

**Aus dem Institut für Pharmakologie und Klinische  
Pharmakologie der**

**Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf**

**Direktor: Prof. Dr. Karsten Schrör**

**Der "human platelet antigen-1" (HPA-1)-Polymorphismus  
beeinflusst nicht die Wirkungen von Glykoprotein  
IIb/IIIa-Inhibitoren**

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der  
Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität  
Düsseldorf

vorgelegt von

Collin Jacobs

2005

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

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. dent. Wolfgang H.-M. Raab

Dekan

Referent: Priv.-Doz. Dr. Weber

Korreferent. Prof. Dr. Gödecke

## Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	01	
1	Einleitung	02
1.1	Polymorphismen als zusätzliches Risiko für die koronare Herzkrankheit	02
1.2	Aufbau und Funktion des Glykoprotein (GP) IIb/IIIa-Rezeptors	02
1.3	Der "human platelet antigen" (HPA-1)-Polymorphismus des GPIIb/IIIa-Rezeptors	04
1.4	Hemmung der Thrombozytenaggregation durch Antiintegrine	05
1.5	Die GPIIb/IIIa-Inhibitoren Abciximab, Eptifibatid und Tirofiban	06
1.6	Einfluss des HPA-1-Polymorphismus auf die Wirkung der Antiintegrine	07
1.7	Zielsetzung	07
2	Material und Methoden	08
2.1	Material	08
2.1.1	Probanden, Patienten und Blutabnahme	08
2.1.2	Präparation der Thrombozyten	08
2.1.3	Substanzen und Lösungen	09
2.2	Methoden	10
2.2.1	Messung der Fibrinogenbindung mittels Durchflusszytometrie	10
2.2.2	Bestimmung des HPA-1-Genotyps mittels "gene amplification labelling in one system" (GALIOS)	11
2.2.3	Statistik	12
3	Ergebnisse	13
3.1	Frequenz der HPA-1-Genotypen	13
3.2	Basale und ADP-induzierte Fibrinogenbindung bei Blutspendern und Patienten mit koronarer Herzkrankheit	13
3.3	Einfluss der HPA-1-Genotypen der Blutspender und Patienten auf die Fibrinogenbindung	14
3.4	Hemmung der Fibrinogenbindung durch Antiintegrine	15
3.5	Hemmung der Fibrinogenbindung bei Blutspendern und Patienten mit koronarer Herzkrankheit	16
3.6	Einfluss der HPA-1-Genotypen der Blutspender und Patienten auf die Hemmung der Fibrinogenbindung	17
4	Diskussion	19
4.1	Aktivierung der Thrombozyten	19
4.2	Abhängigkeit der Aktivierbarkeit vom HPA-1-Polymorphismus	19
4.3	Häufigkeit der verschiedenen HPA-1-Genotypen	22
4.4	Häufigkeit des HPA-1b-Genotyps bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit, Myokardinfarkt oder zerebrovaskulärer Thrombose	22
4.5	Hemmung der Thrombozytenaggregation durch GPIIb/IIIa-Inhibitoren	24
4.6	Einfluss des HPA-1-Polymorphismus auf die Wirksamkeit der GPIIb/IIIa-Inhibitoren	25
4.7	Kritik der Methoden	26
4.8	Schlussfolgerung	27
5	Zusammenfassung	28

6	Literatur	29
7	Publikationen im Zusammenhang mit der Arbeit	35
7.1	Originalarbeiten	35
7.2	Kongressbeiträge	35

## Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
ACD	"acidic citrate dextrose"
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Fab	"fragment antigen-binding"
Fc	"fragment constant"
GALIOS	"gene amplification and labelling in one system"
GP	Glykoprotein
HPA	"human platelet antigen"
IgG	Immunglobulin G
KHK	koronare Herzkrankheit
PRP	plättchenreiches Plasma
TRAP	"thrombin receptor-activating peptide"
vWF	von-Willebrand-Faktor

## **1 Einleitung**

### **1.1 Polymorphismen als zusätzliches Risiko für die koronare Herzkrankheit**

Die koronare Herzkrankheit (KHK) ist die häufigste Todesursache in der westlichen Welt (Balter, 1999). Neben bekannten Risikofaktoren wie Übergewicht, Rauchen, Diabetes mellitus und arterieller Hypertonie werden in jüngster Zeit Polymorphismen von Genen, die für die Hämostase zuständig sind, als zusätzliche Risikofaktoren untersucht (Wu & Tsongalis, 2001).

Polymorphismen sind DNA-Sequenzvariationen, die häufiger als 1% in den Chromosomen der Bevölkerung vorkommen. Diese Polymorphismen können "stumm" sein, d.h. sie haben keinen Einfluss auf die Aminosäuresequenz, oder sie können den Austausch von Aminosäuren bedeuten. Die Rolle dieser Polymorphismen als Risikofaktoren in Bezug auf die koronare Herzkrankheit und ihre Folgen wurde in den letzten Jahren in vielen Studien untersucht (Bray, 1999).

Es gibt mehrere Gründe, weshalb Polymorphismen der Rezeptoren von Thrombozyten mögliche Risikofaktoren für arterielle Thrombosen darstellen können. Ein entscheidender Grund liegt darin, dass diese meistens auf den Adhäsionsmolekülen liegen. Wenn nun der Austausch von Aminosäuren durch den Polymorphismus die Funktion dieser Adhäsionsmoleküle verändert, kann dieser eine gesteigerte Adhäsion zur Folge haben (Bray, 2000).

### **1.2 Aufbau und Funktion des Glykoprotein IIb/IIIa-Rezeptors**

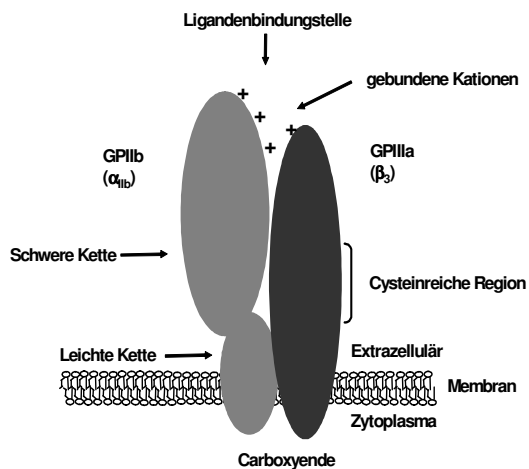
Der in dieser Arbeit untersuchte Polymorphismus betrifft den Glykoproteinrezeptor IIb/IIIa der Thrombozyten.

Aufgrund seines großen Einflusses auf die Thrombozytenaggregation stellt dieser Rezeptor einen wichtigen Ansatzpunkt für pharmakologische Eingriffe dar (Lefkovitz et al., 1995).

Von diesem Rezeptor befinden sich etwa 60.000-80.000 auf der Oberfläche ruhender Thrombozyten (Wagner et al., 1996). Etwa ebenso viele Rezeptoren liegen im Inneren der Thrombozyten (Weber & Schrör, 2001). Ein Teil befindet sich in dem "surface-connected membrane system" (SCS), der andere Teil in den Membranen der  $\alpha$ -Granula. Diese gelangen erst nach Aktivierung an die Oberfläche der Thrombozyten (Woods et al., 1986; Morgenstern et al., 1992).

Dieser Rezeptor gehört zu der Familie der Integrine. Integrine bilden neben Immunglobulinen, Selektinen und Cadherinen die größte Familie der Adhäsionsrezeptoren (Hynes, 1987; Bosman, 1993).

Alle 22 bekannten Integrine sind Heterodimere mit je einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Kette (Abb. 1). Diese  $\alpha$ - und  $\beta$ - Untereinheiten sind Produkte verschiedener Gene und nichtkovalent miteinander auf der Zelloberfläche zu einer funktionellen Einheit verbunden. Die  $\alpha$ -Einheit besteht aus einer niedermolekularen Untereinheit (GPIIbL, light-chain) mit einem Molekulargewicht von 25 kDa und einer höhermolekularen Untereinheit (GPIIbH, heavy-chain) mit 105 kDa Molekulargewicht, welche durch Disulfidbrücken miteinander verbunden sind (Phillips et al., 1988; Bennett, 1996).



**Abb. 1.**  
Schematische Struktur eines GPIIb/IIIa-Integrins

Die  $\beta_3$ -Einheit ist eine einzelne Polypeptidkette (95 kDa) mit einem transmembranären Abschnitt und einem kurzen, hydrophilen Schwanz am Carboxy-Ende im Zytoplasma. Charakteristisch ist die komplizierte Disulfid-Anordnung (Calvete, 1994), die durch die Existenz fünf cysteinreicher Regionen entsteht, von denen eine am Amino-Ende und vier in der Nähe der Membran liegen (Hynes, 1992).

Diese beiden Untereinheiten legen sich während der Synthese in den Megakaryozyten zu einem bivalenten, kationenbindenden Heterodimer zusammen, und diese komplexe Formation ist notwendig für die Expression auf der Zelloberfläche der Thrombozyten (Duperray et al., 1989).

Die Ligandenbindungsstelle wird gemeinsam von der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit gebildet und befindet sich in der amino-terminalen Domäne des Integrins im Bereich der Bindungsstelle für bivalente Kationen. Bivalente Kationen sind notwendig, damit sich die Liganden an den GPIIb/IIIa-Rezeptor und an die anderen Integrine anlagern können (Plow et al., 1992).

Als Liganden erkennen alle Integrine Aminosäuresequenzen mit einer Säurefunktion (Asparaginsäure oder Glutaminsäure), die essentiell für die Bindung am Rezeptor ist. Klassisches Beispiel hierfür ist die Arginin-Glycin-Asparaginsäure (RGD)-Sequenz, die in mehreren Adhäsionsproteinen, u.a. Vitronectin, Fibronectin, Fibrinogen und von Willebrand Faktor enthalten sind (Kiefer & Phillips, 1990).

Die Aufgabe der Integrine besteht darin, einen interzellulären Informationsaustausch durch eine Verbindung des Zellinneren mit der Umgebung zu ermöglichen. Dies gelingt ihnen mittels ihrer transmembranären Struktur. Diese schafft eine mechanische Verbindung zwischen Zellen, Matrix und anderen Zellen und ermöglicht eine Signalübertragung über die Zellmembran in beide Richtungen, d.h. von innen nach außen (inside-out) und von außen nach innen (outside-in) (Shattil & Ginsberg, 1997).

Für den Kontakt der zellmembranständigen Integrine mit anderen Zellen oder der extrazellulären Matrix sind Adhäsionsproteine (fibrilläres Kollagen, Fibrinogen) als Liganden notwendig. Diese übertragen Signale zur Aufrechterhaltung des geordneten Zellverbandes und für zelluläre Reaktionen auf mechanische und chemische Stressreaktionen. Im kardiovaskulären System beinhaltet dies z.B. die Anlagerung von Thrombozyten an die Gefäßwand (Adhäsion) oder an andere Thrombozyten (Aggregation) sowie die Adhäsion von Leukozyten an Thrombozyten und am Endothel bei der zellulären Phase der Entzündung.

Unter normalen Bedingungen zirkulieren die Thrombozyten frei im Blut, ohne miteinander oder mit der Gefäßwand zu interagieren. Bei einer Gefäßverletzung, z.B. der Ruptur eines artherosklerotischen Plaques, werden die nicht thrombogenen Eigenschaften des Endothels verletzt und die subendotheliale Matrix freigesetzt, die Fibronectin, Kollagen, Laminin und den von Willebrand Faktor (vWF) enthält. Diese Substanzen werden von den auf der Oberfläche sitzenden Integrinen erkannt und führen zu einer Plättchenaktivierung und Bindung. Diese Plättchenaktivierung ist die Voraussetzung für die Funktionsfähigkeit des GPIIb/IIIa-Rezeptors. Seine Affinität für lösliches Fibrinogen ist im Ruhezustand so gering, dass kein Fibrinogen gebunden wird. Dies verhindert eine unkontrollierte Aggregation ruhender Thrombozyten. Die Aktivierung beinhaltet eine Änderung seiner Struktur und damit den Übergang in einen hochaffinen Zustand. Erst jetzt besitzt der Rezeptor die Fähigkeit, lösliche Liganden wie Fibrinogen und vWF zu binden. Nach der Fibrinogenbindung entsteht durch "Clusterung" ein supramolekularer Komplex (Dedhar & Hannigan, 1996). Die Bindung dieser Liganden an den GPIIb/IIIa-Rezeptor führt zur Plättchenaggregation. Dies ist der Grund, warum dieser Rezeptor eine so entscheidende Rolle in der Ausbildung von Thromben spielt.

### **1.3 Der "human platelet antigen" (HPA-1)-Polymorphismus des GPIIb/IIIa-Rezeptors**

Der hier untersuchte HPA-1-Polymorphismus mit den Allelen HPA-1a und HPA-1b betrifft das Glykoprotein IIIa des Rezeptors.

Träger des HPA-1a-Allels besitzen Leucin an der 33. Position des Glykoproteins IIIa, bei Trägern des HPA-1b-Allels ist Leucin an dieser Stelle durch Prolin ersetzt. Dieser Austausch ist Folge der C1565T-Substitution im Exon 2 des GPIIIa-Gens (Newman et al., 1989).

Der HPA-1-Polymorphismus des GPIIb/IIIa-Rezeptors ist einer der am genauesten untersuchten Polymorphismen. Dennoch ist seine klinische Relevanz noch nicht eindeutig geklärt (Beer et al., 2000).

So beobachteten Kastrati et al. (1999) und Garcia-Ribes et al. (1998) eine signifikant erhöhte Restenoserate bei Patienten, die Träger des HPA-1 b/b-Allels sind.

Feng et al. (1999) ordneten dem HPA-1-Polymorphismus eine Rolle in der Reaktivität der Thrombozyten zu. Ihre Untersuchungen ergaben eine verstärkte Plättchenaggregation und ein damit verbundenes höheres Risiko für die Entstehung einer koronaren Herzkrankheit bei Trägern des HPA-1 b/b-Genotyps.

Goodall et al. (1999) entdeckten bei ihren Untersuchungen eine signifikant höhere Bindung von löslichem Fibrinogen an Thrombozyten von Personen des HPA-1 b/b-Genotyps als an Thrombozyten von Personen des HPA-1 a/a-Genotyps. Bennett et al. (1997) und Meiklejohn et al. (1999) konnten dies jedoch nicht bestätigen.



Im Gegensatz dazu beschrieben Lasne et al. (1997), dass sogar höhere Konzentrationen des Plättchenaktivators TRAP (thrombin receptor-activating peptide) notwendig sind, um Thrombozyten des Genotyps HPA-1 b/b zu aktivieren.

Weiss et al. (1996) registrierten ein doppelt so häufiges Vorkommen des Genotyps HPA-1 b/b bei einer Gruppe von Patienten mit koronarer Herzkrankheit verglichen mit einer Kontrollgruppe von Personen ohne Vorgeschichte einer kardialen Erkrankung. Aufgrund dessen stellten sie die Hypothese auf, dass das HPA-1 b/b-Gen ein Risikofaktor für das Auftreten einer koronarer Herzerkrankung ist.

Auch Wu & Tsongalis (2001) sahen einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem HPA-1 b/b-Genotyp und dem Auftreten einer koronaren Herzkrankheit.

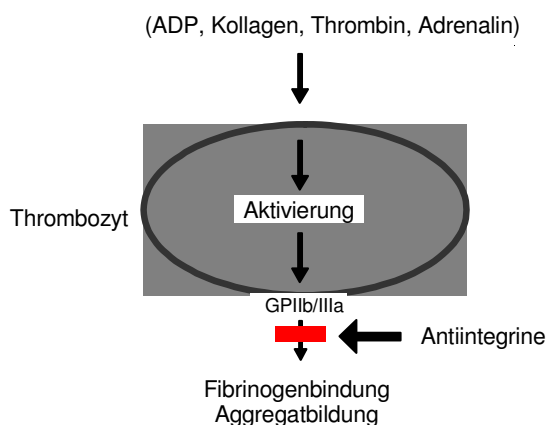
Ridker et al. (1997) fanden hingegen keine Hinweise für einen Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein des HPA-1 b/b-Genotyps und dem Auftreten eines Myokardinfarktes, Schlaganfalls oder venöser Thrombosen.

Somit ist bis jetzt nicht eindeutig geklärt, in wiefern der HPA-1-Polymorphismus alleine oder vielleicht nur bei gemeinsamem Auftreten mit anderen Risikofaktoren für die Entstehung von Thromben die Entwicklung eines Myokardinfarktes, zerebrovaskulärer Thromben oder einer koronaren Herzkrankheit begünstigt.

#### 1.4 Hemmung der Thrombozytenaggregation durch Antiintegrine

Die Blockierung der Thrombozytenfunktion ist ein therapeutisches Prinzip zur Verhinderung arterieller Thrombosen, d.h. insbesondere von Myokardinfarkten.

Ein relativ neues Therapieprinzip zur Hemmung der Thrombozytenaggregation sind Antiintegrine. Diese bestehen aus Peptiden, bzw. Peptidomimetika oder Antikörpern, die direkt den GPIIb/IIIa-Rezeptor blockieren. Dadurch verhindern sie die sonst stattfindende Bindung von Fibrinogen und die Entstehung von Thrombozytenaggregaten nach Aktivierung des Rezeptors durch ADP, Kollagen, Thrombin, Adrenalin oder durch andere Thrombozytenstimuli (Lefkovitz et al., 1995)(Abb.2).



**Abb. 2.**

Hemmung der Fibrinogenbindung und Aggregatbildung mittels Blockierung des GPIIb/IIIa-Rezeptors durch Antiintegrine.

Die Fähigkeit, integrinvermittelte Reaktionen, wie z.B. die Bindung von löslichem Fibrinogen, dem von Willebrand Faktor oder Kollagen, direkt zu inhibieren, beruht auf einer bestimmten Aminosäuresequenz, der RGD- bzw. KGD-Sequenz, die mit der Bindung von Adhäsionsproteinen wie Fibrinogen am Plättchenintegrin, d.h. dem GPIIb/IIIa-Rezeptor, kompetiert (Ingber, 1997).

### **1.5 Die GPIIb/IIIa-Inhibitoren Abciximab, Eptifibatid und Tirofiban**

Die GPIIb/IIIa-Inhibitoren, die im klinischen Gebrauch sind, sind Antikörper oder Antagonisten auf Peptidbasis, die intravenös gegeben werden.

Anfang der achtziger Jahre entdeckten Collier et al. (1983) Antikörper gegen das Glykoprotein IIb/IIIa, die die Bindung von Fibrinogen an den Rezeptor inhibierten. Abciximab wurde aus diesem monoklonalen Antikörper 7E3 gewonnen, welcher zur IgG<sub>1</sub>-Klasse gehört.

Zur Herstellung von Abciximab wurden die Fc (fragment constant)-Regionen von 7E3 proteolytisch entfernt, so dass nur noch die Fab (fragment antigen-binding)-Regionen zurückblieben. Dies war notwendig, um immunologische Komplikationen wie Komplementaktivierung und Thrombozytopenie infolge der speziefremden Herkunft zu reduzieren (Faulds & Sorkin, 1994).

Diese Fab-Fragmente enthielten immer noch Fc-Anteile, die für die Antigenbindung nicht essentiell waren (Collier et al., 1991). Daher reduzierte man die Fc-Region noch mehr, eine residuale Immunogenität blieb aber dennoch. Daraufhin wurde die DNA-Sequenz der Fc-Region durch die entsprechende Region aus humanem IgG ersetzt. Nach der Entfernung auch dieser Fc-Regionen blieben modifizierte Fab-Fragmente übrig, die den Namen Abciximab erhielten (Jordan et al., 1992)

Abciximab blockiert die Fibrinogenbindung sowohl an den aktivierten als auch an den nichtaktivierten GPIIb/IIIa-Rezeptoren. Dadurch wird nicht nur die Thrombozytenaggregation, sondern auch die Thrombozytenadhäsion gehemmt, da Thrombozyten über den nicht aktivierten GPIIb/IIIa-Rezeptor an immobilisiertes Fibrinogen binden können (Collier et al., 1983; Collier et al., 1991; Collier, 1992). Dieses Medikament war der erste GPIIb/IIIa-Blocker, der getestet und am Menschen angewandt wurde. Mehrere klinische Phase-III-Studien konnten die Wirksamkeit dieses Medikamentes bei perkutaner Koronarintervention belegen (The EPIC Investigators, 1994; The EPILOG Investigators, 1997; The CAPTURE Investigators, 1997; The EPISTENT Investigators, 1998).

Eptifibatid ist ein zyklisches Heptapeptid, welches über Disulfidbrücken verbunden ist. Seine Struktur basiert auf einem Disintegrin, Barbourin, welches die Aminosäurefrequenz KGD mit einem Disulfidring enthält (Phillips & Scarborough, 1997). Anstatt einer RGD- enthält es also eine KGD-Sequenz, welche wahrscheinlich für seine hohe Spezifität gegenüber dem GPIIb/IIIa-Rezeptor verantwortlich ist. Seine Affinität zum GPIIb/IIIa-Rezeptor ist allerdings geringer als die von Abciximab. Eptifibatid ist ein niedermolekularer Antagonist (Goa & Noble, 1999). Man nimmt an, dass diese Sequenz analog zu der Sequenz am Carboxyende der  $\gamma$ -Kette von Fibrinogen ist, welche die Bindung von Fibrinogen an den Rezeptor vermittelt (Farrell et al., 1992).

Eine weitere Peptidsequenz, die vom GPIIb/IIIa-Rezeptor erkannt wird, ist –Arg-Gly-Asp- (RGD). Diese Sequenz kommt in Fibrinogen, vWF und anderen Liganden des Rezeptors vor. Diese RGD-Sequenz war der Ansatzpunkt für die Entwicklung von Tirofiban (Egbertson et al., 1994).

Tirofiban ist ein kleines, nicht peptidisches Molekül, welches im Gegensatz zu Eptifibatid nicht mit der Fibrinogenbindungsstelle kompetiert, sondern die Eigenschaften der RGD-Sequenz imitiert und dadurch die Fibrinogenbindung hemmt (Egbertson et al., 1994).

Auch bei diesen beiden Vertretern der Thrombozytenaggregationshemmer konnten verschiedene klinische Phase-III-Studien ihren Effekt bei perkutaner Koronarintervention und bei der Therapie des akuten Koronarsyndroms belegen (The IMPACT II Investigators, 1997; The RESTORE Investigators, 1998; The PRISM Study Investigators, 1998; The PRISM PLUS Study Investigators, 1998; The PURSUIT Investigators, 1998).

## **1.6 Einfluss des HPA-1-Polymorphismus auf die Wirkung der Antiintegrine**

Es ist eine große Variabilität der Wirkungen der Antiintegrine bekannt. Bihour et al. (1999) registrierten eine interindividuell variable Ansprechbarkeit der Thrombozyten auf den Inhibitor des GPIIb/IIIa-Rezeptors Abciximab.

Auch Holmes et al. (1999) beobachteten eine individuell unterschiedlich starke Hemmung des GPIIb/IIIa-Rezeptors durch Eptifibatid oder Tirofiban.

Eine verstärkte Wirkung der GPIIb/IIIa-Inhibitoren auf ADP-aktivierte Thrombozyten bei Trägern des Genotyps HPA-1 a/b beschrieben Michelson et al. (2000).

Bennett et al. (2001) sahen in ihren Untersuchungen hingegen keine Auswirkungen des HPA-1-Genotyps auf die Blockierung der Fibrinogenbindung durch den niedermolekularen GPIIb/IIIa-Inhibitor RWJ 53308.

Ob die Wirkung dieser Antiintegrine in Zusammenhang mit dem HPA-1-Polymorphismus steht, konnte somit bis jetzt nicht eindeutig geklärt werden.

## **1.7 Zielsetzung**

In dieser Arbeit wurde der Einfluss des HPA-1-Genotyps auf die Hemmung der Fibrinogenbindung durch die GPIIb/IIIa-Inhibitoren Abciximab, Eptifibatid und Tirofiban bei gesunden Blutspendern als Kontrollpersonen sowie bei Patienten mit stabiler koronarer Herzkrankheit untersucht.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1. Material**

#### **2.1.1 Probanden, Patienten und Blutabnahme**

Die Studie wurde mit 62 Blutspendern des Instituts für Hämostaseologie und Transfusionsmedizin der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf und 177 Patienten der Klinik für Kardiologie, Pneumologie und Angiologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf durchgeführt.

Unter der Gruppe der Blutspender befanden sich 45 Männer und 17 Frauen. Der Altersdurchschnitt lag bei  $38,1 \pm 1,4$  Jahren.

Bei den Patienten bestand als Grundvoraussetzung das Vorliegen einer stabilen koronaren Herzkrankheit (KHK). Patienten, die im Rahmen ihrer Behandlung Thienopyridine erhielten, wurden von der Studie ausgeschlossen. Die Einnahme von Acetylsalicylsäure stellte keinen Grund zum Ausschluss dar, da Aspirin die Adenosindiphosphat (ADP)-induzierte Thrombozytenaktivierung, gemessen bei einer Kalziumkonzentration von 2 mM, nicht beeinflusst (Hermann et al., 2001).

Diese Gruppe bildeten 132 Männer und 45 Frauen mit einem Altersdurchschnitt von  $63,9 \pm 0,9$  Jahren.

Den Blutspendern und Patienten wurden jeweils 5 ml Blut abgenommen. Sie wurden über die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente aufgeklärt und erklärten schriftlich ihr Einverständnis.

Das Blut wurde in einem Vakutainer mit Citratvorlage (1:9 v/v) gesammelt und unverzüglich zum Labor transportiert.

#### **2.1.2 Präparation der Thrombozyten**

Das Vollblut wurde auf zwei Eppendorf-Gefäße zu je 2 ml verteilt. Durch Zentrifugieren bei 5000 U/min für 45 Sekunden wurde plättchenreiches Plasma (PRP) gewonnen.

Das Eppendorf-Gefäß wurde nun eine Minute stehen gelassen und hieraus 1 ml PRP in ein neues Eppendorf-Gefäß pipettiert.

Dann wurde das PRP 1:5 mit ACD versetzt und bei 6000 U/min. für 30 Sekunden zentrifugiert. Der Überstand wurde komplett abgesaugt und das Pellet in 1 ml Komplett-TM resuspendiert. Anschließend wurde das Material aus 1 ml ACD-versetztem PRP in insgesamt 5 ml Komplett-TM resuspendiert. (Weber & Schrör, 2001).

Vor jedem Versuch wurde der Aktivierungszustand der Thrombozyten durch Überprüfung des "swirl-Phänomens" festgestellt. Dieses Phänomen spiegelt das "Herumwirbeln" der diskoidalen Thrombozyten im Plasma wider und verschwindet bereits in frühen Aktivierungsstadien durch die Abrundung der Thrombozyten, die dann sogenannte Reizformen bilden (Zucker, 1989; Krzywanek, 1987).

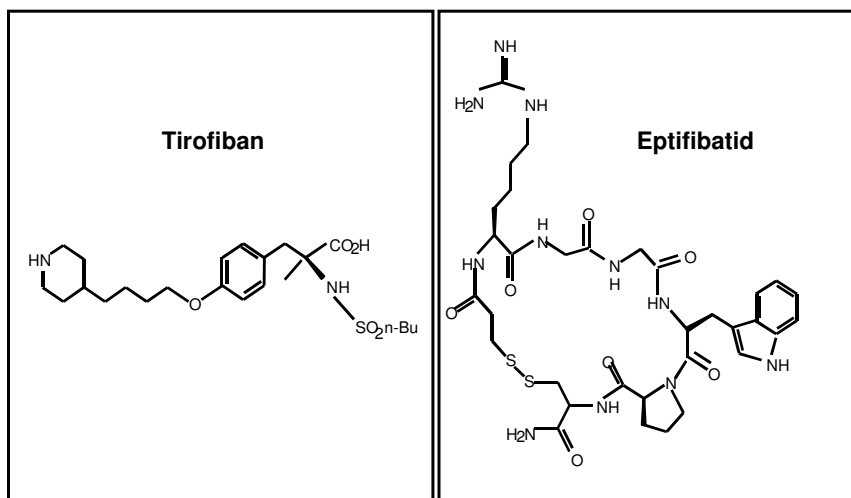
Das zurückgebliebene Blut wurde in zwei 2 ml Eppendorf-Gefäßen bei  $-16^{\circ}$  C eingefroren und für die PCR zur Bestimmung des HPA-1-Genotyps aufbewahrt.

## 2.1.3 Substanzen und Lösungen

### Substanzen

Abciximab (Reopro®)  
ACD (Biostabil®)  
Adenosindiphosphat  
Eptifibatid (Integrelin®)  
Oregon-Green Fibrinogen  
Tirofiban (Aggrastat®)

Centocor, Leiden, Holland  
Biotest Pharma, Dreieich  
Sigma  
Essex Pharma, München  
Molecular Probes, Eugene, USA  
MSD Sharp & Dohme, Haar



**Abb. 3.** Chemische Struktur von Tirofiban und Eptifibatid.

### Lösungen

Adenosindiphosphat: ADP wurde als Stammlösung in einer Konzentration von  $10^{-5}$  M bei  $-20$  °C aufbewahrt und an jedem Versuchstag auf die gewünschte Konzentration verdünnt.

Komplett-TM: 10 ml TM, 100  $\mu$ l Rinderserumalbumin, 100  $\mu$ l CaCl<sub>2</sub> (200mM), 100  $\mu$ l Glukose (100 mg/ml).

HEPES-Tyrode Puffer: Besteht aus 134 mM NaCl, 12 mM NaHCO<sub>3</sub>, 2,9 mM KCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,36 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM HEPES, 5 mM Glucose, 0,5 mg/ml Rinder-Serumalbumin, pH 7,4.

Isoton: NaCl 7,9 g/l, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,9 g/l, EDTA 0,4 g/l, KCl 0,4 g/l, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,2 g/l, NaF 0,3 g/l.

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Messung der Fibrinogenbindung mittels Durchflusszytometrie

In der vorliegenden Arbeit wurde die Sensitivität der Thrombozyten gegenüber den GPIIb/IIIa-Inhibitoren Abciximab (0,03-3 µg/ml), Eptifibatid (0,01-1 µg/ml) und Tirofiban (0,01-1 µg/ml) in Zusammenhang mit dem HPA-1-Genotyp überprüft.

Nach Gewinnung der gewaschenen Thrombozyten aus dem Vollblut wurden diese zu je 100 µl auf Eppendorf-Gefäße (1,5 ml) aufgeteilt. Es folgte die Zugabe von jeweils 10 µl der verschiedenen GPIIb/IIIa-Inhibitoren.

Nach 15 min. Inkubation bei 37 °C wurden für das Maß der Fibrinogenbindung 10 µl Fibrinogengemisch mit ADP dazugegeben. Das Fibrinogengemisch bestand aus Oregon Green-markiertem Fibrinogen (0,5 mg/ml) und, um die physiologische Fibrinogenkonzentration zu erreichen, unmarkiertem Fibrinogen (3 mg/ml) (Weber & Schrör, 2001).

Nach einer Inkubationszeit von 15 min. bei 37 °C wurde die Fibrinogenbindung durch Verdünnung mit Isoton (1:200) gestoppt und unmittelbar mittels Durchflusszytometrie gemessen.

Die Wirksamkeit der Substanzen wurde anhand der Hemmbarkeit der Fibrinogenbindung bestimmt.

#### Inkubationsschema:

100 µl gewaschene Thrombozyten + 10 µl GPIIb/IIIa-Inhibitor  
(15 min. Inkubation bei 37°C)

10 µl Fibrinogengemisch + ADP (30 µM) (15 min. Inkubation bei 37 °C)

Verdünnung mit Isoton (1:200), durchflusszytometrische Analyse

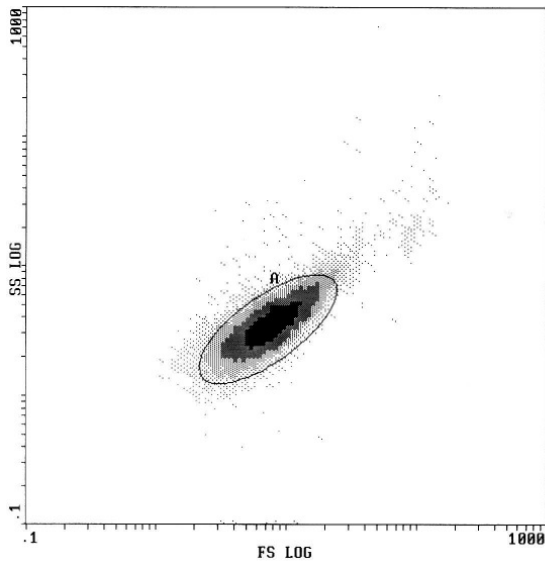
Es wurden folgende Konzentrationen der GPIIb/IIIa-Inhibitoren verwendet:

Abciximab: 0,03 µg/ml, 0,1 µg/ml, 0,3 µg/ml, 1 µg/ml, 3 µg/ml

Eptifibatid: 0,01 µg/ml, 0,03 µg/ml, 0,1 µg/ml, 0,3 µg/ml, 1 µg/ml

Tirofiban: 0,01 nM, 0,03 nM, 0,1 nM, 0,3 nM, 1nM

Nachdem die Reaktionen durch die Zugabe von Isoton gestoppt waren, wurden die Proben im Epics-XL Zytometer (Beckmann Coulter, Krefeld) untersucht. Die Thrombozytenpopulation wurde anhand der Verteilung von Vorwärts- und Seitwärtsstreuung identifiziert und mittels Anfärbung mit Anti-CD62P-Antikörpern verifiziert (Weber & Schrör, 2001) (Abb. 4) Die Signalverstärkung wurde logarithmisch eingestellt. Es wurden 10 000 Plättchen bei maximal 1000 Ereignissen pro Sekunde vermessen und mit der System II-Software analysiert.



**Abb. 4.**

Scatter zur Identifizierung der Thrombozytenpopulation mittels Vorwärts- und Seitwärtsstreuung.

Als unstimulierte Kontrolle diente eine Probe von 100 µl gewaschener Thrombozyten, die mit 10 µl Fibrinogengemisch jedoch ohne ADP versetzt wurde.

Als stimulierte Kontrolle diente eine Probe von 100 µl gewaschener Thrombozyten, die mit 10 µl Fibrinogengemisch und ADP versetzt wurde.

Für jeden Versuch wurde eine Konzentrations-Wirkungs-Kurve erstellt. Aus diesen Kurven wurde für jedes Einzelexperiment die Konzentration für die halbmaximale Hemmung der Fibrinogenbindung (IC<sub>50</sub>-Wert) mittels nicht-linearer Regression berechnet (Programm Graph Pad Prism 2.01, GraphPad Software, Inc. San Diego, CA, USA).

**2.2.2 Bestimmung des HPA-1-Genotyps mittels "gene amplification labelling in one system" (GALIOS)**

Der HPA-1-Genotyp wurde mittels GALIOS und Einzelmolekül-Spektroskopie bestimmt (Weber et al., 2002).

Das GALIOS-Verfahren basiert auf der Synthese allelspezifischer, fluoreszenzmarkierter PCR-Produkte in einer homogenen Reaktion.

In einem Reaktionsansatz werden zwei genspezifische Amplifikationsprimer und zwei allelspezifische Markierungsprimer verwendet. Die genspezifischen, nichtmodifizierten Amplifikationsprimer dominieren die frühen Zyklen der Amplifikation, während die beiden allelspezifischen Labelingprimer in späteren Zyklen hochspezifisch fluoreszenzmarkierte Produkte des entsprechenden Allels generieren.

Die Markierungsprimer sind 5'-terminal an Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelt, die entweder mit Laserlicht der Wellenlängen 543 nm (TAMRA für Allel A) oder 633 nm (EVOblue für Allel B) angeregt werden.

Die Detektion der allelspezifisch markierten PCR-Produkte erfolgte mittels automatisierter Einzelmolekül-Detektion (Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie, FCS) auf dem Analyzer  $\Delta A2.0$ .

Die Genotypisierung wurde durch Frau Dr. Stephanie Weber, EVOTEC, durchgeführt.

### **2.2.3. Statistik**

Die Messdaten wurden als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes (SEM) von  $n$  unabhängigen Versuchen angegeben. Die statistische Signifikanz wurde mittels der Varianzanalyse (Einweg-ANOVA) und dem Bonferroni-Test (GraphPad InStat 3.01, GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) für multiple Vergleiche überprüft. Das Signifikanzniveau  $P$  für  $\alpha$  wurde mit 0,05 festgesetzt.



### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Frequenz der HPA-1-Genotypen

Die Tabelle zeigt die Verteilung der einzelnen HPA-1-Genotypen unter den gesunden Blutspendern und den Patienten mit koronarer Herzkrankheit. Der Genotyp einiger Blutspender war vor den Experimenten bekannt; daher ist die Häufigkeit des homozygoten HPA-1b/b-Genotyps verglichen mit dem Vorkommen in der Bevölkerung erhöht. Bei den Patienten mit koronarer Herzkrankheit waren die Genotypen vorher nicht bekannt, und die Häufigkeit der Genotypen entspricht der Verteilung in der Bevölkerung.

##### Gesunde Blutspender (n = 62)

HPA-1 a/a: 46 (74%)

HPA-1 a/b: 10 (16%)

HPA-1 b/b: 6 (10 %)

##### Patienten mit koronarer Herzkrankheit (n=177)

HPA-1 a/a: 135 (76%)

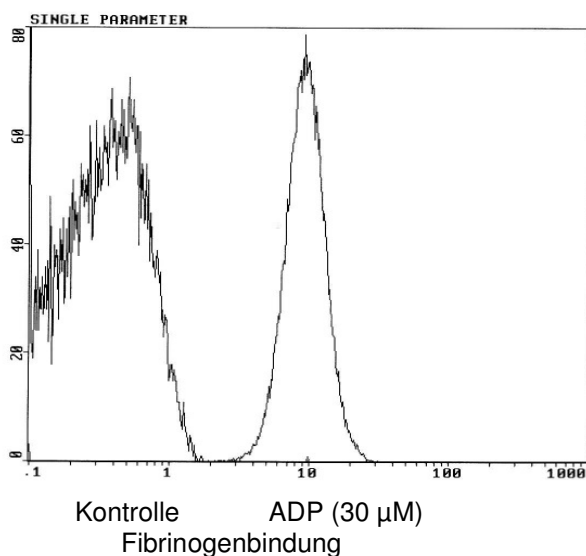
HPA-1 a/b: 38 (22%)

HPA-1 b/b: 4 (2%)

#### 3.2 Basale und ADP-induzierte Fibrinogenbindung bei Blutspendern und Patienten mit koronarer Herzkrankheit

Im nichtaktivierten Zustand zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Fibrinogenbindung der Blutspender und der Fibrinogenbindung der Patienten mit koronarer Herzkrankheit.

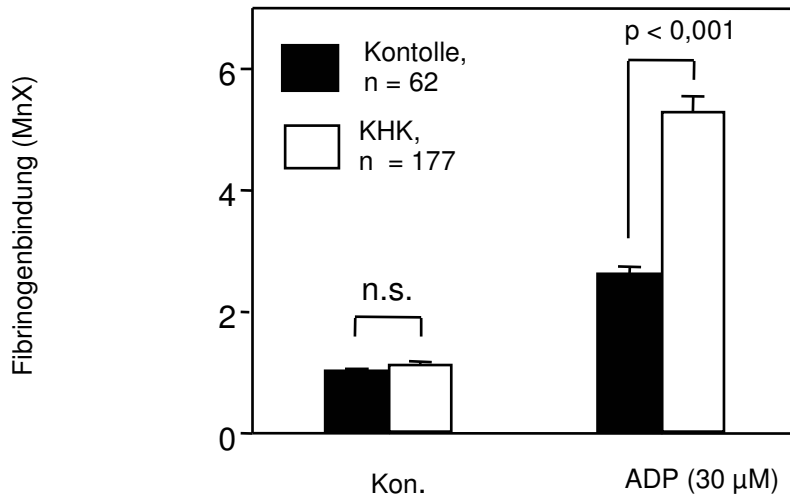
Die Zugabe von ADP führte sowohl bei den Blutspendern, als auch bei den Patienten zu einer erhöhten Fibrinogenbindung (Abb. 5).



**Abb. 5.**

Originaldarstellung der Fibrinogenbindung im nichtaktivierten (Kontrolle) und aktivierten (30 µM ADP) Zustand der Thrombozyten gemessen mittels der Durchflusszytometrie.

Die quantitative Auswertung der Fibrinogenbindung an die Thrombozyten der Blutspender im Vergleich zu den Patienten mit koronarer Herzkrankheit ergab eine signifikant erhöhte Fibrinogenbindung bei den Patienten verglichen mit der Fibrinogenbindung bei den Blutspendern (Abb. 6).



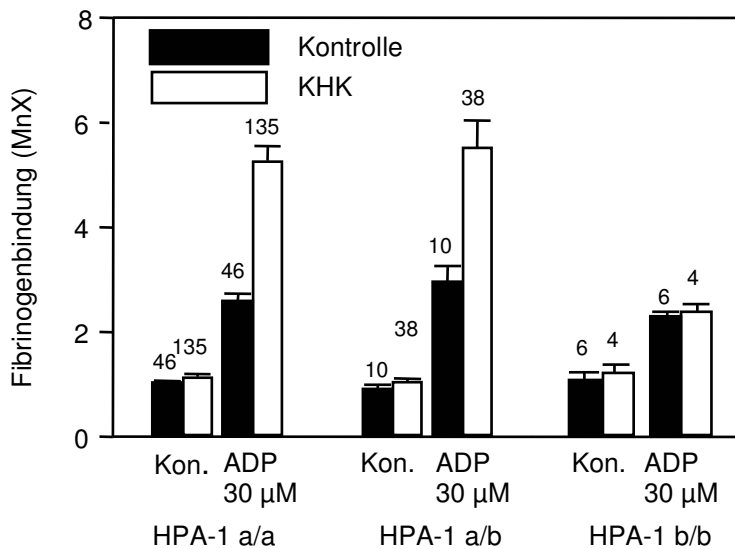
**Abb. 6.**

Fibrinogenbindung (mittlere Fluoreszenz-Intensität, MnX) der Thrombozyten von Blutspendern (Kontrolle, n = 62) und Patienten mit koronarer Herzkrankheit (KHK, n = 177) im nichtaktivierten (Kon.) und im aktivierten (ADP 30 µM) Zustand. Quantitative Analyse (Mittelwerte±SEM, n.s. = nicht signifikant).

### 3.3 Einfluss der HPA-1-Genotypen der Blutspender und Patienten auf die Fibrinogenbindung

Im nicht-aktivierten Zustand konnte kein signifikanter Unterschied in Bezug auf die Fibrinogenbindung der Thrombozyten zwischen den drei HPA-1-Genotypen von Blutspendern und Patienten beobachtet werden.

Bei allen drei Genotypen ließ sich die Fibrinogenbindung durch die Zugabe von ADP (30 µM) erhöhen. Es gab auch im aktivierten Zustand keinen signifikanten Unterschied zwischen den Genotypen. Allerdings ließen sich die Thrombozyten der HPA-1 b/b Genotypen sowohl der Kontrollgruppe, als auch der Patienten tendenziell, jedoch statistisch nicht signifikant, geringer aktivieren (Abb. 7).

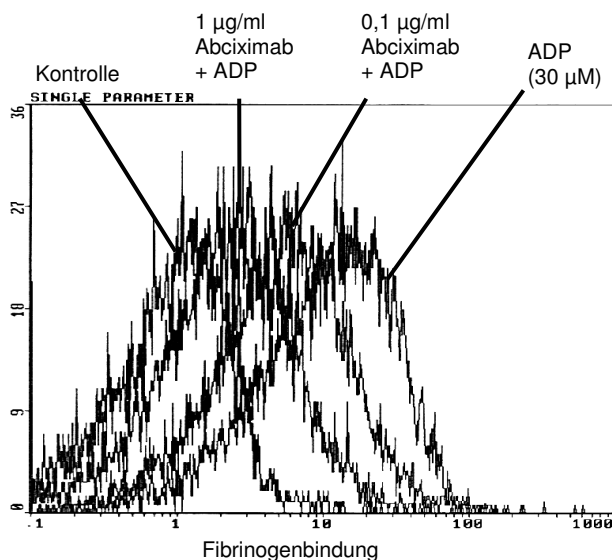


**Abb. 7.**

Fibrinogenbindung (mittlere Fluoreszenz-Intensität, MnX) der Thrombozyten der HPA-1-Genotypen von Blutspendern (Kontrolle) und Patienten mit koronarer Herzkrankheit (KHK) im nichtaktivierten (Kon.) und aktivierten (ADP 30 µM) Zustand. Quantitative Analyse (Mittelwerte±SEM, Zahlen über den Balken = Anzahl der Spender oder Patienten), es gab keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen hinsichtlich der Fibrinogenbindung ( $p > 0,05$ , ANOVA).

### 3.4 Hemmung der Fibrinogenbindung durch Antiintegrine

Die Zugabe von GPIIb/IIIa-Inhibitoren bewirkte eine konzentrationsabhängige Hemmung der ADP-induzierten Fibrinogenbindung der Thrombozyten. Abb. 8 zeigt dies in einer Originaldarstellung der durchflusszytometrischen Messung am Beispiel von zwei exemplarischen Konzentrationen von Abciximab.

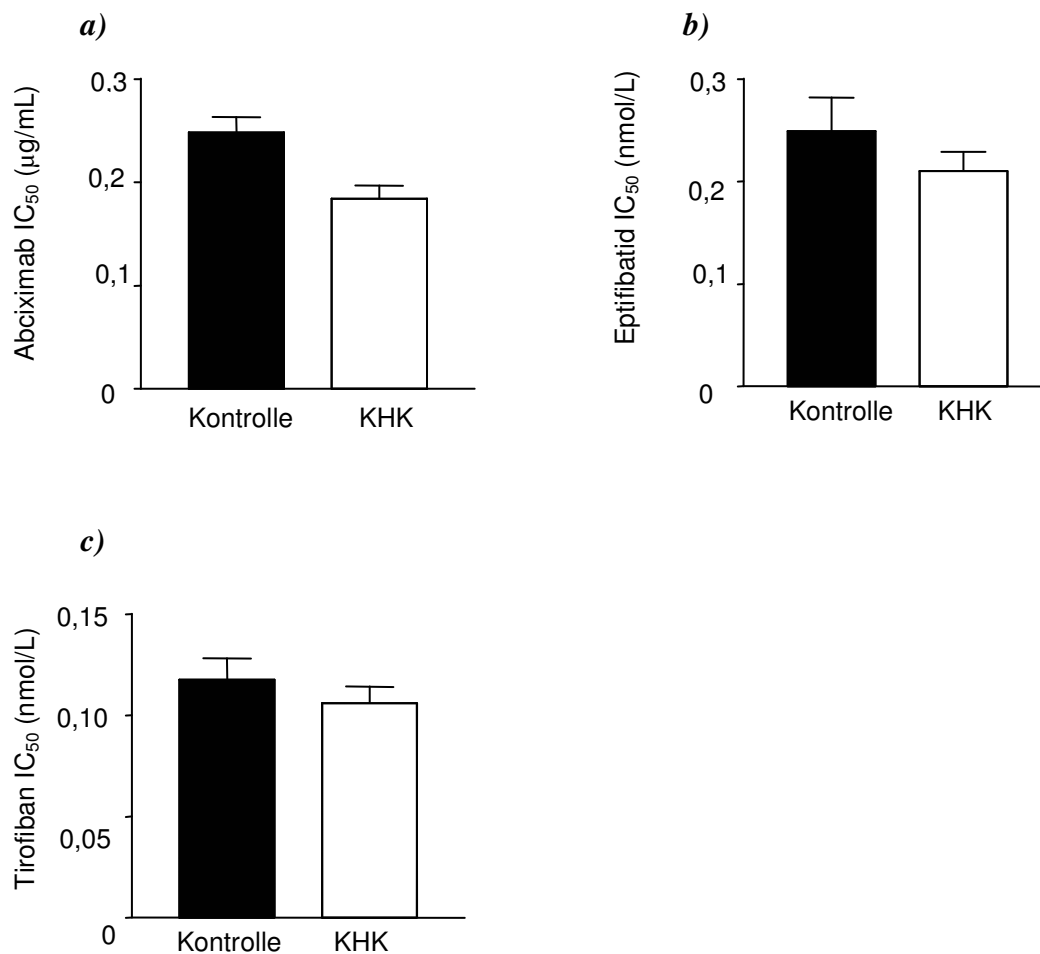


**Abb. 8.**

Originaldarstellung einer durchflusszytometrischen Messung der Fibrinogenbindung ohne Stimulierung (Kontrolle), nach Stimulierung mit ADP (30 µM) und nach Zugabe von Abciximab in zwei verschiedenen Konzentrationen (0,1 µg/ml; 1µg/ml).

### 3.5 Hemmung der Fibrinogenbindung bei Blutspendern und Patienten mit koronarer Herzkrankheit

Die Patienten mit koronarer Herzkrankheit zeigten tendenziell eine bessere Ansprechbarkeit auf Abciximab als die gesunden Blutspender. Nach Berechnung der  $IC_{50}$ -Werte aus den Konzentrations-Wirkungskurven für jeden GPIIb/IIIa-Inhibitor ergab sich jedoch kein signifikanter Unterschied in Bezug auf die Hemmbarkeit der Thrombozyten weder bei Abciximab, Eptifibatid noch Tirofiban (Abb. 9).



**Abb. 9.**

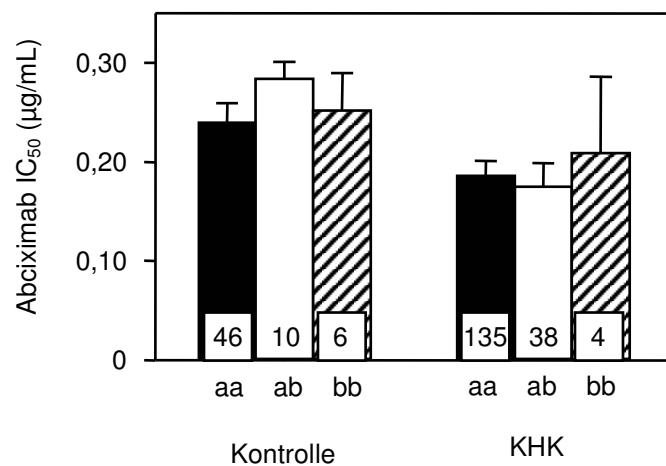
$IC_{50}$ -Werte für die Hemmung der Fibrinogenbindung bei den Blutspendern (Kontrolle,  $n = 62$ ) und den Patienten mit koronarer Herzkrankheit (KHK,  $n = 177$ ) durch *a*) Abciximab, *b*) Eptifibatid und *c*) Tirofiban. Quantitative Analyse (Mittelwerte $\pm$ SEM), es gab keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen Spendern und Patienten hinsichtlich der Effekte der GPIIb/IIIa-Inhibitoren ( $p > 0,05$ , ANOVA).

### 3.6 Einfluss der HPA-1-Genotypen der Blutspender und Patienten auf die Hemmung der Fibrinogenbindung

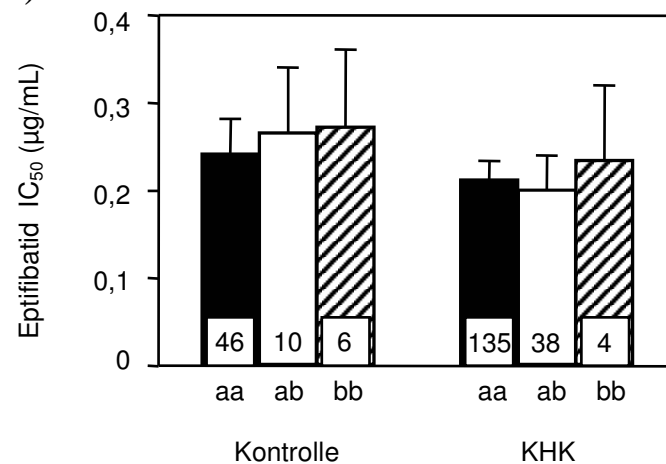
Zwischen den einzelnen HPA-1-Genotypen zeigte sich sowohl bei den Blutspendern, als auch bei den Patienten eine große Variabilität in der Ansprechbarkeit der Thrombozyten auf die antiaggregatorischen Substanzen.

Es bestand aber weder bei den Blutspendern noch bei den Patienten ein signifikanter Unterschied in Bezug auf die Hemmbarkeit der Thrombozyten in Abhängigkeit vom HPA-1-Genotyp. Abciximab, Eptifibatid und Tirofiban hemmten die Fibrinogenbindung der Thrombozyten ohne signifikanten Unterschied zwischen den einzelnen Genotypen (Abb. 10).

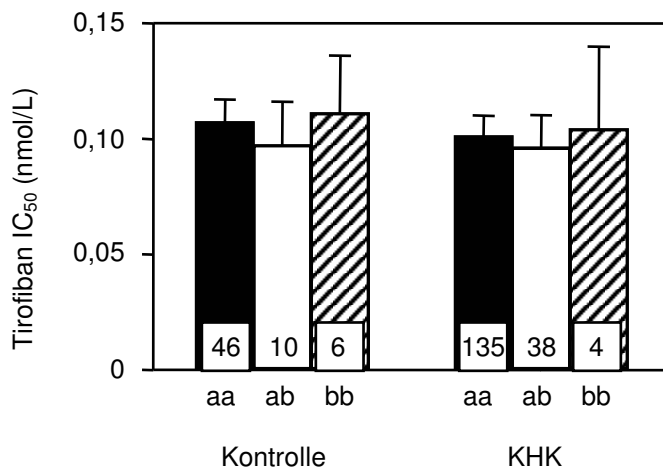
a)



b)



c)



**Abb. 10.**

IC<sub>50</sub>-Werte für die Hemmung der Fibrinogenbindung bei den Genotypen HPA-1-aa, HPA-1-ab und HPA-1-bb der Blutspender (Kontrolle, n = 62) und der Patienten mit koronarer Herzkrankheit (KHK, n = 177) durch *a*) Abciximab, *b*) Eptifibatid und *c*) Tirofiban. Quantitative Analyse (Mittelwerte±SEM), es gab keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen hinsichtlich der Effekte der GPIIb/IIIa-Inhibitoren (p > 0,05, ANOVA).

## 4 Diskussion

### 4.1 Aktivierung der Thrombozyten

Die Aktivierung der Thrombozyten ist ein komplexer Vorgang, der durch eine Vielzahl von Substanzen, wie beispielsweise durch lösliche Agonisten wie ADP oder Thrombin induziert wird. Diese werden zum Teil von den Thrombozyten selbst freigesetzt, teilweise vom umliegenden Gewebe. Die Agonisten wirken über spezifische Rezeptoren und lösen eine Reihe von intrazellulären Signaltransduktionswegen aus, wie beispielsweise die Freisetzung von Kalzium aus dem dichten tubulären System und die Bildung von Thromboxan A<sub>2</sub>. Sie bewirken die Sekretion von Granula und eine Formveränderung mit Bildung von Pseudopodien zur Oberflächenvergrößerung der Thrombozyten. Weiterhin sorgen diese Agonisten für eine Aktivierung des Aggregationsrezeptors GPIIb/IIIa (Andrews et al., 1997). Der GPIIb/IIIa-Rezeptor, der in ruhendem Zustand kein plasmatisches Fibrinogen bindet, ändert nach Aktivierung seine Affinität, so dass lösliches Fibrinogen gebunden werden kann (Plow & Ginsberg, 1989).

Zusätzlich zu dieser Formänderung erhöht sich die Oberflächendichte der Rezeptoren durch die Freisetzung aus einem internen Speicher (Wencel-Drake et al., 1986; Woods et al., 1986; Weber & Schrör, 2001). Diese interne Speicherung der Rezeptoren spielt möglicherweise eine bedeutende Rolle in der Therapie mit den Antagonisten des GPIIb/IIIa-Rezeptors (Kleimann et al., 1995, Bihour et al., 1999). Denn bei starker Aktivierung der Thrombozyten erfolgt die Freisetzung dieser internen Speicher und die GPIIb/IIIa-Rezeptoren gelangen an die Thrombozytenoberfläche. Da diese Rezeptoren in ihrem inneren Speicher wahrscheinlich nicht durch die GPIIb/IIIa-Antagonisten blockiert wurden, können sie auch bei hohen Konzentrationen von GPIIb/IIIa-Antagonisten eine Thrombozytenaggregation bewirken (Gawaz et al., 2000).

### 4.2 Abhängigkeit der Aktivierbarkeit vom HPA-1-Polymorphismus

Das Glykoprotein IIb/IIIa spielt eine entscheidende Rolle bei der Thrombozytenaggregation. In letzter Zeit wird der HPA-1-Polymorphismus dieses Rezeptors mit einem erhöhten Risiko für das Auftreten einer koronaren Herzkrankheit in Zusammenhang gebracht. Es ist noch unklar, welcher Mechanismus dafür verantwortlich sein könnte. Es wird über eine erhöhte Thrombozytenaktivität bei Trägern des HPA-1-b-Allels diskutiert. Es ist jedoch noch nicht geklärt, ob ein eindeutiger Zusammenhang zwischen dem Polymorphismus und der Thrombozytenaggregation besteht.

Einige Studien zeigen dies jedoch. So wurde eine erhöhte Plättchenaktivität bei heterozygoten und homozygoten Trägern des b-Allels dieses Genotyps *in vitro* beobachtet (Feng et al., 1999). Bei Trägern dieses Allels waren signifikant niedrige Konzentrationen Adrenalin notwendig, um die Thrombozyten zu aktivieren. Diese verstärkte Thrombozytenaktivität könnte mit einem erhöhten Risiko für die Entstehung einer koronaren Herzerkrankung, bzw. deren thrombotischen Komplikationen, bei Trägern des b-Allels zusammenhängen.

Bei Untersuchungen zeigten Thrombozyten von Trägern des HPA-1b-Allels auch im ruhenden Zustand verglichen mit Thrombozyten homozygoter Träger des HPA-1a-Allels eine signifikant gesteigerte Bindung von CD62P (P-selectin), welches die  $\alpha$ -

Granula-Sekretion widerspiegelt (Michelson et al., 2000). Auch der F26 Antikörper, der gegen das vom GPIIb/IIIa-Rezeptor gebundene Fibrinogen gerichtet ist, zeigte eine stärkere Bindung zu den Thrombozyten der homozygoten Träger des HPA-1b-Allels als zu den Thrombozyten der anderen Genotypen. Nach Stimulation der Thrombozyten mit ADP zeigten die homozygoten HPA-1b-Träger eine signifikant gesteigerte Aktivierung verglichen mit den HPA-1a-Homozygoten gemessen an der Bindung von CD62P, F26 und LIBS1. Auch zwischen den homozygoten und heterozygoten Trägern des HPA-1b-Allels bestanden bei Michelson et al. (2000) signifikante Unterschiede in der GPIIb/IIIa-Aktivierung. Das Vorhandensein von zwei HPA-1b-Allelen zeigte eine signifikant gesteigerte Plättchenaktivität gemessen an der  $\alpha$ -Granula-Sekretion und der Aktivierung des GPIIb/IIIa-Rezeptors.

Auch nach der Stimulation der Thrombozyten *in vitro* mit Adrenalin zeigten die Thrombozyten bei den homozygoten und heterozygoten HPA-1b-Genotypen eine signifikant schnellere und stärkere Aggregation im Vergleich mit den Thrombozyten der homozygoten Träger des HPA-1a-Allels. Ebenso bewirkte die Stimulation mit Kollagen eine signifikant verstärkte Aggregation bei Trägern des HPA-1b-Allels. Dies lässt darauf schließen, dass das HPA-1b-Allel die Schwelle für die Aktivierbarkeit des GPIIb/IIIa-Rezeptors herabsetzt (Theodoropoulos et al., 2001).

Eine Studie, die die Aktivierbarkeit der Thrombozyten bei 32 Patienten vor ihrer Bypass-Operation der Koronararterien und am siebten Tag danach untersuchte, ergab für die Stimulation mit ADP eine signifikant erhöhte Aktivierbarkeit der Thrombozyten bei den Trägern des HPA-1b-Allels sowohl vor der Operation, als auch danach. Dies spricht für eine erbliche Disposition dieser Allelträger mit einer erhöhten Plättchenreaktivität in der Anwesenheit bestimmter Agonisten und einem damit möglicherweise verbundenen erhöhten Risiko für die Entstehung eines postoperativen Myokardinfarkts (Golanski et al., 2001).

Vijayan et al. (2000) untersuchten 293 Zellen von Ovarien chinesischer Hamster und von embryonalen, menschlichen Nierenzellen, die entweder HPA-1a-positiv oder HPA-1b-positiv waren. In der Bindung von löslichem Fibrinogen beobachteten sie ebenso wie Bennett et al. (1997) keine Unterschiede zwischen den Genotypen. Auch die Aktivierung der Zellen mit TRAP und Adrenalin ergab keine Abweichungen in der Bindung von löslichem Fibrinogen. Die Bindung von immobilisiertem Fibrinogen hingegen war bei den Zellen des HPA-1b-Allels verglichen mit den Zellen des HPA-1a-Allels signifikant erhöht. Ursache hierfür könnten die unterschiedlichen Strukturen von löslichem und immobilisiertem Fibrinogen sein.

Den Grund für die gesteigerte Adhäsion der HPA-1b-Zellen sehen Vijayan et al. (2000) in der besseren Reorganisation des Actin-Zytoskeletts, die durch eine höhere Anwesenheit von F-actin in der Peripherie der HPA-1b-Zellen entsteht, und der besseren Ausbreitung dieser Zellen.

Die hier vorliegende Arbeit ergab jedoch keine signifikanten Unterschiede in der Aktivierbarkeit der Thrombozyten mit ADP gemessen an der Fibrinogenbindung. Sowohl bei den Blutspendern, als auch bei den Patienten mit koronarer Herzkrankheit ließen sich die Thrombozyten der drei Genotypen gleich stark aktivieren. Tendenziell war die Aktivierung der homozygoten b/b-Allelträger in beiden Gruppen zwar geringer, dies ist jedoch aufgrund der geringen Anzahl nicht signifikant.



Es wäre allerdings denkbar, dass bei einer höheren Fallzahl (siehe Kritik der Methoden) dieser Unterschied sich als signifikant herausstellen könnte. Zumindest sprechen die hier vorliegenden Daten nicht für eine Hyperreaktivität der Thrombozyten bei Trägern des HPA-1b-Allels und damit auch gegen ein, mit diesem Allel verbundenes, erhöhtes Risiko für das Entstehen eines arteriellen Verschlusses in Form eines Schlaganfalls oder Myokardinfarktes.

In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen konnten Benett et al. (2001) ebenfalls keinen signifikanten Unterschied zwischen homozygoten Trägern des HPA-1a-Allels und heterozygoten Trägern des HPA-1b-Allels in Bezug auf die Fibrinogenbindung nach maximaler Stimulation mit ADP feststellen. Auch bei niedrigeren ADP-Konzentrationen von 0,25 µM bis 10 µM konnten sie keine signifikanten Unterschiede beobachten.

Auch Corral et al. (1997) beobachteten keine Assoziation des HPA-1-Polymorphismus mit unterschiedlicher Expression des GPIIb/IIIa-Rezeptors und dessen Aktivierbarkeit. Ebenso sahen sie auch keine Variation in der Thrombozytenaggregation in Verbindung mit den einzelnen Genotypen gemessen an der Expression von CD62P und CD63. Auch die Bindung von Fibrinogen und von Willebrand-Faktor an den GPIIb/IIIa-Rezeptor wurde nicht durch den HPA-1b-Genotyp beeinflusst. Ihre Daten lassen somit auch nicht auf eine Hyperreaktivität der Thrombozyten von Trägern des HPA-1b-Allels schließen und unterstützen nicht die These, dass das HPA-1b-Allel ein Risikofaktor für die Entstehung arterieller Thromben darstellt.

Ebenso brachten Untersuchungen, in denen *in vivo* bei 150 Patienten mit akuter arterieller Thrombose die Thrombozytenaktivierung anhand der P-selectin (CD62P)-Expression und der Fibrinogenbindung im Vollblut mittels der Durchflusszytometrie gemessen wurden, keinen Hinweis auf einen Einfluss des HPA-1-Genotyps auf die Thrombozytenaktivierung. Es wurde zwar eine anhaltende Thrombozytenaktivierung bei arteriellen Thrombosen beobachtet, diese war jedoch unabhängig vom HPA-1-Genotyp (Meiklejohn et al., 2000).

Die Diskrepanz zwischen den Ergebnissen der oben genannten Studien ist groß, und die Gründe hierfür sind nicht geklärt. Die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit geben jedoch keine Unterstützung für die These, dass das HPA-1b-Allel einen erblichen Risikofaktor für eine verstärkte Thrombozytenaggregation und ein damit verbundenes, erhöhtes Risiko für die Entstehung von Thromben darstellt. Es wurden keine funktionellen Unterschiede in Bezug auf die Fibrinogenbindung der Thrombozyten bei Trägern des HPA-1b-Allels festgestellt. Somit kann der HPA-1b-Genotyp alleine nicht als Risikofaktor für die Entstehung von Thromben angesehen werden. Da jedoch viele genetische und umweltbedingte Einflüsse für die Entstehung von Thromben eine große Rolle spielen, ist es möglich, dass einige davon, wenn sie kombiniert mit einem HPA-1b-Allel vorliegen, synergistisch mit diesem HPA-1b-Allel wirken. Dies könnte zu einer erhöhten Thrombozytenaktivität führen und damit die Entstehung von Thromben begünstigen. Darüber hinaus könnten Thrombozytenfunktionen, die in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht wurden, wie z. B. die Adhäsion, durch den HPA-1-Genotyp moduliert werden.

Weiterhin ist unklar, ob die von Feng et al. (1999) und Michelson et al. (2000) beobachtete verstärkte Aktivität der Thrombozyten von gesunden Probanden überhaupt klinische Relevanz hat. Hierfür müsste gezeigt werden, dass Personen, die Träger des

HPA-1b-Allels sind, häufiger Thromben entwickeln, bzw. die verstärkte Thrombozytenaktivierung bei der akuten Thrombenentstehung abhängig vom HPA-1-Genotyp ist. Dies konnten Meiklejohn et al. (2000) jedoch nicht bestätigen.

#### **4.3 Häufigkeit der verschiedenen HPA-1-Genotypen**

Der HPA-1-Genotyp wurde in dieser Arbeit bei allen Blutspendern und Patienten bestimmt. Die Verteilung der Genotypen bei den Blutspendern ist dadurch beeinflusst, dass einige Genotypen in dieser Gruppe schon vorher bekannt waren, während bei den Patienten mit der koronaren Herzkrankheit keine Vorbestimmung der Genotypen durchgeführt wurde.

Das Bekanntsein einiger Genotypen der Blutspender ermöglichte eine Steigerung der homozygoten HPA-1b-Frequenz in der Kontrollgruppe auf 10%. Die Anzahl der Träger des HPA-1b-Allels liegt in der nordeuropäischen Bevölkerung bei etwa 25%, die Anzahl homozygoter HPA-1b-Träger bei etwa 2% (Kim et al., 1995).

#### **4.4 Häufigkeit des HPA-1b-Genotyps bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit, Myokardinfarkt oder zerebrovaskulärer Thrombose**

In der Frage, ob die Frequenz des HPA-1b-Genotyps unter den Patienten mit bestehender koronarer Herzkrankheit, schon erlittenem Myokardinfarkt oder Schlaganfall erhöht ist, ergeben zahlreiche Studien kein einheitliches Ergebnis.

Einige Studien beobachteten dies jedoch. So wurde ein erhöhtes Vorkommen des b-Allels bei Patienten mit instabiler Angina pectoris oder Myokardinfarkt beobachtet (Weiss et al., 1996). Die Häufigkeit des b-Allels war über zweimal größer als bei der Kontrollgruppe ohne Angina pectoris oder Myokardinfarkt. Bei der Patientengruppe mit instabiler Angina pectoris oder Myokardinfarkt vor dem sechzigsten Lebensjahr war die Anzahl der b-Allel-Träger sogar mehr als verdreifacht. Dies spricht für eine enge Assoziation zwischen dem Vorhandensein des b-Allels und dem Auftreten der koronaren Herzkrankheit. Allerdings lag in dieser Studie die Anzahl der untersuchten Patienten bei nur 71 und auch die Kontrollgruppe umfasste nur 68 Personen, was die Aussagekraft dieser Studie limitiert. Weiterhin waren unter den Patienten 18 Prozent zusätzlich an Diabetes mellitus erkrankt, was deutlich über der normalen Häufigkeit der Diabetiker bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit liegt und die Ergebnisse beeinflusst haben könnte, da sich die Thrombozyten der Diabetiker physiologisch von Thrombozyten der Nicht-Diabetiker unterscheiden (Steinhubl et al., 1999).

Um den familiären Risikofaktor für das frühe Entstehen einer koronaren Herzkrankheit zu untersuchen, bestimmte man den HPA-1-Genotyp der Geschwister von Patienten mit Manifestation einer koronaren Herzkrankheit vor dem 60. Lebensjahr. Dies ergab eine signifikant erhöhte Frequenz des HPA-1b-Allels unter den Geschwistern im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne koronare Herzkrankheit. Da andere bekannte Risikofaktoren für die Entstehung einer Thrombose tendenziell in der Risikogruppe erniedrigt waren, spricht dies für einen möglichen Zusammenhang zwischen dem Vorliegen des HPA-1b-Allels und der frühen Manifestation einer koronarer Herzkrankheit (Goldschmidt-Clermont et al., 1999).

Zotz et al. (1998) untersuchten die Häufigkeit des HPA-1b-Allels bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit und aufgetretenem Myokardinfarkt, bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit ohne Myokardinfarkt und bei einer Kontrollgruppe ohne

koronare Herzkrankheit und Myokardinfarkt. Es zeigte sich, dass das HPA-1b-Allel zwar kein Risikofaktor für die Entstehung einer koronaren Herzkrankheit darstellt, jedoch als ein Risikofaktor für die Bildung arterieller Thromben bei bestehender koronarer Herzkrankheit eingeordnet werden kann.

Bei der Beobachtung von 261 Patienten ein Jahr lang nach dem Erhalt eines venösen Bypasses aus der Vena saphena ergab sich unter den Patienten, die später als 30 Tage nach der Operation einen Verschluss des Bypasses, einen Infarkt erlitten oder verstarben, eine signifikant erhöhte Frequenz des HPA-1b-Allels verglichen mit den Patienten ohne postoperative Komplikationen. Diese signifikante Assoziation bedeutet, dass das HPA-1b-Allel einen erblichen Risikofaktor für das Auftreten eines Bypass-Verschlusses, Infarkts und Todesfall nach einer Bypass-Operation darstellt (Zotz et al., 2000).

Es gibt jedoch eine große Anzahl an Studien, die diese These nicht unterstützen und keine erhöhte Frequenz des HPA-1-b-Allels bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit, Myokardinfarkt oder zerebrovaskulären Thromben verglichen mit der normalen Bevölkerung beobachteten. Auch in der hier vorliegenden Studie war die Häufigkeit des HPA-1b-Allels in der Gruppe der Patienten mit koronarer Herzkrankheit nicht erhöht und die Verteilung der HPA-1-Genotypen in der Gruppe der Patienten entsprach der Verteilung in der gesunden nordeuropäischen Bevölkerung.

In einer Studie von Ridker et al. (1997) wurden 14916 anfangs gesunde Männer über einen Zeitraum von 8,6 Jahren beobachtet. In dieser Zeit erlitten 374 Männer ihren ersten Herzinfarkt, 209 einen Schlaganfall und 121 Männer entwickelten eine venöse Thrombose. Bei der Bestimmung der einzelnen HPA-1-Genotypen dieser 704 Patienten und dem Vergleich mit der Häufigkeit der einzelnen HPA-1-Genotypen unter den übrigen, gesund gebliebenen Männern ergab sich kein signifikanter Unterschied in der Frequenz der Genotypen. Dies spricht gegen einen Zusammenhang zwischen dem Vorliegen des HPA-1b-Allels und dem Entstehen eines Myokardinfarktes, Schlaganfalls oder einer venösen Thrombose.

Corral et al. (1997) konnten einen Zusammenhang in dieser Form ebenfalls nicht bestätigen. Sie beobachteten keine Verbindung zwischen dem Vorhandensein des HPA-1b-Allels weder mit dem Auftreten einer koronaren Herzerkrankung, noch mit der Entstehung zerebrovaskulärer Thromben. Die Frequenz des HPA-1b-Allels war in keiner der beiden Patientengruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht. Weiterhin registrierten sie in ihrer Kontrollgruppe eine ähnlich wie in ihrer holländischen Bevölkerung vorkommende hohe Frequenz an HPA-1b-Allel-Trägern von etwa 30 Prozent. Nach den Ergebnissen von Weiss et al. (1996) müsste demnach auch die Häufigkeit der Myokardinfarkte entsprechend erhöht sein. Dies war jedoch nicht der Fall.

Auch Sperr et al. (1998) konnten die Ergebnisse von Weiss et al. (1996) nicht unterstützen. Sie registrierten kein gehäuftes Vorkommen des HPA-1b-Allels bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit. Es gab keinen signifikanten Unterschied in der Häufigkeit des HPA-1b-Allels zwischen der Kontrollgruppe und den Patienten mit koronarer Herzkrankheit. Tendenziell war sogar das Vorkommen des HPA-1a-Allels in der Patientengruppe erhöht, allerdings nicht signifikant. Auch bei jungen Patienten mit früher Manifestation der koronaren Herzkrankheit, bei denen genetische Faktoren wie Polymorphismen möglicherweise eine größere Rolle spielen als bei älteren Patienten,

bei denen Ernährung und Lebensgewohnheiten einen immer wachsenden Einfluss nehmen, konnten sie keine signifikanten Unterschiede im Vorkommen der HPA-1-Allele feststellen. Dies spricht gegen einen Einfluss des HPA-1-Polymorphismus auf die Entstehung einer koronaren Herzkrankheit.

Carlsson et al. (1997) beobachteten ebenso keine signifikant erhöhte Anwesenheit des HPA-1b-Allels bei Patienten mit zerebrovaskulären Erkrankungen. Sie sehen das HPA-1b-Allel ebenfalls nicht als einen Risikofaktor für die Entstehung arterieller Verschlüsse.

Diese Ergebnisse stimmen mit denen von Marian et al. (1996) überein. Auch sie konnten bei 180 Patienten mit nachgewiesener koronarer Herzkrankheit keine erhöhte Frequenz des HPA-1b-Genotypes feststellen.

Auch Carter et al. (1996) fanden bei 101 Patienten mit aufgetretenem Myokardinfarkt vor dem 60. Lebensjahr kein häufigeres Auftreten des HPA-1b-Allels als in der gesunden Kontrollgruppe.

Eine weitere Studie (Mamotte et al., 1998) untersuchte 589 Patienten im Alter unter 50 Jahren mit symptomatischer koronarer Herzkrankheit und 207 Patienten sechs Monate nach Ballondilatation im Vergleich zu einer Kontrollgruppe von 570 Personen ohne bekannte koronare Herzkrankheit hinsichtlich der Frequenz des HPA-1b-Allels. Auch hier ergaben sich keine signifikanten Unterschiede im Auftreten dieses Allels zwischen den einzelnen Gruppen. Auch das Auftreten von Restenosen nach der Balondilatation war unabhängig vom vorliegenden HPA-1-Genotyp der Patienten. Diese Ergebnisse geben ebenfalls keinen Grund, eine direkte Verbindung zwischen dem Vorhandensein des HPA-1b-Allels und dem Auftreten arterieller Thromben zu sehen.

Böttiger et al. (2000) untersuchten eine Gruppe von 998 Patienten mit einer koronaren Herzerkrankung ohne Symptomatik und 793 Patienten mit akutem oder vorausgegangenem Herzinfarkt in Bezug auf die Häufigkeit der HPA-1-Allele. Als Vergleichsgruppen dienten 340 Patienten ohne koronare Herzerkrankung oder Infarkt und 104 gesunde Blutspender. Auch sie konnten keine signifikanten Unterschiede in der Frequenz der HPA-1-Allele feststellen und somit keine Assoziation des HPA-1-Polymorphismus mit einem erhöhten Risiko weder für Koronarsklerose noch für das Auftreten eines Herzinfarktes bestätigen. Auch weiterführende Untersuchungen von ihnen erstens zwischen den Patienten mit akutem und denen mit älterem Herzinfarkt und zweitens zwischen den Patienten mit einer und denen mit mehreren Koronargefäßsklerosen ergaben keine Abweichungen in dem Vorliegen der HPA-1b-Allele.

#### **4.5 Hemmung der Thrombozytenaggregation durch GPIIb/IIIa-Inhibitoren**

*In vivo*-Studien an tierischen Modellen der arteriellen Thrombose, die sich über mehr als zehn Jahre erstreckten, haben Hinweise dafür geliefert, dass die Blockade des GPIIb/IIIa-Rezeptors erstens die Tiere nach einer Gefäßverletzung vor einer akuten Thrombose schützte, zweitens die Lyse eines entstandenen Thrombus in Kombination mit einem lysierenden Medikament und Heparin beschleunigte, selbst wenn dessen Dosis um 75 % reduziert war und auch bei plättchenreichen Thromben wirkte, die normalerweise resistent gegen Fibrinolyse sind (Coller, 1997). Weiterhin verhindert

diese Blockierung den Wiederverschluss der Gefäße nach der Reperfusion mit thrombolytischen Medikamenten (Coller, 1992).

Fünf große, mit Placebo kontrollierte Studien ergeben das heutige Wissen über den Nutzen von Abciximab, Eptifibatid und Tirofiban bei koronaren Eingriffen. Diese sind EPIC (Evaluation of 7E3 for the Prevention of Ischemic Complications) (1994), EPILOG (Evaluation in PTCA to Improve Long-term Outcome with Abciximab GPIIb/IIIa blockade) (1997), CAPTURE (Chimeric 7E3 AntiPlateleT in Unstable angina REfractory to standart treatment) (1997), IMPACT II (Integrin to Minimize Platelet Aggregation and Coronary Thrombosis II, Eptifibatid) (1997) und RESTORE (Randomized Efficacy Study of Tirofiban for Outcomes and REstenosis) (1997). In allen Studien wurden die Medikamente vor den koronaren Eingriffen zugeführt. Gemessen am Auftreten von Myokardinfarkt oder Todesfall innerhalb von dreißig Tagen nach dem Eingriff ergab sich eine relative Risikoreduktion in Vergleich zur Placebogabe bei EPIC von 30 %, bei EPILOG von 56 %, bei CAPTURE von 29 %, bei IMPACT II von 22 % und 24 % bei RESTORE.

#### **4.6 Einfluss des HPA-1-Polymorphismus auf die Wirksamkeit der GPIIb/IIIa-Inhibitoren**

Trotz der nachgewiesenen Wirksamkeit der GPIIb/IIIa-Inhibitoren ist es möglich, dass bestimmte Patienten oder Untergruppen von Patienten von der Behandlung mit den GPIIb/IIIa-Inhibitoren weniger profitieren als andere. Die Ursache hierfür könnten Unterschiede in der Plättchenstruktur und ihrer Funktion sein, welche möglicherweise die Wirkung der GPIIb/IIIa-Inhibitoren beeinflussen.

In der Frage, ob der HPA-1-Polymorphismus Einfluss auf die Wirkung der GPIIb/IIIa-Inhibitoren hat, liegen unterschiedliche Studienergebnisse vor und es besteht noch keine einheitliche Erklärung, wodurch diese unterschiedlichen Ergebnisse hervorgerufen werden.

In dieser Arbeit zeigte sich kein Einfluss des HPA-1-Polymorphismus auf die Hemmung der ADP-induzierten Fibrinogenbindung der Thrombozyten durch Abciximab, Eptifibatid und Tirofiban. Es bestand zwar eine große Variabilität in den Wirkungen der GPIIb/IIIa-Inhibitoren, signifikante Unterschiede zwischen den drei Genotypen in der Ansprechbarkeit auf die Inhibitoren gab es jedoch weder bei den gesunden Blutspendern noch bei den Patienten mit koronarer Herzkrankheit.

Benett et al. (2001) überprüften die Auswirkungen des HPA-1b-Allels auf die Inhibition der Fibrinogenbindung von ADP-aktivierten Thrombozyten durch das Tetrapeptid RGDS, welches die Fibrinogenbindung kompetitiv verhindert. Auch bei Ihnen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in der Hemmbarkeit zwischen homozygoten HPA-1a-Genotypen und Trägern eines HPA-1b-Allels.

Michelson et al. (2000) untersuchten die Thrombozytenfunktion und ihre Hemmbarkeit von 56 gesunden Blutspendern. 20 Blutspender waren homozygote Träger des HPA-1a-Allels, 20 waren heterozygote Träger eines HPA-1b-Allels und 16 waren homozygote Träger des HPA-1-b-Allels. Sie beobachteten bei Trägern des HPA-1b-Allels eine verstärkte Fibrinogenbindung und eine verstärkte Oberflächenexpression des GPIIb/IIIa-Rezeptor nach Stimulation mit ADP. Diese verstärkte

Oberflächenexpression könnte der Grund für die von Ihnen beobachtete gesteigerte Ansprechbarkeit heterozygoter Träger des HPA-1b-Allels auf Abciximab im Vergleich mit homozygoten HPA-1a- und HPA-1b-Trägern.

Es lässt sich allerdings nur schwer nachvollziehen, weshalb es bei heterozygoten Trägern eines Allels zu Auswirkungen auf die Effekte von Abciximab kommen soll, nicht aber bei homozygoten Trägern dieses Allels.

Wheeler et al. (2002) sehen den klinischen Nutzen von Abciximab für heterozygote Träger des HPA-1b-Allels verringert, zumal in ihren Messungen die Plättchenaggregation bei dieser Patientengruppe nicht vollständig durch Abciximab gehemmt werden konnte. Ursache hierfür könnte ein größerer innerer Speicher an GPIIb/IIIa-Rezeptoren bei diesen Patienten sein, der durch starke Agonisten wie TRAP freigesetzt wurde, aber schon vorher Fibrinogen gebunden hatte und so für Abciximab nicht empfänglich war. Ebenso könnte es sein, dass der GPIIb/IIIa-Rezeptor vom heterozygoten HPA-1b-Genotyp eine niedrige Affinität zu Abciximab hat.

Die Diskrepanz zu diesen Untersuchungen hängt möglicherweise mit dem verwendeten Agonisten zusammen. So waren auch bei Wheeler et al. (2002) die Unterschiede zwischen den heterozygoten HPA-1b-Trägern und den homozygoten HPA-1a-Trägern unter Verwendung eines starken Aktivators wie TRAP stärker ausgeprägt als bei Zugabe eines schwachen Agonisten wie ADP, der in dieser Arbeit verwendet wurde.

Ein weiterer Grund für die von dieser Studie abweichenden Ergebnisse könnten die künstlich niedrig gehaltenen Kalziumkonzentrationen sein, die Michelson et al. (2000) und Wheeler et al. (2002) verwendet haben. Da die Kalziumbindungsstellen unmittelbar neben der Ligandenbindungsstelle liegen und die Bindung von bivalenten Kationen essentiell für die Ligandenbindung ist (Phillips et Scarborough, 1997), könnten niedrig gehaltene Kalziumspiegel das Bindungsverhalten des Rezeptors sowohl in Bezug auf Fibrinogen als auch in Bezug auf die Antiintegrine beeinflussen.

#### **4.7 Kritik der Methoden**

Als Agonist wurde in dieser Arbeit ADP verwendet. Das Ausmaß der Aktivierung korreliert jedoch sehr eng mit der Stärke des Agonisten. Verantwortlich hierfür sind unter anderem die GPIIb/IIIa-Rezeptoren, die nicht auf der Oberfläche ruhender Thrombozyten liegen, sondern sich in inneren Speichern befinden und möglicherweise erst nach starker Aktivierung der Thrombozyten, z.B. durch TRAP, an die Oberfläche gelangen. Es gibt Hinweise, dass diese in ihren Speichern mit Fibrinogen besetzt sind und daher durch die Antiintegrine nicht vollständig blockiert werden können (Nurden et al., 1996). Dies könnte die Wirkung der Antiintegrine beeinflussen, da sie bei ihrer Freisetzung durch einen starken Agonisten eine Thrombozytenaggregation trotz vorheriger Gabe von Antiintegrinen ermöglichen. So beobachteten Gawaz et al. (2000) eine fast vollständige Hemmung der Thrombozytenaggregation durch Abciximab bei ADP-aktivierten Thrombozyten, bei TRAP-aktivierten Thrombozyten hingegen eine nur teilweise blockierte Aggregation.

Auch Weber et Schrör (2001) beobachteten eine vollständige Hemmung der ADP-induzierten Fibrinogenbindung bei einer Abciximab-Konzentration von 10 µg/ml. Bei der gleichen Konzentration ließ sich die TRAP-induzierte Fibrinogenbindung nur um etwa 50 % hemmen. Die Erklärung hierfür liegt möglicherweise in den von ihnen beobachteten Unterschieden in der Kinetik der Fibrinogenbindung. Die ADP-induzierte

Fibrinogenbindung ist langsamer als die Bindung von Abciximab an den GPIIb/IIIa-Rezeptor, so dass Abciximab die Rezeptoren blockieren kann, bevor sie Fibrinogen binden. Die TRAP-induzierte Fibrinogenbindung läuft hingegen etwa genauso schnell ab, so dass noch Fibrinogen gebunden werden kann, bevor die Rezeptoren durch Abciximab blockiert sind.

Es ist möglich, dass zwischen den hier untersuchten Thrombozyten der drei Genotypen des HPA-1-Polymorphismus Unterschiede in der Kinetik der Fibrinogenbindung und vielleicht auch in der Ansprechbarkeit auf die Antiintegrine vorliegen, die sich erst bei der Aktivierung mit einem starken Agonisten wie beispielsweise TRAP zeigen. Diese Untersuchung, in der ADP als Agonist verwendet wurde, liefert jedoch keine Hinweise auf derartige Unterschiede zwischen den Thrombozyten der drei Genotypen.

Die Anzahl der in dieser Arbeit untersuchten Personen beträgt 239. Dennoch liegt die Anzahl der homozygoten HPA-1b-Genotypen nur bei 10. Dies liegt an dem seltenen Vorkommen dieses Genotypen von etwa 2 % in der nordeuropäischen Bevölkerung (Kim et al., 1995). Nur durch das Bekanntsein einiger Genotypen der Blutspender war es überhaupt möglich, im Rahmen dieser Studie 10 Personen mit diesem Genotyp zu untersuchen. Um wirklich aussagekräftige Studien über den homozygoten HPA-1b-Genotypen zu machen, wäre die Untersuchung von wesentlich höheren Fallzahlen notwendig, was allerdings den Rahmen dieser Arbeit sprengen würde.

#### **4.8 Schlussfolgerungen**

In der hier vorliegenden Untersuchung ließ sich die Fibrinogenbindung sowohl der Thrombozyten der gesunden Blutspender als auch der Thrombozyten der Patienten mit koronarer Herzkrankheit unabhängig von dem HPA-1-Genotyp konzentrationsabhängig durch die GPIIb/IIIa-Inhibitoren hemmen. Dies war bei Abciximab, Eptifibatid und Tirofiban der Fall. Es bestand zwar eine ausgeprägte Variabilität in der Ansprechbarkeit der Thrombozyten der einzelnen HPA-1-Genotypen auf die GPIIb/IIIa-Inhibitoren; ein signifikanter Unterschied zeigte sich jedoch weder bei den gesunden Blutspendern, noch bei den Patienten mit koronarer Herzkrankheit.

Folglich liefern diese Untersuchungen keinen Hinweis dafür, dass der HPA-1-Polymorphismus die Wirkungen von Glykoprotein IIb/IIIa-Inhibitoren beeinflusst.

Obwohl dies momentan die größte Studie darstellt, die angelegt wurde, um herauszufinden, ob der HPA-1-Polymorphismus einen Einfluss auf die Wirkung der GPIIb/IIIa-Inhibitoren hat, ist die Anzahl der Probanden und Patienten nicht groß genug, um mögliche Effekte anderer Erkrankungen oder Medikamente auf die Hemmung der GPIIb/IIIa-Inhibitoren endgültig auszuschließen.

## **5 Zusammenfassung**

In der Frage, ob der HPA-1-Polymorphismus die Wirkungen der GPIIb/IIIa-Inhibitoren beeinflusst, besteht momentan eine große Diskrepanz zwischen den Ergebnissen vieler Studien. Während einige Studien keinen Zusammenhang zwischen den Effekten der GPIIb/IIIa-Inhibitoren und dem vorliegenden HPA-1-Genotyp beobachteten, berichteten andere Untersuchungen von unterschiedlicher Ansprechbarkeit der Thrombozyten. Weitere Studien berichteten auch von einem gehäuften Vorkommen eines HPA-1-Genotyps in Patientenkollektiven mit thrombotischen Ereignissen, was entweder darauf zurückzuführen ist, dass die Thrombozyten von Personen eines HPA-1-Genotyps reaktiver sind als die eines anderen Genotyps oder, dass diese Thrombozyten schlechter auf die inhibitorischen Wirkungen der GPIIb/IIIa-Inhibitoren ansprechen.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Hemmbarkeit der ADP-induzierten Fibrinogenbindung an Thrombozyten von gesunden Blutspendern und von Patienten mit koronarer Herzkrankheit durch die GPIIb/IIIa-Inhibitoren Abciximab, Eptifibatid und Tirofiban mittels der Durchflusszytometrie gemessen und mit dem HPA-1-Genotyp korreliert.

Es wird gezeigt, dass zwar eine große Variabilität in der Effektivität der drei Substanzen besteht, es jedoch keinen signifikanten Unterschied in der Ansprechbarkeit der Thrombozyten der einzelnen Genotypen gibt. Auch die Frequenz des HPA-1b-Allels war in der Gruppe der Patienten mit koronarer Herzkrankheit nicht erhöht und entsprach der Verteilung in der gesunden nordeuropäischen Bevölkerung. Weiterhin wird gezeigt, dass der HPA-1-Genotyp weder die nichtaktivierte Fibrinogenbindung noch die ADP-induzierte Fibrinogenbindung der Blutspender und der Patienten mit koronarer Herzkrankheit beeinflusst.

Obwohl diese Studie bislang die größte Studie ist, die den Einfluss des HPA-1-Polymorphismus auf die Effekte der GPIIb/IIIa-Inhibitoren untersucht hat, ist die Anzahl der Probanden und Patienten nicht groß genug, um mögliche Einwirkungen von anderen Krankheiten oder Medikamenten auf die Ansprechbarkeit der GPIIb/IIIa-Inhibitoren auszuschließen.



## 6 Literatur

1. Andrews RK, Lopez JA, Berndt MC. Molecular mechanisms of platelet adhesion and activation. *Int J Biochem Cell Biol* 1997; 29:91-105.
2. Balter M: AIDS now world`s fourth biggest killer. *Science* 1999; 284:1101.
3. Beer J, Pederiva S, Pontiggia L. Genetics of platelet receptor single-nucleotide polymorphisms: clinical implications in thrombosis. *Ann Med* 2000; 32:10-14.
4. Bennett JS. Structural biology of glycoprotein IIb-IIIa. *Trends Cardiovasc Med* 1996; 6:31-36.
5. Bennett JS, Catella-Lawson F, Rut A, Vilaire G, Qi W, Kapoor S, Murphy S, Fitzgerald G. Effect of the PI<sup>A2</sup> alloantigen on the function of  $\beta$ 3- integrin in platelets. *Blood* 2001; 97:3093-3099.
6. Bennett JS, Vilaire G, Catella-Lawson F, Rut AR, Fitzgerald G. The PI<sup>A2</sup> alloantigen does not alter the affinity of GPIIb-IIIa for fibrinogen or RGD-containing peptides. *Blood* 1997; 90:154a (Abstract).
7. Bihour C, Durrieu-Jais C, Macchi L, Poujol C, Coste P, Bess P, Nurde P, Nurden A. Expression of markers of platelet activation and the interpatient variation in response to Abciximab. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19:212-219.
8. Bosman FT. Integrins: Cell adhesives and modulators of cell function. *Histochem J* 1993; 25:469-477.
9. Böttiger C, Kastrati A, Koch W, Mehilli J, Seidl H, Schömig K, von Beckerath N, Schömig A. HPA-1 and HPA-3 polymorphisms of the platelet fibrinogen receptor and coronary artery disease and myocardial infarction. *Thromb Haemost* 2000, 83:559-562.
10. Bray P. Integrin polymorphisms as risk factors for thrombosis. *Thromb Haemost* 1999; 82:337-344.
11. Bray P. Platelet glycoprotein polymorphisms as risk factors for thrombosis. *Curr Opinion Hematol* 2000; 7:284-289.
12. Calvete JJ. Clues for understanding the structure and function of a prototypic human integrin. *Thromb Haemost* 1994; 72:1-15.
13. Carlsson L, Greinacher A, Spitzer C, Walther R, Kessler C. Polymorphisms of the human platelet antigens HPA-1, HPA-2, HPA-3, and HPA-5 on the platelet receptors for fibrinogen (GPIIb/IIIa), von Willebrand Factor (GPIb/IX), and collagen (GPIa/IIa) are not correlated with an increased risk for stroke. *Stroke* 1997; 28:1392-1392.
14. Carter AM, Ossei-Gerning N, Grant PJ. Platelet glycoprotein IIIa PI<sup>a</sup> polymorphism and myocardial infarction. *N Eng J Med* 1996; 335:1072-1073.
15. Coller BS. Inhibitors of the platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor as conjunctive therapy for coronary artery thrombolysis. *Coron Artery Dis* 1992; 3:1016-1029.
16. Coller BS, Peerschke EI, Scudder LE, Sullivan CA. A murine monoclonale antibody that completely blocks the binding of fibrinogen to platelets produces a thrombasthenic-like state in normal platelets and binds to glycoprotein IIb and/or IIIa. *J Clin Invest* 1983; 72:325-338.

17. Collier BS, Scudder LE, Beer J, Gold HK, Folts JD, Cavagnaro J, Jordan R, Wagner C, Iulucci J, Knight D, Ghrayeb J, Smith C, Weisman HF, Berger H. Monoclonal antibodies to platelet glycoprotein IIb/IIIa as antithrombotic agents. *Ann NY Acad Sci* 1991; 614:193-213.
18. Corral J, Gonzalez-Conejero, Rivera J, Iniesta JA, Lozano ML, Vicente V. HPA-1 genotype in arterial thrombosis-role of HPA-1b polymorphism in platelet function. *Blood Coagul Fibrinol* 1997; 8:284-290.
19. Dedhar S, Hannigan GE. Integrin cytoplasmic interactions and bidirectional transmembrane signalling. *Curr Opin Cell* 1996; 8:657-669.
20. Duperray A, Troesch A, Berthier R, Chagnon E, Frachet P, Uzan G, Marguerie G. Biosynthesis and assembly of platelet GPIIb-IIIa in human megakaryocytes. *Blood* 1989; 74:1603-1611.
21. Egbertson MS, Chang CT-C, Duggan ME. Non-peptide fibrinogen receptor antagonists II. *J Med Chem* 1994; 37:2537-2551.
22. Farrell DH, Thiagarajan P, Chung DW, Dawie EW. Role of fibrinogen alpha and gamma chain sites in platelet aggregation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89:10729-10732.
23. Faulds D, Sorkin EM. Abciximab (c7E3 Fab): a review of its pharmacology and therapeutic potential in ischaemic heart disease. *Drugs* 1994; 48:583-598.
24. Feng D, Lindpaintner K, Larson M, Rao V, O'Donnell C, Lipinska I, Schmtz C, Sutherland P, Silbershatz H, D'Agostino R, Muller J, Myers R, Levy D, Tofler G. Increased platelet aggregability associated with platelet GPIIIa PI<sup>A2</sup> polymorphism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19:1142-1147.
25. Garcia-Ribes M, Gonzalez-Lamuno D, Hernandez-Estefania R, Colman T, Pocovi M, Delgado-Rodrigues M, Garcia-Fuentes M, Revuelta JM. Polymorphism of the platelet glycoprotein IIIa gene in patients with coronary stenosis. *Thromb Haemost* 1998; 79:1126-1129.
26. Gawaz M, Ruf A, Pogatsa-Murray G, Dickfeld T, Rüdiger S, Taubitz W, Fischer J, Müller I, Meier D, 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* 2000; 83:915-923.
27. Goa KL, Noble S. Eptifibatide. A review of its use with acute coronary syndromes and/or undergoing percutaneous coronary intervention. *Drugs* 1999; 57:439-462.
28. Golanski J, Golanski R, Chizynski K, Iwaszkiewicz A, Rozalski M, Wieclawska B, Boncler M, Watala C. Platelet hyperreactivity after coronary artery bypass grafting: the possible relevance to glycoprotein polymorphisms. A preliminary report. *Platelets* 2001; 12:241-247.
29. Goldschmidt-Clermont P, Coleman L, Pham Y, Cooke G, Shear W, Weiss E, Kral B, Moy T, Yook R, Blumenthal R, Becker D, Becker L, Bray P. Higher prevalence of GPIIIa PI<sup>A2</sup> polymorphism in siblings of patients with premature coronary heart disease. *Arch Pathol Lab Med* 1999; 123:1223-1229.

30. Goodall AH, Curzen N, Panesar M, Hurd C, Knight CJ, Ouwehand WH, Fox KM. Increased binding of fibrinogen to glycoprotein IIIa-proline33 (HPA-1b, PI<sup>A2</sup>, Zwb) positive platelets in patients with cardiovascular disease. *Eur Heart J* 1999; 20:742-747.
31. Hermann A, Rauch BH, Braun M, Schrör K, Weber A-A. Platelet CD40 ligand (CD40L) - subcellular localization, regulation of expression, and inhibition by clopidogrel. *Platelets* 2001; 12:74-82.
32. Hynes RO. Integrins: A family of cell surface receptors. *Cell* 1987; 48:549-554.
33. Hynes RO. Integrins: versatility, modulation, and signalling in cell adhesion. *Cell* 1992; 69:11-25.
34. Ingber DE. Tensegrity: The architectural basis of cellular mechanotransduction. *Annu Rev Physiol* 1997; 59:575-599.
35. Jordan RE, Knight DM, Wagner C, McAleer M, McDonough M, Mattis J et al. A dramatic reduction of the immunogenicity of the anti-GPIIb/IIIa monoclonal antibody, 7E3 Fab, by humanization of the murine constant domains. *Circulation* 1992; 86:411 (Abstract).
36. Kastrati A, Schomig A, Seyfarth M, Koch W, Elezi S, Böttiger C, Mehili J, Schomig K, von Beckerath N. PI<sup>A</sup> polymorphism of platelet glycoprotein IIIa and risk of restenosis after coronary stent placement. *Circulation* 1999; 99:1005-1010.
37. Kieffer N, Phillips DR. Platelet membrane glycoproteins: functions in cellular interactions. *Ann Rev Cell Biol* 1990; 6:329-357.
38. Kim HO, Jin Y, Kickler TS, Blakemore K, Kwon OH, Bray PF. Gene frequencies of the five major human platelet antigens in African, American, white, and Korean populations. *Transfusion* 1995; 35:863-867.
39. Kleiman NS, Raizner AE, Jordan R, Wang AL, Norton D, Mace KF, Joshi A, Coller BS, Weisman HF. Differential inhibition of platelet aggregation induced by adenine diphosphate or thrombin receptor-activating peptide in patients for inhibition of the internal pool of GPIIb/IIIa receptors. *Am J Cardiol* 1995; 26:1665-1671.
40. Krzywanek HJ. Klinische Bedeutung der Thrombozytenfunktionsdiagnostik Gustav Fischer 1997, Stuttgart.
41. Lasne D, Krenn M, Pingault V, Arnaud E, Fiessinger JN, Aiach M, Rendu F. Interdonor variability of platelet response to thrombin receptor activation: influence of PI<sup>A2</sup> polymorphism. *Br J Haematol* 1997; 99:801-807.
42. Lefkovitz J, Plow EF, Topol EJ. Platelet glycoprotein IIb-IIIa receptors in cardiovascular medicine. *N Engl J Med* 1995; 332:1553-1559.
43. Mamotte C, van Bockxmeer F, Taylor R. PIa1/a2 polymorphism of glycoprotein IIIa and risk of coronary artery disease and restenosis following coronary angioplasty. *Am J Cardiol* 1998; 82:13-16.
44. Marian AJ, Brugada R, Kleiman NS. Platelet glycoprotein IIIa PI<sup>a</sup> polymorphism and myocardial infarction. *N Engl J Med* 1996; 335:1071-1072.

45. Meiklejohn DJ, Urbaniak SJ, Greaves M. Platelet glycoprotein IIIa polymorphism HPA 1b (PI<sup>A2</sup>): no association with platelet fibrinogen binding. *Br J Haematol* 1999; 105:664-666.
46. Meiklejohn DJ, Vickers M, Morrison E, Dijkhuisen R, Moore I, Urbaniak S, Greaves M. *In vivo* platelet activation in atherothrombotic stroke is not determined by polymorphisms of human platelet glycoprotein IIIa or Ib. *Br J Haematol* 2000; 112:621-631.
47. Michelson A, Furman M, Goldschmidt-Clermont P, Mascelli M, Hendrix C, Coleman L, Hamlington J, Barnard M, Kickler T, Christie D, Kundu S, Bray P. Platelet GPIIIa PI<sup>A</sup> polymorphisms display different sensitivities to agonists. *Circulation* 2000; 101:1013-1018.
48. Morgenstern E, Ruf A, Patscheke H. Transport of anti-glycoprotein IIb/IIIa-antibodies into the alpha-granules of unstimulated human blood platelets. *Thromb Haemost* 1992; 67:121-125.
49. Newman PJ, Derbes RS, Aster RH. The human platelet alloantigens, PI<sup>A1</sup> and PI<sup>A2</sup>, are associated with a leucine33/proline33 amino acid polymorphism in membrane glycoprotein IIIa, and are distinguishable by DNA typing. *J Clin Invest* 1989; 83:1778-1781.
50. Nurden AT. Polymorphisms of Human Platelet Membrane Glycoprotein: Structure and Clinical Significance. *Thromb Haemost* 1995; 74:345-351
51. Nurden P, Humbert M, Piotrowicz RS, Bihour C, Poujol C, Nurden AT, Kunicki TJ. Distribution of ligand-occupied alpha IIb beta 3 in resting and activated human platelets determined by expression of a novel class of ligand-induced binding site recognized by monoclonal antibody AP6. *Blood* 1996; 88:887-899.
52. Phillips DR, Charo IF, Parise LV, Fitzgerald LA. The platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa complex. *Blood* 1988; 71:831-843.
53. Phillips DR, Scarborough RM. Clinical pharmacology of eptifibatide. *Am J Cardiol* 1997; 80:11B-20B.
54. Plow EF, Ginsberg MH. GPIIb/IIIa as a prototypic adhesion receptor. *Prog Haemost Thromb* 1989; 9:117-156.
55. Ridker PM, Hennekens CH, Schmitz C, Stampfer MJ, Lindpaintner K. PI<sup>A1/A2</sup> polymorphism of platelet glycoprotein IIIa and risks of myocardial infarction, stroke and venous thrombosis. *Lancet* 1997; 349:385-388.
56. Shattil SJ, Ginsberg MH. Integrin signaling in vascular biology. *J Clin Invest* 1997; 100:91-95.
57. Sperr W, Huber K, Roden M, Janisiw M, Lang T, Graf S, Maurer G, Mayr W, Panzer S. Inherited platelet glycoprotein polymorphism and a risk for coronary heart disease in young central Europeans. *Thromb Res* 1998; 90:117-123.
58. Steinhubl S, Kottke-Marchant K, Moliterno D, Rosenthal M, Godfrey N, Collier B, Topol E, Lincoff M. Attainment and maintenance of platelet inhibition through standard dosing of Abciximab in diabetic and nondiabetic patients undergoing percutaneous coronary intervention. *Circulation* 1999; 100:1977-1982.

59. The CAPTURE Investigators. Randomised placebo-controlled trial of abciximab before and during coronary intervention in refractory unstable angina. *Lancet* 1997; 349:1429-1435.
60. The EPIC Investigators. Use of a monoclonal antibody directed against the platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor in high-risk coronary angioplasty. *N Engl J Med* 1994; 330:956-961.
61. The EPILOG Investigators. Platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor blockade and low-dose heparin during percutaneous coronary revascularization. *N Engl J Med* 1997; 336:1689-1696.
62. The EPISTENT Investigators. Randomised placebo-controlled and ballon-angioplasty-controlled trial to assess safety of coronary stenting with use of platelet glycoprotein-IIb/IIIa blockade. *Lancet* 1998; 352:87-92.
63. The IMPACT II Investigators. Randomised placebo-controlled trial of effect of eptifibatid on complications of percutaneous coronary intervention. *Lancet* 1997; 349:1422-1428.
64. The PRISM Study Investigators. A comparison of aspirin plus tirofiban with aspirin plus heparin for unstable angina. *N Engl J Med* 1998; 338:1498-1505.
65. The 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.
66. The PURSUIT Investigators. Inhibition of the platelet glycoprotein IIb/IIIa with eptifibatid in patients with acute coronary syndromes without persistent ST-segment elevation. *N Engl J Med* 1998; 339:436-443.
67. 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* 1997; 96:1445-1453.
68. Theodoropoulos I, Christopoulos C, Metcalfe P, Dimitriadou E, Economopoulos P, Loucopoulos D. The effect of human platelet alloantigen polymorphisms on the *in vitro* responsiveness to adrenaline and collagen. *Br J Haematol* 2001; 114:387-393.
69. Vijayan K, Goldschmidt-Clermont P, Roos C, Bray P. The PI<sup>A2</sup> polymorphism of integrin  $\beta_3$  enhances outside-in signaling and adhesive functions. *J Clin Invest* 2000; 105:793-802.
70. Wagner CL, Mascelli MA, Neblock DS, Weisman HF, Coller BS, Jordan RE. Analysis of GPIIb/IIIa receptor number by quantification of 7E3 binding to human platelets. *Blood* 1996; 88:9907-9914.
71. 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* 2001; 98:1619-1621.
72. Weber S, Hummel SA, Weber AA, Zirwes RF, Weiner OH, Reuber BE. Genotyping of human platelet antigen-1 (HPA-1) by GALIOS and automated fluorescence correlation spectroscopy (FCS). *Br J Haematol* 2002; 116:839-843.

73. Weiss E, Bray P, Tayback M, Schulman S, Kickler T, Becker L, Weiss J, Gerstenblith G, Goldschmidt-Clermont P. A polymorphism of a platelet glycoprotein receptor as an inherited riskfactor for coronary thrombosis. *N Engl J Med* 1996; 334:1090-1094.
74. Wencel-Drake JD, Plow EF, Kunicki TJ, Woods VL, Keller DM, Ginsberg MH. Localization of internal pools of membrane glycoproteins involved in platelet adhesive response. *Am J Pathol* 1986; 124:324-334.
75. Wheeler G, Braden G, Bray P, Maiciniak S, Mascelli M, Sane D. Reduced inhibition by abciximab in platelets with PI<sup>A2</sup> polymorphism. *Am Heart J* 2002; 143:76-82.
76. Woods VL, Wolff LE, Keller DM. Resting platelets contain a substantialcentrally located pool of glycoprotein IIb-IIIa complex which may be accessible to some but not other extracellular proteins. *J Biol Chem* 1986; 261:15242-15251.
77. Wu AHB, Tsongalis GJ. Correlation of polymorphisms to coagulation and biochemical risk factors for cardiovascular diseases. *Am J Cardiol* 2001; 87:1361-1366.
78. Zotz R, Klein M, Dauben H, Moser C, Gams E, Scharf R. Prospective analysis after coronary-artery bypass grafting: Platelet GPIIIa polymorphism (HPA-1b/PI<sup>A2</sup>) is a risk faktor for bypass occlusion, myocardial infarction, and death. *Thromb Haemost* 2000; 83:404-407.
79. Zotz R, Winkelmann B, Nauck M, Giers G, Maruhn-Debowski B, März W, Scharf R. Polymorphism of platelet membran glycoprotein IIIa: Human platelet antigen 1b (HPA-1b/PI<sup>A2</sup>) is an inherited risk faktor for premature myocardial infarction in coronary artery disease. *Thromb Haemost* 1998; 79:731-735.
80. Zucker ML. Platelet aggregation measured by the photometric method. *Methods Enzymol* 1989; 169:117-133.

## **7 Publikationen im Zusammenhang mit der Arbeit**

### **7.1 Originalarbeiten**

1. Weber A-A, Jacobs C, Meila D, Weber S, Zotz RB, Scharf RE, Kelm M, Strauer BE, Schrör K. No evidence for an influence of the human platelet antigen-1 polymorphism on the antiplatelet effects of glycoprotein IIb/IIIa inhibitors. *Pharmacogenetics* 2002; 12:581-583.
2. Weber A-A, Meila D, Jacobs C, Weber S, Kelm M, Strauer BE, Zotz RB, Scharf RE, Schrör K. Low incidence of paradoxical platelet activation by glycoprotein IIb/IIIa inhibitors. *Thromb Res* 2002; 106:25-29.

### **7.2 Kongressbeiträge**

1. Meila D, Jacobs C, Weber S, Zotz RB, Scharf RE, Kelm M, Strauer BE, Weber A-A, Schrör K. Paradoxical platelet activation by glycoprotein IIb/IIIa inhibitors – A possible role of the human platelet antigen-1 polymorphism? *Ann Hematol* 2002; 81(Suppl.1):218.
2. Jacobs C, Meila D, Weber S, Zotz RB, Scharf RE, Kelm M, Strauer BE, Weber A-A, Schrör K. The human platelet antigen-1 polymorphism does not influence the antiplatelet effects of glycoprotein IIb/IIIa inhibitors. *Ann Hematol* 2002; 81(Suppl.1):138.

## **Danksagung**

Vielen Dank an Herrn Prof. Dr. K. Schrör, den Leiter des Instituts der Pharmakologie und Klinischen Pharmakologie, für die freundliche Aufnahme in das Institut, für die Betreuung und Unterstützung dieser Arbeit.

Ich danke meinem Doktorvater Herrn PD Dr. A.-A. Weber für die Überlassung des Themas, seine freundliche Betreuung und für seine stete und vielseitige Unterstützung und Förderung in dieser Studie, die es mir ermöglichten, die Experimente dieser Arbeit planmäßig zu beenden, die Ergebnisse in der Literatur zu veröffentlichen und auf einem Kongress zu präsentieren.

Vielen Dank an Herrn Prof. Dr. R. E. Scharf und sein Team des Instituts für Hämostaseologie und Transfusionsmedizin und an Herrn Prof. Dr. B. E. Strauer und sein Team der Klinik für Kardiologie, Pneumologie und Angiologie für die sehr gute Zusammenarbeit und Unterstützung meiner Arbeit.

Vielen Dank an Frau Dr. Stephanie Weber für die schnelle Genotypisierung der Probanden.

Ebenfalls bin ich Frau Kerstin Freidel zu Dank verpflichtet, die mir bei vielen Aufgaben im Laboralltag zur Seite stand.

Großer Dank geht auch an Frau Petra Kuger für die hilfreiche Unterstützung am Computer.

Besonderer Dank gilt auch Frau Lohmann und Frau Montag für die sehr gute Hilfe in allen organisatorischen Angelegenheiten.

Auch meinem Kommilitonen und guten Freund Dan Meila, der zeitgleich seine Doktorarbeit in dem Institut durchführte, möchte ich für die schöne Zeit danken, die wir gemeinsam im Labor verbracht haben.

Allen anderen Kollegen aus der Arbeitsgruppe gebührt ebenso ein Dankeschön! Das entspannte Arbeitsklima und die Hilfsbereitschaft von allen Seiten haben meine Zeit im Labor sehr angenehm werden lassen.

Danken möchte ich auch meinen Eltern für ihre liebe Unterstützung, das Korrekturlesen und die Möglichkeit, mein Studium für die Durchführung der Experimente für ein Semester zu unterbrechen.



## **Lebenslauf**

### **Persönliche Daten**

Name: Jacobs, Collin  
Geburtsdatum: 11.12.1978  
Geburtsort: Göttingen  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Familienstand: ledig

### **Schulbildung**

1984-1988 St. Godehardt-Grundschule in Göttingen  
1988-1990 Bonifatius-Orientierungsschule in Göttingen  
1990-1997 Max-Planck-Gymnasium in Göttingen  
1997 Allgemeine Hochschulreife

### **Zivildienst**

1997 – 1998 Zivildienst in der Kardiologie im Krankenhaus Neu-Bethlehem in Göttingen

### **Studium**

10/1998 Aufnahme des Studiums der Humanmedizin an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
08/2000 Ärztliche Vorprüfung  
02-10/2001 Urlaubssemester für den experimentellen Teil der Promotionsarbeit am Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf unter der Leitung von Professor Dr. K. Schrör und der Betreuung von Priv. Doz. Dr. A.-A. Weber  
Thema: "Der "human platelet antigen-1" (HPA-1)-Polymorphismus beeinflusst nicht die Wirkungen von Glykoprotein IIb/IIIa-Inhibitoren"  
04/2002 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
04/2004 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
04-11/2004 Praktisches Jahr an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
12/2004-03/2005 Chirurgisches Tertial im Concord Hospital der University of Sydney  
05/2005 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

# **Der "human platelet antigen-1" (HPA-1)-Polymorphismus beeinflusst nicht die Wirkungen von Glykoprotein IIb/IIIa-Inhibitoren**

vorgelegt von

Collin Jacobs

## **Zusammenfassung**

In der Frage, ob der HPA-1-Polymorphismus die Wirkungen der GPIIb/IIIa-Inhibitoren beeinflusst, besteht momentan eine große Diskrepanz zwischen den Ergebnissen vieler Studien. Während einige Studien keinen Zusammenhang zwischen den Effekten der GPIIb/IIIa-Inhibitoren und dem vorliegenden HPA-1-Genotyp beobachteten, berichteten andere Untersuchungen von unterschiedlicher Ansprechbarkeit der Thrombozyten. Weitere Studien berichteten auch von einem gehäuften Vorkommen eines HPA-1-Genotyps in Patientenkollektiven mit thrombotischen Ereignissen, was entweder darauf zurückzuführen ist, dass die Thrombozyten von Personen eines HPA-1-Genotyps reaktiver sind als die eines anderen Genotyps oder, dass diese Thrombozyten schlechter auf die inhibitorischen Wirkungen der GPIIb/IIIa-Inhibitoren ansprechen.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Hemmbarkeit der ADP-induzierten Fibrinogenbindung an Thrombozyten von gesunden Blutspendern und von Patienten mit koronarer Herzkrankheit durch die GPIIb/IIIa-Inhibitoren Abciximab, Eptifibatid und Tirofiban mittels der Durchflusszytometrie gemessen und mit dem HPA-1-Genotyp korreliert.

Es wird gezeigt, dass zwar eine große Variabilität in der Effektivität der drei Substanzen besteht, es jedoch keinen signifikanten Unterschied in der Ansprechbarkeit der Thrombozyten der einzelnen Genotypen gibt. Auch die Frequenz des HPA-1b-Allels war in der Gruppe der Patienten mit koronarer Herzkrankheit nicht erhöht und entsprach der Verteilung in der gesunden nordeuropäischen Bevölkerung. Weiterhin wird gezeigt, dass der HPA-1-Genotyp weder die nichtaktivierte Fibrinogenbindung noch die ADP-induzierte Fibrinogenbindung der Blutspender und der Patienten mit koronarer Herzkrankheit beeinflusst.

Obwohl diese Studie bislang die größte Studie ist, die den Einfluss des HPA-1-Polymorphismus auf die Effekte der GPIIb/IIIa-Inhibitoren untersucht hat, ist die Anzahl der Probanden und Patienten nicht groß genug, um mögliche Einwirkungen von anderen Krankheiten oder Medikamenten auf die Ansprechbarkeit der GPIIb/IIIa-Inhibitoren auszuschließen