Beginn die Spontanaggregation ohne Zugabe eines Agonisten bestimmt, wobei die Messung nach Einstellung der Nulllinie für die Dauer von 5 Minuten registriert wurde. Die Bestimmung der Spontanaggregation ermöglicht die Identifizierung von Patienten mit einer Hyperaggregabilität.



**Abbildung 14: Beispiel der aggregometrischen Analyse und der ATP-Freisetzungsreaktion**

Bei der Aggregationskurve wurde sowohl der maximale Ausschlag, als auch die Steigung (Slope) der Kurve durch Berechnung des Quotienten aus a durch b bestimmt. Bei der ATP-Freisetzung wurde ebenfalls der maximale Ausschlag gemessen und ins Verhältnis zu einer Standarddosis ATP gesetzt. Die Messungen wurden nach Zugabe des Agonisten, nach Einstellung der Nulllinie mit 5  $\mu\text{l}$  ADP, 1 mM (Endkonzentration 10  $\mu\text{mol/L}$ ), bzw. 5  $\mu\text{l}$  TRAP, 2,5 mM (Endkonzentration 25  $\mu\text{mol/L}$ ), oder Thrombin 2,2 U/ml (Endkonzentration 0,2 U/ml) gestartet. Nach Zugabe des Agonisten wurde die Messung über fünf Minuten registriert und nach Ablauf der Zeit zur quantitativen Bestimmung der ATP-Freisetzung 5  $\mu\text{l}$  ATP-Standard zugegeben. Abbildung 14 zeigt beispielhaft die Aggregation und die Freisetzung von ATP, welche bei der Untersuchung gegeneinander aufgetragen werden.

#### 3.1.6 Thrombozytäre Oberflächenmarker

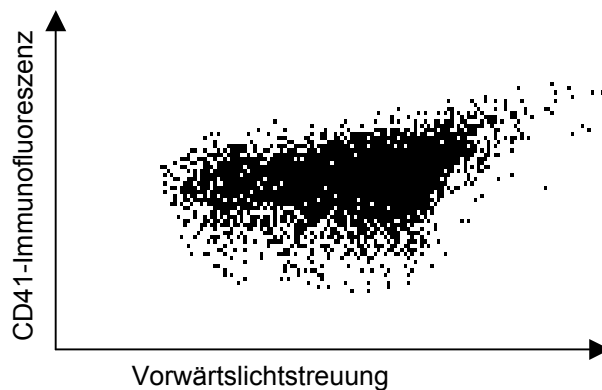
Durch Verwendung von spezifischen monoklonalen Oberflächenmarkern, die gegen den GPIIb-IIIa-Komplex gerichtet sind, kann der Funktionszustand des Rezeptors (ruhend- aktiviert- ligandenbesetzt) auf zirkulierenden Thrombozyten definiert werden. Der monoklonale Antikörper anti- CD41 dient der Evaluation der Oberflächendichte von GPIIb-IIIa. Der hochaffine aktivierte Rezeptorkomplex kann durch Bindung des monoklonalen Antikörpers PAC-1 charakterisiert werden. Durch weitere spezifische Antikörper, welche gegen Ligandeninduzierte Bindungsstellen gerichtet sind (LIBS), kann der ligandenbesetzte Rezeptor erkannt werden. Die Glykoproteine P-Selektin und GP53 werden ausschließlich an der aktivierten Thrombozytenoberfläche exponiert, sofern eine Degranulation von  $\alpha$ -Granula (P-Selektin) oder Lysosomen (GP53) stattgefunden hat. Eine erhöhte Bindung von anti-CD62P oder anti-CD63 weist auf eine irreversible Degranulation der Thrombozyten hin.

#### 3.1.7 Durchflußzytometrische Untersuchung der Blutplättchen

Sämtliche Messungen wurden an einem 2 W-Argonlaser „FACScan-Durchflußzytometer“ der Firma Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland, durchgeführt. Dieses wurde mittels im Handel erhältlichen Standard-Fluoreszenz-Mikrobeads (Calibrite<sup>®</sup>, Fa. Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland) geeicht. Die Auswertung der Daten erfolgte durch das am Gerät angeschlossene Datenverarbeitungsprogramm FACScan des Herstellers. Die Durchflußzytometrie erlaubt es, in Verbindung mit fluorochrommarkierten monoklonalen Antikörpern, spezifische Veränderungen der aktivierten Thrombozytenoberfläche zu charakterisieren. Der Nachweis thrombozytärer Membranglykoproteine mit Hilfe der Durchflußzytometrie dient somit zur Beurteilung prothrombotischer Krankheitsbilder (Abrams *et al* 1990, Böck *et al* 1994, Kestin *et al* 1993, Michelson 1996). Anhand früherer Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß die angewandte Methodik zur Untersuchung der Thrombozytenfunktion *in vivo* geeignet und reproduzierbar ist (Becker *et al* 1994, Kestin *et al* 1993, Abrams *et al* 1990, Gawaz *et al* 1995).

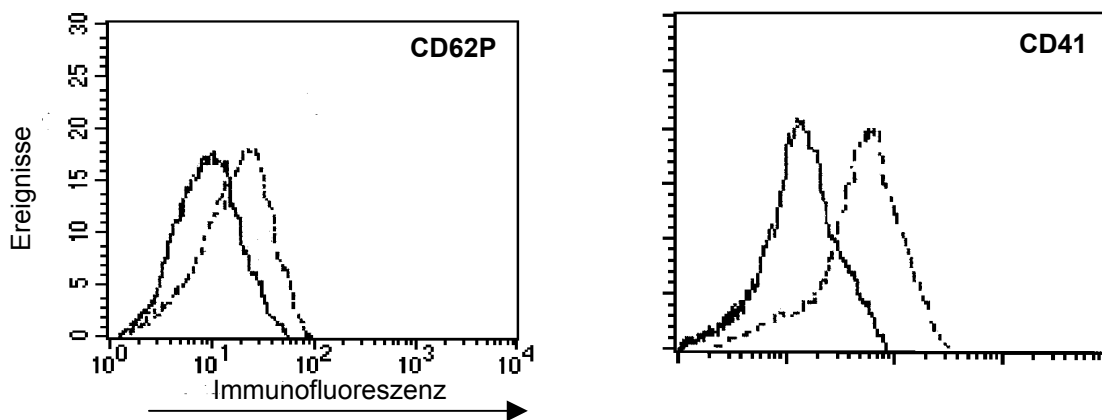


Die Entwicklung aktivierungsabhängiger monoklonaler Antikörper und spezieller durchflußzytometrischer Methoden ermöglicht es, den Funktionszustand zirkulierender Thrombozyten *ex vivo* zu bestimmen. Durch Inkubation mit spezifischen monoklonalen Antikörpern untersucht man die Exposition thrombozytärer Membranglykoproteine. Die Antikörper können durch ihre Konjugation mit fluoreszierenden Substanzen wie Phycoerythrin (PE) oder Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) erkannt werden. Dazu werden die genannten Antikörper im vielfachen Überschuß eingesetzt, um gesättigte Konzentrationen zu erhalten und können durch ihre Konjugation mit Fluorescein-5-Thioisozyanat nach ihrer Bindung mit den Thrombozyten in einem Durchflußzytometer gemessen werden. Thrombozyten produzieren im Durchflußzytometer aufgrund ihrer Größe und Oberflächenbeschaffenheit eine für sie charakteristische Lichtstreuung (Gawaz *et al* 1994, Becker *et al* 1994, Böck *et al* 1994 ). Mit Hilfe der Durchflußzytometrie ist es nun möglich, gleichzeitig sowohl Fluoreszenz, als auch Streulichtsignale einer Zelle zu messen. Die Durchflußzytometrie analysiert Einzelzellen, welche in einem konstanten Fluß durch einen Laserstrahl detektiert werden. Das Streulicht und die Intensität der Fluoreszenz werden von spezifischen Photodioden registriert. Dadurch kann die Größe (Vorwärtsstreulicht, "forward scatter"), Granularität (Seitwärtsstreulicht, "side scatter") und Oberflächenexpression von Antigenen nach Bindung eines fluorochrom-konjugierten Antikörpers (mittlere Immunofluoreszenz) bestimmt werden. Die Messung dieser Thrombozyteneigenschaften erfolgt durch die Durchflußzytometrie zur gleichen Zeit, so daß innerhalb kürzester Zeit mehrere tausend Zellen gemessen und klassifiziert werden können. Mit Hilfe der charakteristische Lichtstreuung und der für Blutplättchen spezifischen CD42b-PE Fluoreszenz ist es möglich, den Meßbereich selektiv auf die Plättchenpopulation einzustellen, während Detritus und andere Zellpopulationen wie Leukozyten und Erythrozyten nicht gemessen werden. Der Registrierbereich wurde vor jeder Meßreihe konstant auf diesen Bereich eingestellt. Bei der Zwei-Parameter-Darstellung können zwei unabhängige Parameter wie z.B. Fluoreszenz und Streulicht zusammen dargestellt werden. Dabei werden die Intensitätsachsen der beiden Parameter gegeneinander aufgetragen. Jeder Punkt im Diagramm entspricht einer Zelle mit der entsprechenden CD42-PE-Fluoreszenz und Vorwärtslichtstreuung. Der aus den einzelnen Punkten entstehende Streubereich ist charakteristisch für die Thrombozyten.



**Abbildung 15: Zwei-Parameter-Darstellung zur Definition der Thrombozyten**

Die spezifische FITC-Fluoreszenz der Thrombozyten im eingestellten Meßbereich läßt sich in Form eines Histogramms darstellen: Bei der Histogrammdarstellung handelt es sich um eine eindimensionale Darstellung, die x-Achse des Diagramms bezeichnet die Fluoreszeintensität, die y-Achse die Anzahl der Zellen.



**Abbildung 16: Durchflußzytometrische Intensitätsverteilung**

*Dargestellt ist die Intensitätsverteilung von zwei Meßproben mit jeweils 2500 registrierten Fluoreszenzereignissen.*

So ist es möglich, die Verteilung einer Zelleigenschaft wie z.B. der FITC-Fluoreszenz innerhalb einer Zellpopulation zu beschreiben: ein Signal schwacher Intensität wird auf der linken Seite der x-Achse abgebildet, ein stärkeres Signal rechts davon. Pro Messung wurden 2500 Fluoreszenzereignisse registriert und deren Intensität in einer

Verteilungskurve dargestellt. Der Mittelwert der Kurvenverläufe erlaubt anschließend einen Rückschluß auf die Antikörperbindung und somit auf die Exposition thrombozytärer Membranglykoproteine. Die gestrichelt dargestellte Kurven stammen von einer Probe mit stimulierten Thrombozyten und somit im Vergleich höherer Gesamtintensität, erkennbar an der Verschiebung der Kurve in Richtung höherer Fluoreszenzintensitätsbereiche. Der Median und der Mittelwert der Kurvenverläufe erlauben eine quantitative Aussage über die Antikörperbindung und damit über die Exposition thrombozytärer Membranproteine.

#### **3.1.8 Statistische Auswertung**

Anhand Datenanalyse durch den "Kolmogorov-Smirnov-Test" konnte festgestellt werden, daß die Ergebnisse der Untersuchungen keiner Normalverteilung nach Gauß unterliegen. Daraufhin konnten nichtparametrische Testverfahren angewandt werden:

- "Friedman's-Test" für Signifikanzwerte
- "Wilcoxon-Test" für verbundene Stichproben
- "Kruskal-Wallis-Test" und "Mann-Whitney-Test" für unverbundene Stichproben

Dabei gelten in der vorliegenden Arbeit p-Werte von  $< 0,05$  gelten als signifikant, von  $< 0,01$  als hochsignifikant. Die statistischen Auswertungen wurden mit dem Programm "SPSS 9.0 for Windows" durchgeführt.

## **3.2 Einfluß von Abciximab auf die Thrombozytenfunktion *in vitro***

### **3.2.1 Aggregometrische Untersuchung von Thrombozyten**

### **3.2.2 Probengewinnung**

Für die aggregometrische Untersuchung wurde mit 2,8% Zitrat antikoaguliertes Blut verwendet. Dazu nahm man gesunden Probanden Blut in eine mit Zitrat gefüllte 10 ml Spritze ab. Die Abnahme erfolgte aus einer mäßig gestauten Oberarmvene durch Punktion mit einer 19 Gauche-Kanüle. Wie in früheren Studien belegt wurde, führt diese Abnahmetechnik zu keiner meßbaren Aktivierung der Thrombozyten *in vitro* (Gawaz *et al* 1999). Die verschiedenen Durchführungen wurden jeweils an 3 verschiedenen, gesunden Probanden durchgeführt.

### **3.2.3 Probenaufbereitung**

PRP und PPP wurden wie in 3.1.4 beschrieben hergestellt. Das von Gawaz (Gawaz *et al* 1995) entwickelte Protokoll hat sich dabei als aussagekräftig und reproduzierbar erwiesen. Für die weitere Versuchsdurchführung wurde das PRP unterschiedlich weiterverarbeitet:

- a) PRP wurde mit unterschiedlichen Konzentrationen des Antagonisten c7E3 inkubiert. Die Inkubationszeit war konstant 15 Minuten bis zur Messung. Es wurden dabei sechs verschiedene Konzentrationen verwendet: 1 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml, 25 µg/ml, 50 µg/ml und 100 µg/ml.
- b) PRP wurde mit einer konstanten Konzentration von 50 µl/mg c7E3 inkubiert. Die Inkubationszeiten variierten dabei und betragen 15 Min., 30 Min., 1 Stunde und 2 Stunden.

Für die Inkubation wurden je 445 µl PRP, 5 µl des GPIIb-IIIa-Antagonisten c7E3 und 50 µl Chrono- Lume verwendet. Die weitere Verarbeitung erfolgte analog zu 3.1.4.

- c) PRP wurde mit c7E3 (50 µg/ml) und Heparin (2 U/ml), Low Molekular Weight Heparin (2 U/ml) bzw. Hirudin (2 U/ml) inkubiert. Als Referenzwert diente hierbei PRP, das nur alleine mit c7E3 (50 µg/ml) inkubiert wurde. Die Inkubationszeit betrug hierbei konstant 15 Minuten.

#### **3.2.4 Messung**

Das Prinzip der Aggregometrie und der Luminometrie erfolgte gemäß der Methode nach Born (Born 1964) wie unter 3.1.5 beschrieben. Die Messungen wurden nach Nullinieneinstellung des Aggregometers mit jeweils 5 µl ADP 2mM (Endkonzentration 20 µmol/L) oder TRAP 5 mM (Endkonzentration 50 µmol/L) gestartet. Nach der Aktivierung wurde der Aggregationsverlauf über 5 Minuten registriert.

#### **3.2.5 Durchflußzytometrische Untersuchung von Thrombozyten**

Das Prinzip der durchflußzytometrischen Analyse ist unter 3.1.7 beschrieben. Anhand früherer Untersuchungen wurde gezeigt, daß die angewandte Methodik zur Untersuchung der Thrombozyten *in vivo* geeignet und reproduzierbar ist (Becker *et al* 1994, Kestin *et al* 1993, Abrams *et al* 1990, Gawaz *et al* 1995).

#### **3.2.6 Probengewinnung**

Für die Durchflußzytometrische Untersuchung wurde in eine mit 2 ml CPDA (Fa. Greiner, Nürtingen, Deutschland) gefüllte 10 ml Spritze 8 ml Vollblut abgenommen. Die Abnahme erfolgte ansonsten wie unter 3.1.3 beschrieben. Wie von Frelinger

(Frelinger 1991) beschrieben, führt diese Abnahmetechnik zu keiner meßbaren Aktivierung der Thrombozyten.

#### **3.2.7 Probenaufbereitung**

PRP wurde aus Zitratblut wie unter 3.1.4 gewonnen. Das PRP wurde auf verschiedene Weisen weiterverarbeitet:

- a) PRP wurde mit unterschiedlichen Konzentrationen an c7E3 inkubiert. Die Konzentrationen betragen 1 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml, 25 µg/ml, 50 µg/ml und 100 µg/ml. Die Inkubationszeit war konstant 15 Minuten bis zur weiteren Verarbeitung.
- b) PRP wurde mit einer c7E3-Konzentration von 50 µg/ml inkubiert. Die Inkubationszeiten betragen dabei 15 Min., 30 Min., 1 Stunde und 2 Stunden.
- c) PRP wurde mit einer konstanten c7E3-Konzentration von 50 µg/ml ebenfalls konstant für 15 Minuten inkubiert.

Nach den entsprechenden Inkubationszeiten erfolgte die Verdünnung des vorinkubierten PRP mit Phosphate-buffered saline (PBS) (Fa. Sigma, Deisenhofen, Deutschland) im Verhältnis 1:100. Anschließend wurde zum Erhalten von signifikanten Werten die Versuche mit einer Inkubationszeit von 30 Minuten in drei weiteren Durchgängen wiederholt. Für die Inkubation wurden jeweils 60 µl verdünntes PRP und 10 µl c7E3 in den verschiedenen Konzentrationen verwendet. Die Endkonzentration wurde auf ein Gesamtvolumen von 100 µl berechnet, um den Verdünnungsfehler bei anschließender Zugabe der Antikörper und Agonisten zu vermeiden. Während der Inkubationsphase wurde in vorher beschriftete Kunststoffröhrchen 10 µl CD42b-PE, bzw. 10 µl CD40L-PE, 10 µl eines spezifischen monoklonalen, FITC-gefärbten Antikörpers und 10 µl Stimulus, bzw. PBS für den unstimulierten Versuch, vorgegeben. Die Tabellen 9, 10 und 11 zeigen das Pipettierschema für die durchflußzytometrische Analyse und die Konzentrationen der eingesetzten Agonisten:

**Tabelle 9: Pipettierschema für die Messung der Plättchen am Durchflußzytometer**

---

60 µl PRP mit PBS verdünnt 1:100  
 + 10 µl c7E3 in verschiedenen Konzentrationen  
 Vorinkubationsschritt (verschiedene Inkubationszeiten)  
 + 10 µl CD 42b-PE oder CD40l-PE  
 + 10 µl spezifischer FITC-Antikörper  
 + 10 µl Stimulus (ADP, TRAP, Thrombin oder PBS)

---

**Tabelle 10: Konzentrationen der eingesetzten Agonisten in der Durchflußzytometrie**

Agonist	eingesetztes Volumen	Endkonzentration
ADP	10 µl	20 µmol/L
TRAP	10 µl	50 µmol/L
Thrombin	10 µl	0,2 U/ml

Für die Proben, die wie unter a) und b) vorbereitet waren, wurden folgende Antikörper benutzt:

**Tabelle 11: Verwendete Antikörper in der Durchflußzytometrie**

Antikörper	Epitop
CD41-FITC	GPIIbIIIa
CD61-FITC	GPIIIa
C7E3-FITC	GPIIbIIIa
CD62P-FITC	P-Selektin

Für die Proben, die wie unter c) vorbereitet waren, wurden folgende Antikörper benutzt:

Antikörper	Epitop
CD61-FITC	GPIIIa
C7E3-FITC	GPIIbIIIa

Nach Zugabe der vorinkubierten Plättchen wurde weitere 15 Minuten Inkubationszeit mit den Antikörpern für die Bindung an die entsprechenden Membranglykoproteine aufgewendet. Die durchflußzytometrische Analyse folgte direkt im Anschluß.

#### **3.2.8 Monoklonale Antikörper**

Es wurden PE-Fluoreszenz-markierte Antikörper vom Typ anti-CD42b und anti-CD401 (Fa. Immunotec, Marseille, Frankreich) verwendet. Anti-CD62P, anti-CD61 und anti-CD41 (Fa. Immunotec, Marseille, Frankreich) lagen als direkt markierte Fluoreszenz-konjugate (FITC) vor.

#### **3.2.9 Messung**

Das Prinzip des Durchflußzytometers und die Messung der spezifischen FITC-Fluoreszenz wurde in Punkt 3.1.7 dargestellt, das Protokoll wurde hier in analoger Weise angewendet (Becker *et al* 1994, Kestin *et al* 1993, Abrams *et al* 1990, Gawaz *et al* 1995)

### **3.3 Einfluß von c7E3 auf die Adhäsionseigenschaften von Thrombozyten**

#### **3.3.1 Herstellung von gewaschenen Thrombozyten**

Die Isolation humaner Thrombozyten erfolgte aus Vollblut, das kurz vor Beginn der Experimente aus der Kubitalvene von gesunden Probanden entnommen wurde. Die Blutabnahme wurde bereits unter 3.1.3 beschrieben. Zur Herstellung gewaschener



Thrombozyten wurde in eine mit 4 ml saurer Dextrose-Zitrat-Lösung (pH 4,5) gefüllte 20 ml-Spritze 16 ml Blut abgenommen (Verhältnis 1:5). Je 10 ml Blut wurden daraufhin vorsichtig in zwei 15 ml-Kunststoffbehälter gegeben. Zur Herstellung von PRP wurde bei 1000 U/min für 20 Minuten zentrifugiert. Das gewonnene PRP wurde mit einer Eppendorf-Pipette abgenommen, in ein 50 ml Falcon gegeben und mit Tyrodes-Puffer (pH 6,5 + 0,1% BSA + 0,1% Glucose, 137,5 mmol/L NaCl, 12 mmol/L NaHCO<sub>3</sub>, 2,6 mmol/L KCL) auf 35 ml aufgefüllt. Anschließend wurde für 10 Minuten bei 2100 U/min zentrifugiert und der Überstand komplett abgesaugt. Das Pellet wurde daraufhin in 500 µl Tyrodes-Puffer vorsichtig resuspendiert und mit weiteren 500 µl Tyrodes-Puffer (pH 7,4 + 0,1% BSA + 0,1% Glucose) vermischt. Anschließend wurde die Thrombozytenzahl im Zählgerät (Fa. Sysmex, Norderstadt, Deutschland) bestimmt und durch Verdünnung mit Tyrodes-Puffer auf eine Zellzahl von  $2 \times 10^5$  Zellen pro µl eingestellt. Die gewaschenen Thrombozyten wurden danach sofort weiterverarbeitet.

#### **3.3.2 Herstellung der Mikrotiterplatten**

Für die Untersuchung der Adhäsion von Thrombozyten wurden folgende Mikrotiterplatten verwendet:

- Fibrinogen
- Vitronektin
- Fibronektin
- Laminin
- Kollagen

Die mit Fibrinogen und Vitronektin beschichteten Platten wurden selbst hergestellt, dafür wurden unbeschichtete 96-Napf-Mikrotiterplatten (Fa. Greiner, Frickenhausen, Deutschland) pro Napf mit jeweils 100 µl PBS-gepuffertem Fibrinogen, in einer Konzentration von 5 µg/ml, bzw. Vitronektinlösung (5 µg/ml) über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Fibronektin, Laminin und Kollagen wurden von Biocoat (Fa. Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland) hergestellt. Nach Entfernen dieser Lösungen wurden die Platten einmal mit PBS (100 µl) gewaschen, anschließend mit 2,5 % BSA-Lösung (Bovines Serum Albumin, Fa. Sigma, Deisenhofen, Deutschland)

versehen und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert, um eine Absättigung unspezifischer Valenzen zu erreichen. Danach folgten 2 Waschgänge mit PBS zur Entfernung von überschüssigem BSA, gefolgt von der Austrocknung der Platten an der Raumluft.

#### **3.3.3 Versuchsdurchführung**

Es wurde die Plättchenbindung auf immobilisierte Proteine (Fibrinogen, Vitronektin, Fibronektin, Laminin und Kollagen), die sich auf verschiedenen 96-Well-Mikrotiterplatten befanden, untersucht. Zum Vergleich diente eine unbeschichtete Plastikplatte. Die Menge adhärenter Thrombozyten konnte durch kolorimetrische Methoden quantitativ bestimmt werden. Die gewaschenen Thrombozyten wurden mit c7E3 vorinkubiert (Ausgangskonzentration 500 µg/ml, Endkonzentration 50 µg/ml). Die eingesetzte Menge betrug 10 µl c7E3 auf 90 µl Thrombozytensuspension (Verdünnung 1:10). Die Verwendung von EDTA diente der Spezifitätsbestimmung der Thrombozytenadhäsion und wurde bei jeder Testreihe in analoger Weise mitgeführt. Die so vorinkubierten Blutplättchen wurden auf die beschichteten 96-Napf-Mikrotiterplatten und als Vergleichswert auf eine unbeschichtete Plastikplatte pipettiert. Dabei verwendete man 100 µl vorinkubierte, gewaschene Thrombozyten pro Napf. Anschließend wurden die Mikrotiterplatten für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. In dieser Zeit konnte die Adhäsion der Thrombozyten an die beschichteten Nöpfchenwände stattfinden. Nach Ablauf der 2 Stunden wurde die Flüssigkeit vorsichtig abgesaugt und die Platten zweimal mit Tyrodes-Puffer gewaschen, um die nicht adhärenen Blutplättchen zu entfernen. Nach diesem Waschgang wurden 100 µl Lyse-Substrat-Puffer (3 mg/ml p-Nitrophenylphosphat; 50 mM Natriumazetat; 1% Triton-X; pH 5,0, Fa. Sigma, Deisenhofen, Deutschland) pro Napf zugefügt. Es folgte eine Inkubationszeit von 30 Minuten bei 37°C im Brutschrank, in der die Thrombozyten lysiert wurden und das p-Nitrophenylphosphat von thrombozytären, intrazellulär gelagerten Phosphatasen in ein gelb gefärbtes Reaktionsprodukt mit spezifischem Extinktionsmaximum bei 405 nm Wellenlänge umgewandelt wurde. Die Beendigung dieses Vorgangs erfolgte nach der Inkubationszeit durch Zugabe von 50 µl NaOH (1 M)

pro Napf. Anschließend wurde die Messung der Extinktionsintensität bei 405 nm in einem geeigneten Photometer (ELISA-Reader, Fa. Dynatech, Deutschland) durchgeführt. Der Referenzfilter betrug dabei 630 nm. Über die Intensitätsmessung der abgelaufenen Farbreaktion konnte somit eine quantitative Bestimmung der Thrombozytenadhäsion durchgeführt werden. Dieser Versuch wurde an 3 unterschiedlichen, gesunden Probanden durchgeführt. Dabei wurde für jeden Meßwert eine 4-fach Bestimmung vorgenommen. Somit erhielt man für jede Mikrotiterplatte 12 Meßwerte. Um zu bestimmen, welcher Anzahl adhärerter Thrombozyten eine bestimmte Farbintensität entspricht, wurde für jeden einzelnen Probanden eine Eichkurve gemessen, indem man in 5 verschiedene Nöpfchen bekannte Mengen an Thrombozyten pipettiert und anschließend die Farbreaktion nach der Lysierung bestimmte. In das erste Nöpfchen wurden 100 µl gewaschene Thrombozyten mit einer Konzentration von  $2 \times 10^5$  Thrombozyten pro µl gegeben, in das zweite gab man 50 µl Thrombozyten und 50 µl PBS. In den weiteren Nöpfchen wurde die Plättchenmenge weiter halbiert und auf ein Volumen von 100 µl mit PBS aufgefüllt. Danach erfolgte, wie vorher beschrieben die Zugabe von Lyse-Substrat-Puffers, Natronlauge und letztlich die Messung der Farbintensität. Zusätzlich wurde analog zu dieser Versuchsdurchführung die sekundäre Adhäsion nach Stimulierung der Thrombozyten mit TRAP getestet. Dabei wurden statt 100 µl vorinkubierter Thrombozyten, 90 µl verwendet und zusätzlich 10 µl TRAP 250 µM (Endkonzentration 25 µmol/L) in jedes Nöpfchen pipettiert. Ansonsten wurde wie oben beschrieben verfahren.

#### **Tabelle 12: Reagentien für die Thrombozyten-Adhäsion**

---

##### **Tyrodes 10x:**

80 g NaCl  
+ 10,15 g NaHCO<sub>3</sub>  
+ 1,95 g KCl  
+ 1000 ml Aqua dest.

---

##### **Tyrodes-Puffer 10x:**

0,2 g BSA  
+ 0,2 g Glucose

**Tabelle 12: Fortsetzung**

+ 20 ml Tyrodes 10x

+ 180 ml Aqua dest.

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

---

**Tyrodes-Puffer (pH 6,5):**

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

---

**Lyse-Substrat-Puffer:**

30 mg p-Nitrophenylphosphat

+ 25 mg Triton x –100

+ 2,5 ml Natriumacetat (200mM)

+ 7,5 ml Aqua dest.

---

### 3.3.4 Statistische Auswertung

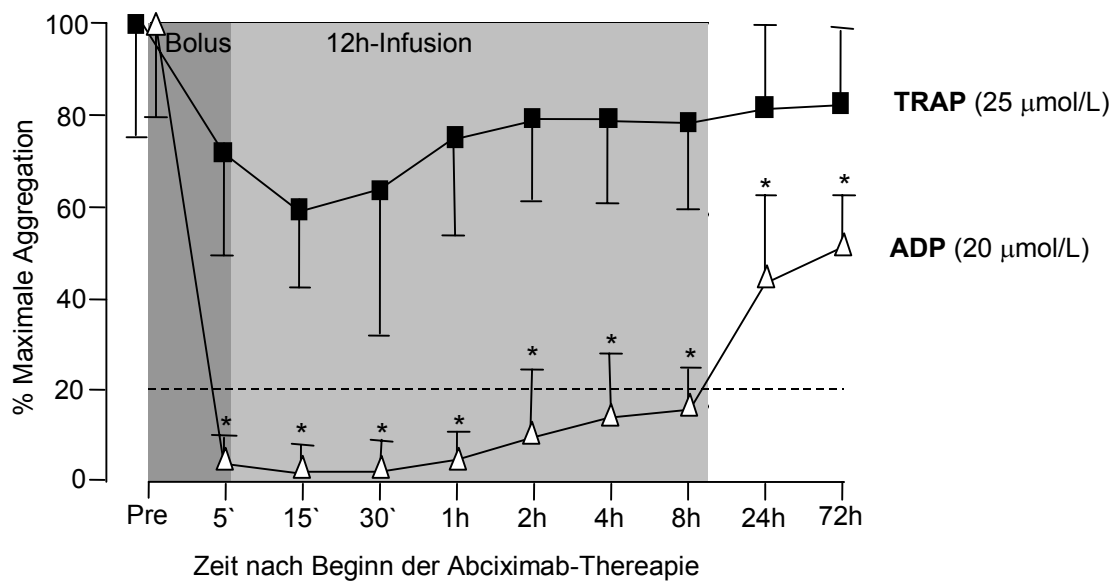
Anhand Datenanalyse durch den “Kolmogorov-Smirnov-Test“ konnte festgestellt werden, daß die Ergebnisse der Untersuchungen keiner Normalverteilung nach Gauß unterliegen. Daraufhin konnten die unter 3.1.8 aufgeführten Testverfahren angewandt werden.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Differentielle Effekte von Abciximab auf die Thrombozytenfunktion

#### 4.1.1 Einfluß auf die Aggregation

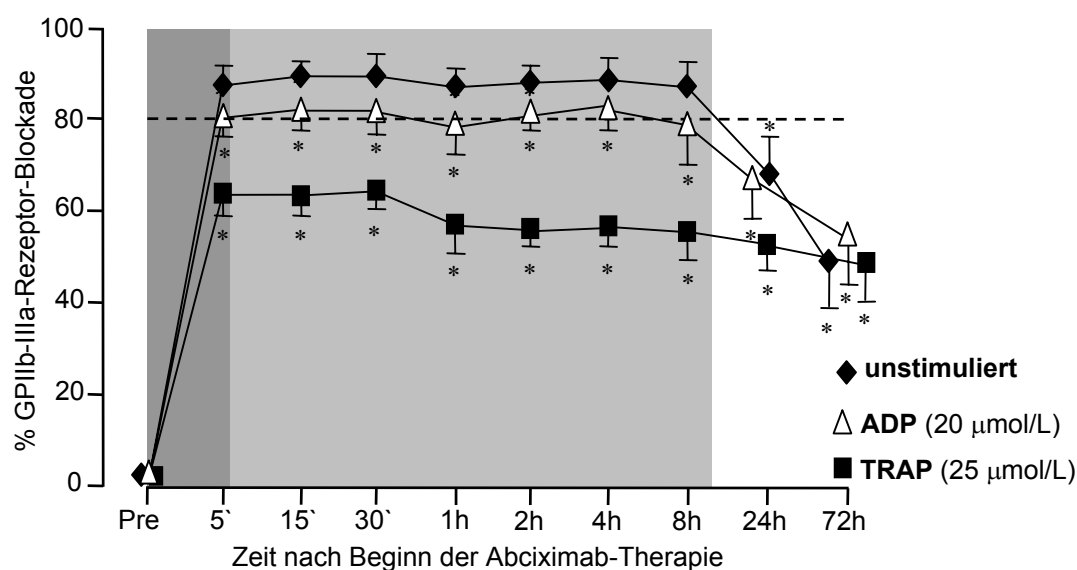
Bei den Patienten, die Abciximab als Bolus vor Intervention und als Dauerinfusion über 12 Stunden nach der Koronarintervention erhielten, zeigte sich bei Zunahme der Konzentration eine 100%ige Aggregationshemmung unter Stimulierung der Thrombozyten mit 20  $\mu\text{mol/L}$  ADP. Dagegen war es unter Stimulierung mit einem starken Agonisten, wie TRAP nicht möglich die Aggregation vollständig zu hemmen.



**Abbildung 17: Maximale Thrombozytenaggregation**

Die maximale Verringerung der ADP-induzierten Plättchenaggregation wurde 15 Minuten nach Bolusgabe beobachtet. Die mittlere Aggregation unter ADP-Stimulation lag hier bei 0,4% des Ausgangswertes. Während der gesamten Abciximab-Infusionsperiode stieg die maximale Aggregationsfähigkeit der Thrombozyten unter

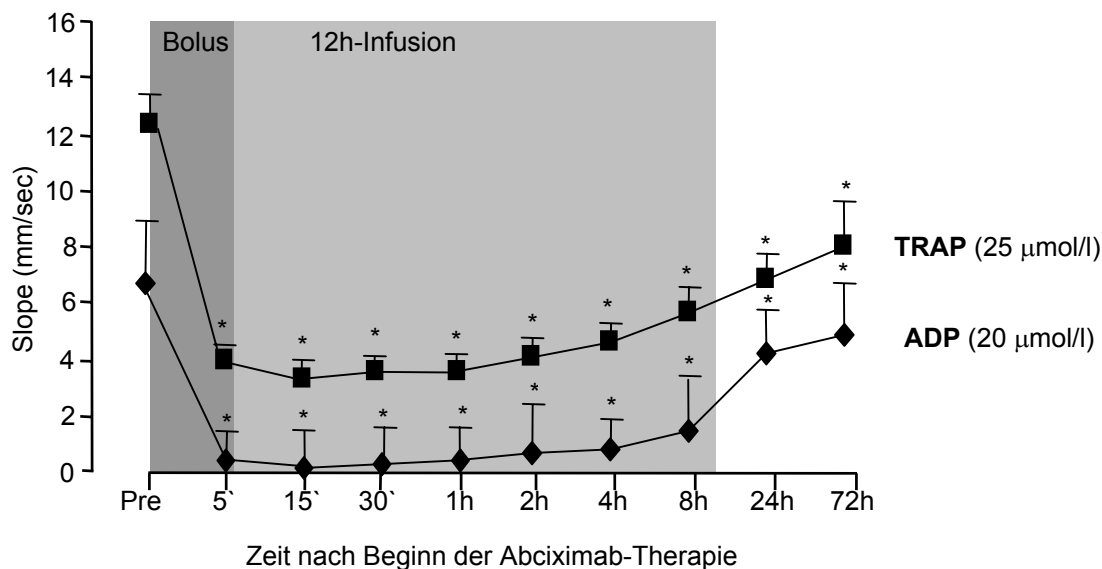
ADP-Aktivierung nicht über 20% des Ausgangswertes an, so erreichte sie nach 8 Stunden gerade 14,2% des vor Intervention gemessenen Wertes. Auch nach 24 Stunden (26,1%), sowie nach 72 Stunden (37,5%) lag die gemessene maximale Aggregation noch weit unter den Ausgangswerten vor dem Eingriff. Im Gegensatz dazu kam es bei der Stimulierung mit 25 µmol/L “Thrombin-Receptor Activating Peptide“ (TRAP) zu einer wesentlich geringeren Verminderung der Plättchenaggregation. Zum Zeitpunkt 15 Minuten nach Beginn der Studie betrug die maximale Aggregation der Thrombozyten immer noch 81,2% des Ausgangswertes. Mit \* markierte Werte sind signifikant mit  $p < 0,05$  gegenüber dem Ausgangswert. Die gemessenen Werte der TRAP-induzierten Aggregation bewegen sich unterhalb der Ausgangswerte, jedoch nicht signifikant, wie dies bei ADP-Stimulation der Fall ist. Den Verlauf der Glykoprotein IIb-IIIa-Rezeptorblockade, gemessen durch Inkubation mit einem FITC-markierten Antikörper gegen den GPIIb-IIIa-Rezeptor (anti-CD41), zeigt die nachstehende Abbildung, mit \* markierte Werte sind mit  $p < 0,05$  signifikant gegenüber dem Ausgangswert.



**Abbildung 18: GPIIb-IIIa Rezeptorblockade**

Die oben abgebildete Rezeptorblockade errechnet sich wie folgt: **% GPIIb-IIIa-Blockade = 100 – (mittlere CD41-Immunofluoreszenz in Abwesenheit von c7E3 x 100/ mittlere CD41-Immunofluoreszenz in Anwesenheit von c7E3)**

Bei unstimulierten oder mit 20  $\mu\text{mol/l}$  ADP stimulierte Plättchen wurde der GPIIb-IIIa-Rezeptor nach Bolusgabe zu mehr als 80% blockiert. Der Effekt hält während der Abciximab-Infusion über 12 Stunden an. Bei Aktivierung der Thrombozyten mit 25  $\mu\text{mol/l}$  TRAP liegt die maximale GPIIb-IIIa-Rezeptorblockade unter dem Niveau der mit einem schwächeren Stimulus aktivierten Plättchen und erreicht ein Maximum mit 63% zum Zeitpunkt 30 Minuten nach Beginn der Aufzeichnung. Bei der Untersuchung der Thrombozytenaggregation wurde neben der maximalen Aggregation auch die Steigung der aufgezeichneten Aggregationskurve bestimmt ("Slope"), als Maß für die Geschwindigkeit des Anstiegs der Plättchenaggregation. Abbildung 18 zeigt die Abnahme der Aggregationsgeschwindigkeit über den Zeitverlauf der Beobachtung. Mit \* markierte Werte gelten als signifikant mit  $p < 0,05$  gegenüber dem Ausgangswert.



**Abbildung 19: Anstiegsgeschwindigkeit der Aggregation ("Slope")**

Es kam direkt nach Beginn der Therapie mit Abciximab zu einer signifikanten Abnahme der Steigung der Aggregationskurve und somit zu einer Abnahme der Aggregabilität der Thrombozyten. Dabei liegt die Abnahme unter Stimulation mit dem Agonisten TRAP mit 25  $\mu\text{mol/l}$  deutlich unter der des schwächeren Agonisten ADP. Ebenso zeigte die Spontanaggregation der Thrombozyten eine Verminderung der Aggregation bei fehlender Zugabe eines Stimulus bis zum Ende der Aufzeichnungen.

Eine weitere Methode zur Bestimmung der Aggregation ist die Vollblutaggregometrie: Die Methode basiert auf der elektrischen Impedanzmessung. Im Gegensatz zum lichtaggregometrischen Verfahren erfolgt der Nachweis der Thrombozytenaggregation bei der Vollblutaggregometrie in einer weitgehendst physiologischen Umgebung der Blutplättchen im Vollblut. Die Ergebnisse entsprechen bei dieser Methode weitgehendst denen der Luminometrie. Es konnte auch hier eine deutliche Abnahme der Aggregation unter Stimulierung mit den Agonisten ADP und TRAP festgestellt werden. Ebenso wie oben beschrieben ist die Inhibition bei einem starken Agonisten wie dem "Thrombin Receptor Activating Peptide" (TRAP, 25  $\mu\text{mol/l}$ ) wesentlich geringer ausgeprägt, als unter Zugabe von ADP (20  $\mu\text{mol/l}$ ) als Stimulans zur Aggregationsauslösung.

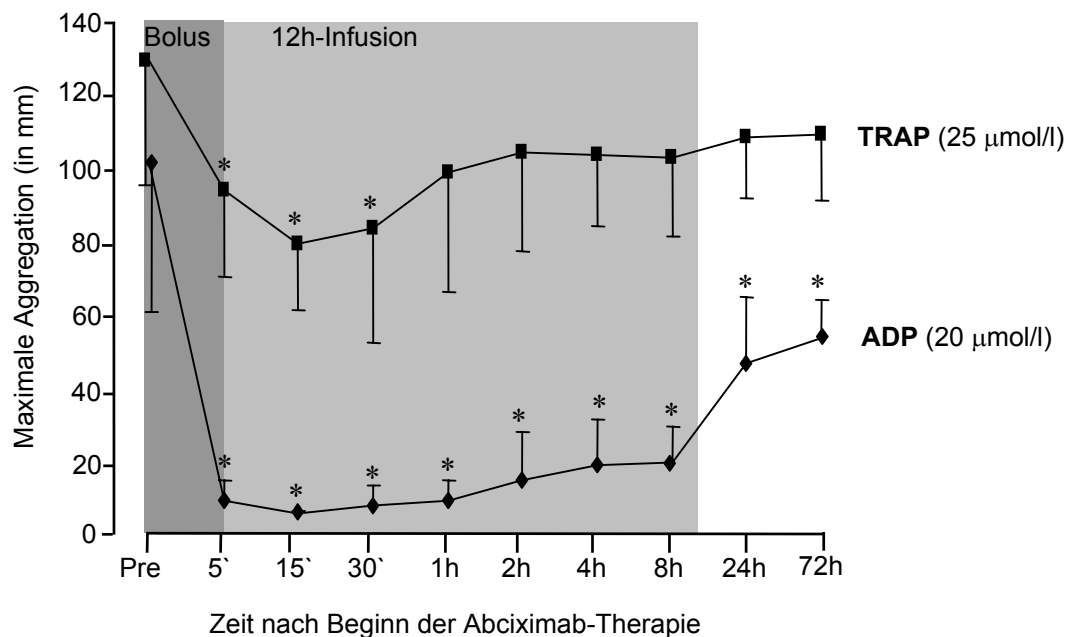


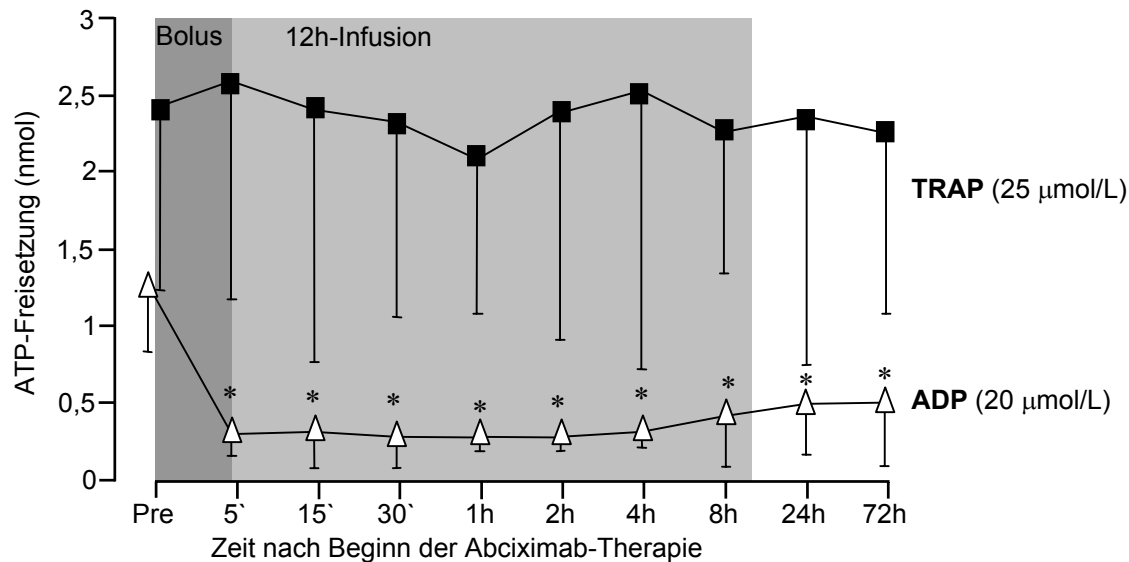
Abbildung 20: Maximale Aggregation bei Impedanzmessung

#### 4.1.2 Einfluß auf die Degranulation und P-Selektin-Expression

**Dichte Granula:** Als Beispiel für die Freisetzung von dichten Granula wählten wir als meßbaren Parameter ATP, welches wie unter 3.1.5 beschrieben im Zusammenhang mit der Aggregation gemessen werden konnte.



Die Degranulation von ATP aus den dichten Granula erreicht zum Zeitpunkt 15 Minuten nach Beginn der Messung unter ADP-Aktivierung ein Minimum von 27,3% des Ausgangswertes.



**Abbildung 21: Degranulation von dichten Granula; ATP-Freisetzung**

Während der gesamten Infusionsperiode von 12 Stunden kommt es zu einer signifikanten Verminderung der ATP-Freisetzung. Bis zum Ende der Registrierung nach 72 Stunden zeigt sich ein nur langsamer Anstieg der Degranulation auf 34% des Ausgangswertes. Die ATP-Freisetzung unter TRAP-Aktivierung hingegen zeigt sich von der c7E3-Infusion weitgehend unbeeinflusst. Die Werte unter ADP-Aktivierung sind signifikant mit  $p < 0,05$  gegenüber dem Ausgangswert.

**Alpha-Granula:** Bei ADP- und TRAP-Stimulierung zeigt sich *ex vivo* bei der durchflußzytometrischen Analyse eine Abnahme der P-Selectin Expression als Zeichen der verminderten Sekretion von  $\alpha$ -Granula unter dem Einfluß einer Abciximab-Therapie. Die Abnahme erreicht 5 Minuten nach Therapiebeginn ein Maximum und steigt im gesamten Beobachtungszeitraum bis 72 Stunden nach Koronarintervention nicht wieder auf den Ausgangswert an. Bei unstimulierten Thrombozyten ist die Abnahme der CD62P –Immunofluoreszenz geringer und im Gegensatz zur ADP-

induzierten  $\alpha$ -Degranulation nicht signifikant. Die mit \* markierten Werte in Abbildung 22 sind signifikant mit  $p < 0,05$  gegenüber dem Ausgangswert.

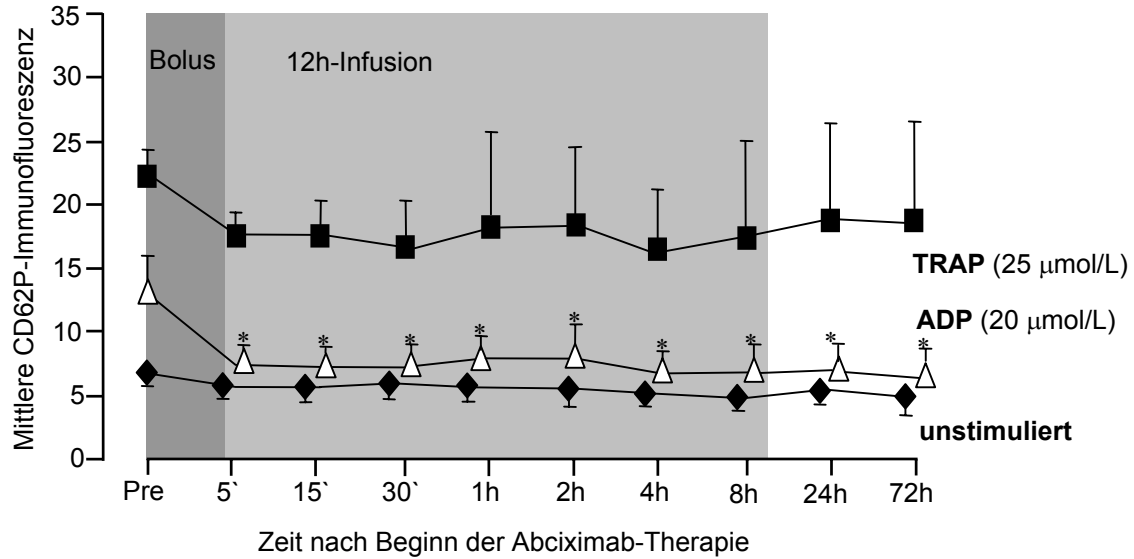
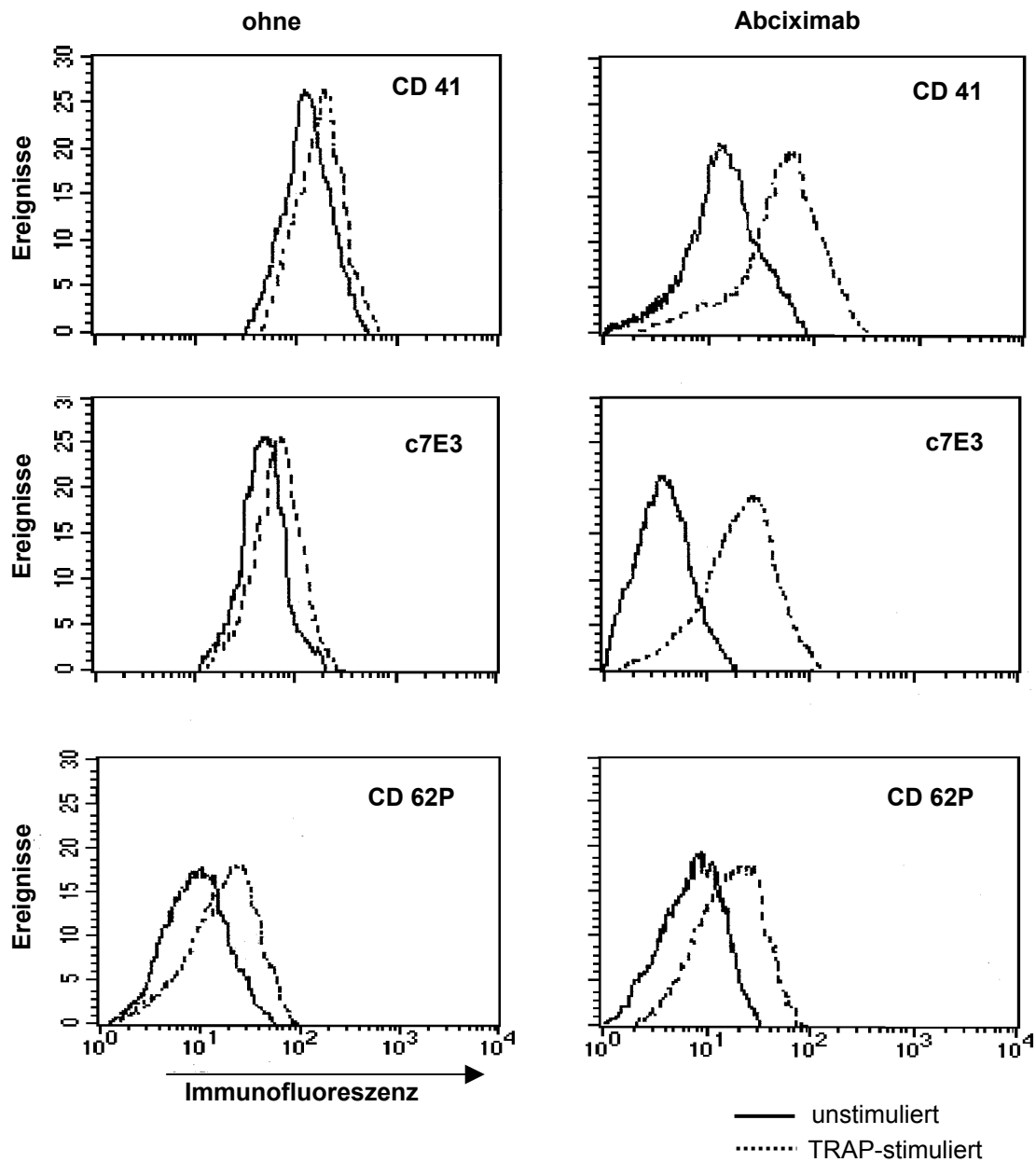


Abbildung 22: P-Selektin Degranulierung



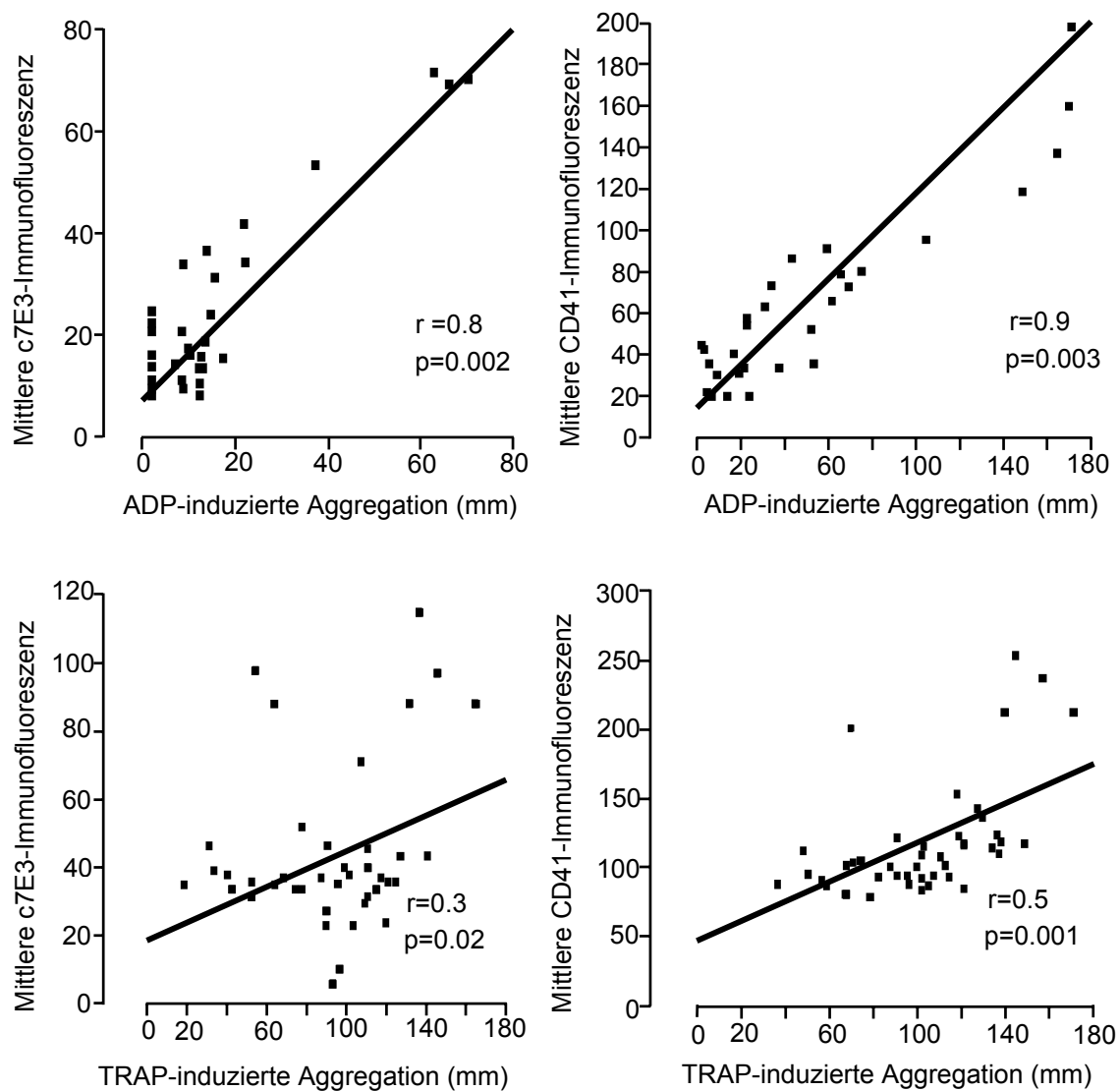
**Abbildung 23: Darstellung der Veränderungen im Durchflußzytometer**

*Die Kurven zeigen bei Aktivierung mit dem Agonisten TRAP eine deutliche Verschiebung der Kurven in Richtung geringerer Fluoreszenzintensitätswerte.*

Die Abbildung 23 zeigt die Veränderungen während der durchfluß-zytometrischen Registrierung der Thrombozyten. Dargestellt ist die durchflußzytometrische Analyse mit dem jeweiligen Fluoreszenzkurven bei FITC-Markierten Antikörpern vom Typ anti-

CD41, anti-c7E3 und anti-CD62P. Alle Kurven zeigen bei Aktivierung mit dem Agonisten TRAP durch Vorinkubation über 10 min. eine deutliche Verschiebung der Kurven in Richtung geringerer Fluoreszenzintensitätswerte.

### 4.1.3 Korrelation zwischen Aggregation und Fluoreszenz



**Abbildung 24: Korrelationen von c7E3-Immunofluoreszenz gegen CD41-Fluoreszenz**

Zur Untersuchung eines Zusammenhanges zwischen der c7E3- Immunofluoreszenz und der CD41-Immunofluoreszenz, bzw. der Externalisierung von GPIIb-IIIa-Rezeptoren an der Thrombozytenoberfläche wurden die Korrelationen gegeneinander bestimmt. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des Programms "SPSS for Windows". Abbildung 24 zeigt den signifikanten Zusammenhang zwischen der Fluoreszenz von FITC-markiertem c7E3 und der Expression von CD41 an der Thrombozytenoberfläche durch FITC-markiertes CD41. Dieser Zusammenhang besteht unabhängig von der Art der Aktivierung der Blutplättchen.

## 4.2 Einfluß auf die Thrombozytenfunktion *in vitro*

### 4.2.1 Einfluß von verschiedenen c7E3 Konzentrationen *in vitro*

Zur Messung der Effekte *in vitro* wurden die Thrombozyten mit steigenden Konzentrationen von Abciximab (1 bis 100  $\mu\text{g/ml}$ ) inkubiert und die ADP- (20  $\mu\text{mol/l}$ ), bzw. TRAP (25  $\mu\text{mol/l}$ ) -induzierte Aggregation aufgezeichnet.

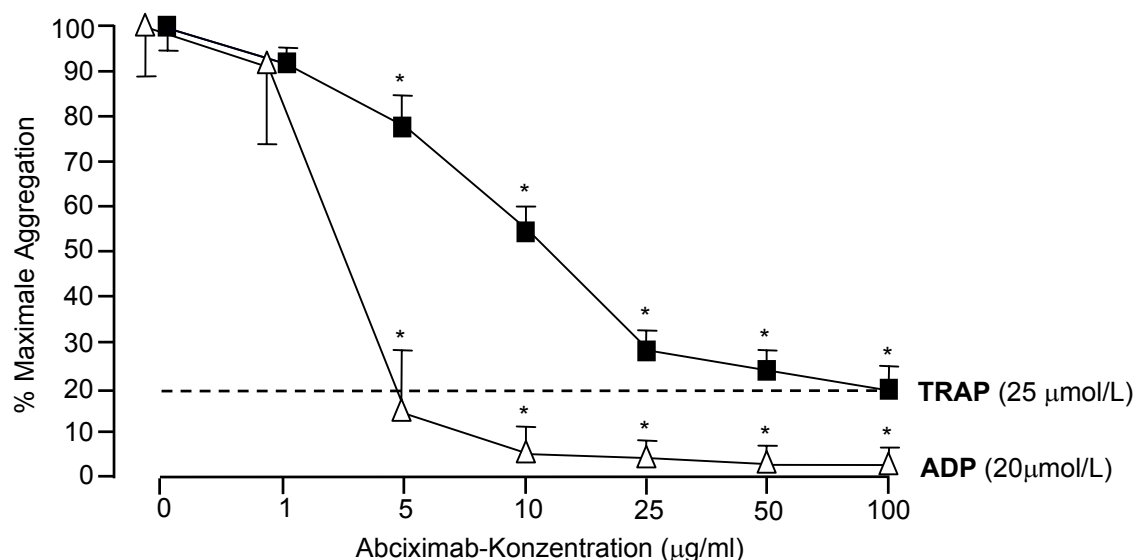
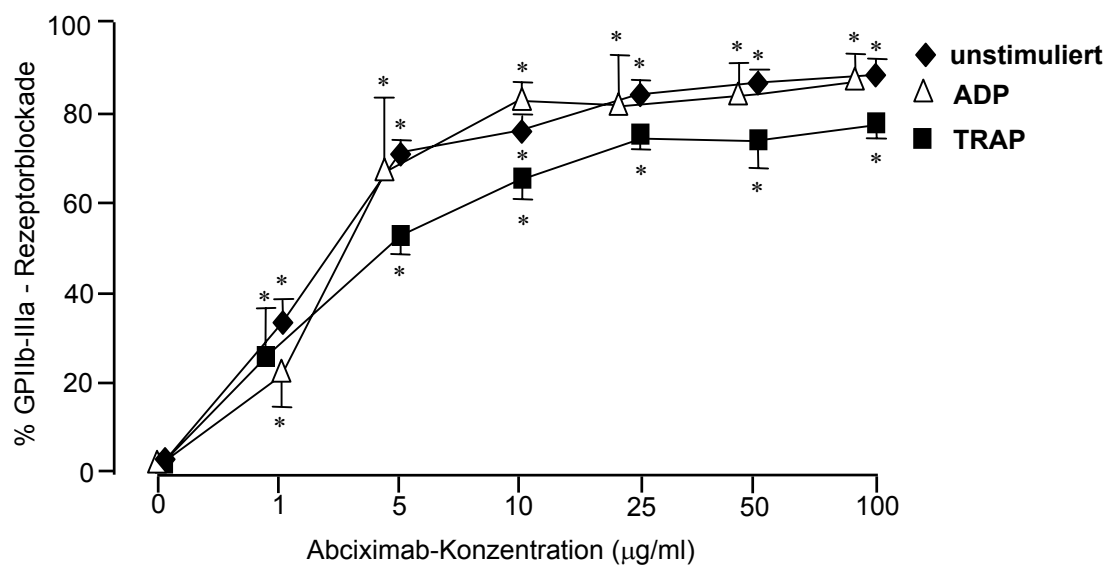


Abbildung 25: konzentrationsabhängige Verringerung der Aggregation

Abbildung 25 zeigt die Konzentrationsabhängigkeit der ADP, bzw. TRAP-induzierten Aggregation. Mit \* markierte Werte gelten mit  $p < 0,05$  als signifikant gegenüber dem Ausgangswert. Das signifikante Maximum der Aggregationshemmung unter ADP-Induktion tritt bereits bei Abciximab-Konzentrationen von 10  $\mu\text{g/ml}$  ein. Durch eine weitere Erhöhung der Abciximab-Konzentrationen ist bei ADP-Aktivierung der Plättchen keine wesentliche weitere Zunahme der Aggregationshemmung zu erreichen. Die TRAP-induzierte Plättchenaggregation ist ebenfalls in Abhängigkeit von der Abciximab-Konzentration verringert. Hier findet sich die halbmaximale Inhibition bei 10  $\mu\text{g/ml}$ . Durch eine Erhöhung der Abciximab-Konzentrationen läßt sich unter TRAP-Stimulation jedoch die Aggregation weiter verringern und erreicht ein Maximum von 20% der maximalen Aggregation bei einer Konzentration von 100  $\mu\text{g/ml}$ . Die Konzentrationsabhängigkeit zeigt sich auch in der GPIIb-IIIa Rezeptorblockade. Bei unstimulierten oder mit ADP (20  $\mu\text{mol/L}$ ) stimulierte Plättchen werden die GPIIb-IIIa Rezeptoren zu mehr als 80% bei einer c7E3-Konzentration von 25  $\mu\text{g/ml}$  blockiert. Eine weitere Konzentrationserhöhung bewirkt keine wesentliche Zunahme der Rezeptorblockade. Bei Aktivierung der Thrombozyten mit TRAP (25  $\mu\text{mol/l}$ ) erreicht die maximale GPIIb-IIIa Rezeptorblockade nicht das 80%-Niveau. Auch bei Konzentrationen  $> 100$   $\mu\text{g/ml}$  ließ sich keine wesentliche Steigerung erzielen.



**Abbildung 26: GPIIb-IIIa Rezeptorblockade in Abhängigkeit von steigenden Abciximab-Konzentrationen**

Alle mit \* markierten Werte sind mit  $p < 0,05$  signifikant gegenüber dem Ausgangswert. Die prozentuale Rezeptorblockade wurde analog zu in 4.1.1 beschrieben errechnet.

#### 4.2.2 Einfluß verschiedener Inkubationszeiten *in vitro*

Die Experimente zum Zeitverlauf wurden in Anwesenheit einer Abciximab-Konzentration von  $50 \mu\text{g/ml}$  durchgeführt. Die Inkubationszeiten betragen dabei 15 Min., 30 Min., 1 Stunde und 2 Stunden. Abbildung 27 zeigt den Verlauf der Aggregation mit verschiedenen Inkubationszeiten von c7E3 ( $50 \mu\text{g/ml}$ ).

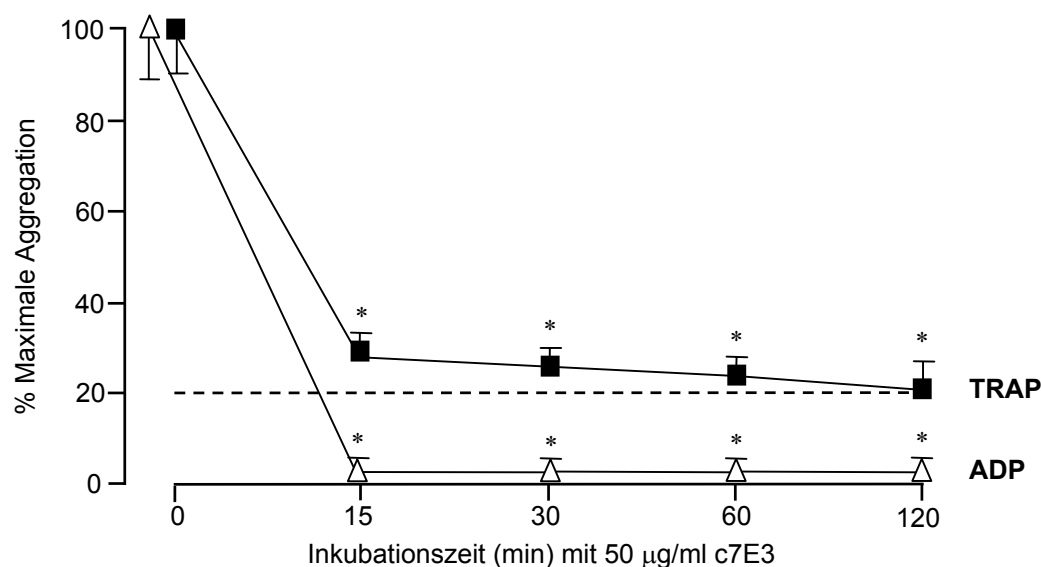
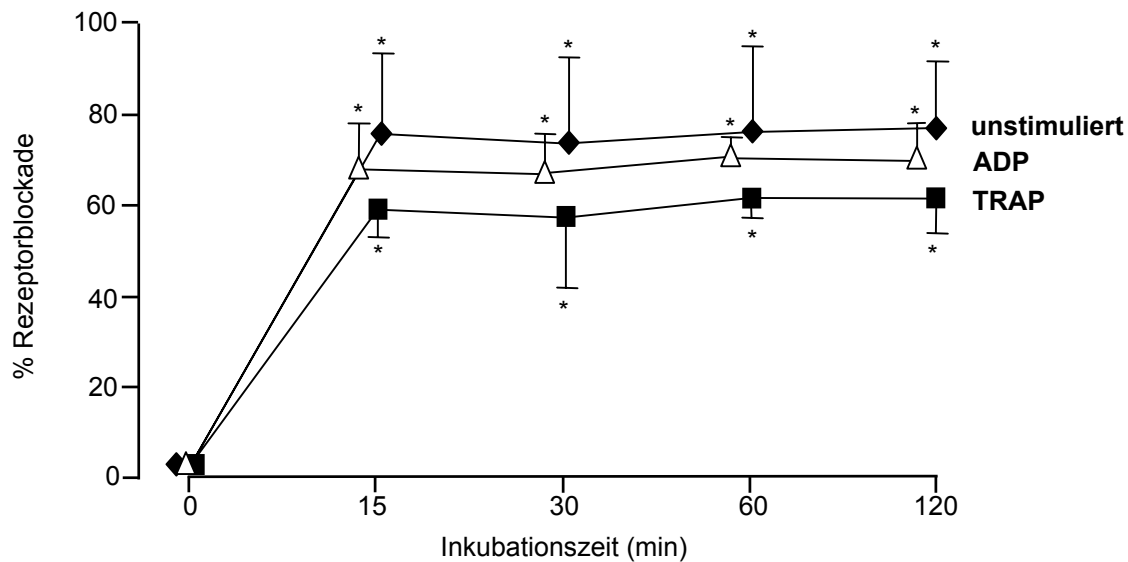


Abbildung 27: Zeitverlauf der Abciximab-Inkubation

Mit \* markierte Werte sind signifikant mit  $p < 0,05$  gegenüber dem Ausgangswert. Nach 15 Minuten Inkubationszeit mit einer Abciximab-Konzentration von  $50 \mu\text{g/ml}$  stellt sich eine beinahe vollständige Inhibition der ADP-induzierten Aggregation ein. Auch durch eine Verlängerung der Inkubationszeit ist dieser Effekt nicht zu verstärken. Im Gegensatz dazu erreicht die TRAP-induzierte Aggregation kein konstantes Plateau, sondern nimmt bis zum Ende der Aufzeichnung weiter ab und erreicht nach 120 Minuten 20% des Ausgangswertes.

Die Analyse der Glykoprotein IIb-IIIa Rezeptorblockade zeigt bei zunehmender Inkubationsdauer eine Zunahme der Rezeptorblockade, die sowohl unstimuliert, als auch bei ADP- oder TRAP-Aktivierung der Plättchen nach 15 Minuten ein Maximum erreicht. Unstimulierte oder ADP-stimulierte Thrombozyten erreichen beinahe das Niveau einer 80%igen Rezeptorblockade, während bei Aktivierung mit TRAP nach 15 Minuten 60% der GPIIb-IIIa –Rezeptoren blockiert sind. Eine Verlängerung der Inkubationszeit auf bis zu 120 Minuten hat keine wesentlichen Einflüsse auf die Rezeptoren.



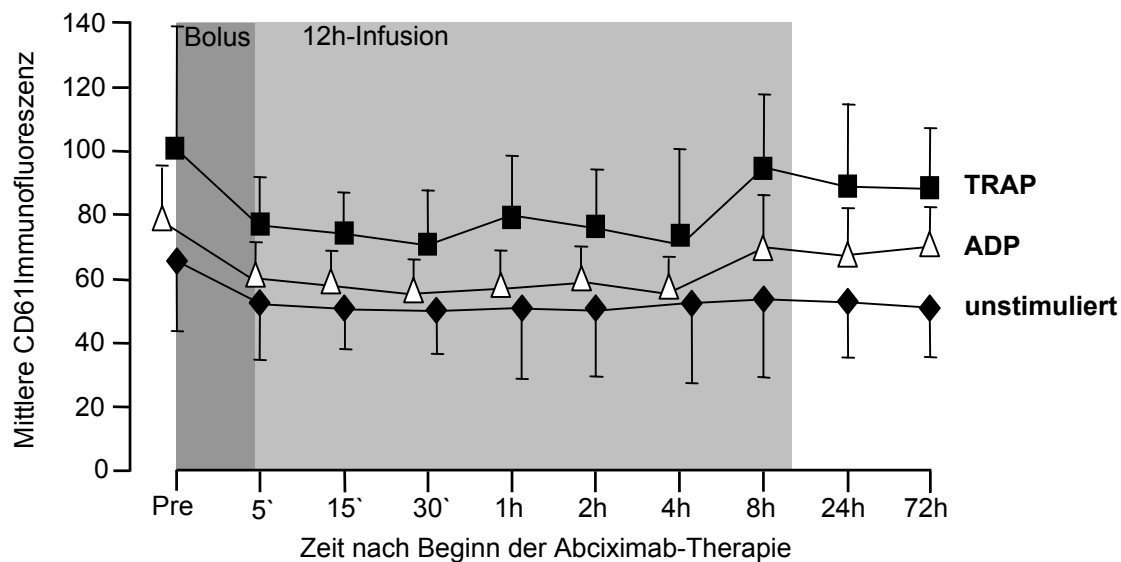
**Abbildung 28: GPIIb-IIIa Rezeptorblockade bei verschiedenen Inkubationszeiten mit 50 µg/ml Abciximab**

Mit \* markierte Werte sind signifikant mit  $p < 0,05$  gegenüber dem Ausgangswert. Die prozentuale Rezeptorblockade wurde analog zur Beschreibung in 4.1.1 errechnet.



### 4.2.3 Oberflächendichte von GPIIb-IIIa-Rezeptoren

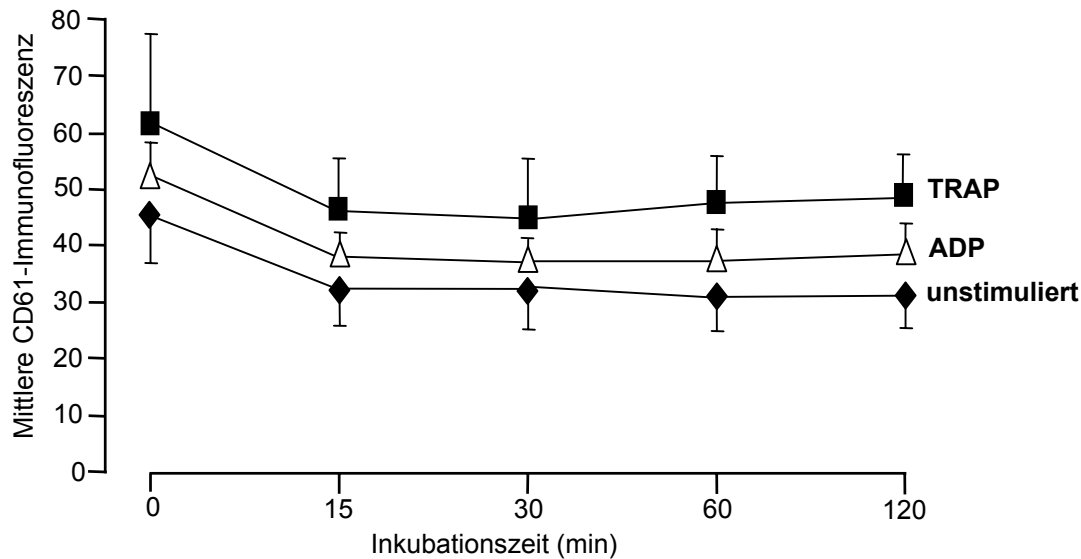
Die Expression von GPIIb-IIIa Rezeptoren an der Oberfläche von Thrombozyten wurde durch die Verwendung von anti-CD61, eines monoklonalen Antikörpers vom Typ anti GP IIIa untersucht. CD61 erlaubt eine Aussage über die Oberflächendichte der  $\beta_3$ -Kette des GPIIb-IIIa-Rezeptors. Eine weitere Aussage über die Oberflächendichte ermöglicht die Analyse von CD41, welches gegen die  $\alpha_{IIb}$ -Kette gerichtet ist. Unstimulierte- und ADP-stimulierte Werte sind signifikant mit  $p < 0,05$  gegenüber dem Ausgangswert. Während der Messung kommt es zu einem signifikanten Abfall der Bindung anti-CD61 an die unstimulierten Blutplättchen der Patienten. Die Abnahme der anti-CD61 Bindung an die Thrombozytenoberfläche verläuft parallel zur Abnahme der GPIIb-IIIa Oberflächenexpression. Unter ADP- oder TRAP-Stimulation war die anti-CD61 -Bindung ebenfalls vermindert. Die Werte nähern sich mit Ausnahme der unstimulierten Plättchen zum Ende der Aufzeichnung nach 72 Stunden den Ausgangswerten wieder an.



**Abbildung 29: Expression von GPIIb-IIIa an der Thrombozytenoberfläche**

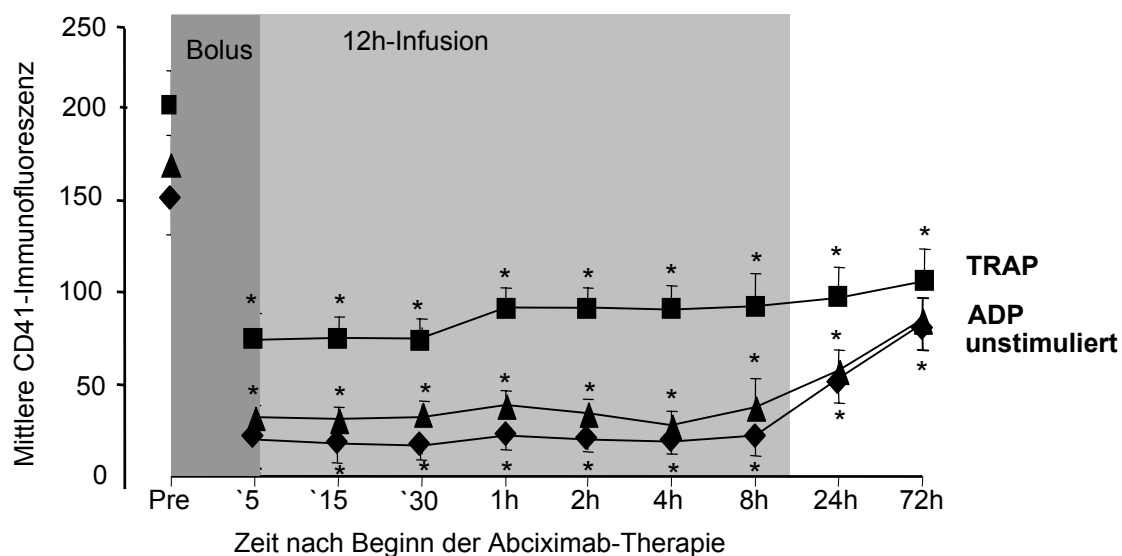
Die *in vitro*-Bindung von anti-CD61 wurde in Anwesenheit einer Abciximab-Konzentration von 50  $\mu\text{g/ml}$  durchgeführt. Die anti-CD61-Bindung ist zeitabhängig

reduziert, sowohl bei unstimulierten, als auch bei ADP- und TRAP-aktivierten Blutproben.



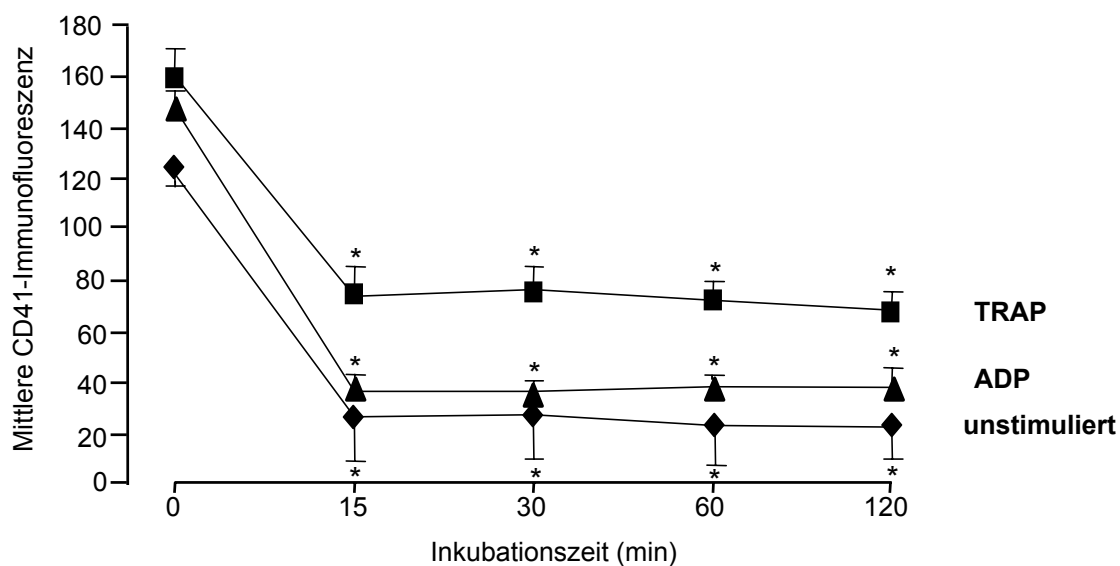
**Abbildung 30: Zeitabhängigkeit der anti-CD61 Bindung an die Thrombozytenoberfläche**

Abbildung 30 zeigt die Abhängigkeit der anti-CD61 Bindung von der Inkubationszeit mit c7E3. Nach einer Inkubationszeit von 15-30 Minuten ist das Minimum der CD61-Bindung an die Thrombozytenoberfläche erreicht. Eine Verlängerung der Inkubationszeit mit 50 µg/ml Abciximab bewirkt keine wesentliche Veränderung der Oberflächenexpression von GPIIIa. Aus Abbildung 31 wird ersichtlich, daß es während der Messung zu einem signifikanten Abfall der Bindung des monoklonalen Antikörpers anti-CD41 an die unstimulierten Blutplättchen der Patienten kommt. Die Abnahme der anti-CD41 Bindung an die Thrombozytenoberfläche verläuft parallel zur Abnahme der oben gezeigten CD61-Expression. Unter ADP- oder TRAP-Stimulation war die CD41 Bindung ebenfalls vermindert. Die Werte nähern sich im Gegensatz zur CD61-Oberflächenexpression zum Ende der Aufzeichnung nach 72 Stunden auch bei TRAP- und ADP-Stimulatin den Ausgangswerten wieder an. Mit \* markierte Werte sind dabei signifikant mit  $p < 0,05$  gegenüber dem Ausgangswert.



**Abbildung 31: Expression der  $\alpha_{IIb}$ -Kette an der Thrombozytenoberfläche**

Abbildung 32 zeigt die CD41-Immunofluoreszenz bei steigenden Inkubationszeiten mit 50  $\mu\text{g/ml}$  c7E3. Dabei sind mit \* markierte Werte sind signifikant mit  $p < 0,05$  gegenüber dem Ausgangswert.

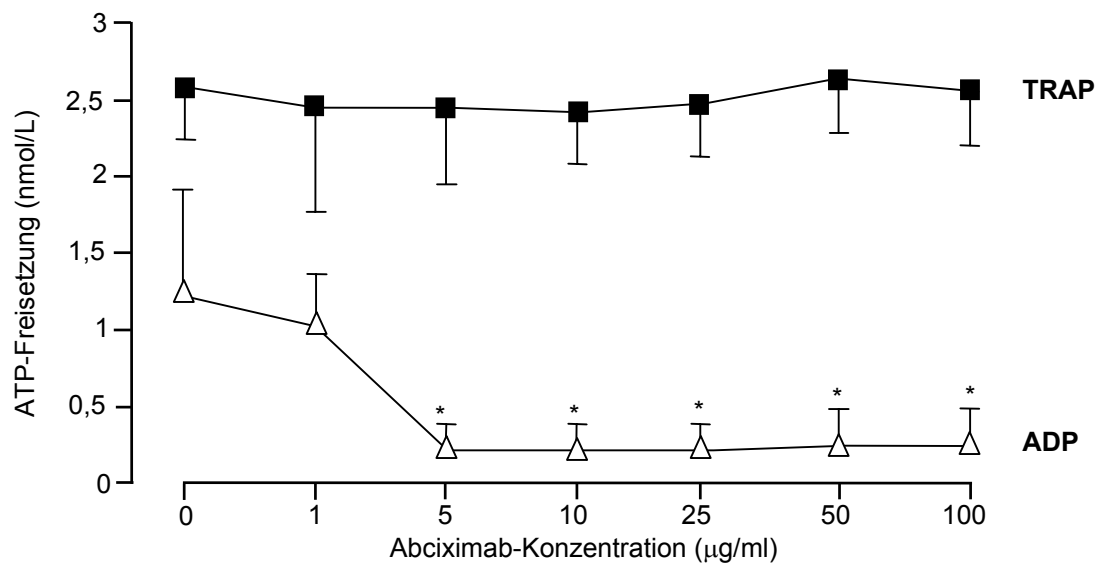


**Abbildung 32: CD41-Immunofluoreszenz bei steigenden Inkubationszeiten**

Nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten ist das Minimum der CD41-Bindung an die Thrombozytenoberfläche erreicht. Eine Verlängerung der Inkubationszeit mit 50 µg/ml Abciximab bewirkt keine wesentliche Veränderung der Oberflächenexpression der  $\alpha_{IIb}$ -Kette von GPIIIa.

#### 4.2.4 Degranulation und P-Selektin-Expression *in vitro*

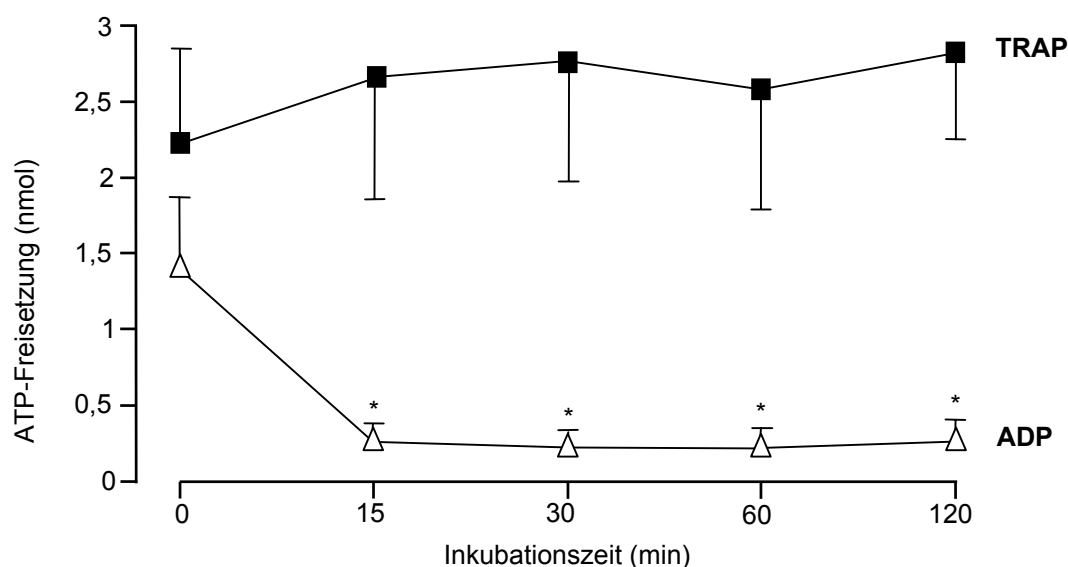
**Dichte Granula:** Die *in vitro*-Experimente zeigen, daß es bei ADP-induzierter Freisetzung von ATP aus den Thrombozyten zu einem signifikanten Absinken der ATP-Freisetzung aus den Blutpättchen kommt.



**Abbildung 33: ATP-Freisetzung *in vitro* bei verschiedenen Abciximab-Konzentrationen**

Dieser Effekt erreicht bereits bei einer Abciximab-Konzentration von 5 µg/ml unter ADP-Aktivierung ein Maximum und läßt sich auch durch eine Konzentrationserhöhung nicht weiter verringern. Dagegen bleibt die Freisetzung von Dichte Granula bei TRAP-stimulierten Thrombozyten weitgehend unbeeinflußt. Hier kommt es nur initial zu einer

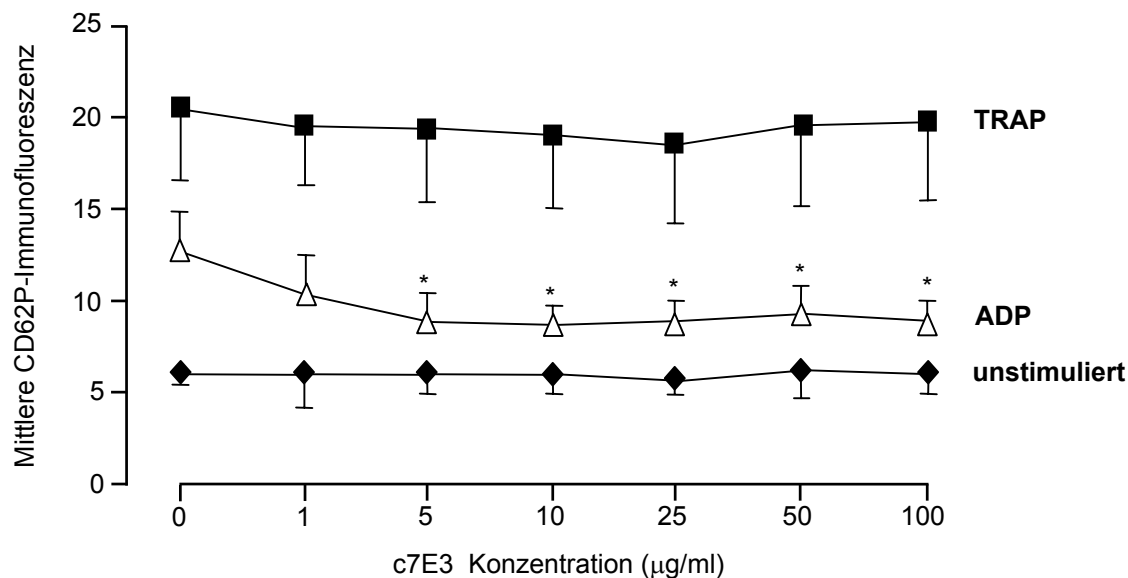
sehr geringen und nicht signifikanten Abnahme der ATP-Freisetzung. Mit \* markierte Werte sind signifikant mit  $p < 0,05$  gegenüber dem Ausgangswert. Der Zeitverlauf der ADP-induzierten Plättchenaggregation nach Vorinkubation mit einer Abciximab-Konzentration von  $50 \mu\text{g/ml}$  zeigt eine Abnahme der ATP-Freisetzung 15 Minuten nach Beginn der Messung. Auch durch eine Verlängerung der Inkubationsdauer mit c7E3 läßt sich die Freisetzung von dichten Granula nicht verringern. Bei TRAP-aktivierten Thrombozyten dagegen kommt es nach 15 Minuten zu einem geringen, jedoch nicht signifikanten Anstieg der Freisetzung von ATP aus dichten Granula. Bis zu Ende des Beobachtungszeitraums nach 2 Stunden kam es nicht zu einem Rückgang auf den Ausgangswert. Die mit \* markierte Werte in der folgenden Abbildung sind signifikant mit  $p < 0,05$  gegenüber dem Ausgangswert.



**Abbildung 34: ATP-Freisetzung bei ansteigender Inkubationsdauer mit Abciximab**

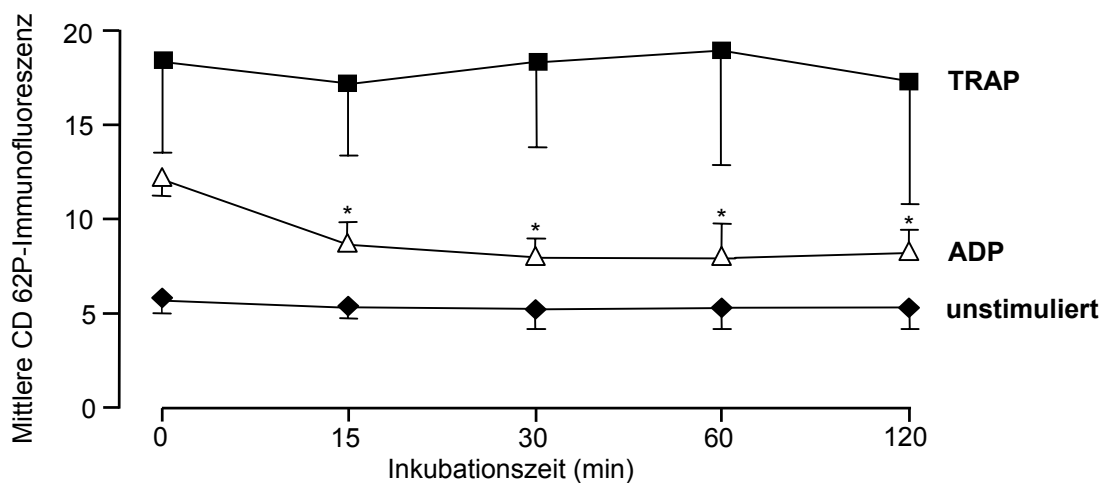
Alpha-Granula: Im Konzentrationsverlauf zeigt der Marker für die  $\alpha$ -Degranulation, CD62P, bei ADP-Aktivierung einen signifikanten Abfall ab einer c7E3-Konzentration von  $5 \mu\text{g/ml}$ . Unstimulierte, bzw. TRAP-stimulierte Thrombozyten zeigen im Konzentrationsverlauf auch bei hohen Abciximab-Konzentrationen bis  $100 \mu\text{g/ml}$  keine

signifikanten Veränderungen in der CD62P-Immunfluoreszenz. Mit \* markierte Werte sind signifikant mit  $p < 0,05$  gegenüber dem Ausgangswert.



**Abbildung 35: Alpha-Degranulation bei steigenden Konzentrationen von c7E3**

Betrachtet man Thrombozyten, die über unterschiedlich lange Zeiträume mit c7E3 inkubiert wurden, so findet man bei ADP-Aktivierung eine Abnahme der CD62P-Immunfluoreszenz und somit der Freisetzung von  $\alpha$ -Granula.

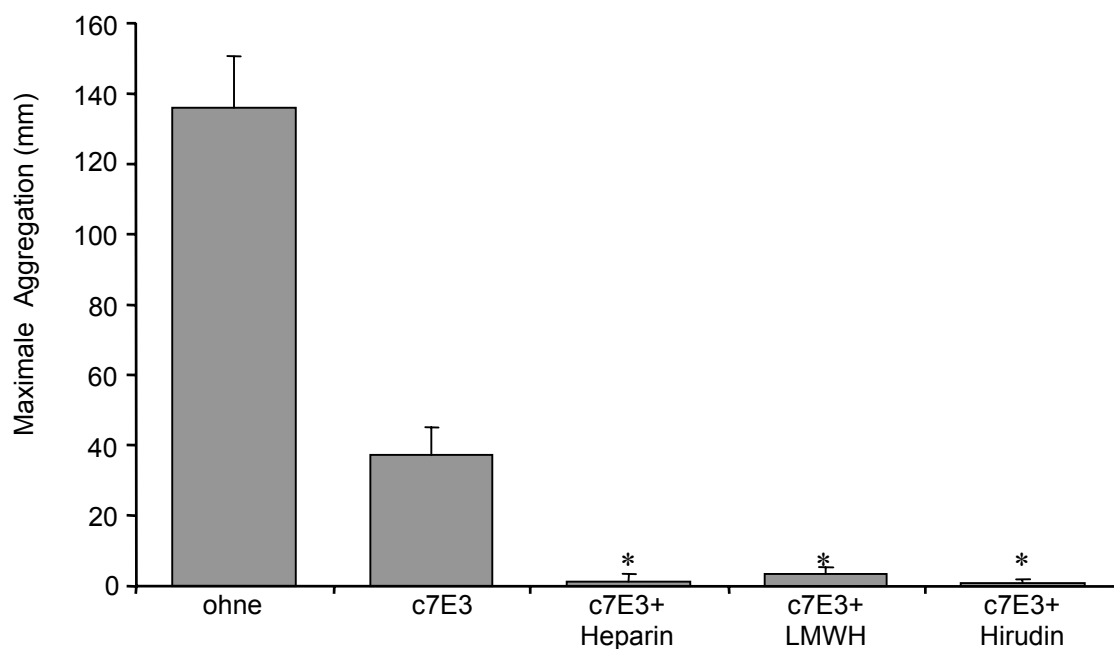


**Abbildung 36: CD62P-Immunfluoreszenz bei steigender Inkubationsdauer mit c7E3**

Das Minimum der ADP-induzierten  $\alpha$ -Degranulation ist nach 30 Minuten erreicht, eine Verlängerung der Inkubationsdauer bewirkt keinen wesentlichen Effekt auf die Freisetzung von  $\alpha$ -Granula. Die Unstimulierten oder TRAP-stimulierten Blutplättchen zeigen mit zunehmender Inkubationsdauer keine wesentlichen Veränderungen der CD62P-Immunofluoreszenz.

#### 4.2.5 Heparin und Hirudin als Zusatztherapie *in vitro*

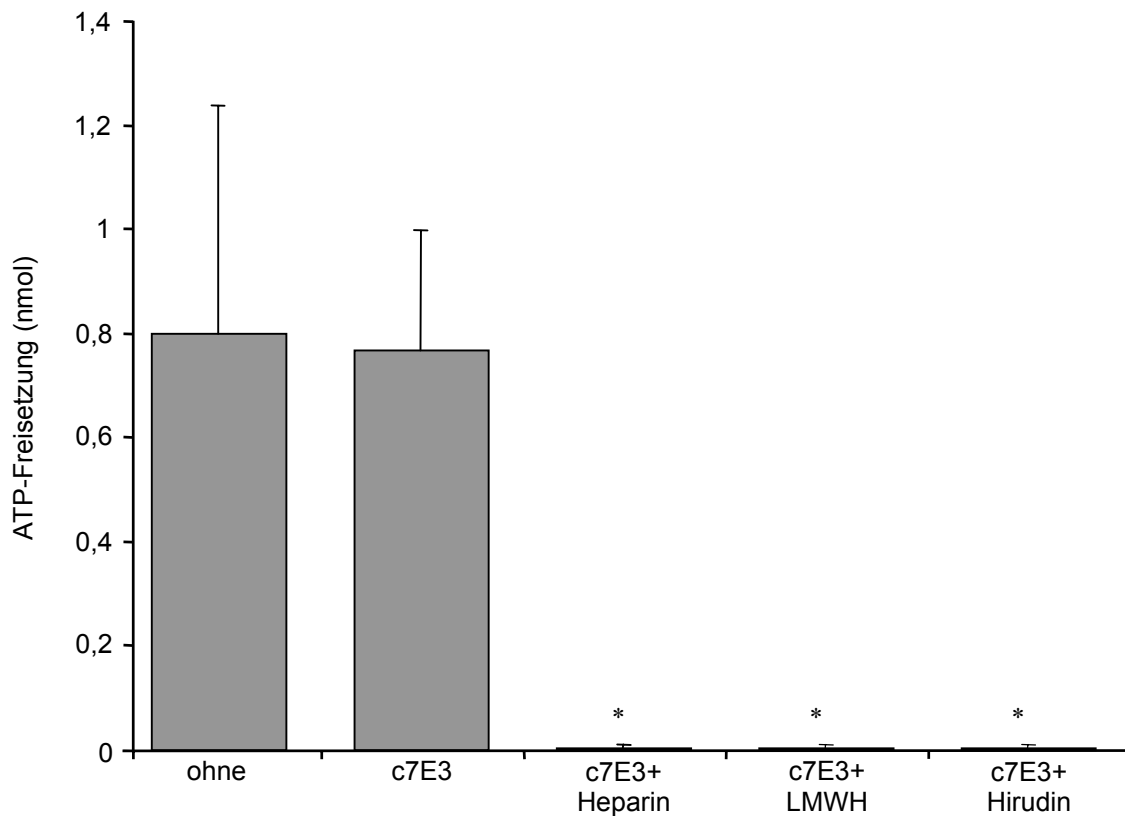
PRP wurde mit c7E3 (50  $\mu$ g/ml) und Heparin (2 U/ml), "Low Molecular Weight Heparin" (2 U/ml) bzw. Hirudin (2 U/ml) inkubiert. Als Referenzwert diente hierbei PRP, das nur alleine mit c7E3 (50  $\mu$ g/ml) inkubiert wurde. Die Inkubationszeit betrug hierbei konstant 15 Minuten.



**Abbildung 37: Aggregation bei Zugabe von Heparin, Hirudin und "Low Molecular Weight Heparin";**

*LMWH = "Low Molekular Weight Heparin"*

Abbildung 36 zeigt die Hemmung der Aggregation unter Zusatz der oben genannten Hemmstoffe. Mit \* markierte Werte sind signifikant mit  $p < 0,05$  gegenüber dem alleinigen Einsatz von c7E3. Die Kombination von c7E3 mit Heparin, niedermolekularem Heparin und mit Hirudin führt zu einer signifikanten Abnahme der Plättchenaggregation. Dabei ist die Kombinationstherapie dem alleinigen Einsatz von c7E3 signifikant überlegen.



**Abbildung 38: ATP-Freisetzung unter Kombinationstherapie**

Im Gegensatz zur Aggregation kommt es bei der Freisetzung von ATP aus dichten Granula beim alleinigen Einsatz von c7E3 zu keiner signifikanten Verringerung. Durch die Kombination mit Heparin, Hirudin und niedermolekularem Heparin (LMWH) kommt es jedoch zu einer signifikanten Abnahme der Freisetzungreaktion, wobei zwischen den einzelnen Substanzen nur geringe Unterschiede bestehen.

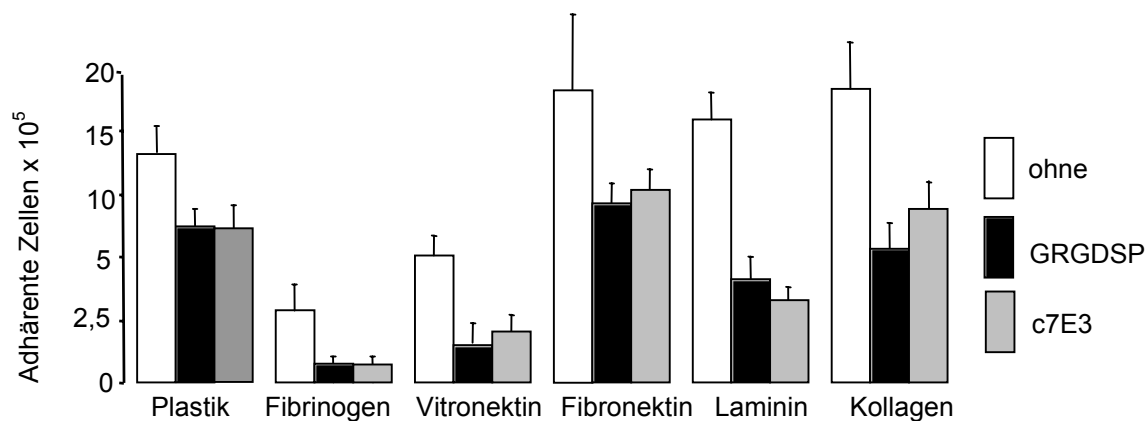


### 4.3 Einfluß von c7E3 auf die Adhäsion von Thrombozyten

Zur Untersuchung der Auswirkungen von Abciximab auf die Adhäsion nativer Thrombozyten wurden zur Messung der primären Adhäsion unstimulierte Thrombozyten und zur Beurteilung der sekundären Adhäsion TRAP-stimulierte Thrombozyten mit c7E3 vorinkubiert. Im Anschluß folgte die Messung der Adhäsion an verschiedene Oberflächenmoleküle der Mikrotiterplatten.

#### 4.3.1 Primäre Adhäsion

Abbildung 38 zeigt die Adhäsionshemmung von Thrombozyten gesunder Probanden durch Inkubation mit c7E3. Als Vergleichswert dient dabei das Peptid GRGDSP.

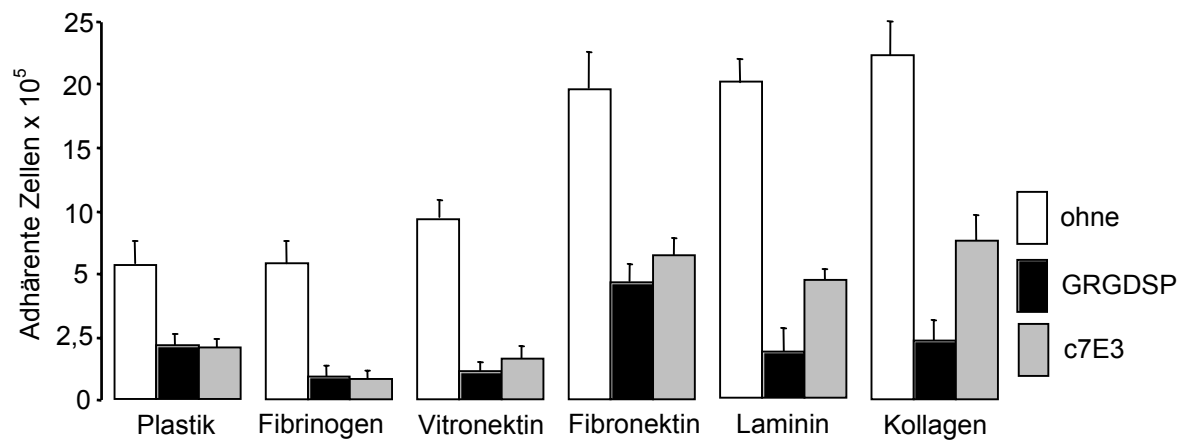


**Abbildung 39: Hemmung der primären Adhäsion von Thrombozyten**

Auf keiner der Oberflächen zeigt c7E3 eine deutlich stärkere Adhäsionshemmung gegenüber GRGDSP.

### 4.3.2 Sekundäre Adhäsion

Zur Untersuchung der sekundären Adhäsion wurden die vorinkubierten, bzw. unbehandelten Thrombozyten mit dem Aktivator TRAP (Endkonzentration 25 µg/ml) stimuliert:



**Abbildung 40: Hemmung der sekundären Adhäsion**

Auf Plastik und Fibrinogen zeigt c7E3 eine größere Hemmung der Adhäsion an Oberflächenmoleküle. An die übrigen Oberflächen adhären mit c7E3 vorinkubierte Blutplättchen wesentlich stärker als bei Vorinkubation mit GRGDSP. Allgemein liegt die Zahl der adhären Plättchen bei Stimulation mit TRAP höher, als bei der primären Adhäsion ohne Zugabe eines Aktivators der Thrombozyten.

## 5 Diskussion

### 5.1 Differentielle Effekte von Abciximab auf die Thrombozytenfunktion bei Patienten und *in vitro*

Thrombozyten sind entscheidend an der Entstehung und Ausprägung akuter Koronarsyndrome beteiligt. Eine besondere Rolle spielt in diesem Zusammenhang der Fibrinogenrezeptor, über dessen Modifizierung durch Hemmung oder Aktivierung in den pathophysiologischen Kreislauf der akuten Koronarsyndrome eingegriffen werden kann. Daher stellt sich daher die Frage, in welchem zeitlichen Ablauf es zur Aktivierung der Blutplättchen kommt und an welcher Stelle des pathophysiologischen Kreislauf Möglichkeiten zur Intervention bestehen, vor allem ob eine antithrombozytäre Therapie mit dem GPIIb-IIIa-Rezeptorantagonisten Abciximab zu einer Veränderung der thrombozytären Membranglykoproteine führt. Diese Studie konnte zeigen, in welchem zeitlichen Zusammenhang die Aktivität von Fibrinogenrezeptoren zu der Wirkung von Abciximab auf die Thrombozytenfunktion steht, vor allem welche Rolle dabei dem Innerem Speicher der GPIIb-IIIa-Rezeptoren zukommt. Die Hauptergebnisse der vorliegenden Arbeit sind:

- Bei Patienten, die eine antithrombozytäre Therapie mit Abciximab erhalten, ist die Aggregation der Thrombozyten über den Zeitverlauf nach der Intervention signifikant verringert. Dies ist auch der Fall, wenn die Thrombozyten mit dem Thrombin-Agonisten TRAP zur Aggregation angeregt werden.
- Mittels der ATP-Freisetzungsreaktion und der Expression von P-Selektin an der Thrombozytenoberfläche konnte nachgewiesen werden, daß Abciximab die Degranulation von Thrombozyten-Granula bei schwachen Stimuli wie ADP vollständig, jedoch unvollständig bei potenteren Stimuli wie TRAP blockiert.
- Abciximab führt zu einer nahezu kompletten Blockade der GPIIb-IIIa-Rezeptoren bei unstimulierten und ADP-stimulierten Thrombozyten *in vivo* und *in vitro*. Die TRAP-Aktivierung der Thrombozyten führt zu einer unvollständigen Blockierung der GPIIb-IIIa-Rezeptoren.
- Die Oberflächenexpression von GPIIb-IIIa auf Thrombozyten ist während der Therapie mit Abciximab reduziert.

- Die Adhäsion von Thrombozyten an Oberflächenmoleküle ist während der Therapie mit Abciximab vermindert.
- Die Kombination von Abciximab mit Heparin oder Hirudin erweist sich *in vitro* der Einfachtherapie überlegen.

Nach den Befunden dieser Arbeit kann unter bestimmten Umständen einer gesteigerten Aktivierung der Thrombozyten, zum Beispiel bei der Stimulierung durch Thrombin, die Freisetzung von GPIIb-IIIa-Rezeptoren aus den Depots an die Oberfläche der Blutplättchen zu einer signifikanten Veränderung der Rezeptorblockade und so zur Aggregation der Thrombozyten führen. Bei manchen Patienten mit einer gesteigerten Thrombin-Aktivität und einem hohen Risiko für koronarthrombotische Komplikationen, z.B. im akuten Myokardinfarkt, könnte ein Nutzen durch die kombinierte Therapie mit GPIIb-IIIa-Rezeptorantagonisten bestehen (Gawaz *et al* 1999). Im folgenden sollen die Ergebnisse näher erläutert und ihre übergreifende Bedeutung dargestellt werden.

### 5.1.1 Interner Speicher von GPIIb-IIIa und Aggregation

Ein beträchtlicher Teil der thrombozytären GPIIb-IIIa-Rezeptoren von etwa 30% liegt im Innern des Blutplättchens im “surface connected system“ und in den  $\alpha$ -Granula gespeichert vor (Gawaz *et al* 1999). Erst durch Aktivierung werden diese Rezeptoren an die Oberfläche transportiert (Plow *et al* 1989, Wencel-Drake *et al* 1986, Morgenstern 1992). Das Ausmaß der Freisetzung von gespeicherten Rezeptoren ist abhängig von der Art der Aktivierung der Thrombozyten. Diese Studie konnte zeigen, daß die Stimulation mit ADP nur zu einer geringen Zunahme der GPIIb-IIIa- Rezeptoren an der Oberfläche führt, die Aktivierung mit TRAP als wesentlich potenterer Stimulus hingegen bewirkt einen deutlich größeren Transport von Rezeptoren an die Thrombozytenoberfläche. Im Gegensatz zur ADP-induzierten Aggregation konnte die TRAP-induzierte Aggregation unter der Standarddosierung von Abciximab nicht effektiv gehemmt werden. Dies korreliert mit der unter Abciximab-Therapie vergleichsweise geringeren Blockade von GPIIb-IIIa-Rezeptoren. Es konnte gezeigt werden, daß auch in unphysiologisch hohen Dosierungen von Abciximab die Entleerung der inneren Speicher von Blutplättchen nicht vollständig verhindert werden kann. Dies bedeutet, daß die TRAP-induzierte

Thrombozytenaggregation auch in hoher Abciximab-Dosierung nicht vollständig gehemmt werden kann. Die Kombination von Abciximab mit Heparin, Hirudin oder einem niedermolekularem Heparin konnte hingegen im Versuch eine deutliche Abnahme der Aggregation bewirken. Besonders in klinischen Situationen mit erhöhter Thrombinaktivierung (Fibrinolyse im akuten Myokardinfarkt) kann die Entleerung der inneren Speicher an GPIIb-IIIa-Rezeptoren von Bedeutung sein (Topol *et al* 1998). Schrör und Weber (Schrör *et al* 2001) konnten in ihren Versuchen zeigen, daß sowohl die Aktivierung durch TRAP, als auch durch ADP, die Externalisierung von GPIIb-IIIa-Rezeptoren (gemessen an der Oberflächenexpression von CD62P) an die Oberfläche der Plättchen fördert. Interessanterweise bestehen jedoch auffallende Unterschiede im Bindungsablauf zwischen ADP- und TRAP stimulierten Plättchen. Die ADP-induzierte Bindung war wesentlich langsamer als diejenige von Abciximab. Diese Unterschiede im Tempo der Fibrinogenbindung resultieren aus einem unterschiedlichen GPIIb-IIIa Aktivierungsablauf, da die tatsächliche Fibrinogenbindungsrate (gemessen durch Zugabe von Fibrinogen nach Ablauf der Thrombozytenaktivierung) bei ADP- und TRAP stimulierten Plättchen gleich war. Die Autoren kommen zu dem Ergebnis, daß bei einem schnellen Prozeß wie der Externalisierung von GPIIb-IIIa, die Unterschiede in der Geschwindigkeit der Fibrinogenbindung aus unterschiedlichen Bindungsabläufen an GPIIb-IIIa resultieren. Dies könnte eine Erklärung für die Unterschiede der ADP- und TRAP- stimulierten Fibrinogenbindung durch GPIIb-IIIa-Antagonisten sein. In diesen Situationen könnte die Kombination aus einem GPIIb-IIIa-Antagonisten und einem Anti-Thrombin von Nutzen sein, was in weiteren Studien geprüft werden müßte.

### 5.1.2 Freisetzungsreaktion

Abciximab vermindert die ATP-Freisetzung von ADP-stimulierten Plättchen. Unter TRAP-Aktivierung kam es hingegen zu keiner signifikanten Beeinflussung der ATP-Freisetzung. Im Vergleich dazu war jedoch sowohl die ADP-, als auch die TRAP-induzierte P-Selektin-Expression vermindert. Die TRAP-induzierte Verringerung der P-Selektin-Expression wurde nur *in vivo* beobachtet, nicht jedoch *in vitro*. Diese Diskrepanz ist dadurch zu erklären, daß im Blut der Patienten Mediatoren wie

Thromboxan A<sub>2</sub> und ADP Feedbackmechanismen modulieren, welche durch die Therapie der Studienpatienten mit ASS und Ticlopidin ausgeschaltet werden. Bei den *in vitro*-Versuchen war keine solche Inhibition möglich (Gawaz *et al* 1999). Die Studie konnte zeigen, daß eine Zunahme der Konzentration *in vitro* keine Veränderung der Befunde bewirkt. Wie bei der Aggregation ist Abciximab nicht in der Lage, bei starken Stimuli die ATP-Freisetzung zu unterbinden. Die Freisetzung von gespeicherten Granula bewirkt *in vivo* die Aktivierung von Thrombozyten, die Anlagerung an die Gefäßwand, Vasokonstriktion und die Verringerung der Fließgeschwindigkeit des Blutstroms mit der folgenden Gefahr einer Thrombose (Willerson *et al* 1989, Siess 1989). Eine Fibrinogenrezeptorhemmung hat somit eine zusätzliche degranulationshemmende und antivasokonstriktorische Wirkung. Besonders in klinischen Situationen mit einer erhöhten Thrombin-Aktivität könnte die Therapie von einem GPIIb-IIIa-Antagonisten in Kombination mit einem Antithrombin vorteilhaft gegenüber der Monotherapie mit einem Fibrinogenrezeptorantagonisten alleine sein.

### 5.2 Einfluß von Abciximab auf die Adhäsion von Thrombozyten

Die primäre Adhäsion bezeichnet den ersten Schritt der Hämostase, die Anlagerung von noch ruhenden Plättchen an die verletzte Gefäßwand, die sekundäre Adhäsion stellt die Anlagerung des aktivierten Plättchens an Strukturen des Subendothels dar. Insgesamt zeigt die Untersuchung, daß Abciximab in der Lage ist, die primäre und sekundäre Adhäsion günstig zu beeinflussen, wobei es dem Peptid GRGDSP, außer auf Laminin, nicht überlegen ist. Die Ergebnisse der Analyse der Adhäsion an unterschiedliche Oberflächenmoleküle zeigt charakteristische Unterschiede. Dies legt die Vermutung nahe, daß Abciximab neben dem GPIIb-IIIa-Rezeptor auch noch andere Integrine beeinflussen kann. So erklärt sich die Hemmung der Adhäsion auf Fibrinogen, Vitronektin und Fibronektin über  $\beta$ 3-Integrine, bei Laminin und Kollagen über  $\beta$ 1-Integrine (Plow 1992). Die Bindung an Integrin-Adhäsions-Rezeptoren kann die Funktionsweise anderer Integrine verändern und somit eine Abtrennung der Liganden-besetzten Integrine bewirken. Die Bindung der Liganden bewirkt außerdem eine Konformationsänderung extrazellulärer Domänen der Integrine

und kann über diesen Mechanismus auch die Funktion anderer Integrine verhindern („Trans-dominante Hemmung“) (Diaz-Gonzalez *et al* 1996). Trans-dominante Hemmung bewirkt also gleichsam eine Blockade der Signaltransduktion von Integrinen und kann als mögliche Ursache der Adhäsionshemmung von Abciximab angesehen werden. Die *ex vivo*- Ergebnisse dieser Arbeit zeigen eine mit dieser Annahme übereinstimmende Zunahme der Oberflächendichte von CD41 und CD61 als Parameter für die  $\beta_3$ -Integrine. Auch eine Abnahme der Oberflächendichte konnte von  $\beta_1$ -Integrinen konnte durch die Abnahme der CD49b-Immunofluoreszenz *ex vivo* nachgewiesen werden.

### 5.3 Studienbeschränkungen

Die Analyse der Thrombozytenfunktion ist immer von einem potentiellen Risiko einer artifiziellen Thrombozytenaktivierung *in vitro*, bei der Gewinnung oder Verarbeitung der Proben begleitet. Um eine Verfälschung der Ergebnisse zu vermeiden, wurden sämtliche methodische Variablen innerhalb der untersuchten Studiengruppe konstant gehalten. Außerdem wurde Wert darauf gelegt, alle Proben innerhalb kürzester Zeit weiterzuverarbeiten. Wie vorausgegangene Studien belegen, hat sich die hier verwendete Untersuchungsmethode in vielen klinischen Fällen als geeignet erwiesen und führt zu keiner meßbaren Aktivierung der Thrombozyten (Frelinger 1991). Die Durchflußzytometrie erlaubt jedoch nur Aussagen über noch zirkulierende Thrombozyten. Blutplättchen, welche bereits sequestriert worden sind, entfallen der Beurteilung. Demnach wäre es möglich, daß die thrombozytäre Aktivität unterbewertet wurde, was vor allem bei Patienten mit geringer systemischer Thrombozytenaktivierung zum Tragen kommen könnte. Des weiteren muß die geringe Fallzahl der Studie in die Interpretation der Ergebnisse miteinbezogen werden. In der vorliegenden Studie gab es keine Komplikationen in Form von Thrombozytopenie oder Blutung, die bei einem größeren Patientenkollektiv hätten auftreten können. Ein weiterer Punkt ist der mögliche synergistische Effekt von anderen Thrombozytenhemmern wie Ticlopidin zusammen mit Abciximab auf die Funktion der Blutplättchen. In früheren Studien konnte bereits nachgewiesen werden, daß Acetylsalicylsäure die intrinsischen

Aktivierungsvorgänge von Abciximab nicht beeinflusst, hinsichtlich der Aggregation von Thrombozyten jedoch ein Synergismus mit ASS vorhanden ist (Peter *et al* 1998).

### 5.4 Therapeutische Ausblicke

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchten Effekte von Abciximab auf die Thrombozytenfunktion können in Zukunft bei der Entwicklung neuer GPIIb-IIIa-Antagonisten hilfreich sein und dazu beitragen, die antithrombozytäre Therapie mit Fibrinogenrezeptorantagonisten effektiver zu gestalten. Es können wichtige Aussagen bezüglich der Effekte einer antithrombotischen Therapie mit Abciximab gemacht werden, speziell hinsichtlich Dauer und Beginn einer Hemmung des Rezeptors. Es wäre nach den vorliegenden Ergebnissen denkbar, daß eine Kombinationstherapie aus Fibrinogenrezeptorantagonisten, ASS und direkten Thrombinhemmern (z.B. Hirudin, Hirulog) in der Akutphase der akuten Koronarsyndrome die Ergebnisse verbessern könnte. ASS besitzt eine verhältnismäßig schwach antiaggregatorische Wirkung und beeinflusst die Freisetzungsreaktion und die Aktivierung von GPIIb-IIIa-Rezeptoren nur wenig (Braun *et al* 1994, Patrono 1994). Die Kombination aus verschiedenen Medikamenten mit unterschiedlichen Angriffspunkten zeigt jedoch eine deutliche Überlegenheit gegenüber der Monotherapie im *in vitro*-Versuch. GPIIb-IIIa-Antagonisten können, wie diese Arbeit zeigt, unterschiedliche Effekte auf die Integrine bewirken und somit die adhäsiven Eigenschaften der Thrombozyten an die Gefäßwand beeinflussen. Neben der bekannten Hemmung der Aggregation könnten Fibrinogenrezeptorantagonisten deshalb vorteilhafte Effekte auf die Adhäsion von Blutplättchen während der Reperfusion haben, oder sich positiv auf proliferative Prozesse innerhalb der Gefäßwand auswirken. Eine zukünftige klinische Herausforderung wird sein, die optimale antithrombozytäre Therapie auf den jeweiligen Patienten und den Krankheitsverlauf abzustimmen.



## 6 Zusammenfassung

Die Einführung von Glykoprotein IIb-IIIa Antagonisten hat die antithrombotische Therapie von Patienten mit akutem Koronarsyndrom entscheidend verändert. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde in einer klinischen Studie die Auswirkungen einer antithrombozytären Therapie mit Abciximab auf die Thrombozytenfunktion und die Expression thrombozytärer Membranglykoproteine bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt untersucht. Es wurden insgesamt 13 Patienten in die Studie aufgenommen, die sich einer elektiven PTCA unterzogen und Abciximab (c7E3-Fab, 0,25 mg/kg als Bolus, gefolgt von einer 12-stündigen Infusion mit 10 µg/min), ASS 100 mg und einen initialen Heparinbolus von 5000 I.E. erhielten. Der Beobachtungszeitraum erstreckte sich bis 72 Stunden nach Therapiebeginn. Untersucht wurden die Aggregation, die Freisetzung von ATP, die Oberflächenexpression von GPIIb-IIIa und P-Selektin, sowie die Blockade von GPIIb-IIIa-Rezeptoren nach Aktivierung der Thrombozyten mit ADP oder TRAP, bzw. ohne zusätzliche Aktivierung. Zur Analyse wurden die Methoden der Aggregometrie, Luminometrie zur Bestimmung der Thrombozytenaggregation und ATP-Freisetzung, sowie die Durchflußzytometrie zur Bestimmung des Aktivierungszustandes thrombozytärer Membranglykoproteine verwendet. Es zeigte sich eine annähernd vollständige Inhibition der ADP-induzierten Aggregation, während unter Stimulierung mit dem potenteren TRAP die Aggregation nur teilweise unterdrückt werden konnte, was auf die Freisetzung von GPIIb-IIa aus internen Speichern zurückzuführen ist. Ebenso ist die Freisetzung von ATP aus dichten Granula nur mit einem schwachen Agonisten wie ADP zu inhibieren. In einem *in vitro*-Versuch konnte nachgewiesen werden, daß dieses Phänomen sich auch bei einer Verlängerung der Inkubationsdauer oder einer Erhöhung der Konzentration von Abciximab auf unphysiologische Werte, nicht verändert. Daraus läßt sich folgern, daß der innere Speicher von GPIIb-IIIa auch bei einer Therapie mit Abciximab entleert wird und es zu keiner vollständigen Blockade der GPIIb-IIIa-Rezeptoren kommt. Diese unvollständige Blockade des inneren Speichers könnte den klinischen Einsatz von Abciximab einschränken. Es konnte jedoch in einem weiteren Versuch gezeigt werden, daß sich die Aggregation und die ATP-Freisetzung mit Hilfe einer Kombinationstherapie aus Abciximab und Heparin, Hirudin oder einem niedermolekularen Heparin sehr viel weiter verringern lassen, als durch die alleinige

Gabe von Abciximab. Die Kombinationstherapie von Abciximab mit einem Thrombinhemmer stellt damit eine möglicherweise erfolgversprechende Therapieoption für Patienten mit akutem Koronarsyndrom dar. In einem weiteren Versuch wurde auch die Adhäsion von aktivierten Thrombozyten nach Vorbehandlung mit c7E3 an unterschiedliche Oberflächenmoleküle untersucht. Dazu wurden mit physiologischen Oberflächenmolekülen der Zellwand beschichtete Mikrotiterplatten verwendet, mit Fluoreszenzfarbstoff markierte und vorher gewaschene Thrombozyten erlaubten die Messung der Fluoreszenz adhärierter Blutplättchen nach Lysierung. Es zeigt sich, daß Abciximab in der Lage ist, die primäre und sekundäre Adhäsion von Thrombozyten günstig zu beeinflussen. Da die Adhäsion an die verschiedenen Oberflächenmoleküle charakteristische Unterschiede zeigt, liegt die Vermutung nahe, daß Abciximab außer dem GPIIb-IIIa-Rezeptor noch andere Integrine beeinflusst, so z.B.  $\beta_1$  und  $\beta_3$ -Integrine. Die beschriebenen Effekte von Abciximab auf die Thrombozytenfunktion können sowohl Konsequenzen auf die Therapie von Patienten mit akutem Koronarsyndrom haben, als auch helfen, die antithrombotischen Strategien bei diesen Patienten zu verbessern.

## 7 Anhang

### 7.1 Abkürzungsverzeichnis

AA	Arachidonsäure
ASS	Acetylsalicylsäure
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CAPTURE	chimeric 7E3 antiplatelet in unstable angina refractory to standard treatment trial
CAPRIE	Clopidogrel versus Aspirin in Patients at Risk of Ishaemic Events
CD	Cluster of Determinants
CD40L	CD40-Ligand
cGMP	cyklisches Guanosinmonophosphat
COX-1	Cyklooxygenase-1
CPDA	Citrate-phosphate-dextrose-adenine
CRP	C-reaktives Protein
EDRF	endothelium derived relaxing factor
EPIC	Evaluation of IIb-IIIa Platelet receptor antagonist 7E3 in preventing Ishemic Complications trial
EPILOG	Evaluation of PTCA to Improve Long term Outcome by c7E3 GPIIb-IIIa receptor blockade trial
EPISTENT	EPILOG-Stent-Studie
ERASER	Evaluation of ReoPro and Stents to Eliminate Restenosis
Fab	Fragment antigen binding
FITC	Fluoreszeinisothiocyant
GP	Glykoprotein
ICAM-1	intercellular adhesion molecule-1
I.E.	Internationale Einheiten
IL-1	Interleukin-1
IMPACT	Integrelin to Manage Platelet Aggregation to Combat Thrombosis trial
ISAR	Intracoronary Stenting and Antithrombotic Regimen trial
ISIS	International Study of Infarct Survival

KGD	Glutamin
LIBS	Liganden-induzierte Bindungsstelle
LP	Lipoprotein
M	molar
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mm	Millimeter
nm	Nanometer
mV	Millivolt
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
NO	Stickstoffmonoxid
NYHA	New York Heart Association
PAI-1	plasminogen activator inhibitor-1
PARADIGM	Platelet Aggregation Receptor Antagonist Dose Investigation and reperfusion Gain in Myocardial infarction
PARAGON	Platelet IIb-IIIa Antagonist for the Reduction of Acute coronary syndrome events in a global Organization Network
PBS	Phosphate-buffered saline
PDGF	platelet derived growth factor
PECAM-1	platelet endothelial cellular adhesion molecule-1
PFA	Paraformaldehyd
PF3	Plättchenfaktor 3
PRISM	Platelet Receptor Inhibition for Ischemic Syndrome Management study
PRISM PLUS	Platelet Receptor Inhibition for Ischemic Syndrome Management study plus
PPP	Platelet-poor-plasma
PRP	Platelet-rich-plasma
PTCA	Perkutane transluminale Coronarangioplastie
PURSUIT	Platelet IIb-IIIa Underpriming the Receptor for Supression of Unstable Ischemia Trial

RAPPORT	ReoPro in Acute myocardial infarction and Primary PTCA Organisation and Randomized Trial
RESTORE	Randomized Efficacy Study of tirofiban for Outcomes and Restenosis trial
RGD	Arginin-Glycin-Aspartat
RIBS	Rezeptor-induzierte Bindungsstelle
rtPA	rekombinanter "tissue plasminogen activator"
SCS	Surface connecting system
SD	Standard deviation
TGF	Transforming-growth-factor
TRAP	thrombin receptor activating peptide
TxA <sub>2</sub>	Thromboxan A <sub>2</sub>
U/min	Umdrehungen pro Minute
U/ml	Units pro Milliliter
vWF	von-Willebrand-Faktor

## 7.2 Literaturverzeichnis

1. Abrams CS, Ellison N, Budzynski AZ, Shattil SJ. Direct detection of activated platelets and platelet-derived microparticles in humans. *Blood* 1990; 75: 128-138
2. Andrews RK, Lopez JA, Berndt MC. Molecular mechanism of platelet adhesion and activation. *Int J Biochem Cell Biol* 1997; 29: 91-105
3. Antiplatelet Trialists Collaboration. Collaborative overview of randomized trials or antiplatelet therapy-I: Prevention of death, myocardial infarction and stroke by prolonged antiplatelet therapy in various categories of patients. *BMJ* 1994; 308: 81-106
4. Becker RC. Antiplatelet therapy in coronary heart disease. *Arch Pathol Lab Med* 1993; 117: 89-96
5. Becker RC, Tracy RP, Bovill EG, Mann KG, Ault K. The clinical use of flow cytometry for assessing platelet activation in acute coronary syndromes. TIMI-III thrombosis and antikoagulation group. *Coron Artery Dis* 1994; 5: 339-345
6. Bertrand M, Legrand V, Boland J, Fleck E, Bonnier J, Emmanuelson H, et al.. Full anticoagulation versus ticlopidine plus aspirin after stent implantation: a randomized multicenter european study: The FANTASTIC trial. *Circulation* 1996; 94: 8:1-685
7. Bihour C, Durrieu-Jais C, Macchi L, Poujol C, Coste P, Besse P, Nurden P, Nurden AT. Expression of markers of platelet activation and the interpatient variation in response to abciximab. *Art Throm Vasc Biol* 1999; 19: 212-219
- 8- Böck M, Gawaz MP, Dietzler A, Heim MU, Mempel W. Single-donor platelet concentrates: changes of surface glycoproteins during storage. *Haemostasis* 1994; 24: 230-235
9. Born GVR, Cross GP. Effect of inorganic ions and of plasma proteins on the aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate. *J Physiol* 1964; 170: 397-414
- 10 Braun M, Kramann J, Strohbach H, Schrör K. Incomplete inhibition of platelet secretion by low-dose aspirin. *Platelets* 1994; 5: 325-331
11. Cairns JA, Gent M, Singer J, Finnie KJ, Froggatt GM, Holder DA, Jablonsky G, Kostuk WJ, Melendez LJ, Myers MG, Sackett DL, Sealy BJ, Tanser PH.

- Aspirin, sulfinpyrazone or both in unstable angina. Results of a Canadian Multicenter Trial. *N Engl J Med* 1985; 313: 1369-1375
12. Cannon CP, Tracy R. Clotting for the clinician: an overview of thrombosis and antithrombotic therapy. *Thrombosis and Thrombolysis* 1995; 2: 95-106
  13. Charo IF, Bekeart LS, Phillips DR. Platelet glycoprotein IIb-IIIa-like proteins mediate endothelial cell attachment to adhesive proteins and the extracellular matrix. *J Biol Chem* 1987; 262: 9935-9938
  14. Cohen LS. Clinical pharmacology of acetylsalicylic acid. *Sem Thromb Hemost* 1976; 2: 146-175
  15. Collier BS. Blockade of platelet GP IIb-IIIa receptors as an antithrombotic strategy. *Circulation* 1995; 92: 2373-2380
  16. Collier BS. Platelets in cardiovascular thrombosis and thrombolysis. In: Fozzard HA, Haber E, Jennings RB, Katz AM, Morgan HE, eds. *The heart and cardiovascular system: scientific foundations*. 2<sup>nd</sup> ed. Vol. 1. New York: Raven Press 1991: 219-273
  17. Collier BS. Monitoring platelet GP IIb-IIIa antagonist therapy. *Circulation* 1998; 97: 5-9
  18. Coukell AJ, Markham A. Clopidogrel. *Drugs* 1997; 54: 745-750
  19. Cox D. Methods for monitoring platelet function. *Am Heart J* 1998; 135: 160-169
  20. Davies MJ, Thomas A. Plaque fissuring – the cause of acute myocardial infarction, sudden ischemic death and crescendo angina. *Br Heart J* 1985; 53:363
  21. Davies MJ, Thomas A. Thrombosis and acute artery lesions in sudden cardiac ischemic death. *N Engl J Med* 1984; 310: 1137-1140
  22. De Groot PG, Sixma JJ. Platelet adhesion. *Br J Haematol* 1990; 75: 308-312
  23. Fitzgerald DJ, Roy L, Catella F, Fitzgerald GA. Platelet activation in unstable coronary disease. *N Engl J Med* 1986; 315: 983-989
  24. Fitzgerald LA, Phillips DR. Platelet membrane glycoproteins. In: Colman RW, Hirsh J, Marder VJ, Salzman EW, eds. *Hemostasis and thrombosis: basic principles and clinical practice*. 2<sup>nd</sup> ed. Philadelphia: J.B. Lippincott 1987: 572-593

- 25 Frelinger AL, Du X, Plow EF, Ginsberg MH. Monoclonal antibodies to ligand-occupied conformers of integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 ( glycoprotein IIb-IIIa ) alter receptor affinity, specificity, and function. *J Biol Chem* 1991; 266: 17106-17111
- 26 Fuster V, Badimon L, Badimon J, Chesebro JH. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes (1). *N Engl J Med* 1992; 326: 242-250
- 27 Fuster V, Jang IK. Role of platelet-inhibitor agents in coronary artery disease. In: Topol EJ (ed). *Textbook of interventional cardiology* 2<sup>nd</sup> ed. Vol. 1 Philadelphia: E.B. Saunders 1994: 3-22
- 28 Gawaz M; Dobos G, Späth M, Mujais SK. Platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa function is impaired in end-stage renal disease. *J Am Soc Nephrol* 1994; 5: 36-46
- 29 Gawaz M, Fateh-Moghadan S, Pilz G, Gurland HJ, Werdan K. Platelet activation and interaction with leucocytes in patients with sepsis or multiple organ failure. *Eur J Clin Invest* 1995; 25: 843-851
30. Gawaz M, Neumann FJ, Schömig A. Evaluation of platelet membrane glycoproteins in coronary artery disease. Consequences for diagnosis and therapy. *Circulation* 1999; 99: e1-e11
31. Gawaz M, Neumann FJ, Ott I, May A, Rüdiger S, Schömig A. Changes in membrane glycoproteins of circulating platelets after coronary stent implantation. *Heart* 1996; 76: 166-172
32. Gawaz M, Neumann FJ, Ott I, May A, Rüdiger S, Schömig A. Platelet activation and coronary stenting. Effect of antithrombotic therapy. *Circulation* 1996; 94: 279-285
33. Gawaz M, Neumann FJ, Ott I, Schiessler A, Schömig A. Platelet function in acute myocardial infarction treated with direct angioplasty. *Circulation* 1996; 93: 229-237
34. Gawaz M, Neumann FJ, Ott I, May A, Rüdiger S, Schömig A. Role of activation dependent platelet membrane glycoproteins in development of subacute occlusive coronary stent thrombosis. *Coron Art Dis* 1997; 8: 121-128
35. Gawaz. M, Mujais SK. Platelet membrane glycoprotein abnormalities in uremia. *J Nephrol* 1995; 8: 12-19



36. Gawaz M, Loftus JC, Frojmovic MM, Plow EF, Ginsberg MH. Ligand bridging mediates integrin  $\alpha$ IIB $\beta$ 3 ( platelet GP IIB-IIIa ) dependent homotypic and heterotypic cell-cell interactions. *J Clin Invest* 1991; 8: 1128-1134
37. Gawaz M, Ruf A, Neumann FJ, Pogatsa-Murray G, Dickfeld T, Zohlh fer D, Schömig A. Effect of glycoprotein IIB-IIIa receptor antagonism on platelet membrane glycoproteins after coronary stent placement. *Thromb Haemost* 1998; 80: 994-1001
38. Gawaz M, Ward R. Effects of hemodialysis on platelet derived thrombospondin. *Kidney Int* 1991; 40: 257-265
39. Ginsberg MH, Frelinger AL, Lam SCT, Forsyth J, McMillan R, Plow EF, Shattil SJ. Analysis of aggregation disorders based on flow cytometric analysis of glycoprotein IIB-IIIa with conformation-specific monoclonal antibodies. *Blood* 1990; 76: 2017-2023
40. Ginsberg MH, Loftus JC. Platelet integrins. *Thromb Haemost* 1995; 74:352-359
41. Gurbel PA, Serebruany VL, Shustov AR, Bahr RD, Carpo C, Ohman EM, Topoj EJ. Effects of reteplase and alteplase on platelet aggregation and major receptor expression during the first 24 hours of acute myocardial infarction treatment. GUSTO-III Investigators. Global Use of Strategies to Open Occluded Coronary Arteries. *J Am Coll Cardiol* 1998; 31: 1466-1473
42. Harker LA, Bruno JJ. Ticlopidine's mechanism of action on human platelets. In: Hass K, Easton JD, eds. *Ticlopidine, Platelets and Vascular Disease*. New York, NY: Springer Verlag; 1993: 99-116
43. Harker LA. Role of platelets and thrombosis in mechanisms of acute occlusion and restenosis after angioplasty. *Am J Cardiol* 1987, 60: 20B-8B
44. Herbert JM, Frehel D, Vellee E, Kieffer G, Gouy D, Berger Y, Necciari J, Defreyn G, Maffrand JP. Clopidogrel, a novel antiplatelet and antithrombotic agent. *Cardiovasc drug rev* 1993; 11: 180-198
45. ISIS-2 ( Second international study of infarct survival ) collaborative group: Randomized trial of intravenous streptokinase, oral aspirin, both, or neither among 17187 cases of suspected acute myocardial infarction: ISIS-2. *Lancet* 1988; 2: 349-360

46. Kestin AS, Ellis PA, Barnard MR, Errichetti A, Rosner BA, Michelson AD. The effect of strenuous exercise on platelet activation state and reactivity. *Circulation* 1993; 88:1502-1511
46. Kong DF, Califf RM, Miller DP, Molinerno DJ, White HD, Harrington RA, Tchong JE, Lincoff AM, Hasselblad V, Topol EJ. Clinical outcomes of therapeutic agents that block the platelet GP IIb-IIIa integrin in ischemic heart disease. *Circulation* 1998; 98: 2829-2835
47. Lefkovitz J, Plow EF, Topol EJ. Platelet glycoprotein IIb-IIIa receptors in cardiovascular medicine. *N Engl J Med* 1995; 332: 1553-1559
48. Lewis HD, Davis JW, Archibald DG, Steinke WE, Smitherman TC, Dorothy JE, Schnaper HW et al.. Protective effects of aspirin against acute myocardial infarction and death in men with unstable angina. Results of a veterans administration cooperative study. *N Engl J Med* 1983; 309: 396-403
49. Madan M, Berkowitz SD, Tchong JE. Glycoprotein IIb-IIIa interging blockade. *Circulation* 1998; 98: 2629-2635
50. Mascelli MA, Worley S, Veriabo NJ, Lance ET, Mack S, Schaible T, Weisman HF, Jordan RE. Rapid assessment of platelet function with a modified whole-blood aggregometer in percutaneous transluminal coronary angioplasty patients receiving anti-GP IIb-IIIa therapy. *Circulation* 1997; 96: 3860-3866
51. Michelson AD. Flow cytometry: a clinical test of platelet function. *Blood* 1996; 87: 4925-4936
52. Morgenstern E. Platelets morphology/ ultrastructure. In: Bruchhausen Fv., Walter U ( edits. ) Platelets and their factors. Handbook of experimental pharmacology. Springer Verlag, Heidelberg 1997; 27-52
53. Morgenstern E, Ruf A, Patscheke H. Transport of anti-glycoprotein IIb/IIIa antibodies into the  $\alpha$ -granules of unstimulated human platelets. *Thromb Haemost* 1992; 67: 121-125
54. Motz W. Die optimale Dosierung von Acetylsalicylsäure in der Therapie der koronaren Herzkrankheit. *Internist* 1994; 35: 1165-1170
55. Mousa SA, Bennett JS. Platelets in health and disease: platelet GP IIb-IIIa structure and function: recent advances in antiplatelet therapy. *Drugs of the future* 1996; 21: 1141-1154
56. Neumann FJ, Blasini R, Schmitt C, Alt E, Dirschinger J, Gawaz M, Kastrati A,

- Schömig A. Effect of glycoprotein IIb-IIIa receptor blockade on recovery of coronary flow and left ventricular function after the placement of coronary artery stents in acute myocardial infarction. *Circulation* 1998; 98: 2695-2701
57. Nurden A. Human platelet glycoproteins. In: *Haemostasis and Thrombosis*. Ed. Bloom A, Forbes CD. Churchill Livingstone 1994; 3<sup>rd</sup> edition, pp 259-285
58. Patrono C. Aspirin as an antiplatelet drug. *New Engl J Med* 1994; 330: 1287-1294
59. Peter KH, Schwarz M, Ylänne J, Kohler B, Moser M, Nordt T, Salbach P, Kubler W, Bode C. Introduction of fibrinogen binding and platelet aggregation as a potential intrinsic property of various glycoprotein IIb/IIIa inhibitors. *Blood* 1998; 92: 3240-3249
60. Phillips DR, Charo IF, Parise LV, Fitzgerald LA. The platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa complex. *Blood* 1988; 71: 831-843
61. Phillips DR, Charo IF, Scarborough RM. GP IIb-IIIa: the responsive integrin. *Cell* 1991; 65: 359-362
62. Plow EF, D'Souza SE, Ginsberg MH. Ligand binding to GP IIb-IIIa: a status report. *Sem Thromb Hemost* 1992; 18: 324-332
63. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990's. *Nature* 1993; 362: 801-809
64. Ruf A, Schlenk RF, Morgenstern E, Patscheke H. Contact-induced neutrophil activation by platelets in human cell suspension and whole blood. *Blood* 1992; 80: 1238-1246
64. Ruggeri ZM. New insights into mechanisms of platelet adhesion and aggregation. *Sem Hematol*. 1994; 31: 229-239
65. Scharf RE, Tomer A, Marzec UM, Teirstein PS, Ruggeri ZM, Harker LA. Activation of platelets in blood perfusing angioplasty-damaged coronary arteries. Flow cytometric detection. *Arterioscler Thromb* 1992; 12: 1475-1487
66. Shattil SJ, Cunningham M, Hoxie JA. Detection of activated platelets in whole blood using activation-dependent monoclonal antibodies and flow cytometry. *Blood* 1987; 70: 307-315
67. Schrör K. Antiplatelet drugs. A comparative review. *Drugs* 1995; 50: 7-28
68. Schrör K, Weber A. Differential inhibition of adenosine diphosphate- versus thrombin receptor-activating peptide- stimulated platelet fibrinogen binding by

- abciximab due to different glycoprotein IIb/IIIa activation kinetics. *Blood* 2001; 98, 5
69. Siess W. Molecular mechanisms of platelet activation. *Physiol Rev* 1989; 69: 50-178
70. Siess W. Platelet receptors: the thrombin receptor. In: Bruchhausen Fv., Walter U ( edits. ) *Platelets and their factors. Handbook of experimental pharmacology.* Springer Verlag, Heidelberg 1997; 101-116
72. Sixma JJ. Interaction of blood platelets with the vessel wall. In: *Haemostasis and Thrombosis.* Ed. Bloom A, Forbes CD. Churchill Livingstone 1994; 3<sup>rd</sup> deition, pp 259-285
73. The CAPTURE Investigators. Randomized placebo-controlled trial of abciximab before and during coronary intervention in refractory unstable angina: the CAPTURE study. *Lancet* 1997; 349: 1429-1435
74. The EPIC Investigators. Use of monoclonal antibody directed against the platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor in high-risk coronary angioplasty. *N Engl J Med* 1994; 330: 956-961
75. The EPILOG Investigators. Platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor blockade and low dose heparin during percutaneous coronary revascularization. *N Engl J Med* 1997; 336: 1689-1696
76. The IMPACT-II Invstigators. Randomized placebo-controlled trial of the effect of eptifibatide on complications of percutaneous coronary intervention: IMPACT-II. *Lancet* 1997; 349: 1422-1428
77. The PRISM Investigators. A comparison of aspirin plus tirofiban with aspirin plus heparin for unstable angina. *N Engl J Med* 1998; 338: 1498-1505
78. The PRISM-PLUS Investigators. Inhibition of the platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor with tirofiban in unstable angina and non-Q-wave myocardial infarction. *N Engl J Med* 1998; 338: 1422-1428
79. The PURSUIT Investigators. Inhibition of platelet glycoprotein IIb/IIIa with eptifibatide in patients with acute coronary syndroms. *N Engl J Med* 1998; 339: 436-443
80. The RAPPORT Investigators. Randomized, placebo-controlled trial of glycoprotein IIb/IIIa blockade with primary angioplasty for acute myocardial infarction. *Circulation* 1998; 98: 734-741

81. The RESTORE Investigators. Effect of glycoprotein IIb/IIIa blockade with tirofiban on adverse cardiac events in patients with unstable angina or acute myocardial infarction undergoing coronary angioplasty. *Circulation* 1997; 96: 1445-1453
82. The RISC Group. Risk of myocardial infarction and death during treatment with low dose aspirin and intravenous heparin in men with unstable coronary artery disease. *Lancet* 1990; 336: 827-830
83. Theroux P, Fuster V. Acute coronary syndroms. Unstable angina and non-Q-wave myocardial infarction. *Circulation* 1998; 97: 211-218
84. Theroux P, Quimet H, McCans J, Latour JG et al.. Aspirin, heparin, or both to treat acute unstable angina. *N Engl J Med* 1988; 319: 1105-1111
85. Topol EJ. Toward a new frontier in myocardial reperfusion therapy. Emerging platelet preeminence. *Circulation* 1998; 97: 211-218
86. Tschoepe D, Schutheiss HP, Kolarov P, Schwippert B, Dannehl K, Nieuwenhuis HK, Kehrel B, Strauer B, Gries FA. Platelet membrane activation markers are predictive for increased risk of acute ischemic events after PTCA. *Circulation* 1993; 88: 37-42
87. Wencel-Drake JD, Plow EF, Kunicki TJ, Woods VL, Keller DM, Ginsberg MH. Localization of internal pools of membrane glycoproteins involved in platelet adhesive responses. *Am J Pathol* 1986; 124: 324-334
88. White JG. Platelets and arteriosclerosis. *E J Clin Invest* 1994; 24: 25-29
89. Willerson JT, Golino P, Eidt J, Campbell WB, Buja M. Specific platelet mediators and unstable coronary artery lesions. Experimental evidence and potential clinical implications. *Circulation* 1989; 80: 198-205
90. Woods VL, Wolff LE, Keller DM. Resting platelets contain a substantial centrally located pool of glycoprotein IIb-IIIa complex which may be accessible to some but not other extracellular proteins. *J Biol Chem* 1986; 261: 1553-1558

### 10.3 Abbildungsverzeichnis

**Abbildungen:**

**Abbildung 1:** Thrombozytenadhäsion

**Abbildung 2:** Thrombozytenaggregation

**Abbildung 3:** Struktur des GPIIb-IIIa (Fibrinogenrezeptor)

**Abbildung 4:** Aktivierungsstadien des Fibrinogenrezeptors GPIIb-IIIa

**Abbildung 5:** Durchflußzytometrische Bestimmung immunologischer  
Oberflächenmarker

**Abbildung 6:** Schematische Darstellung der Plaqueruptur mit Thrombusbildung

**Abbildung 7:** Akutes Koronarsyndrom und Blutplättchen

**Abbildung 8:** Fibrinolyse des koronaren Thrombus

**Abbildung 9:** Wirkungsweise antithrombozytärer Substanzen

**Abbildung 10:** Strukturformel von Abciximab

**Abbildung 11:** Thrombozytenzahlen während des Beobachtungszeitraums

**Abbildung 12:** Konzept zur elektiven Therapie mit c7E3 während koronarer  
Intervention

**Abbildung 13:** Auswertung der Lichtaggregometrie und Luminometrie

**Abbildung 14:** Beispiel der aggregometrischen Analyse und der ATP-  
Freisetzungsreaktion

**Abbildung 15:** Zwei-Parameter-Darstellung zur Definition der Thrombozyten

**Abbildung 16:** Durchflußzytometrische Intensitätsverteilung

**Abbildung 17:** Maximale Thrombozytenaggregation

**Abbildung 18:** GPIIb-IIIa Rezeptorblockade

**Abbildung 19:** Anstiegsgeschwindigkeit der Aggregation (Slope)

**Abbildung 20:** Maximale Aggregation bei Impedanzmessung

**Abbildung 21:** Degranulation von dichten Granula: ATP-Freisetzung

**Abbildung 22:** P-Selektin Degranulierung

**Abbildung 23:** Darstellung der Veränderungen im Durchflußzytometer

**Abbildung 24:** Korrelationen von c7E3-Immunofluoreszenz gegen CD41-  
Fluoreszenz

**Abbildung 25:** konzentrationsabhängige Inhibition der Aggregation

**Abbildung 26:** GPIIb-IIIa Rezeptorblockade in Abhängigkeit von steigenden Abciximab-Konzentrationen

**Abbildung 27:** Zeitverlauf der Abciximab-Inkubation

**Abbildung 28:** GPIIb-IIIa Rezeptorblockade bei verschiedenen Inkubationszeiten mit 50µg/ml Abciximab

**Abbildung 29:** Expression von GPIIb-IIIa an der Thrombozytenoberfläche

**Abbildung 30:** Zeitabhängigkeit der anti-CD61 Bindung an die Thrombozytenoberfläche

**Abbildung 31:** Expression der  $\alpha_{IIb}$ -Kette an der Thrombozytenoberfläche

**Abbildung 32:** CD41-Immunofluoreszenz bei steigenden Inkubationszeiten

**Abbildung 33:** ATP-Freisetzung *in vitro* bei verschiedenen Abciximab-Konzentrationen

**Abbildung 34:** ATP-Freisetzung bei ansteigender Inkubationsdauer mit Abciximab

**Abbildung 35:** Alpha-Degranulation bei steigenden Konzentrationen von Abciximab

**Abbildung 36:** CD62P-Immunofluoreszenz bei steigender Inkubationsdauer mit c7E3

**Abbildung 37:** Aggregation bei Zugabe von Heparin, Hirudin und niedermolekularem Heparin

**Abbildung 38:** ATP-Freisetzung unter Kombinationstherapie

**Abbildung 39:** Hemmung der primären Adhäsion von Thrombozyten

**Abbildung 40:** Hemmung der sekundären Adhäsion

**Tabellen:**

**Tabelle 1:** Thrombozytäre Membranglykoproteine

**Tabelle 2:** Thrombozytäre Degranulationsprodukte

**Tabelle 3:** Monoklonale Antikörper zur durchflußzytometrischen Bestimmung immunologischer Aktivierungsmarker

**Tabelle 4:** Pharmakologische Klassifizierung antithrombozytärer Substanzen

**Tabelle 5:** Wirksamkeit von GPIIb-IIIa-Rezeptorantagonisten beim akuten Koronarsyndrom

**Tabelle 6:** Demographische Daten der PTCA-Patienten

**Tabelle 7:** Laborparameter der Patientengruppe

**Tabelle 8:** Pipettierschema zur Aggregometrie

**Tabelle 9:** Pipettierschema zur durchflußzytometrischen Analyse

**Tabelle 10:** Pipettierschema für die Messung der Plättchen am Durchflußzytometer

**Tabelle 11:** Konzentrationen der eingesetzten Agonisten in der Durchflußzytometrie

**Tabelle 12:** Verwendete Antikörper in der Durchflußzytometrie

**Tabelle 13:** Reagentien für die Thrombozyten-Adhäsion



## 7.3 Curriculum Vitae

### Personalien

---

Name: Fischer  
Vorname: Hans-Jörg  
Geburtsdatum/-ort: 24.02.1973 in Heidelberg  
Familienstand: ledig  
Staatsangehörigkeit: deutsch

### Schulischer Werdegang:

---

1979-1983: Grundschule in Stuttgart und Sindelfingen  
1983-1993: Goldberggymnasium in Sindelfingen, Abitur

### Universitärer Werdegang:

---

Mai 1994: Beginn des Medizinstudiums an der  
Ludwig-Maximilians-Universität München  
September 1996: Ärztliche Vorprüfung  
September 1997: Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung in München  
Mai 2000: Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung in München  
Beginn des Praktischen Jahres  
April 2001: Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung in München  
Januar 2002: Arzt im Praktikum am Krankenhaus Freising, Abteilung  
Chirurgie II

### Studienbegleitende Tätigkeiten

#### Famulaturen:

---

April 1997: Orthopädie im Krankenhaus München-Bogenhausen

März/April 1998: Famulatur im Deutschen Herzzentrum München  
September 1998: Famulatur in einer Internistischen Praxis in Sindelfingen  
Oktober 1998: Famulatur in einer Allgemeinärztlichen Praxis in  
St.Wendel

**Praktisches Jahr:**

---

Mai-August 2000: Chirurgisches Tertian im „Krankenhaus Dritter Orden“ in  
München  
Schwerpunkte: Unfallchirurgie, Eingriffe im Bereich der  
Schilddrüse  
August-Dezember 2000: Tertian in der Inneren Medizin am Summerset Hospital der  
University of Cape Town, Kapstadt, Südafrika  
Schwerpunkt: Infektiologie  
Dezember-März 2001: Wahlfach Orthopädie im Klinikum Großhadern in  
München  
Schwerpunkte: Hüftgelenkendoprothetik

## 7.5 Danksagung

Mein größter Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. Meinrad Gawaz, für seine geduldige Einführung in das wissenschaftliche Arbeiten, seine freundliche Unterstützung während der ganzen Zeit, ohne die diese Arbeit nicht in dieser Art möglich gewesen wäre.

Herrn Professor Dr. Albert Schömig gilt mein aufrichtiger Dank für die freundliche Unterstützung dieser Arbeit.

Besonderen Dank gilt Frau Kirsten Langenbrink, die durch ihre engagierte und selbstlose Arbeit im Labor wesentlich zu Gelingen dieser Arbeit beitrug, sowie Winfried Taubitz dessen Kooperation und Zusammenarbeit bei der Verwirklichung der Arbeit wertvolle Hilfe geleistet hat.

Zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden bedanken, für die Motivation und die Unterstützung, die zur Vollendung dieser Arbeit notwendig waren.