

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

**Einfluss der kombinierten antithrombozytären Therapie auf die  
Plättchenfunktion bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit  
im Rahmen der Implantation koronarer Gefäßstützen**

Philipp Michael Thomas

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. A. Kastrati

Die Dissertation wurde am 23.01.2003 bei der Technischen Universität München  
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 28.05.2003 angenommen.

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung .....	1
1.1.1	Adhäsion und Aktivierung .....	2
1.1.2	Aggregation und Degranulation .....	4
1.2	Thrombozytäre Integrine .....	5
1.3	ADP-Rezeptoren.....	7
1.4	Plättchen-Endothelinteraktion .....	9
1.5	Antithrombozytäre Substanzen .....	12
1.5.1	Acetylsalicylsäure.....	13
1.5.2	Thienopyridine .....	14
1.5.3	GPIIb-IIIa-Antagonisten.....	15
1.5.4	Heparin .....	17
1.6	Therapie des akuten Koronarsyndroms .....	17
1.7	Zielsetzung .....	21
2	Patienten und Methodik.....	22
2.1	Klinischer Teil .....	22
2.1.1	Studienpopulation und Medikation .....	22
2.1.2	Probengewinnung .....	24
2.1.3	Probenweiterverarbeitung.....	25
2.1.4	Aggregometrische Messung .....	26
2.1.5	Bestimmung der plättchenabhängigen Thrombingeneration.....	28
2.1.6	Durchflusszytometrische Messung.....	30
2.1.7	Statistische Auswertung .....	36

2.2	Experimenteller Teil.....	36
2.2.1	Kultivierung und Gewinnung der ECV-304-Zellen.....	37
2.2.2	Zellstimulierung.....	37
2.2.3	Markierung der Zellen.....	38
2.2.4	Durchflusszytometrische Messung.....	39
2.2.5	MCP-1 Bestimmung.....	39
2.2.6	Statistische Auswertung.....	40
3	Ergebnisse.....	41
3.1	Klinische Teil.....	41
3.1.1	Patientencharakteristika.....	41
3.1.2	Plättchenaggregation.....	43
3.1.3	Plättchenabhängige Thrombingeneration.....	50
3.1.4	Degranulation.....	56
3.2	Experimenteller Teil.....	60
3.2.1	ICAM-1-Expression.....	60
3.2.2	uPAR-Expression.....	61
3.2.3	MCP-1 Freisetzung.....	61
4	Diskussion.....	63
4.1	Plättchenaggregation und -deaggregation.....	64
4.2	Steigung der Aggregationskurve.....	66
4.3	LIBS-1 und PAC-1.....	67
4.4	Degranulation.....	69
4.5	Plättchenabhängige Thrombingeneration.....	71

4.6	Plättcheninduzierte Endothelaktivierung.....	72
4.7	Direkter Vergleich Tirofiban/Abciximab .....	73
4.8	Therapeutische Aussichten.....	74
5	Zusammenfassung .....	76
6	Abkürzungsverzeichnis .....	77
7	Abbildungsverzeichnis .....	79
8	Tabellenverzeichnis.....	80
9	Literaturverzeichnis.....	81
10	Lebenslauf .....	105
11	Danksagung .....	106
12	Anhang .....	107

# 1 Einleitung

Der Herzinfarkt, die instabile Angina pectoris und der plötzliche Herztod sind die klinischen Krankheitsbilder des akuten Koronarsyndroms, welches in den westlichen Ländern die häufigste Todesursache darstellt (Topol 2002, Weissberg 2002).

In der Therapie des akuten Koronarsyndroms hat sich die interventionelle Koronarangioplastie mit Ballon-Dilatation und/oder Stentimplantation als Revaskularisationsmaßnahme gegenüber der Lyse etabliert (Zahn 2001, Schömig 2001/Dong 2002: STOP AMI I und STOP AMI II). Beide Verfahren sind der Lyse-Therapie überlegen (STOP AMI I und STOP AMI II).

Im Rahmen des akuten Koronarsyndroms kommt es zur Ruptur des atherosklerotischen Plaque mit Freilegung der subendothelialen Matrix (Schrör 2002). Durch Exposition von subendothelialen thrombogenen Substanzen (Collagen, von-Willebrand-Faktor, Vitronectin etc.) kommt es zur Adhäsion und Aktivierung zirkulierender Thrombozyten bis hin zur Ausbildung eines okklusiven Thrombus. Die Thrombozyten sind daher von zentraler Bedeutung in der Pathogenese des akuten Koronarsyndroms (Willerson 1989, Fuster 1992, Ross 1993, Davies 1997, Zaman 2000). Auch im Rahmen von Katheterinterventionen kommt es zu Fissuren im Bereich der atherosklerotischen Gefäßwand. Damit spielt die Thrombozytenfunktion auch für die Entwicklung peri- oder postinterventioneller koronarthrombotischer Ereignisse, wie dem subakuten Gefäßverschluss oder der Restenosierung, eine wichtige Rolle (Lincoff 1992), so dass eine geeignete antithrombotische Therapie die Ergebnisse der koronaren Angioplastie entscheidend verbessert.

Die therapeutisch eingesetzten Antithrombotika greifen an verschiedenen Wirkorten am Thrombozyten an. Während Acetylsalicylsäure (ASS) und Thienopyridine (z. B. Clopidogrel) durch Inhibierung der Zykllooxygenase bzw. durch Hemmung der ADP-abhängigen Aktivierung die intrazelluläre Signaltransduktion beeinflussen, wirken GPIIb-IIIa-Rezeptorantagonisten durch Blockierung des Fibrinogenrezeptors an der Oberfläche des Plättchens (Scarborough 1993, Cannon 1995, Collier 1995, Schrör 1995, Coukell 1997, Cannon 1999, Schrör 2002). Diese antithrombozytäre Therapie wird während der koronaren Intervention durch eine Antikoagulation mit unfraktioniertem Heparin ergänzt.

Unter Berücksichtigung der Vielzahl der möglichen Aktivierungswege des Thrombozyten kann durch einzelne antithrombozytäre Substanzen lediglich ein Teil der Plättchenfunktion beeinflusst werden (Becker 1993, Cannon 1995, Collier 1995, Schrör 1995, Coukell 1997). Nur durch die Kombination von antithrombozytären Substanzen (ASS, Clopidogrel und GPIIb-IIIa-Rezeptorantagonisten) ist eine effektive, synergistische und additive Thrombozyteninhibition zu erzielen (Herrman 1998).

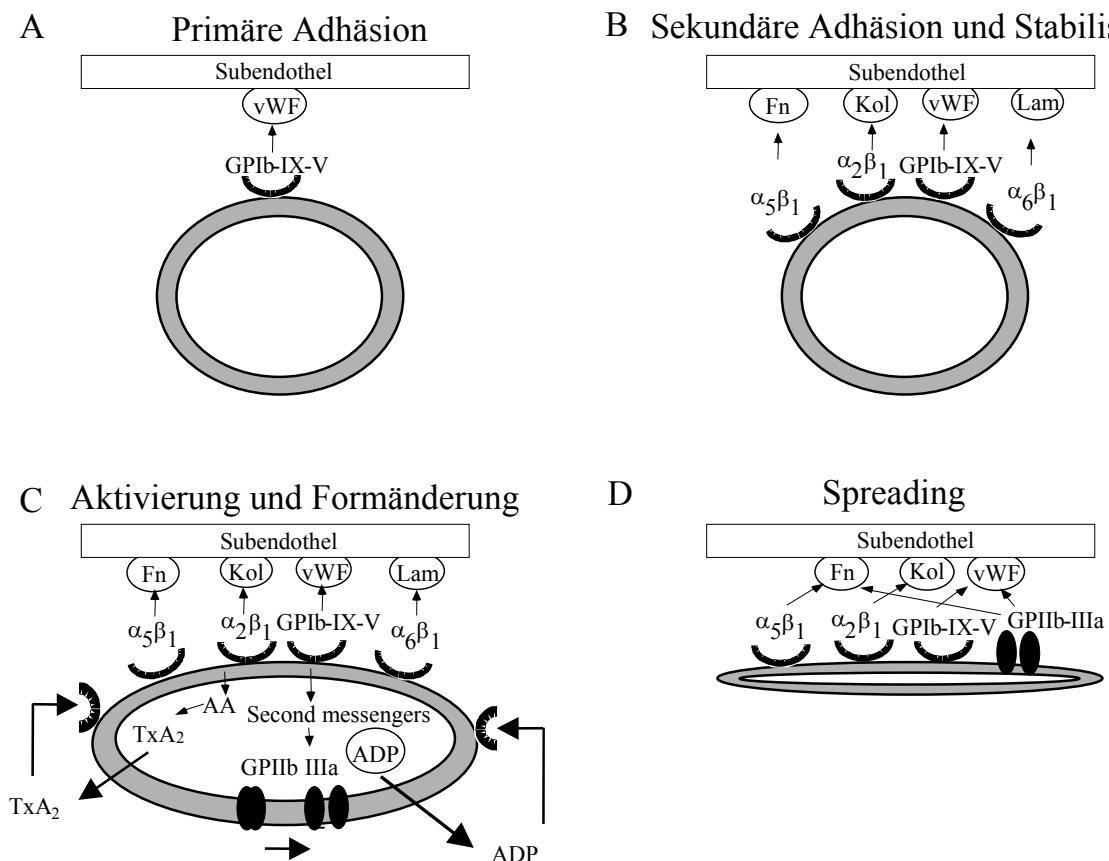
Trotz großer Fortschritte auf dem Gebiet der Thrombozytenforschung wurde der synergistische Effekt einer solchen Medikamentenkombination auf die Thrombozytenfunktion bisher noch nicht umfassend untersucht.

Im folgenden werden sowohl die Rolle des Thrombozyten bei der Pathogenese der arteriellen Thrombose als auch die Wirkweise der oben aufgeführten antithrombozytären Medikamente vorgestellt.

### **1.1.1 Adhäsion und Aktivierung**

Thrombozytenadhäsion und -aktivierung sind die Initialvorgänge der arteriellen Thrombusbildung (Bithell 1993, Andrews 1997) (siehe Abbildung 1).

Zunächst kommt es zur Bindung von GPIb-V-IX an den von-Willebrand-Faktor der Endothelzellen (Kefalides 1987, DeGroot 1990, Nurden 1994) (**A**). Dieser Kontakt löst eine weitere Aktivierung von Membranglykoproteinen aus und bewirkt in Folge die Stabilisierung der Bindung (Ruggeri 1994) (**B**). Es kommt zur Aktivierung und Formveränderung des Thrombozyten mit Aktivierung des GPIIb-IIIa-Rezeptors und mittels Freisetzung von granulären Inhaltsstoffen (Thromboxan  $A_2$ , ADP) aus thrombozytären Granula ( $\alpha$ -Granula, dichte Granula etc.) zur autokrinen Verstärkung der Aktivierung (**C**). Schließlich bildet der Thrombozyt Pseudopodien und spreizt sich über dem Subendothel aus (Sixma 1994) (**D**).



**Abb 1: Schematische Darstellung der Thrombozytenadhäsion und Aktivierung**

Zu Beginn erfolgt die Bindung von GP Ib-IX-V an den von-Willebrand-Faktor der Endothelzellen (A). Dieser Kontakt löst eine weitere Aktivierung von Membranglykoproteinen aus und bewirkt damit die Stabilisierung der Bindung (B). Es kommt zur Aktivierung und Formveränderung des Thrombozyten mit Aktivierung des GPIIb-IIIa-Rezeptors und der Freisetzung von Granulainhaltsstoffen (C). Schließlich kommt es zur Bildung von Pseudopodien und zum Spreading des Thrombozyten (D). Fn: Fibronectin; Kol: Kollagen; Lam: Laminin; vWF: von Willebrandt-Faktor; TxA<sub>2</sub>: Thromboxan A<sub>2</sub>; AA: Arachidonsäure (modifiziert nach Gawaz 2001).

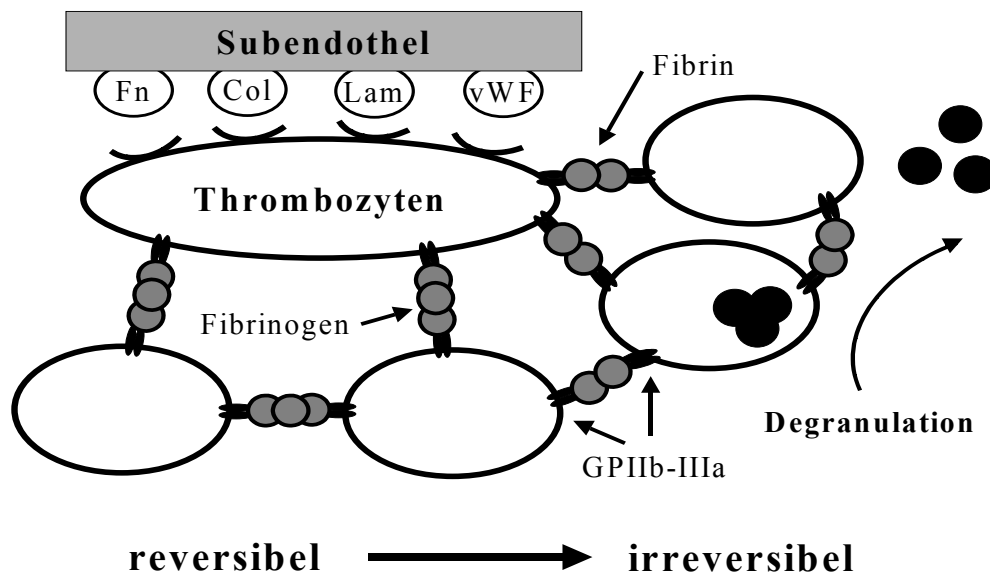
Die Thrombozytenaktivierung hat zwei Konsequenzen: Bildung von Thrombozytenaggregaten mit Sekretion vasokonstriktorischer und mitogener Inhaltsstoffe sowie Bereitstellung einer Matrix für den Prothrombinasekomplex auf der Oberfläche aktivierter Thrombozyten mit nachfolgender Thrombinbildung (plättchenabhängige Thrombinbildung) (Sims 1989).

## 1.1.2 Aggregation und Degranulation

Die Aggregation ist die Koadhäsion zwischen zwei Thrombozyten. Der bedeutendste Rezeptor für diesen Vorgang ist der Fibrinogen-Rezeptor GPIIb-IIIa.

Es wird die primäre von der sekundären Aggregation unterschieden. Während der primären Phase kommt es durch Stimulierung des Thrombozyten (z. B. durch ADP, Thrombin, Adrenalin) es zu einer Konformationsänderung des GPIIb-IIIa-Rezeptors (Ruggeri 1994). Dies ermöglicht die Bindung von löslichem Fibrinogen an GPIIb-IIIa und die Bildung von Plättchenaggregaten über Fibrinogenbrücken (Gawaz 1991).

Die irreversible, sekundäre Aggregation, tritt mit kurzer Latenz nach der primären auf und geht mit der Sekretion der thrombozytären Botenstoffe der  $\alpha$ -Granula (z. B. P-Selektin, CD 40 Ligand) und elektronenoptisch dichten Granula (ATP, Serotonin etc.) in das umgebende Milieu einher (Gawaz 2001, Kulkarni 2001) (siehe Abbildung 2).



**Abb 2: Aggregation und Degranulation**

Die Stimulierung des Thrombozyten bewirkt eine Konformationsänderung des GPIIb-IIIa. Diese ermöglicht die Bindung von löslichem Fibrinogen an den GPIIb-IIIa und die Bildung von Plättchenaggregaten über „Fibrinogenbrücken“ (primäre Aggregation; reversibel). Im weiteren Verlauf wird die Fibrinogenbindung an der Thrombozytenoberfläche verfestigt, und die Granulainhaltsstoffe werden sezerniert (irreversible Phase). Fn: Fibronectin; Col: Kollagen; Lam: Laminin; vWF: von-Willebrand-Faktor (nach Gawaz 2001)



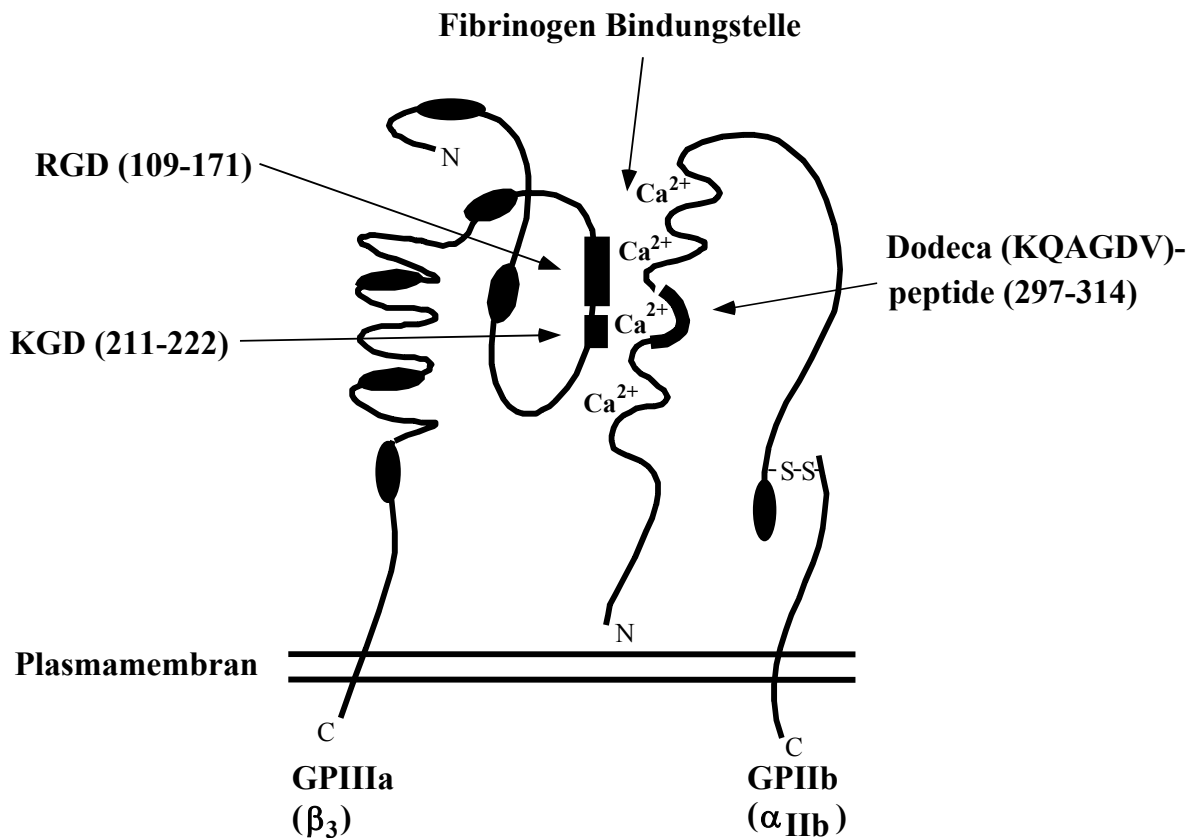
Die Adhäsion und die Aggregation lösen intrazelluläre Signalwirkungen aus, welche zahlreiche Reaktionen zur Folge haben, wie z. B. die Bildung und Sekretion von Thromboxan A<sub>2</sub> (TX A<sub>2</sub>), Serotonin und ADP. Diese Substanzen bewirken wiederum die Aktivierung von weiteren Blutplättchen, eine Verengung der Blutgefäße und eine Verlangsamung des Blutflusses. Dadurch steigt sowohl die Interaktion zwischen den Blutplättchen untereinander als auch zwischen den Plättchen und der Gefäßwand (Siess 1989, Willerson 1989, Sixma 1994).

## 1.2 Thrombozytäre Integrine

Thrombozytäre Adhäsionsmoleküle, und hierbei insbesondere thrombozytäre Integrine, spielen eine zentrale Rolle für das Anhaften von Thrombozyten an der atherosklerotischen Plaque.

Diese Integrine sind Transmembranrezeptoren, welche das Zytoskelett der Zelle mit dem Extrazellulärraum verbinden. Das bedeutendste dieser Membranglykoproteine ist der Fibrinogenrezeptor GPIIb-IIIa (siehe Abbildung 3). Hierbei handelt es sich um ein heterodimeres Glycoprotein mit je einer nicht-kovalent verbundenen  $\alpha$ - (GPIIb) und  $\beta$ -Untereinheit (GPIIIa) (Plow 1992). Es befinden sich zwischen 60.000 und 100.000 Kopien dieses Rezeptors auf einem Blutplättchen (Ginsberg 1995). 70 % des GPIIb-IIIa sind im Ruhezustand auf der Plättchenoberfläche exprimiert, die restlichen 30 % befinden sich im „surface connecting system“ (SCS) und in den intrazellulären  $\alpha$ -Granula (Nurden 1994, Morgenstern 1997). Bei Aktivierung der Blutplättchen gelangen die Rezeptoren, welche sich in den internen Speichern befinden, an die Zelloberfläche (Woods 1986). Bestimmte Aminosäuresequenzen, wie Arginin-Glycin-Aspartat (RGD) oder Dodeca (KQAGDV), die z. B. Bestandteil des Fibrinogenmoleküls sind, binden an spezifische Regionen des GPIIb-IIIa-Komplexes. RGD und KQAGDV enthaltende Peptide konkurrieren dabei mit Fibrinogen um eine gemeinsame Bindungsstelle (Plow 1992, Lefkowitz 1995).

Angeborene Defekte des GPIIb-IIIa, wie bei der Thrombasthenie Glanzmann (Morbus Glanzmann), führen zu einer fehlerhaften Plättchenaggregation und zu einer verlängerten Blutungszeit (Nurden 1994).



**Abb 3: Struktur des GP IIb-IIIa**

*Der GPIIb-IIIa-Rezeptor besteht aus einer  $\alpha$ -Untereinheit (GPIIb) und einer  $\beta$ -Untereinheit (GPIIIa) (modifiziert nach Gawaz 2001).*

Nach Zellaktivierung kommt es zur Aktivierung des Fibrinogenrezeptors, d. h. zur Heterodimerbildung, und somit zum Übergang in einen hochaffinen Zustand (Shattil 1995). In diesem hochaffinen Zustand kann gelöstes Fibrinogen gebunden, und in der Folge eine Plättchen-Plättchen-Interaktion durch Fibrinogenbrücken induziert werden (Du 1997). Deswegen stellt der GPIIb-IIIa-Rezeptor einen dominierenden Angriffspunkt der anti-thrombozytären Therapie speziell für die Patientenbehandlung während eines interventionellen Eingriffes am Herzkranzgefäß dar (Coller 1997).

Ein weiteres Membranglykoprotein der Thrombozyten ist das Leucin-reiche Glykoprotein Ib/IX/V, das als thrombozytärer Rezeptor für von-Willebrand-Faktor fungiert und eine zentrale Rolle in der primären Hämostase spielt (Clemetson 1997). Ein angeborener Defekt des GP Ib/IX/V im Bernard-Soulier-Syndrom führt zu einem funktionellen Defekt der Plättchenadhäsion und zu einer erhöhten Blutungsneigung (Nurden 1999).

P-Selektin (CD62P) ist ein Membranglykoprotein, das in den  $\alpha$ -Granula der Blutplättchen und in den Weibel-Palade-Körperchen der Endothelzellen lokalisiert ist. Durch Aktivierung der Blutplättchen kommt es zu einer Verschmelzung der  $\alpha$ -Granula mit dem „surface connected system“ und zur Expression von P-Selektin auf der Thrombozytenoberfläche. P-Selektin fungiert somit als Degranulationsmarker (Nurden 1994).

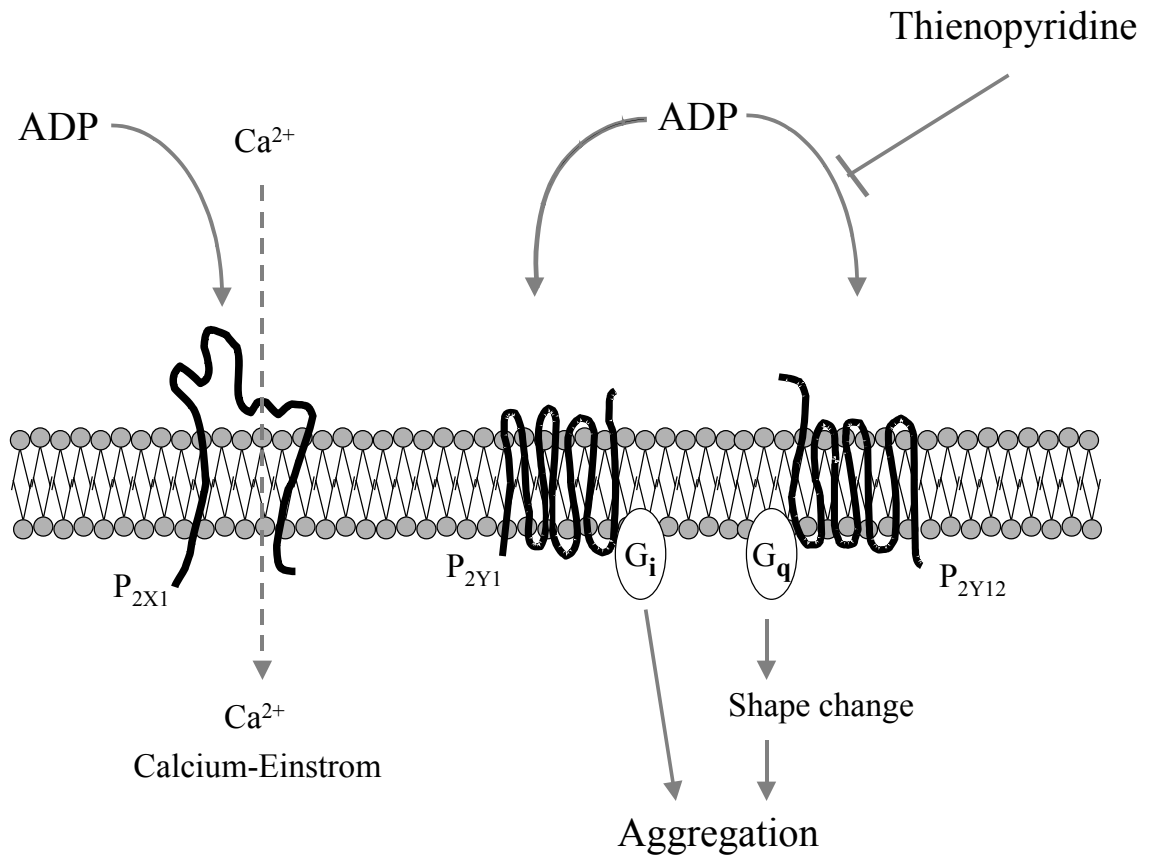
### 1.3 ADP-Rezeptoren

Die Thrombozytenoberfläche weist eine Reihe von ADP-Bindungsstellen auf, von denen bisher im wesentlichen drei purinerge Rezeptoren, P2X<sub>1</sub>, P2Y<sub>1</sub> und P2Y<sub>12</sub> näher charakterisiert wurden (Kunapuli 1998).

Der ionotrope Purinorezeptor P2X<sub>1</sub> steuert den ADP-induzierten Calcium-Einstrom und den „Shape-change“ der Plättchen (siehe Abbildung 4). Dieser Aktivierungsvorgang wird anscheinend von den Substanzen der Thienopyridin-Klasse nicht beeinflusst. Dies könnte eine Ursache dafür sein, dass trotz Behandlung mit Ticlopidin oder Clopidogrel ein intrazellulärer Calciumanstieg sowie eine Formveränderung der Plättchen nicht zu verhindern sind (Gachet 1997).

Der zweite purinerge Rezeptor, P2Y<sub>1</sub>, besitzt sieben transmembranöse Domänen und ist an inhibitorische G-Proteine gekoppelt. P2Y<sub>1</sub> vermittelt durch die Freisetzung von Inositoltriphosphat (IP<sub>3</sub>) als „second-messenger“ die ADP-induzierte Ausschüttung von intrazellulärem Calcium, die Aktivierung des GPIIb-IIIa-Rezeptors und nachfolgend die Plättchenaggregation (Nicholas 1996). Jedoch ist die alleinige Aktivierung von P2Y<sub>1</sub>-Rezeptoren nicht ausreichend für eine vollständige ADP-induzierte Thrombozytenaggregation, welche eine Koaktivierung der beiden Rezeptoren P2Y<sub>1</sub> und P2Y<sub>12</sub> erfordert (Gachet 2001).

Dieser dritte Subtyp (P2Y<sub>12</sub>) wurde kürzlich mit Hilfe eines genetischen Defektes bei einem Patienten mit Blutungsstörung geklont. Ähnlich wie P2Y<sub>1</sub> vermittelt auch dieser Rezeptor die ADP-induzierte Freisetzung von intrazellulär gespeichertem Calcium, wenngleich über einen unterschiedlichen Signaltransduktionsweg (Inhibierung der Adenylatcyclase). Versuche mit radioaktiv-markiertem ADP lassen es sehr wahrscheinlich erscheinen, dass dieser Rezeptor der Hauptangriffspunkt der Thienopyridine ist (Hollopeter 2001, Remijn 2002).



#### Abb 4: ADP-Rezeptoren

ADP führt durch Bindung an den P<sub>2X1</sub>-Rezeptor mittels Calciumeinstrom direkt und über die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren P<sub>2Y1</sub> und P<sub>2Y12</sub> mittels Freisetzung von intrazellulärem Calcium indirekt, zu einer Erhöhung der intrazellulären Konzentration an Calciumionen und damit zur Formveränderung und Aggregation des Thrombozyten. Die ADP-Wirkung am P<sub>2Y12</sub> wird durch Thienopyridine blockiert. G<sub>i</sub>, G<sub>q</sub>: unterschiedliche Klassen, der in der Zellmembran verankerten plättchenaktivierenden G-Proteine (nach Gawaz 2001).

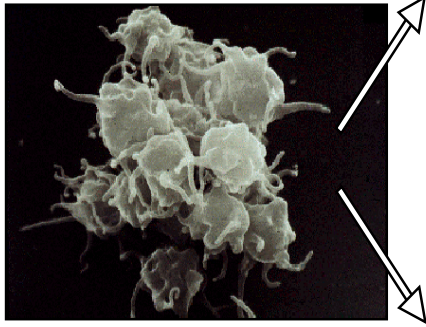
## 1.4 Plättchen-induzierte Inflammation des Endothels

In jüngster Zeit wurde gezeigt, dass aktivierte Thrombozyten entscheidend die chemotaktischen und adhäsiven Eigenschaften von Endothelzellen verändern können (Gawaz 1998, Henn 1998, Gawaz 2000, Schrör 2002). Mittels Freisetzung von potenten zytokinähnlichen Substanzen (Interleukin-1 $\beta$ , CD40-Ligand, RANTES etc) (siehe Abb. 5) durch das aktivierte Plättchen wird im Endothel und in glatten Muskelzellen die Sekretion chemotaktischer Substanzen wie „monocyte chemoattractant protein-1“ (MCP-1) und die Oberflächen-expression des „intercellular adhesion molecule-1“ (ICAM-1) und „urokinasetype Plasminogen Activating Receptor“ (uPAR) induziert (Henn 1998, Gawaz 2000, Dickfeld 2001).

Das Chemokin MCP-1 induziert die Chemotaxis von Monozyten bereits bei subnanomolaren Konzentrationen und spielt eine zentrale Rolle bei der Einwanderung von Leukozyten in atherosklerotische Gefäßverletzungen (Gimbrone 1986; Pober 1990; Valente 1992; Ueda 1994). Auch ICAM-1, das zu der Immunglobulinfamilie der Adhäsionsmoleküle gehört, wird aktivierungsabhängig von endothelialen Zellen exprimiert und begünstigt als Hauptadhäsions-Rezeptor die Anlagerung der „angelockten“ Monozyten an die Endothel-oberfläche (Makgoba 1988, Staunton 1988, Wertheimer 1992, Lawrence 1991, Heyward 1995).

UPAR ist ein multifunktionales Protein, das eine große Anzahl von Signaltransduktionswegen beeinflusst, die letztendlich die Regulation von Zellmigration und –proliferation steuern (Blasi 1993). Interessant hierbei ist, dass uPAR keine eigene intrazytoplasmatische Domäne besitzt, sondern über einen Glykolipidanker mit der Zellmembran verbunden ist. UPAR scheint assoziierte, transmembranöse Glykoproteine wie z. B. Mitglieder der Integrinfamilie zur Signaltransduktion zu nutzen (Preissner 2000). Rezeptor-gebundener uPA (urokinase-type plasminogen activator) aktiviert Plasminogen zu Plasmin und spielt somit eine essentielle Rolle für die Fibrinolyse.

Entscheidend an der thrombozytengesteuerten endothelialen Bildung von MCP-1 und der Oberflächenexpression von ICAM-1 und uPAR ist der Transkriptionsfaktor Nuklear-Faktor- $\kappa$ B, der die zentrale Schaltzelle entzündlicher Veränderungen in Gefäßwandzellen darstellt (Brand 1996). Aktivierte Blutplättchen stimulieren das NF- $\kappa$ B-System und induzieren die Transkription NF- $\kappa$ B-regulierter Genprodukte (Koshelnick 1997, Gawaz 1998) (siehe Abbildung 6).

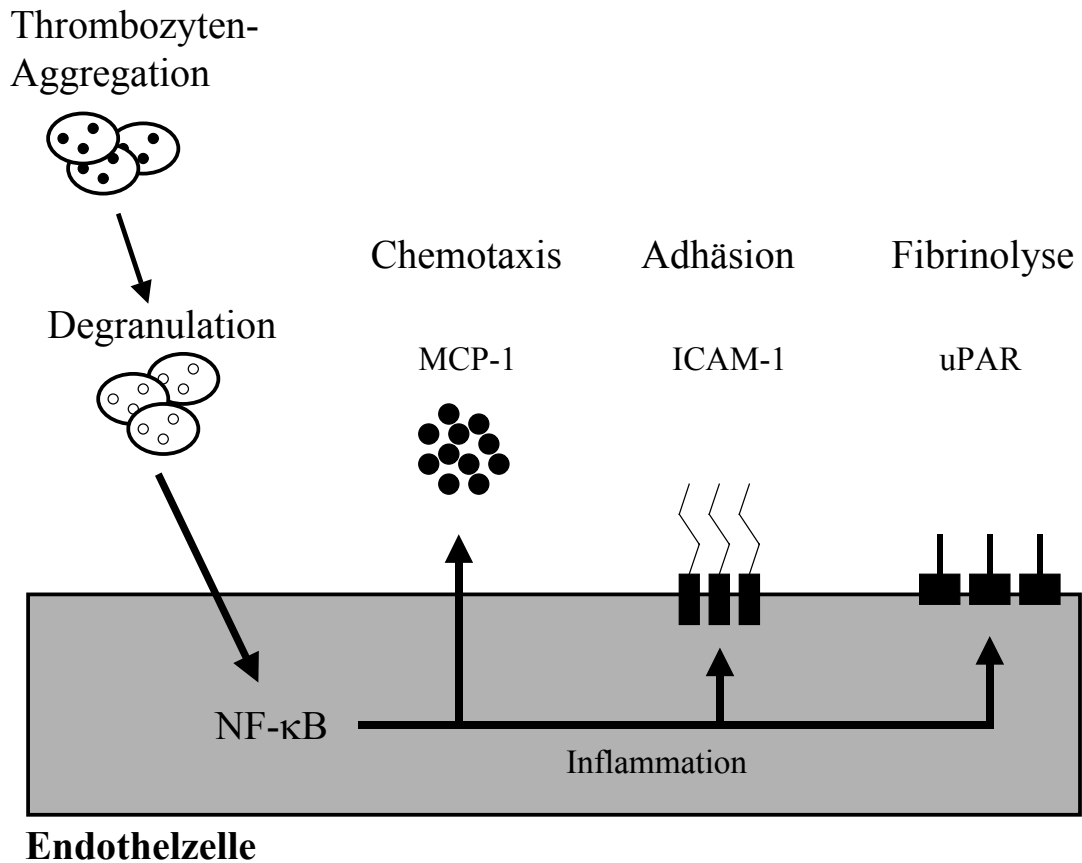


- Cyto-/Chemokine

- Interleukin-1 $\beta$
- $\beta$ -Thromboglobulin
- Platelet factor 4
- CD 40-L
- RANTES

**Abb 5: Aktivierungsabhängige Freisetzung thrombozytärer Zytokine**

*Nach Aktivierung der Thrombozyten kommt es zur Freisetzung von Cyto-/Chemokinen aus den thrombozytären Granula und konsekutiv zu einer Inflammation des Endothels (siehe Abbildung 6) (modifiziert nach Massberg 2002).*

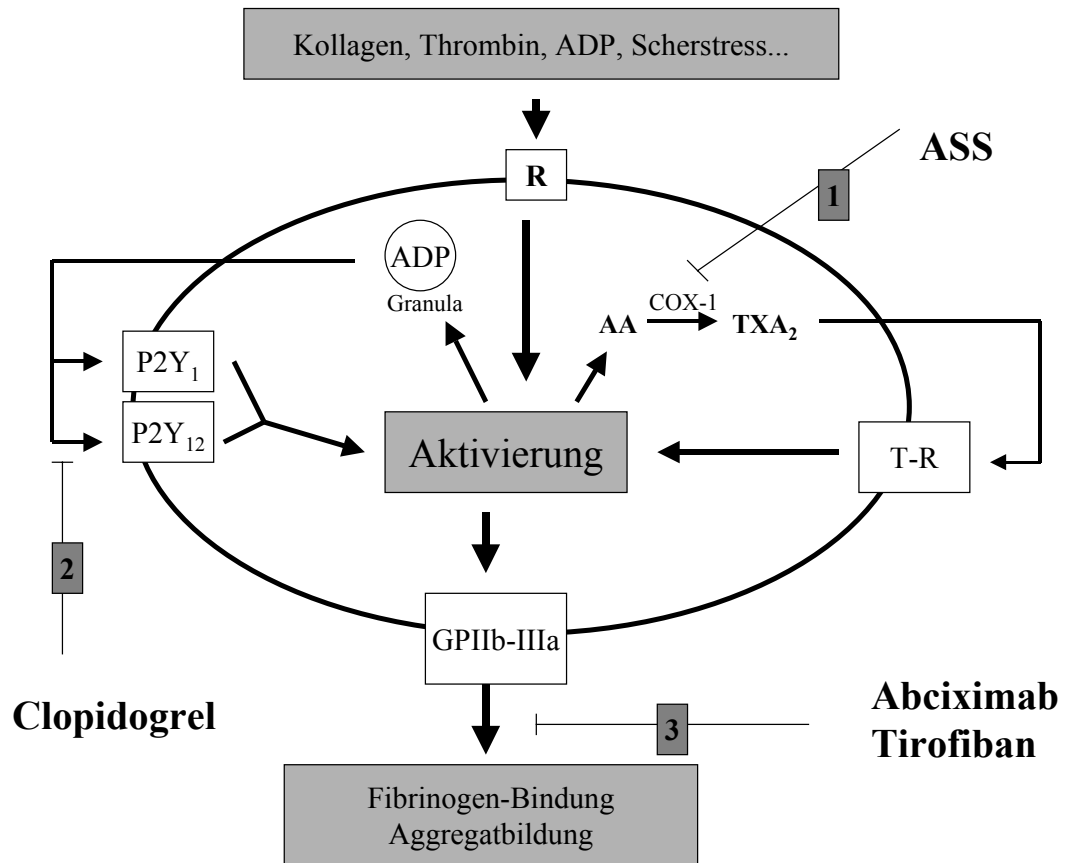


**Abb 6: Plättchen-Endothelinteraktion**

Plättchen interagieren mit Endothelzellen, werden dabei aktiviert und degranulieren. Durch die Freisetzung potenter proinflammatorischer Mediatoren aus den thrombozytären Granula (Abb. 5) werden Endothelzellen aktiviert und exprimieren/sezernieren Chemokine und Adhäsionsmoleküle. MCP-1: monocyte chemoattractant protein-1, ICAM-1: intercellular adhesion molecule-1, uPAR: urokinasetype Plasminogen Activating Receptor, NF-κB: Nuclear-Factor-κB (modifiziert nach Gawaz 2001).

## 1.5 Antithrombozytäre Substanzen

In Abbildung 7 sind die verschiedenen Wirkorte der bei der Therapie des akuten Koronarsyndroms verwendeten antithrombozytären Substanzen dargestellt.



**Abb 7: Wirkorte von Antithrombotika**

(1) ASS hemmt die Bildung von Thromboxan (TX A<sub>2</sub>) und dessen Wirkung auf den Thromboxanrezeptor (T-R). (2) Thienopyridine blockieren den P2Y<sub>12</sub>-ADP-Rezeptor und hemmen darüber ADP-induzierte Aktivierungsmechanismen. Beide Substanzklassen wirken damit intrathrombozytär inhibitorisch auf die Signaltransduktion. (3) Dagegen ist der Wirkort von GPIIb-IIIa-Blockern extrathrombozytär. R: spezifische Plättchenrezeptoren für die chemischen Agonisten und physikalische Einwirkung wie Scherstress; AA: Arachidonsäure (modifiziert nach Schrör 2002).

Zwar ist der Synergismus dieser drei unterschiedlich am Plättchen angreifenden Medikamente bisher hinsichtlich des klinischen Outcomes untersucht worden, eine detaillierte Untersuchung der Effekte dieser kombinierten Therapie auf die Funktion der Thrombozyten ist jedoch bislang nicht erfolgt.



### 1.5.1 Acetylsalicylsäure

ASS hemmt selektiv und irreversibel die Zykllooxygenase-1 (PGH-Synthetase), ein ubiquitär im Organismus vorkommendes Enzym, das die Biosynthese von Prostaglandinen und anderer Eikosanoide katalysiert und in den beiden Isoenzymformen Zykllooxygenase-1 (COX-1) und Zykllooxygenase-2 (COX-2) vorkommt (Patrono 1994). COX-1 ist die konstitutive Form des Enzyms, das unter anderem die Synthese von Prostazyklin katalysiert, welches nach Bildung und Freisetzung durch das Gefäßendothel antithrombogene und bei Freisetzung durch die Magenschleimhaut eine zytoprotektive Wirkung entfaltet. Im Blutplättchen wird durch COX-1 das prothrombogene Thromboxan gebildet. COX-2, eine in Leukozyten enthaltene und durch Mitogene induzierbare Form, ist vorwiegend für die Synthese von Prostaglandinen verantwortlich, die an Entzündungs- und Schmerzprozessen beteiligt sind (Cohen 1976, Wu 2002).

Im Blutplättchen entsteht aus den Prostaglandin-Endoperoxiden hauptsächlich Thromboxan  $A_2$ , das vasokonstriktorisch wirkt und die Aggregation der Thrombozyten fördert. In den Zellen des Gefäßendothels hingegen wird hauptsächlich Prostazyklin  $PGI_2$  gebildet. Prostazyklin  $PGI_2$  hemmt im Gegensatz zu Thromboxan  $A_2$  die Plättchenaggregation und erweitert die Gefäße (Schrör 1993). ASS hemmt sowohl die Thromboxansynthese in den Blutplättchen als auch die Prostazyklinsynthese in den Endothelzellen („Aspirin-Dilemma“). Im Gegensatz zu Thrombozyten sind die kernhaltigen Endothelzellen jedoch in der Lage, die durch Einwirkung von ASS funktionsuntüchtig gewordene Zykllooxygenase neu zu synthetisieren. Der inhibitorische Effekt von ASS auf die Endothelzellen ist somit schwächer und kürzer, insbesondere bei Gabe von ASS in niedrigen Dosierungen (Schrör 1997).

ASS wird nach oraler Gabe rasch und vollständig absorbiert; die Absorptionszeit beträgt 5-16 Minuten. Nach oraler Gabe gelangt der größte Teil der ASS (> 80 %) unverändert in den Dünndarm und nach Passage durch die Darmwand über das Pfortaderblut in die Leber.

Nach Einnahme von 100 bzw. 300 mg ASS stellen sich maximale ASS-Plasmaspiegel nach ca. 30 Minuten ein. Die Halbwertszeit von ASS wurde im Blut mit 15-20 Minuten bestimmt, die Bindung an die Thrombozyten ist jedoch irreversibel, so dass die Wirkung ca. sieben Tage anhält (Hardman 2001).

Mit steigender Tagesdosis nimmt die Komplikationsrate in Form von gastrointestinalen Nebenwirkungen deutlich zu. Aus diesem Grunde empfiehlt die American Heart Association den Einsatz von Tagesdosen im Bereich von 75-325 mg (Motz 1994, Hennekens 1997). Das Risiko, eine schwerwiegende intrazerebrale Blutung unter ASS-Dauertherapie zu erleiden, liegt bei unter 0,5 % pro Jahr (Schrör 1997).

### **1.5.2 Thienopyridine**

Nach ihrer Umwandlung in der Leber zu einem aktiven Metaboliten inhibieren Thienopyridine die ADP-induzierte Thrombozytenaktivierung, indem sie selektiv und irreversibel die Antwort am P2Y<sub>12</sub>-Rezeptor verhindern (Herbert 1993, Savi 1994, Schrör 2000). Über Beeinflussung dieses ADP-Rezeptors bewirken Thienopyridine eine Hemmung der ADP-induzierten Senkung des thrombozytären cAMP-Spiegels und somit der intrazellulären Calciumfreisetzung und ADP-induzierten Sekretion der  $\alpha$ -Granula (Harker 1993, Nurden 1995).

Die Inhibierung dieser intrazellulären Signalkaskade bewirkt auch eine Blockierung der Plättchenadhäsion an das Subendothel. Des weiteren reduzieren Thienopyridin-Präparate (Ticlopidin und Clopidogrel) die Scherkraft-induzierte Plättchenaggregation und –sekretion (Jarvis 2000).

Thienopyridine wirken synergistisch zu ASS. Dementsprechend ist eine kombinierte Therapie mit ASS und Thienopyridinen effektiver in der Hemmung der Thrombozytenaktivierung und –aggregation als das jeweilige Pharmakon alleine (Herrman 1998).

Die heute bevorzugt eingesetzte Substanz in der Gruppe der Thienopyridine ist das Clopidogrel. Die Vorteile von Clopidogrel gegenüber Ticlopidin sind ein schnellerer Wirkungseintritt sowie eine Reduktion der Rate an Nebenwirkungen wie Blutungen, Diarrhoe und der thrombotisch-thrombozytopenischen Purpura (Bennett 1999, Mishkel 1999, Bennett 2000, Michel 2000, Müller 2000, Gawaz 2001, Müller 2001, Pache 2002).

Bei der sekundären Prävention ischämischer Ereignisse konnte die Wirksamkeit von Clopidogrel – im Vergleich zu dem bisherigen „Goldstandard“ ASS –bewiesen werden. Das CAPRIE Steering Committee konnte sogar in der Prävention des kombinierten Risikos ischämischer Ereignisse (Myokardinfarkt, Schlaganfall, peripherer Gefäßverschluss) eine Überlegenheit gegenüber ASS demonstrieren (The CAPRIE Steering Committee 1996).

### 1.5.3 GPIIb-IIIa-Antagonisten

Im Gegensatz zu den Plättchenfunktionshemmern ASS und Clopidogrel, welche die intrathrombozytären Signalkaskaden hemmen, blockieren die Antiintegrine wie z. B. Abciximab und Tirofiban direkt die Fibrinogenbindung am aktivierten GPIIb-IIIa-Komplex und somit die letzte gemeinsame Endstrecke aller Reaktionswege, die zur Thrombozytenaggregation führt (Gawaz 1999, Schrör 2000). Damit bewerkstelligen sie bei lebensbedrohenden intravasalen Plättchenaktivierungen, wie dem akuten Koronarsyndrom, die wirkungsstärkste Inhibition der Plättchenaggregation (Faulds 1994).

Es besteht ein enges therapeutisches Fenster, um eine optimale Hemmung der Plättchenaggregation zu erzielen. So müssen ständig über 80 % der Gesamtrezeptorzahl blockiert werden, da sonst keine zuverlässige antithrombozytäre Wirksamkeit gegeben ist (Steinhubl 2000). Höhere Rezeptorblockierungen über 90 % hingegen erhöhen das Blutungsrisiko. Die Hemmung der Plättchenaggregation durch niedermolekulare Fibrinogenrezeptorantagonisten korreliert mit dem Grad der GPIIb-IIIa-Rezeptorblockade in einer steilen Dosis-Wirkungs-Beziehung, welche die Dosierung der Fibrinogenrezeptorantagonisten erschwert (Coller 1998, Cox 1998). Bei den meisten GPIIb-IIIa-Antagonisten führen kleine Veränderungen der Bioverfügbarkeit des Inhibitors zu großen Variationen der Aggregation (Coller 1998).

Neben ihrer antithrombozytären Wirkung besitzen GPIIb-IIIa-Antagonisten eine sogenannte intrinsische Aktivität. So führt die Bindung der GPIIb-IIIa-Rezeptorantagonisten zu einer Konformationsänderung des Ziel-Rezeptors. Nach Abdissoziation vom Rezeptor kommt es konsekutiv zu einer Expression von Liganden-induzierten Bindungsstellen (LIBS) mit thrombozyten-aktivierender Wirkung (Du 1991, Honda 1998). Dieser Effekt wurde sowohl für Abciximab als auch für Tirofiban in vitro nachgewiesen (Peter 1998).

Während das Wirkprinzip der untersuchten GPIIb-IIIa-Antagonisten identisch ist, unterscheiden sich die strukturellen, pharmakologischen Eigenschaften und die Spezifität von Abciximab und Tirofiban erheblich (Coller 1995, Mousa 1996, Madan 1998).

Abciximab ist ein chimäres Derivat des monoklonalen Antikörpers 7E3, welcher gegen den GPIIb-IIIa-Komplex gerichtet ist (Topol 1996). Das Fc-Fragment wurde vom kompletten Antikörper abgespalten, so dass Abciximab nur den Fab-Anteil aufweist. Zusätzlich wurde der größte Teil des unspezifischen murinen Fab-Anteils durch einen menschlichen Fab-Anteil ersetzt (Coller 1983).

Abciximab kreuzreagiert mit anderen Adhäsionsmolekülen der Integrinfamilie, dem Vitronektinrezeptor ( $\alpha_v\beta_3$ ) auf Endothel- und glatten Muskelzellen und dem Mac-1-Rezeptor auf Leukozyten (Tam 1998, Collier 1999). Abciximab ist ein nicht-kompetitiver Blocker des Glykoprotein I<sub>b</sub>-III<sub>a</sub> (Faulds 1994). Nach Infusion persistiert thrombozytengebundenes Abciximab für mehrere Tage und erreicht so eine allmählich abklingende Hemmung der Thrombozytenaggregation, die über mindestens 4 Tage wirksam ist (Gawaz 1998, Neumann 2001).

Der zweite untersuchte GPIIb-IIIa-Rezeptorantagonist, Tirofiban, ist ein nicht-peptidisches Molekül, welches die geometrischen, stereotaktischen und Oberflächenladungseigenschaften der RGD-Sequenz imitiert und dadurch die Fibrinogenbindung hemmt (Collier 1995, Mousa 1996). Tirofiban ist ein kompetitiver Inhibitor der Ligandbindung an GPIIb-IIIa mit kurzer Plasmahalbwertszeit und Wirkdauer, so dass es als Dauerinfusion appliziert werden muss, um eine kontinuierliche Hemmung der Thrombozytenaggregation zu erzielen (Deckelbaum 1997, Kleiman 1998).

Wie aus großen klinischen Studien unter Einschluss von über 20 000 Patienten hervorgeht, ist die Therapie mit GPIIb-IIIa-Antagonisten bei heutiger Dosierung im allgemeinen gut verträglich und sicher. Die Hauptnebenwirkung der GPIIb-IIIa-Antagonisten - besonders in Kombination mit weiteren Antithrombotika - besteht im Auftreten von Thrombozytopenien und – auch speziell im Rahmen letzterer - unerwünschten Blutungen (Kleiman 1999, Nurden 1999, Tcheng 2000, Kondo 2002). Speziell bei Patienten, bei denen unter laufender GPIIb-IIIa-Therapie eine koronare Intervention oder Bypass-Operation notwendig ist, muss mit erhöhten Blutungskomplikationen insbesondere bei gleichzeitiger Thrombozytopenie gerechnet werden (Berkowitz 1997, Giugliano 1998, Blankenship 1999). Weitere beobachtete Nebenwirkungen wie Hypotension, Schwindel, Erbrechen und Kopfschmerzen treten mit einer Inzidenz von 5-15 % der behandelten Fälle ähnlich häufig auf, wie bei Placebo behandelten Patienten (Tcheng 1994).

#### **1.5.4 Heparin**

Heparin ist ein Glykosaminoglycan, bestehend aus einer heterogenen Mischung von unterschiedlich langen Molekülketten. Trotz bereits jahrzehntelanger Anwendung wurde der Mechanismus der antikoagulatorischen Wirkung von Heparin erst 1973 aufgeklärt (Rosenberg 1973). Heparin erhöht etwa 1000fach die Affinität des Plasmaproteins Antithrombin (AT) für die Bindung von Thrombin (Faktor IIa), Faktor Xa und Faktor IXa. Dadurch wird die prokoagulatorische Aktivität dieser Gerinnungsfaktoren herabgesetzt. Heparin ist daher kein direkter, sondern ein indirekter Inhibitor der Blutgerinnung (Lam 1976).

Die Metaanalyse der wichtigsten Studien zur Heparin-gabe bei instabiler Angina pectoris ergibt für die Kombination von Heparin und ASS im Vergleich zur ASS-Monotherapie eine relative Reduktion des Risikos von Tod und Myokardinfarkt von 32 % (White 1998). Intravenös appliziert kommt es zu einem schnellen Eintritt der Wirkung (ca. 30 Sekunden), welche dosisabhängig 2-4 Stunden anhält (Armstrong 1997).

Nachteile des unfraktionierten Heparins sind der variable antithrombotische Effekt aufgrund starker Plasmaproteinbindung, die fehlende Hemmung von thrombusgebundenem Thrombin, die heparininduzierte Thrombozytenaktivierung, die Hemmbarkeit durch Plättchenfaktor 4, sowie als häufigste Nebenwirkung Blutungen bei Überdosierung, allergische Reaktionen und Thrombozytopenien (Küttler 1996).

#### **1.6 Therapie des akuten Koronarsyndroms**

ASS hat seine antithrombotische Wirksamkeit bei der Primärprophylaxe und Therapie kardiovaskulärer Erkrankungen in einer Vielzahl klinischer Studien unter Einschluss von insgesamt mehr als 30 000 Patienten unter Beweis gestellt („British Doctor’s Trial“: Peto 1988, „Montreal Heart Study“: Theroux 1988, Steering Committee of the Physician’s Health Study 1989, The RISC-Group 1990, Antiplatelet Trialists Collaboration 1994). Die Ergebnisse zeigen, dass die frühzeitige Gabe von ASS die Letalität und Reinfarkthäufigkeit bei akutem Koronarsyndrom signifikant vermindert.

Zur Revaskularisation stenosierter und okkludierter Gefäße hat sich zunehmend die der Lyse-Therapie bezüglich Nebenwirkungen und Therapieerfolg überlegene koronare Intervention (PTCA und Stent-Implantation) durchgesetzt (Topol 1998).

Schömig et al konnten mittels serieller szintigraphischer Untersuchungen bei Patienten mit Myokardinfarkt ein höheres Überleben von Myokard nach Intervention gegenüber Lyse nachweisen ( $p = 0,02$ ), auch das kumulative Ereignis von Tod, Reinfarkt oder Schlaganfall nach sechs Monaten war in der Stentgruppe niedriger als in der Alteplasegruppe ( $p = 0,02$ ; „STOP-AMI I Studie“: Schömig 2000).

Jedoch limitiert die durch den Eingriff bedingte gesteigerte Aktivierung von Blutplättchen den Erfolg von koronaren Interventionen, indem sie bedeutsam zu dem Auftreten thrombembolischer Komplikationen beiträgt (Lincoff 1992, Neumann 1996). Da die bisherige Therapie – bestehend aus ASS und Heparin - die Inzidenz der sich häufig entwickelnden Stent-Thrombosen nur inadäquat senken konnte, war eine verstärkte Inhibition der Plättchenaggregation notwendig (Lincoff 1992, Le Breton 1996, White 1998).

Durch die Entwicklung potenter Aggregationshemmer in Form der Thienopyridine konnte die periinterventionelle antithrombozytäre Therapie akuter Koronarsyndrome entscheidend verbessert werden. Jüngste Studien belegen, dass der synergistische Einsatz von ASS und Ticlopidin der ASS-Monotherapie und Antikoagulation in der Reduktion der post-interventionellen ischämischen Komplikationen nach Implantation koronarer Gefäßstützen deutlich überlegen ist („ISAR-Studie“: Schömig 1996, „FANTASTIC Studie“: Bertrand 1998, „STARS-Studie“: Leon 1998, „MATTIS-Studie“: Urban 1998). Auch haben die Ergebnisse der internationalen Studie zu „Clopidogrel in Unstable angina to prevent Recurrent Events“ (CURE) die Überlegenheit einer Kombinationstherapie von Clopidogrel und ASS im Vergleich zu einer ASS-Monotherapie hoch signifikant bewiesen. So kommt es bei Patienten, die mit dem neuen Thienopyridin-Derivat Clopidogrel therapiert werden, signifikant seltener zum Tod durch kardiovaskuläre Ursachen, nicht tödlichem Myokardinfarkt oder Schlaganfall (9,3 %) als bei Patienten der Kontrollgruppe (11,4 %) (The CURE Committee 2000).

In Anwesenheit hoher Konzentrationen starker Agonisten der Thrombozytenaktivierung (z. B. Thrombin) können jedoch auch Thienopyridine in Kombination mit ASS die Thrombozytenaggregation nicht ausreichend verhindern (Neumann 2002). Dieses Problem in der Behandlung akuter Koronarsyndrome konnte in großem Ausmaß durch adjuvante Blockade der GPIIb-IIIa-Rezeptoren überwunden werden.

In klinischen Studien der Phase III konnte für die GPIIb-IIIa-Antagonisten Abciximab und Tirofiban gezeigt werden, dass die Substanzen gut verträglich sind und bei Patienten mit instabiler Angina pectoris oder Myokardinfarkt zu einer erheblichen Verbesserung der Überlebensrate nach koronarer Intervention führen.

Aus den Studien mit Tirofiban ergibt sich, dass durch zusätzliche Gabe des GPIIb-IIIa-Antagonisten zur Standardtherapie - bestehend aus ASS und Heparin - unabhängig von der weiteren Therapie das Mortalitäts- und Morbiditätsrisiko von Patienten mit akutem Koronarsyndrom günstig beeinflusst werden kann (The RESTORE Investigators 1997, The PRISM-PLUS Investigators 1998). In der EPILOG, CAPTURE und RAPPORT-Studie wurde die Wirksamkeit von Abciximab bei Patienten mit instabiler Angina pectoris oder Myokardinfarkt untersucht. Auch hier zeigte sich eine signifikante Verbesserung des Outcomes gegenüber der bisherigen medikamentösen Standardtherapie (The EPILOG Investigators 1994, The CAPTURE Investigators 1997, The RAPPORT Investigators 1998).

Die EPISTENT-Studie hatte die bisherige adjuvante Therapie bestehend aus ASS um Ticlopidin erweitert. Hier wurde erstmals der synergistische Effekt aller drei Substanzklassen (ASS, Thienopyridine und GPIIb-IIIa-Rezeptorantagonisten) mit der ASS-plus-Heparin Therapie verglichen. Fazit der Studie war, dass in der Abciximabgruppe die Ereignisse bezüglich des primären Endpunktes (Tod, Myokardinfarkt und dringliche Revaskularisation) um 43 % gegenüber der Heparin-Gruppe gesenkt werden konnten ( $p < 0,005$ ; The EPISTENT Investigators 1998).

Die TARGET-Studie war die erste klinische Studie, welche die beiden Fibrinogen-rezeptorantagonisten Abciximab und Tirofiban unter gleichen klinischen Bedingungen direkt miteinander verglichen hat. In dieser multizentrischen sog. non-inferiority Studie wurde der Einfluss von Abciximab und Tirofiban – mit adjuvanter Therapie bestehend aus ASS und Clopidogrel - auf die Verminderung des Auftretens von Tod, Myokardinfarkt und dringlicher Revaskularisation bei Patienten mit stabiler Angina pectoris und Patienten mit akutem Koronarsyndrom nach 30 Tagen und sechs Monaten untersucht. In der Gruppe mit akutem Koronarsyndrom erlitten die mit Abciximab therapierten Patienten nach 30 Tagen und sechs Monaten signifikant weniger Myokardinfarkte ( $p = 0,032$ ) und mussten sich auch signifikant seltener einer Re-Intervention unterziehen ( $p = 0,041$ ). Die Todesrate war jedoch in beiden Behandlungsarmen gleich hoch ( $p = \text{n.s.}$ ; The TARGET Investigators 2001).

Der Einsatz von intravenösen GPIIb-IIIa-Rezeptorblockern, kombiniert mit einer oralen antithrombozytären Therapie bestehend aus ASS und Clopidogrel, hat zwar die klinische Prognose von Patienten nach koronarer Stentimplantation signifikant verbessert (Neumann 1998, Lincoff 2000, Bertrand 2000). Doch obgleich sich der Einsatz dieser antithrombozytären Kombination zu einer Standardtherapie bei der intrakoronaren Intervention entwickelt hat, fehlen detaillierte Untersuchungen über die synergistischen Effekte auf die Thrombozytenfunktion und die plättchen-induzierte Aktivierung des Endothels. Des weiteren ist bis heute unklar, ob die pharmakodynamischen Unterschiede zwischen den beiden GPIIb-IIIa-Rezeptorantagonisten Abciximab und Tirofiban von einer Relevanz bezüglich ihrer Wirkungseffektivität in vivo an Thrombozyten sind.



## 1.7 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, in einer klinischen Studie den synergistischen Einfluss unterschiedlicher antithrombozytärer Substanzen (ASS, Clopidogrel und GPIIb-IIIa-Rezeptorblocker) vor und nach koronarem Stenting auf die Plättchenfunktion zu untersuchen. Hierbei wird sowohl der Grad der Thrombozytenaktivierung, als auch der zeitliche Verlauf bestimmt. Folgende Thrombozytenfunktionen werden überprüft:

- a) Plättchenaggregation
- b) Degranulation der Plättchen
- c) Thrombozytäre Thrombingeneration

Des Weiteren werden in einer experimentellen Studie der synergistische Effekt der antithrombozytären Therapie auf die plättchen-induzierte Endothelaktivierung untersucht. Dabei werden die Auswirkungen der thrombozytären Degranulation auf folgende Eigenschaften von Endothelzellen bestimmt:

- a) Chemotaktische Eigenschaften
- b) Adhäsive Eigenschaften
- c) Fibrinolytische Eigenschaften

Zusätzlich werden die Auswirkungen der GPIIb-IIIa-Blocker auf die Plättchenaktivierung und die plättcheninduzierte Endothelaktivierung direkt miteinander verglichen.

## **2 Patienten und Methodik**

### **2.1 Klinischer Teil**

#### **2.1.1 Studienpopulation und Medikation**

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde eine randomisierte klinische Studie durchgeführt. Hierbei wurden insgesamt 20 konsekutive Patienten mit bekannter koronarer Herzkrankheit eingeschlossen, die unter thorakalen Beschwerden litten und bei denen elektiv eine intrakoronare Angioplastie mit Implantation einer koronaren Gefäßstütze („Stent“) geplant war.

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

Die Indikationen für eine Stentimplantation waren eine Stenose von mehr als 50 %, ein plötzlicher Gefäßverschluss sowie eine Dissektion infolge einer PTCA.

Von der Studie ausgeschlossen wurden Patienten mit einem erhöhten Blutungsrisiko, Blutgerinnungsstörungen oder Erkrankungen, die mit einer Störung der Thrombozytenfunktion einhergehen, wie im Folgenden aufgeführt:

- Sepsis, chronische Entzündungen
- Blutungsanamnese, bekannte Thrombozytenfunktionsstörung, Gerinnungsstörung oder bekannte Thrombozytopenie, Heparin-Unverträglichkeit oder –allergie einschließlich einer Heparin-induzierten Thrombozytopenie
- Invasive koronare Eingriffe innerhalb der letzten 14 Tage oder koronare Bypassoperation im letzten Monat
- Aktive peptische Ulzera
- Anhaltende Hypertension mit Werten von systolisch > 180 mmHg und/oder diastolisch > 110 mmHg zu Beginn der Studie
- Akutes Lungenödem, schwere Herzinsuffizienz (NYHA III-IV) oder kardiogener Schock
- Chronisches Nierenversagen

Ebenso wurden Patienten ausgeschlossen, die bereits dauerhaft vor Aufnahme Thienopyridine, Phenprocoumon oder innerhalb der letzten 14 Tage vor Aufnahme GPIIb-IIIa-Blocker als Medikation erhalten hatten.

Alle Patienten waren bereits vor Studienbeginn mit einer täglichen Dosis von 100 mg ASS oral eingestellt. Während der Studie wurde diese Therapie in doppelter Dosis (200 mg) fortgesetzt (Aspirin<sup>®</sup>, Fa. Bayer, Leverkusen, Deutschland). Als weitere Medikation erhielten alle Patienten 24 Stunden vor der koronaren Intervention 300 mg Clopidogrel als Ladungsdosis, gefolgt von 75mg pro Tag für die nächsten vier Wochen (Iscover<sup>®</sup>, Fa. Bristol-Myers Squibb, München, Deutschland). Vor Beginn der Intervention wurden 500 mg ASS intravenös appliziert (Aspisol<sup>®</sup>, Fa. Bayer, Leverkusen, Deutschland). Nach initialer angiographischer Darstellung der Koronararterien wurde ein intraarterieller Bolus von 70 I.E. unfraktioniertem Heparin pro kg Körpergewicht verabreicht (Liquemin<sup>®</sup>, Fa. Hoffmann-La Roche, Grenzach-Wyhlen, Schweiz; The EPILOG Investigators).

Die Randomisierung der Patienten in eines der beiden Behandlungsregime erfolgte direkt vor der transluminalen perkutanen Stentimplantation durch das Ziehen versiegelter Briefumschläge:

- a) Abciximab: Bolus von 0,25 mg pro Kilogramm Körpergewicht, gefolgt von einer laufenden Infusion mit einer Rate von 10 µg pro Minute für 12 Stunden (ReoPro<sup>®</sup>, Fa. Lilly, Gießen, Deutschland; The EPISTENT-Investigators 1998)
- b) Tirofiban: Bolusgabe 10 µg pro Kilogramm Körpergewicht, gefolgt von einer laufenden Infusion mit einer Rate von 0,15 µg pro Minute für 12 Stunden (Aggrastat<sup>®</sup>, Fa. MSD Sharp & Dohme, Haar, Deutschland; The RESTORE-Investigators 1997)

Der arterielle Zugang wurde bei einer aPTT unter 60 Sekunden entfernt.

### 2.1.2 Probengewinnung

Die Blutentnahmen bei den Patienten wurden zu sechs verschiedenen Zeitpunkten durchgeführt:

- Vor der Gabe der Ladungsdosis von Clopidogrel,
- 24 Stunden nach der Ladungsdosis von Clopidogrel,
- Zehn Minuten nach der intravenösen Bolusgabe des GPIIb-IIIa-Antagonisten,
- Sechs Stunden nach der Bolusgabe,
- 24 Stunden nach der Bolusgabe und
- 48 Stunden nach der Bolusgabe

Durch dieses Protokoll war es möglich, Veränderungen im peripheren Blut während der Gabe der antithrombozytären Substanzen und über einen längeren Zeitraum danach zu messen. Die Proben wurden jeweils langsam aus einer Oberarmvene bei mäßiger Stauung durch Punktion mit einer 19 Gauche-Kanüle entnommen.

Für die durchflusszytometrische und die aggregometrische Messung wurden 10 ml Blut in ein Röhrchen abgenommen, das mit 2,8 % Citrat antikoaguliert wurde (Citrat-Blut). Für die koagulometrische Messung wurde in einer mit 1,0 ml bestückten CPDA-Spritze (Fa. Greiner, Frickenhausen, Deutschland) 9 ml Vollblut abgenommen. Ein 2 ml EDTA-Röhrchen wurde zur Bestimmung von Thrombozytenzahl, Hämoglobin, Hämatokrit und weiteren Laborparametern entnommen. Die Citrat-Blut-Röhrchen und das CPDA-Vollblut wurden innerhalb von 30 Minuten weiterverarbeitet. Die Bestimmungen der Laborparameter aus den EDTA-Röhrchen erfolgten durch die Abteilung für Klinische Chemie des Deutschen Herzzentrums München.

### 2.1.3 Probenweiterverarbeitung

Zehn  $\mu\text{l}$  des Vollblutes wurden mit 2490  $\mu\text{l}$  PBS-Puffer (Fa. Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland) für die Präparation der Thrombozyten für die Durchflusszytometrie verdünnt (Verdünnung 1:50).

Das Plättchen-reiche Plasma (PRP) wurde aus Citrat-Blut durch Zentrifugation hergestellt (200 g bei 20° C für 10 Minuten). Der Überstand (PRP) wurde daraufhin mit einer Eppendorf-Pipette abgenommen und in ein 15 ml Kunststoffgefäß (Falcon, Fa. Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland) überführt. Um Plättchen-armes Plasma (PPP) herzustellen, wurden 800  $\mu\text{l}$  PRP bei 2000 Umdrehungen/Minute (ca.150 g) bei Raumtemperatur drei Minuten zentrifugiert und 500  $\mu\text{l}$  Überstand abgenommen. Anschließend wurde die Thrombozytenzahl des PRP im Zählgerät (Fa. Sysmex, Norderstedt, Deutschland) bestimmt und durch Zugabe von PBS auf eine konstante Plättchenzahl von  $2 \times 10^8$  pro ml eingestellt.

Für die Bestimmung der plättchenabhängigen Thrombingeneration wurde das CPDA-Blut bei 1.000 Umdrehungen/Minute (ca. 200 g) für 10 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Danach wurde der Plasmaüberstand abpipettiert, die Zellzahl bestimmt und gegebenenfalls auf  $3 \times 10^8$  Plättchen/ml verdünnt. Dieses PRP wurde bis zur Weiterverarbeitung innerhalb von 1 Stunde auf Eis gelagert.

Die Thrombozytenüberstände für die Endothelaktivierung im Rahmen des experimentellen Teils der Studie wurden wie folgt gewonnen:

Nach abgelaufener Aggregation (siehe 2.1.4, Seite 26) wurden die Messküvetten der ADP 5  $\mu\text{M}$ -, ADP 20  $\mu\text{M}$ - und TRAP 25  $\mu\text{M}$ -Stimulation jeweils in ein Eppendorf-Gefäß überführt und bei 2.000 U/min und Raumtemperatur 5 min zentrifugiert. Anschließend wurden von jedem Eppendorf-Gefäß 2 Aliquots à 200  $\mu\text{l}$  mit einer Pipette in vorher beschriftete Eppendorf-Gefäße gegeben und diese bei -20° C bis zur Weiterverarbeitung gelagert.

Sämtliche Pipettierungen wurden mit Pipetten der Firma Eppendorf, Hamburg, Deutschland, durchgeführt.

#### 2.1.4 Aggregometrische Messung

Die Bestimmung der Aggregation erfolgte gemäß der turbidimetrischen Methode nach Born et al. (Born 1962, Born 1963). Hierbei wird eine mit PRP gefüllte silikonisierte Glasküvette (Fa. BioData, Horsham, USA) unter Verwendung eines Rührstäbchens (konstant 1000 Umdrehungen pro Minute) mittels Magnetrührer kontinuierlich durchmischt und bei 37° C inkubiert. Durch ein photometrisches Verfahren wird die plättchenbedingte Trübung der Suspension anhand einer Referenzküvette, die 500 µl PPP enthält, bestimmt. Durch Zugabe von 5 µl eines Plättchenstimulus (Endkonzentration: ADP 5 µM, ADP 20 µM oder TRAP 25 µM) in die mit 470 µl PRP sowie 25 µl Chrono-Lume-Reagenz gefüllte Küvette kommt es zur Plättchenaktivierung und konsekutiv zur Aggregatbildung. Diese ist abhängig von Calcium, welches im Citratblut und -plasma in ausreichender Konzentration vorliegt.

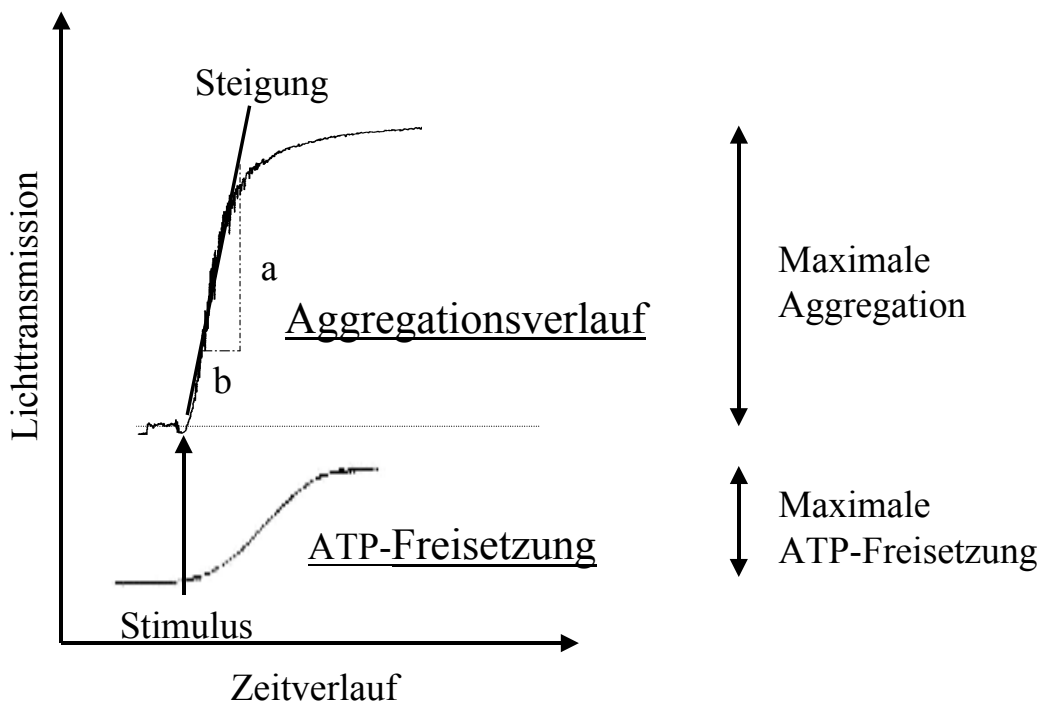
Da die Einzelplättchen eine höhere Lichtstreuung als die von ihnen gebildeten Agglomerate erzeugen, führt die Aggregation zu einer Zunahme der Lichttransmission. Deren Änderung über die Zeit (bis ca. fünf Minuten nach Stimuluszugabe) wird als Aggregationskurve aufgezeichnet.

Parallel zur Messung der Aggregation war am verwendeten Zwei-Kanal-Chronolog-Aggregometer (Fa. Nobis, Endingen, Deutschland) auch eine Bestimmung des freigesetzten ATP aus den dichten Granula der Thrombozyten möglich. Dazu wurde dem PRP (470 µl) 25 µl Chrono-Lume-Reagenz (Luziferin-Luziferase-Extrakt; Fa. Nobis, Endingen, Deutschland) hinzugesetzt, das in Gegenwart von ATP luminesziert. Die bei der ATP-Freisetzung entstehende Lumineszenz wurde von einem Photomultiplier erfasst und mittels Schreiber aufgezeichnet. Zur quantitativen Bestimmung des ATPs wurde zum Anfang jeder Einzelmessung statt der 5 µl Aggregationsstimulus (ADP 5 µM, 20 µM oder TRAP 25 µM) 5 µl ATP-Standard (Fa. Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland) hinzugegeben, welches einer Stoffmenge von 2 nmol entspricht (Feinmann 1977).

Die Plättchenaggregation sowie die ATP-Freisetzung wurden bei 37°C gemessen. Die Mess-Sensitivität für die Aggregation und die ATP-Freisetzung waren auf 0,1 Volt eingestellt. Der Papiervorschub war auf 2 cm pro Minute festgelegt.

### 2.1.4.1 Abgeleitete Werte aus der Aggregationsmessung

Wie in Abbildung 8 dargestellt, konnten durch die aggregatorische Messung sowohl die größte Amplitude (maximale Aggregation) und die größte Steigung („Slope“) der Aggregationskurve, als auch die ATP-Freisetzung (im Vergleich zum ATP-Standard) bestimmt werden.



**Abb 8: Auswertung der Lichtaggregometrie und Luminometrie**

Anhand der Aggregationsverlaufskurve wurde sowohl die maximal mögliche Aggregation (in Relation zu der Eichungszacke als stärksten Zeigerausschlag), als auch die Steigung der Kurve durch Berechnung des Quotienten aus  $a/b$  bestimmt. Diese Steigung zeigt an, mit welcher Geschwindigkeit die Aggregation abläuft. Zur Bestimmung der Freisetzung von ATP aus den dichten Granula wurde ebenfalls der maximale Ausschlag der aktuellen Messung bestimmt und ins Verhältnis zu dem ATP-Standard mit einer konstanten Menge von 2 nM gesetzt.

Die Deaggregation, d. h. die Auflösung von bereits bestehenden Plättchenaggregaten, errechnet sich durch die folgende Formel:

$$\text{Deaggregation} = 100 - \frac{\text{Aggregation nach 5 Minuten}}{(\text{Maximale Aggregation}/100)}$$

#### **2.1.4.2 Methodikbeschränkung**

Die Untersuchung von Thrombozytenfunktionen wird immer von dem potentiellen Risiko einer artifiziellen Thrombozytenaktivierung in vitro, bei der Gewinnung oder Verarbeitung der Proben, beeinträchtigt. Um fehlerhafte Ergebnisse zu vermeiden, wurden deshalb sämtliche methodischen Variablen innerhalb der untersuchten Patienten konstant gehalten und außerdem alle Proben innerhalb kürzest möglicher Zeit – max. eine Stunde - verarbeitet.

#### **2.1.5 Bestimmung der plättchenabhängigen Thrombingeneration**

Hierbei wurde die Spaltung von Thrombin aus Prothrombin innerhalb des Prothrombinasekomplexes gemessen.

Es wurden zu insgesamt 6 Zeitpunkten vor und nach der Gerinnungsreaktion die Bildung von Thrombin im PRP mittels eines chromogenen Substrates detektiert, welches bei Vorhandensein von Thrombin in einen gelben Farbkomplex umgewandelt wird. Die Intensität dieses Komplexes wird photometrisch bei einer Wellenlänge von 450 nm in einem ELISA-Reader gemessen. Die Geschwindigkeit der Substratbildung ist proportional zur enzymatischen Aktivität (Aronson 1992). Der Thrombingehalt in U/ml wird mittels einer Standardreihe berechnet.

Das aus dem CPDA-Blut gewonnene und auf  $3 \times 10^8$  Plättchen/ml verdünnte PRP wird zu je 300 µl in eine mit einer Stahlkugel bestückte Küvette (beides Fa. Strathmann, Berg, Deutschland) im Kugel-Koagulometer KC 4A (Fa. Amelung, Lemgo, Deutschland) pipettiert.



Für die Negativ-Kontrolle wurde zusätzlich 200 µl Tyrodes Puffer (pH 7,4) hinzugegeben, für die Positiv-Kontrollen 140 µl Tyrodes Puffer (pH 7,4) sowie 60 µl Thrombin (0,120 U/ml Endkonzentration; Fa. Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland) oder Tissue-Faktor (Fa. American Diagnostica, Pfungstadt, Deutschland). Die endgültige Konzentration von Tissue-Faktor betrug ein Zehntel der Menge, welche nötig ist, um PPP in ca. 80 Sekunden zu clotten (Reverter 1996). Im Anschluss wurden in Dreifach-Bestimmungen jeweils 10 µl der Positiv- und Negativ-Kontrolle und des Ausgangswertes in die entsprechend markierten Wells der mit 90 µl einer 3,8 prozentigen Natriumcitrat-Lösung (Fa. Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland) pro Well vorbereiteten 96-Well-Mikrotiterplatte (Fa. Greiner, Frickenhausen, Deutschland) für den Ausgangswert pipettiert (siehe Pipettierschema).

Nach Abnahme des Ausgangswertes wurden je 20 µl  $\text{CaCl}_2$  [1Mol] zur Initiierung des Adhäsionsprozesses in die drei Teströhrchen pipettiert. Gleichzeitig mit dieser Startreaktion wurde das Koagulometer gestartet, d. h. das Kreisen der Stahlkugel und der Start der Stoppuhr zur Messung der Gerinnungszeit. Zu fünf weiteren Zeitpunkten (20, 30, 40, 50 und 60 Minuten nach Starten der Clotreaktion) wurden wie beim Ausgangswert in Dreifach-Bestimmungen jeweils 10 µl der Positiv- und Negativ-Kontrolle in die jeweiligen Näpfe der 96-Well-Platte pipettiert (siehe Pipettierschema).

Kurz vor Ende der Inkubationszeit wurde Thrombin in einer geometrischen Verdünnungsreihe zur Erstellung der Standardkurve angesetzt und in Dreifachbestimmung zu je 10 µl in die entsprechenden Näpfe der 96-Well-Platte hinzugegeben (siehe Tabelle 1). Nach der Pipettierung der Standardreihe wurde mit Hilfe einer Multichannel-Pipette 50µl von dem Thrombin Substrat S-2238 (Fa. Chromogenix, Mailand, Italien; Anfertigung siehe Tabelle 7 im Anhang, Seite 92) in alle Wells gegeben und der nun folgende Farbumschlag in dem ELISA-Reader Dynatech MR 5000 (Fa. Dynatech, Denkendorf, Deutschland) bei einer Wellenlänge von 405 nm und einer Referenz Wellenlänge von 630 nm kinetisch bestimmt (Dickfeld 2001; Geräte-Einstellung siehe Tabelle 9 im Anhang, Seite 110). Die durch die Standardkurve mit Thrombin kalibrierte Auswertung [mO.D./min; O.D.: optische Dichte] wurde vom angeschlossenen Drucker ausgegeben. Alle Messungen wurden bei 37° C durchgeführt.

**Tab 1: Pipettierschema plättchenabhängige Thrombingeneration**

	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	<b>D</b>	<b>E</b>	<b>F</b>
<b>1</b>	<b>Thrombinstandard:</b>					
<b>2</b>						
<b>3</b>	1.000 mU/l	500 mU/l	250 mU/l	125 mU/l	62,5 mU/l	31,25 mU/l
<b>4</b>	Ausgangswert	40 min	Ausgangswert	40 min	Ausgangswert	40 min
<b>5</b>						
<b>6</b>						
<b>7</b>	20 min	50 min	20 min	40 min	20 min	40 min
<b>8</b>						
<b>9</b>						
<b>10</b>	30 min	60 min	50 min	60 min	50 min	60 min
<b>11</b>						
<b>12</b>						
	<b>PBS</b>		<b>Thrombin</b>		<b>Tissue-Faktor</b>	

#### 2.1.5.1 Methodikbeschränkung

Es ist denkbar, dass ein Teil des plättchenabhängig entstandenen Thrombins durch Heparin-ATIII-Komplexe gebunden wurde und somit nicht mehr im Assay nachweisbar war. Dies hätte möglicherweise eine Überbewertung der Heparinwirkung zur Folge.

#### 2.1.6 Durchflusszytometrische Messung

Die Markierung der Blutplättchen mit monoklonalen Antikörpern und ihre durchflusszytometrische Messung erlaubt die Erkennung von aktivierungsabhängigen Veränderungen der thrombozytären Membranglykoproteine (Michelson 1996). Damit ist die Durchflusszytometrie die derzeitige Methode, um die funktionellen Aspekte der Thrombozyten bezüglich Aktivierungsgrad und Degranulation zu überprüfen (Charo 1994, Gawaz 1999).

Die Antikörper können durch ihre Konjugation mit fluoreszierenden Substanzen, wie Phycoerythrin (PE) oder Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) nach ihrer Bindung an die Thrombozyten in einem Durchflusszytometer registriert werden (Shattil 1987, Michelson 1999). Dazu werden die monoklonalen Antikörper im vielfachen Überschuss eingesetzt, um gesättigte Konzentrationen zu erreichen (Becker 1994, Böck 1994, Gawaz 1993, Gawaz 1994).

Sämtliche Messungen wurden an einem Zwei-Watt-Argonlaser „FACScan-Durchflusszytometer“ (Fa. Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland) durchgeführt. Dieser wurde mittels der im Handel erhältlichen Standard-Fluoreszenz-Mikrobeads (Calibrite<sup>®</sup>, Firma Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland) geeicht. Die Auswertung der Daten erfolgte durch das am Gerät angeschlossene Datenverarbeitungsprogramm (FACScan) des Herstellers.

#### **2.1.6.1 Immunologische Marker**

Der Zustand hoher Affinität des aktivierten GPIIb-IIIa für Fibrinogen kann mit Hilfe des PAC-1 Antikörpers beurteilt werden, welcher kompetitiv an den aktivierten, nicht aber an den nicht-aktivierten Komplex bindet (Taub 1989, Nurden 1999). Der Liganden-besetzte Zustand, d. h. wenn GPIIb-IIIa Fibrinogen gebunden hat, kann mit monoklonalen Antikörpern, welche spezifisch für bestimmte Epitope auf den GPIIb-IIIa-Rezeptoren, den Liganden-induzierten Bindungsstellen (LIBS), sind, beurteilt werden (LIBS-Epitope: LIBS-1 und PMI-1; Ginsberg 1990, Phillips 1991). Diese Epitope werden weder von Blutplättchen exprimiert, welche sich im Ruhezustand befinden, noch von denen, die sich zwar im aktivierten, jedoch nicht mit Liganden besetzten Zustand befinden. LIBS-Epitope befinden sich sowohl auf der GPIIb als auch auf der GPIIIa Untereinheit des Rezeptors (Plow 1992).

Das Glykoprotein Ib/IX/V kann durch anti-CD42a-b-c markiert werden und fungiert somit als Erkennungsmerkmal für Thrombozyten in der durchflusszytometrischen Erfassung (Michelson 2000).

Die Bindung von anti-CD62P Antikörpern zeigt spezifisch die Freisetzungsreaktion von P-Selektin aus den thrombozytären  $\alpha$ -Granula an (Nurden 1994, McEver 1995).

#### **2.1.6.2 Thrombozytenfärbung**

Im klinischen Teil der vorliegenden Arbeit wurden jeweils 5  $\mu$ l des Antikörpers CD42-b-PE (Fa. Immunotech, Krefeld, Deutschland) und 5  $\mu$ l eines spezifischen, FITC-gefärbten, monoklonalen Antikörpers (Anti-PAC-1, Anti-LIBS-1 oder Anti-CD62P) sowie 35  $\mu$ l in PBS gepuffertes Vollblut in vorher beschriftete Kunststoffröhrchen (Firma Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland) pipettiert (Anti-CD62P: Fa. Immunotech, Krefeld,

Deutschland; Anti-LIBS-1: freundlicherweise von Dr. Mark Ginsberg, Scripps Clinic, La Jolla, USA, zur Verfügung gestellt; Anti-PAC-1: Fa. Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland). Jeder Probe wurde ein Agonist in Form von 5 µl ADP (50 µM Ausgangskonzentration), 5 µl ADP (200 µM Ausgangskonzentration) oder 5 µl TRAP (250 µM Ausgangskonzentration) (TRAP und ADP: Fa. Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland) zugegeben bzw. als unstimulierter Referenzwert 5 µl PBS. Auf diese Weise erhielt man ein konstantes Gesamtreaktionsvolumen von 50 µl (Pipettierschema siehe Tabelle 7).

**Tab 2: Pipettierschema für Durchflusszytometrie**

CD42b PE + CD62P FITC + PBS	CD42b PE + CD62P FITC + ADP (0,05 mM)	CD42b PE + CD62P FITC + ADP (0,2 mM)	CD42b PE + CD62P FITC + TRAP (0,25 mM)
CD42b PE + PAC-1 FITC + PBS	CD42b PE + PAC-1 FITC + ADP (0,05 mM)	CD42b PE + PAC-1 FITC + ADP (0,2 mM)	CD42b PE + PAC-1 FITC + TRAP (0,25 mM)
CD42b PE + Libs-1 FITC + PBS	CD42b PE + Libs-1 FITC + ADP (0,05 mM)	CD42b PE + Libs-1 FITC + ADP (0,2 mM)	CD42b PE + Libs-1 FITC + TRAP (0,25 mM)

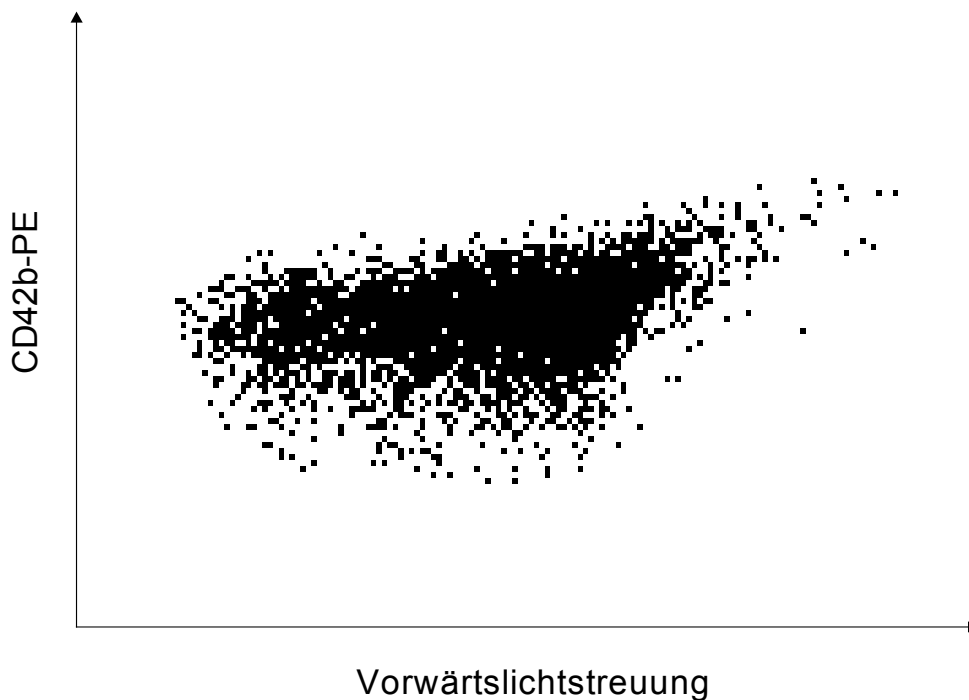
Anschließend wurden die Proben unter Lichtausschluss und ohne Agitation 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Antikörperbindung wurde nach der Inkubationsphase durch Zugabe von jeweils 300 µl einer 0,5 %-Paraformaldehyd-PBS-Lösung (pH 7,4) (Fa. Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland) in die Kunststoffröhrchen gestoppt. Bis zur durchflusszytometrischen Messung innerhalb von 24 Stunden wurden die Proben unter Lichtausschluss bei 4° C aufbewahrt.

### 2.1.6.3 Messung und Auswertung

Individuelle Zellen im kontinuierlichen Fluss wurden mittels eines Laserstrahles detektiert (Warkentin 1990). Die entstehenden Streulichtsignale und die Fluoreszenz wurden von spezifischen Photodioden erfasst. Auf diese Weise konnten sowohl die Größe (forward scatter) und die Granularität (sideward scatter) als auch die Oberflächenexpression durch die mit Fluorochrom markierten Antikörper gebundenen Antigene einer Zelle gemessen werden. Somit ermöglichte dieses Verfahren die Messung und Klassifizierung mehrerer tausend Zellen in kurzer Zeit (Michelson 1996).

Die Klassifizierung der Thrombozyten erfolgte dabei anhand der charakteristischen Lichtstreuung und der für Blutplättchen spezifischen CD42b-PE Fluoreszenz. Der Messbereich wurde selektiv auf die Plättchenpopulation eingestellt, während Detritus und andere Zellpopulationen, wie Leukozyten und Erythrozyten, nicht gemessen wurden. Der Registrierbereich wurde vor jeder Messreihe konstant auf diesen Bereich eingestellt.

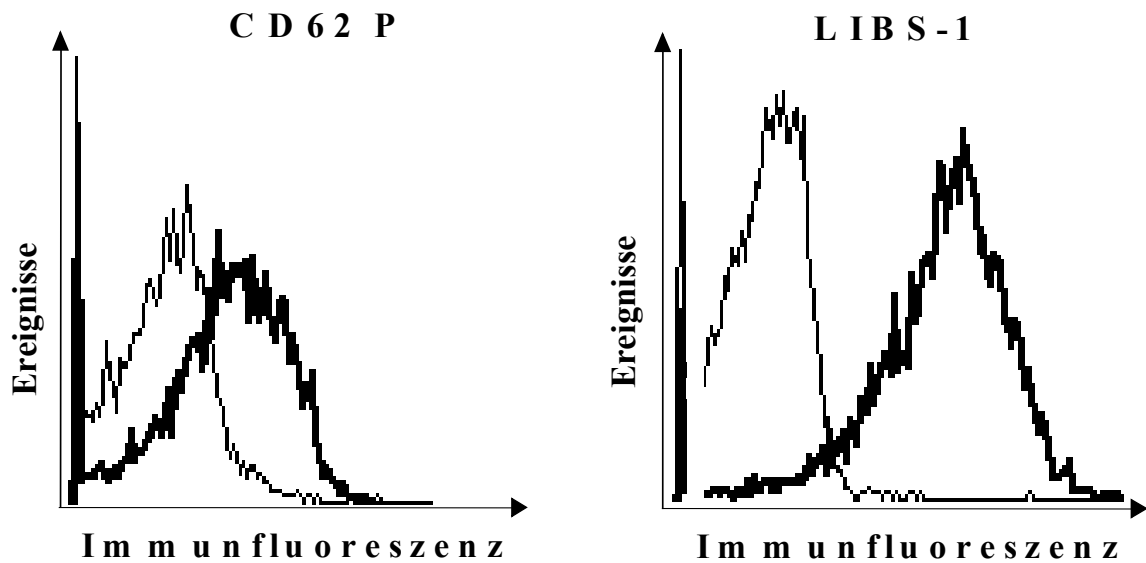
Die Einstellung erfolgte mit Hilfe der Zwei-Parameter-Darstellung. Hierbei können zwei unabhängige Parameter wie z. B. Vorwärtsstreulicht und CD42b-PE-Fluoreszenz zusammen abgebildet werden, indem sie auf x- und y-Achse gegeneinander aufgetragen werden (siehe Abbildung 10).



**Abb 9: Die Zwei-Parameter Darstellung in der Durchflusszytometrie**

*Jeder Punkt im Diagramm entspricht einer Zelle mit der entsprechenden CD42-PE-Fluoreszenz und Vorwärtslichtstreuung. Der aus den einzelnen Punkten entstehende Streubereich ist charakteristisch für die Thrombozytenpopulation (modifiziert nach Gawaz 2001).*

Anschließend wurde die spezifische FITC-Fluoreszenz der eingestellten Thrombozyten in Form eines Histogramms dargestellt. Bei der Histogramm-Abbildung handelt es sich um eine Ein-Parameter-Darstellung, bei der die x-Achse des Diagramms die Fluoreszenzintensität bezeichnet, während die y-Achse die Anzahl der Ereignisse abbildet, um die eventuellen Veränderungen der Zelleigenschaften, wie z. B. die vermehrte Oberflächenexpression von P-Selektin, innerhalb einer Zellpopulation zu beschreiben. Die auf der x-Achse aufgetragene Intensität des Signals (Immunfluoreszenz) nimmt dabei proportional mit dem Abstand zu der y-Achse zu. Pro Messung wurden 5000 Fluoreszenzereignisse registriert und deren Intensität in einer Verteilungskurve dargestellt. Die Fluoreszenzintensität korreliert direkt mit der Expressionsdichte des Antigens (siehe Abbildung 11). Der Mittelwert der Kurvenverläufe erlaubt eine quantitative Aussage über die Antikörperbindung und damit über die Exposition thrombozytärer Membranglykoproteine der aktivierten Thrombozyten.



**Abb 10: Die Darstellung als Histogramm in der Durchflusszytometrie**

*Abgebildet sind jeweils die Intensitätsverteilungen von zwei Messproben mit je 5000 registrierten Fluoreszenz-Ereignissen. Die fett dargestellten Kurven stammen von Proben mit stimulierten Thrombozyten und somit veränderter Gesamtintensität, erkennbar an der Verschiebung der Kurve in Richtung höherer Fluoreszenzintensitätsbereiche (modifiziert nach Gawaz 2001).*

Die Geräteeinstellung für die Messung der Thrombozyten am Durchflusszytometer ist in Tabelle 9 im Anhang dargestellt (siehe Seite 107).

#### **2.1.6.4 Methodikbeschränkung**

Die durchflusszytometrische Untersuchung erlaubt nur Aussagen über noch zirkulierende Thrombozyten, nicht aber die Beurteilung einer Aktivierung von Blutplättchen, die bereits sequestriert wurden oder an Leukozyten gebunden waren (Gawaz1998). Demnach wäre es möglich, dass die thrombozytäre Aktivität unterbewertet wurde, was besonders bei Patienten mit geringer systemischer Thrombozytenaktivierung zum Tragen kommen könnte.

### **2.1.7 Statistische Auswertung**

Die Datenanalyse wurde mit Hilfe des Kolmogorov-Smirnov-Tests für nicht normalverteilte Ergebnisse durchgeführt.

Es wurden nicht parametrische Testverfahren angewandt:

- Friedman- und Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben
  - Kruskal-Wallis-Test und Mann-Whitney-Test für unverbundene Stichproben
- p-Werte von  $< 0,05$  galten als signifikant, von  $< 0,01$  als hochsignifikant.

Die statistische Auswertung erfolgte durch das Programm „SPSS 10.0 for Windows“.

## **2.2 Experimenteller Teil**

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss der antithrombozytären Substanzen auf die plättcheninduzierte Aktivierung von Endothelzellen bestimmt. Zur Bestimmung des Aktivierungsgrades des Endothels wurden Zellen der Tumorzelllinie ECV-304 mit den Thrombozytenüberständen der Patienten der Abciximab- und der Tirofiban-Gruppe (jeweils  $n = 10$ ) inkubiert und anschließend die Freisetzung von MCP-1 und die Oberflächenexpression von uPAR und ICAM-1 untersucht.

Als Kontrollgruppe dienten sechs gesunde Probanden, die mindestens 14 Tage vor der Blutentnahme keine antithrombozytären Substanzen eingenommen hatten. Die Blutentnahme und die Gewinnung der Thrombozytenüberstände nach ADP- und TRAP-stimulierter Aggregation erfolgte analog zu den beiden Patientengruppen (siehe 2.1.2 – 2.1.4).



### **2.2.1 Kultivierung und Gewinnung der ECV-304-Zellen**

Die im ECV-304 Vollmedium, bestehend aus Medium-199, L-Glutamin, Penicillin / Streptomycin (Fa. Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland) und foetalem Kälberserum (FCS; Fa. Biochrom, Berlin, Deutschland), herangezüchteten Zellen der immortalisierten Endothelzelllinie ECV-304 (American Tissue Culture Company (ATCC), Rockwell, USA) wurden mit einer Trypsin-EDTA-Lösung (Fa. Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland) von der Zellkulturflasche (T-75 Flasche: Fa. Greiner, Frickenhausen, Deutschland) abgelöst (Gawaz 1997). Die gewonnene Zellsuspension wurde daraufhin in ein 50 ml Falcon (Fa. Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) überführt und mit ECV-Zell-Vollmedium auf 30 ml aufgefüllt. Danach erfolgte eine fünfminütige Zentrifugation bei ca. 200 g. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet in 1 ml serumfreiem Medium vorsichtig resuspendiert. Anschließend wurde die Zellzahl in der Neubauer-Zählkammer bestimmt und mit Vollmedium auf  $5 \times 10^3$  Zellen pro  $\mu\text{l}$  eingestellt.

Die vorinkubierten ECV-Zellen wurden in die 96-Well-Mikrotiterplatten (Fa. Greiner, Frickenhausen, Deutschland) zu je 8000 Zellen pro Napf ausgelegt. Nach einem Tag wurde das Medium gewechselt und die Zellen mikroskopisch auf Konfluenz und evtl. Infektion untersucht. Sobald ca. 80 % der Bodenfläche mit Zellen bedeckt waren, wurde mit der Zellstimulierung begonnen.

### **2.2.2 Zellstimulierung**

Nach dem Absaugen des Vollmediums und drei Waschschritten mit sterilem PBS wurde in jedes Well 55  $\mu\text{l}$  eines Gemisches aus FCS-freiem Medium und CPDA (Verhältnis 4,5:1) gegeben. Die restlichen 45  $\mu\text{l}$  wurden entweder mit den Thrombozytenüberständen der Patienten oder Probanden, oder der Positiv- (IL 1 $\beta$ ) bzw. Negativ-Kontrolle (PBS; beide Fa. Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland) in Dreifachbestimmung aufgefüllt (siehe Tabelle 3).

**Tab 3: Pipettierschema Plättchen-Endothelinteraktion**

	1	2	3	4	5	6
<b>A</b>	Pat 1: 0 h:	ADP 5		Pat 1: 48 h:	ADP 5	
<b>B</b>	Pat 1: 0 h:	ADP 20		Pat 1: 48 h:	ADP 20	
<b>C</b>	Pat 1: 0 h:	TRAP 25		Pat 1: 48 h:	TRAP 25	
<b>D</b>	Pat 1: 24 h:	ADP 5		Pat 1: 72 h:	ADP 5	
<b>E</b>	Pat 1: 24 h:	ADP 20		Pat 1: 72 h:	ADP 20	
<b>F</b>	Pat 1: 24 h:	TRAP 25		Pat 1: 72 h:	TRAP 25	
<b>G</b>	Pat 1: 30 h:	ADP 5		Proband 1:	ADP 5	
<b>H</b>	Pat 1: 30 h:	ADP 20		Proband 1:	ADP 20	
<b>I</b>	Pat 1: 30 h:	TRAP 25		Proband 1:	TRAP 25	
<b>J</b>	Pat 1: 36 h:	ADP 5		IL-1 $\beta$	[100 pg/ml]	
<b>K</b>	Pat 1: 36 h:	ADP 20		PBS		
<b>L</b>	Pat 1: 36 h:	TRAP 25				

Nach einstündiger Stimulierung im Brutschrank bei 37° C und fünf prozentiger CO<sub>2</sub>-Sättigung wurde das Medium-CPDA-Überstand-Gemisch abgesaugt und die Wells drei mal mit sterilem PBS gewaschen, um die restlichen Thrombozytenüberstände zu entfernen. Danach wurden die Zellen mit Vollmedium versorgt und für weitere 24 Stunden im Brutschrank inkubiert.

Im Anschluss an die Inkubationszeit wurden die ECV-Überstände abpipettiert, zentrifugiert und jeweils 150  $\mu$ l dieser Ansätze in einem Reaktionsgefäß bei -70° C zur späteren MCP-1 Bestimmung asserviert. Vor der Anfärbung der Zellen erfolgten wiederum drei Waschschrte mit PBS.

### 2.2.3 Markierung der Zellen

Für die Bestimmung der Oberflächenexpression von ICAM-1 und uPAR wurden die Zellen mit anti-CD54-FITC (Immunotech, Krefeld, Deutschland) bzw. anti-3936 Anti-Maus-Antikörper (Epitop von uPAR; Fa. Loxo, Dossenheim, Deutschland) und RPE-konjugiertem Kaninchen-Antimaus-Antikörper (Fa. Dako, Glostrup, Dänemark) angefärbt (Gawaz 1997). Zuerst wurden die Endothelzellen mit je 50  $\mu$ l anti-3936-Anti-Maus-Antikörper (Endkonzentration: 50  $\mu$ g/ml) pro Well 30 Minuten inkubiert. Nach Absaugen des Überstandes und eines Waschschrtes wurde mit 50  $\mu$ l/Well RPE (Endkonzentration: 50  $\mu$ g/ml) für 30 Minuten versetzt, um den Maus-Antikörper zu detektieren

und im FACS messbar zu machen. Anschließend wurden die Zellen bei gleicher Menge und Inkubationszeit mit anti-CD54-FITC (50 µg/ml) markiert.

Die doppelt gefärbten Zellen wurden im Anschluss mit Trypsin und mehrmaligem Pipettieren von der Mikrotiterplatte gelöst und mit 200 µl/Well 0,5 procentigem PFA fixiert. Bis zur durchflusszytometrischen Bestimmung der Oberflächenexpression von ICAM-1 und uPAR wurden die Zellen bei 4° C und unter Lichtabschluss aufbewahrt.

#### **2.2.4 Durchflusszytometrische Messung**

Die durchflusszytometrische Zellanalyse erfolgte, wie unter 2.1.6 dargestellt (siehe Seite 30), innerhalb von 24 Stunden nach Zellmarkierung (Gawaz 1998) (Geräteeinstellung siehe Tabelle 7 im Anhang, Seite 108).

#### **2.2.5 MCP-1 Bestimmung**

Die Messung von MCP-1 in den Zellüberständen erfolgte mittels eines fertigen ELISA-Kits der Firma R&D (Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland) in einem Konzentrationsbereich zwischen 30 und 2000 pg/ml (Dickfeld 2001).

Bei diesem Test wurden die asservierten Zellüberstände sowie die angefertigte MCP-1 Standardreihe auf die mit monoklonalen anti-MCP-1 Antikörper beschichteten Festplatten gegeben, so dass sich in der zweistündigen Inkubationszeit Immunkomplexe bilden konnten. Es folgten drei Waschschriffe mit je 200 µl Waschpuffer. Nach der Zugabe von Peroxidase wurden während der einstündigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur die im Konjugat enthaltenen enzymmarkierten polyklonalen Antikörper an die vorher gebildeten Immunkomplexe gebunden. Nach weiteren drei Waschschriffen wurde die Substratlösung hinzupipettiert.

Durch die Reaktion der an den polyklonalen Antikörpern anhaftenden Enzyme mit dem Substrat kam es zu einer Farbentwicklung proportional der im initialen Schritt gebundenen Menge an MCP-1. Diese Farbentwicklung wurde nach 20-minütiger Inkubation durch Zugabe der Stop-Lösung zum Stillstand gebracht. Durch die anschließende Messung im ELISA-Reader Dynatech MR 5000 (Fa. Dynatech, Denkendorf, Deutschland) bei 450 nm

konnte die MCP-1 Konzentration der Proben anhand der Standardreihe bestimmt werden (Geräteeinstellung siehe Tabelle 7 im Anhang, Seite 111). Die Messung der jeweiligen MCP-1 Konzentrationen erfolgte in Doppelbestimmungen.

### **2.2.6 Statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung und Darstellung erfolgte wie unter 2.1.7 beschrieben.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Klinische Teil

Im klinischen Teil der Studie wurden neben den Patientencharakteristika die Plättchenaggregation, die thrombozytäre Degranulation und die thrombozytäre Thrombingeneration verglichen.

##### 3.1.1 Patientencharakteristika

Die beiden Studiengruppen waren hinsichtlich der Laborwerte und der demographischen Daten zum Zeitpunkt der Aufnahme vergleichbar (siehe Tabelle 4 und 5).

**Tab 4: Laborwerte der Patienten zum Zeitpunkt der Aufnahme**

	<b>Abciximab</b> <b>(n = 10)</b>	<b>Tirofiban</b> <b>(n = 10)</b>	<b>p</b>
<b>Hämoglobin [g/dl]</b>	13,9 ± 1,4	14,1 ± 1,5	0,633
<b>Leukozyten [10<sup>9</sup>/l]</b>	7,3 ± 1,6	6,89 ± 1,9	0,573
<b>Thrombozyten [10<sup>9</sup>/l]</b>	248,1 ± 92,2	221,8 ± 44,2	0,633
<b>GPT [U/l]</b>	11,5 ± 4,3	13,3 ± 10,4	0,762
<b>LDH [U/l]</b>	172,0 ± 71,0	183,1 ± 76,9	0,633
<b>CRP [mg/l]</b>	16,9 ± 10,3	26,1 ± 27,5	0,696
<b>Fibrinogen [mg/dl]</b>	366,2 ± 98,2	352,9 ± 149,7	0,515

*Es gab keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Studiengruppen.*

**Tab 5: Demographische Daten der Studienpatienten**

	<b>Abciximab</b> <b>(n = 10)</b>	<b>Tirofiban</b> <b>(n = 10)</b>	<b>p</b>
<b>Geschlecht (M/W)</b>	6/4	9/1	0,268
<b>Alter (J), Mittelwert + SD</b>	63 ± 10	63 ± 11	0,940
<b>Koronare Mehrgefäßerkrankung, n (%)</b>	7	9	0,467
<b>Anamnestischer Myokardinfarkt, n (%)</b>	4	5	0,732
<b>Z.n. PTCA, n (%)</b>	4	6	0,470
<b>Z.n. Stentimplantation, n (%)</b>	2	5	0,269
<b>Z.n. Bypassoperationen, n (%)</b>	2	2	0,969
<b>Kardiovaskuläres Risikoprofil, n (%)</b>			
Arterielle Hypertonie	10	9	0,728
Nikotinabusus	4	2	0,469
Diabetes mellitus	4	3	0,732
Hypercholesterinämie	8	8	0,969
<b>Body Mass Index (Mittelwert + SD)</b>	27,3 ± 5,1	27,1 ± 3,1	0,910

*Zwischen den beiden Studiengruppen gab es keine statistisch signifikanten Unterschiede. SD: Standardabweichung, PTCA: Percutaneous Transluminal Coronary Angioplasty.*

Die intrakoronaren Stents wurden erfolgreich bei allen Patienten implantiert. Im Anschluss war keine angiographisch erkennbare Dissektion zu erkennen. Während der folgenden 30 Tage erlitt keiner der Patienten ein höhergradiges koronarischämisches Ereignis, definiert als Tod, Myokardinfarkt (Q-wave-Infarkt oder Creatinin-Kinase im Serum um mehr als das 5-fache des oberen Limits erhöht) oder notwendige Re-Intervention.

Große vaskuläre Ereignisse oder Blutungskomplikationen, wie zerebrale Hirnblutung, gastrointestinale oder andere Blutung, die evtl. eine Transfusion erfordert hätten, wurden nicht beobachtet. Ein Patient der Abciximab-Studiengruppe entwickelte am Ende der Erhaltungsinfusion des GPIIb-IIIa-Blockers eine Thrombozytopenie, welche sich nach Beenden der Infusion innerhalb von 16 Stunden zurückbildete.

### **3.1.2 Plättchenaggregation**

Im Rahmen der Untersuchung der Thrombozytenaggregation wurden sowohl die maximale Aggregation, die Deaggregation und die Steigung der Aggregationskurve als auch die intrinsische- und die Fibrinogenrezeptor-Aktivierung bestimmt.

#### **3.1.2.1 Maximale Aggregation nach 5 Minuten**

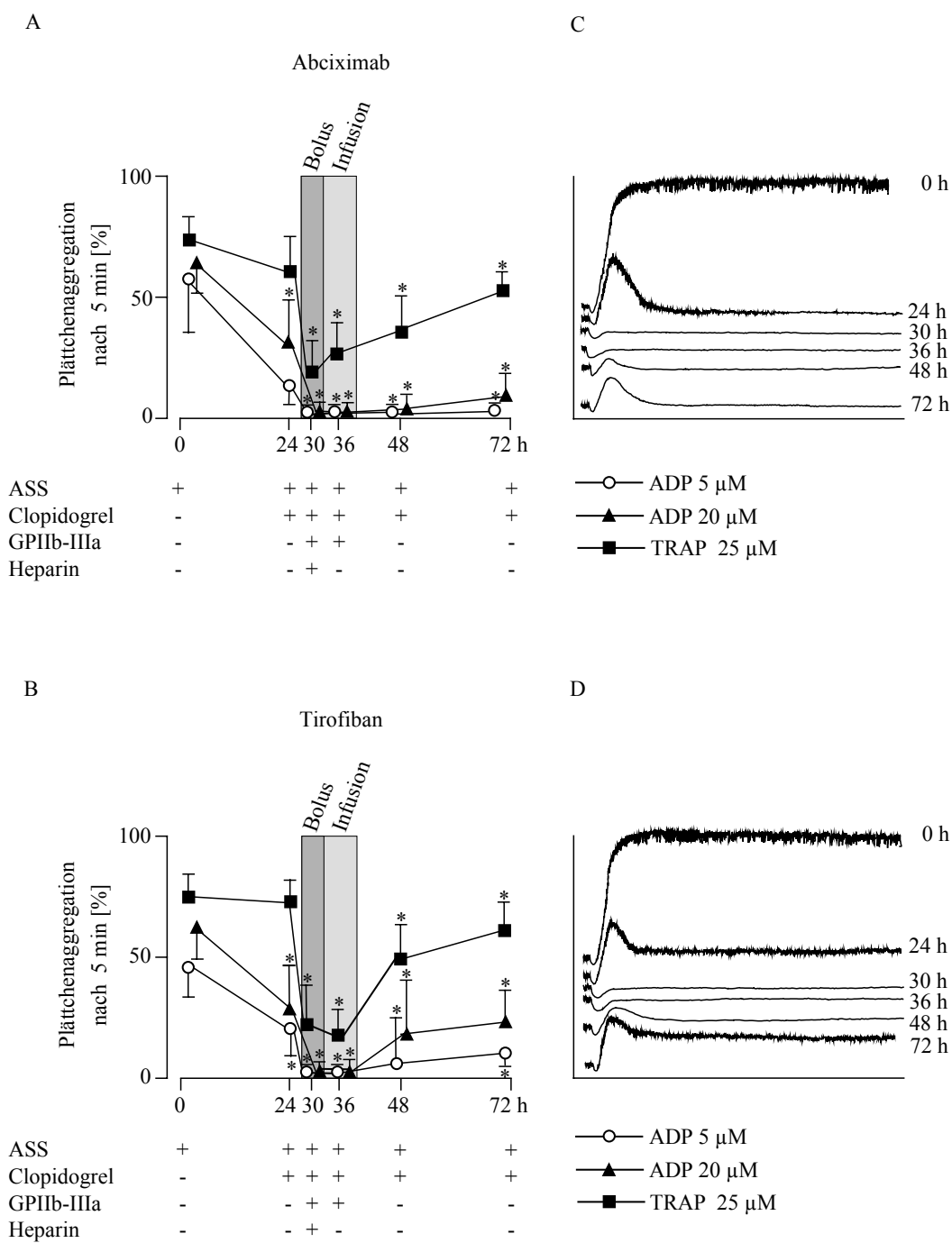
Die Aggregation wurde mittels Lichttransmissions-Aggregometrie nach Stimulation mit ADP 5 $\mu$ M, ADP 20  $\mu$ M beziehungsweise TRAP 25  $\mu$ M bestimmt.

In der Anwesenheit von ASS war eine 30-50 prozentige Inhibition der maximalen Plättchenaggregation zu erkennen (siehe Abbildung 11). Die Behandlung mit ASS in Kombination mit Clopidogrel führte zu einer Reduzierung der Plättchenaggregation von ungefähr 60 % (ADP 5  $\mu$ M) bzw. 45 % (ADP 20  $\mu$ M), respektiv im Vergleich zur ASS-Monotherapie ( $p < 0,05$ ).

Bei der Verwendung von TRAP (25  $\mu$ M), einem starken Stimulus der Plättchenaggregation, zeigte sich eine weitere Hemmung der Aggregation bei kombinierter Behandlung mit ASS und Clopidogrel um 14 % auf insgesamt 65 %. Nach der Bolusgabe von Abciximab oder Tirofiban war die Thrombozytenaggregation bei schwacher Stimulation (ADP 5  $\mu$ M) oder mittlerer Stimulation (ADP 20  $\mu$ M) um mehr als 90 % inhibiert, bei starker Stimulation (TRAP 25  $\mu$ M) um 80 % (beide Stimuli  $p < 0,05$  gegenüber ASS-Monotherapie). In gleicher Weise wurde die Aggregation infolge ADP- oder TRAP-Stimulation bei laufender Infusion der beiden GPIIb-IIIa-Antagonisten um mehr als 90 % bzw. 70 % gehemmt, wiederum signifikant im Vergleich zur ASS-Monotherapie ( $p < 0,05$ ).

36 Stunden nach Beendigung der Infusion der GPIIb-IIIa-Rezeptorantagonisten erholte sich die Plättchenaggregation in der Tirofibangruppe auf Werte von 35 % der maximalen Aggregation bei mittlerer Stimulation (ADP 20  $\mu$ M) bzw. 54 % der maximalen Aggregation bei starker Stimulation (TRAP 25  $\mu$ M), während die maximale Aggregation in der Abciximabgruppe nach mittlerer Stimulation 21 % ( $p < 0,05$  gegenüber Tirofiban) bzw. 54 % nach starker Stimulation betrug. Die Originaldaten sind im Anhang in Tabelle 10 aufgeführt (siehe Seite 112).





### Abb 11: Plättchenaggregation nach 5 Minuten

Dargestellt ist die Plättchenaggregation im Zeitverlauf vor, während und nach der Koronarintervention. Bei Synergismus aller untersuchten Medikamente ist die Aggregation komplett inhibiert. Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung;  $n = 10$  pro Studiengruppe; \*  $p < 0,05$  gegenüber ASS-Monotherapie; [%]: % der maximal möglichen Aggregation; GPIIb-IIIa: GPIIb-IIIa-Blocker

In Abbildung 1C) und 1D) sind repräsentative Plättchen-Aggregations-Kurven (ADP 20  $\mu$ M-Stimulation) für Abciximab (Abb. 1C) und Tirofiban (Abb. 1D) gezeigt. Während der ASS-Monotherapie (0 h) ist die maximal mögliche Aggregation kaum inhibiert. 24 Stunden nach der Ladungsdosis von Clopidogrel (24 h) ist der Ausschlag der Kurve bereits deutlich geringer als bei ASS-Monotherapie. Zehn Minuten nach Bolusgabe des GPIIb-IIIa-Antagonisten (30 h) und während laufender Infusion der GPIIb-IIIa-Blocker (36 h) ist die Aggregation nahezu komplett inhibiert und 12 und 36 Stunden nach Beendigung der Erhaltungsinfusion der Fibrinogenrezeptorantagonisten (48 h und 72 h) nimmt die Aggregation wieder zu, wobei dieser Vorgang in der Tirofibangruppe stärker ausgeprägt ist als in der Abciximabgruppe.

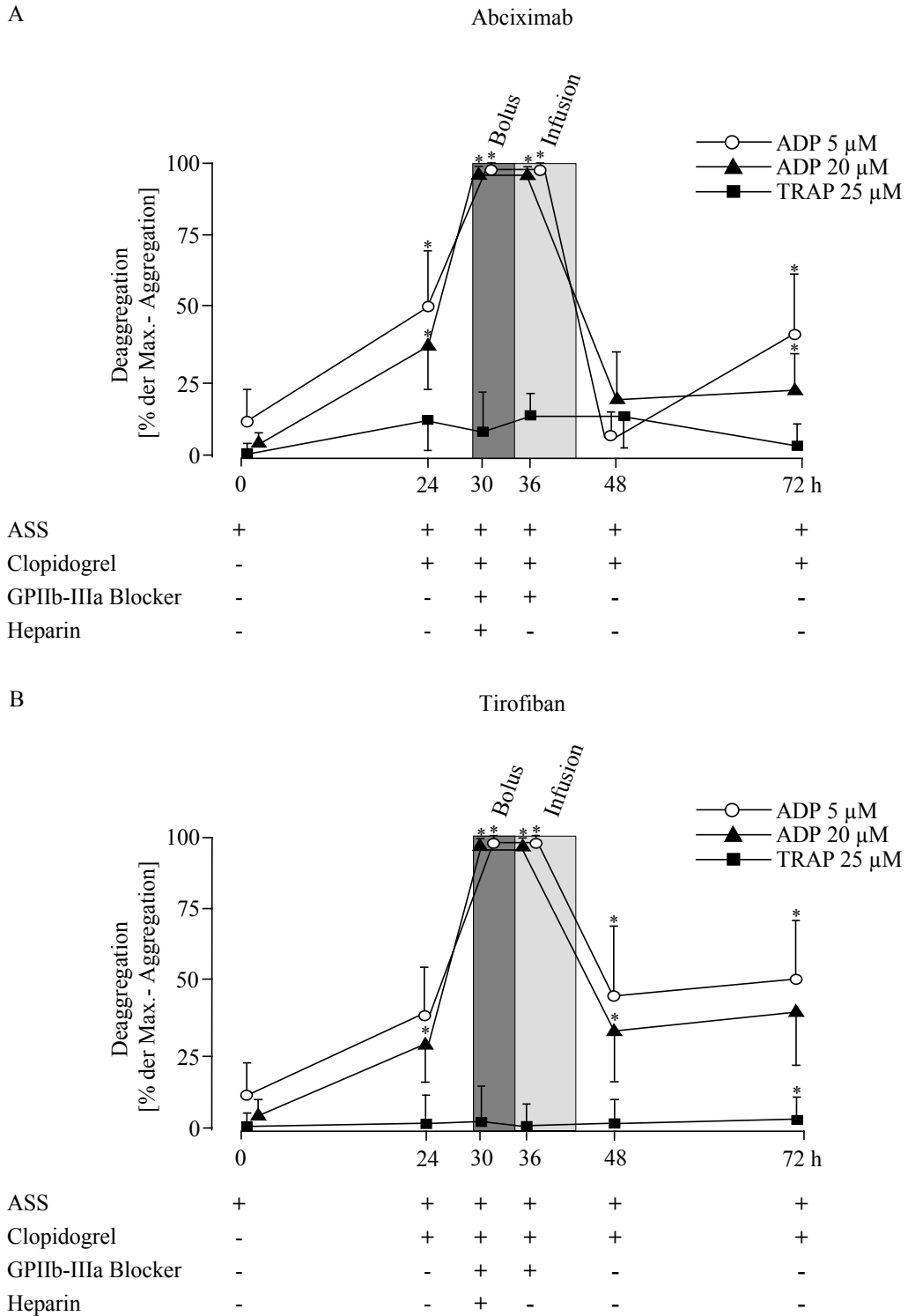
### **3.1.2.2 Deaggregation**

Die Auflösung von bereits bestehenden Plättchenaggregaten, d. h. die Deaggregation, wurde wie unter 2.1.4.1 beschrieben berechnet. Die Werte für die Aggregation nach fünf Minuten und innerhalb fünf Minuten sind im Anhang in Tabelle 10 und 11 aufgeführt (siehe Seite 112 und 113).

Die Deaggregation erreichte bei Monotherapie mit ASS nach Inkubation mit ADP 5  $\mu$ M oder ADP 20  $\mu$ M 9 % bzw. 1 %. Unter einer kombinierten Therapie mit ASS und Clopidogrel stieg die Deaggregation auf 40 % nach Inkubation mit ADP 5  $\mu$ M und bis ungefähr 30 % nach Stimulation mit ADP 20  $\mu$ M (siehe Abbildung 12). Nach der intravenösen Bolusgabe und auch während der kontinuierlichen Infusion von Abciximab und Tirofiban stieg die Auflösung der ADP 5  $\mu$ M- und ADP 20  $\mu$ M-induzierten Plättchenaggregate auf 100 % in beiden Studiengruppen.

Die Deaggregation nach Plättchenaktivierung durch TRAP war bei ASS Monotherapie 0 % und bei der Behandlung mit ASS plus Clopidogrel 8 %. Auch die Gabe Abciximab oder Tirofiban führte zu keiner signifikanten Inhibition der Deaggregation bei TRAP-induzierter Plättchenaggregation gegenüber der ASS-Monotherapie. Nach Bolusgabe betrug die Deaggregation 8 % in der Abciximabgruppe und 3 % in der Tirofibangruppe, bei laufender Infusion 16 % in der Abciximabgruppe bzw. 2 % in der Tirofibangruppe.

12 bzw. 36 Stunden nach Absetzen der GPIIb-IIIa-Rezeptorblocker sank die Deaggregation nach mittlerer Stimulation in der Abciximabgruppe auf 21 % bzw. 33 % und in der Tirofibangruppe auf 32 % bzw. 39 %. Bei starker Stimulation betragen diese Werte für die Abciximabgruppe 13 % bzw. 5 % und in der Tirofibangruppe 3 % bzw. 5 %. Die Originaldaten sind im Anhang in Tabelle 12 aufgeführt (siehe Seite 114).



**Abb 12: Deaggregation**

*Es ist die Deaggregation, d. h. die Auflösung von bereits bestehenden Plättchenaggregaten, im Zeitverlauf vor, während und nach der Koronarintervention dargestellt. Unter einer Kombination aller antithrombozytären Substanzen ist eine komplette Deaggregation möglich. Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung; n = 10 pro Studiengruppe; \* p < 0,05 gegenüber ASS-Monotherapie*

### 3.1.2.3 Steigung der Aggregationskurve

Bereits die Kombinationstherapie aus ASS und Clopidogrel senkte die Steigung der Aggregationskurve und damit die Geschwindigkeit der Aggregation bei schwacher und mittlerer Stimulation (ADP 5  $\mu\text{M}$  und ADP 20  $\mu\text{M}$ ) in beiden Gruppen. Die Werte betragen in der Abciximabgruppe 4,7 bzw. 6,8 (beide Werte  $p < 0,05$  gegenüber ASS-Monotherapie) und in der Tirofibangruppe 5,5 bzw. 6,24 ( $p < 0,05$  gegenüber ASS-Monotherapie). Durch zusätzliche Bolusgabe und Infusion von Abciximab und Tirofiban konnte die Aggregationsgeschwindigkeit bei schwacher und mittlerer Stimulation bei beiden Studiengruppen deutlich unter 1,0 gesenkt werden ( $p < 0,01$  versus ASS-Monotherapie). Nach 12 bzw. 36 Stunden nach Absetzen der Erhaltungsinfusion stiegen die Werte nach mittlerer Stimulation in der Tirofibangruppe bereits auf 3,5 bzw. 4,5 ( $p < 0,01$  gegenüber ASS-Monotherapie), während sich die Werte in der Abciximabgruppe mit 1,4 und 2,5 langsamer Richtung Ausgangswert erholten ( $p < 0,01$  gegenüber ASS-Monotherapie).

Bei Verwendung eines starken Stimulans (TRAP 25  $\mu\text{M}$ ) konnte die Kombination aus ASS und Clopidogrel keine Hemmung der Aggregationsgeschwindigkeit gegenüber der ASS-Monotherapie erzielen. Erst durch Bolusgabe und Erhaltungsinfusion der Fibrinogenrezeptor-Antagonisten war die Steigung in beiden Patientengruppen signifikant gehemmt, auf 1,7 bzw. 2,8 in der Abciximabgruppe und auf 2,6 bzw. 2,2 in der Tirofibangruppe ( $p < 0,01$  gegenüber ASS-Monotherapie). Hierbei war Abciximab dem Tirofiban bei Bolusgabe in der Hemmung der Aggregationsgeschwindigkeit signifikant überlegen ( $p < 0,01$  gegenüber Tirofiban). Bei TRAP-Stimulation zeigte sich in der Tirofibangruppe eine raschere Erholung der Aggregations-Geschwindigkeit in Richtung Ausgangswert als in der Abciximabgruppe. In der letzteren Patientengruppe stiegen die Werte für den Slope 12 bzw. 36 Stunden nach Absetzen der Fibrinogenrezeptor-Blocker auf 3,5 ( $p < 0,01$  gegenüber Tirofiban) bzw. 5,1 (beide Werte  $p < 0,01$  gegenüber ASS-Monotherapie) und in der Tirofibangruppe auf 6,3 ( $p < 0,01$  gegenüber ASS-Monotherapie) bzw. 7,5 ( $p < 0,05$  gegenüber ASS-Monotherapie; siehe Tabelle 6).

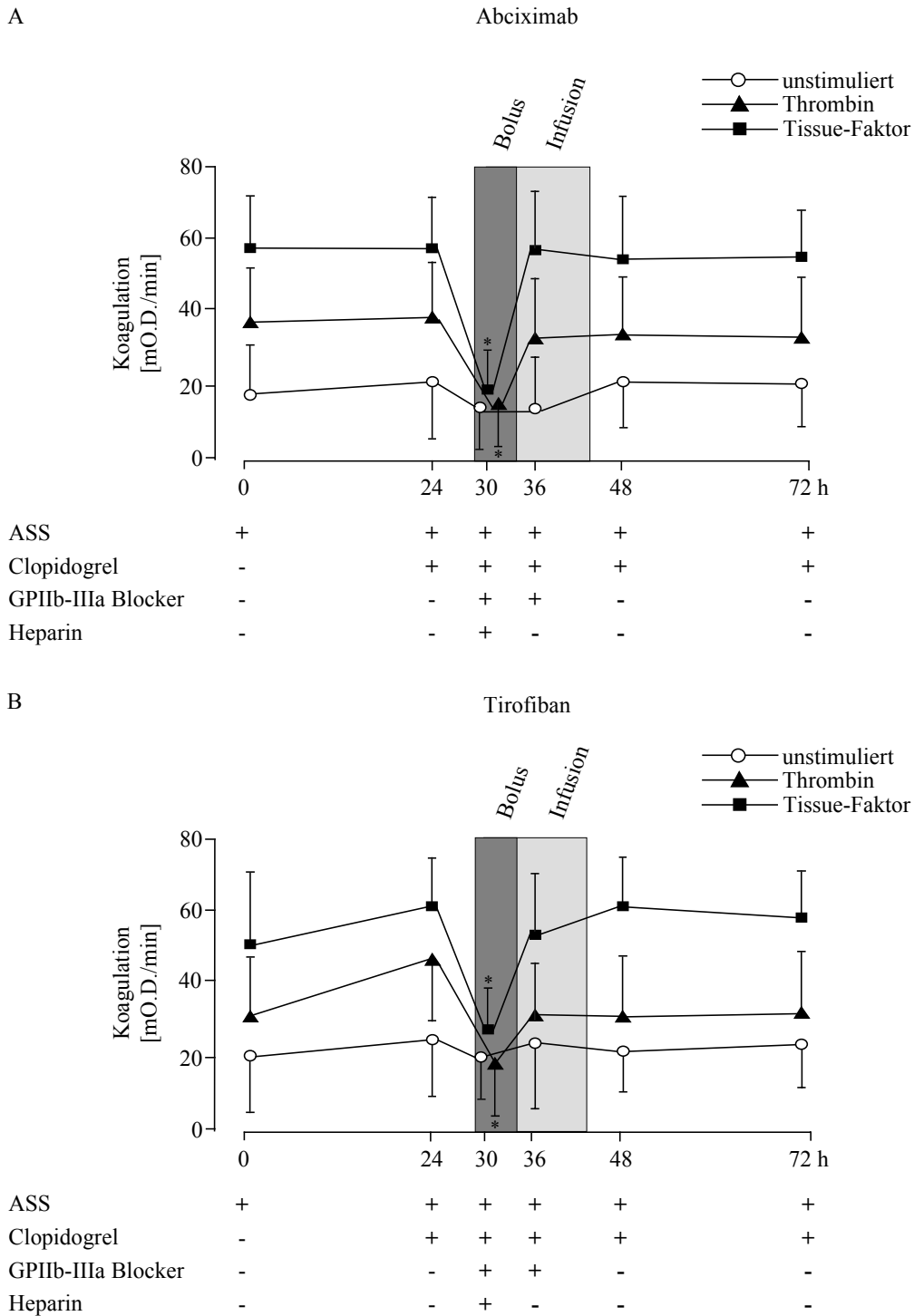
**Tab 6: Steigung der Aggregationskurve**

<b>Zeitverlauf</b>	<b>0 h</b>	<b>24 h</b>	<b>30 h</b>	<b>36 h</b>
ASS	+	+	+	+
Clopidogrel	-	+	+	+
GPIIb-IIIa	-	-	+	+
Heparin	-	-	+	-
<b>Abciximab</b>				
ADP 5	7,1 ± 2,7	4,7 ± 1,3**	0,2 ± 0,1**	0,4 ± 0,3**
ADP 20	8,7 ± 3,2	6,8 ± 3,6**	0,3 ± 0,1**	0,6 ± 0,3**
TRAP 25	9,9 ± 3,5	10,4 ± 3,0	1,7 ± 0,6** <sup>o</sup>	2,8 ± 0,8**
<b>Tirofiban</b>				
ADP 5	5,4 ± 2,0	5,5 ± 3,1	0,4 ± 0,1**	0,3 ± 0,2**
ADP 20	8,3 ± 3,3	6,2 ± 3,5*	0,4 ± 0,2**	0,4 ± 0,3**
TRAP 25	9,6 ± 2,8	9,3 ± 2,6	2,6 ± 0,5**	2,2 ± 1,0**

Dargestellt ist die Steigung der Aggregationskurve, d. h. die Geschwindigkeit, mit welcher die Thrombozyten aggregieren, im Zeitverlauf vor, während und nach der Koronarintervention. Bei schwacher und mittlerer Stimulation ist die Steigung der Aggregationskurve durch Synergismus aller untersuchten antithrombozytären Substanzen nahezu komplett hemmbar. Alle Werte sind als Mittelwert ± Standardabweichung angegeben; n = 10 pro Studiengruppe; \* p < 0,05 gegenüber Abnahme „0 h“; \*\* p < 0,01 gegenüber Abnahme „0 h“; ° p < 0,05 Abciximab gegenüber Tirofiban

### 3.1.3 Plättchenabhängige Thrombingeneration

Die thrombozytäre Thrombingeneration wurde weder durch ASS noch durch Clopidogrel nach Stimulation mit Thrombin oder Tissue-Faktor beeinflusst. In Anwesenheit von Heparin wurde dagegen der Anstieg der Thrombinaktivität sowohl in Thrombin stimuliertem als auch Tissue-Faktor stimuliertem PRP von einem Ausgangswert von ca. 32 mO.D./min bzw. ca. 53 mO.D./min statistisch signifikant auf 16 mO.D./min bzw. 22 mO.D./min gesenkt (p < 0,05 gegenüber ASS-Monotherapie) (siehe Abb. 13). Nach Absetzen des Heparins stieg die plättchenabhängige Thrombingeneration bei laufender Erhaltungsinfusion von Abciximab oder Tirofiban wieder auf das Niveau vom Ausgangswert. Die Originaldaten sind im Anhang in Tabelle 13 aufgeführt (siehe Seite 115).



**Abb 13: Plättchenabhängige Thrombingeneration**

Abgebildet ist die plättchenabhängige Thrombingeneration im Zeitverlauf vor, während und nach der Koronarintervention. Nur unter einer Therapie mit Heparin ist eine signifikante Hemmung der plättchenabhängigen Thrombingeneration zu beobachten. Alle Werte sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung angegeben;  $n = 10$  pro Studiengruppe; \*  $p < 0,05$  gegenüber ASS-Monotherapie

### 3.1.3.1 Durchflusszytometrie

Bei der Untersuchung von an der Plättchenoberfläche exprimiertem LIBS-1 zeigte die Kombinationstherapie von ASS und Clopidogrel bei mittlerer und starker Stimulation (ADP 20  $\mu$ M und TRAP 25  $\mu$ M) eine Inhibition gegenüber der ASS-Monotherapie. In der Abciximabgruppe sank die LIBS-1-Expression nach mittlerer bzw. starker Stimulation von 225 auf 207 bzw. von 241 auf 205 mittlere Immunfluoreszenz. In der Tirofibangruppe nahm die LIBS-1-Expression von einem Ausgangswert von 224 auf 181 bei mittlerer Stimulation bzw. von 218 auf 182 mittlere Immunfluoreszenz bei starker Stimulation ab ( $p < 0,05$  gegenüber ASS-Monotherapie).

Nach zusätzlicher Gabe der Fibrinogenrezeptor-Antagonisten fiel eine signifikante Hemmung gegenüber dem Ausgangswert durch Abciximab auf: 160 mittlere Immunfluoreszenz bei mittlerer und 157 mittlere Immunfluoreszenz bei starker Stimulation ( $p < 0,05$  gegenüber ASS-Monotherapie). Auch 48 Stunden nach Bolusgabe war eine signifikante Hemmung der LIBS-1-Expression zu beobachten: 143 mittlere Immunfluoreszenz bei mittlerer und 159 mittlere Immunfluoreszenz bei starker Stimulation ( $p < 0,05$  im Vergleich zur ASS-Monotherapie). Die Bolusgabe von Tirofiban hingegen führte nach mittlerer und starker Stimulation zu einem Anstieg der LIBS-1-Expression auf das Niveau des Ausgangswertes. Bei laufender Infusion von Tirofiban stieg die LIBS-1-Expression weiter an: von 219 auf 222 mittlere Immunfluoreszenz bei mittlerer und von 217 auf 225 mittlere Immunfluoreszenz bei starker Stimulation. Erst 36 Stunden nach Absetzen der Erhaltungsinfusion von Tirofiban sank der Wert gegenüber dem Ausgangswert auf 164 mittlere Immunfluoreszenz bei mittlerer ( $p < 0,05$  gegenüber ASS-Monotherapie) und auf 167 mittlere Immunfluoreszenz bei starker Stimulation ( $p < 0,05$  gegenüber ASS-Monotherapie; siehe Tabelle 7)

Bei der Messung von aktiviertem GPIIb-IIIa mit anti-PAC-1 führte die Kombinationstherapie von ASS plus Clopidogrel bei mittlerer und starker Stimulation zu einer deutlichen Hemmung der PAC-1-Expression auf der Thrombozytenoberfläche gegenüber dem Ausgangswert (ASS-Monotherapie). Bei einem Ausgangswert von ca. 260 mittlere Immunfluoreszenz bei mittlerer und starker Stimulation sank die PAC-1-Expression auf ein Niveau von ca. 225 mittlere Immunfluoreszenz nach mittlerer bzw. ca. 215 mittlere Immunfluoreszenz nach starker Stimulation. Die Bolusgabe und die Infusion von Tirofiban



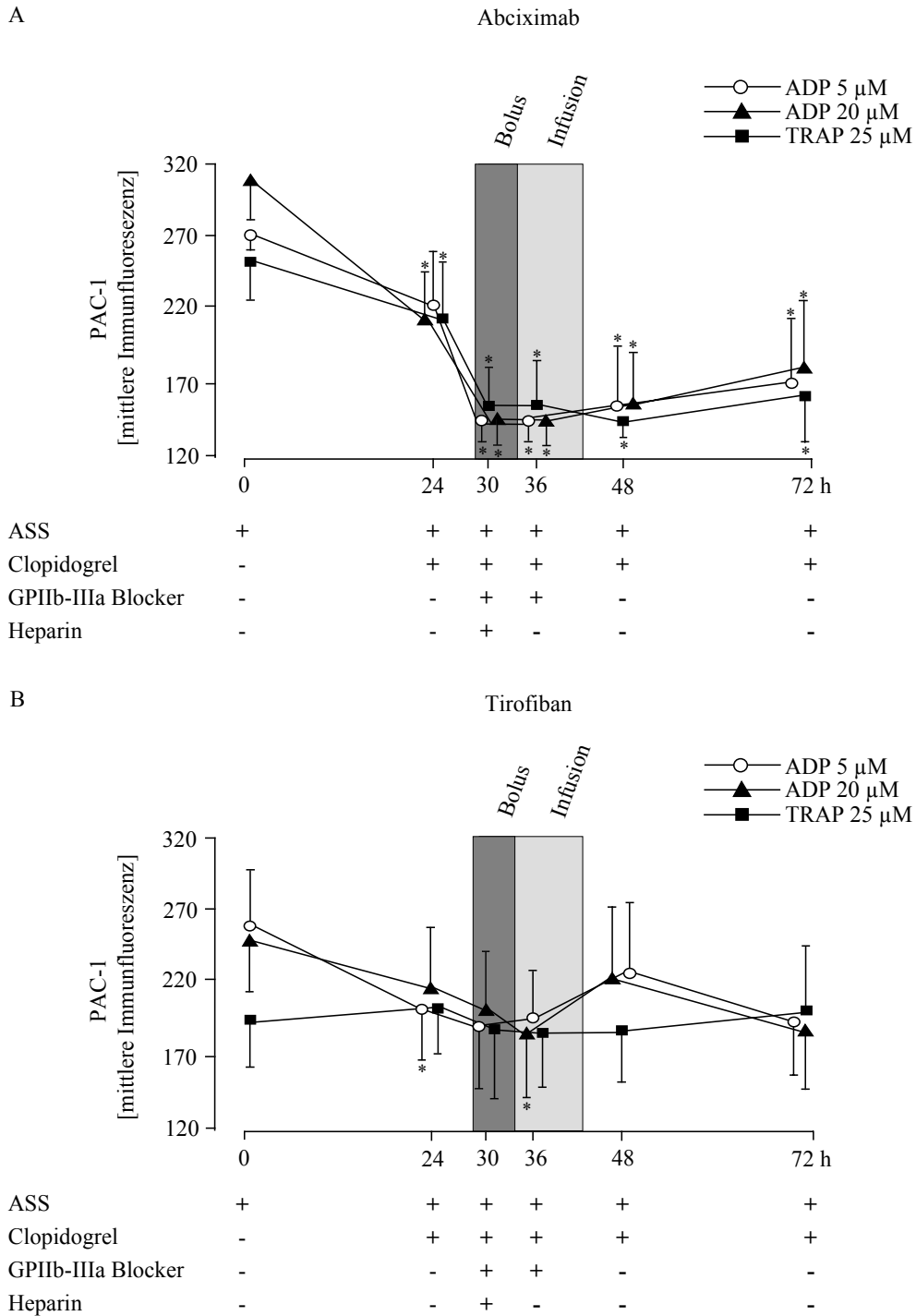
fürten zu einer geringfügigen weiteren Reduktion der Oberflächenexpression von PAC-1 gegenüber der Kombinationstherapie von ASS und Clopidogrel.

Bei mittlerer Stimulation nahm die PAC-1-Expression auf 210 bzw. 186 mittlere Immunfluoreszenz und bei starker Stimulation auf 204 bzw. 183 mittlere Immunfluoreszenz ab. Durch die Bolusgabe und Erhaltungsinfusion von Abciximab konnte eine hoch signifikante Senkung der PAC-1-Expression erzielt werden: 142 bzw. 140 mittlere Immunfluoreszenz bei mittlerer Stimulation und 154 bzw. 141 mittlere Immunfluoreszenz bei starker Stimulation ( $p < 0,01$  gegenüber ASS-Monotherapie). Diese inhibierende Wirkung war auch 36 Stunden nach Absetzen von Abciximab zu erkennen; eine mittlere Immunfluoreszenz von 149 bei mittlerer bzw. 139 nach starker Stimulation ( $p < 0,01$  gegenüber ASS-Monotherapie; siehe Abbildung 14). Die Originaldaten sind im Anhang in Tabelle 115 angeführt (siehe Seite 117).

**Tab 7: LIBS-1-Expression**

<b>Zeitverlauf</b>	<b>0 h</b>	<b>24 h</b>	<b>30 h</b>	<b>36 h</b>	<b>48 h</b>	<b>72 h</b>
ASS	+	+	+	+	+	+
Clopidogrel	-	+	+	+	+	+
GPIIb-IIIa	-	-	+	+	-	-
Heparin	-	-	+	-	-	-
<b>Abciximab</b>						
unstimuliert	168 ± 35	178 ± 29	150 ± 22*	165 ± 40	130 ± 49	158 ± 21
ADP 5	237 ± 50	211 ± 43 °	155 ± 13 <sup>°*</sup>	168 ± 41°	149 ± 32 <sup>°*</sup>	161 ± 22°
ADP 20	225 ± 53	207 ± 45	160 ± 16 <sup>°*</sup>	171 ± 36°	143 ± 45 <sup>°*</sup>	166 ± 38 <sup>°</sup>
TRAP 25	241 ± 60	205 ± 48	157 ± 15 <sup>°*</sup>	170 ± 27°	159 ± 28 <sup>°*</sup>	179 ± 40°
<b>Tirofiban</b>						
unstimuliert	174 ± 16	163 ± 16	177 ± 16	185 ± 42	162 ± 21	151 ± 18°
ADP 5	213 ± 47	180 ± 17	212 ± 31	230 ± 72	201 ± 45	168 ± 24
ADP 20	224 ± 51	181 ± 16 °	219 ± 34	222 ± 67	199 ± 43	164 ± 16°
TRAP 25	218 ± 53	182 ± 17 °	217 ± 40	225 ± 55	204 ± 39	167 ± 18°

Mit der LIBS-1 Expression ist der Aktivitätszustand des GPIIb-IIIa-Rezeptors im Zeitverlauf unter der verwendeten antithrombozytären Therapie dargestellt. Bei Abciximab-Gabe ist eine signifikante Reduktion der LIBS-1 Expression zu beobachten. Alle Werte sind als Mittelwert ± Standardabweichung der mittleren Immunfluoreszenz angegeben; n = 10 pro Gruppe; \* p < 0,05 Abciximab gegenüber Tirofiban; ° p < 0,05 gegenüber Abnahme „0 h“; GPIIb-IIIa: GPIIb-IIIa-Antagonisten



**Abb 14: PAC-1-Expression**

*Es ist die PAC-1 Expression im Zeitverlauf vor, während und nach der Koronarintervention dargestellt. Nach Gabe von Abciximab ist eine signifikante Hemmung der PAC-1 Expression zu erzielen. Alle Werte sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung der mittleren Immunfluoreszenz dargestellt;  $n = 10$  pro Studiengruppe; \*  $p < 0,05$  gegenüber ASS-Monotherapie*

### 3.1.4 Degranulation

Bezüglich der Degranulation wurden die Freisetzung der Inhaltsstoffe von  $\alpha$ -Granula (P-Selektin) und dichter Granula (ATP-Freisetzung) der Thrombozyten untersucht.

#### 3.1.4.1 P-Selektin-Expression

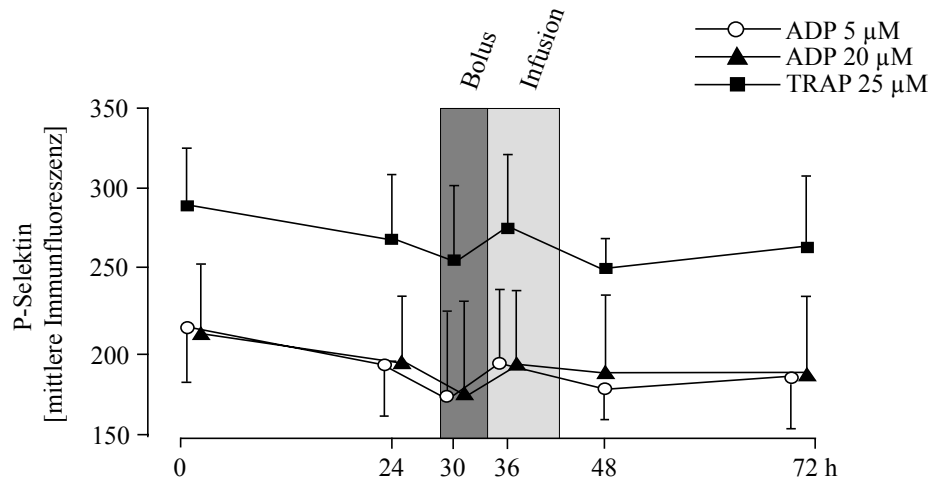
Die ADP 20  $\mu$ M -induzierte Sekretion der  $\alpha$ -Granula, die durch P-Selektin-Expression in der Durchflußzytometrie bestimmt wurde, war unter der kombinierten Therapie von ASS und Clopidogrel im Vergleich zur ASS-Monotherapie deutlich gehemmt. In der Abciximabgruppe sank die mittlere Immunfluoreszenz von 211 auf 187 und in der Tirofibangruppe von 215 auf 190. Die Bolusgabe von Abciximab oder von Tirofiban bewirkten bezüglich der aktivierungsabhängigen Hochregulation des oberflächlichen P-Selektins nur eine geringfügige zusätzliche Reduktion auf 180 mittlere Immunfluoreszenz bei Abciximab und 189 mittlere Immunfluoreszenz bei Tirofiban. Unter kontinuierlicher Infusion der GPIIb-IIIa-Antagonisten stieg die P-Selektin-Expression im Vergleich zur Kombinationstherapie aus ASS und Clopidogrel sogar tendenziell an, hierbei wurden bei Abciximab eine mittlere Immunfluoreszenz von 202 und bei Tirofiban von 198 erreicht.

Auch unter starker Stimulation (TRAP 25  $\mu$ M) führte die Behandlung mit ASS plus Clopidogrel zu einer Senkung der P-Selektin Expression, wobei diese in der Abciximabgruppe von 288 auf 264 mittlere Immunfluoreszenz bzw. in der Tirofibangruppe von 311 auf 278 mittlere Immunfluoreszenz gesenkt wurde. Ähnlich wie bei mittlerer Stimulation mit ADP 20  $\mu$ M konnte durch zusätzliche Gabe der GPIIb-IIIa-Antagonisten nach starker Stimulation nur eine geringfügige Wirkungsverstärkung gegenüber der Kombinationstherapie aus ASS und Clopidogrel erzielt werden. So nahm die mittlere Immunfluoreszenz in der Abciximabgruppe bei Bolusgabe auf 246 mittlere Immunfluoreszenz ab, stieg jedoch bei laufender Infusion wieder auf 275 mittlere Immunfluoreszenz an. Bei der Tirofibangruppe stagnierte die mittlere Immunfluoreszenz nach Bolusgabe bei 278 und nahm bei laufender Infusion auf 270 ab.

Eine signifikante Inhibition der P-Selektin-Expression war demnach auch durch Kombination aller untersuchten Medikamente nicht möglich (siehe Abbildung 15; Originaldaten siehe Tabelle 14 im Anhang, Seite 116).

A

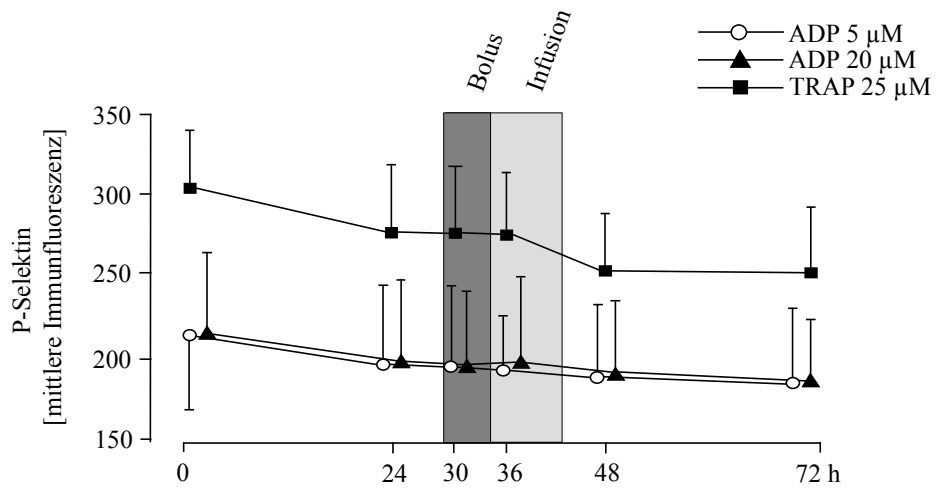
Abciximab



ASS	+	+	+	+	+	+
Clopidogrel	-	+	+	+	+	+
GPIIb-IIIa Blocker	-	-	+	+	-	-
Heparin	-	-	+	-	-	-

B

Tirofiban



ASS	+	+	+	+	+	+
Clopidogrel	-	+	+	+	+	+
GPIIb-IIIa Blocker	-	-	+	+	-	-
Heparin	-	-	+	-	-	-

### Abb 15: P-Selektin-Expression

Anhand der P-Selektin Expression ist die  $\alpha$ -Degranulation der zirkulierenden Thrombozyten bei Patienten im Zeitverlauf vor, während und nach der Koronarintervention dargestellt. Auch unter kombiniertem Einsatz aller untersuchten Antithrombotika ist keine signifikante Hemmung der P-Selektin Expression zu beobachten. Alle Werte sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung der mittleren Immunfluoreszenz dargestellt;  $n = 10$  pro Studiengruppe

### 3.1.4.2 ATP-Freisetzung

Unter ADP 20  $\mu\text{M}$  Stimulation konnte durch die kombinierte Gabe von ASS und Clopidogrel eine deutliche Inhibition der ATP-Freisetzung gegenüber dem Ausgangswert erzielt werden. In der Abciximabgruppe wurde die ATP-Freisetzung von 0,212 nMol auf 0,097 nMol und in der Tirofibangruppe von 0,267 auf 0,176 nMol reduziert. Nach Bolusgabe der GPIIb-IIIa-Blocker konnte bei mittlerer Stimulation eine weitere Hemmung der ATP-Freisetzung beobachtet werden. Bei Abciximab betrug die ATP-Freisetzung 0,073 nMol und bei Tirofiban 0,133 nMol. Während laufender Infusion und bis 36 Stunden nach Absetzen der Infusion blieb die ATP-Freisetzung in der Abciximabgruppe nach mittlerer Stimulation mit 0,073 bzw. 0,099 nMol auf Niveau des 30 Stunden-Wertes (Bolusgabe der GPIIb-IIIa-Blocker), in der Tirofibangruppe nahm die Freisetzung von ATP weiter gegenüber dem Ausgangswert (ASS-Monotherapie) ab (auf 0,135 bzw. 0,067 nMol).

Bei starker Stimulation (TRAP 25  $\mu\text{M}$ ) war in der Tirofibangruppe keine deutliche Veränderung gegenüber dem Ausgangswert zu beobachten. So blieb die ATP-Freisetzung bei den Abnahmezeitpunkten „24 h“ bis „36 h“ in einem Wertniveau von 1,116 nMol bei einem Ausgangswert von 1,119 nMol. In der Abciximabgruppe nahm die Freisetzung von ATP unter Abciximab-Bolusgabe und laufender Infusion gegenüber dem Ausgangswert von 1,268 auf 0,968 bzw. 0,904 nMol ab. D. h. unter starker Stimulation war in der Abciximabgruppe bei Gabe des GPIIb-IIIa-Blockers eine gewisse Hemmung zu erkennen, jedoch konnte bei keiner der beiden Patientengruppen keine signifikante Hemmung der ATP-Freisetzung gegenüber dem Ausgangswert erzielt werden (siehe Tabelle 8).

**Tab 8: ATP-Freisetzung**

<b>Zeitverlauf</b>	<b>0 h</b>	<b>24 h</b>	<b>30 h</b>	<b>36 h</b>
ASS	+	+	+	+
Clopidogrel	-	+	+	+
GPIIb-IIIa	-	-	+	+
Heparin	-	-	+	-
<b>Abciximab</b>				
ADP 5	0,150 ± 0,160	0,028 ± 0,030	0,022 ± 0,020*	0,014 ± 0,010*
ADP 20	0,212 ± 0,180	0,097 ± 0,050	0,073 ± 0,040*	0,099 ± 0,100*
TRAP 25	1,268 ± 0,520	0,554 ± 0,440	0,968 ± 0,680	0,904 ± 0,540
<b>Tirofiban</b>				
ADP 5	0,153 ± 0,189	0,035 ± 0,034	0,056 ± 0,049	0,041 ± 0,059
ADP 20	0,267 ± 0,264	0,176 ± 0,162	0,135 ± 0,144	0,067 ± 0,089
TRAP 25	1,199 ± 0,994	1,177 ± 0,579	1,116 ± 1,003	1,116 ± 1,003

*Anhand der ATP-Freisetzung ist die Sezernierung der dichten Granula der zirkulierenden Thrombozyten bei Patienten im Zeitverlauf vor, während und nach der Koronarintervention dargestellt. In beiden Gruppen ist unter einer kombinierten Therapie aller Antithrombotika eine signifikante Reduktion der ATP-Freisetzung zu beobachten. Alle Werte sind als Mittelwert ± Standardabweichung [nMol] angegeben; n = 10 pro Studiengruppe; GPIIbIIIa: GPIIbIIIa-Antagonisten; \* p < 0,05 gegenüber ASS-Monotherapie*

## 3.2 Experimenteller Teil

Um die Einflüsse der unterschiedlichen antithrombozytären Therapieschemata auf die plättcheninduzierte Endothelaktivierung zu bestimmen, wurden die endotheliale Sekretion von MCP-1 und die endotheliale Oberflächenexpression von ICAM-1 und uPAR nach Inkubation mit Überständen aus den Aggregationsbestimmungen der mit ADP 5  $\mu$ M, ADP 20  $\mu$ M und TRAP 25  $\mu$ M stimulierten Plättchen untersucht. Diese Überstände stammten entweder aus den beiden Patientenkollektiven des klinischen Teils der Studie (Abciximab- und Tirofibangruppe) oder aus der Kontrollgruppe (sechs gesunde Probanden).

### 3.2.1 ICAM-1-Expression

Weder die Inhibition der thrombozytären Cyclooxygenase-1 (ASS) noch der Antagonismus des thrombozytären ADP- (Clopidogrel) oder Fibrinogen-Rezeptors (Abciximab / Tirofiban) hatten einen statistisch signifikanten Effekt auf die plättcheninduzierte endotheliale ICAM-1-Expression. Auch durch Kombination aller untersuchten antithrombozytären Substanzen konnte weder bei mittlerer (ADP 20  $\mu$ M) noch bei starker Stimulation (TRAP 25  $\mu$ M) ein hemmender Effekt beobachtet werden. In der Abciximabgruppe war bei mittlerer Stimulation gegenüber dem Ausgangswert von 188 mittlere Immunfluoreszenz nur eine geringfügige Senkung der ICAM-1-Expression sowohl bei der Kombinationstherapie mit ASS und Clopidogrel als auch bei der Abciximab-Bolusgabe zu verzeichnen (180 bzw. 187 mittlere Immunfluoreszenz; siehe Abbildung 16). Während laufender Infusion sank die ICAM-1-Expression auf 172 mittlere Immunfluoreszenz. Bei der Tirofibangruppe nahm die mittlere Immunfluoreszenz bei Bolusgabe des Fibrinogenrezeptor-Antagonisten von einem Ausgangswert von 183 zunächst auf 199 mittlere Immunfluoreszenz zu und sank dann bei laufender Infusion auf 175 mittlere Immunfluoreszenz.

Bei starker Stimulation waren in beiden Patientengruppen lediglich bei laufender Infusion der GPIIb-IIIa-Rezeptorantagonisten eine Hemmung der ICAM-1-Expression zu erkennen. Von einem Ausgangswert von 180 in der Abciximabgruppe sank die mittlere Immunfluoreszenz auf 172, in der Tirofibangruppe nahm die ICAM-1-Expression von 182 auf 170 mittlere Immunfluoreszenz ab. Die Originaldaten sind im Anhang in Tabelle 17 aufgeführt (siehe Seite 119).



### 3.2.2 uPAR-Expression

Ähnlich wie bei der ICAM-1-Expression konnte durch keines der untersuchten antithrombozytären Pharmaka – auch in Kombination - eine statistisch signifikante Inhibition der uPAR-Expression erzielt werden.

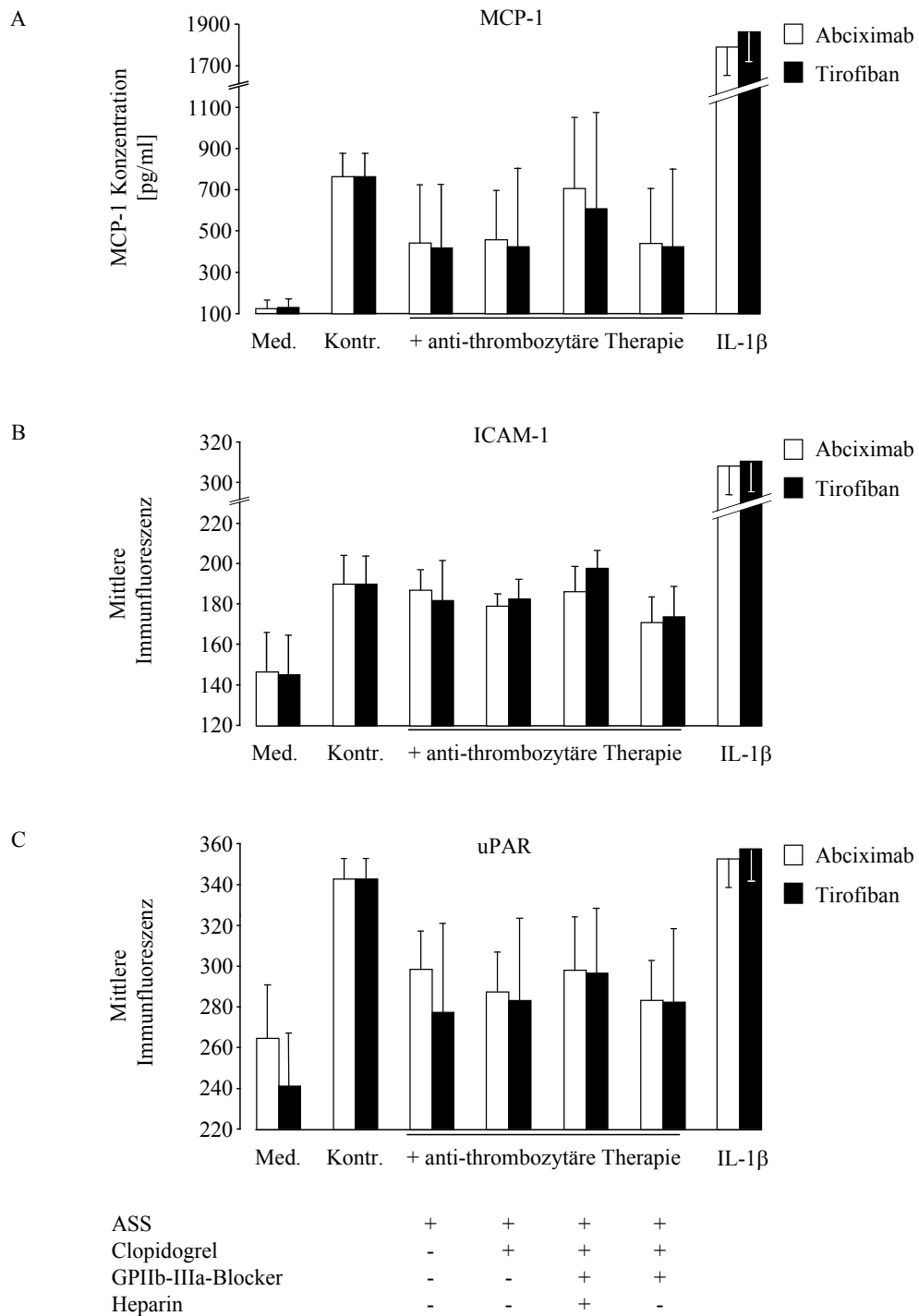
Bei mittlerer Stimulation wurde in der Abciximabgruppe nur bei laufender Infusion des GPIIb-IIIa-Blockers eine geringe Hemmung erzielt, hierbei sank die mittlere Immun-fluoreszenz von einem Ausgangswert von 299 auf 284 (siehe Abbildung 16). In der Tirofibangruppe nahm die uPAR-Expression bei mittlerer Stimulation gegenüber bei einem Ausgangswert von 278 auf 297 mittlere Immunfluoreszenz zu. Bei laufender Infusion von Tirofiban nahm die mittlere Immunfluoreszenz wieder auf 283 ab.

Bei Verwendung von stark stimuliertem PRP-Überständen kam es bei beiden Patientengruppen nur bei laufender Infusion der GPIIb-IIIa-Blocker zu einer gewissen Abnahme gegenüber dem Ausgangswert. In der Abciximabgruppe wurde die mittlere Immunfluoreszenz bei einem Ausgangswert von 290 auf 281 gesenkt, bei der Tirofibangruppe sank die uPAR-Expression von 277 auf 273 mittlere Immunfluoreszenz. Die Originaldaten sind im Anhang in Tabelle 18 aufgeführt (siehe Seite 120).

### 3.2.3 MCP-1 Freisetzung

Auch die MCP-1 Freisetzung konnte durch die in der vorliegenden Studie angewendeten antithrombozytären Strategien nicht signifikant inhibiert werden.

Während bei beiden Patientengruppen bei mittlerer Stimulation die MCP-1 Freisetzung nach Bolusgabe der GPIIb-IIIa-Blocker gegenüber dem Ausgangswert anstieg (von 0,613 auf 0,824 pg/ml bei Abciximab und von 0,541 auf 0,711 pg/ml bei Tirofiban), nahm die Freisetzung von MCP-1 bei laufender Infusion wieder ab (auf 0,579 pg/ml bei Abciximab und auf 0,550 pg/ml bei Tirofiban) (siehe Abb. 16). Bei starker Stimulation hingegen wurde eine Hemmung der MCP-1 Freisetzung gegenüber dem Ausgangswert bei Bolusgabe von Abciximab und Tirofiban erzielt (von 0,638 auf 0,534 pg/ml bei Abciximab und von 0,566 auf 0,469 pg/ml bei Tirofiban). Die Originaldaten sind im Anhang in Tabelle 16 aufgeführt (siehe Seite 118). Die Überstände der Kontrollgruppe erhöhten sowohl die Expression von ICAM-1 und uPAR als auch die MCP-1 Freisetzung signifikant gegenüber dem Medium ( $p < 0,05$ ).



**Abb 16: Plättcheninduzierte Endothelaktivierung**

Dargestellt ist die plättcheninduzierte Endothelaktivierung anhand der MCP-1 Freisetzung und der uPAR- und ICAM-1 Expression. Die Patienten- und Kontrollüberstände wurden nach mittlerer Stimulation (ADP 20  $\mu$ M) gewonnen. Auch unter kombinierter antithrombozytärer Therapie konnten keine signifikanten Unterschiede gegenüber Kontrolle beobachtet werden. Alle Werte wurden als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung dargestellt; n = 10 pro Studien-  
gruppe

## 4 Diskussion

Um das klinische Outcome von Patienten nach koronarem Stenting zu verbessern kommen unterschiedliche thrombozyteninhibierende Substanzen, wie ASS, das Thienopyridin Clopidogrel und die GPIIb-IIIa-Antagonisten Abciximab und Tirofiban zum Einsatz.

Obwohl die Fibrinogenrezeptor-Antagonisten Abciximab und Tirofiban, kombiniert mit einer Therapie bestehend aus ASS und Clopidogrel, in der interventionellen Kardiologie einen weitverbreiteten Einsatz finden, fehlt bis heute ein direkter und detaillierter Vergleich ihrer unterschiedlichen Effekte auf die Thrombozytenfunktion.

In der vorliegenden Studie wurden deshalb die plättcheninhibierenden Effekte der beiden GPIIb-IIIa-Rezeptorantagonisten, Abciximab und Tirofiban, jeweils kombiniert mit Clopidogrel und ASS, im Zeitverlauf vor und nach der Implantation koronarer Gefäßstützen untersucht.

Die Hauptergebnisse dieser randomisierten klinischen Studie sind im Folgenden dargestellt:

(1) Es konnte gezeigt werden, dass beide GPIIb-IIIa-Antagonisten nach Bolusgabe und während kontinuierlicher Infusion gleichermaßen effektiv in der Hemmung der Thrombozytenaggregation bei hochdosierter ADP- oder Thrombinrezeptor-Stimulation waren. Aufgrund der unterschiedlichen pharmakokinetischen Eigenschaften der beiden Präparate hatte Abciximab einen prolongierten inhibitorischen Effekt nach Beendigung der Infusion im Vergleich zu Tirofiban.

(2) Während die kombinierte Therapie mit ASS und Clopidogrel die Sekretion der  $\alpha$ -Granula geringfügig vermindert hatte, konnte durch den Einsatz von Abciximab oder Tirofiban kein weiterer inhibitorischer Effekt auf die thrombozytäre Freisetzungsreaktion erzielt werden.

(3) Keine der getesteten antithrombotischen Therapien hatte einen signifikanten Effekt auf die Plättchen-induzierte Endothelzellaktivierung, wie anhand der endothelialen Freisetzung von MCP-1 und der endothelialen Oberflächenexpression von ICAM-1 und uPAR demonstriert werden konnte.

#### 4.1 Plättchenaggregation und –deaggregation

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die adjuvante Therapie mit ASS und Clopidogrel eine signifikante Inhibition der Plättchenaggregation im Vergleich zur ASS-Monotherapie bewirkt. Dies belegt, dass durch die gleichzeitige Inhibition der Cyclooxygenase- und der ADP-abhängigen Plättchenaktivierung (ASS und Clopidogrel) ein additiver antithrombozytärer Effekt erzielt werden kann.

Entsprechend wurde in großangelegten klinischen Studien gezeigt, dass durch Kombination von ASS und Clopidogrel eine Reduktion von Stent-Thrombosen erzielt werden konnte (Leon 1998, The CURE Committee 2001). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit untermauern die Resultate der oben erwähnten Studien, da sie das pathophysiologische Korrelat auf zellulärer Ebene des Thrombozyten darstellen.

In der vorliegenden Studie war eine signifikante Inhibition der Plättchenaggregation bereits innerhalb von 24 h nach Gabe der Aufsättigungsdosis von Clopidogrel (300mg) erkennbar. Dies steht im Einklang mit früheren Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe, in denen gezeigt wurde, dass Clopidogrel, als Aufsättigungsdosis verabreicht, in den ersten sechs Stunden nach Beginn der Behandlung eine signifikante Plättchen Inhibition bewirkt, wohingegen ein signifikanter plättchen-inhibierender Effekt bei Ticlopidin erst 48 - 72 Stunden nach Verabreichung gesehen wurde (Gawaz 2001, Müller 2001).

Obwohl für beide Thienopyridine, Ticlopidin und Clopidogrel, nachgewiesen ist, dass sie effektiv schwerwiegende kardiovaskuläre Ereignisse bei Patienten mit stabiler Gefäßkrankheit und konsekutivem koronaren Stenting verhindern (CAPRIE Steering Committee 1996; Bertrand 2000; Muller 2000; Mishkel 1999), ist der schnellere Wirkeintritt von Clopidogrel gegenüber Ticlopidin als vorteilhaft anzusehen. Dies ist insbesondere bei der Prävention von schwerwiegenden kardialen Ereignissen bei Hochrisikopatienten im Rahmen des koronaren Stenting von Bedeutung (Müller 2001).

Die Bolusgabe und kontinuierliche Infusion von Abciximab oder von Tirofiban führte zu einer mehr als 90 prozentigen mittleren Inhibition bei ADP-induzierter ex vivo Thrombozytenaggregation. Während der Verabreichung sind beide Substanzen äquipotent im Hinblick auf die antiaggregatorische Wirkung.

Nach Beenden der Infusion hatte jedoch Abciximab im Vergleich zu Tirofiban einen prolongierten inhibitorischen Effekt. Dies entspricht den theoretischen Erwartungen bisheriger Untersuchungen, da Tirofiban im Gegensatz zu Abciximab reversibel an den Fibrinogenrezeptor bindet (Deckelbaum 1997), vergleichende Untersuchungen fehlen jedoch bislang.

Anders als nach ADP-Stimulation war bei Aktivierung des Thrombinrezeptors durch TRAP die Inhibition der Plättchenaggregation deutlich schwächer ausgeprägt. Es bestand jedoch – wie bei Stimulation mit ADP - kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Substanzen. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen der von Neumann et al. durchgeführten Untersuchung (Neumann 2001). In seiner Arbeit konnte ebenfalls durch GPIIb-IIIa-Antagonisten keine vollständige Inhibition der TRAP-induzierten Aggregation erzielt werden.

Die Ursache für die diskrepanz unterschiedliche Inhibition von ADP- und TRAP-induzierter Plättchenaggregation ist am ehesten in der Mobilisation des internen Pools von nicht-geblockten GPIIb-IIIa-Rezeptoren durch den potenteren Agonist TRAP zu sehen (Nurden 1999; Gawaz 2000; Kleiman 1995; Morgenstern 1992).

Entsprechend konnten Dickfeld et al. *in vitro* selbst bei Konzentration von 100 µg/ml Abciximab und 250 ng/ml Tirofiban keine komplette Inhibition (80 %) der TRAP induzierten Aggregation erzielen. Dies bedeutet, dass die gespeicherten GPIIb-IIIa Rezeptoren selbst bei sehr hohen Konzentrationen der Inhibitoren, die *in vivo* ohnehin nicht erreicht werden (Barrett 1993), nicht vollständig blockiert werden können.

Diese beschriebenen einschränkenden Effekte auf die Inhibition Plättchenfunktion nach TRAP-Stimulation durch die Mobilisierung des internen Pools an GPIIb-IIIa betreffen die beiden untersuchten Fibrinogenrezeptor-Antagonisten Tirofiban und Abciximab gleichermaßen. Möglicherweise liefern diese Beobachtungen damit eine Erklärung dafür, warum bei manchen Patienten mit erhöhter Thrombin-Aktivität, wie sie z. B. bei dem akuten Koronarsyndrom auftritt, die Koronarthrombose trotz adäquater Gabe der GPIIb-IIIa-Blocker (Dosierung nach den Richtlinien der EPISTENT- und der RESTORE-Studie) nicht vollständig gehemmt werden kann. Bei diesen Patienten wäre bei entsprechendem pharmakologischen Monitoring eine Erhöhung der Dosierung für eine Optimierung der Therapie zu erwägen.

Die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Ergebnisse der Deaggregation zeigen, dass unter ADP-Stimulation eine vollständige Auflösung der bereits bestehenden Plättchenaggregate bei der Kombination aller untersuchten Medikamente erreicht werden konnte.

Die gesteigerte Deaggregation könnte für die Behandlung des akuten Koronarsyndroms von zentraler Bedeutung sein (The PRISM Investigators, The CAPTURE Investigators). Darüber hinaus haben aktuelle Studien gezeigt, dass die Kombination von GPIIb-IIIa-Antagonisten mit Fibrinolytika sich vorteilhaft auf die Rekanalisationsrate und damit auch der Mortalitätsrate bei der Fibrinolyse-therapie des akuten Myokardinfarktes auswirkt (The IMPACT-AMI-Investigators 1997, The PARADIGM-Investigators 1998, Cannon 1999). Auch die durch Fibrinolytika induzierte Plättchenaktivierung wird durch die kombinierte Gabe mit GPIIb-IIIa-Inhibitoren deutlich inhibiert (Bertolino 1992).

#### **4.2 Steigung der Aggregationskurve**

Ein weiteres untersuchtes Kriterium dieser Studie war die Steigung der Aggregationskurve („Slope“), d. h. die Geschwindigkeit, mit welcher die Thrombozyten aggregieren.

Bereits die kombinierte Gabe von ASS und Clopidogrel konnte den Slope bei mittlerer Stimulation signifikant senken. Dieser Effekt wurde durch den Einsatz von GPIIb-IIIa-Inhibitoren noch weiter gesteigert, so dass nur noch eine minimale Aggregationsgeschwindigkeit zu erkennen war. Im Gegensatz zur mittleren Stimulation mit ADP 20  $\mu\text{M}$  zeigte die kombinierte Therapie mit ASS und Clopidogrel bei starker Stimulation (TRAP 25  $\mu\text{M}$ ) keinen signifikanten inhibitorischen Effekt, erst die Ergänzung der Therapie mit GPIIb-IIIa-Blockern führte zu einer signifikanten Hemmung gegenüber der ASS-Monotherapie ( $p < 0,05$ ).

Neumann et al. hatten bei einem gleichen Versuchsaufbau, jedoch einer höheren TRAP-Konzentration (50  $\mu\text{M}$  statt wie in der vorliegenden Arbeit 25  $\mu\text{M}$ ), eine Hemmung der Aggregationsgeschwindigkeit auf ca. 50 % des Ausgangswertes nach Bolusgabe von Abciximab, Tirofiban und Eptifibatide beobachtet. In der vorliegenden Arbeit ist eine Aggregationsgeschwindigkeit von umgerechnet ca. 25 – 30 % des Ausgangswertes (ASS-Monotherapie) nach Bolusgabe der GPIIb-IIIa-Blocker erreicht worden. Berücksichtigt man die unterschiedliche TRAP-Konzentration, so sind die beobachteten Ergebnisse der beiden in vivo durchgeführten Studien somit als im Einklang stehend zu betrachten.

Ergänzend zu den Ergebnissen der Aggregation verdeutlichen die Resultate aus den „Slope“-Messungen die Wichtigkeit eines synergistischen Einsatzes verschiedener antithrombozytärer Substanzen in der Therapie des akuten Koronarsyndroms, da es bei reinem Einsatz der Einzelsubstanzen zu keiner signifikanten Hemmung des Slope gekommen war.

### **4.3 LIBS-1 und PAC-1**

Zur Detektion submaximaler Veränderungen des Aktivierungsgrades wurde die Durchflusszytometrie eingesetzt (Mikroaggregation), mit der die Oberflächenexpression unterschiedlicher Antigene auf individuellen Zellen gemessen werden kann (Abrams 1991, Gawaz 1993, Becker 1994, Böck 1994, Matzdorff 2001). Mit Hilfe der beiden Oberflächenmarker anti-LIBS-1 und anti-PAC-1 war es möglich, die Induktion einer intrinsischen Aktivierung sowie den Aktivierungszustand des GPIIb-IIIa-Rezeptors zu bestimmen (Gawaz 1994, Michelson 1996).

Durch LIBS-Induktion können GPIIb-IIIa-Antagonisten einen aktiven funktionalen Status des Rezeptors induzieren und somit nach ihrem Abdissoziieren einen proaggregatorischen Effekt erzeugen (Du 1991, Honda 1998, Peter 1998). Während die LIBS-1-Expression bei Gabe von Tirofiban erneut anstieg, führte die Gabe von Abciximab zu einer additiven signifikanten Senkung der LIBS-1-Expression, die auch nach Abstellen der Erhaltungsinfusion anhielt. Diese Ergebnisse legen nahe, dass Tirofiban in vivo offensichtlich zu einer Aktivierung führt, wohingegen Abciximab die LIBS-1 Induktion, und damit indirekt eine intrinsische Plättchenaktivierung unterdrückt.

Dickfeld et al. haben für Abciximab und Tirofiban eine LIBS-Induktion beschrieben, wobei diese bei Tirofiban ausgeprägter, als bei Abciximab war (Dickfeld 2001). Die in dieser in vitro durchgeführten Studie festgestellte LIBS-Induktion durch Tirofiban-Gabe konnte in der vorliegenden klinischen Studie bestätigt werden. Im Gegensatz dazu hat die LIBS-1-Expression nach Bolusgabe und laufender Infusion von Abciximab auch unter starker Stimulation deutlich abgenommen, d. h. eine LIBS-Induktion von Abciximab war klinisch nicht reproduzierbar.

Analog zu der Untersuchung der LIBS-1-Expression zeigte Abciximab seine Überlegenheit gegenüber Tirofiban auch in der Reduktion der PAC-1-Expression und damit der Reduktion der Menge an aktivierten GPIIb-IIIa-Rezeptoren. Während es nach Gabe von

Tirofiban nur zu einer geringen zusätzlichen Abnahme an PAC-1-Expression gegenüber der kombinierten Therapie von ASS und Clopidogrel kam, wurde die PAC-1-Expression durch Abciximabgabe gegenüber der kombinierten Therapie von ASS und Clopidogrel signifikant gehemmt ( $p < 0,05$ ). Wiederum konnte die Gabe von ASS und Clopidogrel zu einer Reduktion der PAC-1-Expression in beiden Behandlungsgruppen (Abciximab- und Tirofibangruppe) gegenüber der ASS-Monotherapie führen.

Caron et al haben bei den mit Tirofiban und Abciximab behandelten isolierten Thrombozyten zwar eine Hemmung der Aggregation durch die beiden oben genannten Medikamente feststellen können, jedoch ließ sich eine TRAP-induzierte Aktivierung der Plättchen – gemessen anhand der PAC-1 Expression – auch bei der gewählten Konzentration von 100 nMol/l nicht inhibieren (Caron 2002). Dieses mittels in vitro Untersuchung gewonnene Ergebnis verdeutlicht, dass die GPIIb-IIIa-Rezeptorantagonisten zwar als Endstrecke der gemeinsamen Aktivierungssignalwege das Aneinanderbinden der GPIIb-IIIa-Rezeptoren über die Fibrinogenbrücken verhindern können, dass aber der Thrombozyt aktiviert bleibt, und womöglich nach Abdissoziieren von Abciximab oder Tirofiban bei noch bestehender Aktivierung aggregieren kann. Im Gegensatz zu den Resultaten von Caron et al war bei der vorliegenden Studie unter Abciximab-Therapie eine Hemmung der PAC-1-Expression zu beobachten, und dies bereits bei einer niedrigeren Konzentration als bei den in vitro Untersuchungen von Caron. Dies legt einen möglichen Vorteil von Abciximab gegenüber Tirofiban in der Patientenbehandlung im Rahmen der koronaren Intervention nahe.

Diese unterschiedliche Beeinflussung des Aktivierungsgrades des Fibrinogenrezeptors und der oben erwähnten intrinsischen Aktivierung könnte eine mögliche Ursache für die in der TARGET-Studie nachgewiesene bessere klinische Langzeitprognose von Abciximab-behandelten Patienten gegenüber Tirofiban-therapierten Patienten nach koronarer Intervention sein.



#### 4.4 Degranulation

Erhöhte Plättchenaktivierung und Granula-Sekretion sind von zentraler Bedeutung für die Pathophysiologie der akuten und subakuten Stent-Thrombose. Man geht heutzutage davon aus, dass diese beiden Effekte entscheidend sowohl zur Progression der Atherosklerose per se als auch zur Gefäßrestenose im Anschluss an eine koronare Interventionen beitragen (Gawaz 2001, Dickfeld 2001).

Um den Einfluss der gegenwärtig angewandten antithrombozytären Behandlungsstrategien auf die Plättchen-Sekretion zu evaluieren, wurde die Oberflächenexpression von P-Selektin als Indikator für die  $\alpha$ -Granula Exozytose sowie die ATP-Freisetzung als Marker für die Freisetzung der dichten Granula untersucht. Durch die Inhibition der Thromboxan  $A_2$ - und der ADP-Signaltransduktionswege, d. h. durch die kombinierte Therapie von ASS und Clopidogrel, wurde die thrombozytäre  $\alpha$ -Granula Freisetzung bei schwacher Stimulation (ADP) unterdrückt. Dieser Effekt war jedoch bei starker Stimulation (TRAP) nicht mehr zu beobachten.

Die zusätzliche Inhibition des thrombozytären Fibrinogenrezeptors durch Abciximab oder Tirofiban hatte keinen additiven Effekt auf die Reduktion der Plättchensekretion. Im Gegenteil, die kontinuierliche Infusion sowohl von Abciximab als auch Tirofiban tendierte im Vergleich zu der kombinierten Therapie von ASS und Clopidogrel dazu, die P-Selektin-Expression zu steigern. In früheren *in vitro* durchgeführten Studien wurde die Hypothese aufgestellt, dass GPIIb-IIIa-Rezeptorantagonisten mit LIBS-Induktion durch eine Erhöhung der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration die Degranulation fördern. Dies legt nahe, dass man bei einer Senkung der LIBS-Induktion durch Abciximab eine Hemmung der Degranulation erwartet hätte. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen jedoch, dass beide GPIIb-IIIa-Rezeptoren bei starker Stimulation durch Thrombin schwache Inhibitoren der thrombozytären Freisetzungsreaktion der  $\alpha$ -Granula sind. Die Degranulation wurde kaum inhibiert bzw. stieg nach Bolusgabe der GPIIb-IIIa-Blocker noch gering an. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit früheren Untersuchungen, z. B. von Neumann et al., welche in einem direkten Vergleich von Abciximab, Tirofiban und Eptifibatide bei starker Stimulation einen geringen Anstieg der P-Selektin Expression *in vivo* bei allen drei GPIIb-IIIa-Blockern beobachtet haben.

Somit ist wahrscheinlich, dass eine Hemmung der LIBS-Induktion *in vivo* unter erhöhter Thrombin-Aktivität, wie man sie im Rahmen der Stentimplantation vorfindet, keinen bedeutsamen Einfluss auf die Degranulation der Thrombozyten hat.

Bei der ATP-Freisetzung nach schwacher Stimulation (ADP) war eine deutliche Hemmung durch die Therapie mit ASS plus Clopidogrel in beiden Gruppen zu verzeichnen. Auch die Bolusgabe und Erhaltungsinfusion der GPIIb-IIIa-Blocker konnte zu einer weiteren Reduktion führen, wobei der Effekt bei Abciximab ausgeprägter und länger anhaltend war. Bei der Verwendung von starken Agonisten (TRAP) war jedoch keines der untersuchten Medikamente in der Lage, die Freisetzung signifikant zu blockieren.

Im Gegensatz zur  $\alpha$ -Degranulation konnte somit nach schwacher Stimulierung ein inhibitorischer Effekt auf die Freisetzung der dichte Granula nachgewiesen werden. Hierbei zeigte sich Abciximab dem Tirofiban in der Wirksamkeit überlegen. Bei starker Stimulation jedoch hatte keines der untersuchten Medikamente einen entscheidenden inhibitorischen Einfluss auf die Freisetzung der dichten Granula.

Entsprechend konnten Gawaz et al. in vitro für Abciximab zeigen, dass selbst bei Konzentrationen von 100  $\mu\text{g/ml}$  von Abciximab nach TRAP-Stimulation nur eine geringfügige Inhibition der ATP-Freisetzung erzielt werden konnte. Auch Caron et al konnten bei ihren in vitro Untersuchungen an isolierten Plättchen zeigen, dass bei IC<sub>50</sub> Konzentrationen von 100 nMol/l bei Abciximab und Tirofiban (entspricht ca. 21  $\mu\text{g/ml}$  bei Abciximab bzw. ca. 53 ng/ml bei Tirofiban) die P-Selektin-Expression nach TRAP-Stimulation nicht signifikant gehemmt werden kann (Caron 2002).

Da bei den derzeit eingesetzten Dosierungen von Abciximab und Tirofiban eine Konzentration von ca. 1  $\mu\text{g/ml}$  bzw. 13-30 ng/ml beim Patient erreicht wird, ist davon auszugehen, dass in vivo keine ausreichende Inhibition der Degranulation erreicht werden kann. Die in unserer Studie gewählte Dosis (nach EPISTENT für Abciximab und RESTORE für Tirofiban) entspricht einer mittleren 80 prozentigen Besetzung der GPIIb-IIIa-Rezeptoren, bei welcher nach Steinhubl et al. von einer ausreichenden Inhibition auszugehen ist (The RESTORE-Investigators 1997, The EPISTENT-Investigators 1998, Steinhubl 2000). Bei einer höhergradigen Rezeptorblockierung würde das Risiko für den Patienten, eine Blutung zu erleiden, beträchtlich gesteigert werden.

Zusammenfassend muss festgestellt werden, dass die Plättchendegranulation selbst durch synergistischen Einsatz aller untersuchten Substanzen (ASS, Clopidogrel und Abciximab/Tirofiban) nur unbefriedigend inhibiert werden konnte. Da durch die Freisetzung der thrombozytären Granula eine inflammatorische und mitogene Reaktion in der Gefäßwand initiiert werden kann, ist es eine künftige Herausforderung, die thrombozytären Freisetzungreaktionen durch Entwicklung neuer Substanzen effektiv zu hemmen.

In experimentellen Studien konnte zwar ein inhibierender Effekt des Fibrinrezeptor-antagonisten EMD sowohl auf die Freisetzung der  $\alpha$ -Granula als auch der dichten Granula nach Thrombin-Stimulation demonstriert werden, es bleibt jedoch in klinischen Untersuchungen abzuwarten, ob dieser Effekt auch in vivo nachzuweisen ist (Dickfeld 2001).

#### 4.5 Plättchenabhängige Thrombingeneration

Thrombozyten spielen eine zentrale Rolle in der Regulation der Koagulation (Bever 1993). Die aktivierte Thrombozyten-Oberfläche fördert die Aktivierung von Prothrombin und dadurch die Thrombingeneration durch das Bereitstellen einer katalytischen Oberfläche für das Zusammenwirken der plasmatischen Faktoren des Prothrombinase-Komplexes (Sims 1989). In der Umgebung von Plättchen-Aggregaten können bereits kleine Mengen von Thrombin den katalytischen Prozess der plättchenabhängigen Thrombingeneration in Gang setzen, welcher im Gegenzug die Thrombin-Produktion in Gebieten erhöhter Plättchenaktivierung verstärkt. In der Literatur ist die Reduktion der plättchenabhängigen Thrombingeneration durch Gabe von GPIIb-IIIa-Hemmern beschrieben. Tam und Simon mutmaßten, dass durch den inhibitorischen Effekt von Abciximab sowohl auf den GPIIb-IIIa als auch auf den Vitronektin-Rezeptor möglicherweise die  $\alpha_v\beta_3$ -medierte Thrombingeneration inhibitorisch beeinflusst sein könnte (Simon 1997, Tam 1998).

Die Ergebnisse der vorliegenden klinischen Studie zeigen, dass eine solche Hemmung der Thrombingeneration weder durch Abciximab noch durch Tirofiban in einem statistisch signifikanten Bereich erreicht werden konnte. Bei den in vitro durchgeführten Untersuchungen von Dickfeld et al. wurde bei einer Konzentration von ca. 3  $\mu\text{g/ml}$  bei Abciximab und ca. 1,5  $\text{ng/ml}$  bei Tirofiban nach Tissue-Faktor-Stimulation eine Hemmung der Thrombingeneration gegenüber der Kontrolle beschrieben. Hingegen zeigte sich bei Thrombinstimulation unter einer Dosis von ca. 10  $\mu\text{g/ml}$  bei Abciximab und ca. 75  $\text{ng/ml}$  bei Tirofiban keine signifikante Reduzierung der plättchenabhängigen Thrombingeneration.

Interessanterweise konnte in der genannten Untersuchung EMD 122347 als einziges der evaluierten Medikamente bei Thrombin-Stimulation eine signifikante Inhibition der Thrombingeneration erzielen.

Abgesehen davon, dass die Thrombozyten im Gegensatz zu in vitro Untersuchungen in vivo beim Passieren der durch die koronare Intervention verletzten Gefäßwand subendothelialen Komponenten exponiert sind und in Folge aktiviert werden, sind die Konzentrationen der GPIIb-IIIa-Rezeptoren, bei denen ein signifikanter inhibitorischer Effekt gegenüber der Kontrolle erzielt werden konnte, weit über den Plasmakonzentrationen die bei heutiger Dosierung beim Patienten erreicht werden. Somit konnte die theoretisch zu erwartende Senkung der Thrombingeneration durch die GPIIb-IIIa-Blocker bei den verwendeten Plasmadosierungen klinisch nicht erzielt werden.

Da die Agonisten-induzierte Thrombingeneration durch keines der evaluierten antithrombozytären Substanzen beeinflusst wurde, zeigt dieses Ergebnis, dass der Einsatz von Heparin, welches als einziges der untersuchten Medikamente die plättchenabhängige Thrombingeneration signifikant gegenüber der ASS-Monotherapie inhibieren konnte, im Rahmen der Stentimplantation zur Risikoreduktion einer arteriellen Thrombose bzw. Restenose sinnvoll ist. Dies gilt besonders, wenn man davon ausgeht, dass durch die Exprimierung von subendothelialer Matrix und die Freisetzung thrombogener Substanzen vorbeifliessende Thrombozyten aktiviert werden können. Die Oberfläche dieser aktivierten Thrombozyten kann als Ausgangspunkt für die Thrombingeneration dienen (Scharf 1992, Wittkowsky 2002).

#### **4.6 Plättchen-induzierte Endothelaktivierung**

Neben der Plättchenaggregation, welche zu akuter und subakuter Thrombose im Anschluss an eine koronare Intervention führt, ist die Plättchenadhäsion an die endotheliale Zelloberfläche ein wichtiges Phänomen, das zur Plättchenaktivierung beiträgt. Durch die Freisetzung von Inhaltsstoffen aus  $\alpha$ -Granula und dichten Granula haben die Thrombozyten das Potential, wichtige endotheliale Zellfunktionen wie Chemotaxis und Migration zu regulieren (Gawaz 1997, Gawaz 2000).

In der aktuellen Studie konnte anhand der Untersuchung an gesunden Probanden gezeigt werden, dass die von aktivierten Plättchen freigesetzte Stoffe die endotheliale Sekretion von MCP-1 signifikant erhöhen und die endotheliale Oberflächenexpression von uPAR und ICAM-1 induzieren.

Es ist bemerkenswert, dass keines der evaluierten antithrombozytären Behandlungsregime substantiell die plättchen-induzierte Erhöhung der MCP-1-Freisetzung oder die verstärkte ICAM-1- oder uPAR-Expression des Gefäßendothels reduzieren konnte.

Dieses Ergebnis legt das Fehlen eines dosisabhängigen Effektes der antithrombozytären Medikamente auf die thrombozytären Freisetzungsprozesse nahe. Da die thrombozytären Freisetzungsstoffe hochgradig mitogen sind und endotheliale Entzündungsreaktionen und migratorische Abläufe initiieren, sind wahrscheinlich weder ASS noch Thienopyridine oder GPIIb-IIIa-Antagonisten in den vorliegenden Konzentrationen imstande, die plättchen-induzierten Restenoseprozesse effektiv zu reduzieren (Le Breton 1996).

#### **4.7 Direkter Vergleich Tirofiban/Abciximab**

Beide untersuchten GPIIb-IIIa-Rezeptorantagonisten, Abciximab und Tirofiban, haben den gleichen Wirkmechanismus, sie inhibieren den letzten Teil der Signaltransduktionsstrecke der Plättchenaggregation, d. h. die Fibrinogenbindung an den GPIIb-IIIa-Rezeptor des Thrombozyten.

Im Rahmen der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass beide Fibrinogenrezeptorantagonisten periinterventionell gleichermaßen effektiv bei der Reduktion der Agonistinduzierten Plättchenaggregation sind, was den Ergebnissen von Neumann et al. entspricht (Neumann 2001).

Bezüglich der plättchenabhängigen Trombingenerierung oder der Plättchendegranulation und damit der plättchen-induzierte endothelialen Aktivierung konnten weder Abciximab noch Tirofiban eine signifikante Hemmung erzielen.

Allerdings zeigte Abciximab einen deutlichen Vorteil bei der Inhibierung der LIBS-Induktion und der intrinsischen Aktivierung von GPIIb-IIIa gegenüber Tirofiban. Dieser vermutlich durch die höhere Molekülgröße und die Kreuzreaktion mit dem Vitronektin- und dem Mac-1-Rezeptor bedingte Effekt könnten eine Ursache für die Überlegenheit von Abciximab gegenüber Tirofiban hinsichtlich der Langzeitwirkung auf die Reduzierung des kombinierten Risikos von ischämischen Ereignissen gegenüber dem rein GPIIb-III spezifischen Tirofiban sein. Die TARGET Studie hat diese Reduktion – speziell bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom - im direkten Vergleich nach sechs Wochen und sechs Monate nach der Intervention demonstriert (The TARGET Investigators 2001).

Auch die 1-Jahres-Nachuntersuchungen ergaben eine bessere Wirksamkeit von Abciximab (SoRelle 2002).

#### **4.8 Therapeutische Aussichten**

Da bisher nur bereits aktivierte Thrombozyten medikamentös behandelt wurden, wäre die Inhibition eines früheren Schrittes in der Entwicklung des arteriellen Thrombus ein neuer Therapieansatz. So konnten Massberg et al. tierexperimentell zeigen, dass die Blockierung des endothelialen GPVI-Rezeptors (Collagen) die Anheftung von Thrombozyten signifikant inhibieren konnte (Massberg 2002, unveröffentlichte Daten). Hierdurch kommt es vermutlich zu keiner weiteren Aktivierung und möglichen Sezernierung von weiteren pro-aggregatorischen Substanzen des Thrombozyten. Diese Beobachtungen gilt es in weiteren Studien zu verifizieren.

Bei dem zunehmenden Einsatz der GPIIb-IIIa-Antagonisten in der Kardiologie auf der einen Seite und dem durch die Gesundheitsreform und die Einführung neuer fallbezogener Pauschalvergütungen (DRG) zunehmenden Druck, Kosten einzusparen, auf der anderen Seite, ist der finanzielle Gesichtspunkt in der Therapie von Patienten mit akutem Koronarsyndrom nicht unerheblich. Eine koronare Intervention mit adjuvanter Abciximab-Therapie kostet ca. das 3-4 fache eines Eingriffes mit adjuvanter Gabe von Tirofiban (Topol 1999). Zwar hat die vorliegende Studie ähnlich wie andere aktuelle Untersuchungen die Gleichwertigkeit bezüglich der Inhibition der Aggregation von Abciximab und Tirofiban demonstriert, jedoch belegen die Ergebnisse der aktuellen Studien eine bessere Langzeitwirkung von Abciximab auf die Reduktion des kombinierten Risikos ischämischer Ereignisse (The TARGET Investigators 2001, Herrmann 2002, SoRelle 2002). Inwieweit hierdurch Kosten im Langzeitverlauf letztendlich eingespart werden, ist derzeit noch offen, so dass es, bis eine kostengünstigere gleichwertige Therapie zur Verfügung steht, zu erwägen ist, nur Hochrisikopatienten mit erhöhtem Troponin T eine adjuvante Therapie mit Abciximab im Rahmen einer sofortigen koronaren Intervention zukommen zu lassen, da Abciximab gerade in dieser Patientengruppe den größten Effekt gezeigt hat (The EPISTENT Investigators 1998).

Ein weiterer wichtiger Aspekt in der aktuellen Diskussion über die Therapie des akuten Koronarsyndroms ist die Dosierung der GPIIb-IIIa-Rezeptorantagonisten. Man ging bisher von den Dosierungen der RESTORE und EPISTENT-Studien als Richtlinie aus. Bei diesen Dosierungen war im Mittel eine 80-90 prozentige GPIIb-IIIa-Rezeptorblockade erzielt worden. Es bestehen jedoch große Patienten-interindividuelle Variationen im Grad der Rezeptorblockade bei gleicher Dosierung der Fibrinogenrezeptor-Antagonisten, so dass für Abciximab während der gesamten Dauer der Erhaltungsinfusion eine große Streuung des Ausmaßes der Thrombozytenaggregationshemmung vorlag (Holmes 2001, Gawaz 2002). Möglicherweise kommt es zu diesem Effekt durch die oben beschriebene neu Exprimierung von GPIIb-IIIa-Rezeptoren aus dem intrathrombozytären Pool heraus, da diese durch das schon irreversibel an vorhandene Rezeptoren gebundene Abciximab nicht erreicht werden, und die Erhaltungsinfusion aufgrund des Rezeptor-Substanz-Verhältnisses von 1,5-2:1 für Abciximab nicht ausreicht, um alle neu exprimierten Rezeptoren zu blockieren. Des Weiteren ist von Kereiakes et al. eine zu niedrige Dosierung von Tirofiban beschrieben, so dass initial nur eine < 80 prozentige Rezeptorbesetzung erfolgt sei (Kereiakes 1999). Da dieser niedermolekulare GPIIb-IIIa-Antagonist bereits bei jetziger Dosierung in einem großem Überschuss appliziert wird (Rezeptor-Substanz-Verhältnis ca. 250:1), wäre zu testen, ob eine höhere Dosierung wirklich einen größeren inhibitorischen Effekt auf die Thrombozytenfunktion erzielen kann.

Des Weiteren ist eine einheitliche Bewertung der Studien durch Verwendung unterschiedlicher Antikoagulation der Blutproben erschwert. Unter dem  $\text{Ca}^{2+}$ -Chelatbildner Zitrat ist nach Gabe von niedermolekularen GPIIb-IIIa-Rezeptorantagonisten wie Tirofiban eine geringere Hemmung der ADP-induzierten Aggregation als unter D-phenylalanyl-L-prolyl-L-arginine chloromethyl ketone (PPACK) zu beobachten. Bei Abciximab ist es genau umgekehrt, d. h. es findet unter PPACK-Antikoagulation eine geringere Hemmung der ADP-induzierten Aggregation als unter Zitrat-Antikoagulation statt (Proimos 2001, Batchelor 2002, Jennings 2002). Um in Zukunft in großangelegten Studien sinnvolle Vergleiche zwischen den antithrombozytären Effekten der verschiedenen GPIIb-IIIa-Rezeptorantagonisten durchführen zu können, sollten ev vivo Studien nach standardisierten Bedingungen, was die Antikoagulation betrifft, durchgeführt werden. Des Weiteren lässt sich sagen, dass bei großen interindividuellen Patientenunterschieden in der Wirksamkeit der GPIIb-IIIa-Antagonisten eine interindividuell abgestimmte Dosierung durch pharmakologisches Monitoring den größten Benefit erzielen wird. An einem kostengünstigen, leicht-durchführbaren Assay wird derzeit gearbeitet (Holmes 1999).

## 5 Zusammenfassung

In der vorliegenden klinischen Studie wurden die antithrombozytären Effekte der beiden GPIIb-IIIa-Rezeptorantagonisten Abciximab und Tirofiban, jeweils kombiniert mit einer adjuvanten Therapie bestehend aus Clopidogrel und ASS, untersucht.

Insgesamt wurden 20 Patienten, die im Rahmen einer elektiven Koronarangiographie eine koronare Gefäßstütze implantiert bekamen, randomisiert einer der beiden Studiengruppen, Abciximab oder Tirofiban, zugeteilt.

Die Ergebnisse der klinischen Studie lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- a) Die kombinierte Therapie mit ASS plus Clopidogrel hemmte die Agonisten-induzierte Thrombozytenaggregation und die Oberflächenexpression von P-Selektin ( $p < 0,05$  versus ASS Monotherapie).
- b) Sowohl Tirofiban als auch Abciximab führten zu einer weiteren Reduktion der Agonisten-induzierte Plättchenaggregation ( $p < 0,05$ ), hatten aber keinen Effekt auf die Freisetzung von Thrombin und der  $\alpha$ -Granula Inhaltsstoffe.
- c) Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Abciximab im Gegensatz zu Tirofiban einen signifikanten inhibitorischen Effekt auf die Aktivierung des GPIIb-IIIa-Rezeptors und die LIBS-Induktion erzielte ( $p < 0,05$  versus Tirofiban).

Die Untersuchungen im Rahmen des experimentellen Teils der vorliegenden Studie ergaben, dass keine der antithrombozytären Behandlungsstrategien einen signifikanten Einfluss auf die plättcheninduzierte Endothel-Aktivierung hatte.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die kombinierte Therapie mit ASS, Clopidogrel und Abciximab/Tirofiban synergistisch die Plättchenaggregation durch hochdosierte ADP- oder Thrombinrezeptor-Stimulation bei Patienten im Rahmen der Implantation koronarer Gefäßstützen reduzieren konnte. Aufgrund des Potentials der Thrombozyten, mittels Plättchenadhäsion und Plättchendegranulation eine inflammatorische und mitogene Reaktion in der Gefäßwand zu initiieren, wird es aber eine zukünftige Herausforderung sein, die thrombozytären Freisetzungsreaktionen effektiv zu inhibieren.



## 6 Abkürzungsverzeichnis

AA	Arachidonsäure
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
ASS	Acetylsalicylsäure
ATP	Adenosintriphosphat
CAPRIE	Clopidogrel versus aspirin in patients at risk of ischemic events
CAPTURE	Chimeric 7E3 antiplatelet in unstable angina refractory to standard treatment
CLASSICS	Clopidogrel aspirin stent international cooperative study
CD	Cluster of Determinants
Col	Kollagen
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetra-Azetat
EPILOG	Evaluation of PTCA to improve long term outcome by c7E3 GPIIb-IIIa receptor blockade trial
EPISTENT	EPILOG-stent study
FANTASTIC	Full anticoagulation versus ticlopidine plus aspirin after stent implantation: a randomized European study
Fg	Fibrinogen
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
Fn	Fibronectin
GP	Glykoprotein
I. E.	Internationale Einheiten
i.v.	Intravenös
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule 1
ISAR	Intracoronary stenting and antithrombotic regimen trial
KHK	Koronare Herzkrankheit
Lam	Laminin
M	Mol/l
MATTIS	Multicenter aspirin and ticlopidine trial after intracoronary stenting
NF-κB	Nuclear Faktor κB

PE	Phycoerythrin
PBS	phosphate buffered saline
PECAM	platelet endothelial cellular adhesion molecule
PPP	Platelet Poor Plasma
PRISM-PLUS	Platelet receptor inhibition for ischemic syndrome management study plus
PRP	Platelet Rich Plasma
PTCA	Percutane transluminale Koronarangioplastie
PURSUIT	Platelet IIb-IIIa underpriming the receptor for suppression of unstable ischemia trial
RAPPORT	ReoPro in acute myocardial infarction and primary PTCA organization and randomized trial
RESTORE	Randomized efficacy study of tirofiban for outcomes and restenosis trial
RGD	Arginin-Glycin-Aspartat
rtPA	rekombinant tissue plasminogen activator
SD	Standardabweichung
STARS	Stent anticoagulation regimen study
STOP-AMI	Stent versus thrombolysis for occluded coronary arteries in patients with acute myocardial infarction
Tab.	Tabelle
TARGET	Do tirofiban and Reopro give similar efficacy outcomes trial
TRAP	thrombin receptor activating peptide
TxA <sub>2</sub>	Thromboxan A <sub>2</sub>
uPAR	Urokinasetype Plasminogen Activating Receptor
vWF	von-Willebrand-Faktor
Z. n.	Zustand nach

## 7 Abbildungsverzeichnis

Abb 1:	Schematische Darstellung der Thrombozytenadhäsion und Aktivierung .....	3
Abb 2:	Aggregation und Degranulation .....	4
Abb 3:	Struktur des GP IIb-IIIa .....	6
Abb 4:	ADP-Rezeptoren.....	8
Abb 5:	Aktivierungsabhängige Freisetzung thrombozytärer Zytokine .....	10
Abb 6:	Plättchen-Endothelinteraktion .....	11
Abb 7:	Wirkorte von Antithrombotika .....	12
Abb 8:	Auswertung der Lichtaggregometrie und Luminometrie .....	27
Abb 9:	Die Zwei-Parameter Darstellung in der Durchflusszytometrie .....	34
Abb 10:	Die Darstellung als Histogramm in der Durchflusszytometrie .....	35
Abb 11:	Plättchenaggregation nach 5 Minuten .....	45
Abb 12:	Deaggregation.....	48
Abb 13:	Plättchenabhängige Thrombingeneration .....	51
Abb 14:	PAC-1-Expression .....	55
Abb 15:	P-Selektin-Expression .....	57
Abb 16:	Plättcheninduzierte Endothelaktivierung.....	62

## 8 Tabellenverzeichnis

Tab 1:	Pipettierschema plättchenabhängige Thrombingeneration.....	30
Tab 2:	Pipettierschema für Durchflusszytometrie .....	32
Tab 3:	Pipettierschema Plättchen-Endothelinteraktion.....	38
Tab 4:	Laborwerte der Patienten zum Zeitpunkt der Aufnahme .....	41
Tab 5:	Demographische Daten der Studienpatienten.....	42
Tab 6:	Steigung der Aggregationskurve .....	50
Tab 7:	LIBS-1-Expression .....	54
Tab 8:	ATP-Freisetzung.....	59
Tab 9:	Geräteeinstellungen und Herstellung der Lösungen.....	107
Tab 10:	Max.-Aggregation nach 5 min.....	112
Tab 11:	Max.-Aggregation innerhalb 5 min .....	113
Tab 12:	Deaggregation.....	114
Tab 13:	Plättchenabhängige Thrombingeneration .....	115
Tab 14:	P-Selektin-Expression .....	116
Tab 15:	PAC-1-Expression.....	117
Tab 16:	MCP-1 Freisetzung.....	118
Tab 17:	ICAM-1-Expression .....	119
Tab 18:	uPAR-Expression .....	120

## 9 Literaturverzeichnis

1. Abrams C, Shattil SJ. Immunological detection of activated platelets in clinical disorders. *Thromb Haemost* 65 (1991) 467-473
2. Andrews RK, Lopez JA, Bendt MC. Molecular mechanisms of platelet adhesion and activation. *Int J Biochem Cell Biol* 29 (1997) 91-105
3. Antiplatelet Trialists Collaboration. Collaborative overview of randomized trials of antiplatelet therapy-I: Prevention of death, myocardial infarction and stroke by prolonged antiplatelet therapy in various categories of patients *BMJ* 308 (1994) 81-106
4. Antman EM, McCabe CH, Gurfinkel EP, et al, for the TIMI 11B Investigators. Enoxaparin prevents death and cardiac ischemic events in unstable angina/non-Q-wave myocardial infarction: results of the Thrombolysis in Myocardial Infarction (TIMI) 11B trial. *Circulation* 100 (1999) 1593-1601
5. Armstrong P. Heparin in acute coronary disease-requiem for a heavyweight? *N Engl J Med* 337 (1997) 492-494
6. Aronson DL, Chang P, Kessler CM. Platelet-dependent thrombin generation after in vitro fibrinolytic treatment. *Circulation* 85 (1992) 1706-1712
7. Badimon JJ, Fuster V, Chesebro JH, Badimon L. Coronary atherosclerosis, a multifactorial disease. *Circulation* 87 (1993) II-3 – II-16
8. Barrett JS, Murphy G, Peerlinck K, De Lepeleire I, Gould RJ, Panebianco D, Hand E, Deckmyn H, Vermylen J, Arnout J. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of MK-383, a selective non-peptide platelet glycoprotein-IIb/IIIa receptor antagonist, in healthy men. *Clin Pharmacol Ther* 56 (1994) 377-88

9. Batchelor WB, Tolleson TR, Huang Y, Larsen RL, Mantell RM, Dillard P, Davidian M, Zhang D, Cantor WJ, Sketch MH Jr, Ohman EM, Zidar JP, Gretler D, DiBattiste PM, Tchong JE, Califf RM, Harrington RA. Randomized COMparison of Platelet Inhibition With Abciximab, TiRofiban and Eptifibatide During Percutaneous Coronary Intervention in Acute Coronary Syndromes: The COMPARE Trial. *Circulation* 17 (2002) 1470-1476
10. Becker RC. Antiplatelet therapy in coronary heart disease. *Arch Pathol Lab Med* 117 (1993) 89-96
11. Becker RC, Tracy RP, Bovill EG, Mann KG, Ault K. The clinical use of flow cytometry for assesing platelet activation in acute coronary syndroms. TIMI-III thrombosis and anticoagulation group. *Coron Art Dis* 5 (1994) 339-345
12. Bennett CL, Davidson CJ, Raisch DW, Weinberg PD, Benett RH, Feldman MD. Thrombotic thrombocytopenic purpura associated with ticlopidine in the setting of coronary artery stents and stroke prevention. *Arch Intern Med* 159 (1999) 2524-2528
13. Bennett CL, Connors JM, Carwile JM, Moake JL, Bell WR, Tarantolo SR, McCarthy LJ, Sorde R, Hatfield AJ, Feldman MD, Davidson CJ, Tsai HM. Thrombotic thrombocytopenic purpura associated with clopidogrel. *N Engl J Med* 342 (2000) 1773-1777
14. Berkowitz SD, Harrington RA, Rund MM, Tchong JE. Acute profound thrombocytopenia after c7E3 FAB therapy. *Circulation* 95 (1997) 809-813
15. Bertolino G, Noris P, Previtali M, Gamba G, Ferrario M, Montani M, Balduini CL. Platelet function after in vivo and in vitro treatment with thrombolytic agents. *Am J Cardiol* 1992; 69: 457-461
16. Bertrand ME, Legrand V, Boland J, Fleck E, Bonnier J, Emmanuelson H, Vrolix M, Missault L, Chierchia S, Casaccia M, Niccoli L, Oto A, White C, Webb-Peploe M, Van Belle E, McFadden EP. Randomized multicenter comparison of conventional anticoagulation versus antiplatelet therapy in unplanned and elective coronary stenting. The full anticoagulation versus aspirin and ticlopidine (fantastic) study. *Circulation* 98 (1998) 1597-1603

17. Bertrand ME, Rupprecht HJ, Urban P, Gershlick AH, Investigators for Double-blind study of the safety of clopidogrel with and without a loading dose in combination with aspirin compared with ticlopidine in combination with aspirin after coronary stenting: the clopidogrel aspirin stent international cooperative study (CLASSICS). *Circulation* 102 (2000) 624-629
18. 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. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19 (1999) 212-219
19. Bithell TC. The physiology of primary hemostasis. In: Lee GR, Bithell TC, Foerster J, Athens JW, Lukens Jn, Herausgeber. *Wintrobe's Clinical Hematology*, Lea & Febinger Verlag Philadelphia, 9. Auflage, 1993, 57-82
20. Blankenship JC. Bleeding complications of glycoprotein IIb-IIIa receptor inhibitors *Am Heart J* 138 (1999) S287-S296
21. Blasi F. Urokinase and urokinase receptor: a paracrine/autocrine system regulation cell migration and invasiveness. *Bioessays* 15 (1993) 105-111
22. Böck M, Gawaz M, Dietzler A, Heim MU, Mempel W. Single-donor platelet concentrates: changes of surface glycoproteins during storage. *Haemostasis* 24 (1994) 230-235
23. Born GVR. Quantitative investigations into the aggregation of blood platelets. *J. Physiol Lond.* 162 (1962) 67-73
24. Born GVR, Cross MJ. The aggregation of blood platelets. *J Physiol* 168 (1963) 178-196
25. Brand K, Page S, Rogler G, Barsch A, Brandl R, Knuechel R, Pate M, kaltschmidt C, Baeuerle PA, Neumeier D. Activated transcription factor nuclear factor-kappa B is present in the atherosclerotic lesion. *J Clin Invest* 97 (1996) 1715-1722
26. Braun M, Kramann J, Strohbach H, Schrör K. Incomplete inhibition of platelet secretion by low-dose aspirin. *Platelets* 5 (1994) 325-331
27. Cannon CP, Tracy R. Clotting for the clinician: an overview of thrombosis and antithrombotic therapy. *J Thrombosis and Thrombolysis* 2 (1995) 95-106

28. Cannon CP. Combination therapy for acute myocardial infarction: glycoprotein IIb/IIIa inhibitors plus thrombolysis. *Clin Cardiol* 22 (1999) IV37-43
29. Caron A, Theroret JF, Mousa SA, Merhi Y. Anti-platelet Effects of GPIIb/IIIa and P-Selectin Antagonism, Platelet Activation , and Binding to Neutrophils. *J Cardiovasc Pharmacol* 40 (2002) 296-306
30. Charo IF, Kieffer N, Phillips DR. Platelet membrane glycoproteins. Aus: Colman RW, Hirsh J, Marder V, Salzman EW (Hrsg.): *Hemostasis and Thrombosis: Basic principles and clinical practice*. Philadelphia, JB Lippincott, 1994, 3.Auflage, 489-507
31. Clemetson KJ. Platelet GPIb-V-IX complex. *Thrombosis and Haemostasis* 78 (1997) 266-270
32. Cohen LS. Clinical pharmacology of acetylsalicylic acid. *Sem Thromb Hemost* 2 (1976) 95-106
33. Cohen M, Demers C, Gurfinkel EP et al. A comparison of low molecular-weight heparin weight unfractionated heparin for unstable coronary artery disease. *N Engl J Med* 337 (1997) 447-452
34. Collier BS, Peerschke EI, Scudder LE, Sullivan CA. A murine monoclonal antibody that completely blocks the binding of fibrinogen to platelets produces a thrombasthenic-like state in normal platelets and binds to glycoproteins IIb and/or IIIa. *J Clin Invest* 72 (1983) 325-338
35. Collier BS. Blockade of platelet GPIIb/IIIa receptors as an antithrombotic strategy. *Circulation* 92 (1995) 2373-2380
36. Collier BS. Platelet GPIIb/IIIa antagonists: the first anti-integrin receptor therapeutics. *J Clin Invest*. 99 (1997) 1467-1471
37. Collier BS. Monitoring platelet GPIIb/IIIa antagonist therapy. *Circulation* 97 (1998) 5-9
38. Collier BS. Binding of abciximab to  $\alpha_v\beta_3$  and activated alpha M beta 2 receptors: with a review of platelet-leukocyte interactions. *Thromb Haemost* 82 (1999) 326-336



39. Colman RW, Cook JJ, Niewiarowski S. Mechanisms of platelet aggregation. Aus: Colman RW, Hirsh J, Marder V, Salzman EW (Hrsg.): Hemostasis and Thrombosis: Basic principles and clinical practice. Philadelphia, JB Lippincott, 1994b, 3. Auflage, 508-521
40. Colman RW, Marder VJ, Salzman EW, Hirsh J. Overview of Hemostasis. Aus: Colman RW, Hirsh J, Marder V, Salzman EW (Hrsg.): Hemostasis and Thrombosis: Basic principles and clinical practice. Philadelphia, JB Lippincott, 1994a, 3. Auflage, 3-18
41. Coukell AJ, Markham A. Clopidogrel. *Drugs* 54 (1997) 745-750
42. Cox D. Methods for monitoring platelet function. *Am Heart J* 135 (1998) S160-S169
43. D'Souza SE, Ginsberg MH, Matsueda GR, Plow EF. A discrete sequence in a platelet integrin is involved in ligand recognition. *Nature* 350 (1991) 66-68
44. Davies MJ. The composition of coronary-artery plaques *N Engl J Med* 336 (1997) 1312-1314
45. Deckelbaum LI, Sax FL. Tirofiban, a nonpeptide inhibitor of the platelet glycoprotein IIb-IIIa receptor. In: Sasahara AA, Loscalzo J, editors. *New Therapeutic Agents in Thrombosis and Thrombolysis*. Marcel Dekker, 1997, 355-365
46. DeGroot PG, Sixma JJ. Platelet adhesion. *Br J Haematol* 75 (1990) 581-589
47. Dickfeld T, Lengyel E, May AE, Massberg S, Brand K, Page S, Thielen C, Langenbrink K, Gawaz M. Transient interaction of activated platelets with endothelial cells induces expression of monocyte-chemoattractant protein-1 via p38 mitogen-activated protein kinase mediated pathway. Implications for atherogenesis. *Cardiovasc Res* 49 (2001) 189-199
48. Dickfeld T, Ruf A, Pogatsa-Murray G, Müller I, Engelmann B, Taubitz W, Fischer J, Meier O, Gawaz M. Differential antiplatelet effects of various glycoprotein IIb-IIIa antagonists. *Thromb Res* 101 (2001) 53-64

49. Dong J, Ndrepepa G, Schmitt C, Mehilli J, Schmieder S, Schwaiger M, Schomig A, Kastrati A. Early resolution of ST-segment elevation correlates with myocardial salvage assessed by Tc-99m sestamibi scintigraphy in patients with acute myocardial infarction after mechanical or thrombolytic reperfusion therapy. *Circulation* 25 (2002) 2946-2949
50. Du X, Plow EF, Frelinger AL, O'Toole TE, Loftus JC, Ginsberg MH. Ligands activate integrin  $\beta$ IIb $\beta$ 3 (platelet GPIIb-IIIa). *Cell* 65 (1991) 409-416
51. Du X, Ginsberg MH. Integrin alpha IIb beta 3 and platelet function. *Thromb Haemost* 78 (1997) 96-100
52. Eikelboom JW, Anand SS, Malmberg K, Weitz JI, Ginsberg JS, Yusuf S. Unfractionated heparin and low-molecular-weight heparin in acute coronary syndrome without ST elevation: a meta-analysis. *Lancet* 355 (2000) 1936-1942
53. Esmon CT. Regulation of blood coagulation. *Biochim Biophys Acta* 1470 (2000) 349-360
54. Faulds D, Sorkin EM. Abciximab (c7E3 Fab). A review of its pharmacology and therapeutic potential in ischaemic heart disease. *Drugs* 48 (1994) 583-598
55. Feinman, R.D., et al. The lumi-aggregometer: A new instrument for simultaneous measurement of secretion and aggregation. *J. Lab. Clin. Med.* 90 (1977) 125
56. Fitzgerald DJ, Roy L, Catella F, Fitzgerald GA. Platelet activation in unstable coronary disease. *N Engl J Med* 315 (1986) 983-989
57. Fragmin During Instability in Coronary Artery Disease (FRISC) Study Group. Low-molecular-weight heparin during instability in coronary artery disease. *Lancet* 347 (1996) 561-568
58. Frelinger AL, Cohen I, Plow EF, Smith MA, Roberts J, Lam SCT, Ginsberg MH. Monoklonal antibodies to ligand-occupied conformers of integrin  $\alpha$ IIb- $\beta$ 3 (Glycoprotein IIb-IIIa) alter receptor affinity, specificity and function. *J Biol Chem* 266 (1990) 17106-17111

59. Fuster V, Badimon L, Badimon J, Chesebro JH. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndroms. *N Engl J Med* 326 (1992) 242-250
60. Fuster V, Badimon L, Cohen M, Ambrose JA, Badimon JJ, Chesebro J. Insights into pathogenesis of acute ischemic syndroms. *Circulation* 77 (1988) 1213-1220
61. Gachet C, Hechler B, Leon C, Vial C, Leray C, Ohlmann P, Cazenave JP. Activation of ADP receptors and platelet function. *Thrombosis and Haemostasis* 78 (1997) 271-275
62. Gachet C. ADP receptors of platelets and their inhibition. *Thromb Haemost* 86 (2001) 222-232
63. Gawaz M, Loftus JC, Bajt ML, Frojmovic MM, Plow EF, Ginsberg MH. Ligand bridging mediates integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 dependent homotypic and heterotypic cell-cell interactions. *J Clin Invest* 8 (1991) 1128-1134
64. Gawaz M, Bogner C, Gurland HJ. Flowcytometry analysis of mepacrine-labelled platelets in patients with end-stage renal failure. *Haemostasis* 23 (1993) 284-289
65. Gawaz M, Dobos G, Späth M, Mujais SK. Platelet membrane glycoprotein GPIIb/IIIa function is impaired in end-stage renal failure (ESRF). *J Am Soc Nephrol* 5 (1994) 36-46
66. Gawaz M, Neumann FJ, Dickfeld T, Reininger A, Adelsberger H, Gebhardt A, Schömig A. Vitronectin receptor ( $\alpha$ (v) $\beta$ 3) mediates platelet adhesion to the luminal aspect of endothelial cells: implications for reperfusion in acute myocardial infarction. *Circulation* 96 (1997) 1809-1818
67. Gawaz M, Neumann FJ, Dickfeld T, Koch W, Laugwitz KL, Adelsberger H, Langenbrink K, Page S, Neumeier D, Schömig A, Brand K. Activated platelets induce monocyte chemotactic protein-1 secretion and surface expression of intercellular adhesion molecule-1 on endothelial cells. *Circulation* 98 (1998) 1164-1171

68. Gawaz M, Ruf A, Neumann FJ, Pogatsa-Murray G, Dickfeld T, Zohnhofer D, Schömig A. Effect of glycoprotein IIb-IIIa receptor antagonism on platelet membrane glycoproteins after coronary stent placement. *Thromb Haemost* 80 (1998) 994-1001
69. Gawaz M, Neumann FJ, Schömig A. Evaluation of platelet membrane glycoproteins in coronary artery disease, consequences for diagnosis and therapy. *Circulation* 99 (1999) e1-e11
70. Gawaz M, Brand K, Dickfeld T, Pogatsa-Murray G, Page S, Bogner C, Koch W, Schömig A, Neumann FJ. Platelets induce alterations of chemotactic and adhesive properties of endothelial cells mediated through an interleukin-1-dependent mechanism. Implications for atherogenesis. *Atherosclerosis* 148 (2000) 75-85
71. Gawaz M, Ruf A, Pogatsa-Murray G, Dickfeld T, Rüdiger S, Taubitz W, Fischer J, Müller I, Meier O, Patscheke H, Schömig A. Incomplete inhibition of platelet aggregation and glycoprotein IIb-IIIa receptor blockade by abciximab: importance of internal pool of glycoprotein IIb-IIIa receptors. *Thromb Haemost* 83 (2000) 915-922
72. Gawaz M (Herausgeber). *Blood platelets*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1. Auflage, 2001, 4-7, Abbildungen: S. 9-11, S. 19, S. 35, S. 50, S. 101
73. Gawaz M, Seyfarth M, Müller I, Rüdiger S, Pogatsa-Murray G, Wolf B, Schömig A. Comparison of effects of clopidogrel versus ticlopidine on platelet function in patients undergoing coronary stent placement. *Am J Cardiol* 87 (2001) 332-336, A9
74. Gimbrone M. Vascular endothelium: Nature's blood container. In: Gimbrone M, editor. *Vascular Endothelium in Hemostasis and Thrombosis*. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1986, 1-21
75. Ginsberg MH, Frelinger AL, Lam SCT, Forsyth J, McMillian R, Plow EF, Shattil SJ. Analysis of platelet aggregation disorders based on flow cytometric analysis of membrane glycoprotein IIb-IIIa with conformation-specific monoclonal antibodies. *Blood* 76 (1990) 2017-2023

76. Ginsberg MH, Loftus JC. Platelet integrins. *Thromb Haemost.* 74 (1995) 352-359
77. Giugliano RP. Drug-induced thrombocytopenia: Is it a serious concern for glycoprotein IIb/IIIa receptor inhibitors? *J Thromb Thrombolysis* 5 (1998) 191-202
78. Goodman S, Bigonzi F, Radley D, Le Louer V, Gosset F, Cohen M, for the ESSENCE Group. One-year follow-up of the ESSENCE trial (enoxaparin versus heparin in unstable angina and non-Q-wave myocardial infarction. *Eur Heart J* 50 (1998) Abstract P477
79. Hardman JG, Limbird LE (Herausgeber). *The Pharmacological Basis of therapeutics.* Mc Graw Hill Verlag, New York, 2001. 1928-1929
80. Harker LA, Bruno JJ. Ticlopidines mechanism of action on human platelets. Aus: Hass K, Easton JD (Hrsg). *Ticlopidine, Platelets and Vascular Disease.* Springer Verlag, New York 1993, 99-116
81. Hauptmann J, Stürzebecher J. Synthetic inhibitors of thrombin and factor Xa: from bench to bedside. *Thromb Res* 93 (1999) 203-241
82. Hawrylowicz CM, Howells GL, Feldmann M. Platelet-derived interleukin-1 induces human endothelial adhesion molecule expression and cytokine production. *J Exp Med* 174 (1991) 785-790
83. Henn V, Slupsky JR, Gräfe M, Anagnostopoulos I, Förster R, Müller-Berghaus G, Kroczeck RA. CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature* 391 (1998) 591-594
84. Hennekens CH, Dyken ML, Fuster V. Aspirin as a therapeutic agent in cardiovascular disease. A statement from healthcare professionals from the American Heart Association. *Circulation* 96 (1997) 2751-2753
85. 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* 11 (1993) 180-198
86. Herrman AG. Rationale for the combination of anti-aggregating drugs. *Thrombosis Res* 92 (1998) S17-S21

87. Herrmann HC, Swierkosz TA, Kapoor S, Tardiff DC, DiBattiste PM, Hirshfeld JW, Klugherz BD, Kolansky DM, Magness K, Valettas N, Wilensky L. Comparison of Degree of Platelet Inhibition by Abciximab Versus Tirofiban in Patients With Unstable Angina Pectoris and Non-Q-Wave Myocardial Infarction Undergoing Percutaneous Coronary Intervention. *Am J Cardiol* 89 (2002) 1293-1297
88. Heyward SA, Dubois-Stringfellow N, Rapoport R, Bautch VL. Expression and inducibility of vascular adhesion receptors in development. *FASEB J* 9 (1995) 956-962
89. Hiller E, Riess H. Hämorrhagische Diathese und Thrombose. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, Deutschland, 2. Auflage (in Zusammenarbeit mit K. Auberger), 1998
90. Holmes MB, Schneider DJ. Optimizing Antiplatelet Therapy in Patients with Acute Coronary Syndromes: A Role for Monitoring Platelet Reactivity. *J Invasive Cardiol* 11 (1999) Suppl C:21C-25C
91. Holmes MB, Kabbani SS, Terrien CM, Watkins MW, Sobel BE, Schneider DJ. Quantification by flow cytometry of the efficacy of and interindividual variation of platelet inhibition induced by treatment with tirofiban and abciximab. *Coron Artery Dis* 12 (2001) 245-253
92. Honda S, Tomiyama Y, Aoki T, Shiraga M, Kurata Y, Seki J, Matsuzawa Y. Association between ligand-induced conformational changes of integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 and  $\alpha$ IIb $\beta$ 3-mediated intracellular  $Ca^{2+}$  signaling. *Blood* 92 (1998) 3675-3683
93. Hoolopeter G, Jantzen HM, Vincent D, Li G, et al. Identification of the platelet ADP receptor targeted by antithrombotic drugs. *Nature* 409 (2001) 202-207
94. Jarvis B, Simpson K. Clopidogrel: a review of its use in the prevention of atherothrombosis. *Drugs* 60 (2000) 347-377
95. Jennings LK, Jacoski MV, McCabe White M. The Pharmacodynamics of Parenteral Glycoprotein IIb/IIIa Inhibitors. *J Intervent Cardiol* 15 (2002) 45-60

96. Kaku S, Umemura K, Mizuno A, Yano S, Suzuki K, Kawasaki T, Nakashima M. Evaluation of a GPIIb/IIIa receptor antagonism on platelet membrane glycoproteins after coronary stent placement. *Thromb Haemost* 80 (1998) 994-1001
97. Kefalides NA. Biochemical aspects of the vessel wall. In: Colman RW, Hirsch J, Marder VJ, Salzman EW, Herausgeber. *Hemostasis and Thrombosis: Basic principles and clinical practice*. JB Lippincott Co Verlag, Philadelphia, 2. Auflage, 1987, 247-263
98. Kereiakes DJ, Broderick TM, Roth EM, Whang D, et al. Time course, magnitude, and consistency of platelet inhibition by abciximab, tirofiban, or eptifibatide in patients with unstable angina pectoris undergoing percutaneous coronary intervention. *Am J Cardiol* 84 (1999) 391-395
99. Kestin AS, Ellis PA, Barnard MR, Errichetti A, Rosner BA, Michelson AD. The effect of strenuous exercise on platelet activation state and reactivity. *Circulation* 88 (1993) 1502-1511
100. Keularts LW, Beguin S, deZwaan C, Hemker HC. Treatment with a GPIIb/IIIa antagonist inhibits thrombin generation in platelet rich plasma from patients. *Thromb Haemostasis* 80 (1998) 370-371
101. Kleimann NS, Raizner AE, Jordan R, Wang AL, Norton D, Mace KF, Joshi A, Coller BS, Weisman HF. Differential inhibition of platelet aggregation induced by adenosine diphosphate of a thrombin receptor-activating peptide in patients treated with bolus chimeric 7E3 Fab: implications for inhibition of the internal pool of GPIIb/IIIa receptors. *J Am Coll Cardiol* 26 (1995) 1665-1671
102. Kleiman NS. Pharmacology of the intravenous platelet receptor glycoprotein IIb/IIIa antagonists. *Coron Artery Dis* 9 (1998) 603-616
103. Kleiman NS. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of glycoprotein IIb-IIIa inhibitors. *Am Heart J* 139 (1999) 263-275

104. Klein W, Buchwald A, Hillis SE, Monrad S, Sanz G, Turpie G, van der Meer J, Olaisson E, Undeland S, Ludwig K. Comparison of low-molecular-weight heparin with unfractionated heparin acutely and with placebo for 6 weeks in the management of unstable coronary artery disease: Fragmin in unstable Coronary Artery Disease Study (FRIC). *Circulation* 96 (1997) 61-68
105. Kondo K, Umemura K. Clinical pharmacokinetics of tirofiban, a nonpeptide glycoprotein IIb/IIIa receptor antagonist: comparison with the monoclonal antibody abciximab. *Clin Pharmacokinet* 41 (2002)187-195
106. Koshelnick Y, Ehart M, Hugnagl P, Heinrich PC, Binder BR. Urokinase receptor is associated with the components of the JAK1/STAT1 signaling pathway and leads to activation of this pathway upon receptor clustering in hum kidney epithelial tumor cell line TCL-598. *J Biol Chem* 272 (1997) 28563-28567
107. Küttler T (Hrsg.). *Pharmakologie und Toxikologie*. Gustav-Fischer-Verlag , Stuttgart, Deutschland, 17. Auflage, 1996, 162-164
108. Kulkarni S, Dopheide SM, Yap Cl et al. A revised model of platelet aggregation. *J Clin Invest* 105 (2001) 783-791
109. Kunapuli SP, Daniel JL. P2 receptor subtypes in the cardiovascular system. *Biochem J* 336 (1998) 513-523
110. Lam LH, Silbert JE, Rosenberg RD. The separation of active and inactive forms of heparin. *Biochem Biophys Res Commun* 69 (1976) 570-577
111. Lawrence MB, Springer TA. Leukocytes roll on a selectin at physiologic flow rates: distinction from and prerequisite for adhesion through integrins. *Cell* 65 (1991) 859-873
112. Le Breton H, Plow EF, Topol EJ. Role of platelets in restenosis after percutaneous coronary revascularization. *J Am Coll Cardiol* 28 (1996) 1643-1651
113. Lefkowitz J, Plow EF, Topol EJ. Platelet glycoprotein IIb-IIIa receptors in cardiovascular medicine. *N Engl J Med* 332 (1995) 1553-1559



114. Leon MB, Baim DS, Popma JJ, Gordon PC, Cutlip DE, Ho KK, Giambartolomei A, Diver DJ, Lasorda DM, Williams DO, Pocock SJ, Kuntz RE. A clinical trial comparing three antithrombotic-drug regimens after coronary-artery stenting. Stent Anticoagulation Restenosis Study Investigators. *N Eng J Med* 339 (1998) 1665-1671
115. Lewis HD, Davis JW, Archibald DG, Steinke WE. Protective effects of aspirin against acute myocardial infarction and death in men with unstable angina. Results of a veterans administration cooperative study. *N Engl J Med* 309 (1983) 396-403
116. Lincoff AM, Popma JJ, Ellis SG, Hacker JA, Topol EJ. Abrupt vessel closure complicating coronary angioplasty: clinical, angiographic and therapeutic profile. *J Am Coll Cardiol* 19 (1992) 926-935
117. Lincoff AM, Califf RM, Topol EJ. Platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor blockade in coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 35 (2000) 1103-1115
118. Lindahl U, Backstrom G, Thunberg L. The antithrombin-binding sequence in heparin: identification of an essential 6-O-sulfate group. *J Biol Chem* 25 (1983) 9825-9830
119. Llevadot J, Coulter SA, Giugliano RP. A practical approach to the diagnosis and management of thrombocytopenia associated with glycoprotein IIb/IIIa receptor inhibitors. *J Thromb Thrombolysis* 9 (2000) 175-180
120. Mackie IJ, Neal CR. *The Platelet. Platelet-vessel wall interactions (The Bloomsbury series in clinical science)*. Springer Verlag Berlin, Heidelberg, 1988, 1-32
121. Madan M, Berkowitz SD, Tcheng JE. Glycoprotein GPIIb-IIIa integrin blockade. *Circulation* 98 (1998) 2629-2635
122. Makgoba MW, Sanders ME, Ginther Luce GE, Dustin ML, Springer TA, Clark EA, Mannoni P, Shaw S. ICAM-1 a ligand for LFA-1-dependent adhesion of B, T and myeloid cells. *Nature* 331 (1988) 86-88
123. Matzdorff AC, Kühnel G, Kemeks-Matthes B, Voss, R. Comparison of GP IIb/IIIa Inhibitors and Their Activity as Measured by Aggregometry, Flow Cytometry, Single Platelet Counting, and the Rapid Platelet Function Analyzer. *J Thrombosis Thrombolysis* 12 (2001) 129-139

124. McEver RP. Regulation of function and expression of P-selectin. *Agents Actions Suppl* 47 (1995) 117-119
125. Michelson AD. Flow cytometry: a clinical test of platelet function. *Blood* 87 (1996) 4925-4936
126. Michelson AD, Furman MI. Laboratory markers of platelet activation and their clinical significance. *Curr Opin Hematol* 6 (1999) 342-348
127. Michelson AD, Barnard MR, Krueger La, Frelinger AL 3rd, Furman MI. Evaluation of platelet function by flow cytometry. *Methods* 21 (2000) 259-270
128. Mishkel GJ, Aguirre FV, Ligon RW, Rocha-Singh KJ, Lucore CL. Clopidogrel as adjunctive antiplatelet therapy during coronary stenting. *J Am Coll Cardiol* 34 (1999) 1884-1890
129. Morgenstern E, Ruf A, Patscheke H. Transport of anti-glykoprotein IIb/IIIa-antibodies into the alpha-granules of unstimulated human blood platelets. *Thromb Haemost* 67 (1992) 121-125
130. Morgenstern E. Platelets morphology/ultrastructure. In: Bruchhausen FV, Walter U, eds. *Platelets and their factors: Handbook of Experimental Pharmacology*. Springer Verlag, Heidelberg, Germany, 1997, 27-52
131. Motz W. Die optimale Dosierung von Acetylsalicylsäure n der Therapie der koronaren Herzkrankheit. *Internist* 35 (1994) 1165-1170
132. Mousa SA, Bennett JS. Platelets in health and disease: Platelet GPIIb-IIIa structure and function : recent advances in antiplatelet therapy. *Drugs of the future* 21 (1996) 1141-1154
133. Müller C, Büttner HJ, Petersen J, Roskamm H. A randomized comparison of clopidogrel and aspirin versus ticlopidine and aspirin after the placement of coronary-artery stents. *Circulation* 101 (2000) 590-593
134. Müller I, Seyfarth M, Rüdiger S, Wolf B, Pogatsa-Murray G, Schömig A, Gawaz M. Effect of a high loading dose of clopidogrel on platelet function in patients undergoing coronary stent placement. *Heart* 85 (2001) 92-93

135. Neumann FJ, Ott I, Gawaz M, Puchner G, Schömig A. Neutrophil and platelet activation at balloon-injured coronary artery plaque in patients undergoing angioplasty. *J Am Coll Cardiol* 27 (1996) 819-824
136. Neumann FJ, Schömig A. Glycoprotein IIb/IIIa receptor blockade with coronary stent placement. *Semin Interv Cardiol* 3 (1998) 81-90.
137. Neumann FJ, Hochholzer W, Pogatsa-Murray G, Schömig A, Gawaz M. Antiplatelet effects of abciximab, tirofiban and eptifibatide in patients undergoing coronary stenting. *J Am Coll Cardiol* 37 (2001) 1323-1328
138. Neumann FJ. Medikamentöse Therapie der instabilen Angina pectoris. *Internist* 43 (2002) 112-120
139. Nicholas RA, Nazarowski ER, Watt WC, Li Q, Boyer J, Harden TK. Pharmacological and second messenger signalling selectivities of cloned P2Y receptors. *J Auton Pharmacol* 16 (1996) 319-323
140. Nurden A, Macchi L, Bihour C, Durrieu C, Besse P, Nurden P. Markers of platelet activation in coronary hearts disease patients. *Eur J Clin Invest* 24 (1994) 42-45
141. Nurden A. Human platelet Glykoproteins. In: Bloom A, Forbes CD, Herausgeber. *Haemostasis and Thrombosis*. Churchill Livingstone Verlag, New York, 3. Auflage, 1994, 115-165
142. Nurden A, Humbert M, Bilhour C et al. A specific ADP-dependent pathway of platelet activation that is inhibited by clopidogrel. *Pharmacol Res* 31 (suppl.) (1995) 291
143. Nurden AT, Poujol c, Nurden P. Different activation states of GP IIb/IIIa complexes in platelets. *Blood Coagul Fibrinolysis* 10 (1999) S67-S70
144. Nurden AT. Inherited abnormalities of platelets. *Thromb Haemost* 82 (1999) 468-480

145. Nurden AT, Poujol C, Durrieu-Jais C, Nurden P. Platelet glycoprotein IIb/IIIa inhibitors: basic and clinical aspects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19 (1999) 2835-2840
146. Pache J, Kastrati A, Mehilli J, Gawaz M, Neumann FJ, Seyfarth M, Hall D, Braun S, Dirschinger J, Schömig A. Clopidogrel therapy in patients undergoing coronary stenting: value of a high-loading-dose regimen. *Catheter Cardiovasc Interv* 55 (2002) 436-441
147. Patrono C. Aspirin as an antiplatelet drug. *N Engl J Med* 330 (1994) 1287-1294
148. Peter KH, Schwarz M, Ylänne J, Kohler B, Moser M, Nordt T, Salbach P, Kübler W, Bode C. Induction of fibrinogen binding and platelet aggregation as a potential intrinsic property of various glycoprotein IIb/IIIa ( $\alpha$ IIb $\beta$ 3) inhibitors. *Blood* 92 (1998) 3240-3249
149. Peter KH, Straub A, Kohler B, Volkmann M, Schwarz M, Kubler W, Bode C. Platelet activation as a potential mechanism of GP IIb/IIIa inhibitor-induced thrombocytopenia. *Am J Cardiol* 84 (1999) 519-524
150. Peto R, Gray R, Collins R, Wheatley K, Hennekens C, Jamrozik K, Warlow C, Hafner B, Thompson E, Norton S, et al. Randomised trial of prophylactic daily aspirin in British male doctors. *Br Med J (Clin Res Ed)* 296 (1988) 313-316
151. Phillips DR, Charo IF, Scarborough RM. GPIIb-IIIa: the responsive integrin. *Cell* 65 (1991) 359-362
152. Plow EF, D'Souza SE, Ginsberg MH. Ligand binding to GPIIb-IIIa: a status report. *Semin Thromb Hemost* 18 (1992) 324-332
153. Pober JS, Cotran RS. Cytokines and endothelial cell biology. *Physiol Rev* 70 (1990) 427-451
154. Preissner KT, Kanse SM, May AE. Urokinase Receptor: A molecular organizer in cellular communication. *Curr Opin Cell Biol* 12 (2000) 621-628
155. Proimos G. Platelet Aggregation Inhibition with Glycoprotein IIb-IIIa Inhibitors. *J Thromb and Thrombolysis* 11 (2001) 99-110

156. Rai R, Sprengeler PA, Elrod KC, Young WB. Perspectives on factor Xa inhibition. *Curr Med Chem* 8 (2001) 101-119
157. Ranke C, Hecker H, Creutzig A, Alexander K. Dose-dependent effect of aspirin on carotid atherosclerosis. *Circulation* 87 (1993) 1873-1879
158. Remijn JA, Wu YP, Jeninga EH, Ijsseldijk MJ, van Willigen G, de Groot PG, Sixma JJ, Nurden AT, Nurden P. Role of ADP Receptor P2Y<sub>12</sub> in platelet adhesion and thrombosis formation in flowing blood. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22 (2002) 686-691
159. Reverter JC, Beguin S, Kessels H, Kumar R, Hemker HC, Coller BS. Inhibition of platelet-mediated, tissue factor-induced thrombin generation by the mouse/human chimeric 7E3 antibody. *J Clin Invest* 98 (1996) 863-874
160. Rosenberg RD, Damu PS. The purification and mechanism of action of human antithrombin-heparin cofactor. *J Biol Chem* 248 (1973) 6490-6505
161. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990's. *Nature* 362 (1993) 801-809
162. Rossi F, Rossi E, Pareti FI, Colli S, Tremoli E, Gallo L. In vitro measurement of platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor blockade by abciximab: interindividual variation and increased platelet secretion. *Haematologica* 86 (2001) 192-198
163. Ruggeri ZM. New insights into mechanisms of platelet adhesion and aggregation. *Sem Hematol* 31 (1994) 229-239
164. Savi P, Combalbert J, Gaich C, et al. The antiaggregating activity of clopidogrel is due to a metabolic activation by the hepatic cytochrome P450-1A. *Thromb Haemost* 72 (1994) 313-317
165. Scarborough RM, Naughton MA, Teng W, Rose JW, Phillips DR, Nannizzi L, Arfsten A, Campbell AM, Charo IF. Design of potent and specific integrin antagonists. Peptide antagonists with high specificity for glycoprotein IIb-IIIa. *J Biol Chem* 268 (1993) 1066-1073

166. 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* 12 (1992) 1475-1487
167. Schneider DJ, Taatjes DJ, Sobel BE. Paradoxical inhibition of fibrinogen binding and potentiation of alpha-granule release by specific types of inhibitors of glycoprotein IIb-IIIa. *Cardiovasc Res* 45 (2000) 437-446
168. Schömig A, Kastrati A, Dirschinger J, Mehili J, Schricke U, Pache J, Martinoff S, Neumann FJ, Schwaiger M. Coronary stenting plus platelet glycoprotein IIb/IIIa blockade compared with tissue plasminogen activator in acute myocardial infarction. Stent versus Thrombolysis for Occluded Coronary Arteries in Patients with Acute Myocardial Infarction Study Investigators. *N Engl J Med* 334 (1996) 1084-1089
169. Schömig A, Kastrati A, Dirschinger J, Mehili J, Schricke U, Pache J, Martinoff S, Neumann FJ, Schwaiger M. Coronary stenting plus platelet glycoprotein IIb/IIIa blockade compared with tissue plasminogen activator in acute myocardial infarction. Stent versus Thrombolysis for Occluded Coronary Arteries in Patients with Acute Myocardial Infarction Study Investigators. *N Engl J Med* 343 (2000) 385-391
170. Schrör K. Thrombozyten. (Physis Spezial; 67). Verlag Urban und Vogel, München, 1993
171. Schrör K. The effect of prostaglandins and thromboxane A<sub>2</sub> on coronary vessel tone – mechanisms of action and therapeutic implications. *Eur Heart J* 14 Suppl I (1993) 34-41
172. Schrör K. Antiplatelets drugs. A comparative review. *Drugs* 50 (1995) 7-28
173. Schrör K. Aspirin and platelets: the antiplatelet action of aspirin and its role in thrombosis treatment and prophylaxis. *Semin Thromb Hemost* 23 (1997) 349-356
174. Schrör K (Hrsg.). Abciximab – Erstes klinisch eingeführtes Antiintegrin zur Hemmung der Thrombozytenaggregation. Dr.Schrör Verlag, Frechen, 2000
175. Schrör K. Ticlopidine and clopidogrel. In: *Antiplatelet Therapy in Clinical Practice*. Ferguson JJ, Chronos NAF, Harrington RA (Herausgeber), Martin Dunitz Verlag, London, 3. Auflage, 2000, 93-111

176. Schrör K (Hrsg.). Antithrombotische Pharmaka. Dr. Schrör Verlag, Frechen, 2002, Abbildung: S. 6
177. Shattil SJ, Cunningham M, Hoxie JA. Detection of activated platelets in whole blood using activation-dependent monoclonal antibodies and flow cytometry. *Blood* 70 (1987) 307-312
178. Shattil SJ. Function and regulation of the  $\beta_3$  integrins in hemostasis and vascular biology. *Thromb Haemost* 74 (1995) 149-155
179. Siess W. Molecular mechanisms of platelet activation. *Physiol Rev* 69 (1989) 50-178
180. Simon DI, Xu H, Ortlepp S, Rogers C, Rao NK. 7E3 monoclonal antibody directed against the platelet glycoprotein IIb/IIIa cross reacts with the leukocyte integrin Mac-1 and blocks adhesion to fibrinogen and ICAM-1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17 (1997) 528-535
181. Sims PJ, Wiedmer T, Esmon CT, Weiss HJ, Shattil SJ. Assembly of the platelet prothrombinase complex is linked to vesiculation of the platelet plasma membrane: studies in Scott syndrome: an isolated defect in platelet procoagulant activity. *J Biol Chem.* 264 (1989) 17049-17057
182. Sixma JJ. Interaction of blood platelets with the vessel wall. In: Bloom A, Forbes CD, Herausgeber. *Haemostasis and Thrombosis*. Churchill Livingstone Verlag, New York, 3. Auflage, 1994, 259-285
183. SoRelle, R. Stents are the CADILLAC of care. Controlled Abciximab and Device Investigations to Lower Late Angioplasty Complications. *Circulation* 105 (2002) e9094-e9095
184. Staunton DE, Marlin SD, Stratowa C, Dustin ML, Springer TA. Primary structure of ICAM-1 demonstrates interaction between members of the immunoglobulin and integrin supergene families. *Cell* 52 (1988) 925-933
185. Steinhubl SR. Assessing the optimal level of platelet inhibition with GP IIb/IIIa inhibitors in patients undergoing coronary intervention. Rationale and design of the GOLD Study. *J Thrombosis Thrombolysis* 9 (2000) 199-205

186. Swahn E, Wallentin L, for the FRISC Study Group. Low-molecular-weight heparin (Fragmin) during instability in coronary artery disease (FRISC). *Am J Cardiol* 80 (Suppl 5 A) (1997) 25E-29E
187. Talley JD. Pathogenesis of acute ischemic coronary syndromes. *J Intervent Cardiol* 11 (1998) 427-435
188. Tam SH, Sassoli PM, Jordan RE, Nakada MT. Abciximab (ReoPro, chimeric 7E3 Fab) demonstrates equivalent affinity and functional blockade of glycoprotein IIb/IIIa and alpha(v)beta3 integrins. *Circulation* 98 (1998) 1085-1091
189. Taubman MB, Fallon JT, Schechter AD et al. Tissue factor in the pathogenesis of atherosclerosis. *Thromb Haemost* 78 (1997) 200-204
190. Taub R, Gould RJ, Garsky VM, Ciccarone TM, Hoxie J, Friedman PA, Shattil SJ. A monoclonal antibody against the platelet fibrinogen receptor contains a sequence that mimics a receptor recognition domain of fibrinogen. *J Biol Chem* 264 (1989) 259-265
191. Tcheng JE, Ellis SG, George BS, et al. Pharmacodynamics of chimeric glycoprotein IIb/IIIa integrin antiplatelet antibody Fab 7E3 in high-risk coronary angioplasty. *Circulation* 90 (1994) 1757-1764
192. Tcheng JE. Clinical challenges of platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor inhibitor therapy: bleeding, reversal, thrombocytopenia, and retreatment. *Am Heart J* 139 (2000) S38-45
193. The CAPRIE Steering Committee. A randomized, blinded, trial of clopidogrel versus aspirin in patients at risk of ischaemic events (CAPRIE). *Lancet* 348 (1996) 1329-1339
194. The CAPTURE Investigators. Randomized placebo-controlled trial of abciximab before and during coronary intervention in refractory unstable angina: The CAPTURE study. *Lancet* 349 (1997) 1429-1435



195. The CURE committee. The Clopidogrel in Unstable angina to prevent Recurrent Events (CURE) trial programme. Rationale, design and baseline characteristics including a meta-analysis of the effects of thienopyridines in vascular disease. *Eur Heart J* 21 (2000) 2033-2041
196. The EPIC Investigators. Use of monoclonal antibody directed against the platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor in high-risk coronary angioplasty. *N Engl J Med* 330 (1994) 956-961
197. The EPILOG Investigators. Platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor blockade and low dose heparin during percutaneous coronary revascularization. *N Engl J Med* 336 (1997) 1689-1698
198. The EPISTENT Investigators. Randomised placebo-controlled and balloon-angioplasty-controlled trial to assess safety of coronary stenting with use of platelet glycoprotein-IIb/IIIa blockade. *Lancet* 352 (1998) 87-92
199. The IMPACT-AMI-Investigators. Combined accelerated tissue-plasminogen activator and platelet glycoprotein IIb/IIIa integrin receptor blockade with Integrelin in acute myocardial infarction. Results of a randomized, placebo-controlled, doseranging trial (IMPACT-AMI). *Circulation* 1997; 95: 846-854
200. The PARADIGM-Investigators. Combining thrombolysis with the platelet glycoprotein IIb/IIIa inhibitor lamifiban: results of the Platelet Aggregation Receptor Antagonist Dose Investigation and Reperfusion Gain in Myocardial Infarction (PARADIGM) trial. *J Am Coll Cardiol* 1998; 32: 2003-2010
201. The PRISM Investigators. A comparison of aspirin plus tirofiban with aspirin plus heparin for unstable angina. *N Engl J Med* 338 (1998) 1498-1505
202. 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* 338 (1998) 1488-1497
203. The RAPPORT Investigators. Randomized, placebo-controlled trial of platelet glycoprotein IIb/IIIa blockade with primary angioplasty for acute myocardial infarction. *Circulation* 98 (1998) 734-741

204. The RESTORE Investigators. Effects of platelet glycoprotein IIb/IIIa blockade with tirofiban on adverse cardiac events in patients with unstable angina or acute myocardial infarction undergoing coronary angioplasty. *Circulation* 96 (1997) 1445-1453
205. 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* 336 (1990) 827-830
206. Theroux P, Quimet H, McCans J, Latour JG et al. Aspirin, heparin, or both to treat acute unstable angina. *N Engl J Med* 319 (1988) 1105-1111
207. Theroux P, Fuster V. Acute coronary syndroms. Unstable angina and non-Q-wave myocardial infarction. *Circulation* 97 (1998) 1195-1206
208. The TARGET Investigators. Topol EJ, Moliterno DJ, Herrmann HC, Powers ER, Grines CL, Cohen DJ, Cohen EA, Bertrand M, Neumann FJ, Stone GW, Dibattiste PM, Demopoulus L. Comparison of two platelet glycoprotein IIb/IIIa inhibitors, tirofiban and abciximab, for the prevention of ischemic events with percutaneous coronary revascularization. *N Engl J Med* 344 (2001) 1888-1894
209. Topol EJ. Platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor antagonists in coronary artery disease. *Eur Heart J* 17 (1996) 9-18
210. Topol EJ. Toward a new frontier in myocardial reperfusion therapy: emerging platelet preeminence. *Circulation* 97 (1998) 211-218
211. Topol EJ, Mark DB, Lincoff AM, Cohen E, Burton J, Kleiman N, Talley D, Sapp S, Booth J, Cabot CF, Anderson KM, Califf RM. Outcomes at 1 year and economic implications of platelet glycoprotein IIb/IIIa blockade in patients undergoing coronary stenting: results from a multicentre randomised trial. EPISTENT Investigators. Evaluation of Platelet IIb/IIIa Inhibitor for Stenting. *Lancet* 354 (1999) 2019-2024
212. Topol EJ (Herausgeber). Textbook of cardiovascular medicine. 2. Auflage. Lippincott Williams & Williams Verlag, Philadelphia, 2001. 385-420

213. Ueda A, Okuda K, Ohno S, Shirai A, Iarashi T, Matsunaga K, Fukushima J, Kawamoto S, Ishigatsubo Y, Okubo T. NF-kappa B and Sp1 regulate transcription of the human monocyte chemoattractant protein-1 gene. *J immunol* 153 (1994) 2052-2063
214. Urban P, Macaya C, Rupprecht HJ, Kiemeneij F, Emanuelsson H, Fontanelli A, Pieper M, Wesseling T, Sagnard L. Randomized evaluation of anticoagulation versus antiplatelet therapy after coronary stent implantation in high-risk patients. The MATTIS-Trial. *Circulation* 98 (1998) 2126-2132
215. Valente AJ, Rozek MM, Sprague EA, Schwartz CJ. Mechanisms in intimal monocyte-macrophage recruitment. A special role for monocyte chemotactic protein-1. *Circulation* 86 (1992) III20-III25
216. Vidhun R, Feldman D, Stoyanov MY, Badimon JJ, Ambrose JA. Effects of platelet glycoprotein IIb/IIIa inhibition with abciximab on thrombin generation and activity during percutaneous coronary intervention *Am Heart J* 138 (1999) 49-54
217. Wallentin L, Ohlsson J, Swahn E. Low-molecular-weight-heparin during instability in coronary artery disease. *Lancet* 347 (1996) 561-567
218. Warkentin TE, Powling MJ, Hardisty RM. Measurement of fibrinogen binding to platelets in whole blood by flow cytometry: a micromethod for the detection of platelet activation. *Br J Haematol* 76 (1990) 387-394
219. Weber A-A, Schrör K. 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* 98 (2001) 1619-1621
220. Weissberg PL, Rudd JHI. in *Textbook of cardiovascular medicine* (Herausgeber: Topol, EJ) Lippincott Williams & Williams Verlag, Philadelphia, 2001. 3-14
221. Wencel-Drake JD, Plow EF, Kunicki TJ, Woods VL, Keller DM, Ginsberg MH. Localization of internal pools of membrane glykoproteins involved in platelet adhesive responses. *Am J Pathol* 124 (1986) 324-334

222. Wertheimer SJ, Myers CL, Wallace RW, parks TP. Intercellular adhesion molecule-1 gene expression in human endothelial cells. Differential regulation by tumor necrosis factor-alpha and phorbol myristate acetate. *J Biol Chem* 267 (1992) 12030-12035
223. White JG. Platelets and atherosclerosis. *Eur J Clin Invest* 24 (1994) Suppl. 1: 25-29
224. White JG. Unstable angina. In: *Textbook of cardiovascular medicine*. Topol EJ (Herausgeber), Lippincott-Raven Verlag, Philadelphia, 2. Auflage, 1998, 365-393
225. 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* 80 (1989) 198-205
226. Wittkowsky AK. The role of thrombin inhibition during percutaneous coronary intervention. *Pharmacotherapy* 22 (2002) 97S-104S
227. 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* 261 (1986) 15242-15251
228. Xiao Z, Theroux P. Platelet activation with unfractionated heparin at therapeutic concentrations and comparisons with a low-molecular-weight heparin and with a direct thrombin inhibitor. *Circulation* 97 (1998) 251-256
229. Zahn R, Schiele R, Schneider S, Gitt AK, Wienbergen H, Seidl K, Bossaller C, Buttner HJ, Gottwik M, Altmann E, Rosahl W, Senges J. Decreasing hospital mortality between 1994 and 1998 in patients with acute myocardial infarction treated with primary angioplasty but not in patients treated with intravenous thrombolysis. Results from the pooled data of the Maximal Individual Therapy in Acute Myocardial Infarction (MITRA) Registry and the Myocardial Infarction Registry (MIR). *J Am Coll Cardiol* 36 (2000) 2064-71
230. Zaman AG, Herlft G, Worthley SG, Badimon JJ. The role of plaque rupture and thrombosis in coronary artery disease. *Atherosclerosis* 149 (2000) 251-266

## 10 Lebenslauf

### Persönliche Daten:

Name	Thomas, Philipp Michael
Geburtsdatum	9. August 1971
Geburtsort	Reinbek
Staatsangehörigkeit	deutsch
Konfession	evangelisch
Familienstand	ledig
Eltern	Thomas, Karin Thomas, Dr. Alfred

### Schulbildung:

1978-1982	Grundschule Neuschönningstedt
1982-1991	Sachsenwald-Gymnasium Reinbek Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

### Weiterbildung:

1991-1992	Zivildienst bei der Sozialstation Glinde
1993-1994	Tätigkeit als Krankenpflegehelfer im Krankenhaus St. Adolphstift Reinbek

### Hochschulbildung:

Seit 1994	Studium der Medizin an der Ludwig-Maximilians- Universität in München
1997	Ärztliche Vorprüfung
1998	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2000	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2001-2002	Praktisches Jahr
2002	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

## **11 Danksagung**

Mein größter Dank gilt Herrn Professor Dr. Meinrad Gawaz, der mir das Gelingen dieser spannenden und interessanten Dissertation ermöglichte, für seine kompetente und motivierende Betreuung. Durch ihn habe ich menschliche wie auch fachliche Bereicherung erfahren.

Auch möchte ich mich ganz herzlich bei Frau Dr. Iris Müller und Frau Sandra Kerstan für ihre Betreuung und tatkräftige Mithilfe bei der Studie bedanken.

## 12 Anhang

**Tab 9: Geräteeinstellungen und Herstellung der Lösungen**

Durchflusszytometer / Thrombozytenmessung:

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

Durchflusszytometer / ECV-304-Zell Messung:

Cytometer Type:	FACScan					
Detectors/Amps:						
	Parameter	Detector	Voltage	Amplification		Gain Mode
	P1	FSC	E-1	1,00	log	
	P2	SSC	279	1,00	log	
	P3	FL1	418	1,00	log	
	P4	FL2	376	1,00	log	
	P5	FL3	150	1,00	log	
Threshold:						
	Parameter FSC					
	Value 0					
Compensation:						
	FL1	0,0 % FL2				
	FL2	24,7 % FL1				
	FL2	0,0% FL3				
	FL3	0,0 % FL2				
Log Data Units:	Channel Values					



## Herstellung der Lösungen / Plättchenabhängige Thrombin-Messung:

### **Chromogen S-2238:**

1 Ampulle Chromogen S-2238  
+ 13,8 ml Aqua dest. = Stammlösung

1 ml Stammlösung  
+ 4,8 ml Tris-Puffer pH 8,1  
= fertiges Chromogen

### **Tris-Puffer (pH 8,1):**

12,1 g Trizma-Base (Fa. Sigma-Aldrich) in 100 ml Aqua dest. auflösen

Mit rauchender 37 prozentiger Salzsäure am pH-Meter auf pH 8,1 einstellen

### **Tyrodes Puffer (pH 7,4):**

0,2 g BSA (Bovines Serum Albumin, Fa. Sigma-Aldrich)  
+ 0,2 g Glukose  
+ 20 ml Tyrodes 10x  
+ 180 ml Aqua dest.

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

### **Tyrodes 10x:**

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

Photometer / Plättchenabhängige Thrombin-Messung:

MODULE:	KINETICS		
TEST WAVELENGTH:	405 nm		
REF. WAVELENGTH:	630 nm		
PLATE ID PROMPT:	NO		
SHAKE TIME:	5 Seconds		
DISPLAY WELL:	S6		
START MODE:	IMMEDIATELY		
TOTAL TIME OF KINETIC:	00:19.30		
TIME INTERVAL:	30 Secs.		
NUMBER OF READINGS:	40		
CALCULATION MODE:	BEST O.D./min		
O.D.'s:	INCREASING		
SCALE FACTOR:	NONE		
RESULTS LOG:	NO		
REPORT FORMAT:	mOD		
O.D. EDIT OPTION:	YES		
CONCENTRATIONS:			
STD. 1	=	31.250	mU/ml
STD. 2	=	62.500	mU/ml
STD. 3	=	125.000	mU/ml
STD. 4	=	250.000	mU/ml
STD. 5	=	500.000	mU/ml
STD. 6	=	1000.000	mU/ml
CURVE FIT TYPE	=	LINEAR POWER FIT WITH TAILS Y = a+bX	
		LOG-LOG AXIS FITTING	
CURVE FIT QUALITY CONTROL :	NO		
mO.D./min MATRIX :	YES		
THRESHOLD MATRIX :	NO		

Photometer / MCP-1 Messung:

MODULE: MR 5000

W / L MODE: DUAL

TEST WAVELENGTH: 450 nm

REF. WAVELENGTH: 550 nm

PLATE ID PROMPT: YES

OD MATRIX PRINTOUT: YES

PRINTER ENABLED: YES

NO SHAKE

OPTIONS:

CURVE FIT - LOG-LOG CURVE

NO. OF STANDARDS = 8

CONCENTRATIONS:

STD. 1 = 2000.000

STD. 2 = 1000.000

STD. 3 = 500.000

STD. 4 = 250.000

STD. 5 = 125.000

STD. 6 = 62.500

STD. 7 = 31.500

STD. 8 = 0.000

**Tab 10: Max.-Aggregation nach 5 min**

**ADP 5 µM**

**Abciximab**

Abnahme		24 h	30 h	36 h	48 h	72 h
Mittelwert	61,71	30,90	0,00	0,36	4,40	11,42
SD*	12,83	7,34	0,00	1,14	5,72	7,50

**Tirofiban**

Abnahme		24 h	30h	36 h	48 h	72 h
Mittelwert	53,14	31,36	0,00	0,00	18,74	24,71
SD	13,30	20,94	0,00	0,00	13,37	11,08

**ADP 20 µM**

**Abciximab**

Abnahme	0 h	24 h	30 h	36 h		72 h
Mittelwert	67,18	47,59	0,30	2,56	8,99	20,61
SD	10,54	13,28	0,96	4,36	9,27	10,43

**Tirofiban**

Abnahme	0 h	24 h	30 h	36 h	48 h	72 h
Mittelwert	64,86	43,88	0,00	0,46	27,86	35,05
SD	13,42	16,99	0,00	0,92	18,93	11,79

**TRAP 25 µM**

**Abciximab**

Abnahme	0 h	24 h	30 h	36 h	48 h	72 h
Mittelwert	73,91	65,31	20,65	34,31	39,70	54,30
SD	8,10	11,72	14,26	14,70	16,33	9,81

**Tirofiban**

Abnahme	0 h	24 h	30 h	36 h	48 h	72 h
Mittelwert	73,24	72,78	22,10	18,30	53,94	61,53
SD	10,62	9,66	10,37	12,40	19,13	14,94

\*SD: Standardabweichung; [% der max. Aggregation]

**Tab 11: Max.-Aggregation innerhalb 5 min**

**ADP 5 µM**

**Abciximab**

Abnahme	0 h	24 h	30 h	36 h	48 h	72 h
Mittelwert	61,92	30,90	0,00	0,36	4,40	11,42
SD*	12,83	7,34	0,00	1,14	5,72	7,50

**Tirofiban**

Abnahme	0 h	24 h	30h	36 h	48 h	72 h
Mittelwert	46,53	26,86	0,00	0,00	19,74	20,47
SD	20,57	20,94	0,00	0,00	16,37	13,34

**ADP 20 µM**

**Abciximab**

Abnahme	0 h	24 h	30 h	36 h	48 h	72 h
Mittelwert	67,18	47,59	0,30	2,56	8,99	20,61
SD	10,54	13,28	0,96	4,36	9,27	10,43

**Tirofiban**

Abnahme	0 h	24 h	30 h	36 h	48 h	72 h
Mittelwert	59,64	39,41	0,00	0,46	27,86	33,21
SD	17,76	18,67	0,00	0,82	18,93	12,36

**TRAP 25 µM**

**Abciximab**

Abnahme	0 h	24 h	30 h	36 h	48 h	72 h
Mittelwert	73,91	65,31	20,65	34,31	39,70	54,30
SD	8,10	11,72	14,26	14,70	16,33	9,81

**Tirofiban**

Abnahme	0 h	24 h	30 h	36 h	48 h	72 h
Mittelwert	71,73	67,87	22,10	18,30	54,39	58,8
SD	10,62	15,14	9,23	11,28	17,46	16,42

\*SD: Standardabweichung; [% der max. Aggregation]

**Tab 12: Deaggregation****ADP 5 µM****Abciximab**

Abnahme	0 h	24 h	30 h	36 h	48 h	72 h
Mittelwert	8,53	54,65	100,0	100,0	7,91	40,50
SD*	11,14	28,75	100,0	100,0	25,01	36,70

**Tirofiban**

Abnahme	0 h	24 h	30 h	36 h	48 h	72 h
Mittelwert	9,73	25,04	100,0	100,0	46,43	55,33
SD	10,03	33,86	100,0	100,0	40,40	39,22

**ADP 20 µM****Abciximab**

Abnahme	0 h	24 h	30 h	36 h	48 h	72 h
Mittelwert	1,03	35,19	100,0	100,0	20,84	33,47
SD	2,18	33,54	100,0	100,0	19,40	34,16

**Tirofiban**

Abnahme	0 h	24 h	30 h	36 h	48 h	72 h
Mittelwert	0,66	29,69	100,0	100,0	32,43	39,76
SD	1,61	38,18	100,0	100,0	36,71	34,73

**TRAP 25 µM****Abciximab**

Abnahme	0 h	24 h	30 h	36 h	48 h	72 h
Mittelwert	0,00	12,89	7,90	15,84	13,04	4,61
SD	0,00	17,68	10,21	20,15	16,05	4,30

**Tirofiban**

Abnahme	0 h	24 h	30 h	36 h	48 h	72 h
Mittelwert	0,28	2,98	2,83	1,61	2,93	4,59
SD	0,78	5,59	4,29	3,33	3,75	8,17

\*SD: Standardabweichung

**Tab 13: Plättchenabhängige Thrombingeneration**

**unstimuliert**

**Abciximab**

Abnahme	0 h	24 h	30 h	36 h	48 h	72 h
Mittelwert	17,84	21,33	15,27	15,93	27,00	21,64
SD*	9,43	16,71	5,77	8,56	21,89	12,09

**Tirofiban**

Abnahme	0 h	24 h	30 h	36 h	48 h	72 h
Mittelwert	21,08	26,40	20,71	27,24	21,34	25,75
SD	11,77	19,80	16,77	16,14	12,25	14,26

**Thrombin**

**Abciximab**

Abnahme	0 h	24 h	30 h	36 h	48 h	72 h
Mittelwert	36,49	38,32	14,17	31,52	34,39	31,78
SD	16,84	22,00	5,15	15,54	23,77	16,35

**Tirofiban**

Abnahme	0 h	24 h	30 h	36 h	48 h	72 h
Mittelwert	31,90	46,18	18,34	32,09	31,33	32,78
SD	19,31	28,93	12,63	16,70	12,18	18,78

**Tissue-Factor**

**Abciximab**

Abnahme	0 h	24 h	30 h	36 h	48 h	72 h
Mittelwert	53,10	52,85	17,70	55,81	50,85	56,23
SD	15,31	23,59	8,34	22,20	16,98	19,98

**Tirofiban**

Abnahme	0 h	24 h	30 h	36 h	48 h	72 h
Mittelwert	50,80	65,58	27,19	51,99	64,21	58,33
SD	27,20	29,13	16,69	23,09	29,04	26,52

\*SD: Standardabweichung; [mO.D./min]

**Tab 14: P-Selektin-Expression**

**Abciximab**

**unstimuliert**

Abnahme	0 h	24 h	30 h	36 h	48 h	72 h
Mittelwert	176,56	171,33	172,98	190,52	177,55	179,00
SD*	30,04	22,67	25,32	35,44	36,90	21,18

**Tirofiban**

Abnahme	0 h	24 h	30 h	36 h	48 h	72 h
Mittelwert	184,80	174,98	177,13	183,66	168,25	172,71
SD	31,60	9,31	14,34	29,64	15,74	21,32

**Abciximab**

**ADP 5 µM**

Abnahme	0 h	24 h	30 h	36 h	48 h	72 h
Mittelwert	214,80	183,51	176,95	202,70	180,52	188,98
SD	51,73	21,30	21,66	47,75	45,15	25,11

**Tirofiban**

Abnahme	0 h	24 h	30 h	36 h	48 h	72 h
Mittelwert	211,88	187,88	190,50	192,00	184,50	178,00
SD	29,98	16,38	15,41	34,07	23,38	18,38

**Abciximab**

**ADP 20 µM**

Abnahme	0 h	24 h	30 h	36 h	48 h	72 h
Mittelwert	211,38	186,64	180,12	202,46	191,59	190,89
SD	46,77	20,24	25,99	51,00	29,02	27,71

**Tirofiban**

Abnahme	0 h	24 h	30 h	36 h	48 h	72 h
Mittelwert	215,38	190,09	189,03	198,15	188,58	172,43
SD	26,73	12,96	10,28	26,95	17,45	24,43

**Abciximab**

**TRAP 25 µM**

Abnahme	0 h	24 h	30 h	36 h	48 h	72 h
Mittelwert	288,51	264,22	245,60	275,14	242,60	277,67
SD	36,63	52,50	62,95	56,81	78,65	52,11

**Tirofiban**

Abnahme	0 h	24 h	30 h	36 h	48 h	72 h
Mittelwert	310,55	277,63	245,91	275,21	242,60	277,82
SD	38,64	32,50	40,38	43,47	44,75	28,67

\*SD: Standardabweichung; [mittlere Immunfluoreszenz]



**Tab 15: PAC-1-Expression**

**Abciximab**

**unstimuliert**

Abnahme	0 h	24 h	30 h	36 h	48 h	72 h
Mittelwert	157,20	158,37	140,59	134,71	128,40	137,72
SD*	55,31	40,70	24,55	26,30	20,07	28,90

**Tirofiban**

Abnahme	0 h	24 h	30 h	36 h	48 h	72 h
Mittelwert	155,32	164,06	177,62	135,51	154,22	162,74
SD	28,08	49,49	58,22	36,72	50,45	32,75

**Abciximab**

**ADP 5 µM**

Abnahme	0 h	24 h	30 h	36 h	48 h	72 h
Mittelwert	272,69	221,00	142,06	140,84	145,78	169,95
SD	117,79	62,20	25,50	30,51	25,16	59,40

**Tirofiban**

Abnahme	0 h	24 h	30 h	36 h	48 h	72 h
Mittelwert	261,38	213,96	207,51	204,53	227,13	199,63
SD	80,47	74,56	67,07	57,68	69,57	37,52

**Abciximab**

**ADP 20 µM**

Abnahme	0 h	24 h	30 h	36 h	48 h	72 h
Mittelwert	308,01	215,21	142,59	140,69	149,30	183,16
SD	84,58	74,35	30,94	29,21	22,44	67,14

**Tirofiban**

Abnahme	0 h	24 h	30 h	36 h	48 h	72 h
Mittelwert	253,83	236,07	210,06	186,40	225,63	198,38
SD	77,99	75,54	79,99	54,25	66,93	34,02

**Abciximab**

**TRAP 25 µM**

Abnahme	0 h	24 h	30 h	36 h	48 h	72 h
Mittelwert	260,52	216,55	154,16	140,51	139,11	162,70
SD	64,77	82,08	50,41	33,13	22,78	55,97

**Tirofiban**

Abnahme	0 h	24 h	30 h	36 h	48 h	72 h
Mittelwert	200,13	212,13	204,04	183,13	192,63	206,25
SD	63,42	68,85	74,46	54,86	55,48	43,63

\*SD: Standardabweichung; [mittlere Immunfluoreszenz]

**Tab 16: MCP-1 Freisetzung**

**Abciximab**

**ADP 5  $\mu$ M**

Abnahme	0 h	24 h	30 h	36 h
Mittelwert	0,582	0,646	0,690	0,580
SD*	0,141	0,068	0,218	0,099

**Tirofiban**

Abnahme	0 h	24 h	30 h	36 h
Mittelwert	0,515	0,591	0,588	0,520
SD	0,156	0,298	0,244	0,183

**Abciximab**

**ADP 20  $\mu$ M**

Abnahme	0 h	24 h	30 h	36 h
Mittelwert	0,613	0,627	0,824	0,579
SD	0,111	0,070	0,314	0,127

**Tirofiban**

Abnahme	0 h	24 h	30 h	36 h
Mittelwert	0,541	0,554	0,711	0,550
SD	0,184	0,253	0,439	0,250

**Abciximab**

**TRAP 25  $\mu$ M**

Abnahme	0 h	24 h	30 h	36 h
Mittelwert	0,638	0,703	0,534	0,607
SD	0,099	0,124	0,209	0,114

**Tirofiban**

Abnahme	0 h	24 h	30 h	36 h
Mittelwert	0,566	0,533	0,469	0,598
SD	0,212	0,190	0,139	0,266

	<b>Medium</b>	<b>IL-1<math>\beta</math></b>	<b>Kontrollgruppe</b>
Mittelwert	0,220	1,743	0,716
SD	0,046	0,501	0,016

\*SD: Standardabweichung; [pg/ml]

**Tab 17: ICAM-1-Expression**

**Abciximab**

**ADP 5  $\mu$ M**

Abnahme	0 h	24 h	30 h	36 h
Mittelwert	183,1	184,5	186,7	178,5
SD*	15,0	7,0	12,4	8,8

**Tirofiban**

Abnahme	0 h	24 h	30 h	36 h
Mittelwert	187,8	186,8	192,1	175,0
SD	16,2	10,9	10,0	17,6

**Abciximab**

**ADP 20  $\mu$ M**

Abnahme	0 h	24 h	30 h	36 h
Mittelwert	188,3	180,2	187,4	171,9
SD	10,0	5,9	12,6	12,9

**Tirofiban**

Abnahme	0 h	24 h	30 h	36 h
Mittelwert	182,9	183,8	199,3	174,8
SD	20,5	10,0	9,0	15,4

**Abciximab**

**TRAP 25  $\mu$ M**

Abnahme	0 h	24 h	30 h	36 h
Mittelwert	180,7	183,9	180,0	172,1
SD	6,9	9,5	12,6	9,9

**Tirofiban**

Abnahme	0 h	24 h	30 h	36 h
Mittelwert	181,9	182,1	176,5	170,0
SD	13,0	18,4	19,3	15,7

	<b>Medium</b>	<b>IL-1<math>\beta</math></b>	<b>Kontrollgruppe</b>
Mittelwert	146,5	315,1	190,0
SD	19,2	25,1	14,0

\*SD: Standardabweichung; [mittlere Immunfluoreszenz]

**Tab 18: uPAR-Expression****Abciximab****ADP 5 µM**

Abnahme	0 h	24 h	30 h	36 h
Mittelwert	292,5	296,2	301,1	287,8
SD*	15,9	19,1	25,3	20,8

**Tirofiban**

Abnahme	0 h	24 h	30 h	36 h
Mittelwert	287,9	283,4	295,8	277,9
SD	28,0	37,2	32,5	29,7

**Abciximab****ADP 20 µM**

Abnahme	0 h	24 h	30 h	36 h
Mittelwert	298,8	287,7	298,2	283,6
SD	18,7	19,4	26,3	22,5

**Tirofiban**

Abnahme	0 h	24 h	30 h	36 h
Mittelwert	277,6	283,3	296,8	282,6
SD	43,7	40,4	31,8	35,9

**Abciximab****TRAP 25 µM**

Abnahme	0 h	24 h	30 h	36 h
Mittelwert	289,3	292,9	299,8	280,9
SD	19,0	21,4	25,8	24,4

**Tirofiban**

Abnahme	0 h	24 h	30 h	36 h
Mittelwert	276,9	280,8	297,0	273,1
SD	39,7	42,2	37,8	29,4

	<b>Medium</b>	<b>IL-1β</b>	<b>Kontrollgruppe</b>
Mittelwert	264,9	357,8	342,8
SD	26,1	19,7	16,6

\*SD: Standardabweichung; [mittlere Immunfluoreszenz]