

Aus dem Institut für Anästhesiologie  
des Herz- und Diabeteszentrums Nordrhein-Westfalen  
Direktor: Prof. Dr. med. Kazuo Inoue

**Diagnostik der Thrombozytenfunktion unter Zusatz des Glyko-  
protein-IIb/IIIa-Rezeptorantagonisten Tirofiban**

– Vergleich der „Point of Care“ Verfahren Thrombelastographie,  
Impedanzaggregometrie und „Platelet Function Analyzer“ (PFA 100)  
bei verschiedenen Tirofiban-Konzentrationen –

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität  
Düsseldorf

vorgelegt von  
Michael Friedrich Niggemeier  
2004

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der  
Heinrich Heine-Universität Düsseldorf

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. dent. W. Raab  
Dekan

Referent: Prof. Dr. med. K. Inoue  
Korreferent: Priv.-Doz. Dr. med. Dr. G. Giers

## Inhaltsverzeichnis

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1. Einleitung</b>   | <b>1</b>  |
| <b>2. Methode</b>  | <b>4</b>  |
| 2.1. Blutentnahme  | 4         |
| 2.2. Herstellung der Testproben  | 4         |
| 2.3. Messgeräte und Prinzipien   | 5         |
| 2.3.1. Thrombelastographie   | 5         |
| 2.3.2. Vollblut-Impedanz-Aggregometrie   | 6         |
| 2.3.3. Thrombozytenfunktion-Analyse mit PFA-100  | 7         |
| 2.4. Statistische Analyse  | 8         |
| <b>3. Ergebnisse</b>   | <b>9</b>  |
| 3.1. Blutbild und Gerinnungsstatus der Probanden   | 9         |
| 3.2. Einflüsse von Tirofiban auf Thrombelastographie, Vollblut-Impedanz-Aggregometrie und PFA-100 (Überblick)      | 9         |
| 3.3. Einflüsse von Tirofiban auf Thrombelastographie, Vollblut-Impedanz-Aggregometrie und PFA-100 (Einzelne Daten) | 10        |
| 3.3.1. Thrombelastographie   | 10        |
| 3.3.1.1. Clot Formation Time (CFT)   | 10        |
| 3.3.1.2. Maximum Clot Firmness (MCF)   | 11        |
| 3.3.1.3. Alpha-Winkel  | 11        |
| 3.3.1.4. Coagulation Time (CT)   | 11        |
| 3.3.2. Vollblut-Impedanz-Aggregometrie   | 11        |
| 3.3.3. PFA-100   | 12        |
| 3.4. Kurzfassung der Ergebnisse  | 12        |
| <b>4. Diskussion</b>   | <b>14</b> |
| 4.1. Problematik bei der Verwendung des PFA-100-Systems  | 14        |
| 4.2. Problematik bei der Verwendung der Thrombelastographie  | 15        |
| 4.3. Plasmakonzentration und therapeutisches Ziel  | 16        |
| 4.4. Vergleich der optischen (turbimetrischen) und elektronischen (Impedanzmessung) Aggregometrie                  | 17        |
| 4.5. Zum Problem der Agonisten   | 18        |
| 4.6. Zum Einfluss von Citrat auf Messergebnisse  | 19        |
| 4.7. Schlussfolgerungen  | 20        |
| <b>5. Zusammenfassung</b>  | <b>21</b> |
| <b>6. Literaturverzeichnis</b>   | <b>23</b> |
| <b>7. Abbildungen</b>  | <b>26</b> |
| <b>8. Tabellen</b>   | <b>37</b> |
| <b>9. Lebenslauf</b>   | <b>41</b> |

## 1. Einleitung

Die durch Thrombozyten initiierte Thrombose spielt eine zentrale Rolle in der Pathogenese des akuten Koronarsyndroms und der akuten ischämischen Komplikationen nach einer perkutanen transluminalen Koronarangioplastie (PTCA).<sup>1,2</sup> Die Entstehung einer spontanen bzw. durch PTCA verursachten Endothelläsion führt zur Adhäsion, Aktivierung und Aggregation der Thrombozyten. Die Thrombozytenaggregate bilden schließlich einen Thrombus in den Koronarien, der zur Myokardischämie führt. Große Bedeutung besitzt bei diesem Vorgang der Glykoprotein-IIb/IIIa-Komplex auf der Thrombozytenoberfläche.<sup>3,4</sup> Während auf der ruhenden Oberfläche der Thrombozyten keine Bindung zwischen Glykoprotein-IIb/IIIa-Komplex und Fibrinogen besteht, führt die Aktivierung der Thrombozyten u.a. zur Rekrutierung weiterer Glykoprotein-IIb/IIIa-Rezeptoren aus den inneren Speichern und zur Freilegung von Bindungsstellen für Fibrinogen.

Die Entwicklung einer neuen Klasse von Medikamenten, welche die Bindung von Fibrinogen an den Glykoprotein-IIb/IIIa-Rezeptoren hemmen, eröffnete somit die Möglichkeit, thrombotische Komplikationen im akuten Koronarsyndrom und nach PTCA zu reduzieren.<sup>5-8</sup> Die Behandlung mit den Glykoprotein-IIb/IIIa-Antagonisten ist heute eine Standardmaßnahme in der interventionell tätigen Kardiologie, auf Intensivstationen und im Herzkatheterlabor. Grundlage für den Einsatz vom Glykoprotein-IIb/IIIa-Antagonisten Tirofiban waren die positiven Ergebnisse der RESTORE (Randomized Efficacy Study of Tirofiban for Outcome and REstenosis)-,<sup>9</sup> PRISM (Platelet Receptor Inhibition in Ischemic Syndrome Management)-<sup>7</sup> und PRISM-PLUS (Platelet Receptor Inhibition in Ischemic Syndrome Management in Patients Limited by Unstable Signs and Symptoms)<sup>10</sup>-Studie.

Für den klinisch tätigen Anästhesisten in der Kardiochirurgie stellt sich die Frage nach einem geeigneten Monitoring der Thrombozytenfunktion bei einer Therapie mit Glykoprotein-IIb/IIIa-Antagonisten, dies sowohl unter der Problematik einer Unterdosierung und der daraus resultierenden Gefahr einer Gefäßocclusion und

Myokardischämie, als auch aus dem Risiko einer Überdosierung mit konsekutiven Blutungskomplikationen und exzessivem Transfusionsbedarf bei dringlich erforderlicher Myokardrevaskularisierung.

Auch die peri- und intraoperative Gabe von Glykoprotein-IIb/IIIa-Antagonisten durch den Anästhesisten erscheint bei bestimmten Indikationen sinnvoll. So verwendeten Koster et al.<sup>11</sup> den Glykoprotein-IIb/IIIa-Antagonisten Tirofiban bei Patienten mit heparininduzierter Thrombozytopenie Typ II (HIT II), die sich einer Herzoperation unter Zuhilfenahme der Herz-Lungen-Maschine (HLM) unterziehen mussten. Sie antikoagulierte die Patienten mit HIT II konventionell mit Heparin für die HLM und verhinderte die heparininduzierte Thrombozytenaggregation mit Tirofiban. Bei einer solchen Kombinationstherapie mit Heparin und Tirofiban ergibt sich ebenfalls die Frage nach einem geeigneten Monitoring der Thrombozytenfunktion.

Tirofiban (Aggrastat<sup>R</sup>; MK-383; L-Thyrosin, N-(n-Butylsulfonyl)-O-[4-Butyl(4-Piperidiny)], monohydrochlorid Monohydrat) ist ein kurzwirkender nicht peptidischer Glykoprotein-IIb/IIIa-Antagonist mit geringem Metabolismus, mit einer Plasmaclearance von 329 ml/min, einer renalen Clearance von 140 ml/min, einem Verteilungsvolumen von 76 Litern und einer Plasma-Halbwertszeit von 1,6 Stunden. Tirofiban wird zu 37 Prozent im Urin ausgeschieden, der überwiegende Anteil wird biliär sezerniert.<sup>12</sup>

Eine schon traditionelle Überwachung einer Pharmatherapie wäre das Messen von Plasmaspiegeln unter der Vorstellung, ein bestimmter Spiegel eines Medikaments entspräche einer bestimmten pharmakologischen Wirkung. In der Praxis sagt eine Plasmaspiegelbestimmung wenig über die tangierte Thrombozytenfunktion aus, fließen Störgrößen wie die interindividuelle Rezeptorenanzahl, die Thrombozytenzahl, ihr Aktivierungsgrad, Unterschiede der intrinsischen Thrombozytenkompetenz und unterschiedliche Spiegel von Thrombozyten-Cofaktoren (Von Willebrand Faktor, Fibrinogen) mit ein.<sup>13</sup>

Ein Monitoring der Thrombozytenfunktion hat gegenüber dem Messen von Plasmaspiegeln die theoretischen Vorteile, den therapeutischen Bereich der Glykoprotein-IIb/IIIa-Antagonisten-Therapie zu definieren, wichtige Störgrößen auszublenden und mit einem limitierten Aufwand an Equipment sowohl klinischen als auch finanziellen

Sachzwängen gerecht zu werden.<sup>13</sup> Die Thrombozytenfunktionsmessungen bewerten die gesamten Fähigkeiten der Thrombozyten zur Adhäsion, zur Form- und Funktionsänderung, zur Sekretion von Granula und zur Aggregation, auch unter pharmakologischer Therapie.

Zur Funktionsdiagnostik der Thrombozyten stehen verschiedene Verfahren zur Verfügung. An dieser Stelle seien genannt die Bestimmung der Blutungszeit nach Ivy (modifiziert nach Mielke), der Rumpel-Leede Test, die Bestimmung der Thrombozytenaggregation mit Hilfe der turbimetrischen Verfahren nach Born,<sup>14</sup> die Vollblut-Impedanz-Aggregometrie,<sup>15</sup> die Thrombelastographie (z.B. RoTEG),<sup>16</sup> das „Rapid Platelet Function Assay“ (RPFA),<sup>17</sup> die „in vitro“ Blutungszeit nach Katzer und Born (PFA-100),<sup>18,19</sup> die luminometrische Freisetzungsreaktion von ATP, die Bestimmung von thrombozytenspezifischen Eikosanoidmetaboliten (z.B. ELISA-Messung von Thromboxan-B<sub>2</sub>), und die durchflusszytometrischen Verfahren.<sup>20</sup>

In der vorliegenden Studie soll nun untersucht werden, inwieweit die Effekte von Tirofiban auf die Thrombozytenfunktion mit den einfach und schnell durchführbaren Tests („point of care“) Thrombelastographie, Vollblut-Impedanz-Aggregometrie und „Platelet Function Analyser“ (PFA-100) beurteilt werden können.

## **2. Methode**

### **2.1. Blutentnahme**

Von 10 gesunden Probanden (Mitarbeiter der Abteilung), die in den letzten 21 Tagen vor der Blutentnahme keine antithrombozytäre Medikation erhielten, wurde durch eine 20-Gauge-Nadel venöses Blut in zwei 10 ml-Citrat-Monovetten (zur Herstellung von Testproben für Thrombelastographie und Vollblut-Impedanz-Aggregometrie) und in sieben 3,8 ml-Citrat/Puffer-Monovetten (für PFA-Messung) entnommen. Zusätzlich wurde venöses Blut in zwei 2,7 ml-EDTA-Monovetten und zwei 3 ml-Citrat-Monovetten entnommen, um Hämoglobin-Werte, Thrombozytenzahl und Gerinnungsstatus ohne und mit 1 µg/ml Tirofiban zu bestimmen.

### **2.2. Herstellung der Testproben**

Vier verschiedene Konzentrationen von Tirofiban-Lösungen wurden durch Verdünnung von Tirofiban (250 µg/ml) mit 0,9% NaCl hergestellt (Tabelle 1).

Für Thrombelastographie und Impedanz-Aggregometrie wurden, wie in der Tabelle 2 aufgelistet, 2 ml Citratblut ohne und mit unterschiedlich verdünnten Tirofiban-Lösungen und 0,9% NaCl gemischt, so dass Blutproben ohne und mit neun verschiedenen Tirofiban-Konzentrationen (von 2,5 ng/ml bis 1000 ng/ml) entstanden.

Für die PFA-Bestimmungen wurden, wie in der Tabelle 3 gezeigt, Tirofiban-Lösungen direkt in die 3,8 ml-Citrat/Puffer-Monovetten pipettiert. Da in den Pilotuntersuchungen alle PFA-Werte bereits bei 50 ng/ml Tirofiban den maximalen gerätetechnisch möglichen PFA-Wert von 300 Sekunden erreichten, wurden PFA-Bestimmungen an Blutproben mit maximal 100 ng/ml Tirofiban durchgeführt.

Um eine Testprobe mit 1 µg/ml Tirofiban für Hämoglobin- und Thrombozytenbestimmung herzustellen, wurde eine gefüllte 2,7 ml-EDTA-Monovette mit 10,8 µl Lösung I (250 µg/ml) gemischt. Ebenso wurde eine gefüllte 3 ml-Citrat-Monovette mit 12 µl

Lösung I (250 µg/ml) gemischt, um eine Testprobe mit 1 µg/ml Tirofiban für den Gerinnungsstatus herzustellen.

Die Messungen an allen Geräten wurden innerhalb von drei Stunden nach Mischung der Testproben mit Tirofiban-Lösungen durchgeführt.

## **2.3. Messgeräte und Prinzipien**

### **2.3.1. Thrombelastographie**

Die Thrombelastographie ist eine bereits 1948 von Hartert<sup>21</sup> in Heidelberg entwickelte Methode zur Vollblut-Gerinnungsanalyse. Sie beruht auf der kontinuierlichen Aufzeichnung der viscoelastischen Eigenschaften des Blutgerinnsels gegen die Zeit.

Dabei wird eine Blutprobe in die Küvette gegeben, in deren Mitte sich ein Stempel befindet. Die Küvette wird nach rechts und links innerhalb bestimmter Freiheitsgrade gedreht (Abb. 1). In der Originalarbeit beträgt der Drehwinkel ein Zwölftel des Radius.

Beim klassischen Thrombelastographie-System wird die Drehung der Küvette mit der Bildung des Gerinnsels allmählich zum Stempel übertragen und die Drehung des Stempels zeichnet das Thrombelastogramm. Hartert beschrieb an seiner thrombelastographischen Normalkurve folgende Parameter: Die Reaktionszeit, die Gerinnselbildungszeit, die Gesamtelastizität und schließlich die Retraktionszeit.

Das in dieser Studie verwendete RoTEG-System (Rotations-Thrombelastographie, Pentapharm, München) ist eine Weiterentwicklung des klassischen Thrombelastographie-Systems mit moderner Computertechnik. Beim RoTEG-System wird die Drehung des Stempels durch Bildung des Gerinnsels zwischen der Küvette und dem Stempel allmählich eingeschränkt. Diese Änderung in der Drehung des Stempels wird in die Thrombelastographie-Amplitude, die in der klassischen Methode durch die Drehung der Küvette aufgezeichnet wird, umgerechnet, d.h., eine ungehinderte Drehung des Stempels entspricht 0 mm Amplitude und ein vollständiges Festhalten des Stempels



durch das Gerinnsel 100 mm Amplitude. Die Drehbewegung des Stempels wird optisch mittels Spiegel und Zeilensensor abgetastet und durch ein Computersystem verrechnet.

In dieser Studie werden vier Parameter vom Thrombelastogramm dargestellt, die Normbereiche werden in Klammern angegeben (Abb. 2):

1. Coagulation Time (CT) (<190sec), Gerinnungszeit, Reaktionszeit (Hartert): Zeit bis zum Beginn des Gerinnungsprozesses.
2. Clot Formation Time (CFT) (<110sec), Gerinnselbildungszeit (Hartert): Zeit, die das Gerinnsel benötigt, um ab Beginn der Gerinnselbildung eine definierte Grundfestigkeit (MCF = 20mm) zu erreichen.
3. Maximum Clot Firmness (MCF) (53 - 74mm), Gesamtelastizität (Hartert): Maximalamplitude des Thrombelastogramms.
4. Alpha-Winkel (70 - 85°): Ein Maß für die Schnelligkeit der Gerinnselbildung.

Bei der hier verwendeten RoTEG-Thrombelastographie wurde die Blutprobe (300µl) zuerst in die Küvette mit einer elektrisch gesteuerten automatischen Pipette gegeben. Die Wirkung des Citrats in der Blutprobe wurde dann mit CaCl<sub>2</sub> (20 µl, Konzentration 0,2 mol/l) (Reagenz StartTEG, Pentapharm) aufgehoben. Anschließend wurde der intrinsische Aktivator Thromboplastin-Phospholipid (20 µl) (Reagenz InTEG, Pentapharm) in die Blutprobe zugegeben, um den Gerinnungsprozess zu beschleunigen. Die ursprüngliche Thrombelastographie wurde ohne die Aktivatoren durchgeführt. Durch die Verwendung von Aktivatoren (hier Thromboplastin-Phospholipid) konnte ein erheblicher Zeitgewinn realisiert werden. Die Aufzeichnung des Thrombelastogramms begann dann automatisch im Bildschirm des angeschlossenen Notebooks. Die graphische Darstellung aller Analysen erfolgte später mit einem Drucker.

### **2.3.2. Vollblut-Impedanz-Aggregometrie**

Die Impedanz-Aggregometrie wurde zu Beginn der achtziger Jahre von Cardinal et al.<sup>15</sup> vorgestellt. Dabei wird in die Blutprobe eine aus zwei parallel positionierten Drähten bestehende Elektrode eingetaucht. Während des initialen Kontaktes mit Vollblut werden

die Elektroden mit einer Schicht Thrombozyten bedeckt. Ohne aggregationsfördernde Reagentien bleibt die Leitfähigkeit eines bestimmten Stromflusses konstant. Mit der Zugabe von Aggregationsstimulantien (z.B. Adenosindiphosphat (ADP), Arachidonsäure, Prostaglandine, Ristocetin, Thrombin) kommt es zur Thrombozytenaggregation (Anlagerung der Thrombozyten an die Elektroden) und daraus resultierend zur reduzierten Leitfähigkeit bzw. zum erhöhten Widerstand. Die Widerstandsänderung erfolgt proportional zur Thrombozytenaggregation.

Für die Messungen mit einem 2-Kanal-Vollblut-Impedanz-Aggregometer (Chrono-Log, Havertown, PA, USA) wurden die Blutproben (500µl Citratblut) mit dem gleichen Volumen von 0,9% NaCl in einer Küvette verdünnt und fünf Minuten inkubiert. Danach wurde eine Nullpunkt-Messung bei einem kontinuierlichen Stromfluss vorgenommen. Nach der Nullpunktbestimmung wurde die Probe mit dem Reagenz Kollagen (5 µg/ml) stimuliert. Die Impedanz wurde nach sechs Minuten gemessen. Das Ergebnis wurde am Gerät in Ohm angezeigt (Normbereich 13 - 23 Ohm).

### **2.3.3. Thrombozytenfunktion-Analyse mit PFA-100**

Als drittes Testgerät diente uns der Platelet-Funktion-Analyser PFA-100 (Dade-Behring, Schwalbach, Deutschland). Das System basiert auf Prinzipien, die ursprünglich von Kratzer und Born<sup>22,23</sup> beschrieben wurden. Ein Vorgänger des heutigen Systems (Thrombostat 4000) wurde von Von der Goltz<sup>24</sup> unter der Prämisse, die Thrombozytenfunktion schnell, akkurat und quantitativ zu beschreiben, entwickelt. Das PFA-System initiiert die thrombozytenabhängige Hämostase in vitro. Dazu wird Citratblut bei konstantem Unterdruck und Fluss aus einer Testkartusche durch eine Kapillare mit einer kleinen Öffnung (147 µm) und einer Nitrozellulosemembran (Porengröße 0,45 µm) gesaugt. Die Hämostase wird durch die Beschichtung von Kollagen-Epinephrin oder Kollagen-ADP im System aktiviert. Das Gerät misst die Verschlusszeit der kleinen Öffnung, welche ein Maß der Thrombozytenfunktion ist. Normale Werte für Epinephrin-PFA werden mit 60 – 175 Sekunden und für ADP-PFA mit 50 – 110 Sekunden angegeben. Der maximale, gerätetechnisch bedingte Wert des PFA-Tests beträgt 300

Sekunden für beide Agonisten. Eine Verschlusszeit länger als 300 Sekunden wird vom Gerät als „300 Sekunden“ angegeben.

#### **2.4. Statistische Analyse**

Die erhobenen Daten wurden mit Hilfe des Statistikprogramms SPSS 11<sup>25</sup> bearbeitet. Im Rahmen der deskriptiven Statistik werden alle Daten als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung angegeben. Für den Vergleich der Werte zwischen Blutproben ohne Tirofiban und Blutproben mit verschiedenen Tirofibankonzentrationen wurde der Student-t-test für gepaarte Daten herangezogen. Ein Signifikanzniveau mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit kleiner als 0,05 wurde als statistisch signifikant angenommen.

### **3. Ergebnisse**

#### **3.1. Blutbild und Gerinnungsstatus der Probanden**

Neben den Thrombozytenfunktionstests wurde bei allen zehn Testprobanden Hämoglobin-Gehalt, Thrombozytenzahl, PTT, Quick-Wert, International Normal Ratio (INR), Fibrinogen-Gehalt und Antithrombin III-Konzentration gemessen. Dabei lagen die Werte von Blutbild und Gerinnungsstatus aller Probanden im Normbereich (Tabelle 4).

Um zu prüfen, ob der Zusatz von Tirofiban Einfluss auf Blutbild und Gerinnungsstatus hat, wurde den 2,7 ml-EDTA-Monovetten und den 3 ml-Citrat-Monovetten Tirofiban (1 µg/ml, die hier verwendete Höchstdosis) hinzugefügt. Der Zusatz verursachte keine Änderungen in dem Hämoglobin-Gehalt, der Thrombozytenzahl, dem Quick-Wert, dem INR, dem Fibrinogen-Wert und dem Antithrombin III-Wert. Lediglich der PTT-Wert verlängerte sich geringfügig, zwar statistisch signifikant, aber ohne eine klinische Relevanz ( $26 \pm 1,3$  gegenüber  $27 \pm 1,7$ ,  $P = 0,021$ ).

#### **3.2. Einflüsse von Tirofiban auf Thrombelastographie, Vollblut-Impedanz-Aggregometrie und PFA-100 (Überblick)**

Eine statistisch signifikante Änderung der Werte von jeweiligen Ausgangswerten wurde mittels verschiedener Meßmethoden mit verschiedenen Tirofiban-Konzentrationen festgestellt (Tabelle 5). Die Impedanz-Aggregometrie zeigte bereits bei 5 ng/ml Tirofiban eine geringe, aber statistisch signifikante Änderung. Bei 25 ng/ml und 50 ng/ml Tirofiban, welche dem therapeutischen Konzentrationsbereich entsprechen, reduzierten sich die Impedanz-Werte auf etwa ein Drittel bzw. ein Viertel vom Ausgangswert. Der niedrigste Wert wurde bei einer Tirofiban-Konzentration von 100 ng/ml erreicht. Die Epinephrin-PFA-Zeit verlängerte sich bei 10 ng/ml Tirofiban statistisch signifikant und die ADP-PFA-Zeit bei 25 ng/ml Tirofiban. Die Epinephrin-PFA-Zeit erreichte bei 25 ng/ml und die ADP-PFA-Zeit bei 50 ng/ml Tirofiban das Maximum. Von vier Thrombelastographie-Parametern wurde die CT (Gerinnungszeit) nicht von Tirofiban beein-

flusst, demgegenüber zeigten die CFT (Gerinnselbildungszeit), MCF (Maximalamplitude) und der Alpha-Winkel signifikante Änderungen. Die CFT (Gerinnselbildungszeit) verlängerte sich ab 25 ng/ml Tirofiban statistisch signifikant gegenüber dem Ausgangswert. Die MCF (Maximalamplitude) nahm bei 50 ng/ml Tirofiban statistisch signifikant, aber nur geringfügig ab. Der Alpha-Winkel reduzierte sich statistisch signifikant ab 25 ng/ml Tirofiban. Während die Impedanz-Aggregometrie ab 100 ng/ml Tirofiban, die Epinephrin-PFA-Zeit ab 25 ng/ml und die ADP-PFA-Zeit ab 50 ng/ml, keine weitere Änderung mehr zeigten, änderten sich die CFT (Gerinnselbildungszeit)-, MCF (Maximalamplitude)- und Alpha-Werte bis zur höchsten Tirofiban-Konzentration, so dass es noch zwischen 500 ng/ml und 1000 ng/ml Tirofiban statistisch signifikante Unterschiede für diese drei Thrombelastographie-Parameter gab.

### **3.3. Einflüsse von Tirofiban auf Thrombelastographie, Vollblut-Impedanz-Aggregometrie und PFA-100 (Einzelne Daten)**

#### **3.3.1. Thrombelastographie**

Alle einzelnen Werte der Thrombelastographie-Parameter lagen, wie im folgenden erwähnt wird, außerhalb des Normbereichs erst dann, wenn die Tirofiban-Konzentration den therapeutischen Bereich (25 – 50 ng/ml) überschritt.

##### **3.3.1.1. Clot Formation Time (CFT)**

Die CFT (Gerinnselbildungszeit)-Werte lagen bei allen Probanden am Ausgang (ohne Zusatz von Tirofiban) im Normbereich und zeigten ab 25 ng/ml Tirofiban eine stetige Zunahme mit steigenden Tirofiban-Konzentrationen (Abb. 5). Ab 100 ng/ml Tirofiban lagen alle Werte außerhalb des Normbereichs. Bemerkenswert war im hohen Tirofiban-Konzentrationsbereich (ab 250 ng/ml) die relativ große Streuung einzelner Werte. So wurden für den Konzentrationsbereich von 1000 ng/ml CFT (Gerinnselbildungszeit)-Werte zwischen 240 und 775 Sekunden gemessen.

### **3.3.1.2. Maximum Clot Firmness (MCF)**

Alle Ausgangswerte der MCF (Maximalamplitude) waren im Normbereich (Abb. 6). Bei einer Konzentration von 250 ng/ml Tirofiban sanken die MCF (Maximalamplitude)-Werte bei 9 von 10 Probanden unter den Normbereich. Ab 500 ng/ml Tirofiban lagen alle MCF (Maximalamplitude)-Werte unterhalb des Normbereichs.

### **3.3.1.3. Alpha-Winkel**

Der Alpha-Winkel war bei allen Blutproben ohne Zusatz von Tirofiban im Normbereich (74 – 82 Grad) (Abb. 7). Ab 100 ng/ml Tirofiban lagen alle gemessene Winkel unterhalb des Normbereichs. Beim Alpha-Winkel fiel, ähnlich wie bei der CFT (Gerinnungszeit), eine erhebliche Streuung der Werte im hohen Konzentrationsbereich ab 250 ng/ml Tirofiban auf. Zum Beispiel betrug der Alpha-Winkel zwischen 47 - 67 Grad bei einer Konzentration von 1000 ng/ml Tirofiban.

### **3.3.1.4. Coagulation Time (CT)**

Die CT (Gerinnungszeit)-Werte der Proben ohne den Tirofiban-Zusatz lagen zwischen 129 und 195 Sekunden (Abb. 8). Durch das Hinzufügen steigender Tirofiban-Mengen war eine eindeutige Tendenz nicht zu erkennen.

### **3.3.2. Vollblut-Impedanz-Aggregometrie**

An den Darstellungen der einzelnen Daten ist zu erkennen, dass Impedanz-Werte der Aggregometrie ab 25 ng/ml Tirofiban bei allen Probanden unter dem Normbereich lagen (Abb. 9). Sie reduzierten sich mit steigender Tirofiban-Konzentration weiter. Ab 50 ng/ml Tirofiban lagen alle Werte unter 5 Ohm.

### 3.3.3. PFA-100

Die Epinephrin-PFA-Zeit lag am Ausgang bereits bei zwei Probanden über dem Normbereich (Abb. 10). Bei zwei Probanden wurden bereits bei 2,5 ng/ml und 5 ng/ml Tirofiban und bei sieben Probanden bei 25 ng/ml Tirofiban maximal messbare Werte (300 sec) der Epinephrin-PFA-Zeit erreicht. Ab 50 ng/ml Tirofiban lagen alle Werte von Epinephrin-PFA weit über dem Normbereich (bei einem Probanden 288 sec sonst 300 sec). Die ADP-PFA-Zeit lag am Ausgang bei allen Probanden im Normbereich (Abb. 11). Ab 25 ng/ml Tirofiban lagen alle ADP-PFA-Werte über dem Normbereich. Bei allen Probanden betrug die ADP-PFA-Zeit 300 Sekunden ab 50 ng/ml Tirofiban. Zu beachten ist, dass im besonders interessanten Dosisbereich zwischen 25 und 50 ng/ml Tirofiban die in dieser Studie ermittelten Werte einer großen Streuung unterliegen. So wurden bei der Epinephrin-PFA bereits bei 25 ng/ml Werte zwischen 169 und 300 Sekunden gemessen, bei der ADP-PFA ebenfalls bei 25 ng/ml Werte zwischen 117 und 300 Sekunden.

### 3.4. Kurzfassung der Ergebnisse

1. Die Vollblut-Impedanz-Aggregometrie zeigte im Vergleich zur Thrombelastographie und zum PFA-100-System bei der niedrigeren Tirofiban-Konzentration (5 ng/ml) bereits eine statistisch signifikante Änderung und die maximale Änderung wurde erst bei Überschreiten (100 ng/ml Tirofiban) des therapeutischen Konzentrationsbereichs (25 – 50 ng/ml) erreicht.
2. Das PFA-100-System zeigte statistisch signifikante Änderungen erst bei höheren Konzentrationen (Epinephrin-PFA 10 ng/ml Tirofiban, ADP-PFA 25 ng/ml Tirofiban) im Vergleich zur Vollblut-Impedanz-Aggregometrie, aber bereits bei 50 ng/ml Tirofiban wurden die maximalen Änderungen erreicht.
3. Die Änderungen in den Thrombelastographie-Parametern (CFT, MCF und Alpha-Winkel) treten erst bei viel höheren Konzentrationen auf als bei der Vollblut-Impedanz-Aggregometrie bzw. dem PFA-100-System und die maximalen Änderungen

werden auch bei den Konzentrationen weit über dem therapeutischen Bereich nicht erreicht.



## 4. Diskussion

Nach den Ergebnissen dieser Studie ist der Vollblut-Impedanz-Aggregometrie für die Beurteilung der Tirofiban-Effekte im therapeutischen Dosisbereich eine bevorzugte Rolle gegenüber dem PFA-100-System und der Thrombelastographie zuzuweisen, denn nicht nur zeigten sich die Tirofiban-Effekte mit der Vollblut-Impedanz-Aggregometrie bereits bei niedrigen Konzentrationen, sondern die maximale Änderung wurde auch noch nicht im therapeutischen Bereich erreicht. Es bestand also eine dosisabhängige Beziehung innerhalb des therapeutischen Bereichs zwischen den Änderungen in der Aggregometrie und den Tirofiban-Konzentrationen. Mit dem PFA-100-System kann es besonders problematisch werden, wenn Ausgangswerte bereits weit über dem Normbereich liegen, da die maximale Änderung innerhalb des therapeutischen Bereichs erreicht wird. Die drei Parameter der Thrombelastographie, die CFT (Gerinnelbildungszeit), die MCF (Maximalamplitude) und der Alpha-Winkel, zeigten zwar ständige, reproduzierbare Änderungen mit steigenden Tirofiban-Konzentrationen, aber da die CFT (Gerinnelbildungszeit) bei 25 ng/ml, die MCF (Maximalamplitude) bei 50 ng/ml und 100 ng/ml bzw. der Alpha-Winkel bei 25 ng/ml noch im Normbereich lagen, ist ein Vergleich zum Ausgangswert hier nötig, um Tirofiban-Effekte herauszufinden. Wenn man dennoch diese drei Parameter der Thrombelastographie als Anhaltspunkt für die Beurteilung der Tirofiban-Effekte benutzt, sind die CFT (Gerinnelbildungszeit) und der Alpha-Winkel der MCF (Maximalamplitude) überlegen, da die ersteren zwei bei niedrigerer Konzentration als die letztere eine hoch signifikante Änderung zeigten und bei 50 ng/ml bereits außerhalb des Normbereichs liegen. Die MCF (Maximalamplitude) lag erst außerhalb des Normbereichs bei Tirofiban-Konzentrationen, die weit über dem therapeutischen Bereich lagen (ab 250 ng/ml).

### 4.1. Problematik bei der Verwendung des PFA-100-Systems

Das PFA-100-System wurde von Madan et al.<sup>26</sup> für die Beurteilung der Glykoprotein-IIb/IIIa-Antagonist-Wirkung auf die Trombozytenfunktion als brauchbares Verfahren

vorgeschlagen. Die Ergebnisse dieser Studie können diese Position aber nicht voll bestätigen. So erscheint es bei der Verwendung des PFA-100-Systems nötig, die folgenden Punkte zu berücksichtigen:

1. Im therapeutischen Dosisbereich zwischen 25 und 50 ng/ml Tirofiban unterliegen die in dieser Studie erworbenen Werte einer großen Streuung. Bei der Epinephrin-PFA wurden bei 25 ng/ml Tirofiban Werte zwischen 169 und 300 Sekunden gemessen, bei der ADP-PFA ebenfalls bei 25 ng/ml Tirofiban Werte zwischen 117 und 300 Sekunden.
2. Bereits bei einer Tirofibankonzentration von 50 ng/ml, also dem therapeutischen Bereich, zeigen sowohl Epinephrin-PFA-Zeit als auch ADP-PFA-Zeit bei den meisten Probanden den maximal messbaren Wert von 300 Sekunden an.
3. Die Beurteilung der Messwerte wird problematisch insbesondere, wenn die Ausgangswerte bereits über dem Normbereich liegen, wie es z.B. bei aspirinvorbehandelten Patienten zum Regelfall gehören dürfte.

Vor ähnlichen Problemen standen Hormoncik et al.,<sup>19</sup> die bei ihren Untersuchungen mit dem PFA-100-System bei Probanden mit Aspirinmedikation (100 mg/i.v.) sehr schnell erreichte maximale Werte (300 sec) beobachteten. Sie schlugen daher Veränderungen an der Geräteuhr (Die maximale Verschlusszeit soll länger als 300 sec sein) oder den Einbau einer kleineren Kapillaröffnung (Die Verschlusszeit soll kürzer werden) vor, so dass die Verschlusszeit eine breitere Spanne haben könnte.

#### **4.2. Problematik bei der Verwendung der Thrombelastographie**

Eine stets reproduzierbare Änderung in der CFT (Gerinnselbildungszeit), der MCF (Maximalamplitude) und dem Alpha-Winkel wurde unter Tirofiban-Wirkungen beobachtet. Die aggregationshemmenden Effekte von Tirofiban auf die Thrombozyten können somit mit diesen drei Parametern des Thrombelastogramms analysiert werden. Von diesen drei Parametern erscheinen die CFT (Gerinnselbildungszeit) und der Alpha-Winkel geeigneter zu sein als die MCF (Maximalamplitude), um Aussagen über die Hemmung der Thrombozytenfunktion unter Tirofiban-Wirkung zu machen, da bei den

ersteren zwei Parametern statistisch signifikante Änderungen bei niedrigerer Konzentration (25 ng/ml Tirofiban), die bei der klinischen Anwendung von Tirofiban in Frage kommt, auftraten als bei der MCF (Maximalamplitude) (50 ng/ml Tirofiban). Messwerte außerhalb des Normbereichs wurden im Vergleich zu der Vollblut-Impedanz-Aggregometrie und dem PFA-100-System erst bei viel höheren Konzentrationen (CFT ab 50 ng/ml, MCF ab 250 ng/ml, Alpha-Winkel ab 50 ng/ml) beobachtet. Greilich et al.<sup>27</sup> untersuchten in einer „in vitro“ Studie Effekte von Abciximab (ReoPro<sup>R</sup>) auf die Gerinnsselfestigkeit (MCF) des Thrombelastogramms bzw. die turbimetrische Aggregometrie und berichteten ebenfalls über geringere Änderungen bei der Thrombelastographie als bei der turbimetrischen Aggregometrie.

#### **4.3. Plasmakonzentration und Therapeutisches Ziel**

In einem Tierversuch<sup>28</sup> wurde gezeigt, dass eine Aggregationshemmung größer als 80% erforderlich ist, um eine Thrombusbildung zu verhindern. Die Frage ist dabei, bei welchem Plasmaspiegel und welcher Tirofibandosis eine solche Aggregationshemmung erreicht wird.

Peerlinck et al.<sup>29</sup> berichteten 1993 über die erste Verabreichung von Tirofiban beim Menschen. Sie verabreichten Tirofiban mit ein- bzw. vierstündiger Infusionsdauer in ansteigenden Konzentrationen (0,1 - 0,4 µg/kg/min). Plasmakonzentrationen von Tirofiban wurden 15, 30, 45, 60, 75, 90, 120, 180 und 240 Minuten nach Beginn der Infusion gemessen. Der „ex vivo“ Thrombozytenaggregation-Test, induziert mit ADP (3,4 µmol/L) bzw. Kollagen (2 µg/ml), wurde mit dem turbimetrischen Verfahren nach Born durchgeführt. Eine Hemmung der Thrombozytenaggregation größer als 80% wurde, bei Verwendung von ADP zur Induktion, bei einer Plasmakonzentration zwischen 15 und 30 ng/ml erreicht. Eine Aggregationshemmung größer 80 Prozent mit Kollagen zur Induktion gelang bei einer etwas höheren Plasmakonzentration zwischen 30 und 40 ng/ml Tirofiban.

In den PRISM- und PRISM-PLUS-Studien wurde jeweils eine „Loading“-Dosis von 0,6 µg/kg/ min über 30 Minuten gegeben, gefolgt von einer Erhaltungsdosis von 0,15

$\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$  über 47,5 Stunden.<sup>7,10</sup> Diese Dosis wurde gewählt auf der Basis einer Pilotstudie, in der eine 85 – 90%ige Aggregationshemmung erzielt wurde.

Die RESTORE-Arbeitsgruppe gab einen Bolus von 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  über drei Minuten, gefolgt von einer Infusion von 0,15  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$  über 36 Stunden.<sup>9</sup> Eine 95 – 100%ige Aggregationshemmung erfolgte unter diesem Infusionsregime.<sup>30</sup>

Die o.g. Infusionsschemen von Tirofiban basieren ebenfalls auf einer pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Untersuchung von Barrett et al.,<sup>12</sup> die unter Infusionsraten zwischen 0,05 und 0,4  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$  sowohl die Plasmakonzentrationen als auch Blutungszeiten sowie die turbimetrisch ermittelte Thrombozytenfunktion untersuchten. Nach den Ergebnissen dieser Studie konnte eine Thrombozytenaggregationshemmung von  $82,6 \pm 13,9$  Prozent (Induktion mit ADP 3,4  $\mu\text{mol}/\text{L}$ ) bei einer Tirofiban-Konzentration von  $30,1 \pm 9,2$  ng/ml erzielt werden. Bei der Wahl von 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Kollagen zur Induktion betrug die Thrombozytenaggregationshemmung  $75,4 \pm 24,2$  Prozent ebenfalls bei einer Tirofiban-Konzentration von  $30,1 \pm 9,2$  ng/ml.

Der in der vorliegenden Studie angegebene therapeutische Konzentrationsbereich stammt aus den o.g. Angaben.

#### **4.4. Vergleich der optischen (turbimetrischen) und elektronischen (Impedanzmessung) Aggregometrie**

Bei dem turbimetrischen Verfahren nach Born wird das Vollblut in einem Titrations- und Zentrifugationsverfahren in seine Bestandteile getrennt. Das dabei entstandene thrombozytenreiche Plasma wird recalcifiziert, mit einem Agonisten versehen und die durch Aggregation verursachte Zunahme der Lichtdurchlässigkeit in der Küvette wird gemessen. Demgegenüber benötigt das in dieser Studie verwendete impedanzaggregometrische Verfahren von Cardinal et. al.<sup>15</sup> keine zentrifugale Aufarbeitung der Probe, sondern benutzt das Vollblut. Thrombozytenaggregation wird hier über eine Widerstandsänderung zwischen den in die Probe eingetauchten zwei Elektroden gemessen. Der stör anfälligste Schritt im Bornschen Verfahren scheint in der aufwendigen Präparation des thrombozytenreichen Plasmas zu liegen. Dazu bedarf es mehrerer apparativer

Komponenten (z.B. Zentrifuge mit einer Beschleunigung von 175 G), multiplen Pipetierens und in der Präparation des thrombozytenreichen Plasmas erfahrenes Laborpersonal.<sup>31</sup> Aus diesen Arbeitsschritten resultiert eine relativ lange Bearbeitungszeit der Proben, schnelle Ergebnisse wie bei den hier verglichenen Verfahren sind nicht zu erwarten.

Untersuchungen zur Vergleichbarkeit der Methoden (Impedanzmessung versus turbimetrische Methode) und Messungen, aber auch zur Auswahl und Konzentration verschiedener Agonisten wurden als erstes von Mascelli et al.<sup>31</sup> vorgelegt. Die Autoren kamen zu dem Ergebnis, dass 12 Stunden nach Abciximab-Therapie beide Methoden vergleichbare Grade von Thrombozytenaggregationshemmung zeigten. 36 Stunden nach der Therapie korrelierte aber die Messung mit der Vollblut-Impedanz-Aggregometrie enger mit dem Ausmaß der Glykoprotein-IIb/IIIa-Rezeptorblockade als mit dem turbimetrischen Verfahren. Für die Abweichung zwischen turbimetrischem Verfahren und Vollblut-Impedanz-Aggregometrie machten die Autoren die umfangreiche Probenvorbereitung der turbimetrischen Verfahren verantwortlich, wobei ein eventueller Verlust von kurzwirksamen Mediatoren, wie Prostacyclin und Thromboxan-A<sub>2</sub>, im Rahmen des Herstellungsprozesses des thrombozytenreichen Plasmas Einflüsse genommen haben könnte. Auch das Fehlen der anderen Blutbestandteile bei der turbimetrischen Methode könne zu Veränderungen des Thrombozytenverhaltens geführt haben. So fehlen sowohl das aus den Leukozyten freigesetzte Prostacyclin und der thrombozytenaktivierende Faktor, als auch das von den Erythrozyten freigesetzte ADP. Schließlich verweisen die Autoren darauf, dass die sehr heterogene Größe und Dichte zirkulierender Thrombozyten während des Zentrifugierens in der Vorbereitung zur turbimetrischen Messung zum Verlust bestimmter Subpopulationen von Thrombozyten führt.

#### **4.5. Zum Problem der Agonisten**

Ein wesentliches Problem bei der Vergleichbarkeit vieler Untersuchungen sind die verschiedenen, zum Einleiten der Aggregation eingesetzten Agonisten. Eine Übersicht über die in der Messung der Thrombozytenfunktion eingesetzten Agonisten und Verfahren liefert Bick in seiner ausführlichen Übersichtsarbeit.<sup>32</sup>

Neben der Wahl der passenden agonistischen Substanz hat die Wahl einer adäquaten Dosis einen wesentlichen Einfluss auf das Ergebnis, wie Mascelli et al.<sup>31</sup> demonstrierten: So betrug bei der turbimetrischen Methode die Aggregation am Ausgang vor Beginn der Glykoprotein-IIb/IIIa-Antagonisten (Abciximab)-Infusion bei 5  $\mu\text{mol/L}$  ADP  $63 \pm 7,8\%$  Prozent (Mittelwert und Standardabweichung) bei 20  $\mu\text{mol/L}$   $73 \pm 6,9$  Prozent. Auch die Verwendung von verschiedenen Kollagen-Mengen in der Vollblut-Impedanz-Aggregometrie wurde von den Autoren untersucht: So zeigte eine Aggregationsmessung mit 2,5  $\mu\text{g/ml}$  Kollagen zur Induktion einen Widerstandswert von  $18 \pm 6,7$  Ohm am Ausgang, eine Messung mit 5  $\mu\text{g/ml}$  Kollagen steigerte diesen Wert um 50 Prozent auf  $27 \pm 5,6$  Ohm. Eine Verdoppelung des Agonisten auf 10  $\mu\text{g/ml}$  erhöhte die Impedanz um weitere 15 Prozent auf  $31 \pm 5,6$  Ohm. Die Autoren konnten nachweisen, dass die Vollblut-Impedanz-Aggregometrie mit 5  $\mu\text{g/ml}$  Kollagen als Agonist überhaupt die beste Korrelation mit der Glykoprotein-IIb/IIIa-Rezeptorblockade zeigte. Nach dieser Aussage ist also die Wahl des in der vorliegenden Studie verwendeten Agonisten (5  $\mu\text{g/ml}$  Kollagen) für die Vollblut-Impedanz-Aggregometrie berechtigt.

#### **4.6. Zum Einfluss von Citrat auf Messergebnisse**

Von Bedeutung für diese Arbeit erscheint auch die Diskussion zur Verwendung von Citrat zur Antikoagulation bei der Blutabnahme. Der Mechanismus, die „in vitro“ Gerinnung von Blutproben durch den Zusatz von Citrat zu unterbinden, wirkt über eine Reduzierung des Spiegels an ionisiertem Calcium von 1,1 mmol/L (im zirkulierenden Blut) auf einen Anteil von 40 bis 50  $\mu\text{mol/L}$  (in der Monovette). Da Glykoprotein-IIb/IIIa-Rezeptoren reversibel Calcium und andere bivalente Kationen an fünf Stellen binden, kann jede Veränderung des Calciumspiegels Einfluss auf Struktur und Funktion der Glykoprotein-IIb/IIIa-Rezeptoren haben. So konnten Philips et al.<sup>33</sup> nachweisen, dass über den Mechanismus der Chelatbildung bivalenter Kationen durch Citrat oder EDTA die Bindung von Eptifibatide (Integrillin<sup>R</sup>) an den Glykoprotein-IIb/IIIa-Rezeptor gesteigert werden konnte. Ein Labortest unter erniedrigten Calciumspiegeln könnte somit einen größeren antithrombotischen Effekt der Glykoprotein-IIb/IIIa-Antagonisten suggerieren, als nach klinischen Untersuchungen zu erwarten gewesen wäre. Diese

Beobachtung könnte auch Konsequenzen für diese Arbeit haben, insbesondere für die Vergleichbarkeit der drei Verfahren Thrombelastographie (RoTEG), Vollblut-Impedanz-Aggregometrie und PFA-100: Während beim RoTEG-Verfahren die Probe vor Hinzufügen der Agonisten recalcifiziert wird, verzichten die anderen Verfahren auf einen solchen Schritt. Somit könnte in den Untersuchungen mit PFA-100 und Vollblut-Impedanz-Aggregometrie ein höherer antithrombotischer Effekt der Substanz Tirofiban gemessen werden als de facto vorhanden gewesen wäre.

#### **4.7. Schlussfolgerungen**

Nach den in dieser Studie erworbenen Erkenntnissen ist die Vollblut-Impedanz-Aggregometrie für die Beurteilung der Tirofiban-Effekte auf die Thrombozytenfunktion am besten geeignet, um die Wirkungen dieses Medikamentes im therapeutischen Dosisbereich (25 – 50 ng/ml Tirofiban) beurteilen zu können. Es bestand eine dosisabhängige Beziehung innerhalb des therapeutischen Bereichs zwischen den Änderungen in der Vollblut-Impedanz-Aggregometrie und den Tirofiban-Konzentrationen. Die Impedanz-Werte verringerten sich bereits beim therapeutischen Dosisbereich außerhalb des Normbereichs. Die PFA-Werte erreichten bei den meisten Probanden bereits innerhalb des therapeutischen Bereichs die maximal messbaren Werte, so dass Tirofiban-Wirkungen im höheren Dosisbereich nicht beurteilt werden können. Die Änderungen in den Thrombelastographie-Parametern (CFT, MCF und Alpha-Winkel) unter Tirofiban-Wirkungen sind zwar innerhalb des therapeutischen Bereichs deutlich sichtbar, aber der CFT (Gerinnselbildungszeit)-Wert und der Alpha-Winkel liegen erst ab 50 ng/ml Tirofiban und der MCF (Maximalamplitude)-Wert sogar erst ab 100 ng/ml Tirofiban außerhalb des Normbereichs. Um Tirofiban-Wirkungen mit der Thrombelastographie beurteilen zu können, ist also der Vergleich mit den Ausgangswerten notwendig.

## 5. Zusammenfassung

Die vorliegende Studie beschäftigt sich mit der Frage, ob und inwieweit die Effekte vom Glykoprotein-IIb/IIIa-Rezeptorantagonisten Tirofiban (Aggrastat<sup>R</sup>) auf die Thrombozytenfunktion mit Hilfe der drei „point of care“-Verfahren Thrombelastographie (RoTEG), Vollblut-Impedanz-Aggregometrie und „Platelet Function Analyser“ (PFA-100-System) beurteilt werden können. Da die durch Thrombozyten initiierte Thrombose eine zentrale Rolle in der Pathogenese des akuten Koronarsyndroms und der akuten ischämischen Komplikationen nach einer perkutanen transluminalen Koronarangioplastie (PTCA) spielt, ist die Hemmung der Thrombozytenaggregation durch Glykoprotein-IIb/IIIa-Antagonisten eine gängige Maßnahme in der interventionellen Kardiologie und auf der kardiologischen Intensivstation. Für den klinisch tätigen Anästhesisten stellt sich dabei die Frage nach dem schnell und einfach durchführbaren Monitoring der Thrombozytenfunktion, da sich die Patienten unter Glykoprotein-IIb/IIIa-Antagonisten-Therapie eventuell einer Operation, wie z.B. einer notfallmäßigen Myokardrevaskularisation unterziehen müssen

Die Ergebnisse stammen von 10 gesunden Probanden, die in den letzten 21 Tagen vor der Blutentnahme keine antithrombozytäre Medikation erhielten. Für die Untersuchungen wurden Blutproben mit verschiedenen Tirofiban-Konzentrationen (0, 2,5, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500 und 1000 ng/ml) hergestellt. Der therapeutische Bereich der Tirofiban-Konzentrationen liegt zwischen 25 und 50 ng/ml. Der Ablauf der Thrombelastographie wurde durch einen Aktivator für das intrinsische System (Thromboplastin-Phospholipid) beschleunigt. Zur Vollblut-Impedanz-Aggregometrie wurden Blutproben mit Kollagen (5 µg/ml) stimuliert. Für das PFA-100-System wurde die thrombozytenabhängige Hämostase durch Kollagen-Epinephrin oder Kollagen-ADP initiiert.

Die Vollblut-Impedanz-Aggregometrie zeigte bei der Tirofiban-Konzentration von 5 ng/ml bereits eine statistisch signifikante Änderung und die maximale Änderung wurde erst bei Überschreiten von 100 ng/ml Tirofiban erreicht, d.h. es bestand eine dosis-



abhängige Beziehung innerhalb des therapeutischen Bereichs zwischen den Änderungen in der Vollblut-Impedanz-Aggregometrie und den Tirofiban-Konzentrationen.

Das PFA-100-System zeigte statistisch signifikante Änderungen bei höheren Konzentrationen (Epinephrin-PFA 10 ng/ml Tirofiban, ADP-PFA 25 ng/ml Tirofiban) als die Vollblut-Impedanz-Aggregometrie, aber bereits bei 50 ng/ml Tirofiban wurden die maximalen Änderungen erreicht.

Die Änderungen in den Thrombelastographie-Parametern (Gerinnselbildungszeit, Maximalamplitude und Alpha-Winkel) treten erst bei viel höheren Konzentrationen auf als bei der Vollblut-Impedanz-Aggregometrie bzw. dem PFA-100-System, und die maximalen Änderungen werden auch bei den Konzentrationen weit über dem therapeutischen Bereich nicht erreicht.

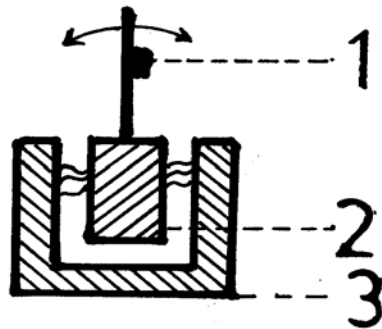
Nach den Ergebnissen dieser Studie sollte in erster Linie die Vollblut-Impedanz-Aggregometrie für die Beurteilung der Tirofiban-Effekte verwendet werden, um die Wirkungen von Tirofiban auf die Thrombozytenfunktion im therapeutischen Dosisbereich beurteilen zu können.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Mizuno K, Satomura K, Miyamoto A, Arakawa K, Shibuya T, Arai T, Kurita A, Nakamura H, Ambrose JA. Angioscopic evaluation of coronary artery thrombi in acute coronary syndroms. *N Engl J Med* 1992; 326:287-297
2. Amrose J, Weinrauch M. Thrombosis in ischemic heart disease. *Arch Intern Med* 1996; 156:1382-1394
3. Calvete J. Platelet integrin GP IIb/IIIa: Structure-function correlations. An update and lessons from other integrins. *Proc Soc Exp Biol Med* 1999; 222:29-38
4. Wagner C, Mascelli MA, Neblock DS, Weisman HF, Collier BS, Jordan, RE. Analysis of GP IIb/IIIa receptor number by quantification of 7E3 binding to human platelets. *Blood* 1996; 88:9907-9914
5. EPIC-Investigators. Use of monoclonal antibody directed against the platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor in high-risk coronary angioplasty. *N Engl J Med* 1994; 330:956-961
6. ESPRIT-Investigators. Novel dosing regimen of eptifibade in planned coronary stent implantation (ESPRIT): a randomised, placebo-controlled trial. *Lancet* 2000; 356:2037-2044
7. PRISM-PLUS Study Investigators. Inhibition of the platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor with Tirofiban in unstable angina and non-Q-wave myocardial infarction. *N Engl J Med* 1998; 338:1488-1497
8. PURSUIT Trial Investigators. Inhibition of platelet glycoprotein IIb/IIIa with eptifibatide in patients with acute coronary syndroms. *N Engl J Med* 1998; 339:436-443
9. 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* 1997; 96:1445-1453
10. PRISM-STUDY-INVESTIGATORS. A comparison of aspirin plus tirofiban with aspirin plus heparin for unstable angina. *N Engl J Med* 1998; 338:1498-1505
11. Koster A, Kuckula M, Bach F, Meyer O, Fischer T, Mertzluft F, Loebe M, Hetzer R, Kuppe H. Anticoagulation during cardiopulmonary bypass in patients with heparin-induced thrombocytopenia type II and renal impairment using heparin and the platelet glycoprotein IIb-IIIa antagonist tirofiban. *Anesthesiology* 2001; 94:245-251

12. Barrettt 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* 1994; 56:377-388
13. Coller BS. Monitoring platelet GP IIb/IIIa antagonist therapy. *Circulation* 1998; 97:5-9
14. Born G. Simulation of primary haemostasis in vitro. *Haemostasis* 1985; 15:357-362
15. Cardinal DC, Flower RJ. The electronic aggregometer: A novel device for assessing platelet behavior in blood. *J Pharmacol Methods* 1980; 3:135-158
16. Calatzis A, Heesen M, Spannagl M. Patientennahe Sofortdiagnostik von Hämostaseveränderungen in der Anästhesie und Intensivmedizin. *Anaesthesist* 2003; 52:229-237
17. Coller B, Lang D, Scudder LE. Rapid and simple platelet function assay to assess glycoprotein IIb/ IIIa receptor blockade. *Circulation* 1996; 95:860-867
18. Kundu SK, Heilmann EJ, Sio R, Garcia C, Davidson RM, Ostgaard RA. Description of an in vitro platelet function analyzer-PFA 100. *Semin Thromb Hemost* 1995; 21(Suppl.2):106-112
19. Hormoncik M, Jilma B, Hergovich N, Stohlawetz P, Panzer S, Speiser W. Monitoring of aspirin (ASA) pharmacodynamics with the platelet function analyzer PFA-100. *Thromb Haemost* 2000; 83:316-321
20. Shattil SJ, Cunningham M, Hoxie JA. Detection of activated platelets in whole blood using activation-dependent monoclonal antibodies and flow cytometry. *Blood* 1987; 70:307-315
21. Hartert H. Blutgerinnungsstudien mit der Thrombelastographie, einem neuen Untersuchungsverfahren. *Klin Wochenschr* 1948; 26:577-583
22. Kratzer MAA, Born GVR. Simulation of haemostasis in vitro. *Haemostasis* 1985; 15:357-362
23. Kratzer MAA, Bellucci S, Caen JP. Detection of abnormal platelet functions with an in vitro model of primary haemostasis. *Haemostasis* 1985; 15:363-370.
24. Von der Goltz V. US Patent 5051239, 1991
25. Bühl A, Zöfel P. SPSS 11. Pearson-Verlag, München, 2002

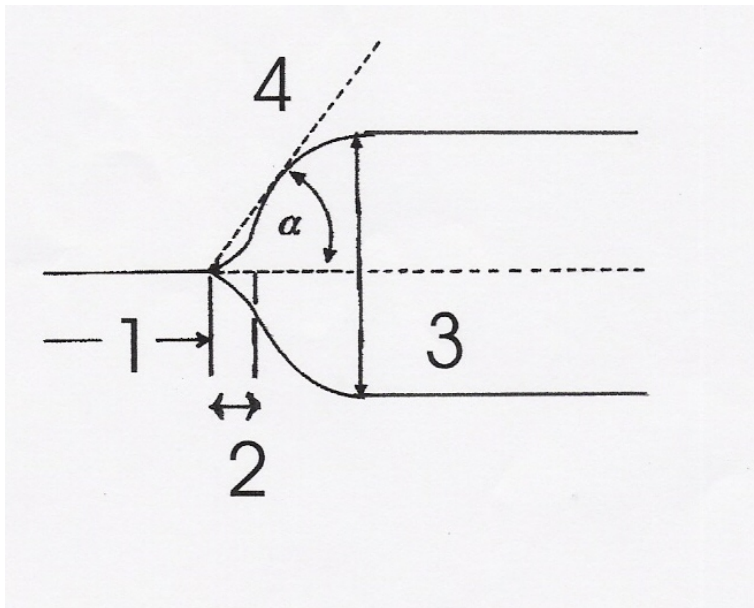
26. Madan M, Berkowitz S, Christie DJ, Jennings LK, Smit AC, Sigmon KN, Glazer S, Tchong JE. Rapid assessment of glycoprotein IIb/IIIa blockade with platelet function analyzer (PFA-100) during percutaneous coronary intervention. *Am Heart J* 2001; 84:31-38
27. Greilich PE, Alving BM, O'Neill KL, Chang AS, Reid TJ. A modified thrombelastographic method for monitoring C7E3 Fab in heparinized patients. *Anesth Analg* 1997; 84:31-38
28. Gold HK, Gimple LW, Yasuda T, Leinbach RC, Werner W, Holt R, Jordan R, Berger H, Collen D, Collier BS. Pharmacodynamic study of F(ab')<sub>2</sub> fragments of murine monoclonal antibody 7E3 directed against human platelet glycoprotein IIb/IIIa in patients with unstable angina pectoris. *J Clin Invest* 1990; 86:651-659
29. Peerlinck K, De Lepeleire I, Goldberg M, Farrell D, Barrett J, Hand E, Panebianco D, Deckmyn H, Vermylen J, Arnout J. MK-383 (L700,462), a selective nonpeptide platelet glycoprotein IIb/IIIa Antagonist, is active in man. *Circulation* 1993; 88:1512-1517
30. Keraiakes M, Kleiman S, Ambrose A, Cohen M, Rodriguez S, Palabrica T, Herrmann HC, Sutton JM, Weaver WD, McKee DB, Fitzpatrick V, Sax FL. Randomized, double-blind, placebo-controlled dose ranging study of tirofiban (MK-383) platelet IIb/IIIa blockade in high risk patients undergoing coronary angioplasty. *J Am Coll Cardiol* 1996; 27:536-542
31. Mascelli MA, Worley S, Veriabo NJ, Lance ET, Mack S, Schaible T, Weismann HF, Jordan RE. Rapid assessment of platelet function with a modified whole-blood aggregometer in percutaneous transluminal coronary angioplasty patients receiving anti-GP IIb/IIIa therapy. *Circulation* 1997; 96:3860-3866
32. Bick RL. Laboratory evaluation of platelet dysfunction. *Clinics in Lab Med* 1995;15:1-38
33. Phillips DR, Teng W, Arfsten A, Nannizzi-Alaimo L, White MM, Longhurst C, Shattil SJ, Randolph A, Jakubowski JA, Jennings LK, Scarborough RM. Effect of Ca<sup>2+</sup> on GP IIb-IIIa interactions with integrilin. Enhanced GP IIb/IIIa binding and inhibition of platelet aggregation by reductions in the concentration of ionized calcium in plasma anticoagulated with citrate. *Circulation* 1997; 96:1488-1494



**Abbildung 1.** Schematische Darstellung des Thrombelastographierätes.

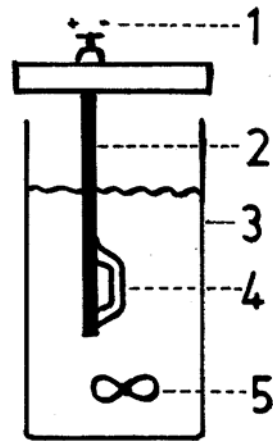
1. Zeilensensor, 2. Stempel, 3. Küvette.

Die Probe (Citratblut),  $\text{CaCl}_2$  und der intrinsische Aktivator werden in die Küvette (3) gegeben. In die Probe taucht der Stempel (2) ein, der um 4,75 Grad nach rechts und links gedreht wird. Die Drehung des Stempels, die durch Bildung des Gerinnsels allmählich eingeschränkt wird, wird optisch erfasst (1) und in die Thrombelastogramm-Amplitude umgerechnet.



**Abbildung 2.** Parameter des Thrombelastogramms.

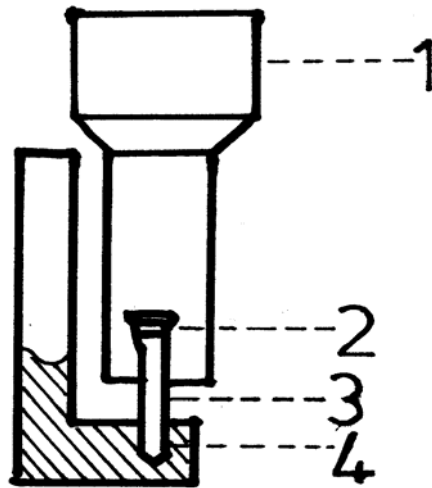
1. Coagulation Time (CT) - Gerinnungszeit: Zeit bis zum Beginn des Gerinnungsprozesses.
2. Clot Formation Time (CFT) – Gerinnselbildungszeit: Zeit, die das Gerinnsel benötigt, um ab Beginn der Gerinnselbildung eine definierte Grundfestigkeit (Amplitude = 20mm) zu erreichen.
3. Maximum Clot Firmness (MCF) - Maximalamplitude.
4. Alpha-Winkel: Ein Maß für die Schnelligkeit der Gerinnselbildung.



**Abbildung 3.** Aufbau des Vollblut-Impedanz-Aggregometers.

1. Kabel von Elektroden, 2. Befestigungsstab von Elektroden, 3. Küvette, 4. Elektroden, 5. Rührstäbchen.

Die aus zwei parallel positionierten Drähten bestehenden Elektroden (4) werden in die Blutprobe (3) eingetaucht, was die Anlagerung einer Schicht von Thrombozyten an den Elektroden hervorruft. Die Blutprobe wird mit dem Reagenz Kollagen ( $5 \mu\text{g/ml}$ ) stimuliert. Dabei wird der Widerstand zwischen zwei Drähten bei einem kontinuierlichen Stromfluss gemessen. Durch Stimulation mit dem Reagenz lagern sich weitere Thrombozyten an die Elektroden an und dadurch kommt es zu einer Widerstandsänderung zwischen zwei Drähten.

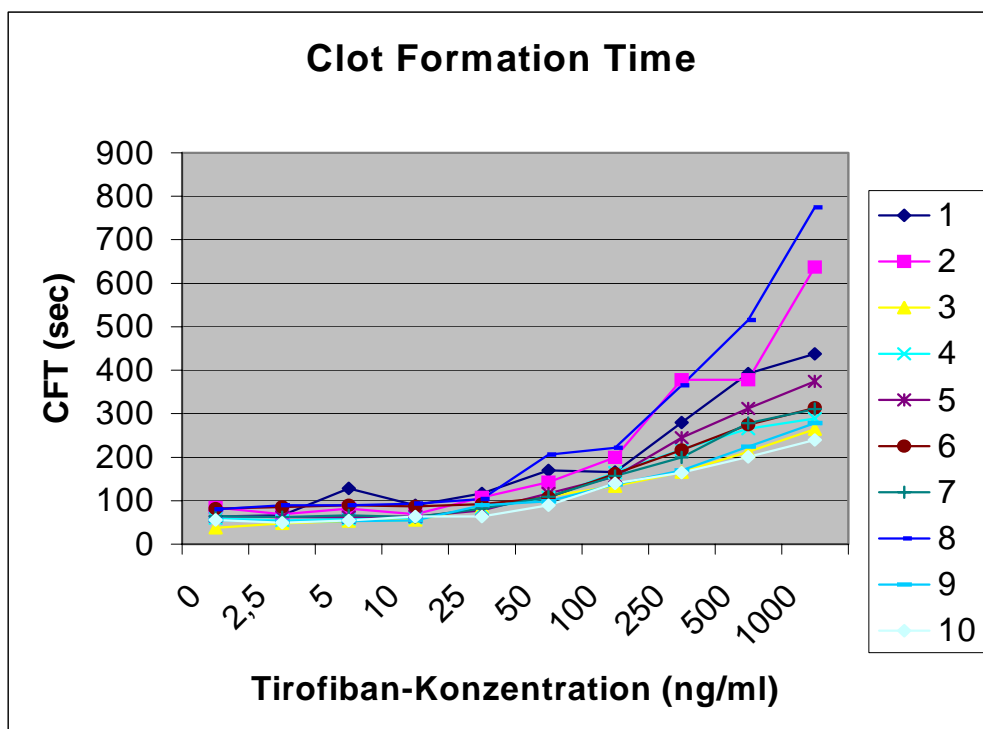


**Abbildung 4.** Aufbau des PFA-100-Systems.

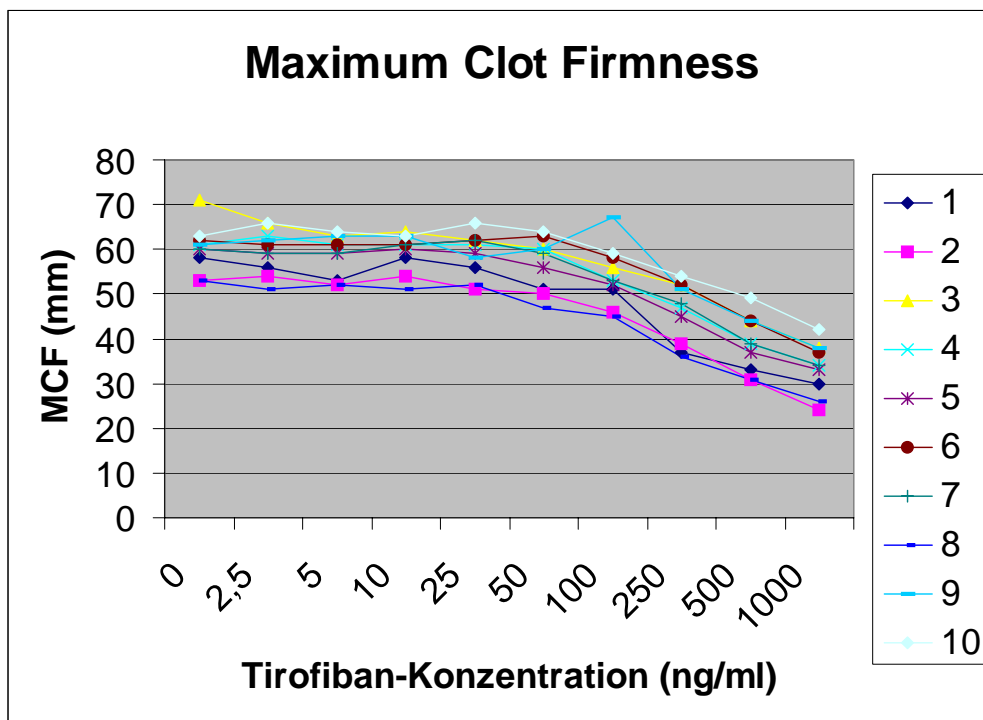
1. Gerätekopf zur Erzeugung eines Unterdrucks, 2. Membran, 3. Kapillare, 4. Testkartusche.

Das PFA-System initiiert die thrombozytenabhängige Hämostase unter hohen Shear-Stress-Bedingungen *in vitro*. Dazu wird nicht-recalcifiziertes Citratblut durch eine kleine Öffnung (147  $\mu\text{m}$  in Durchmesser) (2) einer Testkartusche (4) bei einer konstanten Flussrate abgesaugt. Die Hämostase wird durch Beschichtung mit Kollagen-Epinephrin oder Kollagen-ADP im System aktiviert. Das Gerät misst die Verschlusszeit der kleinen Öffnung, welche ein Maß der Thrombozytenfunktion ist.

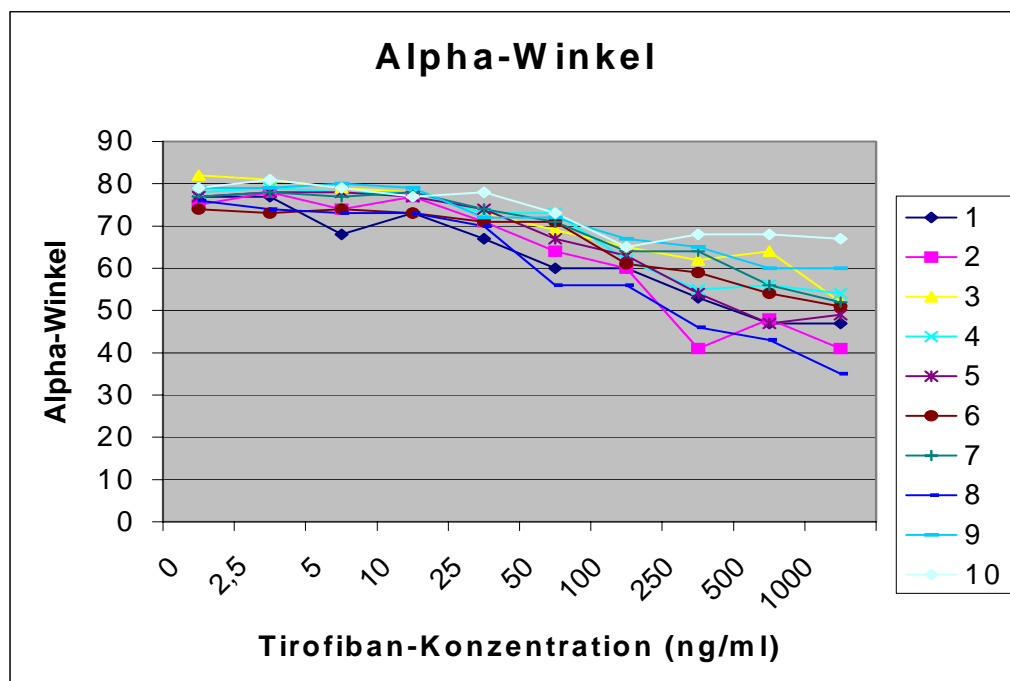




**Abbildung 5.** Clot Formation Time (CFT) bei steigenden Tirofibankonzentrationen. Die CFT-Werte lagen bei allen Probanden ohne Zusatz von Tirofiban im Normbereich und zeigten ab 25 ng/ml Tirofiban eine stetige Zunahme mit steigenden Tirofiban-Konzentrationen. Ab 100 ng/ml Tirofiban lagen alle Werte außerhalb des Normbereichs. Bemerkenswert war im hohen Tirofiban-Konzentrationsbereich (ab 250 ng/ml) die relativ große Streuung einzelner Werte. So wurden für den Konzentrationsbereich von 1000 ng/ml CFT-Werte zwischen 240 und 775 Sekunden gemessen.

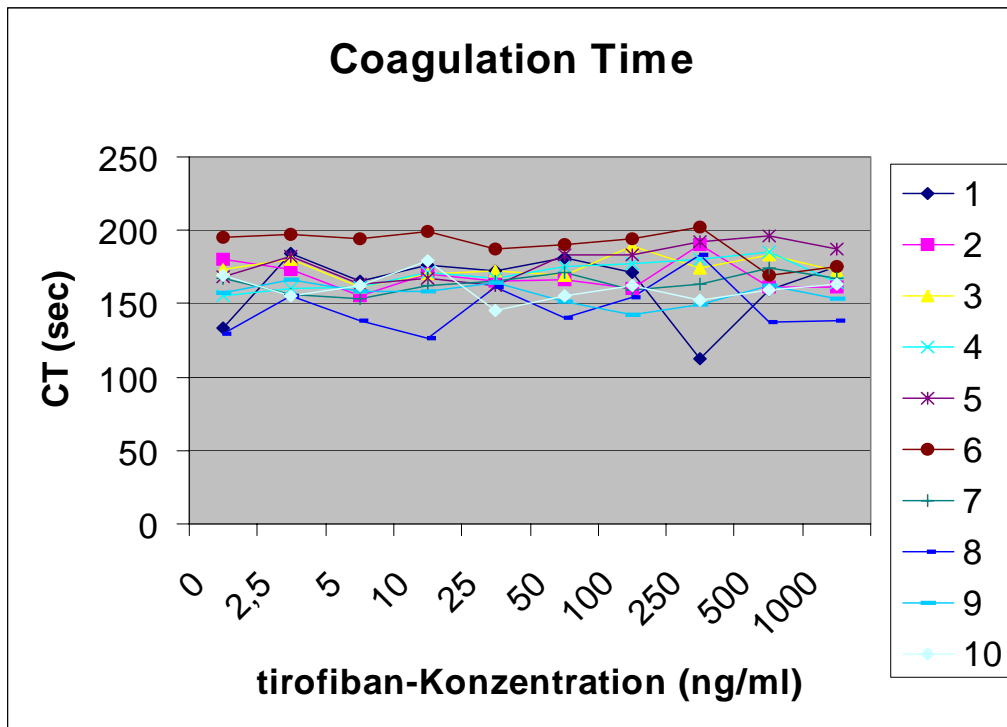


**Abbildung 6.** Maximum Clot Firmness (MCF) bei steigenden Tirofibankonzentrationen. Alle Ausgangswerte von MCF waren im Normbereich. Bei einer Konzentration von 250 ng/ml Tirofiban sanken die MCF-Werte bei 9 von 10 Probanden unter den Normbereich. Ab 500 ng/ml Tirofiban lagen alle MCF-Werte unterhalb des Normbereichs.

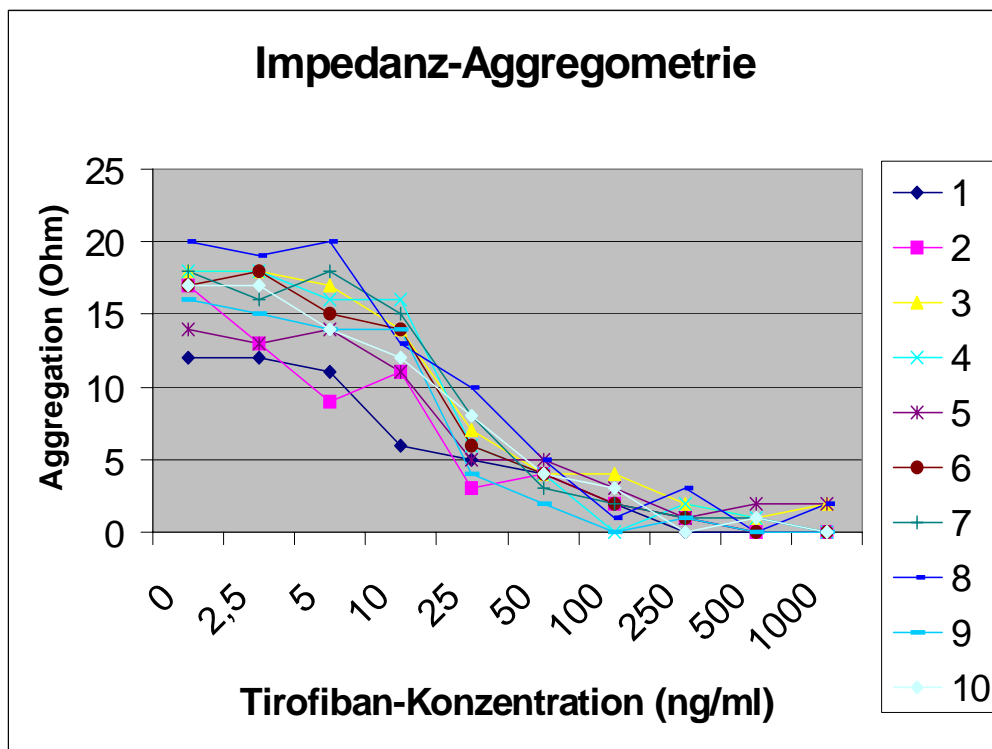


**Abbildung 7.** Alpha-Winkel bei steigenden Tirofibankonzentrationen.

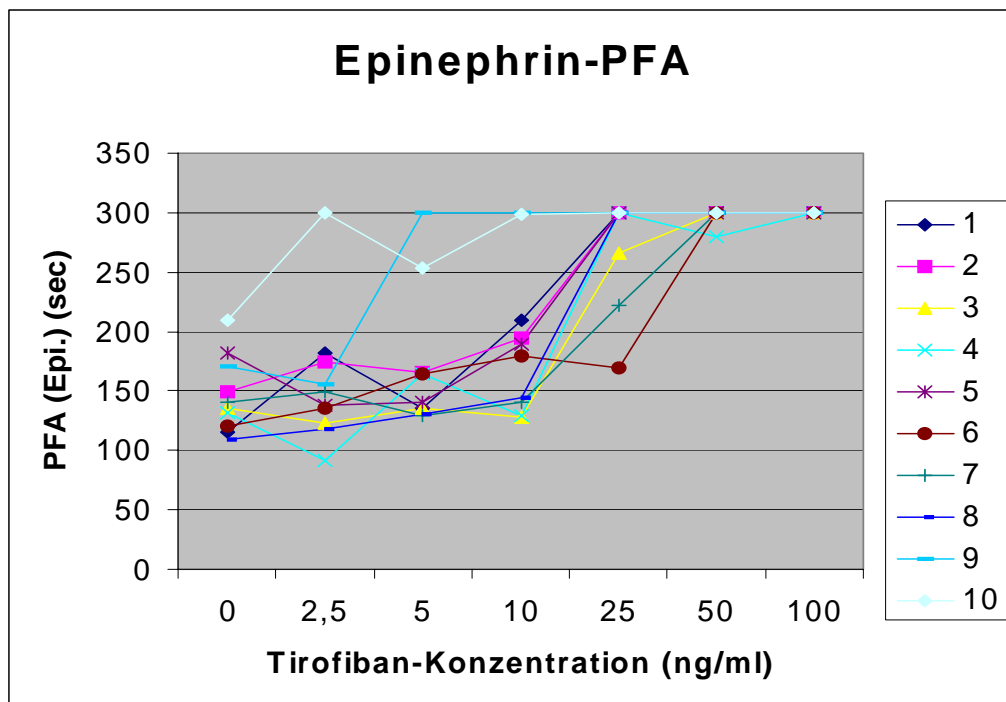
Der Alpha-Winkel war bei allen Blutproben ohne Zusatz von Tirofiban im Normbereich (74 – 82 Grad). Ab 100 ng/ml Tirofiban lagen alle gemessene Winkel unterhalb des Normbereichs.



**Abbildung 8.** Coagulation Time (CT) bei steigenden Tirofibankonzentrationen. Durch das Hinzufügen steigender Tirofibanmengen war eine eindeutige Tendenz in der CT nicht zu erkennen.

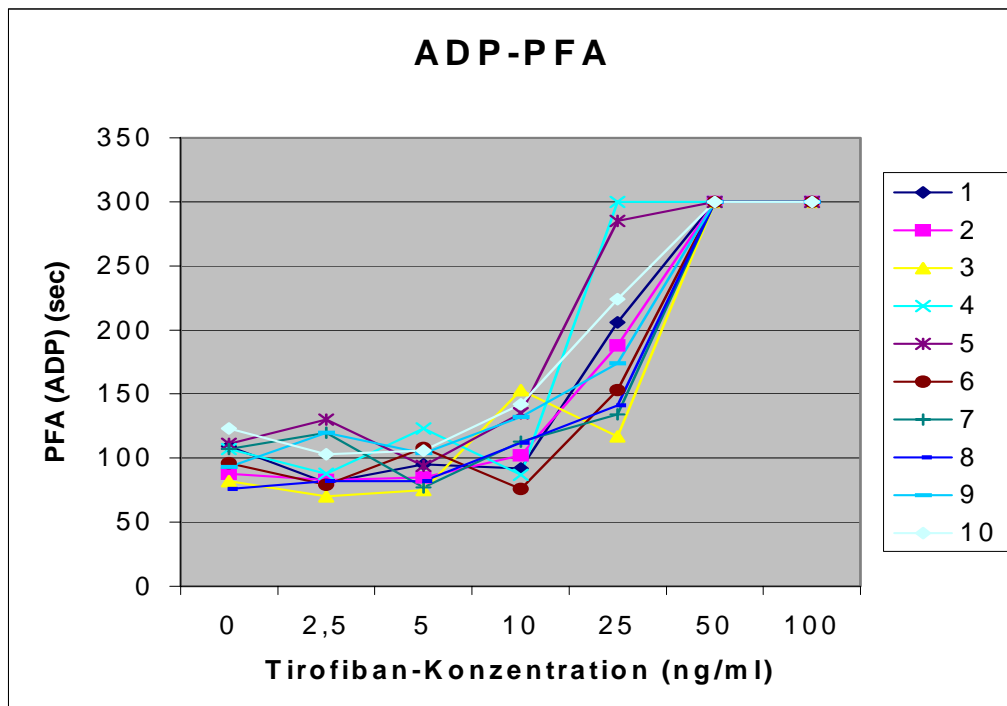


**Abbildung 9.** Impedanz-Aggregometrie bei steigenden Tirofiban-Konzentrationen. Impedanz-Werte lagen ab 25 ng/ml Tirofiban bei allen Probanden unter dem Normbereich.



**Abbildung 10.** Epinephrin-PFA bei steigenden Tirofibankonzentrationen.

Die Epinephrin-PFA-Zeit lag am Ausgang bereits bei zwei Probanden über dem Normbereich. Bei zwei Probanden wurden bei 2,5 ng/ml und 5 ng/ml Tirofiban und bei sieben Probanden bei 25 ng/ml Tirofiban maximal messbare Werte (300 sec) der PFA-Zeit erreicht.



**Abbildung 11.** ADP-PFA bei steigenden Tirofibankonzentrationen. Die ADP-PFA-Zeit lag am Ausgang bei allen Probanden im Normbereich. Ab 25 ng/ml Tirofiban lagen alle ADP-PFA-Werte über dem Normbereich. Bei allen Probanden betrug die ADP-PFA-Zeit 300 Sekunden ab 50 ng/ml Tirofiban.

**Tabelle 1.** Herstellung der verdünnten Tirofibanlösungen mit 0,9% NaCl

| Lösungsnummer | Tirofibankonzentration |
|---------------|------------------------|
| I             | 250 µg/ml              |
| II            | 50 µg/ml               |
| III           | 12,5 µg/ml             |
| IV            | 6,25 µg/ml             |



**Tabelle 2.** Herstellung der Testproben im 2 ml Citratblut

| Nr. | Konzentration |         | Tirofibanlösung |                   | 0,9%NaCl |        |
|-----|---------------|---------|-----------------|-------------------|----------|--------|
| 1   | 0             | ng/2 ml |                 |                   | 8 µl     |        |
| 2   | 5             | ng/2 ml | (2,5 ng/ml)     | 0,8 µl Lösung IV  | +        | 7,2µl  |
| 3   | 10            | ng/2 ml | (5 ng/ml)       | 1,6 µl Lösung IV  | +        | 6,4 µl |
| 4   | 20            | ng/2 ml | (10 ng/ml)      | 1,6 µl Lösung III | +        | 6,4 µl |
| 5   | 50            | ng/2 ml | (25 ng/ml)      | 1 µl Lösung II    | +        | 7 µl   |
| 6   | 100           | ng/2 ml | (50 ng/ml)      | 2 µl Lösung II    | +        | 6 µl   |
| 7   | 200           | ng/2 ml | (100 ng/ml)     | 4 µl Lösung II    | +        | 4 µl   |
| 8   | 500           | ng/2 ml | (250 ng/ml)     | 2 µl Lösung I     | +        | 6 µl   |
| 9   | 1             | µg/2 ml | (500 ng/ml)     | 4 µl Lösung I     | +        | 4 µl   |
| 10  | 2             | µg/2 ml | (1000 ng/ml)    | 8 µl Lösung I     | +        | 0 µl   |

**Tabelle 3.** Herstellung der Testproben im 3,8 ml Citrat/Puffer-Blut

| Nr. | Konzentration |           | Tirofibanlösung |                    | 0,9%NaCl |         |
|-----|---------------|-----------|-----------------|--------------------|----------|---------|
| 1   | 0             | ng/3,8 ml |                 |                    | 7,6 µl   |         |
| 2   | 9,5           | ng/3,8 ml | (2,5 ng/ml)     | 1,52 µl Lösung IV  | +        | 6,08 µl |
| 3   | 19            | ng/3,8 ml | (5 ng/ml)       | 1,52 µl Lösung III | +        | 6,08 µl |
| 4   | 38            | ng/3,8 ml | (10 ng/ml)      | 3,04 µl Lösung III | +        | 4,56 µl |
| 5   | 95            | ng/3,8 ml | (25 ng/ml)      | 1,9 µl Lösung II   | +        | 5,7 µl  |
| 6   | 190           | ng/3,8 ml | (50 ng/ml)      | 3,8 µl Lösung II   | +        | 3,8 µl  |
| 7   | 380           | ng/3,8 ml | (100 ng/ml)     | 7,6 µl Lösung II   | +        | 0 µl    |

**Tabelle 4.** Blutbild und Gerinnungsstatus der Probanden ohne und mit Tirofiban (N = 10)

| Tirofiban               | 0          | 1 µg/ml    |           |
|-------------------------|------------|------------|-----------|
| Hämoglobin (g/l)        | 14,9 ± 0,8 | 14,8 ± 0,8 | P = 0,104 |
| Thrombozyten (x1000/µl) | 259 ± 45   | 257 ± 51   | P = 0,569 |
| PTT (sec)               | 26 ± 1,3   | 27 ± 1,7   | P = 0,021 |
| Quick-Wert (%)          | 99 ± 2,9   | 98 ± 4,4   | P = 0,085 |
| Intern. Normal Ratio    | 1,0 ± 0,05 | 1,0 ± 0,05 | P = 0,591 |
| Fibrinogen (mg/dl)      | 222 ± 44   | 218 ± 45   | P = 0,185 |
| Antithrombin III (%)    | 102 ± 5,3  | 101 ± 6,7  | P = 0,413 |

**Tabelle 5.** Thrombelastogramm, PFA-Zeit und Aggregometrie bei verschiedenen Tirofiban-Konzentrationen (N=10)

|                                   | <u>Tirofiban-Konzentration (ng/ml)</u> |        |             |               |               |               |               |               |               |                |
|-----------------------------------|--|--------|-------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|----------------|
|                                   | 0                                      | 2,5    | 5           | 10            | 25            | 50            | 100           | 250           | 500           | 1000           |
| <b><u>TEG</u></b>                 |  |        |             |               |               |               |               |               |               |                |
| CT (min)                          | 163±20                                 | 171±15 | 161±14      | 168±18        | 166±11        | 168±16        | 169±17        | 170±26        | 169±17        | 166±13         |
| <i>P-Werte*</i>                   |  | ,210   | ,751        | ,309          | ,600          | ,383          | ,314          | ,336          | ,361          | ,628           |
| CFT (min)                         | 65±14                                  | 64±15  | 74±24       | 70±14         | <b>90±16</b>  | <b>125±37</b> | <b>164±28</b> | <b>240±78</b> | <b>305±98</b> | <b>392±178</b> |
| <i>P-Werte*</i>                   |  | ,639   | ,222        | ,211          | ,001          | ,000          | ,000          | ,000          | ,000          | ,000           |
| <i>P-Werte**</i>                  |  |        | ,136        | ,423          | ,001          | ,002          | ,000          | ,001          | ,001          | ,015           |
| MCF (mm)                          | 60±5                                   | 60±5   | 59±5        | 60±4          | 59±5          | <b>57±6</b>   | <b>54±6</b>   | <b>46±7</b>   | <b>39±6</b>   | <b>34±7</b>    |
| <i>P-Werte*</i>                   |  | ,513   | ,138        | ,468          | ,240          | ,028          | ,005          | ,000          | ,000          | ,000           |
| <i>P-Werte**</i>                  |  |        | ,074        | ,147          | ,373          | ,027          | ,043          | ,000          | ,000          | ,000           |
| Alpha (°)                         | 77±2                                   | 78±3   | 76±4        | 76±2          | <b>72±3</b>   | <b>68±6</b>   | <b>62±3</b>   | <b>57±9</b>   | <b>54±8</b>   | <b>51±9</b>    |
| <i>P-Werte*</i>                   |  | ,423   | ,177        | ,129          | ,000          | ,000          | ,000          | ,000          | ,000          | ,000           |
| <i>P-Werte**</i>                  |  |        | ,085        | ,671          | ,000          | ,008          | ,002          | ,020          | ,146          | ,031           |
| <b><u>PFA (sec)</u></b>           |  |        |             |               |               |               |               |               |               |                |
| Epi.                              | 147±32                                 | 157±57 | 172±58      | <b>191±64</b> | <b>276±45</b> | <b>298±6</b>  | <b>300±0</b>  |               |               |                |
| <i>P-Werte*</i>                   |  | ,481   | ,110        | ,016          | ,000          | ,000          | ,000          |               |               |                |
| <i>P-Werte**</i>                  |  |        | ,426        | ,081          | ,003          | ,167          | ,343          |               |               |                |
| ADP                               | 99±15                                  | 96±21  | 95±15       | 114±26        | <b>192±62</b> | <b>300±0</b>  | <b>300±0</b>  |               |               |                |
| <i>P-Werte*</i>                   |  | ,559   | ,391        | ,137          | ,000          | ,000          | ,000          |               |               |                |
| <i>P-Werte**</i>                  |  |        | ,932        | ,110          | ,007          | ,000          | 1,000         |               |               |                |
| <b><u>Aggregometrie (Ohm)</u></b> |  |        |             |               |               |               |               |               |               |                |
| Kollagen                          | 17±2                                   | 16±3   | <b>15±3</b> | <b>13±3</b>   | <b>6±2</b>    | <b>4±1</b>    | <b>2±1</b>    | <b>1±1</b>    | <b>1±1</b>    |                |
| <i>P-Werte*</i>                   |  | ,104   | ,032        | ,000          | ,000          | ,000          | ,000          | ,000          | ,000          |                |
| <i>P-Werte**</i>                  |  |        | ,111        | ,026          | ,000          | ,005          | ,001          | ,140          | 1,000         |                |

*P-Werte\** Signifikanztest zwischen Ausgangswerten und Werten jeweiliger Tirofiban-Konzentrationen.

*P-Werte\*\** Signifikanztest zwischen nachfolgenden Werten.

TEG = Thrombelastographie, CT = Coagulation Time, CFT = Clot Formation Time, MCF = Maximum Clot Firmness, Alpha = Alpha-Winkel, PFA = Platelet Function Analyser, Epi. = Epinephrin, ADP = Adenosin diphosphat.

## 9. Lebenslauf

MICHAEL FRIEDRICH NIGGEMEIER

Fasanenstr.3, 33161 Hövelhof

Am 19.4.1960 wurde ich in Paderborn geboren.

|                    |   |
|--------------------|---|
| 12.1966 - 07.1971  | Busdorf Grundschule Paderborn   |
| 09.1971 - 05.1980  | Goerdeler Gymnasium Paderborn   |
| 07.1980 - 09. 1981 | Zivildienst bei der Johanniter Unfallhilfe  |
| 10.1981 - 05.1986  | Universität-Gesamthochschule Paderborn<br>Studium der Geschichte, Sozial- und Erziehungswissenschaften<br>Abschluss: 1. Staatsexamen für das Lehramt Sekundarstufe II |

### Medizinische Ausbildung

|                   |  |
|-------------------|--|
| 05.1986 - 11.1992 | Westfälische-Wilhelms-Universität Münster  |
| 10.1991 - 09.1992 | Praktisches Jahr: Anästhesiologie (Uni Münster)<br>Chirurgie (Derriford Hospital, Plymouth)<br>Innere Medizin (Gilead, Bielefeld-Bethel) |
| 12.1992           | Ärztliche Prüfung  |
| 10.1999           | Facharztprüfung, Facharzt für Anästhesiologie  |

### Bisherige Berufstätigkeit

|                   |  |
|-------------------|--|
| 03.1993 - 08.1994 | Arzt im Praktikum, Anästhesie, Klinikum Lippe-Detmold  |
| 09.1994 - 09.1998 | Assistenzarzt, Anästhesie, Klinikum Lippe-Detmold  |
| Seit 10.1998      | Facharzt für Anästhesiologie, Institut für Anästhesiologie<br>Herz- und Diabeteszentrum NRW, Bad Oeynhausen    |
| Seit 11.2002      | Ernennung zum Funktionsoberarzt, Institut für Anästhesiologie<br>Herz- und Diabeteszentrum NRW, Bad Oeynhausen |

## **Diagnostik der Thrombozytenfunktion unter Zusatz des Glykoprotein-IIb/IIIa-Rezeptorantagonisten Tirofiban – Vergleich der „Point of Care“ Verfahren Thrombelastographie, Impedanzaggregometrie und „Platelet Function Analyser“ (PFA-100) bei verschiedenen Tirofibrankonzentrationen**

Michael Friedrich Niggemeier, Fasanenstr. 3, 33161 Hövelhof

### **Zusammenfassung**

Die vorliegende Studie beschäftigt sich mit der Frage, ob und inwieweit die Effekte vom Glykoprotein-IIb/IIIa-Rezeptorantagonisten Tirofiban (Aggrastat<sup>R</sup>) auf die Thrombozytenfunktion mit Hilfe der drei „point of care“-Verfahren Thrombelastographie (RoTEG), Vollblut-Impedanz-Aggregometrie und „Platelet Function Analyser“ (PFA-100-System) beurteilt werden können. Da die durch Thrombozyten initiierte Thrombose eine zentrale Rolle in der Pathogenese des akuten Koronarsyndroms und der akuten ischämischen Komplikationen nach einer perkutanen transluminalen Koronarangioplastie (PTCA) spielt, ist die Hemmung der Thrombozytenaggregation durch Glykoprotein-IIb/IIIa-Antagonisten eine gängige Maßnahme in der interventionellen Kardiologie und auf der kardiologischen Intensivstation. Für den klinisch tätigen Anästhesisten stellt sich dabei die Frage nach dem schnell und einfach durchführbaren Monitoring der Thrombozytenfunktion, da sich die Patienten unter Glykoprotein-IIb/IIIa-Antagonisten-Therapie eventuell einer Operation, wie z.B. einer notfallmäßigen Myokardrevaskularisation unterziehen müssen

Die Ergebnisse stammen von 10 gesunden Probanden, die in den letzten 21 Tagen vor der Blutentnahme keine antithrombozytäre Medikation erhielten. Für die Untersuchungen wurden Blutproben mit verschiedenen Tirofiban-Konzentrationen (0, 2,5, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500 und 1000 ng/ml) hergestellt. Der therapeutische Bereich der Tirofiban-Konzentrationen liegt zwischen 25 und 50 ng/ml. Der Ablauf der Thrombelastographie wurde durch einen Aktivator für das intrinsische System (Thromboplastin-Phospholipid) beschleunigt. Zur Vollblut-Impedanz-Aggregometrie wurden Blutproben mit Kollagen (5 µg/ml) stimuliert. Für das PFA-100-System wurde die thrombozytenabhängige Hämostase durch Kollagen-Epinephrin oder Kollagen-ADP initiiert.

Die Vollblut-Impedanz-Aggregometrie zeigte bei der Tirofiban-Konzentration von 5 ng/ml bereits eine statistisch signifikante Änderung und die maximale Änderung wurde erst bei Überschreiten von 100 ng/ml Tirofiban erreicht, d.h. es bestand eine dosisabhängige Beziehung innerhalb des therapeutischen Bereichs zwischen den Änderungen in der Vollblut-Impedanz-Aggregometrie und den Tirofiban-Konzentrationen.

Das PFA-100-System zeigte statistisch signifikante Änderungen bei höheren Konzentrationen (Epinephrin-PFA 10 ng/ml Tirofiban, ADP-PFA 25 ng/ml Tirofiban) als bei der Vollblut-Impedanz-Aggregometrie, aber bereits bei 50 ng/ml Tirofiban wurden die maximalen Änderungen erreicht.

Die Änderungen in den Thrombelastographie-Parametern (Gerinnselbildungszeit, Maximalamplitude und Alpha-Winkel) treten erst bei viel höheren Konzentrationen auf als bei der Vollblut-Impedanz-Aggregometrie bzw. dem PFA-100-System, und die maximalen Änderungen werden auch bei den Konzentrationen weit über dem therapeutischen Bereich nicht erreicht.

Nach den Ergebnissen dieser Studie sollte in erster Linie die Vollblut-Impedanz-Aggregometrie für die Beurteilung der Tirofiban-Effekte verwendet werden, um die Wirkungen von Tirofiban auf die Thrombozytenfunktion im therapeutischen Dosisbereich beurteilen zu können.

Prof. Dr. med. Kazuo Inoue