

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

Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Prof. Dr. Karsten Schrör

**Niedrige Prävalenz einer paradoxen Thrombozyten-
aktivierung durch Glykoprotein IIb/IIIa-Inhibitoren**

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der
Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

vorgelegt von

Dan Doru Meila

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

Meinen lieben Eltern in Dankbarkeit gewidmet

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	1
1 Einleitung	2
2 Material und Methoden	10
2.1 Studienplan	10
2.2 Material	10
2.2.1 Teilnehmer	10
2.2.2 Blutentnahme	10
2.2.3 Präparation der Thrombozyten	11
2.2.4 Substanzen und Lösungen	11
2.2.5 Strukturformeln von Tirofiban und Eptifibatid	12
2.3 Methoden	13
2.3.1 Messung der CD62P-Expression mittels Durchflusszytometrie	13
2.3.2 Bestimmung des Human platelet antigen-1 (HPA-1)-Genotyps	14
2.3.3 Statistische Auswertung	15
3 Ergebnisse	16
3.1 Thrombozytenreaktivität bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit	16
3.2 Abhängigkeit der ADP-induzierten CD62P-Expression vom HPA-1 Genotyp	16
3.3 Effekte von GPIIb/IIIa-Inhibitoren auf die thrombozytäre CD62P-Expression in Abhängigkeit vom HPA-1-Genotyp	17
4 Diskussion	20
4.1 Kritik der Methoden	20
4.2 Thrombozytenhyperreaktivität bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit	20
4.3 Thrombozytenhyperreaktivität und HPA-1-Polymorphismus	21
4.4 Paradoxe Thrombozytenaktivierung durch Abciximab	22
4.5 Schlussfolgerung	27
5 Zusammenfassung	28
6 Literatur	30
7 Publikationen im Zusammenhang mit der Arbeit	36
7.1 Originalarbeiten	36
7.2 Kongressbeiträge	36
Danksagung	37
Lebenslauf	38

Abkürzungsverzeichnis

ACD	Acidic citrate dextrose (Biostabil [®])
ACVB	Aortocoronarer Venenbypass
ADP	Adenosindiphosphat
FCS	Fluorescence correlation spectroscopy
GALIOS [®]	Gene amplification and labeling in one system
GPIIb/IIIa	Glykoprotein IIb/IIIa
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N-2-ethansulfonsäure
HPA-1	Human Platelet Antigen-1
kDa	Kilodalton
KGD	Lysin-Glycin-Asparaginsäure
KHK	Koronare Herzkrankheit
Kon	Kontrolle
LIBS	Ligand-induced binding sites (Ligandeninduzierte Bindungsstellen)
MnX	Mittlere Fluoreszenz-Intensität
PCI	Percutaneous coronary intervention (perkutane Koronarintervention)
PCR	Polymerase chain reaction
PRP	Plättchenreiches Plasma
RGD	Arginin-Glycin-Asparaginsäure
SEM	Standard error of the mean (Standardfehler des Mittelwertes)
TRAP	Thrombin receptor activating peptide
vWF	Von Willebrand-Faktor

1 Einleitung

Ischämische kardiovaskuläre Erkrankungen stellen die häufigste Todesursache in industrialisierten Ländern dar. Thrombozyten spielen dabei, insbesondere im Rahmen akuter ischämischer Komplikationen, eine zentrale Rolle (Gawaz, 1999).

Thrombozyten werden in großer Zahl aus ihren Vorläuferzellen, den Megakaryozyten, gebildet. Diese entstehen zunächst im Knochenmark und wandern mit zunehmender Reifung durch die Endothelschranke in die vaskulären Sinus. Dort fragmentieren sie zu Pro-Thrombozyten und setzen schließlich Thrombozyten frei. Die anukleären Thrombozyten zirkulieren dann im Kreislauf für 7-10 Tage, wobei die physiologische Thrombozytenzahl im peripheren Blut ca. 150000 bis 300000 pro μl Blut beträgt.

Thrombozyten spielen eine zentrale Rolle in der Physiologie der Hämostase und bei pathophysiologischen Vorgängen der arteriellen Thrombose. Die Bildung eines Gefäßwandthrombus, welcher zur Blutstillung führt, wird Hämostase genannt. Durch Gefäßwandverletzung, welche eine Freilegung von Subendothel bedeutet, kommt es zunächst zu einer Thrombozytenadhäsion, welche eine Thrombozytenaktivierung zur Folge hat und schließlich zur Thrombozytenaggregation, die eine beginnende Blutung unterbricht und so einen Blutverlust verhindert.

Die Adhäsion wird primär durch die Interaktion des Glykoproteins Ib-IX-V mit von Willebrand-Faktor ausgelöst, der an die subendotheliale Matrix gebunden wird. Über weitere membranständige Adhäsionsrezeptoren, wie Kollagenrezeptoren, erfolgt eine Stabilisierung der Thrombozytenadhäsion. Insbesondere die Bindung des thrombozytären Kollagenrezeptors GP VI an Kollagen führt zur Thrombozytenaktivierung und damit zur Formveränderung („shape change“) der adhärenenten Thrombozyten (Nieswandt et al., 2001).

Die adhärenenten und nun aktivierten Thrombozyten bilden aus freigesetzter Arachidonsäure Thromboxan A_2 , welches einerseits den Aktivierungsvorgang verstärkt, andererseits vasokonstriktorisch wirkt und so durch Verlangsamung des Blutstromes die Thrombusbildung begünstigt. Voraussetzung für eine normal verlaufende Thrombozytenaggregation ist einmal Scherkraft, welche die Kontaktwahrscheinlichkeit zwischen zwei Thrombozyten erhöht, und außerdem Ca^{++} und Fibrinogen. Die stabile Interaktion von noch zirkulierenden Thrombozyten mit schon adhärenenten Thrombozyten erfolgt über aktivierte GPIIb/IIIa-Rezeptoren, welche sich auf ihrer Oberfläche befinden. Hierbei werden die Thrombozyten über Fibrinogenbrücken miteinander verbunden. Der GPIIb/IIIa-Rezeptor ist somit für den finalen und allen Thrombozytenagonisten gemeinsamen Schritt der Aggregation entscheidend (Italiano et al., 1999; Nurden et al., 2000; Nurden & Nurden, 2002).

Zunächst wird auf die Struktur und die Funktion des GPIIb/IIIa-Rezeptors näher eingegangen:

Der GPIIb/IIIa-Rezeptor gehört zu der Familie der Integrine, welche neben Immunglobulinen, Selectinen und Cadherinen die größte Familie der Adhäsionsrezeptoren bilden. Integrine sind transmembranäre heterodimere Glykoproteine mit je einer α - und β -Untereinheit, die abhängig von divalenten Kationen, wie Ca^{++} , sind. Die α - und β -Untereinheiten sind Produkte unterschiedlicher Gene und nichtkovalent miteinander auf der Zelloberfläche zu einer funktionellen Einheit verbunden. Sowohl die α - als auch die β -Kette der Integrine besteht aus einer großen aminoterminalen extrazellulären Domäne, einem kleinen transmembranösen und

einem carboxyterminalen zytoplasmatischen Teil. Die extrazelluläre Domäne enthält eine aktivierungsabhängige Ligandenbindungsstelle für extrazelluläre Matrixproteine, lösliche Matrixmoleküle oder Gegen-Rezeptoren an der Oberfläche benachbarter Zellen (Hynes, 1987; Schrör, 2000). (Abb. 1)

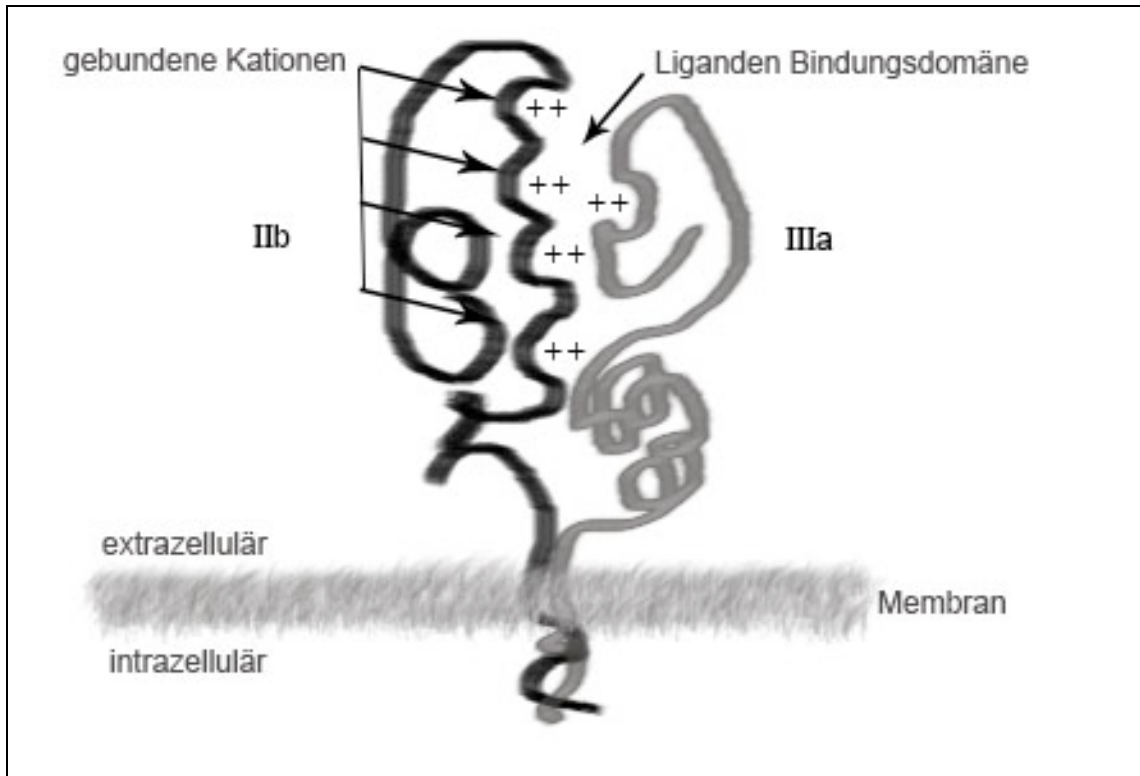


Abb. 1
Struktur des GPIIb/IIIa-Rezeptors.

Der GPIIb/IIIa-Rezeptor ist das mengenmäßig am häufigsten vorkommende Membranglykoprotein der Blutplättchen mit ca. 3% des Gesamtproteingehaltes und ca. 17% des Zellmembranproteingehaltes (Phillips et al., 1988). Ein normaler Thrombozyt besitzt ca. 50000 – 100000 GPIIb/IIIa-Rezeptoren (Wagner et al., 1996). 50-60% der Rezeptoren liegen konstitutiv auf der Oberfläche von ruhenden Thrombozyten exprimiert vor. Der Rest, welcher sich innerhalb der Thrombozyten befindet, kann jedoch nach Thrombozytenaktivierung an die Oberfläche freigesetzt werden (Schrör & Weber, 2003). Der GPIIb/IIIa-Rezeptor besteht aus zwei Untereinheiten, der IIB-Kette und der IIIA-Kette, welche zusammen einen funktionellen Komplex bilden. Die IIIA-Kette ist einzelsträngig und besitzt ein Molekulargewicht von 95 kDa. Die IIB-Kette besteht dagegen aus einer niedermolekularen (GPIIbL, light-chain) Untereinheit 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; Calvete, 1994; Bennett, 1996). Die IIB-Kette, oder auch α -Kette, besitzt vier Ca^{++} -Bindungsstellen, welche sich im gleichen Bereich wie die Ligandenbindungsstelle befinden, jedoch nicht mit dieser identisch sind. Die IIIA-Kette, oder auch β -Kette, enthält vier Wiederholungen einer Cystein-reichen Region. Zudem wird angenommen, dass die Region, die zur

Ligandenbindung beiträgt, in der aminoterminalen Zone, auch eine Bindungsstelle für bivalente Kationen enthält (Schrör, 2000). (Abb. 1)

Ein Polymorphismus in der IIIa-Kette hat in den letzten Jahren großes allgemeines Interesse verursacht und zu kontroversen Diskussionen geführt hinsichtlich seiner Beteiligung als möglicher Risikofaktor bei dem akuten Koronarsyndrom und bei koronaren Stent-Thrombosen (Walter et al., 1997; Weiss et al., 1996). Auf diese Thematik wird später genauer eingegangen.

Die Hauptaufgabe des GPIIb/IIIa-Rezeptors liegt darin lösliches Fibrinogen an die aktivierte Thrombozytenoberfläche zu binden und somit die Thrombozytenaggregation zu initiieren. Außerdem kann der GPIIb/IIIa-Rezeptor zusätzlich mit anderen Adhäsionsproteinen, die sich im Plasma befinden oder im Subendothel vorkommen, wie z.B. Fibronectin, Vitronectin oder von Willebrand-Faktor (vWF), interagieren.

All diese Adhäsionsproteine besitzen in ihrer Primärstruktur die charakteristische Aminosäuresequenz Arginin-Glycin-Asparaginsäure (Arg-Gly-Asp, RGD), welche die Ligandenbindung an den GPIIb/IIIa-Rezeptor vermittelt. Darüber hinaus kann der GPIIb/IIIa-Rezeptor noch die Aminosäuresequenz Lysin-Glutaminsäure-Alanin-Asparaginsäure-Glycin-Valin (Lys-Gln-Ala-Asp-Gly-Val, KQAGDV) im Fibrinogenmolekül binden (Plow & Ginsberg, 1989). Daher sind RGD-haltige Peptide oder RGD-analoge Moleküle sehr geeignet die Bindung der natürlichen Liganden kompetitiv zu hemmen.

Unter physiologischen Verhältnissen zirkulieren Thrombozyten frei in der Blutstrombahn ohne in Kontakt zu der Gefäßwand oder zu anderen Thrombozyten zu geraten. In diesem Zustand tragen die Thrombozyten einen ruhenden nicht aktivierten GPIIb/IIIa-Rezeptor an ihrer Oberfläche. In diesem niedrigaffinen Funktionszustand kann der Rezeptor nur immobilisiertes nicht aber lösliches, plasmatisches Fibrinogen binden. Ein Ausbleiben der Bindung von löslichem Fibrinogen an den GPIIb/IIIa-Rezeptor unter Ruhebedingungen ist essentiell, um beim vorhandenen Überschuss von Fibrinogen im Plasma eine generelle Thrombozytenaggregation und einen thrombotischen Gefäßverschluss zu verhindern.

Nach Gefäßwandverletzungen, wie z.B. bei der Ruptur eines atherosklerotischen Plaques, kommt es zur Freilegung von Subendothel und somit auch von Kollagen, Fibronectin und von Willebrand-Faktor. Diese werden von bestimmten Adhäsionsrezeptoren auf der Oberfläche der Thrombozyten erkannt und es kommt zur Adhäsion der Thrombozyten an die verletzte Gefäßwand. Durch diese Thrombozytenadhäsion und durch die zusätzliche Stimulation löslicher Agonisten wie Thrombin, ADP, Thromboxan A₂ und Kollagen kommt es zunächst zur Thrombozytenaktivierung. Dieser wichtige Schritt der Thrombozytenaggregation führt dann zu einer Konformationsänderung des GPIIb/IIIa-Rezeptors von einem ruhenden, niedrigaffinen zu einem aktivierten, hochaffinen Funktionszustand und somit zu einer Freilegung von Ligandenbindungs-Taschen. Diese ermöglichen schließlich eine Bindung von löslichem Fibrinogen an die Thrombozytenoberfläche. Dieser komplexe Vorgang wird auch als „inside-out-signaling“ beschrieben.

Die Ligandenbindung führt nun zu einer Clusterbildung, das heißt zu einer Bildung von multimeren Rezeptorkomplexen, welche die Fähigkeit des gebundenen Liganden für Interaktionen über Oberflächenkontakte erhöht. Außerdem kommt es jetzt zu einer Tyrosin-Phosphorylierung der zytoplasmatischen Domäne der IIIa-Kette, welche nunmehr ein „outside-in-signaling“ zur Folge hat.

Diese bewirkt einen Aufbau des Zytoskeletts und damit eine Verstärkung der Wirkung chemischer Agonisten in Form eines positiven Rückkopplungsmechanismus. Die Bindung von Fibrinogen an den nun aktivierten GPIIb/IIIa-Rezeptor induziert eine weitere Konformationsänderung des Rezeptors mit Expression von Neo-Epitopen, den sogenannten LIBS (ligand-induced binding sites, ligandeninduzierte Bindungsstellen) (Frelinger et al., 1988; Schwartz et al., 1995; Shattil & Ginsberg, 1997; Gawaz, 1999; Topol et al., 1999; Schrör, 2000; Phillips et al., 2001; Nurden & Nurden, 2002).

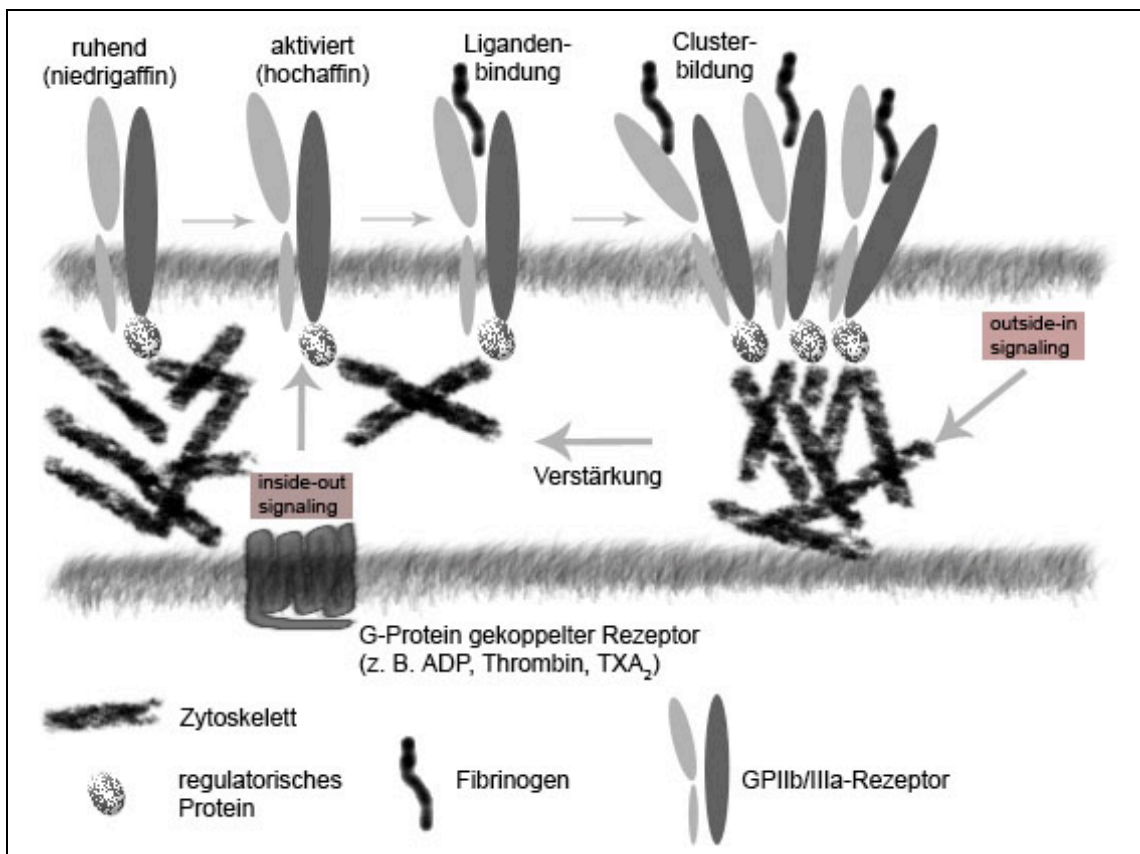


Abb. 2
Funktion des GPIIb/IIIa-Rezeptors (modifiziert nach Schrör, 2000).

Pharmakologische Ansätze zur Inhibition der Thrombozytenaggregation:
Antikörper, Disintegrine und Antiintegrine

Die Thrombasthenie Glanzmann führt aufgrund quantitativer oder qualitativer Defekte des GPIIb/IIIa-Rezeptors zu einem Verlust der Aggregationsfähigkeit von Thrombozyten gegenüber allen physiologischen Agonisten. Dies zeigt, dass der GPIIb/IIIa-Rezeptor für den finalen und allen Thrombozytenagonisten gemeinsamen Schritt der Aggregation entscheidend ist.

Die hier beschriebenen Wirkstoffe beeinflussen extrazellulär die Interaktion zwischen Adhäsionsprotein und Adhäsionsmolekül. Im Vergleich dazu beeinflussen Thrombozytenfunktionshemmer wie Acetylsalicylsäure oder Clopidogrel die intrazelluläre Signaltransduktion (Schrör, 2002). Aus den Anstrengungen neue

Pharmaka zu entwickeln, welche die Funktion thrombozytärer Membranglykoproteine hemmen, entstand so eine neue Klasse der antithrombozytären Therapie, die GPIIb/IIIa-Inhibitoren, welche die Thrombozytenaggregation nachweislich hemmen. In Deutschland zugelassen sind diese Substanzen zum einen als Begleitmedikation bei akuten perkutanen Koronarinterventionen (PCI, percutaneous coronary intervention) und zum anderen als Therapie des akuten Koronarsyndroms.

Diese Substanzen lassen sich in drei unterschiedliche molekulare Substanzgruppen unterteilen (Lefkovits et al., 1995; Topol et al., 1999):

a) Die erste Gruppe bilden blockierende Antikörper, die gegen den GPIIb/IIIa-Rezeptor gerichtet sind. Das bereits als Arzneimittel zugelassene humanisierte Antikörperfragment Abciximab (c7E3, ReoPro[®]) ist aus dieser Gruppe die einzige Substanz, die bis zur klinischen Anwendung weiterentwickelt wurde.

b) Die zweite Gruppe sind sogenannte Disintegrine, kleine Proteine, die ursprünglich aus Schlangengiften isoliert wurden. Die Aminosäuresequenz der Bindungsstellen an den GPIIb/IIIa-Rezeptor dienten als Grundlage zur Herstellung von Peptidderivaten und Analoga. Ein typisches Beispiel dafür ist die Aminosäuresequenz KGD (Lysin-Glycin-Asparaginsäure), die in Disintegrinen vorhanden und relativ spezifisch für den GPIIb/IIIa-Rezeptor ist. Basierend auf dieser Sequenz wurde das Pharmakon Eptifibatid (Integrelin[®]) als zyklisches Peptid entwickelt.

c) Antiintegrine, oder auch sogenannte RGD-Analoga, bilden schließlich die dritte Gruppe. Hierbei handelt es sich um chemisch hergestellte Substanzen, die der Struktur des RGD-Peptids nachgebildet wurden. Die RGD-Sequenz ist im Fibrinogenmolekül für dessen Bindung an den GPIIb/IIIa-Rezeptor verantwortlich. Ein in Deutschland zugelassenes Pharmakon aus dieser Substanzgruppe ist das Tirofiban (Aggrastat[®]).

Die drei GPIIb/IIIa-Inhibitoren, die in Deutschland zugelassen sind, werden nachfolgend kurz eingeführt.

Abciximab (c7E3, ReoPro[®])

Der monoklonale Antikörper 7E3 wurde 1985 von Barry Coller beschrieben. Er wurde durch die Immunisierung von Mäusen mit menschlichen Thrombozyten gewonnen und zeigte eine Spezifität für den GPIIb/IIIa-Rezeptor. Um Immunreaktionen gegen den originalen Maus-Antikörper zu vermeiden, wurde bei der Entwicklung des endgültigen Pharmakons c7E3 nur das Fab-Fragment verwendet und in diesem zusätzlich alle konstanten Mausregionen durch humane Sequenzen ersetzt.

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 nichtaktivierten GPIIb/IIIa-Rezeptor an immobilisiertes Fibrinogen binden können (Coller & Scudder, 1985; Coller, 1995; Knight et al., 1995; Coller, 1997).

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 (Integrelin®)

Im Vergleich zu dem hochmolekularen Abciximab handelt es sich hier um zwei niedermolekulare GPIIb/IIIa-Inhibitoren. Eptifibatid ist ein über Disulfid-Brücken verbundenes zyklisches Peptid mit 7 Aminosäuren und weist die Aminosäuresequenz KGD auf, welche der GPIIb/IIIa-Rezeptor Bindungsregion im Disintegrin Barbourin, einem Schlangengift, ähnelt. Das Heptapeptid Eptifibatid bindet kompetitiv im Bereich der RGD-Erkennungsregion des GPIIb/IIIa-Rezeptors (Scarborough et al., 1993).

Tirofiban (Aggrastat®)

Tirofiban ist ein kleines, nichtpeptidisches Molekül, welches im Vergleich 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 den beiden Vertretern der Thrombozytenaggregationshemmer Eptifibatid und Tirofiban 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).

Allen drei Substanzgruppen ist gemeinsam, dass sie sowohl mit der ruhenden, als auch mit der aktivierten Form des GPIIb/IIIa-Rezeptors reagieren und somit sowohl an stimulierte, als auch an nicht stimulierte Thrombozyten binden können. Sie stellen effektive Pharmaka in der Thrombozytenaggregationshemmung dar. (Topol et al., 1999).

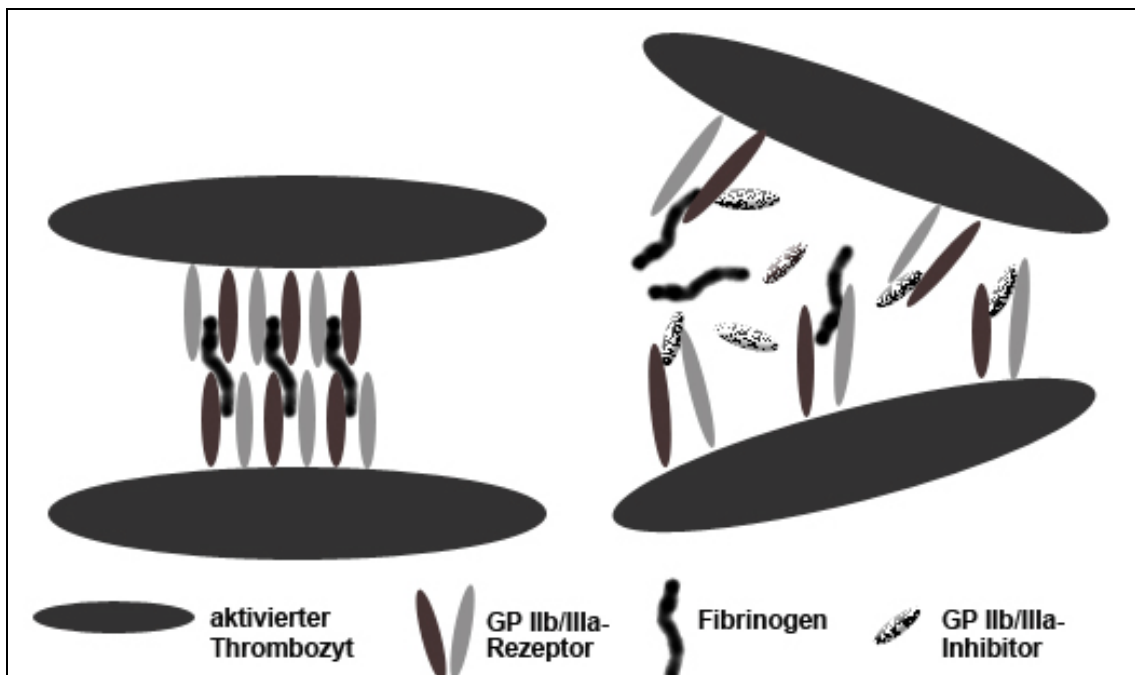


Abb. 3
Wirkmechanismus von GPIIb/IIIa-Inhibitoren.

Allerdings unterscheiden sie sich hinsichtlich verschiedener pharmakokinetischer und pharmakodynamischer Punkte. Es werden sowohl Konformationsänderungen der GPIIb/IIIa-Rezeptoren durch GPIIb/IIIa-Inhibitoren, als auch paradoxe Thrombozytenaktivierungen durch GPIIb/IIIa-Inhibitoren diskutiert.

Die Gruppe um Peter (1998) konnte zeigen, dass GPIIb/IIIa-Inhibitoren in der Lage sind eine Konformationsänderung des GPIIb/IIIa-Rezeptors einzuleiten. Nach Dissoziation eines GPIIb/IIIa-Inhibitors, wie z.B. Abciximab, hinterlässt dieser den Rezeptor von einem ruhenden in einen aktivierten Zustand. Dies wiederum ermöglicht Fibrinogen an den GPIIb/IIIa-Rezeptor zu binden und eine Thrombozytenaggregation einzuleiten.

Holmes et al. (2000) stellten fest, dass es bei Patienten, welche mit dem oralen GPIIb/IIIa-Inhibitor Orbofiban behandelt wurden, zu einem Anstieg der Thrombozytenreaktivität kam. Diese äußerte sich in einer vermehrten Fibrinogenbindung und einer verstärkten α -Granula-Degranulation, welche sich in einer erhöhten CD62P-Expression widerspiegelte.

Frelinger et al. (2001) zeigten jedoch, dass GPIIb/IIIa-Inhibitoren unter physiologischen Bedingungen keine intrinsische Aktivität besitzen, welche zu einer Fibrinogenbindung oder zu einer Thrombozytenaggregation führen könnte.

Zudem beobachteten Ndoko et al. (2002), dass nach Dissoziation des GPIIb/IIIa-Rezeptors durch den GPIIb/IIIa-Inhibitor Abciximab dieser nicht in einem aktivierten Zustand hinterlassen wird.

Demnach scheint es sich hier nicht um einen allgemein gültigen Vorgang zu handeln.

In einer anderen Studie untersuchte die Gruppe um Peter (1999) 26 Patienten, die mit akutem Myokardinfarkt eingewiesen wurden und mit Abciximab alleine oder mit der Kombination Abciximab und Reteplase behandelt wurden. Mittels Durchflusszytometrie wurde hier der Aktivierungszustand der Thrombozyten gemessen. Bei einem Patienten kam es zehn Minuten nach dem Beginn der Behandlung mit Abciximab zu einer Erhöhung der CD62P-Expression von 10.2 % auf 58.3 %. Die CD62P-Expression spiegelt eine α -Granula-Degranulation wider und zeigt damit eine Thrombozytenaktivierung und nicht nur eine Konformationsänderung des GPIIb/IIIa-Rezeptors. Interessanterweise konnte sowohl zwei als auch vier Wochen später an den isolierten Thrombozyten dieses Patienten eine Thrombozytenaktivierung durch Zugabe von Abciximab *in vitro* reinduziert werden.

Bis jetzt ist jedoch der Mechanismus für die Thrombozytenaktivierung durch GPIIb/IIIa-Inhibitoren, wie Abciximab, unklar. Die Häufigkeit der Thrombozytenaktivierung in Peter et al. (1999) Arbeit lag bei ca. 1/30. Dies ist in etwa die gleiche Häufigkeit wie die des HPA-1-Genotyps b/b.

Bei dem HPA-1-Polymorphismus handelt es sich um eine Punktmutation in der β -Kette des GPIIb/IIIa-Rezeptors an der Stelle 33 mit Substitution von Leucin für Prolin (Newman et al., 1989).

Daher wurde die Hypothese aufgestellt, dass der HPA-1-Genotyp möglicherweise an der paradoxen Thrombozytenaktivierung durch Abciximab beteiligt ist.

Verschiedene Autoren berichteten bereits, dass der HPA-1-Polymorphismus scheinbar die hemmenden Eigenschaften des GPIIb/IIIa-Inhibitors Abciximab beeinflusst.

Michelson et al. (2000) fanden in diesem Zusammenhang heraus, dass die Thrombozyten gesunder Blutspender mit dem HPA-1-Genotyp b/b eine erhöhte

Neigung zur Aktivierbarkeit zeigten als diejenigen mit dem HPA-1-Genotyp a/a oder a/b.

Zudem konnten Wheeler et al. (2002) zeigen, dass es in ihren Untersuchungen zu einer verminderten Thrombozytenaggregationshemmung durch Abciximab bei Patienten mit dem HPA-1-Genotyp b/b kam.

Damit scheint der HPA-1-Genotyp b/b möglicherweise die Funktion von GPIIb/IIIa-Rezeptoren zu beeinflussen. Aufgrund der genannten Ergebnisse wurde in dieser Studie die Hypothese aufgestellt, wonach der HPA-1-Genotyp b/b möglicherweise bei der von Peter et al. (1999) beschriebenen paradoxen Thrombozytenaktivierung durch Abciximab eine Rolle spielt.

Insbesondere sollen in dieser Arbeit folgende Fragestellungen untersucht werden:

- i) Kommt es zu einer Aktivierung der Thrombozyten durch GPIIb/IIIa-Inhibitoren *in vitro*, und wenn ja, wie häufig tritt dann diese Aktivierung auf?
- ii) Determiniert der HPA-1-Polymorphismus die Aktivierung der Thrombozyten durch GPIIb/IIIa-Inhibitoren *in vitro*?

2 Material und Methoden

2.1 Studienplan

In dieser Studie wurden gesunde Blutspender aus dem Institut für Hämostaseologie und Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Düsseldorf als Kontrollgruppe untersucht. Daraufhin wurden Patienten der Klinik für Kardiologie, Pneumologie und Angiologie des Universitätsklinikums Düsseldorf untersucht, wobei es sich hier um Patienten mit koronarer Herzkrankheit (stabile Angina pectoris) handelte. Bei allen Teilnehmern wurde sowohl die basale, als auch die ADP-induzierte CD62P-Expression vor und nach Gabe der GPIIb/IIIa-Inhibitoren Abciximab, Eptifibatid und Tirofiban *in vitro* mittels Durchflusszytometrie gemessen. Der HPA-1-Genotyp wurde bei allen Teilnehmern mittels GALIOS[®] und automatisierter Einzelmolekül-Spektroskopie bestimmt.

2.2 Material

2.2.1 Teilnehmer

Die Teilnehmer der Studie waren zum einen 62 Blutspender aus dem Institut für Hämostaseologie und Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Düsseldorf und zum anderen 177 Patienten der Klinik für Kardiologie, Pneumologie und Angiologie des Universitätsklinikums Düsseldorf.

Die erste Gruppe der Blutspender bestand aus 45 gesunden Männern und 17 gesunden Frauen. Dabei lag der Altersdurchschnitt bei 38.1 ± 1.4 Jahren

Die zweite Gruppe bestand aus 132 Männern und 45 Frauen mit einem Altersdurchschnitt der bei 63.9 ± 0.9 Jahren lag. In dieser Gruppe lag als Grundvoraussetzung koronare Herzkrankheit vor. Blutspender bzw. Patienten, die Thienopyridine zu sich genommen hatten, waren von dieser Studie ausgeschlossen. Die meisten Patienten wurden mit Acetylsalicylsäure behandelt. Eine Behandlung mit Acetylsalicylsäure beeinflusst jedoch nicht die Adenosindiphosphat (ADP)-induzierte Thrombozytenaktivierung, welche bei einer 2 mM Ca^{++} -Konzentration gemessen wurde (Hermann et al., 2001).

Alle Teilnehmer wurden über die Untersuchungen aufgeklärt und erklärten schriftlich ihr Einverständnis.

2.2.2 Blutentnahme

Es wurden jedem Blutspender bzw. Kardiologiepatienten 5 ml Blut entnommen. Das Blut wurde mittels eines Vakutainers mit Citratvorlage (1:9; v/v) gesammelt und sofort nach Entnahme in das Labor transportiert.

2.2.3 Präparation der Thrombozyten

Das aus dem Vakutainer entnommene Vollblut wurde auf zwei Eppendorf-Gefäße mit je 2 ml Inhalt verteilt. Mittels Zentrifugation 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.

Das PRP wurde jetzt in dem Verhältnis 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.

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

Das übriggebliebene Blut wurde in jeweils zwei 2 ml Eppendorf-Gefäße bei -16°C eingefroren und so zur HPA-1-Genotypisierung aufbewahrt.

2.2.4 Substanzen und Lösungen

Substanzen

Abciximab (ReoPro [®])	Centocor, Leiden, Niederlande
ACD (Biostabil [®])	Biotest Pharma, Dreieich
Adenosindiphosphat	Sigma, Deisenhofen
Eptifibatid (Integrelin [®])	Essex Pharma, München
Isotypische Kontroll-AK	Immunotech, Marseille, Frankreich
Monoclonal Antibody CD62P-FITC	Immunotech, Marseille, Frankreich
Tirofiban (Aggrastat [®])	MSD Sharp & Dohme, Haar

Lösungen

ACD (Biostabil[®]): Das Antikoagulans ACD enthält Natrium-Citrat (74,8 mM), Citronensäure (38 mM) und Glukose (123,6 mM).

Adenosindiphosphat: Das ADP wurde als Stammlösung in einer Konzentration von 10^{-5} M bei -20°C aufbewahrt und zu jedem Versuch mit Testmedium auf die gewünschte Konzentration verdünnt.

Isoton: Der azidfreie stabilisierte Elektrolyt enthält 7,9 g/L Natriumchlorid, 1,9 g/L di-Natriumhydrogenphosphat, 0,4 g/L EDTA, 0,4 g/L Kaliumchlorid, 0,2 g/L Natriumdihydrogenphosphat und 0,3 g/L Natriumfluorid.

Komplett-TM: 10 ml TM, 100 µl Rinderserumalbumin, 100 µl CaCl₂ (200mM), 100 µl Glukose (100 mg/ml).

TM (HEPES-Tyrode): 134 mM NaCl, 12 mM NaHCO₃, 2,9 mM KCl, 0,36 mM NaH₂PO₄, 1 mM MgCl₂, 5 mM HEPES, pH 7,4.

2.2.5 Strukturformeln von Tirofiban und Eptifibatid

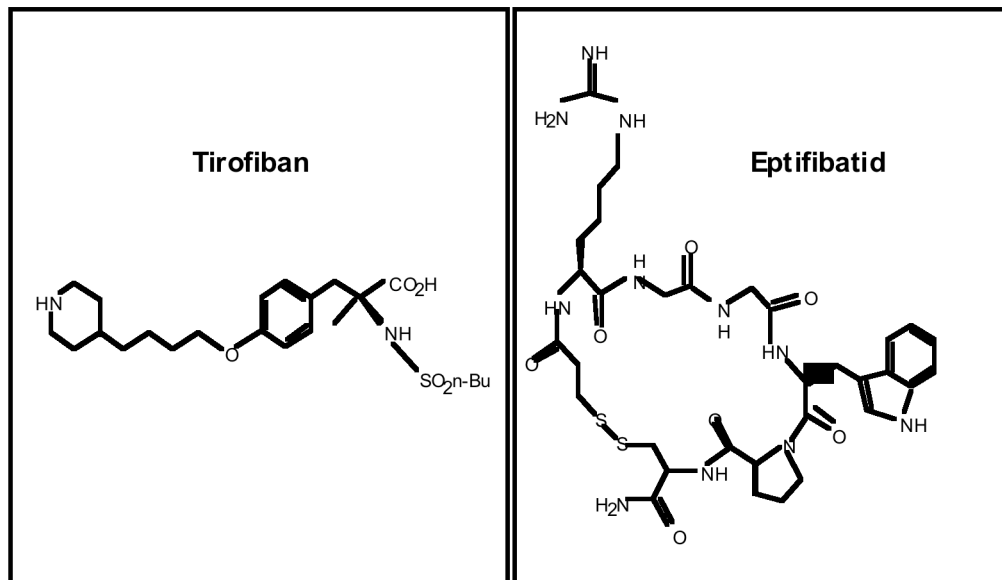


Abb. 4
Strukturformeln von Tirofiban und Eptifibatid.

2.3 Methoden

2.3.1 Messung der CD62P-Expression mittels Durchflusszytometrie

Die gewaschenen Thrombozyten wurden in sieben Eppendorf-Gefäßen (1,5 ml) zu je 200 µl aufgeteilt. Darauf folgte in sechs der Gefäße die Zugabe von 20 µl der drei GP IIb/IIIa-Inhibitoren in verschiedenen Konzentrationen, welche sich nach zuvor durchgeführten Konzentrationsfindungsstudien richteten. Die Konzentrationen betragen bei Abciximab 1 µg/ml und 10 µg/ml, bei Eptifibatid 0,3 µg/ml und 3 µg/ml und bei Tirofiban 3 nM und 30 nM. Das siebte Gefäß erhielt keine Inhibitoren und diente als Kontrollprobe.

Die sieben verschiedenen Eppendorf-Gefäße wurden jetzt zu einer 15 minütigen Inkubation in ein Wasserbad mit einer Temperatur von 37°C gestellt. Jetzt wurden aus jedem Eppendorf-Gefäß 100 µl entnommen und jeweils in ein neues Gefäß pipettiert. Die erste Hälfte wurde nun wieder in das Wasserbad für 15 Minuten gestellt. Bei der anderen Hälfte jedoch wurde jedes Gefäß mit 10 µl ADP in einer Endkonzentration von 3 µM stimuliert und mit der ersten unstimulierten Hälfte in das Wasserbad gestellt.

Somit ergab sich das folgende Inkubationsschema:

Eppendorf-Gefäße für die CD62P-Antikörperinkubation	
Unstimuliert	ADP (3 µM) - stimuliert
Kontrolle	Kontrolle
Abciximab 1 µg/ml	Abciximab 1 µg/ml
Abciximab 10 µg/ml	Abciximab 10 µg/ml
Eptifibatid 0,3 µg/ml	Eptifibatid 0,3 µg/ml
Eptifibatid 3 µg/ml	Eptifibatid 3 µg/ml
Tirofiban 3 nM	Tirofiban 3 nM
Tirofiban 30 nM	Tirofiban 30 nM

Nach der Inkubation bzw. Stimulation wurden 25 µl Thrombozyten mit 5 µl Anti-CD62P-FITC-Antikörpern für 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Zum Vergleich wurde pro Versuchsteilnehmer ein zusätzliches Eppendorf-Gefäß mit nichtspezifischen Kontrollantikörpern (Isotyp) inkubiert.

Nach der Antikörperinkubation wurde die Reaktion mit 0,5 ml Isoton gestoppt und die CD62P-Expression wurde sofort mittels Durchflusszytometrie gemessen (Weber & Schrör, 2001).

Durchflusszytometrie

Zur Durchflusszytometrie diente das Epics-XL-Zytometer (Beckmann Coulter, Krefeld). Die Thrombozytenpopulation wurde anhand der Verteilung von Vorwärts- und Seitwärtsstreuung identifiziert. Hierbei wurde die Signalverstärkung logarithmisch eingestellt. Mittels der System 2 Software wurden 10000 Thrombozyten bei maximal 1000 Ereignissen pro Sekunde vermessen und analysiert. Hierbei wurde die mittlere Fluoreszenzintensität (MnX) ausgewertet.

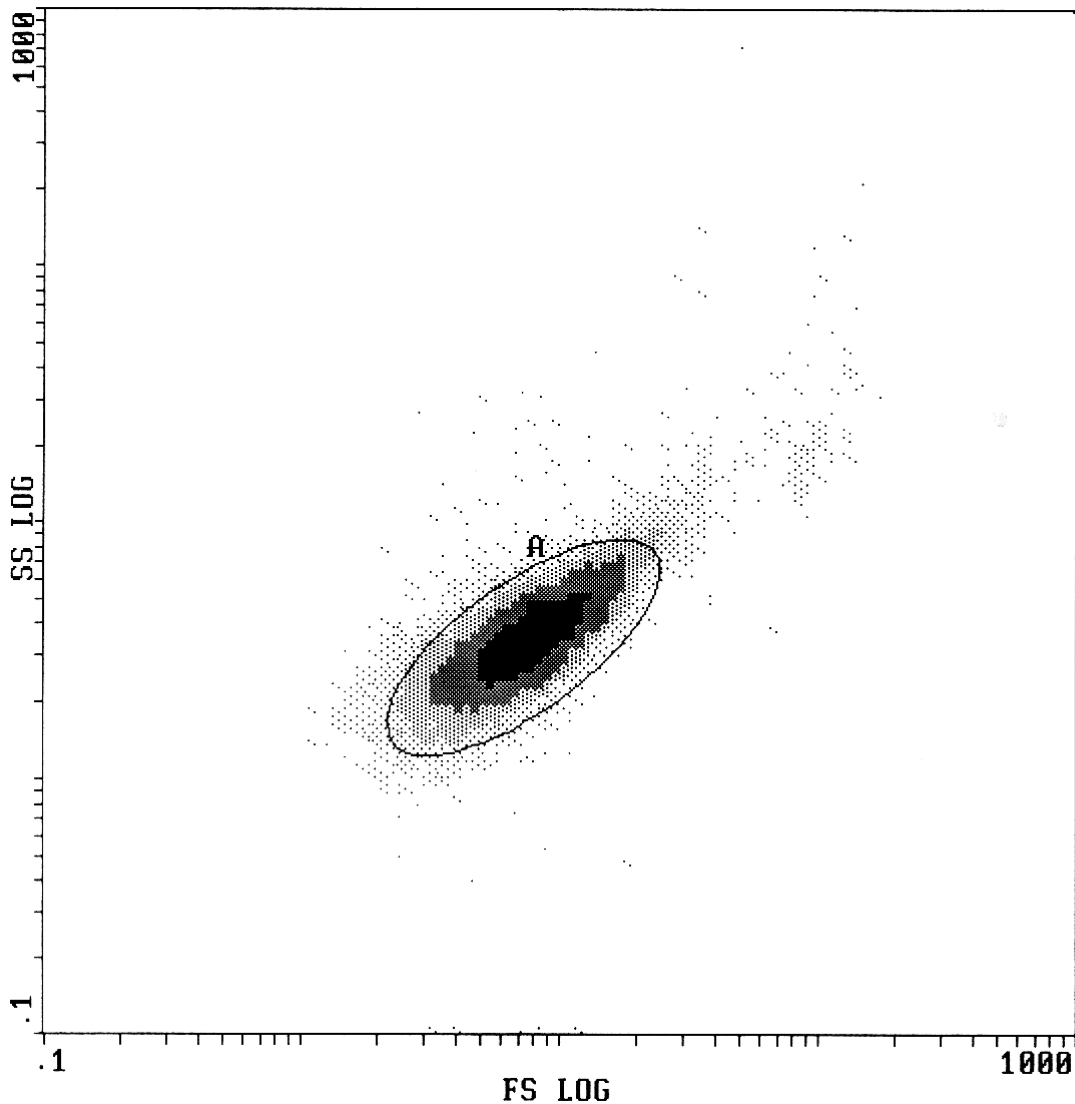


Abb. 5
Scatter zur Identifizierung der Thrombozytenpopulation mittels Vorwärts- und Seitwärtsstreuung.

2.3.2 Bestimmung des Human platelet antigen-1 (HPA-1)-Genotyps

Der Human platelet antigen-1 (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 Primer 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 allelspezifisch markierter PCR-Produkte erfolgte mittels automatisierter Einzelmolekül-Detektion (Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie, FCS) auf dem Analyzer Δ A2.0.

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

2.3.3 Statistische Auswertung

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 α wurde mit 0,05 festgesetzt.

3 Ergebnisse

3.1 Thrombozytenreaktivität bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit

Die basale (unstimulierte) Expression von CD62P bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit unterschied sich nicht von der bei den gesunden Blutspendern.

Allerdings konnte eine Thrombozytenhyperreaktivität bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit festgestellt werden. Bei diesen Patienten war die ADP (3 μ M)-stimulierte CD62P-Expression im Vergleich zu den gesunden Kontrollpersonen signifikant erhöht (Abb. 6).

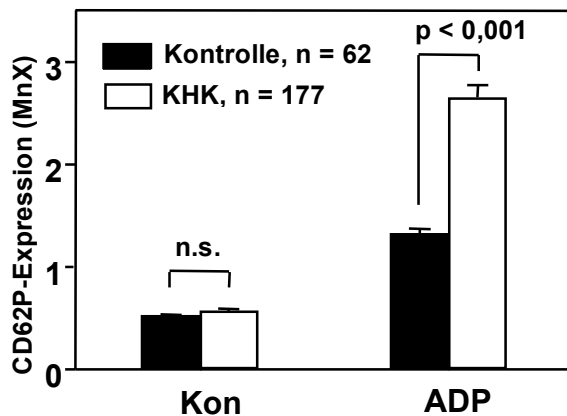


Abb. 6

Basale (Kon) und Adenosindiphosphat (ADP, 3 μ M)-induzierte CD62P-Expression (mittlere Fluoreszenz-Intensität, MnX) bei gesunden Blutspendern (Kontrolle) und bei Patienten mit stabiler koronarer Herzkrankheit (KHK). Die Messdaten wurden als Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben, n.s., nicht signifikant (ANOVA, Bonferroni).

3.2 Abhängigkeit der ADP-induzierten CD62P-Expression vom HPA-1-Genotyp

Der human platelet antigen-1 (HPA-1) Genotyp wurde bei allen Studienteilnehmern bestimmt. Die Häufigkeit der jeweiligen Genotypen werden in Abb. 7 gezeigt.

Die Frequenz der HPA-1-Genotypen in der Kontrollgruppe entspricht nicht der der allgemeinen Bevölkerung. Hier wurde eine gezielte Vorauswahl der Studienteilnehmer durchgeführt. Bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit wurde hingegen keine Vorauswahl der Genotypen getroffen.

Abb. 7 zeigt, dass der HPA-1-Genotyp weder die basale, noch die ADP-induzierte CD62P-Expression beeinflusste. Dies traf sowohl auf die Kontrollgruppe der gesunden Blutspendern, als auch auf die Gruppe der Patienten mit koronarer Herzkrankheit zu.

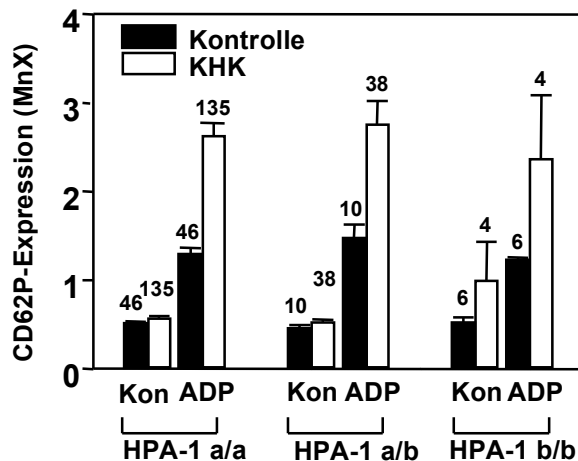


Abb. 7

Basale (Kon) und Adenosindiphosphat (ADP, 3 μ M)-induzierte CD62P-Expression (mittlere Fluoreszenz-Intensität, MnX) bei gesunden Blutspendern (Kontrolle) und bei Patienten mit stabiler koronarer Herzkrankheit (KHK) hinsichtlich des human platelet antigen-1 (HPA-1)-Genotyps. Die Messdaten wurden als Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Die Diagramme zeigen die jeweilige Anzahl der Studienteilnehmer, welche hinsichtlich des zugehörigen Allels genotypisiert wurden. Es gab keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen ($p > 0,05$, ANOVA).

3.3 Effekte von GPIIb/IIIa-Inhibitoren auf die thrombozytäre CD62P-Expression in Abhängigkeit vom HPA-1-Genotyp

Die Effekte der drei GPIIb/IIIa-Inhibitoren, die für den klinischen Gebrauch zugelassen sind (Abcixmab, Tirofiban und Eptifibatid), wurden hinsichtlich der basalen und ADP (3 μ M)-induzierten CD62P-Expression bei gesunden Blutspendern (Kontrolle, $n = 62$) und bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit (KHK, $n = 177$) untersucht.

Hierbei gab es keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen HPA-1-Genotypen hinsichtlich der Effekte von GPIIb/IIIa-Inhibitoren auf die basale oder ADP-stimulierte CD62P-Expression (Abb. 8).

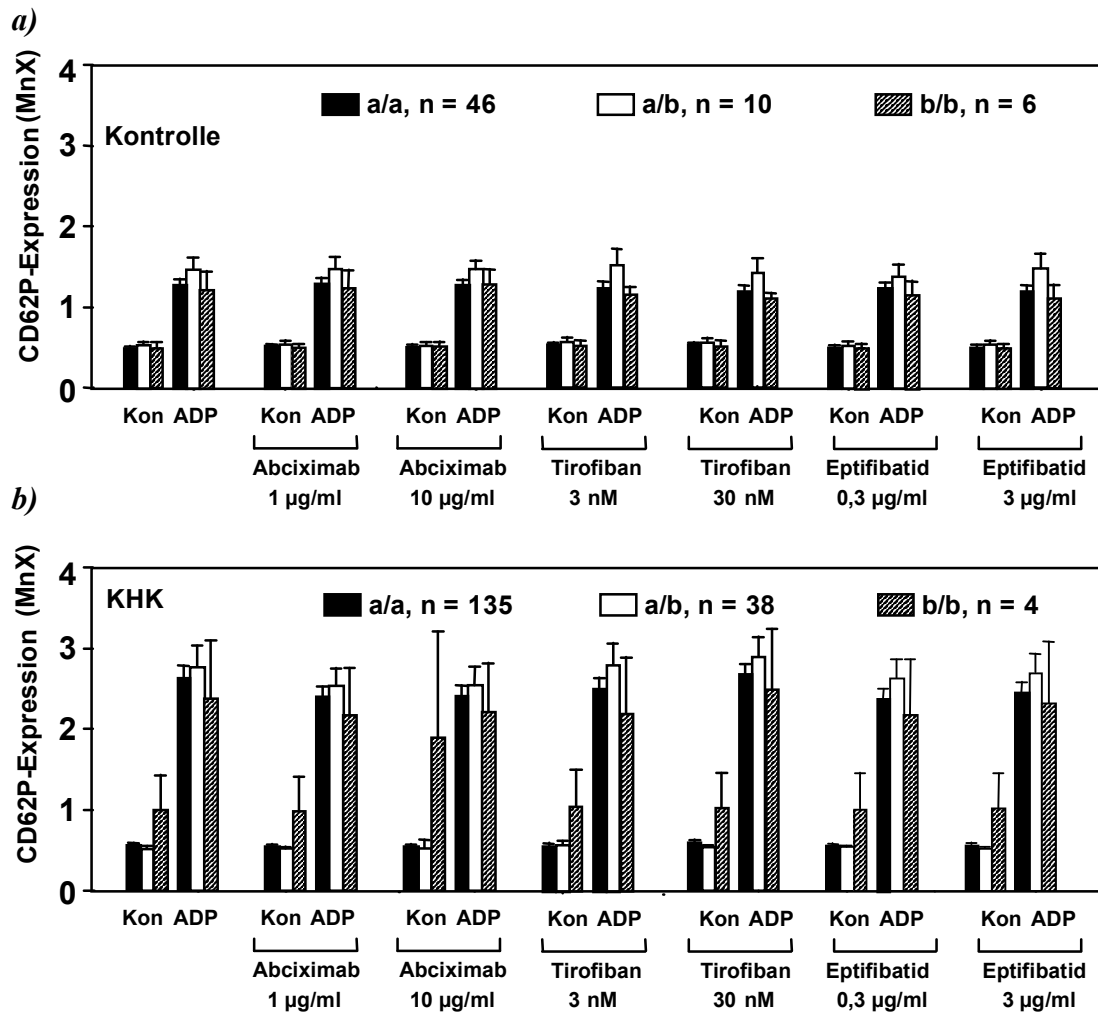


Abb. 8

Effekte von Abciximab (1-10 µg/ml), Tirofiban (3-30 nM) und Eptifibatid (0,3-3 µg/ml) auf basale (Kon) und Adenosindiphosphat (ADP, 3 µM)-induzierte Thrombozyten-CD62P-Expression (mittlere Fluoreszenz-Intensität, MnX) bei gesunden Blutspendern (Kontrolle) und bei Patienten mit stabiler koronarer Herzkrankheit (KHK) hinsichtlich des human platelet antigen-1 (HPA-1)-Genotyp. Die Messdaten wurden als Mittelwerte ± Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Es gab keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen hinsichtlich der Effekte der GPIIb/IIIa-Inhibitoren ($p > 0,05$, ANOVA).

Es konnte nur bei einem Patienten mit koronarer Herzkrankheit eine leichte Stimulation der CD62P-Expression nach Inkubation mit Abciximab beobachtet werden (Abb. 9a). Bei diesem Patienten war bereits die basale (unstimulierte) CD62P-Expression leicht erhöht.

Durch Zugabe von Abciximab (10 µg/ml) erfolgte eine etwa zweifache Erhöhung der CD62P-Expression.

Allerdings konnten weder die niedrigere Konzentration von Abciximab (1 µg/ml), noch die beiden anderen GPIIb/IIIa-Inhibitoren eine Erhöhung der CD62P-Expression bewirken.

Die ADP-induzierte CD62P-Expression wurde durch keinen der drei untersuchten GPIIb/IIIa-Inhibitoren zusätzlich verstärkt.

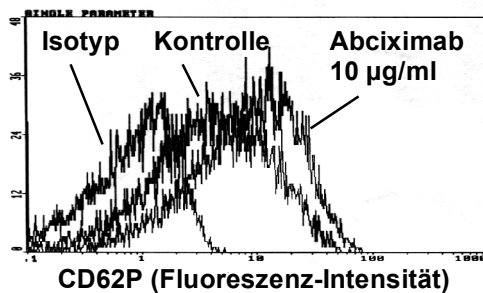
Ausgehend von einer Gesamtteilnehmerzahl von 239, liegt demnach in unserer Studie die Prävalenz einer Thrombozytenaktivierung durch Abciximab bei 0,4 % (95 % Vertrauensintervall 0,02 %; 2 %).

Demnach scheint eine paradoxe Thrombozytenaktivierung durch GPIIb/IIIa-Inhibitoren ein seltenes (< 2 %) Ereignis zu sein.

Interessanterweise trug der Patient, bei dem die Thrombozytenaktivierung durch Abciximab beobachtet wurde, den HPA-1-Genotyp b/b.

Es wurde allerdings bei keinem weiteren Studienteilnehmer eine Thrombozytenaktivierung durch GPIIb/IIIa-Inhibitoren beobachtet (Abb. 9b).

a)



b)

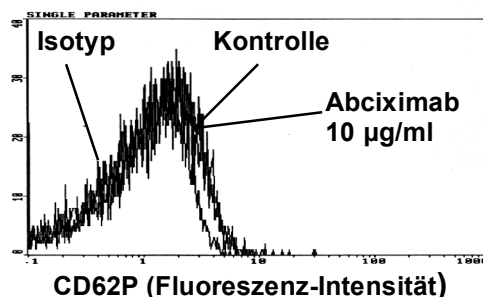


Abb. 9

Original-Durchflusszytometrie-Histogramm der Effekte von Abciximab (10 µg/ml) auf die thrombozytäre CD62P-Expression bei einem Patienten mit koronarer Herzkrankheit (a). Histogramm, welches repräsentativ für alle anderen Studienteilnehmer ist (b). Die Histogramme, welche sowohl unbehandelte, als auch mit Abciximab behandelte Thrombozyten beinhalten, überlappen sich. Dies zeigt, dass Abciximab die CD62P-Expression nicht beeinflusst. Zum Vergleich wurden Histogramme mit nichtspezifischen Kontrollantikörpern (Isotyp) gemacht.

4 Diskussion

4.1 Kritik der Methoden

Es soll hier darauf hingewiesen werden, dass alle Versuche *in vitro* durchgeführt wurden und somit das Verhalten der Thrombozyten und der Ergebnisse nicht dem Verhalten unter *in vivo*-Bedingungen widerspiegeln muss.

Larsson et al. (1990) konnten zeigen, dass Thrombozyten eine unterschiedliche Aggregabilität unter *in vivo* und *in vitro*-Bedingungen besitzen. Andere Befunde belegen, dass möglicherweise auch andere Blutzellen, wie Erythrozyten und Leukozyten, an der Aktivierung von Thrombozyten beteiligt sind (Santos et al., 1991, Li et al., 2000).

Interaktionen zwischen Thrombozyten und dem Endothel oder der Gefäßwand, wie es in physiologischen oder pathophysiologischen Vorgängen vorkommt, werden bei *in vitro* Versuchen ebenfalls nicht erfasst.

Die Aktivierung der Thrombozyten in dieser Studie erfolgte durch Stimulation von 3 μ M ADP. ADP ist einer der hauptverantwortlichen chemischen Agonisten der Thrombozytenaktivierung, jedoch nicht der einzige. Stimulation und deren Auswirkungen durch potentiell stärkere Agonisten, wie Thrombin oder Kollagen, blieben somit unerfasst.

Die Anzahl der in dieser Arbeit untersuchten Personen beträgt 239. Dennoch liegt die Anzahl der homozygoten HPA-1 b/b Genotypen nur bei 10, was an dem seltenen Vorkommen dieses Genotypen liegt. Nur durch das Bekanntsein einiger Genotypen der Blutspender war es überhaupt möglich, im Rahmen dieser Studie 10 Personen mit diesem Genotyp zu untersuchen. Von 4 Individuen in der HPA-1b/b-KHK-Patienten-Gruppe stellt der Patient mit der paradoxen Thrombozytenaktivierung durch Abciximab 25 % der Fälle. Es ist somit nicht ausgeschlossen, dass diese Gruppe einen breiteren Raum einnähme, wenn mehr Individuen untersucht würden.

Um wirklich aussagekräftige Studien über den homozygoten HPA-1-Genotyp b/b zu machen, wäre die Untersuchung von wesentlich höheren Fallzahlen notwendig, was allerdings im Rahmen dieser Arbeit nicht geleistet werden konnte.

4.2 Thrombozytenhyperreaktivität bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit

In dieser Studie stellte sich zunächst heraus, dass es keinen Unterschied in der basalen CD62P-Expression zwischen gesunden Blutspendern und Patienten mit koronarer Herzkrankheit gab. Jedoch kam es bei der ADP-induzierten CD62P-Expression zu einem signifikanten Anstieg dieser Expression bei der Gruppe der KHK-Patienten im Vergleich zu der Gruppe der gesunden Blutspender.

Im Zusammenhang mit den Ergebnissen anderer Arbeiten zeigte diese Studie damit eine signifikante Thrombozytenhyperreaktivität bei Patienten mit KHK.

So konnten Furman et al. (1998) zeigen, dass Patienten mit stabiler koronarer Herzkrankheit aktivierte Thrombozyten und Monozyten-Thrombozyten Aggregate im zirkulierenden Blut besitzen. Zudem besaßen die Patienten eine erhöhte Reaktivität gegenüber den chemischen Agonisten ADP, Adrenalin und TRAP (Thrombin receptor activating peptide) und eine erhöhte Neigung Monozyten-Thrombozyten Aggregate zu bilden.

Auch Holmes et al. (1999) kamen zu ähnlichen Ergebnissen wie den vorliegenden. Sie zeigten, dass Patienten mit akutem Koronarsyndrom im Vergleich zu gesunden Teilnehmern eine signifikant höhere CD62P-Expression nach ADP-Stimulation vorwiesen.

Die Gruppe um Ault (1999) untersuchte die Effekte eines oralen GPIIb/IIIa-Inhibitors, Sibrafiban, bei der Therapie des akuten Koronarsyndroms. Auch hier zeigte die Gruppe der Patienten, die aufgrund eines akuten Koronarsyndroms behandelt wurde, eine erhöhte Aktivierung der Thrombozyten im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe. Diese erhöhte Thrombozytenaktivierung ließ sich auch noch 28 Tage nach Beginn der Therapie nachweisen.

4.3 Thrombozytenhyperreaktivität und HPA-1-Polymorphismus

Zahlreiche Arbeiten befassen sich mit dem Zusammenhang zwischen dem HPA-1-Polymorphismus und der thrombozytären Funktion. Die Meinungen diesbezüglich sind jedoch geteilt. Einige Autoren vertreten die Ansicht, dass der HPA-1-Polymorphismus die Funktion des GPIIb/IIIa-Rezeptors beeinflusst, andere wiederum konnten hier keinen Zusammenhang feststellen.

Bei dem HPA-1-Polymorphismus handelt es sich um eine Punktmutation in der β -Kette des GPIIb/IIIa-Rezeptors an der Stelle 33 mit Substitution von Leucin (HPA-1 a/a) für Prolin (HPA-1 b/b) (Newmann et al., 1989).

Feng und Mitarbeiter (1999) fanden heraus, dass die Konzentrationsschwelle für Adrenalin-stimulierte Thrombozytenaggregation bei Menschen mit dem HPA-1-Genotyp b/b signifikant niedriger ist als bei Trägern des a-Allels. Die Gruppe um Michelson (2000) beobachtete, dass Thrombozyten mit dem HPA-1-Genotyp b/b sich eher aktivieren lassen als Thrombozyten mit dem HPA-1-Genotyp a/a oder a/b.

In einer anderen Studie untersuchten Lasne et al. (1997) die Schwelle für biphasische Aggregation, welche durch TRAP und ADP induziert wurde, und fanden heraus, dass Thrombozyten mit dem HPA-1-Genotyp b/b weniger stark auf diese Agonisten wirkten als diejenigen mit dem a-Allel.

Goodall et al. (1999) konnten zeigen, dass Thrombozyten mit dem HPA-1-Genotyp b/b eine erhöhte Fibrinogenbindung an den GPIIb/IIIa-Rezeptor besitzen, wenn sie mit ADP aktiviert werden, als Thrombozyten mit dem HPA-1-Genotyp a. Zu diesem Effekt kam es jedoch nicht nach Stimulation mit TRAP. Diese Beobachtung wiederum konnten Meiklejohn et al. (1999) nicht teilen. In ihrer Arbeit kamen sie zu dem

Ergebnis, dass es keinen Unterschied in den verschiedenen HPA-1-Genotypen hinsichtlich der ADP-induzierten Fibrinogenbindung gibt.

Golanski et al. (2001) beobachteten eine Thrombozytenhyperreaktivität nach ACVB (Aortocoronarer Venenbypass) und vermuteten, dass auch hier der HPA-1-Polymorphismus eine mögliche Rolle spielt.

Schließlich zeigten Bennett et al. (2001), dass der HPA-1-Genotyp b/b keinerlei Auswirkungen auf turbidometrisch gemessene Thrombozytenaggregation, Thrombozytensekretion oder auf Thrombusbildungen hat.

In der vorliegenden Arbeit wurde der HPA-1-Genotyp bei 62 gesunden Blutspendern und bei 177 Patienten mit koronarer Herzkrankheit bestimmt. Somit war im Vergleich zu anderen Studien hier eine direkte Gegenüberstellung zwischen gesunden und kranken Teilnehmern möglich. Zudem erhöhte die Gesamtzahl von 239 Studienteilnehmern die Aussagekraft in Bezug auf den Einfluss des HPA-1-Polymorphismus. Im Vergleich zu anderen Arbeiten handelte es sich hier nicht nur um eine größere, sondern auch um eine vollständigere Studie. In dieser Arbeit wurden nämlich die Effekte aller drei in Deutschland zugelassenen GPIIb/IIIa-Inhibitoren, Abciximab, Eptifibatid und Tirofiban, untersucht. Dies wiederum ermöglichte einen direkten Vergleich zwischen den drei Substanzgruppen Antikörper, Disintegrine und Antiintegrine.

In der vorliegenden Studie kam man zu dem Ergebnis, dass der HPA-1-Genotyp weder die basale, noch die ADP-induzierte CD62P-Expression beeinflusst. Dieser Effekt konnte sowohl innerhalb der Kontrollgruppe, als auch innerhalb der Patientengruppe gezeigt werden. Die in dieser Arbeit beobachtete Thrombozytenhyperreaktivität nach Stimulation durch den chemischen Agonisten ADP innerhalb der Patientengruppe war somit ebenfalls nicht abhängig von dem HPA-1-Genotyp.

In einer anderen Arbeit konnte zudem gezeigt werden, dass es keinen Anhaltspunkt dafür gibt, wonach der HPA-1-Polymorphismus die antithrombozytären Effekte der drei GPIIb/IIIa-Inhibitoren Abciximab, Eptifibatid und Tirofiban beeinflusst (Weber et al., 2002).

4.4 Paradoxe Thrombozytenaktivierung durch Abciximab

Die Bindung von Fibrinogen an den GPIIb/IIIa-Rezeptor ermöglicht insbesondere den Kontakt zwischen Thrombozyten und stellt somit den finalen Schritt der Thrombozytenaggregation dar. Allerdings führt sie ebenso zu Signaltransduktionen in Thrombozyten (outside-in signaling), welche für die normale thrombozytäre Funktion unerlässlich sind. In den letzten Jahren wurde immer häufiger berichtet, dass GPIIb/IIIa-Inhibitoren ebenfalls in der Lage sind bestimmte Signaltransduktionen in Thrombozyten zu initiieren. Diese zeigten sich unter anderem als intrazelluläre Veränderungen der Ca^{2+} -Signale, Thromboxan A_2 -Produktionen, Konformationsänderungen des GPIIb/IIIa-Rezeptors mit nachfolgender Fibrinogen-Bindung und nicht zuletzt als erhöhte Expressionen verschiedener Marker für Thrombozytenaktivierung (Honda et al., 1998; Peter et al., 1998; Cox et al., 2000).

Hierbei muss jedoch eindeutig zwischen einer durch outside-in signaling bedingten Thrombozytenaktivierung (erhöhtes Ca_i^{2+} , erhöhte CD62P-Expression) und einer

Aktivierung des GPIIb/IIIa-Rezeptors, im Sinne einer Transformation des Rezeptors in den high-affinity-state, dabei aber ohne Thrombozytenaktivierung, unterschieden werden. Eine erhöhte Thrombozytenaktivierung spielt eine herausragende Rolle in den Pathomechanismen des akuten Koronarsyndroms und der instabilen Angina pectoris (Fitzgerald et al., 1986).

In der vorliegenden Arbeit wurden die *in vitro*-Effekte von Abciximab (1 und 10 µg/ml), Eptifibatid (0,3 und 3 µg/ml) und Tirofiban (3 und 30 nM) auf Thrombozyten von 62 gesunden Blutspendern aus dem Institut für Hämostaseologie und Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Düsseldorf und von 177 Patienten mit koronarer Herzkrankheit (KHK) der Klinik für Kardiologie, Pneumologie und Angiologie des Universitätsklinikums Düsseldorf untersucht. Hierbei wurde sowohl die basale, als auch die durch 3 µM ADP-induzierte CD62P-Expression mittels Durchflusszytometrie gemessen.

Die drei von uns verwendeten Medikamente entstammen alle jeweils einer anderen molekularen Substanzgruppe. Abciximab ist ein Antikörper, Eptifibatid stammt aus der Gruppe der Disintegrine und Tirofiban ist ein Vertreter der sogenannten Antiintegrine oder auch Peptid-Mimetika (Lefkovits et al., 1995).

Nur bei einem Patienten mit koronarer Herzkrankheit konnte eine leichte, ca. zweifache Stimulation der CD62P-Expression durch Abciximab, jedoch nicht durch Eptifibatid oder Tirofiban, festgestellt werden. Zu dieser paradoxen Thrombozytenaktivierung kam es allerdings nur bei der suprapharmakologischen Konzentration von 10 µg/ml. Bei der Konzentration von 1 µg/ml Abciximab kam es nicht zu diesem Effekt. Interessanterweise trug dieser Patient den HPA-1-Genotyp b/b. Es konnte bei keinem weiteren Teilnehmer dieser Studie eine Thrombozytenaktivierung durch GPIIb/IIIa-Inhibitoren festgestellt werden.

Schneider et al. (2000) untersuchten die *in vitro*-Effekte der GPIIb/IIIa-Inhibitoren Abciximab und Orbofiban hinsichtlich einer möglichen paradoxen Thrombozytenaktivierung. Hierbei wurden als durchflusszytometrische Marker für Thrombozytenaktivierung zum einen P-selectin (CD62P) zum anderen CD63 verwendet. P-selectin spiegelt eine α -Granula-Degranulation wider, die CD63-Expression hingegen misst die lysosomale-Degranulation. Abciximab erhöhte eine ADP-induzierte P-selectin (CD62P)-Expression um ca. 10-20 %, während der orale GPIIb/IIIa-Inhibitor Orbofiban diesen Effekt nicht zeigen konnte. Die CD63-Expression blieb zu jeder Zeit durch die GPIIb/IIIa-Inhibitoren unbeeinflusst.

In einer anderen Arbeit (Holmes et al., 1999) konnte die selbe Gruppe zeigen, dass auch Eptifibatid eine Agonisten-induzierte P-selectin-Expression erhöhte, Xemilofiban und Tirofiban jedoch nicht.

Ihre Ausgangshypothese für diese Ergebnisse war, dass eine erhöhte Proteinmasse in den α -Granula der Thrombozyten zu einer α -Granula-Degranulation führt. Sowohl Abciximab, als auch Orbofiban konnten nach Exposition an Thrombozyten in deren α -Granula lokalisiert werden. Dabei steigerte Abciximab, welches ein Fab-Fragment eines IgG-Moleküls ist, eine Agonisten-induzierte CD62P-Expression. Orbofiban, welches zu der Gruppe der Nicht-Peptide zählt, wies diesen Effekt dagegen nicht auf. Daher gelangten sie zu dem Schluss, dass die thrombozytäre Aufnahme von Proteinen oder Peptiden in den α -Granula zu einer α -Granula-Degranulation führen könnte. Eptifibatid, welches zu den Peptid-Inhibitoren zählt, führte ebenso zu einer erhöhten Agonisten-induzierten P-Selectin-Expression. Dieser Effekt blieb bei den Nicht-Peptiden Xemilofiban und Tirofiban aus.

Abciximab konnte jedoch die ADP-induzierte lysosomale Degranulation, gemessen als CD63-Expression, nicht weiter erhöhen. Dies zeigte, dass es sich hierbei nicht um eine generalisierte Thrombozytenaktivierung handelte, sondern vielmehr um eine spezifische α -Granula-Degranulation.

Hinzufügend muss erwähnt werden, dass die Studiengröße lediglich 25 Teilnehmer betrug und dass die Studienteilnehmer gesunde Personen waren, welche in den letzten zehn Tagen vor der Studie weder Acetylsalicylsäure, noch irgendwelche anderen nicht-steroidalen Antiphlogistika eingenommen hatten.

Es stellt sich nun die Frage, welche klinische Relevanz eine *in vitro*-gemessene, lediglich um ca. 10-20 % erhöhte CD62P-Expression besitzt. In einer neueren Studie untersuchte dieselbe Arbeitsgruppe die *in vivo*-Effekte von Abciximab und Tirofiban sowohl an gesunden Probanden, als auch an Patienten mit koronarer Herzkrankheit. Sie stellten fest, dass es hierbei zu einer signifikanten Hemmung der ADP-induzierten CD62P-Expression durch die GPIIb/IIIa-Inhibitoren kam (Holmes et al., 2000).

In unserer Studie führte nur Abciximab bei einer suprapharmakologischen Konzentration zu einer paradoxen Thrombozytenaktivierung. Sie wurde als CD62P-Expression gemessen. Holmes et al. (1999) kamen zu dem zunächst ähnlichen Ergebnis, dass die ADP-induzierte P-selectin (CD62P)-Expression durch die höchste Konzentration von Eptifibatid verstärkt wurde. In unserer Arbeit dagegen induzierte Abciximab eine erhöhte CD62P-Expression nur unter basalen Bedingungen und konnte eine ADP-induzierte CD62P-Expression nicht weiter verstärken. Außerdem bewirkte Eptifibatid (0,3-3 μ g/ml), welches ein Peptid darstellt, vorliegend weder eine basale noch eine ADP-induzierte Erhöhung der CD62P-Expression.

Somit erscheint es geboten eine andere Erklärung für die paradoxe Thrombozytenaktivierung durch GPIIb/IIIa-Inhibitoren zu suchen.

Andere Arbeiten konnten ebenfalls Thrombozytenaktivierungen durch GPIIb/IIIa-Inhibitoren demonstrieren. Aufgrund der fehlenden Effektivität des oralen GPIIb/IIIa-Inhibitors Orbofiban untersuchten Cox et al. (2000) die Möglichkeit einer partiell agonistischen Aktivität. Hierbei konnten sie an den Thrombozyten von Patienten mit akutem Koronarsyndrom zeigen, dass Orbofiban sowohl eine Konformationsänderung des GPIIb/IIIa-Rezeptors, als auch eine Thrombozytenaktivierung, gemessen als CD63-Expression, herbeiführte.

Auch Dalby et al. (2003) kamen in ihrer Studie zu dem Ergebnis, dass ein GPIIb/IIIa-Inhibitor möglicherweise eine partiell agonistische Aktivität besitzt. Sie untersuchten die Effekte von Eptifibatid an 32 NSTEMI (Non-ST-Elevation Myocardial Infarction)-Patienten hinsichtlich der Thrombozytenaktivierung und stellten eine leichte Erhöhung der P-selectin (CD62P)-Expression fest.

Die Gruppe um Seiffert (2003) hingegen fand in ihrer Studie keinen Anhalt für eine Thrombozytenaktivierung durch einen GPIIb/IIIa-Inhibitor. Sie untersuchten die Effekte des oralen GPIIb/IIIa-Inhibitors Roxifiban an den Thrombozyten von 21 jungen, gesunden Versuchsteilnehmern. Diese Studie kann daher nicht als repräsentativ für ältere Patienten mit koronarer Herzkrankheit angesehen werden, die GPIIb/IIIa-Inhibitoren benötigen würden. Außerdem reichte die Teilnehmerzahl nicht aus um Individuen zu erfassen, welche möglicherweise abnorm auf GPIIb/IIIa-Inhibitoren ansprechen.

In einer anderen Arbeit konnten Peter et al. (1999) erstmals unter klinischen Bedingungen eine durch einen GPIIb/IIIa-Inhibitor induzierte Thrombozytenaktivierung und eine darauffolgende Thrombozytopenie zeigen.

Sie beobachteten 26 Patienten, die aufgrund eines akuten Myokardinfarktes in ein Klinikum eingewiesen wurden, in Bezug auf den Aktivierungszustand ihrer Thrombozyten und GPIIb/IIIa-Rezeptoren. Alle Patienten wurden mit 500 mg Acetylsalicylsäure und 5000 IU unfraktioniertem Heparin behandelt. Zusätzlich wurden 7 Patienten nur mit Abciximab behandelt, während die anderen 19 Patienten sowohl mit Abciximab, als auch mit dem Thrombolytikum Reteplase behandelt wurden.

Bei einem 63 Jahre alten Mann, welcher mit Abciximab und Reteplase behandelt wurde, kam es zu einer Thrombozytopenie zehn Minuten nach Beginn der Behandlung. Mittels Durchflusszytometrie stellten sie bei ihm eine erhöhte CD62P-Expression und eine erhöhte Fibrinogenbindung fest. Außerdem bildeten sich bei diesem Patienten Thrombozytenaggregate im Verlauf der Therapie. Diese Effekte konnten sowohl zwei, als auch vier Wochen später *in vitro* reinduziert werden. Es zeigte sich eine konzentrationsabhängige Erhöhung der CD62P-Expression durch Abciximab.

Dies zeigt eindeutig, dass es hierbei zu einer Thrombozytenaktivierung gekommen ist. Weitere Versuche nur mit Heparin oder mit Reteplase zeigten keinerlei abnormen Veränderungen der Thrombozyten, womit die Faktoren einer iatrogen induzierten Thrombozytopenie ausgeschlossen werden konnten.

Bis auf die Thrombozytenaggregate zeigten sich keine thrombotischen Komplikationen bei diesem Patienten. Seine durch Abciximab induzierten Aggregate waren klein und hatten nur eine reduzierte Stabilität. In diesem Zusammenhang wurde in früheren Studien auch gezeigt, dass Thrombozytenaggregate, induziert durch Abciximab oder RGD-Peptide, andere Charakteristika besitzen, als solche die durch ADP induziert wurden (Nakatani et al., 1996; Peter et al., 1998). Daher könnte man zu der Annahme gelangen, dass sich durch Abciximab-induzierte Thrombozytenaggregate von solchen, die durch physiologische Agonisten, wie ADP, induziert wurden, unterscheiden und möglicherweise aufgrund ihrer Größe und reduzierten Stabilität nicht zu einer Verklumpung der Gefäße führen.

Es stellt sich die Frage was den Patienten aus Peters Arbeit (1999) und unserem Patienten, bei dem die paradoxe Thrombozytenaktivierung durch Abciximab erfolgte, von den anderen Patienten oder Versuchsteilnehmern unterscheidet.

Es werden präformierte Antikörper als eine mögliche immunologische Antwort für GPIIb/IIIa-Inhibitor-induzierte Thrombozytopenie diskutiert. Es kann sich hierbei um Medikamenten-abhängige Antikörper handeln, welche „natürlich“ vorkommen oder aber durch vorherige Exposition an verschiedene Inhibitoren entstanden sind (Bougie et al., 2002; Seiffert et al., 2003). Allerdings wurden bisher noch keine anaphylaktischen Reaktionen durch Abciximab beobachtet. Zudem konnten an den Thrombozyten des Patienten von der Gruppe um Peter (1999) keine präformierten Antikörper entdeckt werden.

Somit ist das Vorhandensein von körpereigenen Antikörpern gegen bestimmte GPIIb/IIIa-Inhibitoren als Grund für eine Thrombozytenaktivierung unwahrscheinlich.

Vielmehr stellt sich die Frage, ob nicht eine Mutation im GPIIb/IIIa-Rezeptor zu einer abnormen outside-in Signaltransduktion führt, welche wiederum ein abnormes Bindungsverhalten von Abciximab an den GPIIb/IIIa-Rezeptor nach sich zieht und damit eine paradoxe Thrombozytenaktivierung hervorruft.

Da die Prävalenz einer paradoxen Thrombozytenaktivierung durch Abciximab in Peters et al. Arbeit (1999) bei 1/26 lag, wurde vorliegend die Hypothese aufgestellt, wonach der HPA-1-Polymorphismus b/b, welcher bei ca. 1/30 liegt, hieran möglicherweise beteiligt ist. Der HPA-1-Polymorphismus scheint die thrombozytäre Funktion zu beeinflussen. Manche Autoren sprechen von einer erhöhten thrombozytären Fibrinogenbindung und Thrombozytenaggregation im Zusammenhang mit dem HPA-1-Genotyp b/b (Feng et al., 1999; Goodall et al., 1999; Michelson et al., 2000; Golanski et al., 2001), während andere diese Ergebnisse nicht bestätigen konnten (Bennett et al., 2001).

Bei einer Gesamtzahl von 239 Studienteilnehmern gab es keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen HPA-1-Genotypen hinsichtlich der basalen und der ADP-induzierten CD62P-Expression durch die verschiedenen GPIIb/IIIa-Inhibitoren.

Allerdings trug der oben beschriebene Patient tatsächlich den HPA-1-Genotyp b/b. Aus unseren Ergebnissen kann abgeleitet werden, dass es sich bei der hier beschriebenen paradoxen Thrombozytenaktivierung durch den GPIIb/IIIa-Inhibitor Abciximab um ein seltenes (< 2 %) Ereignis handelt. Der in diesem Zusammenhang beschriebene HPA-1-Genotyp b/b ist möglicherweise ein mitwirkender Faktor, lässt jedoch keine zwingende Aussage diesbezüglich zu.

Es ist derzeit ungeklärt und bleibt daher abzuwarten, ob ausserdem nicht andere, vielleicht unbekannt Mutationen an dem GPIIb/IIIa-Rezeptor, oder aber Veränderungen innerhalb des outside-in Signaltransduktionsweges als überwiegende wenn nicht sogar ausschlaggebende Faktoren beteiligt sind.

In einer anderen Studie (Adderley & Fitzgerald, 2000) konnte gezeigt werden, dass bestimmte GPIIb/IIIa-Inhibitoren aufgrund einer Caspase-3-Aktivierung Apoptose in Kardiomyozyten einleiten können. Allerdings trat dieser Effekt nur bei bestimmten RGD-Peptiden auf. Abciximab hingegen war aufgrund seiner Molekülgröße nicht in der Lage die Zellmembran zu passieren. Welche Rolle dieses Phänomen in unserem Zusammenhang spielt ist unklar und es erscheint fragwürdig, ob eine klinische Relevanz gegeben ist.

Desweiteren muss erwähnt werden, dass die Mehrheit der Patienten mit koronarer Herzkrankheit aus unserer Studie mit oraler Acetylsalicylsäure behandelt wurden. Acetylsalicylsäure hemmt zwar keine ADP-induzierte Thrombozytenaktivierung im Sinne einer CD62P-Expression (Hermann et al., 2001), kann aber Abciximab-induzierte Thrombozytenaggregationen hemmen (Peter et al. 1998). Die beobachtete Thrombozytenaktivierung nach Abciximab-Infusion bei einem Patienten (Peter et al., 1999) erfolgte interessanterweise nach intravenöser Gabe von 500 mg Acetylsalicylsäure, so dass sich die Frage stellt, ob der Wirkstoff Acetylsalicylsäure in den beiden genannten Fällen möglicherweise ebenfalls eine Rolle bei der Thrombozytenaktivierung gespielt hat.

Mit dem Zusammenhang zwischen einer Thrombozytenaktivierung und der Verabreichung von Acetylsalicylsäure befassten sich andere Autoren.

So kam es bei Patienten eines Methadon-Programmes nach einmaliger oraler Gabe von 325 mg Acetylsalicylsäure zu einer paradoxen Erhöhung der CD62P-Expression. In der Kontrollgruppe, welche aus gesunden Teilnehmern bestand, konnte Acetylsalicylsäure dagegen die CD62P-Expression verringern (Malinin et al., 2001).

Weiterhin konnte die Gruppe um McKenzie (2003) zeigen, dass Acetylsalicylsäure konzentrationsabhängig die CD62P- und auch die CD63-Expression hemmt.

Li et al. (2003) hingegen stellten fest, dass Acetylsalicylsäure eine Thrombozytenaktivierung, gemessen als P-selectin (CD62P)-Expression, nicht beeinflusst. Die genannten unterschiedlichen Ergebnisse zeigen, dass es weiterer Klärung bedarf, ob der Cyclooxygenase-Hemmer in diesem Zusammenhang eine klinisch relevante Rolle spielt.

Es stellt sich die Frage, warum in der vorliegenden Arbeit nur Abciximab das Phänomen einer paradoxen Thrombozytenaktivierung zeigte, nicht jedoch Eptifibatid und Tirofiban. Abciximab unterscheidet sich von Tirofiban und Eptifibatid hinsichtlich einiger physikochemischer Eigenschaften, wie z.B. dem Molekulargewicht und der physikalischen Bindungsstelle am GPIIb/IIIa-Rezeptor. Möglicherweise spielt demnach die pharmakologische Substanzgruppe ebenfalls eine Rolle in diesem Zusammenhang.

Zudem muss erwähnt werden, dass die CD62P-Expression auf den Thrombozyten des vorliegend beschriebenen Patienten bereits unter basalen (unstimulierten) Bedingungen leicht erhöht war (Abb. 9a). Zu einer weiteren ca. zweifachen Erhöhung der CD62P-Expression kam es erst nach Gabe von Abciximab bei einer suprapharmakologischen Konzentration von 10 µg/ml. Ob die Thrombozyten schon im Vorfeld aktiviert waren und wenn ja, warum bleibt ungeklärt. Die Möglichkeit einer spontanen Thrombozytenaktivierung, welche verschiedene Mediatoren mit einbezieht, sollte zumindest nicht ausgeschlossen werden.

Schließlich sollte im Zusammenhang mit einer möglichen paradoxen Thrombozytenaktivierung nicht unerwähnt bleiben, dass die orale Gabe von GPIIb/IIIa-Inhibitoren in der Vergangenheit nicht nur klinische Unwirksamkeit gezeigt hat, sondern sogar zu einer Zunahme der Sterblichkeit geführt hat (Chew et al., 2001). Die Ursachen dafür sind unklar. In Diskussion stehen neben einem inkonstanten Wirkspiegel der Substanzen eine Thrombozytenaktivierung durch outside-in signaling.

Ob nun eine partiell agonistische Aktivität in den negativen Langzeiteffekten der GUSTO-IV-ACS-Studie (Ottervanger et al., 2003) durch Abciximab eine Rolle gespielt hat, bleibt ebenfalls zu klären.

4.5 Schlussfolgerung

Abschließend kann aus den Ergebnissen abgeleitet werden, dass es sich bei der hier beschriebenen paradoxen Thrombozytenaktivierung durch den GPIIb/IIIa-Inhibitor Abciximab um ein seltenes (< 2 %) Ereignis handelt. Der in diesem Zusammenhang beschriebene HPA-1-Genotyp b/b ist möglicherweise ein mitwirkender Faktor, lässt jedoch keinen zwingenden Schluss für eine paradoxe Thrombozytenaktivierung durch Abciximab zu. Da dieses Ereignis zudem nur bei einer suprapharmakologischen Konzentration aufgetreten ist, erscheint eine klinische Relevanz äußerst unwahrscheinlich.

5 Zusammenfassung

- (1) Es werden sowohl Konformationsänderungen der GPIIb/IIIa-Rezeptoren durch GPIIb/IIIa-Inhibitoren als auch paradoxe Thrombozytenaktivierungen durch GPIIb/IIIa-Inhibitoren diskutiert. Bis jetzt ist der Mechanismus für eine Thrombozytenaktivierung durch GPIIb/IIIa-Inhibitoren jedoch unklar. Die Häufigkeit der Thrombozytenaktivierung wurde von anderen Autoren mit 1/30 beschrieben, welche in etwa der gleichen Häufigkeit des HPA-1-Genotyps b/b entspricht. Damit scheint der HPA-1-Genotyp b/b möglicherweise die Funktion von GPIIb/IIIa-Rezeptoren zu beeinflussen. In dieser Arbeit wurde die Hypothese aufgestellt, wonach der HPA-1-Genotyp möglicherweise an der paradoxen Thrombozytenaktivierung durch GPIIb/IIIa-Inhibitoren beteiligt ist.
- (2) In der vorliegenden Arbeit wurden die *in vitro*-Effekte von Abciximab (1 und 10 µg/ml), Eptifibatid (0,3 und 3 µg/ml) und Tirofiban (3 und 30 nM) auf Thrombozyten von 62 gesunden Blutspendern aus dem Institut für Hämostaseologie und Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Düsseldorf und von 177 Patienten mit koronarer Herzkrankheit (KHK) der Klinik für Kardiologie, Pneumologie und Angiologie des Universitätsklinikums Düsseldorf untersucht. Hierbei wurde sowohl die basale, als auch die durch 3 µM ADP-induzierte CD62P-Expression mittels Durchflusszytometrie gemessen. An allen Teilnehmern dieser Studie erfolgte eine Genotypisierung hinsichtlich des HPA-1-Genotyps mittels GALIOS[®] und automatisierter Einzelmolekül-Spektroskopie.
- (3) Im Vergleich zu der Kontrollgruppe der gesunden Blutspender konnte in der Gruppe der Patienten mit KHK eine Thrombozytenhyperreaktivität festgestellt werden. Der HPA-1-Genotyp beeinflusste jedoch in beiden Gruppen weder die basale, noch die ADP-induzierte CD62P-Expression.
- (4) Nur bei einem Patienten mit koronarer Herzkrankheit konnte eine leichte, ca zweifache Stimulation der CD62P-Expression durch Abciximab, jedoch nicht durch Eptifibatid oder Tirofiban, festgestellt werden. Zu dieser paradoxen Thrombozytenaktivierung kam es jedoch nur bei der suprapharmakologischen Konzentration von 10 µg/ml. Bei der Konzentration von 1 µg/ml Abciximab kam es nicht zu diesem Effekt. Interessanterweise trug dieser Patient den HPA-1-Genotyp b/b.
- (5) Es konnte bei keinem weiteren Teilnehmer dieser Studie eine Thrombozytenaktivierung durch GPIIb/IIIa-Inhibitoren festgestellt werden. Zudem gab es keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen HPA-1-Genotypen hinsichtlich der basalen und der ADP-induzierten CD62P-Expression durch die verschiedenen GPIIb/IIIa-Inhibitoren.

- (6) Abschließend kann aus den Ergebnissen abgeleitet werden, dass es sich bei der hier beschriebenen paradoxen Thrombozytenaktivierung durch den GPIIb/IIIa-Inhibitor Abciximab um ein seltenes (< 2 %) Ereignis handelt. Der in diesem Zusammenhang beschriebene HPA-1-Genotyp b/b ist möglicherweise ein mitwirkender Faktor, lässt jedoch keinen zwingenden Schluss für eine paradoxe Thrombozytenaktivierung durch Abciximab zu. Da dieses Ereignis zudem nur bei einer suprapharmakologischen Konzentration aufgetreten ist, erscheint eine klinische Relevanz äußerst unwahrscheinlich.

6 Literatur

1. Adderley SR, Fitzgerald DJ. Glycoprotein IIb/IIIa antagonists induce apoptosis in rat cardiomyocytes by caspase-3 activation. *J Biol Chem* 2000; 275:5760-5766.
2. Ault KA, Cannon CP, Mitchell J, McCahan J, Tracy RP, Novotny WF, Reimann JD, Braunwald E. Platelet activation in patients after an acute coronary syndrome: results from the TIMI-12 trial. *J Am Coll Cardiol* 1999; 33:634-639.
3. Bennett JS. Structural biology of glycoprotein IIb-IIIa. *Trends Cardiovasc Med* 1996; 6:31-36.
4. Bennett JS, Catella-Lawson F, Rut AR, Vilaire G, Qi W, Kapoor SC, Murphy S, FitzGerald GA. Effect of the PL(A2) alloantigen on the function of beta(3)-integrins in platelets. *Blood* 2001; 10:3093-9.
5. Bougie DW, Wilker PR, Wuitschick ED, Curtis BR, Malik M, Levine S, Lind RN, Pereira J, Aster RH. Acute thrombocytopenia after treatment with tirofiban or eptifibatide is associated with antibodies specific for ligand-occupied GPIIb/IIIa. *Blood* 2002; 100:2071-2076.
6. Calvete JJ. Clues for understanding the structure and function of a prototypic human integrin. *Thromb Haemost* 1994; 72:1-15.
7. Chew DP, Bhatt DL, Sapp S, Topol EJ. Increased mortality with oral platelet glycoprotein IIb/IIIa antagonists. A meta-analysis of phase III multicenter randomized trials. *Circulation* 2001; 103:201-206.
8. Collier BS, Scudder LE. Inhibition of dog platelet function by in vivo infusion of F(ab')₂ Fragments of a monoclonal antibody to the platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor. *Blood* 1985; 66:1456.
9. Collier BS. Blockade of platelet GPIIb/IIIa receptors as an antithrombotic strategy. *Circulation* 1995; 92:2373.
10. Collier BS. Platelet GP IIb/IIIa Antagonists: The first anti-integrin receptor therapeutics. *J Clin Invest* 1997; 1467.
11. Cox D, Smith R, Quinn M, Theroux P, Crean P, Fitzgerald DJ. Evidence of platelet activation during treatment with a GPIIb/IIIa antagonist in patients presenting with acute coronary syndromes. *J Am Coll Cardiol* 2000; 36:1514-1519.
12. Dalby M, Montalescot G, Bal dit Sollier C, Vicaut E, Soulat T, Collet JP, Choussat R, Gallois V, Drobinski G, Drouet L, Thomas D. Eptifibatide provides additional platelet inhibition in Non-ST-Elevation Myocardial Infarction patients already treated with aspirin and clopidogrel. *J Am Coll Cardiol* 2004; 43:162-168.
13. Egbertson MS, Chang CT, Duggan ME, Gould RJ, Halczenko W, Hartman GD, Laswell WL, Lynch JJ Jr, Manno PD, et al. Non-peptide fibrinogen receptor antagonists. 2. Optimization of a tyrosine template as a mimic for Arg-Gly-Asp. *J Med Chem* 1994; 37:2537-2551.

14. Feng D, Lindpaintner K, Larson MG, Rao VS, O'Donnell CJ, Lipinska I, Schmitz C, Sutherland PA, Silbershatz H, D'Agostino RB, Muller JE, Myers RH, Levy D, Tofler GH. Increased platelet aggregability associated with platelet GPIIIa PLA2 polymorphism: the Framingham Offspring Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19:1142-7.
15. Fitzgerald D, Roy L, Catella F, FitzGerald GA. Platelet activation in unstable coronary disease. *N Engl J Med* 1986; 315:983-989.
16. Frelinger AL III, Lam SC-T, Plow EF, Smith MA, Loftus JC, Ginsberg MH. Occupancy of an adhesive glycoprotein receptor modulates expression of an antigenic site involved in cell adhesion. *J Biol Chem* 1988; 263:12397-402.
17. Frelinger AL, Furman MI, Krueger LA, Barnard MR, Michelson AD. Dissociation of glycoprotein IIb/IIIa antagonists from platelets does not result in fibrinogen binding or platelet aggregation. *Circulation* 2001; 104:1374-9.
18. Furman MI, Benoit SE, Barnard MR, Valeri CR, Borbone ML, Becker RC, Hechtman HB, Michelson AD. Increased platelet reactivity and circulating monocyte-platelet aggregates in patients with coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 1998; 31:352-8.
19. Gawaz MP. Das Blutplättchen: Physiologie, Pathophysiologie, Membranrezeptoren, antithrombozytäre Wirkstoffe und antithrombozytäre Therapie bei koronarer Herzerkrankung. Stuttgart; New York: *Thieme* 1999.
20. Golanski J, Golanski R, Chizynski K, Iwaszkiewich A, Rozalski M, Wieclawska B. Platelet hyperreactivity after coronary artery bypass grafting: the possible relevance to glycoprotein polymorphisms. A preliminary report. *Platelets* 2001; 12:241-7.
21. Goodall AH, Curzen N, Panesar M, Hurd C, Knight CJ, Ouwehand WH, Fox KM. Increased binding of fibrinogen to glycoprotein IIIa-proline33 (HPA-1b, PLA2, Zwb) positive platelets in patients with cardiovascular disease. *Eur Heart J* 1999; 20:742-7.
22. 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.
23. Holmes MB, Sobel BE, Howard DB, Schneider DJ. Differences between activation thresholds for platelet P-selectin and glycoprotein IIb-IIIa expression and their clinical implications. *Thromb Res* 1999; 95:75-82.
24. Holmes MB, Sobel BE, Schneider DJ. Variable responses to inhibition of fibrinogen binding induced by tirofiban and eptifibatide in blood from healthy subjects. *Am J Cardiol* 1999; 84:203-207.
25. Holmes MB, Kabbani SS, Terrien CM, Watkins MW, Sobel BE, Schneider DJ. Quantification by flow cytometry of the efficacy of an interindividual variation of platelet inhibition induced by treatment with tirofiban and abciximab. *Coron Artery Dis* 2000; 12:245-53.
26. Honda S, Tomiyama Y, Aoki T, Shiraga M, Kurata Y, Seki J, Matsuzawa Y. Association between ligand-induced conformational changes of integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ and $\alpha_{IIb}\beta_3$ -mediated intracellular Ca^{2+} signaling. *Blood* 1998; 92:3675-3683.
27. Hynes RO. Integrins: A family of cell surface receptors. *Cell* 1987; 48:549-554.

28. Italiano JE, Lecine P, Sivdasani RA, Hartwig JH. Blood platelets are assembled principally at the ends of proplatelet processes produced by differentiated megakaryocytes. *J Cell Biol* 1999; 147:1299-1312.
29. Knight DM, Wagner C, Jordan R, McAleer MF, DeRita R, Fass DN, Collier BS, Weismann HF, Ghrayeb J. The immunogenicity of the 7E3 murine monoclonal Fab antibody fragment variable is dramatically reduced in humans by substitution of human for murine constant regions. *Mol Immunol* 1995; 32:1271.
30. Krzywanek HJ. Klinische Bedeutung der Thrombozytenfunktionsdiagnostik, Gustav Fischer, Stuttgart 1987.
31. Larsson PT, Hjemdahl P, Olsson G, Angelin B, Hornstra G. Platelet aggregability in humans: contrasting *in vivo* and *in vitro* findings during sympatho-adrenal activation and relationship to serum lipids. *Eur J Clin Invest* 1990; 20:398-405.
32. Lasne D, Krenn M, Pingault V, Arnault E, Fiessinger JN, Aiach M, Rendu F. Interdonor variability of platelet response to thrombin receptor activation: influence of PL^{A2} polymorphism and efficacy of aspirin. *Br J Haematol* 1997; 99:801-807.
33. Lefkovits J, Plow EF, Topol EJ. Platelet glycoprotein IIb/IIIa receptors in cardiovascular medicine. *N Engl J Med* 1995; 332:1553-59.
34. Li N, Hu H, Hjemdahl P. Aspirin treatment does not attenuate platelet or leukocyte activation as monitored by whole blood flow cytometry. *Thromb Res* 2003; 111:165-170.
35. Li N, Hu H, Lindqvist M, Wikström-Jonsson E, Goodall AH, Hjemdahl p. Platelet-Leukocyte Cross Talk in Whole Blood. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20:2702-2708.
36. Malinin AI, Callahan KP, Serebruany VL. Paradoxical activation of major platelet receptors in the methadone-maintained patients after single pill of aspirin. *Thromb Res* 2001; 104:297-299.
37. McKenzie ME, Malinin AI, Bell CR, Dzhanashvili A, Horowitz ED, Oshrine BR, Atar D, Serebruany VL. Aspirin inhibits surface glycoprotein IIb/IIIa, P-selectin, CD63, and CD107a receptor expression on human platelets. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2003; 14:249-253.
38. Meiklejohn DJ, Urbaniak SJ, Greaves M. Platelet glycoprotein IIIa polymorphism HPA 1b (PLA2): no association with platelet fibrinogen binding. *Br J Haematol* 1999; 20:742-747.
39. Michelson AD. Flow cytometry: a clinical test of platelet function. *Blood* 1996; 87:4925-4936.
40. Michelson AD, Furman MI, Goldschmidt-Clermont P, Mascelli MA, Hendrix C, Coleman L, Hamlington J, Barnard MR, Kickler T, Christie DJ, Kundu S, Bray PF. Platelet GPIIIa Pl(A) polymorphisms display different sensitivities to agonists. *Circulation* 2000; 101:1013-8.
41. Nakatani S, Hato T, Minamoto Y, Fujita S. Differential inhibition of fibrinogen binding to agonist- and RGDS peptide-activated states of GPIIb-IIIa by an anti-GPIIIa monoclonal antibody, PMA5. *Thromb Haemost* 1996; 76:1030-1037.

42. Ndoko S, Poujol C, Combrie R, Nurden A, Nurden P. Paradoxical platelet activation was not observed on dissociation of abciximab from GPIIb-IIIa complexes. *Thromb Haemost* 2002; 87:317-22.
43. Newman PJ, Derbes RS, Aster RH. The human platelet alloantigens PL^{A1} and PL^{A2}, are associated with a leucine³³/ proline³³ amino acid polymorphism in membrane glycoprotein IIIa, and are distinguishable by DNA typing. *J Clin Invest* 1989; 83:1778-81.
44. Nieswandt B, Brakebusch C, Bergmeier W, Schulte V, Bouvard D, Mokhtari-Nejad R, Lindhout T, Heemskerk JW, Zirngibl H, Fassler R. Glycoprotein VI but not alpha2beta1 integrin is essential for platelet interaction with collagen. *EMBO J.* 2001; 20(9):2120-30.
45. Nurden AT, Nurden P. GPIIb/IIIa-Antagonisten und andere Antiintegrine, in Schrör K (Hrsg.) *Antithrombotische Pharmaka – Neue therapeutische Strategien zur Thromboseprophylaxe und –therapie.* Frechen: Dr. Schrör Verlag, 2002; 61-81.
46. Ottervanger JP, Armstrong P, Barnathan ES, Boersma E, Cooper JS, Ohman EM, James S, Topol E, Wallentin L, Simoons ML; GUSTAVO IV-ACS Investigators. Long-term results after the glycoprotein IIb/IIIa inhibitor abciximab in unstable angina: one-year survival in the GUSTO IV-ACS (Global Use of Strategies To Open Occluded Coronary Arteries IV--Acute Coronary Syndrome) Trial. *Circulation* 2003; 107:437-442.
47. Peter K, Schwarz M, Ylänne J, Kohler B, Moser M, Nordt T, Salbach P, Kubler W, Bode C. Induction of fibrinogen binding and platelet aggregation as a potential intrinsic property of various glycoprotein IIb/IIIa ($\alpha_{IIb}\beta_3$) inhibitors. *Blood* 1998; 92:3240-9.
48. Peter K, Straub A, Kohler B, Volkmann M, Schwarz M, Kübler W, Bode C. Platelet activation as a potential mechanism of GPIIb/IIIa inhibitor-induced thrombocytopenia. *Am J Cardiol* 1999; 84:519-24.
49. Phillips DR, Charo IF, Parise LV, Fitzgerald LA. The platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa complex. *Blood* 1988; 71:831-43.
50. Phillips DR, Nannizzi-Alaimo L, Prasad KSS. β_3 tyrosine phosphorylation in $\alpha_{IIb}\beta_3$ (platelet membrane GPIIb-IIIa) outside-in integrin signaling. *Thromb Haemost* 2001; 86:246-258.
51. Santos MT, Valles J, Marcus AJ, Safier LB, Broekman MJ, Islam N, Ullman HL, Eiroa AM, Aznar J. Enhancement of platelet reactivity and modulation of eicosanoid production by intact erythrocytes. *J Clin Invest* 1991; 87:571-580.
52. Scarborough RM, Naughton MA, Teng W, Rose JW, Phillips DR, Nannizzi L, Arfsten A, Campbell AM, Charo IF. Design of potent and specific integrin antagonists. Peptide antagonists with high specificity for glycoprotein IIb/IIIa. *J Biol Chem* 1993; 268:1066-1073.
53. Schneider DJ, Taatjes DJ, Sobel BE. Paradoxical inhibition of fibrinogen binding and potentiation of alpha-granule release by specific types of inhibitors of glycoprotein IIb-IIIa. *Cardiovasc Res* 2000; 45:437-46.
54. Schrör K (Hrsg.). *Abciximab – Erstes klinisch eingeführtes Antiintegrin zur Hemmung der Thrombozytenaggregation.* Frechen: Dr. Schrör Verlag, 2000.

55. Schrör K (Hrsg.). Antithrombotische Pharmaka – Neue therapeutische Strategien zur Thromboseprophylaxe und –therapie. Frechen: Dr. Schrör Verlag, 2002.
56. Schwartz MA, Schaller MD, Ginsberg MH. Integrins. *Annu Rev Cell Biol* 1995; 11:549-99.
57. Seiffert D, Stern AM, Ebling W, Rossi RJ, Barrett YC, Wynn R, Hollis GF, He B, Kieras CJ, Pedicord DL, Cromley DA, Hua TA, Stein RB, Daly RN, Sferruzza A, Pieniaszek HJ, Billheimer JT. Prospective testing for drug-dependent antibodies reduces the incidence of thrombocytopenia observed with the small molecule glycoprotein IIb/IIIa antagonist roxifiban: implications for the etiology of thrombocytopenia. *Blood* 2003; 19:58-63.
58. Seiffert D, Thomas BE, Bradley JD, Munzer DA, Tchinnas MA, Kornhauser DM, Cain VA, Hua TA, Feuerstein GZ, Martin DE, Stern AM. Effects of the glycoprotein IIb/IIIa antagonist Roxifiban on P-selectin expression, fibrinogen binding, and microaggregate formation in a phase I dose-finding study: no evidence for platelet activation during treatment with a glycoprotein IIb/IIIa antagonist. *Platelets* 2003; 14:179-187.
59. Shattil SJ, Ginsberg MH. Integrin signaling in vascular biology. *J Clin Invest* 1997; 100:S91-95.
60. The CAPTURE Investigators. Randomized placebo-controlled trial of abciximab before and during intervention in refractory unstable angina: the CAPTURE Study. *Lancet* 1997; 349:1498-1505.
61. 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; 330:956-61.
62. The EPILOG Investigators. Effect of the glycoprotein IIb/IIIa receptor inhibitor abciximab with lower heparin dosages on ischemic complications of percutaneous coronary revascularization. *N Engl J Med* 1997; 336:1689-96.
63. The EPISTENT Investigators. Randomized controlled trial to assess safety of coronary stenting with use of abciximab. *Lancet* 1998; 352:85-90.
64. The IMPACT II Investigators. Effects of competitive platelet glycoprotein IIb/IIIa inhibition with integrilin in reducing complications of percutaneous coronary intervention. *Lancet* 1997; 349:1422-28.
65. The PRISM Study Investigators. A comparison of aspirin plus tirofiban with aspirin plus heparin for unstable angina. *N Engl J Med* 1998; 338:1498-505.
66. 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; 338:1488-97.
67. 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; 339:436-43.
68. The RESTORE Investigators. Effects of platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor blockade with tirofiban on adverse cardiac events in patients with unstable angina. *N Engl J Med* 1998; 338:1498-505.

69. Topol EJ, Byzova TV, Plow EF. Platelet GPIIb-IIIa blockers. *Lancet* 1999; 353:227-31.
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; 88:907-914.
71. Walter DH, Schachinger V, Elsner M, Dimmeler S, Zeiher AM. Platelet glycoprotein IIIa polymorphisms and risk of coronary stent thrombosis. *Lancet* 1997; 350:1217-19.
72. 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(7):581-583.
73. 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; 98:1619-21.
74. Weber S, Hummel SA, Weber A-A, Zirwes RF, Weiner OH, Reuber BE. Genotyping of human platelet antigen-1 by gene amplification and labelling in one system and automated fluorescence correlation spectroscopy (FCS). *Br J Haematol* 2002; 116:839-43.
75. Weiss EJ, Bray PF, Tayback M, Schulman SP, Kickler TS, Becker LC, Weiss JL, Gerstenblith G, Goldschmidt-Clermont PJ. A polymorphism of a platelet glycoprotein receptor as an inherited risk factor for coronary thrombosis. *N Engl J Med* 1996; 334:1090-99.
76. Wheeler GL, Braden GA, Bray PF, Marciniak SJ, Mascelli MA, Sane DC. Reduced inhibition by abciximab in platelets with the P1^{A2} polymorphism. *Am Heart J* 2002; 143:76-82.
77. Zucker MB. 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, Meila D, Jacobs C, Weber S, Zotz RB, Scharf RE, Kelm M, Strauer BE, Schrör K. Low incidence of paradoxical platelet activation by glycoprotein IIb/IIIa inhibitors. *Thromb Res* 2002; 106:25-29.
2. 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(7):581-583.

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

Meinem Doktorvater, Herrn Privatdozent Dr. Artur-Aron Weber, danke ich ganz herzlich für die Überlassung des Themas, für seine stets freundliche Betreuung und für seine stete und vielseitige Unterstützung und Förderung, die es mir ermöglichten, die Experimente dieser Arbeit planmäßig zu beenden, die Ergebnisse in der Literatur zu veröffentlichen und auf einem Kongress zu präsentieren.

Dem Leiter des Instituts für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie, Herrn Professor Dr. Karsten Schrör, möchte ich für die freundliche Aufnahme in das Institut und für die Zustimmung zur Durchführung der Versuche herzlich danken.

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

Bei Frau Dr. Stephanie Weber möchte ich mich für die schnelle Genotypisierung der Versuchsteilnehmer ebenfalls herzlich bedanken.

Großer Dank gilt auch Frau Kerstin Freidel, die mir bis zuletzt bei vielen Aufgaben im Laboralltag zur Seite stand.

Meinem Kommilitonen und guten Freund, Herrn Collin Jacobs, der zeitgleich seine Doktorarbeit in dem Institut durchführte, möchte ich für die schöne, gemeinsame Zeit im Labor und während der gesamten Studienzeit herzlich danken.

Bei allen anderen Kollegen aus der Arbeitsgruppe möchte ich mich ebenfalls bedanken. Das entspannte Arbeitsklima und die Hilfsbereitschaft von allen Seiten haben meine Zeit im Labor sehr angenehm werden lassen.

Ein großes Dankeschön gilt außerdem meinen Freunden Herrn Frank Wessler und Herrn Burkart Orłowski für ihre wertvollen Ratschläge und Unterstützung bei der technischen Ausgestaltung dieser Arbeit.

Abschließend möchte ich meiner Schwester Oana-Crina Meila für das Korrekturlesen der Arbeit herzlich danken.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Meila, Dan Doru
Geburtsdatum: 01.11.1977
Geburtsort: Reschitz / Rumänien
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

Schulbildung

1984-1988 Grundsulen in Marktredwitz, Mülheim/Ruhr und Neuss
1988-1997 Alexander-von-Humboldt-Gymnasium in Neuss
06/1997 Allgemeine Hochschulreife

Zivildienst

1997 – 1998 Zivildienst beim Caritasverband für das Stadtdekanat Neuss e.V.

Studium

10/1998 Aufnahme des Studiums der Humanmedizin an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
09/2000 Ärztliche Vorprüfung
02/2001-10/2001 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
Thema: „Niedrige Prävalenz einer paradoxen Thrombozytenaktivierung durch Glykoprotein IIb/IIIa-Inhibitoren“
04/2002 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
04/2004 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
05/2005 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Niedrige Prävalenz einer paradoxen Thrombozytenaktivierung durch Glykoprotein IIb/IIIa-Inhibitoren

vorgelegt von

Dan Doru Meila

Zusammenfassung

Es werden sowohl Konformationsänderungen der Glykoprotein (GP)IIb/IIIa-Rezeptoren durch GPIIb/IIIa-Inhibitoren als auch paradoxe Thrombozytenaktivierungen durch GPIIb/IIIa-Inhibitoren diskutiert. Bis jetzt ist der Mechanismus für eine Thrombozytenaktivierung durch GPIIb/IIIa-Inhibitoren jedoch unklar. Die Häufigkeit der Thrombozytenaktivierung wurde von anderen Autoren mit 1/30 beschrieben, welche in etwa der gleichen Häufigkeit des Human platelet antigen-1 (HPA-1)-Genotyps b/b entspricht. Damit scheint der HPA-1-Genotyp b/b möglicherweise die Funktion von GPIIb/IIIa-Rezeptoren zu beeinflussen. In dieser Arbeit wurde die Hypothese aufgestellt, wonach der HPA-1-Genotyp möglicherweise an der paradoxen Thrombozytenaktivierung durch GPIIb/IIIa-Inhibitoren beteiligt ist.

In der vorliegenden Arbeit wurden die *in vitro*-Effekte von Abciximab (1 und 10 µg/ml), Eptifibatid (0,3 und 3 µg/ml) und Tirofiban (3 und 30 nM) auf Thrombozyten von 62 gesunden Blutspendern aus dem Institut für Hämostaseologie und Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Düsseldorf und von 177 Patienten mit koronarer Herzkrankheit (KHK) der Klinik für Kardiologie, Pneumologie und Angiologie des Universitätsklinikums Düsseldorf untersucht. Hierbei wurde sowohl die basale, als auch die durch 3 µM Adenosindiphosphat (ADP)-induzierte CD62P-Expression mittels Durchflusszytometrie gemessen.

An allen Teilnehmern dieser Studie erfolgte eine Genotypisierung hinsichtlich des HPA-1-Genotyps mittels GALIOS[®] und automatisierter Einzelmolekül-Spektroskopie.

Im Vergleich zu der Kontrollgruppe der gesunden Blutspender konnte in der Gruppe der Patienten mit KHK eine Thrombozytenhyperreaktivität festgestellt werden. Der HPA-1-Genotyp beeinflusste jedoch in beiden Gruppen weder die basale, noch die ADP-induzierte CD62P-Expression.

Nur bei einem Patienten mit koronarer Herzkrankheit konnte eine leichte, ca. zweifache Stimulation der CD62P-Expression durch Abciximab, jedoch nicht durch Eptifibatid oder Tirofiban, festgestellt werden. Zu dieser paradoxen Thrombozytenaktivierung kam es jedoch nur bei der suprapharmakologischen Konzentration von 10 µg/ml. Bei der Konzentration von 1 µg/ml Abciximab kam es nicht zu diesem Effekt. Interessanterweise trug dieser Patient den HPA-1-Genotyp b/b.

Es konnte bei keinem weiteren Teilnehmer dieser Studie eine Thrombozytenaktivierung durch GPIIb/IIIa-Inhibitoren festgestellt werden. Zudem gab es keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen HPA-1-Genotypen hinsichtlich der basalen und der ADP-induzierten CD62P-Expression durch die verschiedenen GPIIb/IIIa-Inhibitoren.

Abschließend kann aus den Ergebnissen abgeleitet werden, dass es sich bei der hier beschriebenen paradoxen Thrombozytenaktivierung durch den GPIIb/IIIa-Inhibitor Abciximab um ein seltenes (< 2 %) Ereignis handelt. Der in diesem Zusammenhang beschriebene HPA-1-Genotyp b/b ist möglicherweise ein mitwirkender Faktor, lässt jedoch keinen zwingenden Schluss für eine paradoxe Thrombozytenaktivierung durch Abciximab zu. Da dieses Ereignis zudem nur bei einer suprapharmakologischen Konzentration aufgetreten ist, erscheint eine klinische Relevanz äußerst unwahrscheinlich.