

Aus der Radiologischen Universitätsklinik Tübingen  
Geschäftsführender Direktor: Professor Dr. C. D. Claussen  
Abteilung für Radiologische Diagnostik  
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. C. D. Claussen

**Flowzytometrisches Monitoring  
von GP IIb/IIIa Blocker Abciximab  
und Wertebestimmung nach Thrombolyse  
mit Reteplase und Urokinase  
im Vergleich bei Patienten  
mit peripheren Gefäßverschlüssen**

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT  
der Eberhard-Karls-Universität  
zu Tübingen

vorgelegt von  
**RALF ANDLER**  
aus Gomaringen

2004

Köhler Druck Tübingen

Dekan: Professor Dr. C. D. Claussen  
1. Berichterstatter: Privatdozent Dr. G. Tepe  
2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. A. Scheule

# Inhaltsverzeichnis

Einleitung: .....	1
Thrombozyten und ihre Bedeutung im Gerinnungssystem.....	3
alpha – Granula:.....	3
dichte Granula (dense granules):.....	4
Lysosomen:.....	4
Peroxisomen:.....	4
Thrombozyten und Thrombusentstehung.....	4
Der Thrombin-Antithrombin-III-Komplex (TAT).....	6
β-Thromboglobulin:.....	6
Integrine und ihre Bedeutung:.....	8
Selectine und ihre Bedeutung bei der Thrombozytenaggregation.....	9
P-Selectin (CD 62, GMP 140, PADGEM):.....	9
Immunoglobuline, Cadherine, Proteoglykane und Mucine.....	9
Thrombusentstehung, pharmakologische Beeinflussung und der Stellenwert von GP IIb/IIIa-Rezeptorblockern:.....	10
Substanzen, die eine Blockade des GP IIb/IIIa-Rezeptors hervorrufen können:.....	11
Entwicklung und Forschung an GP IIb/IIIa – Rezeptorblockern .....	13
Genetischer Polymorphismus und Faktoren, welche die Wirkung der Rezeptorblockade beeinflussen.....	14
Bisherige Erkenntnisse aus der Reteplase – GP IIb/IIIa – Blocker – Forschung.....	15
Überwachungsmöglichkeiten einer Therapie mit GP IIb/IIIa-Antagonisten.....	15
Fragestellung:.....	16
Einsatz eines durchflusszytometrischen Messsystems zur Evaluierung einer möglichen GP IIb/IIIa-Rezeptor-Resistenz.....	18
Material und Methoden:.....	19
Der Durchflusszytometer FACSCalibur (Fluorescence Activated Cell Scan): .....	19
Die Geschichte des Durchflusszytometers:.....	20
Der Aufbau eines Durchflusszytometers.....	22

Das Flüssigkeitssystem.....	22
Die Optik.....	23
Die Elektronik.....	28
Dotplot:.....	28
Histogramm:.....	28
Geräteeinstellungen.....	30
Schwellenwert (Threshold): .....	31
Photodetektoren: .....	31
Verstärker (Amplifier): .....	31
Kompensation: .....	31
Erstellen eines Gates:.....	34
Die Auswertung:.....	34
Die heutige Anwendungen des Durchflusszytometers:.....	35
1. In der Routinediagnostik: .....	35
2. In der Grundlagenforschung:.....	35
Benutzte Antikörper, Puffer, Medikamente, etc.....	36
Benutztes Material bei der Blutabnahme:.....	37
Monovetten: .....	37
Blutentnahme.....	37
In vitro Messung der Abciximab-Bindung und der Fibrinogenbindung an Thrombozyten bei verschiedenen Abciximab-Konzentrationen in der FACS-Analyse.....	38
Protokoll der Lysebehandlung:.....	38
Protokoll für die Präparation der Thrombozyten und die Durchführung der FACS-Analyse:.....	40
Ergebniswiedergabe:.....	41
Protokoll des Schockgefrierens zur TAT und $\beta$ -Tg Bestimmung:.....	41
Die TAT-Wertebestimmung:.....	42
Prinzip: .....	42
Auswertung: .....	43
Die $\beta$ -Tg-Wertebestimmung:.....	43
Auswertung: .....	44
Ergebnisse:.....	45

Indirektes Monitoring der Abciximab-Bindung an Thrombozyten durch Flowzytometrie.....	45
Vergleich Reteplase-Urokinase.....	51
Die Wirkung der Thrombozytenaktivierung auf den TAT-Komplex:.....	54
Die Wirkung der Thrombozytenaktivierung auf den $\beta$ -Thromboglobulin-Verlauf:.....	59
In-vitro Vergleich eines in-vivo Nonresponders mit einem gesunden Probanden: .....	60
Diskussion.....	63
Die Bedeutung des Flowzytometers für das Monitoring der Rezeptorblockade.....	63
Beurteilung der Rezeptorbindung.....	64
Die Rezeptorblockade von Reteplase und Urokinase im Vergleich.....	65
$\beta$ -Thromboglobulin und TAT-Antithrombin-Komplex Werte nach heparinierter Lysetherapie mit darauffolgender Abciximabgabe:.....	66
Vergleich eines Abciximab-Nonresponders mit einem Normalprobanden und der Einfluss der Genetik:.....	67
Komplikationen.....	69
Zusammenfassung.....	69



# **Flowzytometrisches Monitoring von GP IIb/IIIa Blocker Abciximab und Wertebestimmungen nach Thrombolyse mit Reteplase und Urokinase im Vergleich bei Patienten mit peripheren Gefäßverschlüssen**

## **Einleitung:**

Seit geraumer Zeit ist die thrombolytische Therapie immer mehr zur Routinetherapie bei akuten und subakuten Verschlüssen der unteren Extremität geworden. Allerdings wurden bei dieser Therapie eine hohe technische Fehlerrate, eine lange Lysezeit und eine recht hohe Rate an Reokklusionen (zwischen 20% und 50%) beobachtet<sup>1</sup>. In einer 1998 durchgeführten Studie (TOPAS) wurde die Lysetherapie mit Urokinase mit der chirurgischen Therapie verglichen. Die Reduktion der offenen Eingriffe bei der Urokinasegruppe konnte allerdings die lange Dauer der Lysetherapie und die höhere Rate an Blutungskomplikationen nicht aufwiegen<sup>2</sup>. Hauptprobleme waren die Dissoziationsresistenz der Thrombozyten<sup>3</sup>, sowie die Neigung der Plättchen sich an der Thrombusoberfläche erneut zu akkumulieren<sup>4</sup>. Daher ist der gegenwärtige Standard eine Zusatztherapie mit Aspirin, einem relativ schwachen Thrombozyteninhibitor, und Heparin<sup>5</sup>. Da erste Studien mit Fibrinolytika kombiniert mit Abciximab bei koronaren Verschlüssen gute Ergebnisse gezeigt hatten<sup>6,7</sup>, wurde in Tübingen die PROMPT- Studie

durchgeführt. Bei Patienten mit akuten oder subakuten Verschlüssen zeigte sich die Therapie unter Abciximab, Urokinase, Heparin und Aspirin als sicher und vielversprechend. Eine schnellere Thrombusdissolution, sowie ein verbessertes amputationsfreies Überleben konnten für die Abciximabgruppe nachgewiesen werden, wenngleich die (nicht verhängnisvolle) Blutungsrate leicht zunahm<sup>8,9</sup>.

Das ursprüngliche Fibrinolytikum t-PA ist weiterentwickelt worden, um verbesserte Lyseeigenschaften mit geringerem Blutungsrisiko zu erreichen. Reteplase (r-PA) ist eine rekombinant produzierte rt-PA (Alteplase) Variante der 3. Generation. Es hat eine geringere Fibrinbindung und eine längere Halbwertszeit als Alteplase<sup>10 11</sup>. In früheren Arbeiten (RAPID) konnte bei r-PA eine höhere Offenheitsrate (v.a. nach 30 min) als bei rt-PA nachgewiesen werden<sup>d1</sup>, wohingegen die GUSTO-III-Studie keinen signifikanten Unterschied unter der akuten Myokardinfarkttherapie darlegen konnte<sup>12</sup>. Hess et al. berichtete über einen grossen klinischen Fortschritt, eine verkürzte Therapiedauer und keinen Anstieg an systemischen Blutungen oder Embolisationen beim Gebrauch von t-PA bei peripheren Gefässverschlüssen<sup>13</sup>. Momentan aber ist Urokinase das einzige Medikament, welches in den USA und Deutschland zur Lysetherapie bei peripheren Gefässverschlüssen anerkannt ist.

Die APART-Studie beabsichtigte nun das therapeutische Potential und die Sicherheit der lokal gegebenen Kombination Abciximab mit Reteplase bei peripheren Verschlüssen zu testen. Dabei wurden 18 Patienten mit Abciximab und Reteplase und 6 Patienten mit Abciximab und Urokinase behandelt und der GP IIb/IIIa -Rezeptorbesatz flowzytometrisch bestimmt. Ausserdem wurde die Entwicklung der beta-Thromboglobulin-Werte, sowie der TAT-Werte bestimmt und beobachtet.



## **Thrombozyten und ihre Bedeutung im Gerinnungssystem**

Die 1 – 4 µm großen Thrombozyten, auch Blutplättchen genannt, haben ihre wichtigsten Aufgaben im Rahmen der Blutstillung, der Gefäßreparatur und der Entzündung. Auch bei thrombotischen Vorgängen und bei der Entstehung der Arteriosklerose spielen Thrombozyten eine entscheidende Rolle. 5 bis 11 Tage nachdem sie im Knochenmark gebildet worden sind, werden sie in Lunge, Leber und vor allem in der Milz abgebaut. Die Organellenzone der Thrombozyten, das Granulomer, enthält Mitochondrien, Glykogenvesikel und Granula. Ausserdem verfügen Thrombozyten über Enzyme der Glykolyse, des Pentosephosphatzyklus, des Zitronensäurezyklus der Atmungskette und über ATP-ase<sup>14</sup>. Der für die Blutgerinnung wichtige Plättchenfaktor 3 (TAT) ist Bestandteil der äußeren Thrombozytenmembran und somit kein Inhaltsstoff der Thrombozyten<sup>15</sup>. Außerdem wird aus der Zellmembran Arachidonsäure freigesetzt, welche in Tromboxane umgewandelt wird, und somit die Aggregationsneigung der Plättchen steigert und die Konstriktion von Arterien fördert<sup>16</sup>.

Von den Granula gibt es 4 verschiedene Arten<sup>17</sup>:

### **alpha – Granula:**

Die in den alpha – Granula gespeicherten Proteine sind für die Adhäsion, die Blutstillung und die Blutgerinnung der Thrombozyten sehr wichtig: Fibrinogen, Fibronectin, der von-Willebrand-Faktor, das β-Thromboglobulin, der Plättchenfaktor 4, PDGF, Faktor V, Faktor VII, Thrombospondin, Kallikrein und Antiplasmin werden alle in den alpha-Granula gespeichert.

**dichte Granula (dense granules):**

Sie speichern die Energie in Form von ATP, ADP, GTP, GDP, Calcium und Serotonin, welche für die Speicherfunktion, die Blutstillung und den Erhalt der Thrombozytenstruktur absolut notwendig ist.

**Lysosomen:**

Sie enthalten lysosomale Enzyme (z.B. saure Hydrolasen).

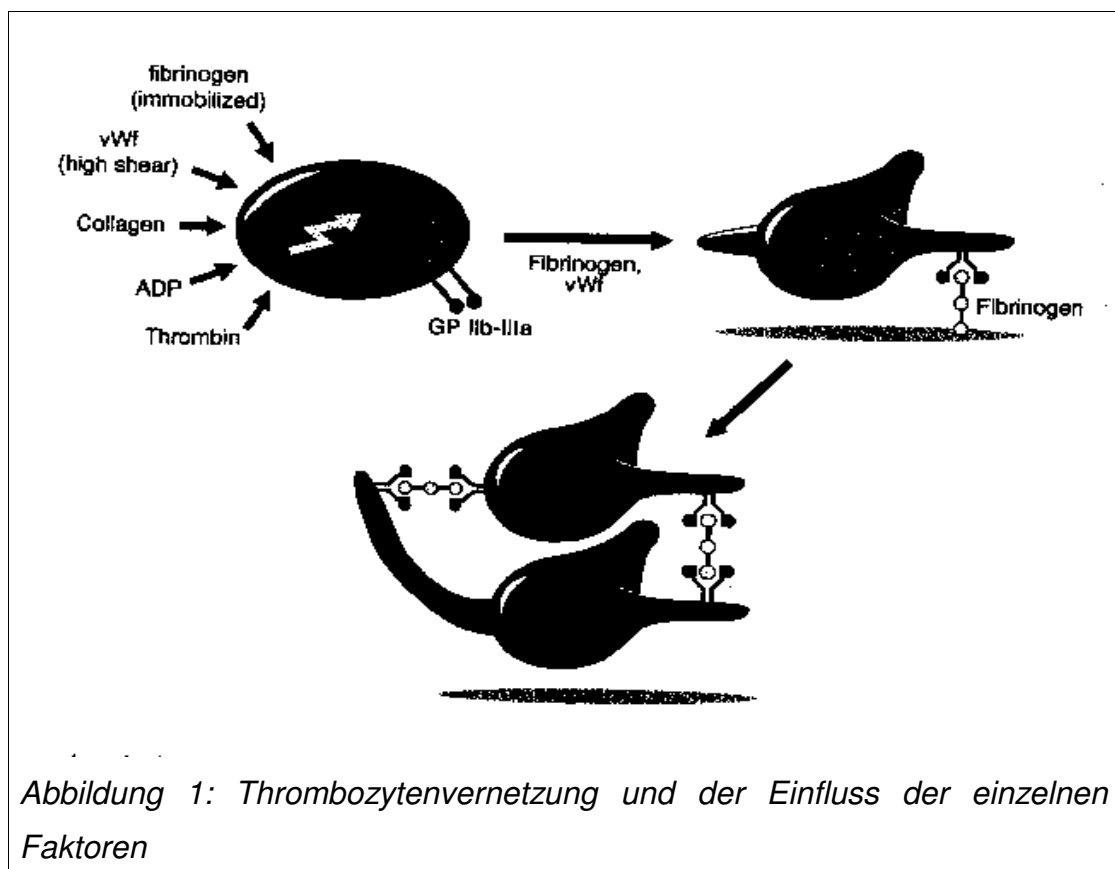
**Peroxisomen:**

Sie liegen in geringer Zahl vor und besitzen Peroxidaseaktivität.

**Thrombozyten und Thrombusentstehung**

Durch einen Kontakt der Thrombozyten mit Kollagen oder vWF an einer Gefäßverletzung oder einem arteriosklerotischen Plaque kommt es zur Thrombozytenadhäsion, also zu einer Anheftung an die Gefäßwand. Die Thrombozytenrezeptoren GP Ib und GP Ia/IIa der Thrombozytenmembran vermitteln die Bindung an die Glykoproteine Kollagen und vWF. Dies führt schließlich zur Ausbildung einer Thrombozytenschicht im Bereich des Gefäßwanddefektes<sup>18</sup>. Dabei sind es sowohl der Vorgang der Adhäsion als auch das Vorhandensein der Agonisten, unter anderem Fibrinogen, vWF, Kollagen, ADP und Thrombin, die die Thrombozytenaktivierung induzieren können. Die Thrombozyten, die in unstimuliertem Zustand als diskoide Partikel vorliegen, verändern hierbei ihre Form derart, dass sie Kugelform annehmen und stachelartige Fortsätze ausbilden (shape change). Weiterhin kommt es zu einer Ausschüttung der Inhalte von alpha- und elektronendichten Granula (Sekretionsreaktion) sowie zu einer Konformationsänderung des GP IIb/IIIa-

Rezeptors von einem niedrig affinen in einen hoch affinen Bindungszustand für Fibrinogen. Im Rahmen dieser Vorgänge werden einzelne Thrombozyten nun untereinander verknüpft, wobei die Bindung des bivalenten Fibrinmoleküls an den GP IIb/IIIa-Rezeptor den Kontakt unter den Thrombozyten vermittelt. Fibrinogen dient somit als Brücke und vermittelt so die Thrombozytenaggregation (siehe Skizze)<sup>19</sup>. Es bildet sich so der weiße Abscheidungsthrombus. Prostazyklin, welches kontinuierlich aus dem Gefäßendothel freigesetzt wird, verhindert die zu weite Ausbreitung des Thrombus. Im Prozess der sekundären Hämostase wird die verletzte Gefäßstelle aufgrund der Fibringerinnung durch Blutgerinnsel endgültig verschlossen. Andere Blutzellen wie Erythrozyten oder Leukozyten lagern sich ein und bilden den sogenannten roten Abscheidungsthrombus<sup>20</sup>.



## **Der Thrombin-Antithrombin-III-Komplex (TAT)**

Die Aufgabe des Proteinaseinhibitors Antithrombin III (AT III), einem in der Leber synthetisierten Glykoproteins (Molekulargewicht 65000 Dalton), ist die Inaktivierung von Thrombin. Dieser Thrombin-Antithrombin-III-Komplex (TAT) ist ein irreversibler kovalenter äquimolarer 1:1 Enzym-Inhibitorkomplex unter Beteiligung des aktiven Zentrums. Auch andere Serinproteasen des Gerinnungssystems werden, wenn auch mit geringerer Aktivität, vom TAT gehemmt. Durch Verabreichung von Heparin kommt es zu einer katalytischen Beschleunigung der Komplexbildung zwischen AT III und den aktivierten Gerinnungsfaktoren um ein Vielfaches. Heparin bindet an die Lysinseite des AT III und erreicht dadurch eine Konformationsänderung des AT III-Moleküls. Die nun hervorgehobene Argininseite interagiert mit den Serinproteasen sofort. Diese Interaktion wird mit Heparin als Cofaktor bei Thrombinhemmung 400-fach und bei F Xa-Inaktivierung 200-fach beschleunigt<sup>21</sup>. Ebenfalls beschrieben worden ist eine direkte allosterische Modifikationswirkung des Heparins am Thrombin, was eine bessere Anbindung an AT III zur Folge haben soll. Die Thrombingenerierung kann vom Heparin jedoch nicht vollständig unterdrückt werden<sup>22</sup>. Eine vollständige Heparinisierung kann die Aktivierung des Gerinnungssystems via F XII nicht unterdrücken, und es kommt zu einer Thrombingenerierung<sup>23</sup> und zu erhöhten TAT-Spiegeln<sup>24</sup>. Bei Zugabe von Glykoproteinrezeptorantagonisten zeigte sich eine Abnahme der TAT-Formation und eine Senkung der Thrombingenerierung im ganzen Blut. Die Gerinnungszeit verlängerte sich<sup>25</sup>.

### **β-Thromboglobulin:**

Das Protein β-Thromboglobulin, welches bei der Aktivierung der Plättchen aus den alpha-Granula freigesetzt wird, hat ein Molekulargewicht von 36000 Dalton. Taomoto beschreibt sechs Untereinheiten zu je 6.000 Dalton<sup>26</sup>. Van Oost et al. geht eher von einem Tetramer β-Globulin aus. Die bisher bekannte Funktion

des  $\beta$ -Tg besteht in der Kontrolle verschiedenster Regulationsmechanismen. Diese beinhalten proteolytische Prozesse von Chemokinvorläufern, Oligomerformationen und der verschiedenartige Gebrauch von Rezeptoren, welche auf Neutrophile Granulozyten ansprechen<sup>27</sup>. Die Halbwertszeit von  $\beta$ -Thromboglobulin beträgt 100 min<sup>28</sup>. Für den mittleren Plasmalevel von  $\beta$ -Tg werden in der Literatur unterschiedliche Zahlen genannt: Sie reichen von 17,8 ng/ml Plasma bei Kaplan et al.<sup>29</sup> bis zu 30,8 ng/ml Plasma bei Ludham<sup>30</sup>.

$\beta$ -Tg wird in den Nieren katabolisiert und 0,1-0,5% des zirkulierenden  $\beta$ -Tg's sind im Urin des Gesunden nachweisbar<sup>31</sup>. Dies geschieht durch einen biphasischen Eliminationsmechanismus: Die schnellere Komponente dauert ca. 6,4 min, die langsame 68,4 min<sup>32</sup>. Der normale mittlere  $\beta$ -Tg-Gehalt im Morgen-Urin beträgt 175 pg/ml<sup>33</sup>. Guzzo et al. geht von einer mittleren Produktion von 57 ng/d/100 mg Kreatinin aus<sup>34</sup>.

Da  $\beta$ -Tg von aktivierten Plättchen freigesetzt wird, dient es in mehreren Studien als Indikator des Ausmaßes der Plättchenaggregation. Es ist bekannt, dass es bei der Bestimmung aus dem Blutplasma durch eine falsche Blutabnahmetechnik leicht zu falsch hohen Werten kommen kann. Durch das Stauen der Venen kann bereits eine Aktivierung der Plättchen hervorgerufen werden<sup>35</sup>. Lande et al. empfiehlt die arterielle Blutabnahme, da sie die in vivo  $\beta$ -Tg Konzentration besser reflektiert<sup>36</sup>. Da aus technischen Gründen bei dieser Studie keine konstant auf die selbe Art und Weise durchgeführte Blutentnahme möglich war (siehe Material und Methoden), sollte dies bei der Wertebeurteilung mit berücksichtigt werden.

Untersuchungen bezüglich der Wirkung von Glykoproteinrezeptorblockern auf die  $\beta$ -Tg-Freisetzung zeigten bisher unterschiedliche Ergebnisse: Die DuPont Merck Pharmaceutical Company konnte keinen direkten Einfluss feststellen, es konnte jedoch trotzdem unter Antagonistengabe eine reduzierte Thrombozytenzahl festgestellt werden<sup>37</sup>. Bei einer Studie mit Schweinenieren konnte unter GP IIa/IIIb Gabe ein erhöhter  $\beta$ -Tg-Wert in der Kontrollgruppe nachgewiesen werden<sup>38</sup>.

## **Integrine und ihre Bedeutung:**

Integrine gehören zur Gruppe der Zelladhäsionsmoleküle. Die Aufgabe dieser Glykoproteine besteht in der Verknüpfung von Zellen untereinander und im Anhaften von Zellen an der Oberfläche. Als Membranrezeptoren verbinden sie die Liganden im Bereich der Zelloberfläche mit dem Zytoskelett im Inneren der Zelle<sup>39</sup>. Alle Integrine bestehen aus 2 nichtkovalent gebundenen Untereinheiten, der alpha- und der beta-Untereinheit. Beide Untereinheiten durchdringen die Zellmembran und bestehen aus einem intrazellulären, einem transmembranären und einem extrazellulären Anteil<sup>40</sup>.

Der thrombozytäre GP IIb/IIIa-Rezeptor wird zur Gruppe der Integrine gezählt und gehört dabei zur Unterfamilie der Zytoadhäsine<sup>41</sup>. Er besitzt unter anderem eine Bindungsstelle für Fibrinogen und vermittelt die Thrombozytenaggregation, wobei bivalente Fibrinogenmoleküle als Brücke zwischen einzelnen Thrombozyten dienen<sup>42</sup>. Die Untersuchung der Glanzmann Thrombasthenie, bei der ein erbliches GP IIb/IIIa Defizit vorliegt, trug zum Verständnis des Rezeptors bei. Erkrankte Patienten weisen eine gegenüber der Norm verlängerte Blutungszeit auf und neigen zu Haut- und Schleimhautblutungen<sup>43</sup>. Ungefähr 100.000 Kopien des GP IIb/IIIa-Rezeptors, von denen etwa 80 % auf der Oberfläche sitzen, sind bei einem normalen Thrombozyten vorhanden. Der verbleibende Rezeptorpool befindet sich in der Membran des mit der Oberfläche verbundenen kanalikulären Systems und in der Membran der alpha-Granula. Diese Rezeptoren werden bei einer Thrombozytenaktivierung ebenfalls an der Oberfläche exprimiert<sup>44</sup>. Die Erkennungssequenz für den Rezeptor ist das Tripeptid Arg-Gly-Asp (RGD-Sequenz). Diese Sequenz findet sich bei einer ganzen Reihe von Liganden, unter anderem Fibrinogen, Fibronektin, Thrombospondin, Vitronektin, Laminin und Kollagen Typ1. Die Bindung dieser Moleküle an den Rezeptor wird unter anderem über die RGD-Sequenz vermittelt<sup>45</sup>.

## **Selectine und ihre Bedeutung bei der Thrombozytenaggregation**

In Abhängigkeit von dem Zelltyp, auf dem sie exprimiert werden, werden die Selectine als L-Selectin (Lymphozyten), E-Selectin (Endothel) und P-Selectin (Plättchen) bezeichnet<sup>46</sup>. Diese Zell-Adhäsionsmoleküle sind darauf spezialisiert, Leukozyten aus dem Blutstrom an die Gefäßwand zu binden<sup>47</sup>. Außerdem gehören die Auslösung intrazellulärer Signalkaskaden und die Regulation von Zell-Zell Interaktionen von Monozyten, Lymphozyten, Thrombozyten und Endothelzellen zu Aufgabengebieten der Selectine<sup>48</sup>.

### **P-Selectin (CD 62, GMP 140, PADGEM):**

Das P-Selectin findet sich in thrombozytären alpha-Granula, aber auch in endothelialen Weibel-Palade-Körpern. Die Ausschüttung des P-Selectins wird über Thrombin, Histamin und andere Speichergranula reguliert<sup>49</sup>. Nach Aktivierung der Thrombozyten oder Endothelzellen wird P-Selectin auf deren Oberfläche exprimiert und kann insbesondere bei Thrombozyten als Aktivierungsmarker benutzt werden<sup>50</sup>. P-Selectin bindet an verschiedene Leukozyten-Subtypen wie Neutrophile Granulozyten und Monozyten und vermittelt Interaktionen zwischen Thrombozyten und Leukozyten, aber auch zwischen Endothelzellen und Leukozyten<sup>51</sup>.

## **Immunoglobuline, Cadherine, Proteoglykane und Mucine**

Die Aufgabe der Immunoglobuline liegt vorwiegend in der Adhäsion, aber auch in der Transmigration von Leukozyten (ICAM-1, ICAM-2, VCAM-1). Endothelzellinteraktionen werden ebenfalls durch Immunoglobuline vermittelt (PECAM-1).

Cadherine dienen vor allem dem Erhalt von tight- und gap-junctions.

Proteoglykane vermitteln sowohl die Bindung von Lymphozyten an mukosale high endothelial venules als auch die Bindung von Endothelzellen an verschiedene Kollagentypen, Fibronektin und Thrombospondin.

Der thrombozytäre GP Ib-IX-Komplex ist das bekannteste Zell-Adhäsionsmolekül der Mucin-Familie. Es besitzt eine Thrombin- und eine vWF-Bindungsstelle und bindet nichtaktivierte Thrombozyten an das Subendothel<sup>52</sup>.

### **Thrombusentstehung, pharmakologische Beeinflussung und der Stellenwert von GP IIb/IIIa-Rezeptorblockern:**

Wie bereits beschrieben beruht der Verschluss eines Blutgefäßes auf dem komplexen Zusammenspiel zwischen Gefäßwand, der plasmatischen Gerinnungskaskade und den Thrombozyten. Eine Thrombosenentstehung wird wie von Virchow 1856 beschrieben von den Faktoren Gefäßwandläsion, reduzierte Strömungsgeschwindigkeit und Hyperkoagulabilität begünstigt<sup>53</sup>. Es ergeben sich nun zusätzlich zu den oben erwähnten Pharmaka weitere zahlreiche Ansätze für eine pharmakologische Intervention:

Der thrombozyteninhibierende Effekt der Thienopyridine Clopidogrel und Ticlopidin beruht auf der selektiven Bindungshemmung von ADP an seinem Rezeptor auf den Thrombozyten. Dadurch wird die ADP-induzierte Aktivierung thrombozytärer Stoffwechselwege und somit die ADP-induzierte Ausschüttung des Inhaltes der elektronendichten und der alpha-Granula, die Fibrinogenbindung an Thrombozyten und die ADP-induzierte Thrombozytenaggregation inhibiert<sup>54</sup>. Clopidogrel stellt im Gegensatz zu Ticlopidin die auf das hämatopoetische System bezogene deutlich nebenwirkungsärmere Variante dar. Aus diesem Grund könnte Clopidogrel eine erweiterte und sicherere Nutzung dieser potenten Stoffgruppe thrombozyteninhibierender Substanzen ermöglichen<sup>55</sup>.

Die Wirkung von Acetylsalicylsäure beruht auf der Hemmung der Bildung von Thromboxan A<sub>2</sub> im Thrombozyten. Eine wichtige Rolle dabei spielt die irreversible Inaktivierung der Cyclooxygenase durch Acetylierung<sup>56</sup>.



Diese Medikamente haben mit vielen anderen antithrombogenen Medikamenten eines gemeinsam: Es wird bei der Thrombozytenaktivierung immer nur ein Anteil inhibiert, während der Thrombozyt nach wie vor über die nicht blockierten Wege oder Agonisten aktiviert werden kann. Die Inhibition ist somit nicht vollständig.

Alle Thrombozytenaktivierungswege haben jedoch einen, den letzten Schritt, gemeinsam: Die Konformationsänderung des GP IIb/IIIa-Rezeptors aus dem niedrig affinen in den hoch affinen Bindungszustand des Fibrinogens. Dies führt zur Bindung von Fibrinogen und zur Kreuzvernetzung von Thrombozyten<sup>57</sup>. Das bedeutet nun, dass die Rezeptorblockade unabhängig von dem jeweiligen Agonisten ist und die Ausbildung eines Thrombus somit potent verhindert.

### **Substanzen, die eine Blockade des GP IIb/IIIa-Rezeptors hervorrufen können:**

- ❖ Disintegrine sind Polypeptide, die auch in manchen Schlangengiften enthalten sind<sup>58</sup>.
- ❖ Es gibt Peptide, welche die RGD-Sequenz enthalten. Sie führen in vitro zu einer effektiven Hemmung des Rezeptors. Deshalb wurden zahlreiche chemisch synthetisierte meist polycyclische RGD-Analoga entwickelt, die als Inhibitoren Ladung und Konformation der RGD-Sequenz imitieren. Tirofiban und Lamifiban gehören zu den parenteral verabreichten RGD-Analoga, oral aktive GP IIb/IIIa-Antagonisten befinden sich in klinischer Erprobung<sup>59</sup>.
- ❖ Abciximab gehört zu den monoklonalen Antikörpern. Abciximab ist das chimäre Mensch-Maus Fab-Fragment c7E3. Die Immunogenität des Antikörpers in vivo wird durch die humanen Sequenzen herabgesetzt<sup>60</sup>.

<b>Substanz</b>	<b>Struktur</b>	<b>K<sub>D</sub>(nmol/l)</b>	<b>Integrinselektivität</b>	<b>Indikation</b>
<i>Abciximab</i>	<i>Mensch / Maus-  Chimärer  monoklonaler Fab</i>	<i>5</i>	<i>Alpha<sub>v</sub>Beta<sub>IIIb</sub>,  GP IIb/IIIa,  Mac-1</i>	<i>PTCA</i>
<i>Tirofiban</i>	<i>Non-Peptid</i>	<i>15</i>	<i>GP IIb/IIIa</i>	<i>ACS</i>
<i>Eptifibatid</i>	<i>Zyklisches Peptid</i>	<i>120</i>	<i>GP IIb/IIIa</i>	<i>ACS, PTCA</i>
<i>Lamifiban</i>	<i>Peptidomimetikum</i>	<i>9,4</i>	<i>GP IIb/IIIa</i>	<i>In Erprobung (Phase III)</i>

*Tabelle 1: Übersicht über die Pharmakologischen Eigenschaften der GP IIb/IIIa-Inhibitoren Abciximab, Tirofiban, Eptifibatide und Lamifiban<sup>61</sup>*

Die Dissoziationskonstante  $K_D$  repräsentiert im Allgemeinen Affinitätskonstanten und beruht auf präzisen biochemischen Berechnungen. Sie ist gleich dem Ausmaß der Dissoziation einer pharmakologischen Substanz von ihrem Rezeptor geteilt durch das Ausmaß der Assoziation dieses Komplexes. Abciximab ist somit relativ hochaffin, Eptifibatid, Lamifiban und Tirofiban sind im Gegensatz dazu niedrigaffin. Frühere Berechnungen haben gezeigt, dass ungefähr 67 % der klinisch verabreichten Bolusmenge von Abciximab an Thrombozyten bindet<sup>62</sup>.

## Entwicklung und Forschung an GP IIb/IIIa – Rezeptorblockern

Im Februar 1990 wurde Abciximab als erster GP IIb/IIIa – Rezeptor – Antagonist auf den kommerziellen Markt gebracht. Entdeckt wurde Abciximab als Mäuse mit humanen Thrombozyten immunisiert und auf die Entwicklung von Antikörpern, welche die Bindung von Thrombozyten an mit Fibrinogen überzogenen beads hemmen sollten, untersucht worden waren. Durch die Entfernung seines Fc-Fragmentes konnten die Gefahren der Komplementaktivierung, sowie der Eliminierung durch das RES verringert werden. DNA-Sequenzen, welche für die konstanten Domänen des Antikörpers kodieren, wurden zu 50% durch korrespondierende humane Immunglobulin-Sequenzen ersetzt, um die potentielle Immunogenität des Antikörpers in vivo zu verringern<sup>63,64</sup>. 1990 wurden dann Phase I – Versuche an normalen Probanden durchgeführt, gefolgt von Phase II – Versuchen an Hochrisikopatienten unter PTCA (percutaneous transluminal coronary angioplasty) 1991. Die entscheidende Phase III – Studie, die Evaluation des 7E3 – Fragmentes für die Prävention von ischämischen Komplikationen wurden am American College of Cardiology Scientific Sessions im März 1993 präsentiert (EPIC)<sup>65</sup>. Der initiale Nutzen der Abciximab - Bolus- (0,25 mg/kg) + Infusionsgabe (12 h mit 10 µg/min) im Vergleich zur Placebogabe konnte in der Folgezeit bestätigt werden: 29 mal weniger Myokardinfarkte, 54 mal weniger Reokklusionen und 18 Tote weniger unter 1000 behandelten Patienten waren die Ergebnisse einer 1997 veröffentlichten Studie<sup>66</sup>. Die EPILOG – Studie bewertete dann die Effizienz sowohl an Niedrig- als auch an Hochrisikopatienten unter PTCA<sup>67</sup>. Das Blutungsrisiko, das bei der EPIC – Studie als hoch eingestuft worden war, konnte hierbei stark reduziert werden. Die Evaluation der Thrombozyteninhibition IIb/IIIa unter der Stenttherapie zeigte positive Ergebnisse am Herzen in der EPISTENT – Studie<sup>68</sup>. Auch die GP IIb/IIIa – Behandlung bei Carotisstenosen war sicher und ohne erhöhtes Risiko für intrakranielle Blutungen<sup>69</sup>. Bei der Stroke – Behandlung konnten inzwischen ebenfalls positive Ergebnisse unter der GP IIb/IIIa – Behandlung beobachtet werden: Infarktgebiete waren deutlich kleiner in der

Rezeptorantagonistengruppe<sup>70</sup>. Die Forschung über GP IIb/IIIa – Rezeptorenblocker im Zusammenhang mit PAD (peripheral artery disease) kam inzwischen zu folgendem Ergebnis: Frühe Reokklusionen und zwischenzeitliche Restenosen bei Hochrisikopatienten konnten reduziert werden. Mit Abciximab behandelte Patienten zeigten vermehrt Komplikationen in Form von starken Nachblutungen. Als auslösende Faktoren wurden unter anderem Hypertension, Nierenmissbildung und Heparin genannt<sup>71</sup>. Eine seltene aber schwerwiegende Komplikation stellt die Beobachtung einer tiefgreifenden Thrombozytopenie dar, welche wahrscheinlich auf eine idiopathische Alteration von Glykoproteinen der Thrombozytenmembran zurückzuführen ist<sup>72</sup>.

## **Genetischer Polymorphismus und Faktoren, welche die Wirkung der Rezeptorblockade beeinflussen**

Bisherige Analysen der GP IIb/IIIa – Blockade haben gezeigt, dass der Rezeptorbesatz von der Thrombozytenzahl invers abhängig ist. Der Einfluss der Fibrinogenmenge wird gegenwärtig noch diskutiert<sup>73</sup>.

In Bezug auf die Genetik werden vor allem der Polymorphismus des PI(A) – Glykoprotein IIIa – Genes, sowie des HPA-I (human platelet antigen-I) – Genes erforscht. Dabei stellte sich folgende genotypische Verteilung des für das PI(A) – Gen in der Bevölkerung heraus: PI(A2/A2) 3,4 %, PI(A1/A2) 24,7 % und PI(A1/A1) 71,9 %<sup>74</sup>. Eine relative Resistenz der PI(A2) – positiven Patienten, sowie eine verringerte Abciximab – Wirkung für PI(A1/A2) – Thrombozyten ist beschrieben worden<sup>75</sup>. Dabei wird die vermehrte P-Selektin Expression, die verstärkte Rezeptoraktivierung und Fibrinogenbindung des GP IIb/IIIa – Rezeptors bei PI(A2) – Genträgern verantwortlich gemacht. Im Vergleich des heterozygoten mit dem homozygoten PI(A2) – Gen zeigen die Patienten mit dem heterozygoten Allel eine höhere Sensitivität gegenüber antithrombotischen Medikamenten<sup>76</sup>. Ein Einfluss des HPA-I – Genes auf die Fibrinogenbindung ließ sich nicht nachweisen<sup>77</sup>. In Bezug auf die Abciximab – Wirkung könnte das HPA-Ib/b-Gen in Form einer Stimulation von CD62P – Expression beitragen<sup>78</sup>.

## **Bisherige Erkenntnisse aus der Reteplase – GP IIb/IIIa – Blocker – Forschung**

Bei der Frage nach der Kombinationstherapie Reteplase/GP – Rezeptorblocker sind vor allem die Studien SPEED, GUSTO IV und GUSTO V zu nennen, welche ihre Forschung an Koronargefäßen betrieben haben: In der SPEED – Studie konnte eine Häufung der frühen Reperfusion im Vergleich zur alleinigen Reteplase - Therapie nachgewiesen werden<sup>79</sup>. Auch die GUSTO IV – Studie beschrieb die Kombination als sicher und effektiv<sup>80</sup>. Eine weitere Veröffentlichung, die sich mit den Nebenwirkungen aus den beiden Studien befasst hatte, wies aber auf die zu große Reokklusionsrate und auf die vom Alter abhängigen intrakraniellen Blutungen hin<sup>81</sup>. In der daraufhin groß angelegte Multicenter – Studie GUSTO V (n=16588) kam man zu dem Ergebnis, dass die Kombinationstherapie der einfachen Therapie mit Reteplase zwar nicht überlegen aber auch nicht unterlegen war. Eine leichte absolute Abnahme (0,3 %) der 30 – Tage – Sterberate sowie eine beständige Abnahme sekundärer Komplikationen sprachen für, extrakranielle Blutungshäufungen gegen die Kombination<sup>82</sup>.

## **Überwachungsmöglichkeiten einer Therapie mit GP IIb/IIIa-Antagonisten**

Nachdem bei den GP IIb/IIIa-Antagonisten inzwischen auch über eine Langzeittherapie nachgedacht wird, sind die Fragen nach Therapieüberwachung und individueller Dosisanpassung diskutiert worden. Die Frage nach dem richtigen Therapieparameter ist noch offen.

Einige Methoden stellen die Methoden der konventionellen Thrombozytenaggregometrie wie zum Beispiel die Lichttransmissions- oder die Impedanz-Methode dar. Hierbei wird die Formation großer Thrombozytenaggregate erfasst. Größenänderungen von Thrombozytenaggregaten in Zusammenhang mit Stimulation oder mit dem

Einfluss thrombozyteninhibierender Medikation können über das Prinzip der Lichtstreuung gemessen werden<sup>83</sup>. Die GP IIb/IIIa-Rezeptorblockade kann mit Hilfe eines radioaktivitätsmarkierten Antikörper-Assays detektiert werden<sup>84</sup>. Darüberhinaus wurde ein Messassay beschrieben, das mit Hilfe von mit Fibrinogen beschichteten beads die Auswirkungen einer GP IIb/IIIa-Rezeptorblockade anhand der Agglutination dieser beads mit Thrombozyten nach Stimulation erfasst<sup>85</sup>. Schließlich ist die Durchflusszytometrie auch als ein Instrument zur Erfassung pharmakodynamischer Aspekte der Therapie mit GP IIb/IIIa-Antagonisten beschrieben worden<sup>86</sup>. Eine direkte durchflusszytometrische Detektion von Abciximab mit Hilfe eines Antikörpers, der durch die Immunisierung von Kaninchen mit Abciximab gewonnen und anschliessend mit Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt wurde, konnte erreicht werden<sup>87</sup>. Der Einsatz des fluoreszenzgekoppelten Disintegrins Echistatin, der Einsatz eines Antikörpers gegen LIBS-Epitope auf GP IIb/IIIa und der Einsatz von fluoreszenzgekoppeltem c7E3 stellen indirekte durchflusszytometrische Messmethoden dar<sup>88</sup>. Eine direkte Beurteilung der Rezeptorfunktion über die Erfassung der Fibrinogenbindung ist im Jahre 2000 beschrieben worden<sup>89</sup>. Im Kapitel „Material und Methoden“ wird das Verfahren der Durchflusszytometrie genauer beleuchtet.

### **Fragestellung:**

Die Behandlung des Problems der Reokklusion nach Lysetherapie in peripheren Arterien wird schon lange versucht medikamentös zu lösen. Ziel dieser Arbeit ist es, die Bindung von Abciximab, einem GP IIb/IIIa-Rezeptor-Blocker, an den Thrombozyten flowzytometrisch zu erfassen und dabei die Veränderung der Thrombozytenaktivierung durch  $\beta$ -Thromboglobulinbestimmungen und TAT-Wertebestimmungen darzustellen. Unterschiede zwischen den verschiedenen Fibrinolytika Reteplase und Urokinase sollten hierbei herausgearbeitet werden.

Die Arbeit gliedert sich demnach folgendermaßen:

Detektion der Substanz Abciximab auf der Thrombozytenoberfläche und die Erfassung der prozentualen Belegung der GPIIb/IIIa-Bindungsstellen mittels Durchflusszytometrie

Erfassung der Kinetik der Thrombozytenmarker Thromboglobulin und Thrombin-Antithrombin III-Komplex

Der Nachweis der Bindungsstellenbelegung wurde hier in vitro indirekt über den Vergleich eines zu Abciximab kompetitiven und eines nicht kompetitiven Antikörpers, welche kommerziell erhältlich sind, durchgeführt. Allen Proben, sowohl der Probe mit dem kompetitive Antikörper als auch der Probe mit dem nicht kompetitive Antikörper als auch einer Vergleichsprobe, wurde ein fluoreszenzmarkierender sekundärer Antikörper zugegeben, um den Rezeptorbesatz in der FACS-Analyse sichtbar zu machen.

Folgende Fragen standen im Vordergrund:

- Inwieweit erreicht der GP-Rezeptorblocker eine therapeutische Dosis von 80% und wie ist der Verlauf des Rezeptorbesatzes innerhalb der ersten 48 Stunden?
- Ist dies mit Hilfe der oben angegebenen Antikörper und dem Durchflusszytometer nachweisbar und ist diese Methode auch als routinemäßiges Monitoring zu verwenden?
- Ändert sich hierbei etwas, wenn man anstatt Urokinase Reteplase als Fibrinolytikum verwendet?
- Wie verhält sich der thrombozytäre Aktivationsstatus im Hinblick auf die Parameter  $\beta$ -Thromboglobulin und TAT-Komplex?

## **Einsatz eines durchflusszytometrischen Messsystems zur Evaluierung einer möglichen GP IIb/IIIa-Rezeptor-Resistenz**

Im Rahmen der bisher erwähnten durchflusszytometrischen Untersuchungen sollte bei einem auf Abciximab-Gabe nicht ansprechenden Patienten überprüft werden, ob es Resistenzen gegen den Rezeptorblocker gibt.

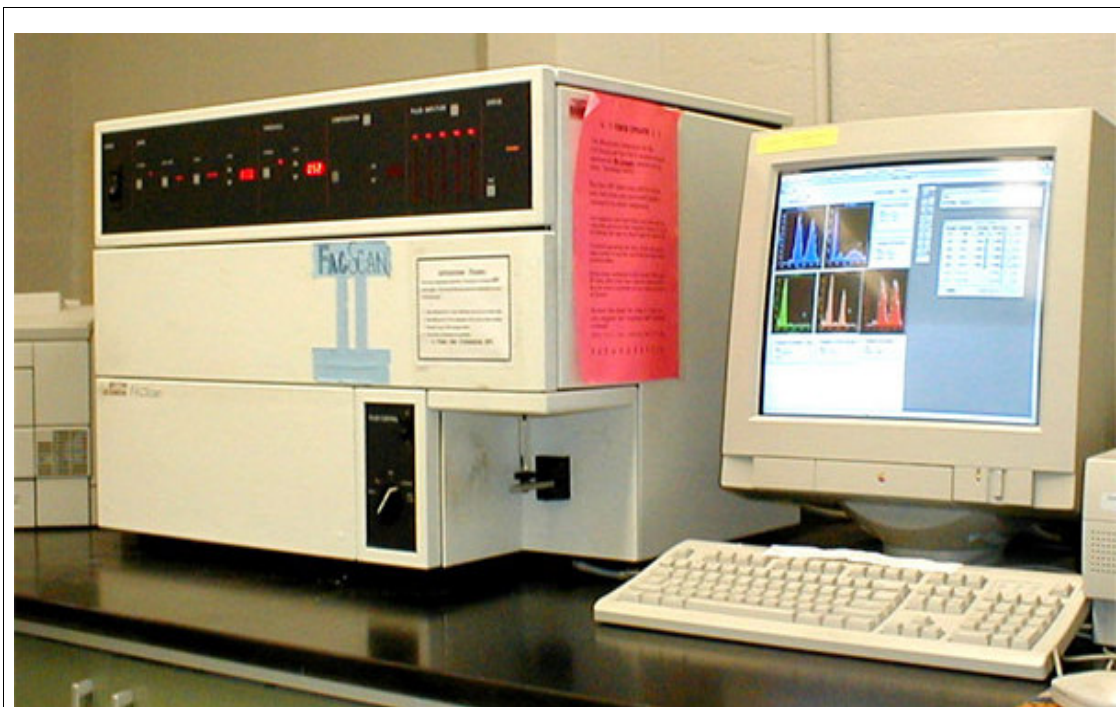
Folgende Fragen standen hierbei im Vordergrund:

- Wie verhält sich der Rezeptorbesatz bei steigender Zugabe von Abciximab in vitro im Vergleich zu einem Normalprobanden?
- Lässt sich der Befund des Nichtansprechens auf Abciximab in vitro bestätigen?
- Gibt es Hinweise auf genetische Variabilitäten des GP IIb/IIIa-Rezeptors, die den Befund erklären könnten?



## Material und Methoden:

### *Der Durchflusszytometer FACSCalibur (Fluorescence Activated Cell Scan):*



*Abbildung 2: Flowzytometer mit angeschlossenem Computersystem*

## **Die Geschichte des Durchflusszytometers:**

Schon in den 40er und 50er Jahren des letzten Jahrhunderts wurde das Fluoreszenzmikroskop entwickelt. Bei diesem Verfahren werden Zellsuspensionen oder Gewebsschnitte mit Antikörpern die mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt sind inkubiert und unter fluoreszierendem Licht auf das Vorhandensein und auf das Verteilungsmuster antigener Strukturen betrachtet.

In den 50 er Jahren folgte dann die Coulter-Technologie: Bei dieser Technik wird über den elektrischen Widerstand einer Zelle das Zellvolumen bestimmt. Die Zellen fließen dabei in einer isotonen Kochsalzlösung durch das Messsystem und werden dort gemessen.

Dittrich und Göhde waren es dann, die 1969 das erste Durchflusszytometer konstruierten. In einer durchflusszytometrischen Messzelle, konnte die Fluoreszenz von Ethidiumbromid gemessen werden.

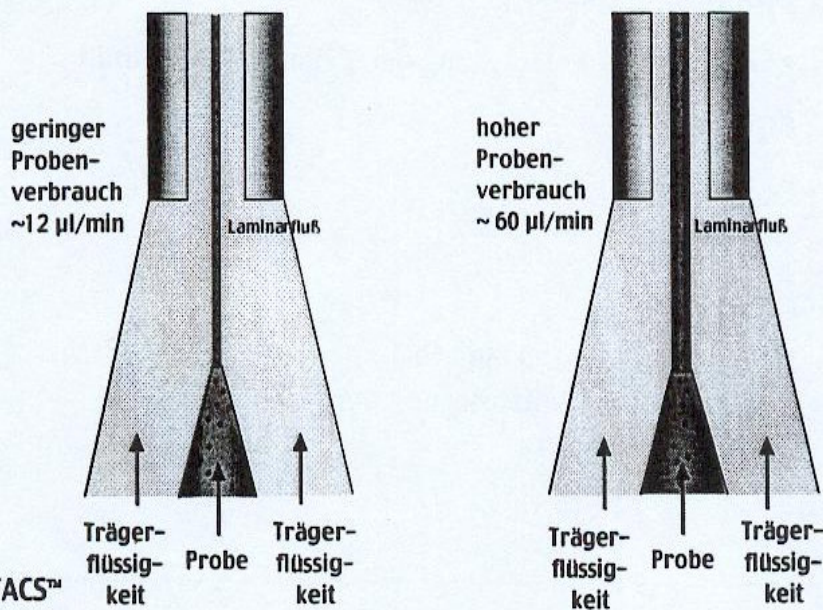
Die Einführung der hydrodynamischen Fokussierung verbesserte das System in der darauf folgenden Zeit: Hierbei werden die Zellen in die Mitte eines laminaren Hüllstroms eingeführt, wodurch verhindert wird, dass mehrere Zellen gleichzeitig die Messzelle passieren. Das von Van Dilla 1969 beschriebene Durchflusszytometer wurde genau in diesem Punkt verbessert und besaß außerdem ein verbessertes optisches System und einen Argon-Laser als Lichtquelle. Das Gerät wurde zur Messung von Feulgen-DNA-Färbung von CHO-(Chinesischen-Hamster-Ovar)-Zellen eingesetzt. Weiterhin wurde diese Methode zur Bestimmung von Oberflächenantigenen und zum Sortieren von Leukozyten verwendet.

# Probenfluß in der Meßküvette

(FACSCalibur™, FACScan™, FACSort™)

niedriger Probendruck

hoher Probendruck



11

Abbildung 3: Das Prinzip der hydrodynamischen Fokussierung bei niedrigem und hohem Probendruck. Je niedriger der Druck, desto schmaler der Probenfluß und desto geringer der Probenverbrauch.

Das von uns benutzte FACScan (Becton Dickinson, Heidelberg) arbeitet ebenfalls nach dem Prinzip der hydrodynamischen Fokussierung: Über eine Probenkapillare wird die Zellsuspension angezogen und in die laminare Strömung einer Trägerflüssigkeit (Hüllstrom) eingebracht. Mithilfe einer Lichtquelle kann schließlich die Lichtbrechung oder die Fluoreszenz von Antikörpern, die auf der Oberfläche der untersuchten Objekte gebunden haben, gemessen werden.

## Der Aufbau eines Durchflusszytometers

Ein Durchflusszytometer besteht aus drei kombinierten Komponenten:

- Das Flüssigkeitssystem: Gewährleistet die Zufuhr und Fokussierung der Zellen im Messpunkt.
- Die Optik: Zuständig für Anregung und Detektion der Zellen.
- Die Elektronik: Sorgt für die Umwandlung der optischen in relative elektronische Signale und digitalisiert die Daten für die Computeranalyse.

### Das Flüssigkeitssystem

Das Flüssigkeitssystem besteht aus einer Luftpumpe, zwei Druckreglern, einem Trägerflüssigkeitsbehälter, einem Trägerflüssigkeitsfilter, einem Probedruckluftregler, einem Probenröhrchen, einer Messküvette und ein Abfallbehälter.

Die *Luftpumpe* sorgt für einen positiven Luftdruck im Probenkreislauf und im Tröpfchensammelsystem. Dieser Luftdruck wird jeweils über einen *Luftdruckregler* kontrolliert.

Der *Trägerflüssigkeitsbehälter* hat ein Volumen von 4 Litern und enthält Flüssigkeit für 3 Stunden Laufzeit. Ein Füllstandsdetektor zeigt an, wenn der Behälter beinahe leer ist. Eine Metallplatte sichert das Gefäß bei Betrieb, da der Behälter in Betrieb unter Überdruck steht. Der Überdruck kann über einen Kippschalter und über ein Druckablassventil abgelassen werden.

Der Füllungszustand des 4 Liter fassenden *Abfallbehälters* wird ebenfalls über einen Flüssigkeitsdetektor angezeigt.

Der 0,22-µm große *Trägerflüssigkeitsfilter* reinigt die Trägerflüssigkeit vor dem Eintritt in die Durchflussküvette und verringert die Menge an Partikeln in der

Trägerflüssigkeit.

Den Transport der Zellen aus dem *Probenröhrchen* in die *Messküvette* wird von der Probennadel übernommen. Steht das Gerät im RUN-Modus, dann wird Druck auf die Probe gegeben und der Transport in Gang gesetzt. Die äußere Umhüllung der Nadel ist Bestandteil eines Tröpfchensammelsystems. Im PAUSE-Modus läuft ständig Trägerflüssigkeit aus der Probennadel, um Verschleppungen zu vermeiden. Mittels einer Vakuumpumpe aspiriert nun das Tröpfchensammelsystem diese Flüssigkeit, transportiert sie zum Abfallbehälter und verhindert so Spritzer auf dem Labortisch. Die Vakuumpumpe wird durch den Haltearm aktiviert beziehungsweise deaktiviert.

Nur eine am Ende jedes Arbeitstages durchgeführte Reinigung der Nadel mittels FACSafe und FACSRinse gewährleistet, dass Tröpfchensammelsystem und Probennadel nicht verstopfen.

## **Die Optik**

Die Optik des Flowcytometers funktioniert nach dem Prinzip der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie. Kleinste Strukturen bis hinunter zu einem Durchmesser von 10 nm können mit dieser Methode sichtbar gemacht werden. Lichtquelle des Flowcytometers ist ein luftgekühlter Argon-Laser mit einer Wellenlänge von 488 nm. Dies entspricht dem Absorptionsmaximum der unten genannten Fluoreszenzfarbstoffe. Über die hydrodynamische Fokussierung kann jede Zelle einzeln an dem Laser vorbeigeführt werden.

Das Licht des Laserstrahls wird mit einer Sammellinse aufgefangen und mit Hilfe einer Photodiode in elektrischen Strom umgewandelt. Dieses entlang der Achse des Laserstrahls aufgefangene Signal wird Forwardscatter (FSC/ Vorwärtsstreulicht) genannt und ist proportional zur Zelloberfläche und somit auch proportional zur Zellgröße.

Das in 90° zur Achse des Laserstrahls reflektierte Licht wird durch mehrere Brewsterspiegel- das sind Spiegel, die das Licht zum Teil durchlassen und zum Teil reflektieren- aufgeteilt. Hierbei wird ein Signalverstärker, ein so genannter

Photo Multiplier Tube (PMT) verwendet. Das resultierende Signal, der Sidewardscatter (SSC/ Seitwärtsstreulicht), ist proportional zu Zellkomplexität oder Zellgranularität. Verschiedene Farbfilter sorgen dafür, dass nur die Wellenlängenbereiche selektiv gemessen werden, welche von Fluoreszenz-Molekülen ausgesandt werden, die vom Laserstrahl angeregt wurden.

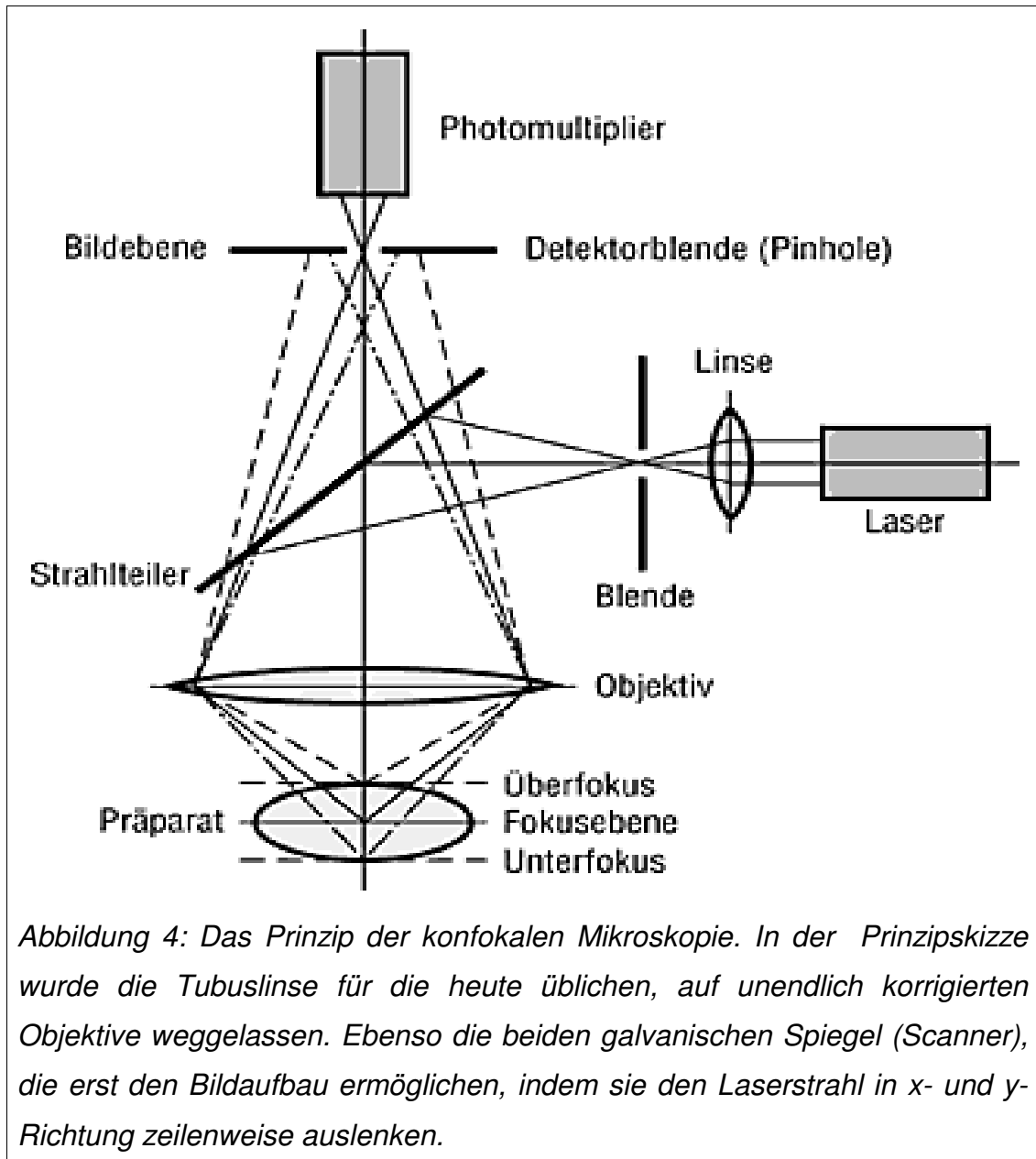
Die Beladung der Zelle mit Fluoreszenz-Molekülen hängt dabei von der Probenvorbereitung ab. Die Zellsuspension kann mit verschiedenen Substanzen, wie in dieser Studie mit Antikörpern, die mit bis zu drei verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelt sind, dotiert werden.

Das Fluorochrom absorbiert die Energie des Laserlichtes und lässt sie in Form von Vibration oder durch Emission eines Photons höherer Wellenlänge wieder frei. Bei diesem Vorgang werden drei Stadien durchlaufen: Die Exzitation, in der das Fluoreszenzmolekül das Photon absorbiert, der angeregte Zustand, bei dem in 1-10 ns ein Konformationswechsel unter Energieabgabe stattfindet, und die Emission, in der ein Photon emittiert wird, welches eine größere Wellenlänge aber eine geringere Energie als das absorbierte Photon hat. Das emittierte Fluoreszenzlicht ist proportional zur Zahl der gebundenen Fluorochrommoleküle.

In der vorliegenden Arbeit wurde vor allem mit dem FITC-Fluorochrom gearbeitet. Dieser Fluoresceinisothiocyanat-Farbstoff wird bei 492 nm maximal angeregt und hat somit sein Absorptionsmaximum nahe der Wellenlänge des Argonlasers des FACScan. Das Emissionsmaximum liegt bei 520 nm. Nachteil des Farbstoffes sind eine schnellere Ausbleichung unter Lichteinwirkung und eine mangelhafte Wirkung im sauren Milieu.

Es können so verschiedene Oberflächenrezeptoren, DNA- und RNA-Gehalt der Zelle, intrazelluläre Ionen oder der intrazelluläre pH-Wert dargestellt werden.

Über die CELLQuest-Software kann erreicht werden, dass das Gerät bei jeder Messung immer eine vorgeschriebene Zellzahl erfasst, in unserer Studie waren es immer 10.000 Zellen je Messung. Eine Bestimmung der Zellkonzentration einer Probe ist unter normalen Bedingungen nicht möglich.

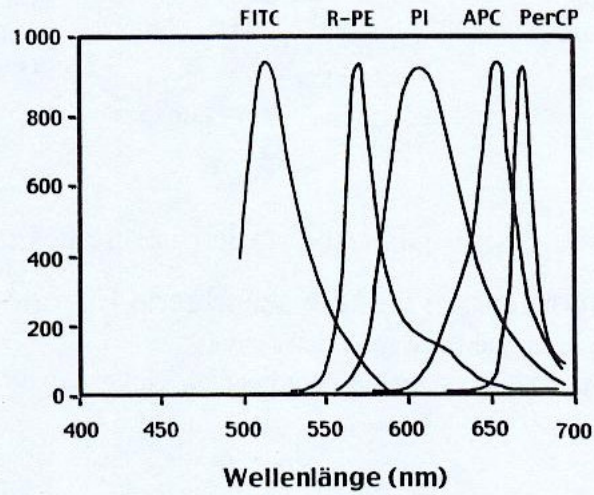


	<b>Spektralbereich des Filters</b>	<b>Farbe</b>	<b>Fluoreszenzmolekül</b>
<b>FL 1</b>	515-545 nm	grün	FITC (Fluoresceinisothiocyanat)
<b>FL 2</b>	565-585 nm	orange	R-PE (Phycoerythrine)
<b>FL 3</b>	575-620 nm	rot	PI: Propidium Iodid

*Tabelle 2: Die verschiedenen Fluoreszenzbereiche und ihre Überlappungen des FACSCalibur*



# Emissionsspektrum (= Fluoreszenzspektrum)



FACS™  
Academy

7

Abbildung 5: Das Emissionsspektrum der unterschiedlichen Filter

## Die Elektronik

Die Elektronik wandelt die optischen Signale in elektrische Spannungspulse um, analysiert die Höhe (H), die Fläche und die Weite des Spannungspulses, digitalisiert die Daten und übermittelt diese an den Computer zur Analyse. Diese Auswertung der Messungen erfolgt im Analog-Digital-Wandler: Je nach der Spannung des elektrischen Impulses (0-10, 23 V) jeder Einzelmessung wird diese in einen von meistens 1024 Kanälen, welche binär kodiert sind, klassifiziert. Die Nummer des Kanals hängt also von der Spannung (0,01V pro Kanal) des Impulses und somit von der Intensität der Fluoreszenz beziehungsweise des FSC oder SSC ab.

Für jede Zelle werden bis zu fünf binäre Codes, nämlich FSC, SSC und bis zu drei Fluoreszenzen gespeichert. Diese Werte hängen von der Geräteeinstellung ab und sind somit als relativ zu bewerten.

Es gibt 2 Verfahren für die Darstellung der erhobenen Daten:

### ➤ **Dotplot:**

Bei dieser Form der Darstellung werden zwei Parameter gegeneinander aufgetragen. Jede Zelle erscheint hierbei als Punkt im Diagramm. Besonders geeignet ist diese Darstellungsform für die Parameter FSC und SSC, weil somit einzelne Zellpopulationen anhand ihrer Größe und ihrer Granularität abgegrenzt werden können.

### ➤ **Histogramm:**

Das Histogramm gibt die Häufigkeitsverteilung in einer Probe wieder. Auf der Y-Achse wird die Zahl der gemessenen Zellen, also die Häufigkeit der „Events“ aufgetragen, auf der X-Achse sind die einzelnen Kanäle, also die relative Fluoreszenz, FSC oder SSC dargestellt. Für die weitere Auswertung wird in der

Regel der Mittelwert (mean fluorescence) verwendet, der allerdings anfällig für „Ausreißer“ ist. Ebenso kann aber auch der Prozentsatz der Zellen bestimmt werden, der einen relativen Wert übersteigt. Hierfür wird an der Schnittstelle zwischen Negativ- und Positivkontrolle ein Marker gesetzt.

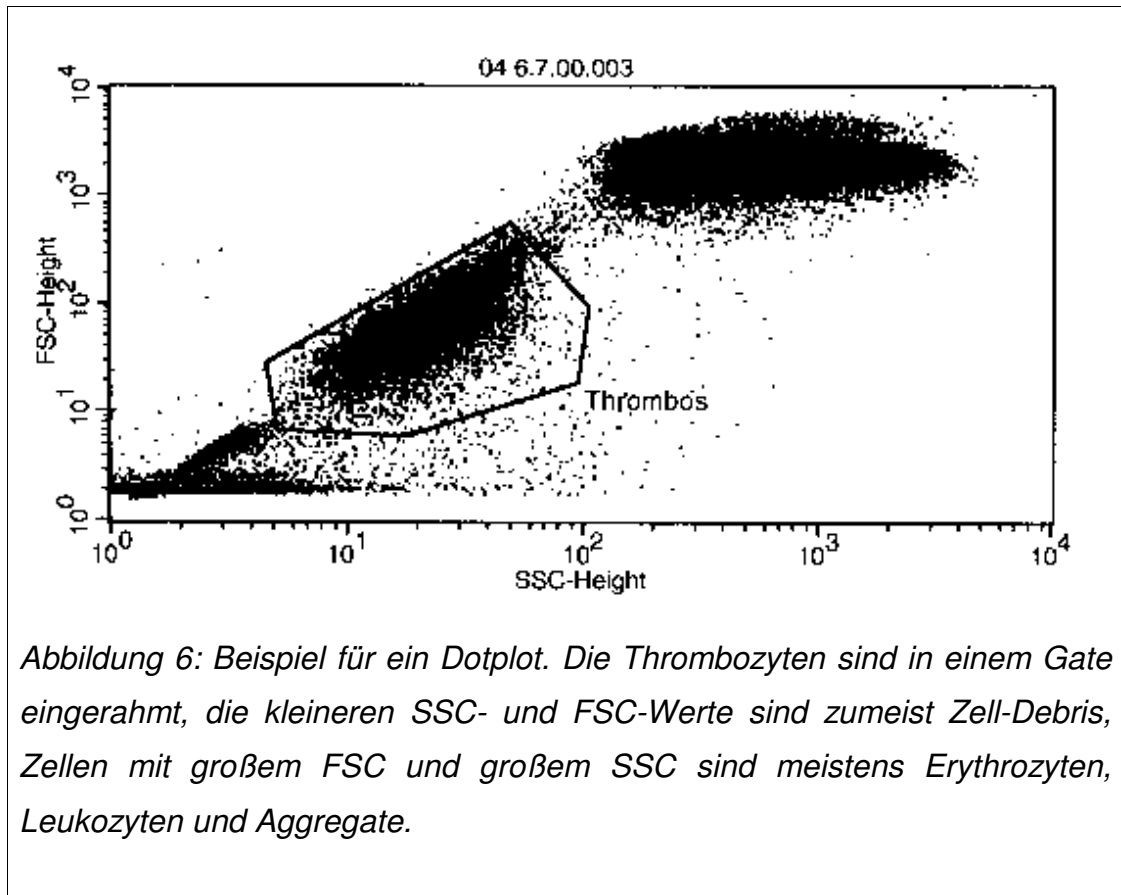
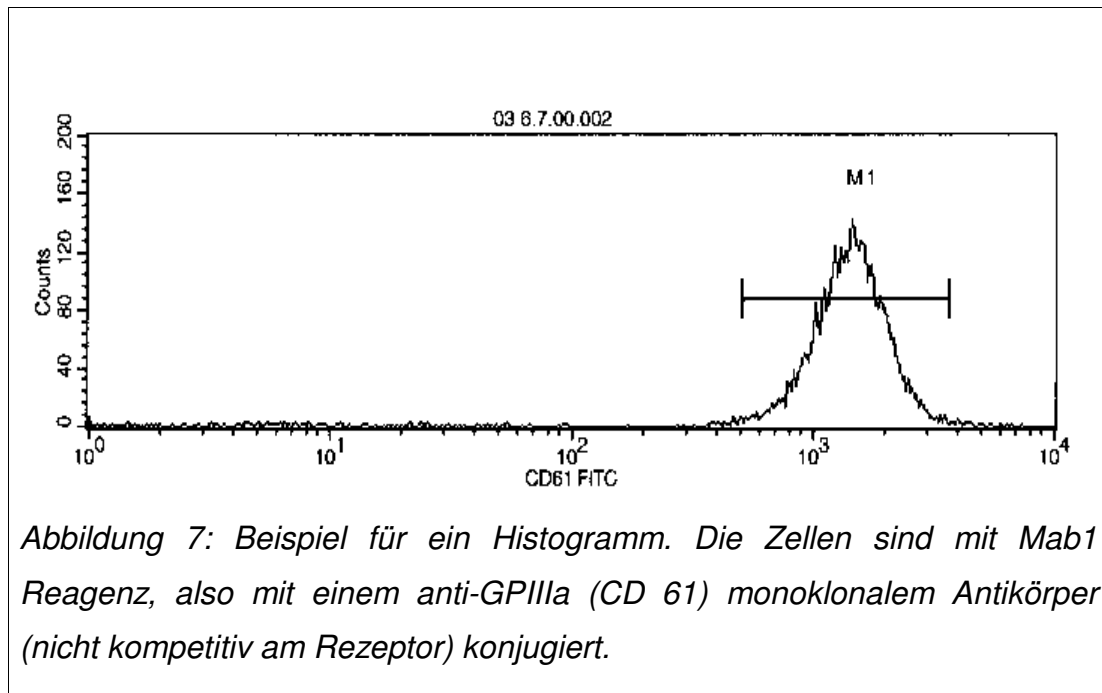


Abbildung 6: Beispiel für ein Dotplot. Die Thrombozyten sind in einem Gate eingerahmt, die kleineren SSC- und FSC-Werte sind zumeist Zell-Debris, Zellen mit großem FSC und großem SSC sind meistens Erythrozyten, Leukozyten und Aggregate.



## Geräteeinstellungen

Vor jeder Messung werden die Geräteeinstellungen festgesetzt. Die günstigen Einstellungen werden vor jeder Versuchsreihe durch Probemessungen, den so genannten „beats“, mit Positiv- und Negativkontrollen für jede Zellart und für jeden verwendeten Antikörper mit seinen spezifischen Fluoreszenzfarbstoffen ermittelt.

Im Einzelnen sind dies:

➤ **Schwellenwert (Threshold):**

Einzelmessungen müssen einen gewissen Schwellenwert übersteigen, um gespeichert zu werden. So können durch entsprechende Triggerung des FSC-Thresholds am Trigger Circuit sehr kleine Partikel (Zelldebris) von der Messung ausgeschlossen werden.

➤ **Photodetektoren:**

An den Detektoren werden die Spannung (150V - 1000V) der PMTs für die Fluoreszenz- und für die SSC-Messung und die Empfindlichkeit der Photodiode (E-1: entspricht 1/10 bis E03: entspricht der 1000-fachen Empfindlichkeit) eingestellt.

➤ **Verstärker (Amplifier):**

Der Verstärker erlaubt die Wahl zwischen linearem und logarithmischem Maßstab. Für schwache Impulse wie bei der Fluoreszenzmessung von kleinen Zellen wird der lineare Maßstab verwendet. Bei starken Impulsen, wie bei den Thrombozyten in unserem Fall, eignet sich die logarithmische Verstärkung.

➤ **Kompensation:**

Wenn mehr als eine Fluoreszenz gleichzeitig gemessen werden soll, besteht das Problem der Überlappung der Emissionsspektren, das heißt ein Fluoreszenzfarbstoff sendet - wenn auch nur in geringer Intensität - Licht innerhalb des Emissionsspektrums des anderen aus. So induziert

beispielsweise FITC auch schwache Signale im FL-2 Detektor und bewirkt somit eine Fluoreszenzüberstrahlung. Diese Überlappung, die unkorrigierte Messwerte verfälschen kann, wird dadurch ausgeglichen, dass durch vorherige Einstellung der Kompensation automatisch vom Signal des einen Detektors ein Anteil des anderen abgezogen werden kann. Wenn 2 Fluoreszenzen gleichzeitig gemessen werden sollen, muss demnach jeweils FL-1: FL-2 (%) und FL-2: FL-1 (%) festgelegt werden. Dies ist am besten mit einer Probe, welche jeweils zwei verschiedene einfach positive Populationen von Zellen oder Eichpartikeln enthält, möglich. Wenn nun die Fluoreszenzintensität einer FL-1 positiven Population für FL-2 der negativen Population entspricht und umgekehrt, ist die Einstellung richtig. Insbesondere FL-2: FL-1 muss einen vergleichsweise hohen Prozentsatz aufweisen, da das Spektrum von FITC deutlich in das von PE hineinreicht (siehe Abbildung 2).

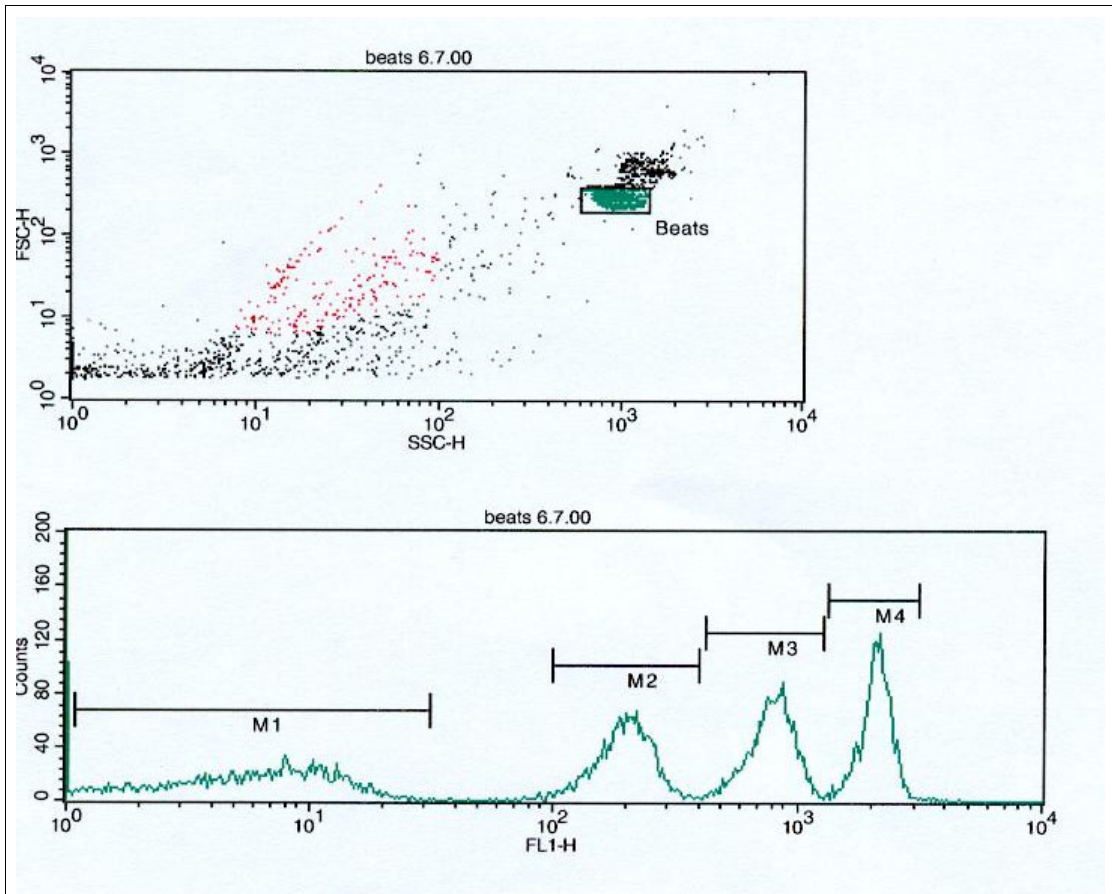


Abbildung 8: Beispiel für eine Eichmessung als Dotplot und als Histogramm. Die Thrombozyten sind wieder in einem Gate eingerahmt.

## **Erstellen eines Gates:**

Ein Gate dient dazu, den Messbereich der Messung einzuschränken, also nur die Eigenschaften einer bestimmten Zellpopulation zu messen. Das Gate kann, wie in den Abbildungen 3 bis 5 ersichtlich, sowohl im Dotplot, als auch im Histogramm gesetzt werden. Nur wenn eine Zelle in dieses Gate fällt, werden ihre Messdaten gespeichert und der weiteren Auswertung zugänglich gemacht. Auf diese Weise können Zellen einer bestimmten Größe und Granularität oder Zellen mit einem bestimmten Markerepitop (z.B. CD 61) gesondert bearbeitet werden. Vor jeder Versuchsreihe sollte daher das Gate genau festgelegt werden.

## **Die Auswertung:**

Die Auswertung der Fluoreszenz-Histogramme erfolgt mit CELLQUEST-Software (Becton Dickinson, Heidelberg) noch während der Messung.

Hierbei gibt es zwei Möglichkeiten:

- Im Histogramm kann der prozentuale Anteil der Zellen bestimmt werden, der eine Fluoreszenz gegenüber der Fluoreszenz einer Kontrollpopulation beziehungsweise gegenüber der Fluoreszenz eines Kontrollantikörpers hat, wobei bei den Kontrollen eine unspezifische Antikörperbindung oder eine unspezifische Fluoreszenz angenommen wird. Geringe Veränderungen können dabei ausgeglichen werden.
- Es kann die Antikörperbindung pro Zelle und somit die mittlere Fluoreszenz bestimmt werden. Diese Messung ist jedoch bei logarithmischer Auftragung sehr anfällig für Ausreißer und daher nur für Populationen mit homogener Fluoreszenzverteilung geeignet.



## **Die heutige Anwendungen des Durchflusszytometers:**

Es gibt zwei Bereiche, in denen die Durchflusszytometrie heute ihre Anwendung findet:

### **1. In der Routinediagnostik:**

Hier dienen die FACS-Geräte in erster Linie zur Differenzierung von Leukozyten unter anderem im Rahmen von Leukämien, in der HIV-Diagnostik, bei Organtransplantationen sowie in der Tumordiagnostik, z.B. zur Bestimmung des Hormonrezeptorstatus.

### **2. In der Grundlagenforschung:**

Messung von Oberflächenantigenen, wie z.B. Rezeptoren

Analyse von DANN-Gehalt (Ploidität) und Chromosomen

Untersuchung von Zellzyklus, Zelltod und Apoptose

Bestimmung des pH-Milieus und des Ionengehaltes, wie zum Beispiel der Calciumgehalt als Indikator für die Signaltransduktion

Differenzierung aquatischer Mikroorganismen, vornehmlich von Pilzen, Algen und Protozoen

Der große Vorteil der Durchflusszytometrie gegenüber der herkömmlichen Fluoreszenzmikroskopie beruht vor allem in der schnellen Messung vieler Zellen und in der objektiven Analyse der Messproben durch den Computer und seine Software. Das Gating erlaubt die Detektion sehr seltener Zellen in kurzer Zeit.

## **Benutzte Antikörper, Puffer, Medikamente, etc.**

Abciximab (ReoPro<sup>®</sup>, c7E3)

Chimäres Mensch/Maus Fab-Fragment (Beiersdorf-Lilly GmbH, Hamburg, Deutschland)

Urokinase HS medac (medac, Hamburg, Deutschland)

Retepase (Rapilysin<sup>®</sup> 10 U, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland)

Heparin (Braun, Melsungen, Deutschland)

Isotone Natriumchloridlösung 0,9 %, 10 ml (B.Braun, Melsungen, Deutschland)

Diluent-Puffer 10-fach konzentriert (Beckmann Coulter Inc., Deutschland)

Aqua destillata (eigenes Labor)

Monoklonaler IgG Antikörper isotopische Negativkontrolle, Maus (Beckmann Coulter Inc., Deutschland)

MAb1-Reagenz, anti-GpIIIa (CD 61) monoklonaler-Antikörper (Beckmann Coulter Inc., Deutschland)

MAb2-Reagenz, anti-GpIIIa (CD 61) monoklonaler-Antikörper (Beckmann Coulter Inc., Deutschland)

Beats-Suspension mit Maus-IgG-Immunglobulin beschichtet (Beckmann Coulter Inc., Deutschland)

Polyklonaler anti-Maus IgG-Antikörper FITC konjugiert

Färbereagenz (Beckmann Coulter Inc., Deutschland)

## **Benutztes Material bei der Blutabnahme:**

### ***Monovetten:***

3/5/10 ml Blutentnahme-Behälter (Sarstedt, Numbrecht, Deutschland) mit Natrium-Citrat als Antikoagulanzen (Endkonzentration: 0,106 M)

2,7 ml Blutentnahme-Behälter (Sarstedt, Numbrecht, Deutschland) mit Kalium-EDTA als Antikoagulanzen (Endkonzentration: 1,6 mg/ml)

4,5 ml Neutralmonovette (Sarstedt, Numbrecht, Deutschland) mit CTAD-Puffer gefüllt (gekühlt)

Eppendorfgläser, Reaktionsgefäße 1,5 ml Safe-L (Eppendorf, Deutschland)

## **Blutentnahme**

Da Thrombozyten durch eine fehlerhaft durchgeführte Blutentnahme aktiviert werden können, was zu einer Verfälschung der Messergebnisse führen kann, wurde die Blutentnahme so schonend wie möglich durchgeführt.

Es wurden 2 verschiedene Methoden angewandt:

Aufgrund der OP-ähnlichen Situation wurden die Proben nach 2 Stunden und nach 4 Stunden direkt aus der arteriellen Schleuse (bestehender Katheter) entnommen. Hierbei wurden die ersten 10 ml Blut verworfen. Diese Proben wurden dann bis zur FACS-Analyse nach der 6 Stunden-Abnahme bei

Raumtemperatur gelagert. CTAD-Probe und EDTA-Probe wurden nach kurzer Eislagerung schockgefroren.

Die 6-Stunden-, 24-Stunden- und 48-Stunden-Proben wurden sofort flowzytometrisch analysiert. Diese Proben wurden venös über die Punktion einer gestauten Vene gewonnen.

Für die Bestimmung der  $\beta$ -Thromboglobulinwerte wurde nur das Blut der letzten 5 Patienten herangezogen.

### **In vitro Messung der Abciximab-Bindung und der Fibrinogenbindung an Thrombozyten bei verschiedenen Abciximab-Konzentrationen in der FACS-Analyse**

Um die funktionelle Blockade des thrombozytären GP IIb/IIIa-Rezeptors bei verschiedenen Abciximab Konzentrationen zu bestimmen, wurde die Bindung von Abciximab und parallel die Fibrinogenbindung an Thrombozyten in vitro untersucht.

#### **Protokoll der Lysebehandlung:**

- ◆ Gabe von ASS:

300 mg ASS 1-6 Stunden vor der Prozedur, wenn nicht bereits mit ASS behandelt. Weiterbehandlung mit einer ASS Dosis von 100 mg/d in den darauffolgenden 6 Monaten. Wenn bereits mit ASS behandelt, Gabe von 100 mg ASS vor der Intervention.

- ◆ Gabe des Fibrinolytikums über die gelegte Schleuse und den Lysekatheter in folgender Dosis:

*Urokinase*: Bolusgabe von 25,000 IU/ 10 cm Thrombuslänge + pulse spray  
– Gabe von 240,000 IU/h x 2h (0.4ml/15s)

*Retepase*: Bolusgabe von 0.5 MU/ 10 cm Thrombuslänge + pulse spray –  
Gabe von 1.0 MU/h x 2h (0.4 ml/ 15 s)

- ◆ Gabe von *Abciximab* in folgender Dosis:

0.25 mg/kg i.v. bolus injection + 0.125 µg/kg/min x 12 h als Infusion  
(maximal 10 µg/min)

- ◆ Gabe von *Heparin* :

Vor der Lysetherapie: Für ACT < 150 oder PTT < 50 s: 30 U/kg  
(maximal 3,000IU)

Wenn ACT > 150 oder PTT > 50 s: kein Heparin

Während der Lysetherapie: Für ACT < 150 oder PTT < 50 s: 20 IU als Bolus  
jede halbe Stunde

Nach der Lysetherapie: Dauerinfusion von 7 IU/kg/h über 48 Stunden

## **Protokoll für die Präparation der Thrombozyten und die Durchführung der FACS-Analyse:**

- Puffer mit destilliertem Wasser 10-fach verdünnen
  
- 5 Plastikröhrchen für das Flowcytometer mit T1 bis T5 kennzeichnen
  
- T1: 50  $\mu$ L Citratvollblut und 150  $\mu$ L Puffer hineinpipettieren und mischen
  
- T2: 20  $\mu$ L Negativkontrolle in das Röhrchen pipettieren
  
- T3: 20  $\mu$ L MAb1
  
- T4: 20  $\mu$ L MAb2
  
- T5: 40  $\mu$ L Beads als Eichkontrolle; vorher mittels Vortex mischen
  
- In T2, T3 und T4 20  $\mu$ L verdünnte Probe geben und mischen; 20 min Inkubation
  
- 20  $\mu$ L anti-Maus IgG-Antikörper-FITC konjugiert in die Röhrchen T2, T3, T4 und T5 geben und mischen; 10 min Inkubation
  
- In alle Röhrchen T2, T3, T4 und T5 2 mL Puffer geben, mischen und am Flowzytometer messen

## Ergebniswiedergabe:

Aggregations- hemmstoff	Gesamtzahl der Gp IIIa – Bindungsstelle n	Nicht belegte Gp IIIa- Bindungsstellen	Anzahl der durch Aggregations- hemmstoffe belegte GpIIIa- Bindungsstellen	Prozentuale Belegung der GpIIIa- Bindungsstellen in % $\frac{(Mab2-MAb1)}{Mab1} \times 100$
Mono- klonaler Antikörper	MAb 2	MAb 1	MAb2 – MAb1	

Tabelle 3: Berechnung des Ergebnisses

## Protokoll des Schockgefrierens zur TAT und $\beta$ -Tg Bestimmung:

Da auch andere Werte als  $\beta$ -Tg und TAT bestimmt wurden, wurde das Plasma einer 10ml Citratmonovette, einer 2,7ml EDTA-Monovette und einer 4,5ml CTAD-Monovette schockgefroren:

Die Citratprobe wurde bis zur Zentrifugation bei Raumtemperatur gelagert und anschließend bei 20°C und einer Geschwindigkeit von 2000 g 20 min lang zentrifugiert. Daraufhin wurden in 15 Safe-Lock-Reaktionsgefäße jeweils 300  $\mu$ l des Citratplasmas abpipettiert, in flüssigen Stickstoff getan und bei –20°C im Gefrierschrank aufbewahrt.

Die EDTA- und die CTAD- Probe wurden nach Eisbadkühlung in der Kühlzentrifuge bei 4°C und eine Geschwindigkeit von 2000 g 30 min lang zentrifugiert. Vom Plasmaüberstand der EDTA-Röhrchen wurden 300 µl, vom Plasmaüberstand des CTAD-Röhrchens 200 µl (aus der Mitte des Plasmaüberstandes) in Eppendorfgefäße abpipettiert. Diese Proben wurden dann ebenfalls mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und im Gefrierschrank aufbewahrt.

### **Die TAT-Wertebestimmung:**

Der Human/Thrombin/Antithrombin III-Komplex (TAT)-Wert wurde mithilfe von Enzygnost® TAT micro (Dade Behring Marburg GmbH, Deutschland) bestimmt. Dies ist ein Enzymimmunassay, das nach dem Sandwich-Prinzip funktioniert. Hierfür wurde die Citrat-Plasma-Probe verwendet, aber auch EDTA-Plasma-Proben hätten für diesen Zweck genutzt werden können. Zur automatischen Durchführung der Reagenzien-Dosierung, der Waschschritte sowie der Auswertung wurde der Behring ELISA Processor II und ein Wasserbad (37°C, zirkulierend) verwendet. Die Proben wurden innerhalb von 5 Minuten pipettiert, um die Richtigkeit und die Präzision des Testes zu gewährleisten.

### **Prinzip:**

Während der ersten Inkubation bindet sich das in der Probe vorhandene TAT an die Antikörper gegen Thrombin, die an der Oberfläche der Mikrotitrationsplatte fixiert sind. Nach Auswaschen werden in einer 2. Reaktion Peroxidase-konjugierte Antikörper gegen Human-AT III an die freien AT III-Determinanten gebunden. Die überschüssigen Enzym-konjugierten Antikörper werden ausgewaschen; anschließend wird die gebundene Enzymaktivität bestimmt. Die enzymatische Umsetzung von Wasserstoffperoxid und Chromogen wird durch Zusatz von verdünnter Schwefelsäure unterbrochen.



Die der Konzentration von TAT proportionale Farbintensität wird photometrisch bestimmt. Der Konzentrationsbereich von 2 bis 60 µg/l wird durch die in der Packung enthaltenen Standards abgedeckt. Bei höheren Konzentrationen muss die Probe mit TAT-Verdünnungsplasma verdünnt werden.

### **Auswertung:**

Nach Berechnung der Extinktionsmittelwerte der Standards kann entweder eine Bezugskurve auf doppelt-logarithmischem Netzpapier erstellt werden oder computergestützt mittels polygonaler Interpolation die Auswertung erfolgen. Da die Bezugskurve im oberen Bereich tatsächlich leicht gekrümmt verläuft, können die nach der computergestützten Methode ermittelten TAT-Konzentrationen von denen der graphischen Auswertemethode geringfügig abweichen. Bei Extinktion, die oberhalb des obersten Standards liegen, müssen die Proben nach Verdünnung nochmals getestet werden. Probenverdünnungen (z.B. 1:10) müssen mit TAT-Verdünnungsplasma erfolgen bzw. mit einem Normalplasma, dessen TAT-Gehalt < 4µg/l beträgt. Zur Berechnung der TAT-Konzentrationen der Probe muss der TAT-Gehalt des Verdünnungsplasmas berücksichtigt werden.

### **Die $\beta$ -Tg-Wertbestimmung:**

Zur quantitativen  $\beta$ -Tg-Bestimmung wurde Asserachrom<sup>®</sup>  $\beta$ -TG (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland), ein enzymimmunologischer in-vitro Test, verwendet. Dafür wurde die CTAD-Probe (Plättchenarmes Plasma) gebraucht.

**Prinzip:**

Das Testprinzip basiert ebenfalls auf dem Sandwich-Assay. Bei der 1. Immunreaktion bindet der auf den Mikrotitrationsstreifen fixierte spezifische Antikörper gegen das  $\beta$ -Thromboglobulin ( $\beta$ -Tg) der Probe.  $\beta$ -Tg besitzt mehrere antigene Determinanten. Daher werden in der anschließenden 2. Immunreaktion mit POD-markierten  $\beta$ -Tg-Antikörpern Sandwich-Komplexe gebildet. Die Menge der Sandwich-Komplexe stellt ein Maß für den  $\beta$ -Thromboglobulin-Gehalt der Probe dar. Im nachfolgenden Waschschrift (bound-free-separation) wird das nicht gebundene POD-Konjugat entfernt. Nach Zusatz von Harnstoffperoxid und Chromogen (o-Phenylendiamin) wird die gebundene POD-Aktivität photometrisch bestimmt.

**Auswertung:**

Um die Bezugskurve einer Serie zu erstellen, wird aus der  $\beta$ -TG-Standard-Lösung eine geometrische Verdünnungsreihe hergestellt. Die  $\beta$ -TG-Konzentration der Verdünnungen (IU/ml) ergibt sich dabei aus den Quotienten des Sollwertes („t“) von  $\beta$ -TG-Standard.

Auf doppelt logarithmischem Papier wird die gemessene Extinktion gegen IU/ml  $\beta$ -TG aufgetragen. Die alternative Verwendung von linearem Netzpapier gestattet eine bessere Ablesegenauigkeit bei höheren Werten unter gleichzeitigem Verzicht auf eine lineare Kalibrationskurve. Für die Probenverdünnung 1:10 sind die Werte direkt an der Bezugskurve abzulesen, bei anderen Verdünnungen mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor zu multiplizieren. Bei einer Verdünnung der Probe 1:20 ist beispielsweise der Verdünnungsfaktor 2 anzuwenden.

## **Ergebnisse:**

### **Indirektes Monitoring der Abciximab-Bindung an Thrombozyten durch Flowzytometrie**

Von den 24 untersuchten Patienten zeigten 20 eine akzeptable Abciximab-Rezeptorblockade innerhalb der ersten 6 Stunden nach Therapiebeginn. 3 Patienten hatten jedoch eine verringerte Rezeptorblockade von  $33 \pm 26\%$  während dieser Zeit trotz normaler Rezeptorenanzahl. Ein Patient zeigte überhaupt keine Rezeptorblockade. Auffällig dabei war, dass alle 6 mit Urokinase behandelten Patienten nach 2 Stunden die therapeutische Dosis von  $80\%$  deutlich übertroffen hatten, während die 4 Patienten welche die therapeutische Dosis nicht erreichten mit Reteplase behandelt worden waren. Nach 24 Stunden konnte nur noch bei einem Patienten eine Rezeptorblockade von über  $80\%$  gemessen werden, nach 48 Stunden waren alle Patienten außerhalb des therapeutischen Bereiches. Während der Abciximabinfusion von 12 Stunden konnten die Rezeptoren also hinreichend geblockt werden, nach Abbruch der Infusion wurde ein Abfall der Blockade unter den therapeutischen Bereich beobachtet.

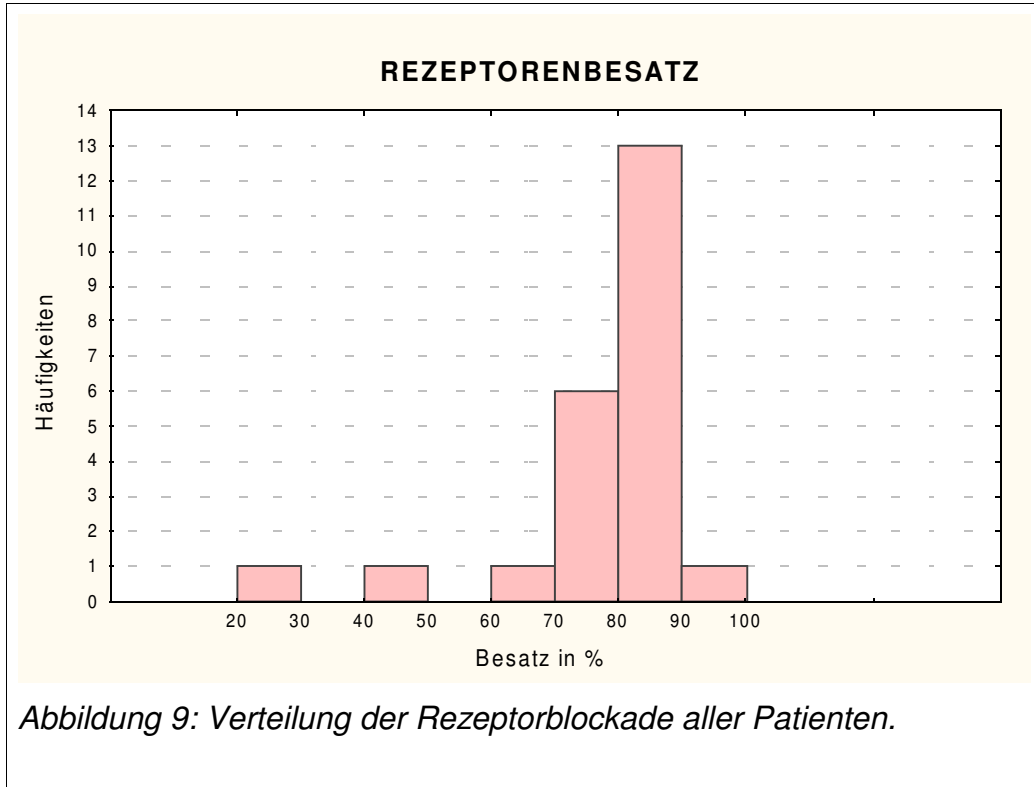
Die durchschnittliche Rezeptorenzahl auf der Oberfläche der Thrombozyten waren 50632 mit einer Standardabweichung von 8571 Rezeptoren je Thrombozyt. Bei einer durchschnittlichen Thrombozytenzahl von  $250000/\mu\text{l}$  entspricht dies einer durchschnittlichen Rezeptorenzahl von 11,8 Milliarden Rezeptoren/ $\mu\text{l}$ . Ungefähr ein Viertel dieser Rezeptoren blieb frei und wurde nicht geblockt (12600/Thrombozyt). Der Korrelationskoeffizient zwischen insgesamt vorhandenen und geblockten Rezeptoren betrug 0,69.

<b>Patient Nr.</b>	<b>2 Stunden</b>	<b>4 Stunden</b>	<b>6 Stunden</b>	<b>24 Stunden</b>	<b>48 Stunden</b>
20	44,81 %	44,70 %	43,82 %	22,82 %	11,36 %
15	21,87 %	35,22 %	24,46 %	19,14 %	6,25 %
8	58,71 %	59,43 %	62,75 %	37,76 %	27,88 %
10	-22,66 %	-15,78 %	7,08 %	19,00 %	26,77 %

*Tabelle 4: Rezeptorblockade in % der nicht auf Abciximab ansprechenden Patienten*

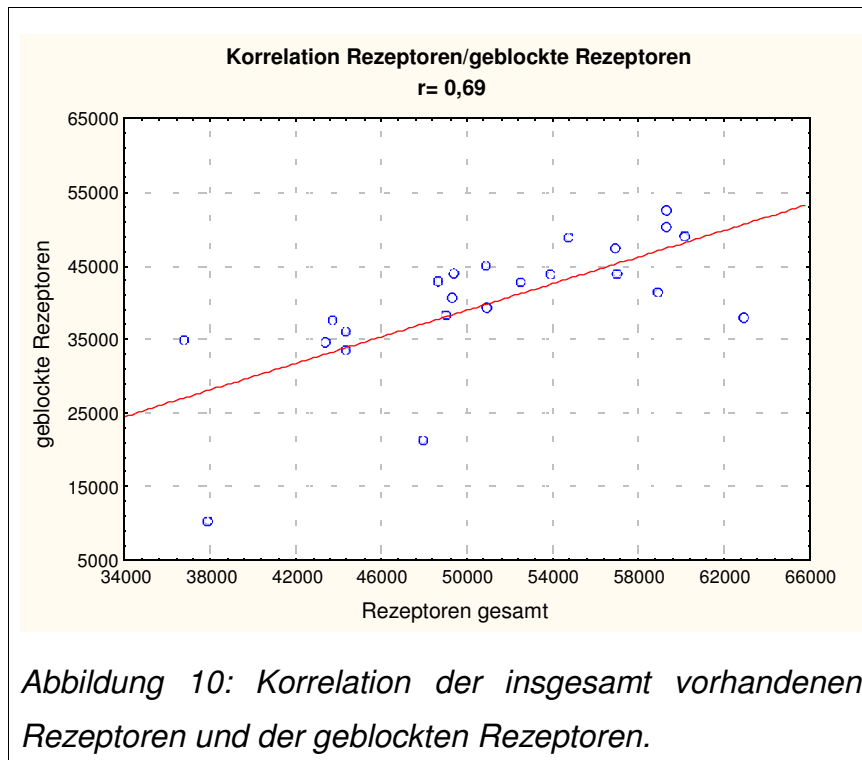
<b>Patient Nr.</b>	<b>2 Stunden</b>	<b>4 Stunden</b>	<b>6 Stunden</b>	<b>24 Stunden</b>	<b>48 Stunden</b>
26	90,21%	81,22%	73,11%	62,77%	41,16%
3	97,40%	94,61%	92,53%	74,76%	59,20%
1	89,08%	89,38%	88,69%	88,43%	53,72%
13	79,96%	68,85%	62,13%	39,22%	27,27%
24	81,16%	76,33%	69,58%	54,51%	
23	80,08%	77,94%	76,54%	49,25%	37,59%
5	88,19%	79,62%	86,52%	67,57%	
25	91,73%	88,46%	84,50%	65,21%	43,79%
4	77,82%	79,57%	73,74%	59,20%	
2		85,76%	73,78%	63,69%	50,56%
12	86,31%	76,62%	81,19%	53,36%	30,36%
16	80,41%	75,45%	75,59%	53,36%	52,44%
11	86,80%	82,18%	78,59%	60,93%	44,26%
6	89,93%	83,22%	84,70%	60,63%	43,82%
14	88,10%	82,27%	79,49%	62,01%	50,50%
19	88,41%	81,46%	74,45%	60,16%	26,99%
18	90,79%	88,21%	86,70%		
22	90,42%	88,81%	88,39%	76,98%	63,44%
21	85,46%	80,12%	78,24%	58,16%	41,90%
9	90,71%	89,00%	85,65%	70,04%	
Standarda b-weichung	87,0+/- 5,1%	82,5+/-6,1%	79,7+/-7,6%	62,1+/- 10,8%	44,5+/- 10,9%

*Tabelle 5: Rezeptorblockade der 20 auf Abciximab ansprechenden Patienten*

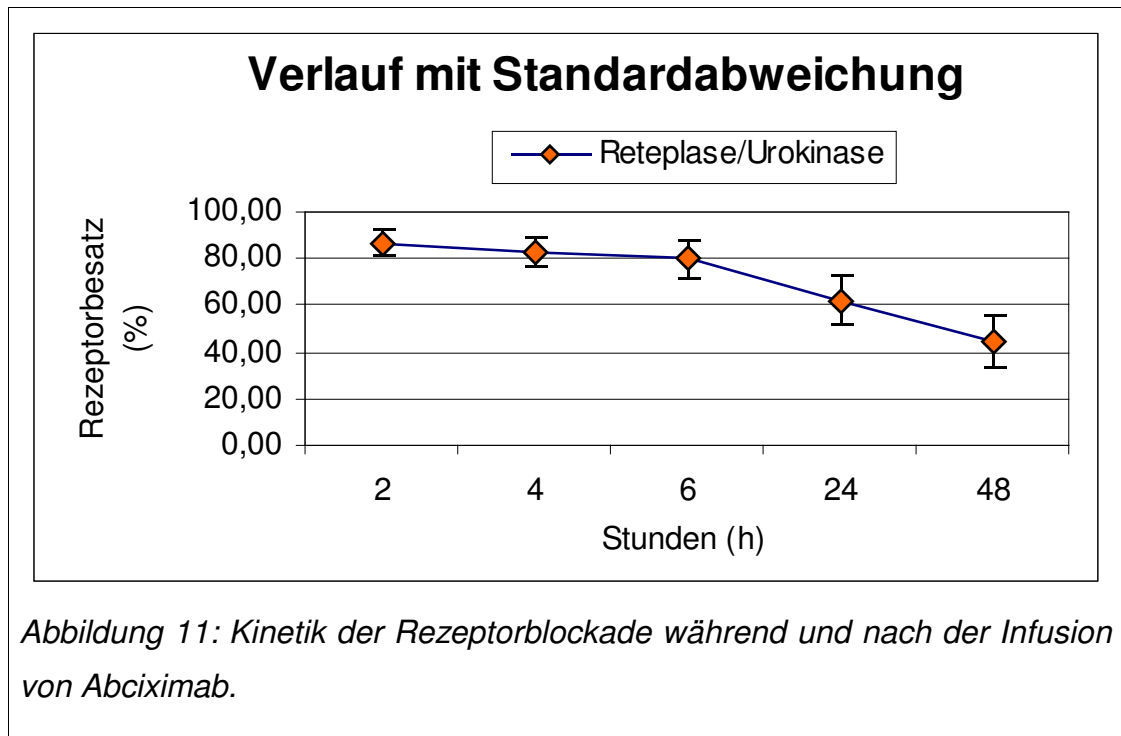


<b>Patienten- nummer</b>	<b>Anzahl Throm- bozyten/ <math>\mu</math>l (x 1000)</b>	<b>Rezeptoren/ Thromboyt (gesamt)</b>	<b>Rezeptoren/ Thrombozyt (frei)</b>	<b>Rezeptoren/<math>\mu</math>l</b>
26	143	60179	11125	8605539,8
3	123	36781	1896	4524102,6
1	320	49400	5409	15807884,6
20	276	47946	26637	13233170,2
13	200	58921	17492	11784190,6
24	330	44329	10776	14628405
23	310	49032	10696	15199982
5	209	59322	9030	12398354,6
25	145	48648	5726	7053989
4	279	57027	13093	15910407,2
2	291	43400	8780	12629284,4
12	331	44337	8259	14675625,6
10	338	46555	46555	15735655,8
16	294	50935	11639	14974868,5
11	245	49314	8619	12081836,6
6	368	43733	6145	16093605,5
15	468	37875	27580	17725682,8
14	177	56929	9513	10076350,4
19		52515	9746	
18	187	59335	6783	11095725,1
22	99	54756	5910	5420883,6
21	260	53923	10098	14019905,2
9	118	50888	5875	6004829,77
8	234	62937	24988	14727142,1

Tabelle 6: Thrombozyten und Rezeptorenzahlen im Vergleich







## Vergleich Reteplase-Urokinase

Eine Verbesserung der Rezeptorblockade durch den Einsatz von Reteplase anstelle von Urokinase konnte nicht festgestellt werden. Die 80 % Rezeptorbindung wurde jedoch von 14 der 18 Reteplasepatienten während der Abciximabinfusion erreicht. Sowohl die größte Rezeptorblockade (97,4 % nach 2h), wie auch die niederste Rezeptorblockade (Nonresponder) traten bei Reteplasepatienten auf. Ein ähnlicher Rezeptorenbesatz als bei den Reteplasepatienten, jedoch mit einer etwas geringeren Standardabweichung, konnte bei den 6 Urokinase-Patienten festgestellt werden .

<b>Patient Nr.</b>	<b>2 Stunden</b>	<b>4 Stunden</b>	<b>6 Stunden</b>	<b>24 Stunden</b>	<b>48 Stunden</b>
26	90,21	81,22	73,11	62,77	41,16
3	97,40	94,61	92,53	74,76	59,20
1	89,08	89,38	88,69	88,43	53,72
13	79,96	68,85	62,13	39,22	27,27
23	80,08	77,94	76,54	49,25	37,59
5	88,19	79,62	86,52	67,57	
4	77,82	79,57	73,74	59,20	
16	80,41	75,45	75,59	53,36	52,44
11	86,80	82,18	78,59	60,93	44,26
6	89,93	83,22	84,70	60,63	43,82
14	88,10	82,27	79,49	62,01	50,50
19	88,41	81,46	74,45	60,16	26,99
22	90,42	88,81	88,39	76,98	63,44
9	90,71	89,00	85,65	70,04	
Standardabweichung	86,9+/-5,5%	82,4+/-6,5%	80,0+/-8,2%	63,2+/-12,2%	45,5+/-10,4%

*Tabelle 7: Rezeptorblockade der 14 auf Abciximab ansprechenden Reteplase-Patienten (in %)*

<b>Patient Nr.</b>	<b>2 Stunden</b>	<b>4 Stunden</b>	<b>6 Stunden</b>	<b>24 Stunden</b>	<b>48 Stunden</b>
24	81,16	76,33	69,58	54,51	
2		85,76	73,78	63,69	50,56
25	91,73	88,46	84,50	65,21	43,79
12	86,31	76,62	81,19	53,36	30,36
18	90,79	88,21	86,70		
21	85,46	80,12	78,24	58,16	41,90
Standardabweichung	87,1+/-4,2%	82,6+/-5,6%	79,0+/-6,5%	59,0+/-5,3%	41,7+/-8,4%

*Tabelle 8: Rezeptorblockade der 6 Urokinasepatienten (in %)*

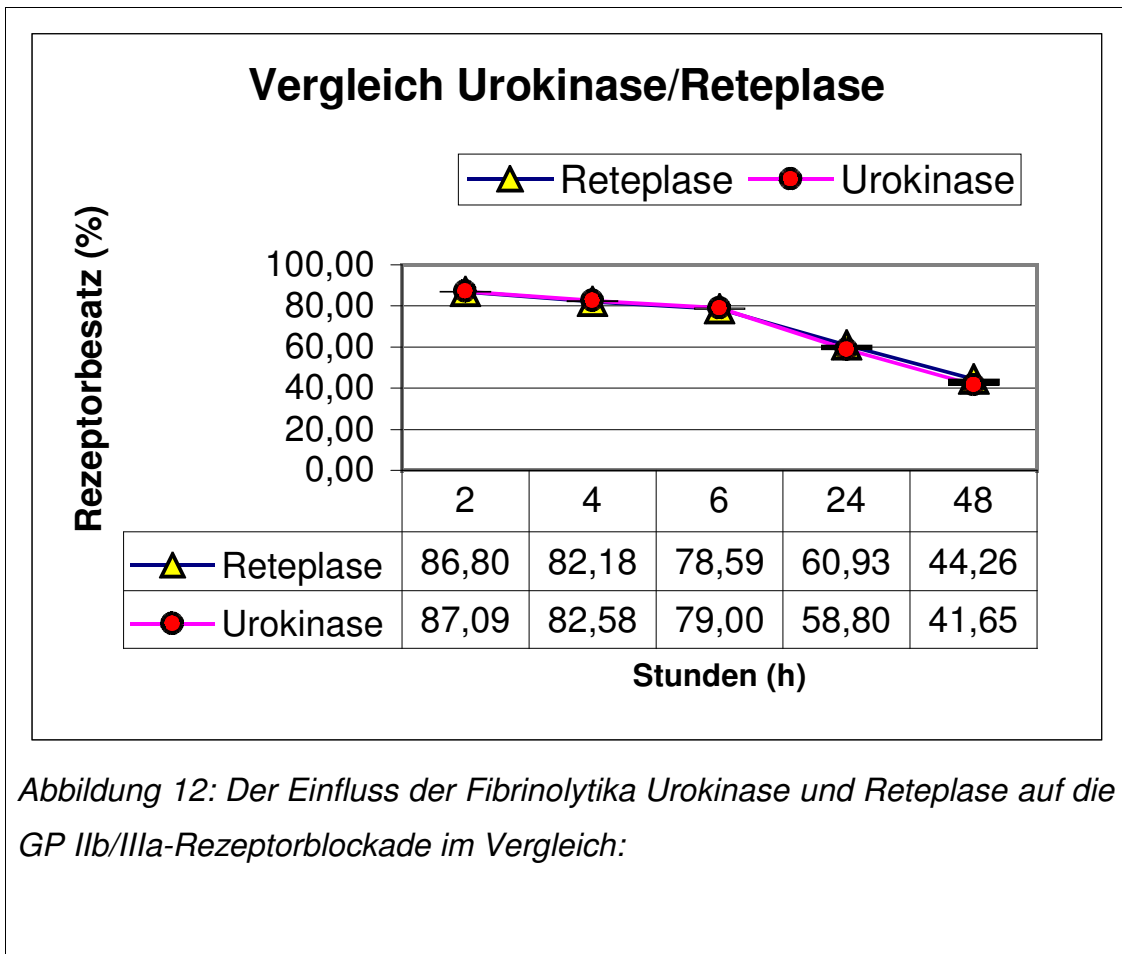


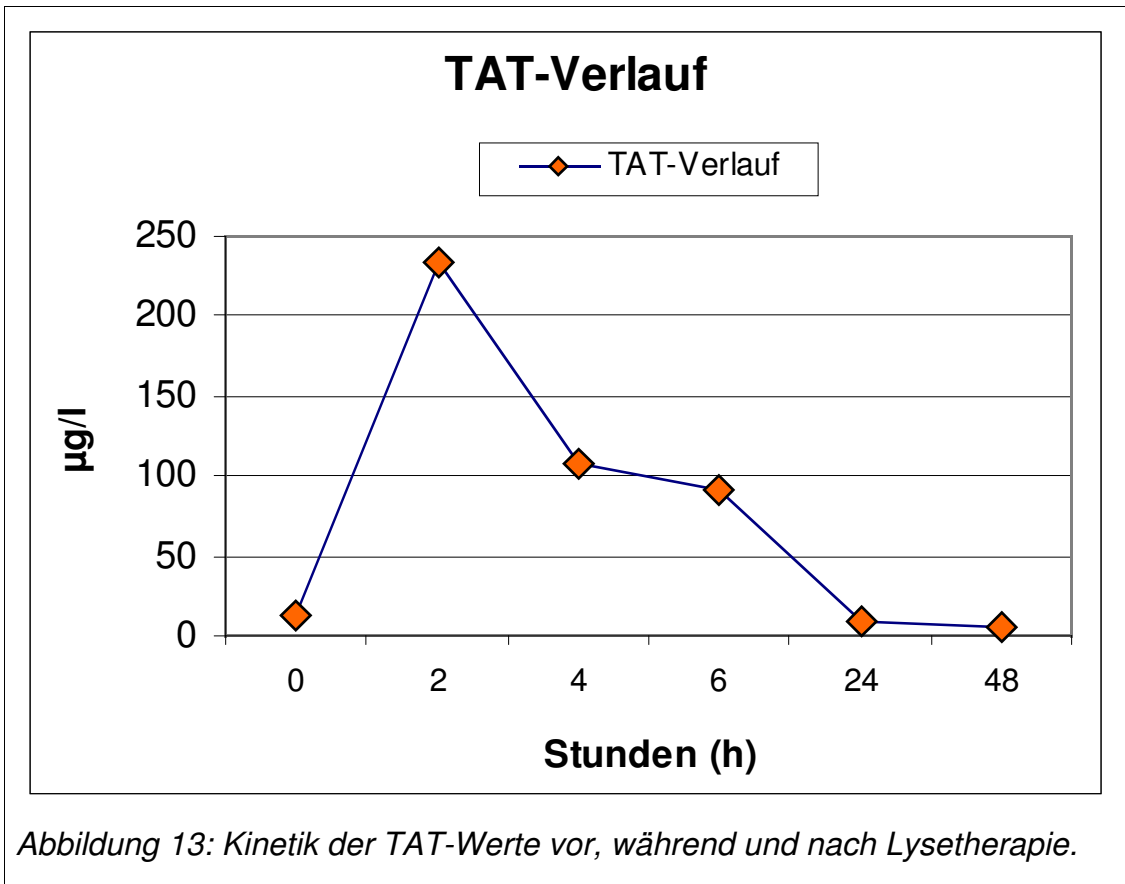
Abbildung 12: Der Einfluss der Fibrinolytika Urokinase und Reteplase auf die GP IIb/IIIa-Rezeptorblockade im Vergleich:

### Die Wirkung der Thrombozytenaktivierung auf den TAT-Komplex:

Die TAT-Werte stiegen sowohl für die Urokinasepatienten, als auch für die Reteplasepatienten infolge der Lysetherapie stark an (nach 2h: 223 µg/l im Durchschnitt) und nahmen in der Folgezeit wieder ab (nach 4h: 159µg/l; nach 6h: 134 µg/l). Nach etwas mehr als 24 Stunden war der durchschnittliche Nullwert von 12 µg/l wieder erreicht. Werte über 60 µg/l konnten durch Verdünnungsreihen gemessen werden.

<b>Patient Nr.</b>	<b>Vor Abciximab- gabe</b>	<b>2 Stunden</b>	<b>4 Stunden</b>	<b>6 Stunden</b>	<b>24 Stunden</b>	<b>48 Stunden</b>
3	31,14	83,48	50,26	49,43	8,12	3,17
20	9,48	295,34	725,78	1167,75	15,64	32,56
13	4,86	14,54	6,38	12,44	7,62	7,07
24	7,15	50,98	33,1	377,4	4,3	
23	3,2	1510,21	160,55	307,17	9,73	2
5	3,12	28,5	142,02	35,53	4,54	
25	3,77	42,26	39,7	18,34	5,43	3,34
4	7,44	28,4	152,63	36,51	11,01	7,7
12	31,14	83,48	50,26	49,43	8,12	3,17
10	23,47	20,24	45,35	28,42	86,68	4,02
16	5,19	47,67	73,05	27,85	6,13	3,97
17	37,17	660,47	403,58	184,42	15,15	6,82
11	5,19	47,67	73,05	27,85	6,13	3,97
6	4,46	18,2	19,32	7,89	5,81	9,44
15	5,93	38,74	147,08	39,04	6,19	6
14	5,22	155,55	38,05	18,71	3,87	3,12
19	5,6	4,53	18,62	7,33	6,48	7,3
18	15,44	358,74	142,28	66,76		
22	43,52	68,13		106,15	18,18	9,16
21	5,63	39,87	18,92	6,18	6,7	15,12
9	5,01	949,98	399,99	304,37	14,47	
8	1,84	353,56	592,16	65,27	8,74	2,86
<b>Mittelwert</b>	<b>12,04</b>	<b>222,75</b>	<b>158,67</b>	<b>133,83</b>	<b>12,34</b>	<b>7,27</b>

Tabelle 9: Die Entwicklung der TAT-Werte (in µg/l)

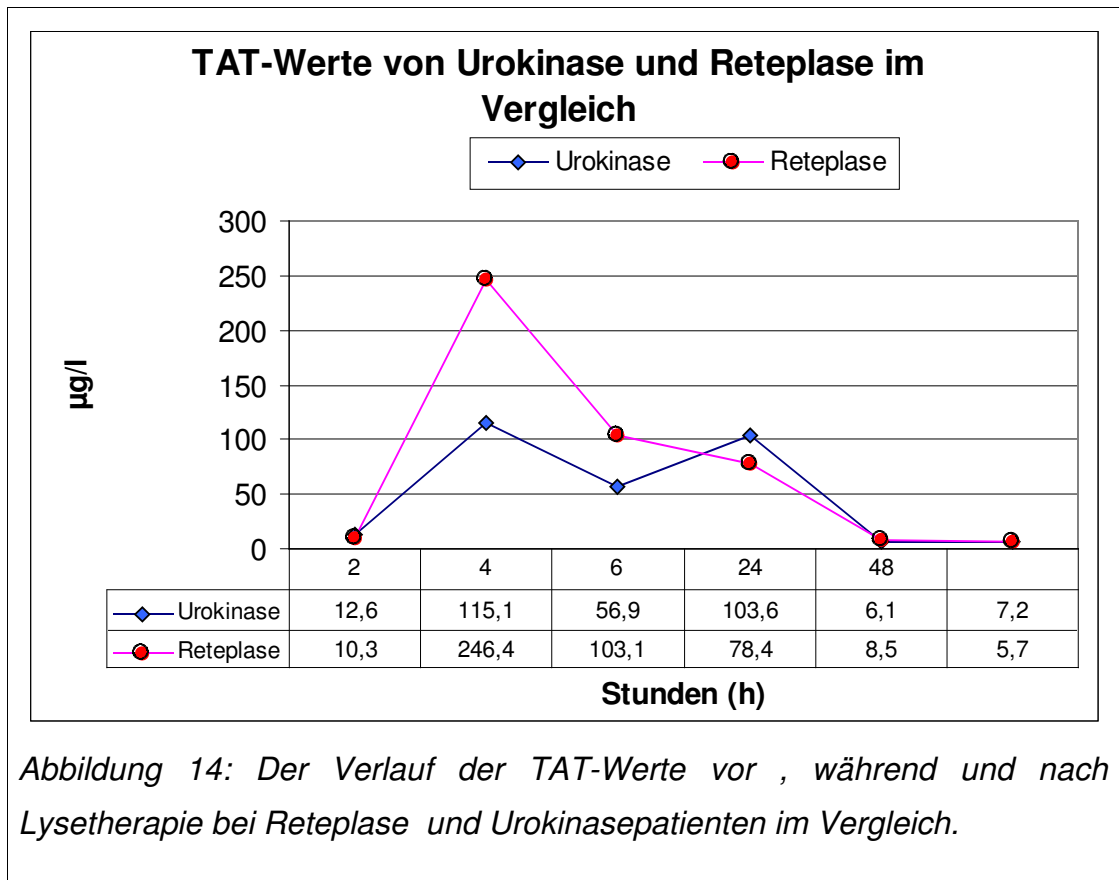


<b>Patient Nr.</b>	<b>Vor Abciximab- gabe</b>	<b>2 Stunden</b>	<b>4 Stunden</b>	<b>6 Stunden</b>	<b>24 Stunden</b>	<b>48 Stunden</b>
3	31,14	83,48	50,26	49,43	8,12	3,17
13	4,86	14,54	6,38	12,44	7,62	7,07
23	3,2	1510,21	160,55	307,17	9,73	2
5	3,12	28,5	142,02	35,53	4,54	
4	7,44	28,4	152,63	36,51	11,01	7,7
16	5,19	47,67	73,05	27,85	6,13	3,97
11	5,19	47,67	73,05	27,85	6,13	3,97
6	4,46	18,2	19,32	7,89	5,81	9,44
14	5,22	155,55	38,05	18,71	3,87	3,12
19	5,6	4,53	18,62	7,33	6,48	7,3
22	43,52	68,13		106,15	18,18	9,16
9	5,01	949,98	399,99	304,37	14,47	
<b>Mittelwert</b>	<b>10,3</b>	<b>246,4</b>	<b>103,1</b>	<b>78,4</b>	<b>8,5</b>	<b>5,7</b>

*Tabelle 10: TAT-Werte der Reteplasepatienten (in µg/l)*

<b>Patient Nr.</b>	<b>Vor Abciximab- gabe</b>	<b>2 Stunden</b>	<b>4 Stunden</b>	<b>6 Stunden</b>	<b>24 Stunden</b>	<b>48 Stunden</b>
24	7,15	50,98	33,1	377,4	4,3	
25	3,77	42,26	39,7	18,34	5,43	3,34
12	31,14	83,48	50,26	49,43	8,12	3,17
18	15,44	358,74	142,28	66,76		
21	5,63	39,87	18,92	6,18	6,7	15,12
<b>Mittelwert</b>	<b>12,6</b>	<b>115,1</b>	<b>56,9</b>	<b>103,6</b>	<b>6,1</b>	<b>7,2</b>

*Tabelle 11: TAT-Werte der Urokinase-Patienten (in µg/l)*



## Die Wirkung der Thrombozytenaktivierung auf den $\beta$ -Thromboglobulin-Verlauf:

Auch der  $\beta$ -Thromboglobulin-Wert erfuhr einen Anstieg in der ersten Zeit nach Lysetherapie auf Werte bis zu 1000  $\mu\text{g/l}$  in einzelnen Messungen. Nach einem Tag sanken auch die  $\beta$ -TG-Werte wieder auf den Wert vor Beginn der Therapie ab.



<b>Patient Nr.</b>	<b>Vor Abciximabgabe</b>	<b>2 Stunden</b>	<b>4 Stunden</b>	<b>6 Stunden</b>	<b>24 Stunden</b>	<b>48 Stunden</b>
24	144,82	277,44	226,47	1056,53	118,98	
23	317,4	668,33	329,43	255,41	308,23	236,62
25	32,48	90,08	112,65	65,11	73,76	32,72
22	149,07	219,48		114,14	264,83	179,17
20	563,68	804,92	945,37	918,19	589,46	280,18
<b>Mittelwert</b>	<b>241,49</b>	<b>412,05</b>	<b>403,48</b>	<b>481,88</b>	<b>271,05</b>	<b>182,17</b>

Tabelle 12:  $\beta$ -TG-Werte der 5 gemessenen Patienten (in IU/ml)

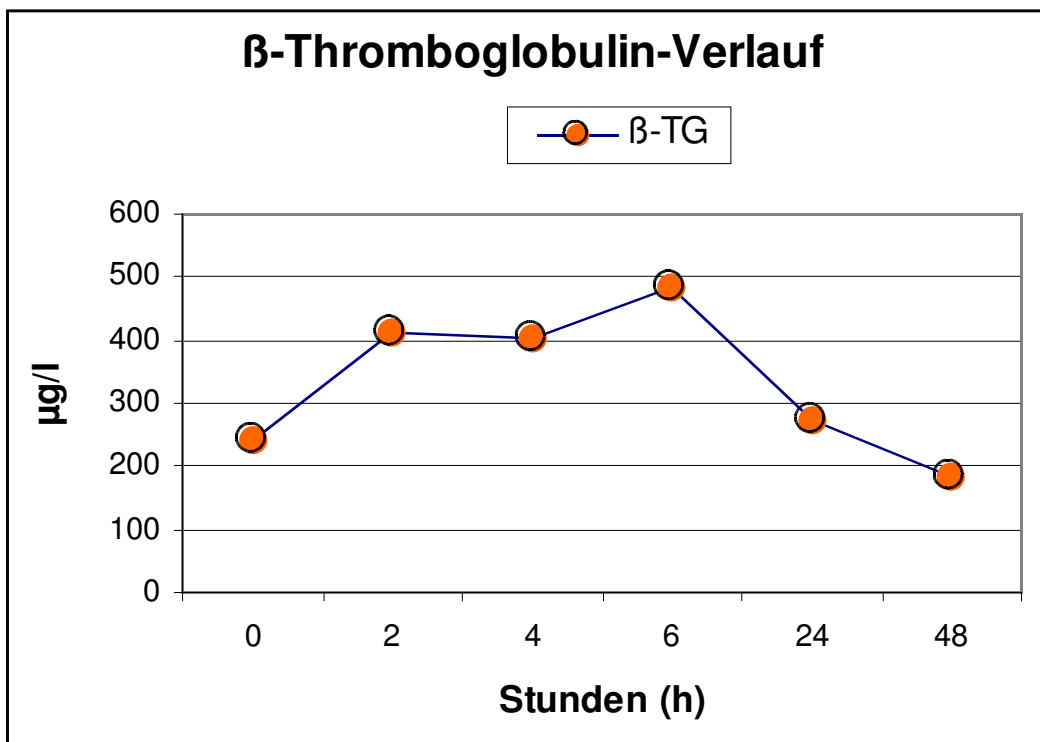


Abbildung 15: Kinetik der  $\beta$ -TG-Werte vor, während und nach Lysetherapie.

## **In-vitro Vergleich eines in-vivo Nonresponders mit einem gesunden Probanden:**

Um Fehler bei der Blutentnahme oder bei der flowzythometrischen Messung auszuschließen, wurde das Blut des Patienten, welcher nicht auf Abciximab angesprochen hatte, nochmals mit verschiedenen Dosen von Abciximab in-vitro untersucht und mit einem gesunden Probanden verglichen. Dem Blut wurde dabei die Standarddosis, die doppelte Dosis, die vierfache Dosis und die achtfache Dosis der in vivo-Abciximab-Konzentration zugesetzt. Das Ergebnis zeigte, dass lediglich die Standarddosis eine erniedrigte Rezeptorbindung hervorrief. Schon bei der doppelten Konzentration erhielt man eine normale Rezeptorbindung im Vergleich zu dem Normalprobanden. Die fehlende Respondenz in vivo ließ sich bei einfacher Dosis in vitro bestätigen.

	<b>Standarddosis</b>	<b>x 2</b>	<b>x 4</b>	<b>x 8</b>
<i>Proband</i>	91,84	94,21	94,87	95,03
<i>Patient</i>	-3,05	92,39	93,72	94,43

*Tabelle 13: Vergleich der Rezeptorblockade eines Normalprobanden mit einem Abciximab-Nonresponder in vitro (in %)*

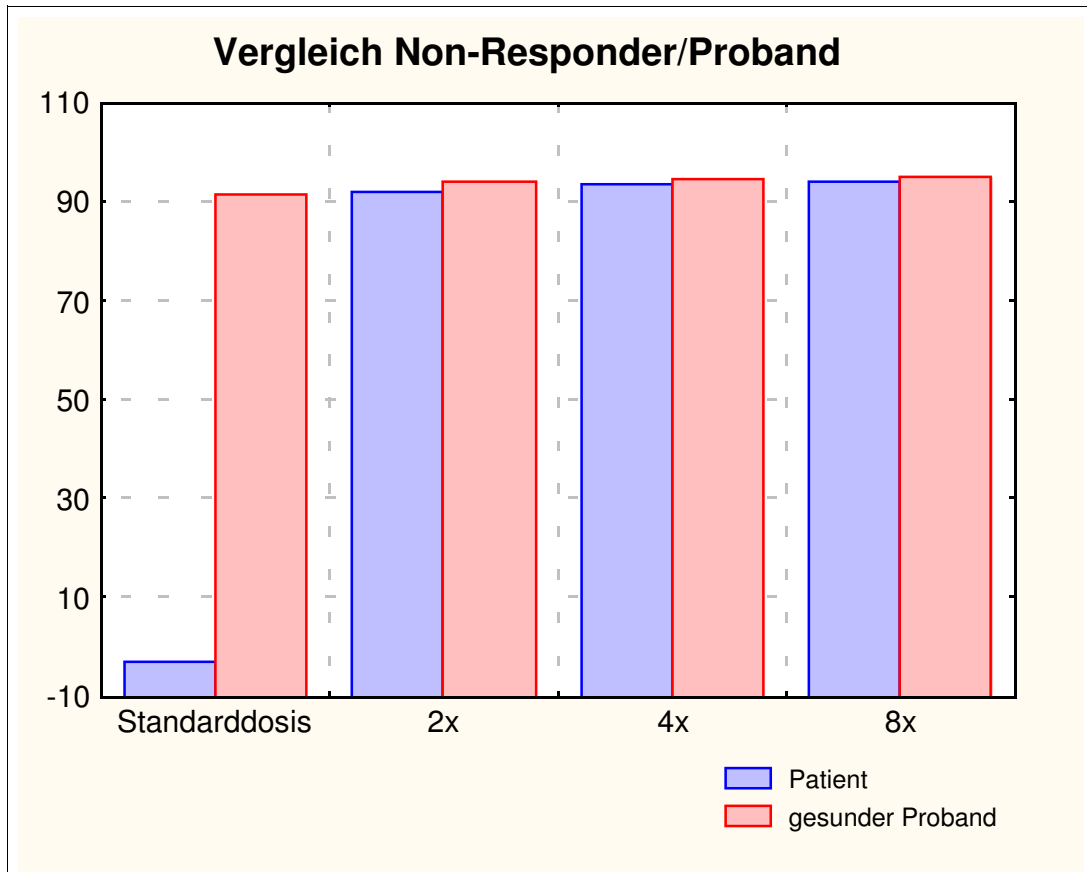


Abbildung 16: Vergleich der Rezeptorblockade eines gesunden Probanden und eines Non-Responder-Patienten in Abhängigkeit der Abciximab Blutkonzentration.



## Diskussion

### Die Bedeutung des Flowzytometers für das Monitoring der Rezeptorblockade

Um die Wirkung verschiedenster Thrombozyten-Antikörper zu bestimmen und auf einen bestimmten Zeitraum messen zu können, wurde in der Vergangenheit schon über mehrere Methoden nachgedacht und diskutiert. Gegenüber der Impedanz-Methode<sup>90</sup>, einigen Agglutinationstests<sup>91</sup>, verschiedenster ELISA Techniken<sup>92</sup> und einigen anderen Methoden hat sich die Flowzytometrie in den letzten Jahren immer mehr als das Mittel der Wahl für das Monitoring von Thrombozyten-Antagonisten durchgesetzt. Dabei lassen sich die Vorzüge des Flowzytometers klar zusammenfassen: Schnelligkeit, Sensitivität, Präzision und Objektivität<sup>93</sup>. Durch das gute Zusammenspiel der Einzelelemente Optik, Flüssigkeitssystem und Elektronik, sowie deren ständige Überarbeitung konnten diese Vorzüge in den letzten Jahren weiter optimiert werden. Im Gegensatz zur Thrombozytenaggregometrie, bei der die Aggregationsfunktion der gesamten Thrombozyten gemessen wird, kann bei der Flowzytometrie durch spezifische Epitope der Aktivationsstatus des einzelnen Thrombozyten evaluiert werden<sup>94</sup>. Eine Zentrifugation, welche die Blutplättchen aktivieren könnte, ist dabei nicht nötig. Während bei der Aggregometrie 500 µl Blut für eine Standarduntersuchung benötigt werden, bedarf es bei der Flowzytometrie lediglich 50µl pro Messung. Andere die Gerinnung betreffenden Faktoren, wie zum Beispiel das Fibrinogen, können dabei die Messung nicht beeinflussen. Außerdem ermöglicht die Flowzytometrie auch die Messung am thrombozytopenischen Patienten<sup>95</sup>.

Die in dieser Studie verwendete indirekte flowzytometrische Messmethode mithilfe der Antikörper Mab 1 und Mab 2 und dem Fluoreszenzfarbstoff FITC hat sich in der gegenwärtigen Forschung auf diesem Gebiet bereits etabliert<sup>96</sup>.

Auch für das Monitoring der Glykoproteinrezeptorblockade hat sich die Verwendung des Flowzytometers erneut bewährt. Hinsichtlich der Frage, ob der

Flowzytometer auch der therapeutischen Überwachung außerhalb der Forschung dient, müssen in heutiger Zeit sicherlich die Kosten für Zytometer und Proben mitberücksichtigt werden. Da jedoch der Flowzytometer vielseitig einsetzbar ist, haben inzwischen mehrere Laboratorien ein Gerät. Ein geschultes Personal, welches die Analyse innerhalb von 40 Minuten je Messung durchführen kann, wird allerdings immer benötigt. Alternativ zum Flowzytometer käme für die Überwachung am Bett ein in der Literatur beschriebener Test in Frage, der auf einer Koagglutination von Fibrinogen umhüllten Beads und Thrombozyten basiert<sup>97</sup>. Die weitere Entwicklung muss abgewartet werden.

## **Beurteilung der Rezeptorbindung**

Die Forschung an Glykoproteinrezeptorblockern bei peripheren Gefäßverschlüssen ist noch recht neu. Nach der PROMT-Studie<sup>98</sup>, ist die APART – Studie nun die zweite zu diesem Thema veröffentlichte Tübinger Studie.

20 der untersuchten 24 Patienten erreichten eine Rezeptorblockade innerhalb des therapeutischen Wirkungsspektrums von über 80 %. Nach Absetzen der Infusion nach einer Infusionsdauer von 12 Stunden nahm die Wirkung von Abciximab kontinuierlich ab, so dass nach 24 Stunden bei nahezu allen Patienten und nach 48 Stunden bei allen Patienten keine ausreichende Blockade mehr vorhanden war. Diese Erkenntnis deckt sich vorwiegend mit den bisher gemachten Erfahrungen aus früheren Studien<sup>99,100</sup>.

Die Korrelation zwischen Rezeptoranzahl und Rezeptorblockade ist mit 0,69 als sehr schwach einzustufen. Außerdem gab es drei Patienten, welche unter berechneter Dosis keine ausreichende Blockade erzielen konnten, und ein Patient, welcher gar keine Blockade zeigte. Es war jedoch zu beobachten, dass alle auf Abciximab ansprechende Patienten während der ersten 6 Stunden gar keine oder eine geringe Abnahme der Rezeptorblockade verzeichneten. Grund

für das verschiedenartige Ansprechen könnte der hohe genetische Polymorphismus des GPIIb/IIIa Rezeptors sein. Genetische Variationen des Rezeptors sind zuweilen mit thrombotischen Syndromen assoziiert<sup>101</sup>. Es ist bekannt, dass genetische Varianten der GPIIIa-Untereinheit die Bindungsaffinität des ganzen Rezeptors zu Fibrinogen verändern können<sup>102</sup>. Insbesondere trifft diese Beobachtung auf die Variabilität des PI(A) - Allels zu<sup>103</sup>. Es wird daher angenommen, dass genetische Variationen auch die Bindungsaffinität an Abciximab ändern können. Ein Ansprechen auf den Wirkstoff sollte daher zumindest einmal nach Bolusgabe überprüft werden.

## **Die Rezeptorblockade von Reteplase und Urokinase im Vergleich**

Bis zum heutigen Zeitpunkt ist für die Lysetherapie der peripheren Gefäße Abciximab nur in Kombination mit Urokinase als Fibrinolytikum zugelassen. Bisher veröffentlichte Studien<sup>104</sup> schilderten Reteplase als Alternative für die Behandlung peripherer Verschlüsse. Die APART-Studie ist nun die erste Studie, die die Rezeptorblockade von Abciximab unter der Therapie mit Urokinase gegenüber der Therapie mit Reteplase mittels Flowzytometer vergleicht.

Alle 6 mit Urokinase und Abciximab behandelten Patienten sprachen auf die Abciximabtherapie an und erreichten die therapeutische Dosis von 80 %. 14 der 18 untersuchten Patienten, welche mit Reteplase und Abciximab behandelt worden waren, erzielten ähnlich gute Rezeptorblockaden. Die anderen 4 Patienten konnten die therapeutische Dosis nicht erreichen.

Es wurde beobachtet, dass bei den meisten Patienten, Reteplase eine Alternative zu Urokinase darstellt. In 22% der mit Reteplase und Abciximab behandelten Fälle ist jedoch keine ausreichende Rezeptorblockade erzielt worden. Um eine eindeutige Aussage über die Reteplaseansprechrates machen zu können, müssten sicherlich noch weitere Studien mit größeren Stichproben folgen.

## **β-Thromboglobulin und TAT-Antithrombin-Komplex Werte nach heparinisierte Lysetherapie mit darauffolgender Abciximabgabe:**

Der Thrombin-Antithrombin-Komplex (TAT) dient der Inaktivierung von Thrombin und wird bei einem Angiologischen Eingriff wie einer Lysetherapie verstärkt freigesetzt. Heparin verstärkt auf unterschiedliche Art und Weise diesen Effekt<sup>105</sup>. Bei Zugabe eines Glykoproteinrezeptorantagonisten ist eine Abnahme der TAT-Formation und eine verstärkte Freisetzung beschrieben worden<sup>106</sup>.

Unsere Ergebnisse entsprechen diesen Beschreibungen. Der Anstieg auf 223 µg/l innerhalb der ersten beiden Stunden ist als sehr groß einzustufen. Ein langsames Abfallen der Werte ist in der darauffolgenden Zeit zu beobachten gewesen. Auch die darauf folgenden Werte nach 24 und nach 48 Stunden lagen deutlich über dem Durchschnittswert einer Normalperson der mit 1,5 µg/l angegeben wird. Dies ist auf die Vollheparinisierung für 48 Stunden und auf die Abciximab-Gabe durchaus zurückzuführen.

Beim Vergleich des TAT-Kurvenverlaufes der unterschiedlichen Fibrinolytika fällt zunächst auf, dass die TAT-Werte unter Reteplase zunächst stärker ansteigen, nach 24 Stunden aber unter die TAT-Werte der Urokinasepatienten fallen. Sowohl Reteplase<sup>107</sup> als auch Urokinase<sup>108</sup> werden eine Erhöhung der TAT-Werte nachgesagt. Ein Vergleich der beiden fand bisher noch nicht statt. Nach unserer Studie scheint aber Reteplase einen größeren Einfluss auf den TAT-Anstieg zu haben als Urokinase.

Auch das β-Thromboglobulin wird bei der Thrombozytenaktivierung verstärkt aus den alpha-Granula freigesetzt<sup>109</sup>. Eine arterielle Blutentnahme wird in der Literatur empfohlen<sup>110</sup>. Eine Studie konnte bisher eine Erhöhung der β-TG-Werte im Zusammenhang mit Abciximab nachweisen<sup>111</sup>.



In dieser Studie konnten wir einen starken Anstieg der  $\beta$ -TG-Werte beobachten, der sein Maximum nach 6 Stunden erreichte. Dies spricht für eine Beeinflussung des  $\beta$ -TG-Wertes während der Abciximab-Infusion. Nach Absetzen der Infusion nahmen die Werte dann deutlich ab.

### **Vergleich eines Abciximab-Nonresponders mit einem Normalprobanden und der Einfluss der Genetik:**

Bisher unbeantwortet ist die Frage, ob es komplette Resistenzen bezüglich der Behandlung mit Glykoproteinrezeptorblockern gibt.

Einer der mit Reteplase und Abciximab behandelten Patienten zeigte keinerlei Rezeptorblockade nach Verabreichung von Reopro<sup>®</sup>. Auch bei der in vitro-Kontrolle einige Tage später, bei der Abciximab zunächst in einfacher Dosis der Blutprobe zugegeben wurde, konnte keine Rezeptorblockade beobachtet werden. Erst nach Zugabe der doppelten Abciximab-Dosis stellte sich mit 92,39% eine deutliche Rezeptorblockade ein. Wir konnten zusätzlich feststellen, dass trotz Erhöhung der Abciximab-Dosis bis zum achtfachen der Standarddosis die Rezeptorblockade immer unterhalb der Rezeptorblockade eines verglichenen Normalprobanden war.

Grund für das Nichtansprechen auf Reopro<sup>®</sup> könnte die bereits erwähnte genetische Variationsbreite der GPIIIa-Untereinheit sein<sup>112</sup>. Die in vitro-Messungen zeigten, dass Variationen in der Bindungskinetik überbrückt werden können, indem man die Abciximab-Dosis verändert. Diese Beobachtung deckt sich am ehesten mit den beschriebenen Polymorphismen des PI(A) – Gens. Im Gegensatz zu homozygoten Patienten für das PI(A1) – Gen zeigen homozygote Patienten für das PI(A2) – Gen eine relative Resistenz auf die Abciximab – Wirkung. Ein drei- bis vierfach erhöhtes Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen ist beschrieben worden<sup>113</sup>. Heterozygote Erbträger zeigen eine geringgradigere Einschränkung der Fibrinogenbindung. Das Vorliegen eines homozygoten PI(A2) – Gens könnte bei diesem Patienten angenommen

werden, würde jedoch eine komplette Resistenz in vivo nicht erklären<sup>114</sup>.

Ein weiterer Grund für das Nichtansprechen auf Reopro® könnte eine Spaltung der langen Kette der GP IIIa Cys(5)-Cys(435) Disulfid-Brücke sein. Genetische Mutationen in diesem Bereich können zu einer verstärkten GP IIb/IIIa-Komplex-Aktivität aufgrund einer Konformationsänderung der GP IIIa-Untereinheit führen<sup>115</sup>.

Ein Einfluss des HPA-I – Gens kann genannte Beobachtung nicht erklären<sup>116</sup>. Die mögliche Stimulation der CD62P – Expression wurde nicht untersucht<sup>117</sup>. Eine Interaktion mit der thrombolytischen Therapie sollte jedoch ausgeschlossen werden, da die meisten Patienten mit derselben Therapie eine normale Bindungskinetik gezeigt hatten. Die Rezeptorblockade des Glykoproteinrezeptors ist invers von der Thrombozytenzahl abhängig<sup>118</sup>. Bei dem Patienten wurden 338.000 Thrombozyten/ $\mu$ l gemessen. Die hier vorliegende Resistenz wird dadurch jedoch nicht erklärt.

Die wahrscheinlichste Ursache dieser in vivo beobachteten kompletten und in vitro beobachteten relativen Resistenz scheint demnach in der Genetik des Patienten verankert zu sein. Nachdem eine relative Resistenz bei homozygoten PI(A2) – Genträgern bereits beschrieben worden ist, bleibt die Ätiologie einer kompletten Resistenz Gegenstand künftiger Forschungen. Eine Mutation der Cys(5)-Cys(435) Disulfid-Brücke ist ebenfalls möglich.

Vor allem aufgrund eines ursächlichen Zusammenhangs mit der Glanzmannschen Thrombasthenie bleibt die genetische Untersuchung des GP IIb/IIIa-Rezeptors Gegenstand aktueller Forschung<sup>119</sup>. Als Lokalisation der meisten für die Thrombasthenie verantwortlichen Mutationen wird das Chromosom 17q angegeben<sup>120</sup>.

## Komplikationen

Blutungskomplikationen infolge Abciximab-Gabe sind in der Literatur häufiger beschrieben worden<sup>121</sup>. Bei einem von 25 Patienten traten innere Blutungen auf, infolgedessen die Therapie unterbrochen wurde.

Eine lebensbedrohliche Thrombozytopenie im Zusammenhang mit der Abciximab - Gabe aufgrund idiopathischer Alteration der Glykoproteinzusammensetzung der Thrombozytenmembran trat nicht auf<sup>122</sup>.

## Zusammenfassung

Diese Arbeit befasst sich vorwiegend mit der Wirkung des Glykoproteinrezeptorblockers Abciximab auf den GP IIb/IIIa-Rezeptor des Thrombozyten infolge Lysetherapie peripherer Verschlüsse mit den Fibrinolytika Reteplase oder Urokinase im Vergleich. Die Rezeptorblockade wurde mithilfe Flowzytometrie ermittelt und über 48 Stunden beobachtet. Zur Überprüfung der Thrombozytenaktivierung wurden die Parameter TAT und  $\beta$ -Thromboglobulin über denselben Zeitraum gemessen und verglichen.

Von den 24 untersuchten Patienten erreichten 20 die benötigte Rezeptorblockade von 80 %. Nach 48 Stunden waren alle behandelten Patienten außerhalb des therapeutischen Bereiches. Der Einsatz von Reteplase erbrachte keinen Vorteil gegenüber dem bisher verwendeten Urokinase. Vier der Patienten, die mit Reteplase behandelt worden waren, zeigten keine ausreichende Rezeptorblockade, einer von ihnen sprach überhaupt nicht auf Abciximab an. Dieser Patient zeigte auch bei der Überprüfung in vitro nach Zugabe der Standarddosis Abciximab kein Ansprechen auf den Rezeptorblocker. Die Korrelation der freien Rezeptoren zu insgesamt vorhandenen Rezeptoren war sehr schwach ( $r=0,69$ ).

Sowohl der Thrombin-Antithrombin-Komplex TAT, als auch das  $\beta$ -Thromboglobulin, zeigten einen starken Anstieg infolge Lysetherapie und Abciximabgabe. Dabei stiegen die TAT-Werte unter Reteplase stärker an, als unter Urokinase. Ein auf die Freisetzung beider Parameter verstärkender Einfluss des Rezeptorblockers muss eher angenommen denn ausgeschlossen werden.

Bei einem Patienten wurde infolge Abciximabgabe überhaupt kein Rezeptorbesatz gemessen. Ein Zusammenhang mit der relativen Resistenz bei homozygoten PI(A2) – Genträgern ist möglich, eine komplette Glykoproteinrezeptorblockerresistenz kann damit aber nicht erklärt werden. Eine Mutation der Cys(5)-Cys(435) Disulfid-Brücke kann ebenfalls Ursache erhöhter Aktivität des Rezeptors sein.

Ein Patient zeigte innere Blutungen infolge Reopro<sup>®</sup>-Gabe. Lebensbedrohliche Thrombozytopenien traten nicht auf.

In weiterführenden Studien mit größeren Stichproben sollte in Erfahrung gebracht werden, ob Reteplase die Blockade weniger Patienten sogar verschlechtert und ob es komplette Resistenzen gegenüber Glykoproteinrezeptorblocker IIb/IIIa gibt.

Für den Gebrauch von Abciximab infolge Lysetherapie peripherer Verschlüsse muss eine auf das Anprechen des Rezeptorblockers überprüfende Blutabnahme empfohlen werden.

- <sup>1</sup> Ouriel K, Shortel CK, Azodo MVU, Guitierrez OH, Marder VJ. Acute peripheral arterial occlusion: predictors of success in catheter directed thrombolytic therapy. *Radiologie* 1994; 193:561-566
- <sup>2</sup> Ouriel L, Veith FJ, Sasahard AA for the Thrombolysis or Peripheral Arterial Surgery (TOPAS) Investigators. A comparison of recombinant urokinase with vascular surgery as initial treatment for acute arterial occlusion of the legs. *New Engl J Med* 1998; 338:1105-1111.
- <sup>3</sup> Jank IK, Gold HK, Ziskind AA, et al. Differential sensitivity of erythrocyte-rich and platelet-rich arterial thrombi to lysis with recombinant tissue-type plasminogen activator: a possible explanation for resistance to coronary thrombolysis. *Circulation* 1989; 79:920-928.
- <sup>4</sup> Yasuda T, Gold HK, Fallon JT, et al. A canine model of coronary artery thrombosis with superimposed high grade stenosis for the investigation of rethrombosis after thrombolysis. *J Am Coll Cardiol* 1989; 13:1409-1414.
- <sup>5</sup> ISIS-3 (Third International Study of Infarct Survival) Collaborative Group. Randomised comparison of streptokinase vs tissue plasminogen activator vs anistreplase and of aspirin plus heparin vs aspirin alone among 41299 cases of suspected acute myocardial infarction. *Lancet* 1992; 339: 753-770.
- <sup>6</sup> Gold HK, Collier BS, Yasuda T, et al. Rapid and sustained coronary artery recanalization with combined bolus injection of recombinant tissue-type plasminogen activator and monoclonal antiplatelet GP IIb/IIIa antibody in a canine preparation. *Circulation* 1998; 77: 670-677.
- <sup>7</sup> Yasuda T, Gold HK, Leinbach RC, et al. Lysis of plasminogen activator-resistant platelet-rich coronary artery thrombus with combined bolus injection of recombinant tissue-type plasminogen activator and antiplatelet GP IIb/IIIa antibody. *J Am Coll Cardiol* 1990; 16:1728-1735.
- <sup>8</sup> Tepe G, Duda SH, Erley CM, Schott U, Huppert PE, Claussen CD. Monoclonal antibody c7E3 Fab as an adjunct for thrombolysis of peripheral arteries. *Fortschr Röntgenstr* 1997; 166: 254-257.
- <sup>9</sup> Tepe G, Duda SH, Erley CM, Schott U, Albes J, Claussen CD. Platelet glykoprotein IIb/IIIa receptor antagonist used in conjunction with thrombolysis for peripheral artery thrombosis. *AJR* 1999; 172 (May, in press).
- <sup>10</sup> Lopez LM Clinical trial in thrombolytic therapy, part 2: The open-artery hypothesis and RAPID-1 and RAPID-2. *Am J Health Syst Pharm*.1997; 54: Suppl. 1, S27-30.
- <sup>11</sup> Bode C., Nordt TK, Peter K, Smalling RW, Runge MS, Kubler W. Patency trials with reteplase (r-PA): what do they tell us? *Am J Cardiol*. 1996; 78: 16-19.
- <sup>12</sup> GOSTO study group. A comparison of reteplase with alteplase for acute myocardial infarction. The Global Use of Strategies to Open Occluded Coronary Arteries (GUSTO III). *N Engl J Med* 1997; 337: 118-123.
- <sup>13</sup> Mitchel JF, Shwedick M, Alberghini TA, Knibbs D, McKay RG. Catheter-based local thrombolysis with urokinase: comparative efficacy of intraluminal clot lysis with conventional urokinase infusion techniques in an in vivo porcine thrombus model. *Cathet Cardiovasc*

Diagn. 1997; 41: 293-302.

- 14 Schmidt Robert F. , Thews Gerhard, Physiologie des Menschen, Axel-Springer-Verlag 1997; 426-427
- 15 Holmsen H. , Platelet metabolism and activation, Semin Hematol 1985; 22:219
- 16 Löffler Georg, Petrides Petro E., Biochemie und Pathobiochemie, Axel-Springer-Verlag 1998; 441-442
- 17 Löffler Georg, Petrides Petro E., Biochemie und Pathobiochemie, Axel-Springer-Verlag 1998; 882-883
- 18 Collier BS. Platelet GP IIb/IIIa antagonists: The first anti-integrin receptor therapeutics. J Clin Invest. 1997;99: 1467-1471
- 19 Scarborough RM, Kleinmann NS Phillips DR. Platelet glykoprotein IIb/IIIa antagonists: what are the relevant issues concerning their pharmacology and clinical use? Circulation. 1999; 100:437- 444
- 20 Schmidt Robert F. , Thews Gerhard, Physiologie des Menschen, Axel-Springer-Verlag 1997, 428-429
- 21 Kalmár P., Irrgang E., Cardiac Surgery in Germany during 1996. A report by the German society for thoracic and endovascular surgery. J Thorac Cardiovasc Surg. 1996; 8(6): 315-22
- 22 Mazoyer E, Boizard-Boval B, Pidard D Caen J Wautier JL, Platelet membrane glycoproteins and platelet functions during storage in the presence of a proteinase inhibitor. Thromb Res. 1991; 62:165-75
- 23 Boldt J, Schindler E., Knothe Ch., Hammermann H., Stenmann E., Hempelmann G., Does Aprotinin Influence Endothelial. Associated Coagulation in Cardiac Surgery? J Cardiothorac Vasc Anesth 1994; Vol8, No5:527-531
- 24 Tanaka K et al., Alterations in Coagulation and fibrinolysis associated with cardiopulmonary bypass during open heart surgery, J Cardiothorac Anesth.1989; Vol 3, No 2:181-88
- 25 Butenas et al., Antiplatelet agents in tissue factor-induced blood coagulation. Bloodjournal 2001; 97(8): 2314-2322.
- 26 Taomoto K, Asada M, Kanazawa Y, Matsumoto S: Usefulness of Measurement of Plasma  $\beta$ -Tg in Cerebrovascular Disease, Stroke 1983; 14: 518-24.
- 27 Brandt E, Petersen F, Ludwig A, Ehler JE, Bock L, Flad HD; The beta-thromboglobulins and platelet factor 4: blood platelet-derived CXC chemokines with divergent roles in early neutrophil regulation; J Leukoc Biol 2000; 67 (4): 471-8.
- 28 Dawes J, Smith RC, Pepper DS, The release, distribution and clearance of human  $\beta$ -Tg and PF 4; Thromb Res. 1978; 12: 851-61.
- 29 Kaplan KL, Owen J; Plasma levels of  $\beta$ -thromboglobulin and platelet factor 4 as indices of platelet activation in vivo. Blood 1981; 57: 199-202.
- 30 Ludham CA, Moore S, Bolton AE, Pepper DS, Cash JD; The release of human platelet-specific protein measured by radioimmunoassay. Thromb Res 1975; 6: 543-8.
- 31 Van Oost BA, Veldhuyzen B, Timmermans APM, Sixma JJ; Increased Urinary  $\beta$ -Thromboglobulin Excretion in Diabetes Assayed with a Modified RIA Kit Technique. Thromb Haemost 49: 18-20.
- 32 Bastl CP, Musial J, Kloczewiak M, Guzzo J, Berman I, Niewiarowski S; Role of Kidney in

- Catabolic Clearance of Human Platelet Antiheparin Proteins from Rat Circulation. *Blood* 1981; 57: 233-8.
- <sup>33</sup> Bolton AE, Cooke ED, Lekwani CP, Bowcock SA; Urinary  $\beta$ -Tg levels as a diagnostic marker for post-operative deep vein thrombosis. *Thromb Res* 1980; 19: 249-55.
- <sup>34</sup> Guzzo J, Niewiarowski S, Musial J, Bastl CP, et al.; Secreted platelet proteins with antiheparin and mitogenic activities in chronic renal failure. *J Lab Clin Med* 1980; 96: 102-13.
- <sup>35</sup> Van Oost BA, Veldhuyzen B, Timmermans APM, Sixma JJ; Increased Urinary  $\beta$ -Thromboglobulin Excretion in Diabetes Assayed with a Modified RIA Kit Technique. *Thromb Haemost* 49: 18-20.
- <sup>36</sup> Lande K, Gjesdal K, Os I, Kjeldsen SE, Eide I, Westheim A, Hjermann I; Does Arterial Rather than Venous Plasma  $\beta$ -Thromboglobulin Better Reflect in Vivo Platelet Release Reaction? *Thromb Haemost* 1985; 54: 547.
- <sup>37</sup> Tsao PW, Forsythe MS, Mousa SA; Dissociation between the anti-aggregatory & anti-secretory effects of platelet integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 (GP IIb/IIIa) antagonists c7E3 and DMP 728; *Thromb Res* 1997; 88(2): 137-46.
- <sup>38</sup> Fiane AE, Videm V, Mollnes TE, Hogasen K, Hovig T; Inhibition of platelet aggregation by the GP IIb/IIIa antagonist reopro does not significantly prolong xenograft survival in an ex vivo model. *Transpl Int* 1999; 12(5): 323-33.
- <sup>39</sup> Hynes RO; Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell*. 1992 Apr 3; 69(1):11-25. Review.
- <sup>40</sup> Jang IK, Plow EF, Gold HK, Roskams T, Collier D, Kiss RG, Lu HR; Time course of the effects of a single bolus injection of F(ab')<sub>2</sub> fragments of the antiplatelet GPIIb/IIIa antibody 7E3 on arterial eversion graft occlusion, platelet aggregation, and bleeding time in dogs. *Arterioscler Thromb*. 1994 Mar;14(3):367-74.
- <sup>41</sup> Jang et al.1994
- <sup>42</sup> Braunwald E, Maseri A, Califf RM, Gibler WB, Hamm CW, Simons MC, Van de Werf F, Armstrong PW; Rationale and clinical evidence for the use of GP IIb/IIIa inhibitors in acute coronary syndromes. *Am Heart J*. 1998 Apr;135(4):S56-66. Review.
- <sup>43</sup> Tullu MS, Dixit PS, Nair SB, Karnat J, Vaswani RK, Shetty SD, Pawar AC; Glanzmann's thrombasthenia. *Indian J Pediatr*. 2001 Jun;68(6):563-6. Review.
- <sup>44</sup> Calvete JJ; Clues for understanding the structure and function of a prototypic human integrin: the platelet glycoprotein IIb/IIIa complex. *Thromb Haemost*. 1994 Jul;72(1):1-15. Review.
- <sup>45</sup> Jang et al.1994
- <sup>46</sup> Jang et al.1994
- <sup>47</sup> Vestweber D, Blanks JE; Mechanisms that regulate the function of the selectins and their ligands. *Physiol Rev*. 1999 Jan;79(1):181-213. Review.
- <sup>48</sup> Crocket-Torabi E; Selectins and mechanisms of signal transduction. *J Leukoc Biol*. 1998 Jan;63(1):1-14. Review.
- <sup>49</sup> Jang et al.1994
- <sup>50</sup> McEver; The clinical significance of platelet membrane glycoproteins. *Hematol Oncol Clin*

- North Am. 1990 Feb;4(1):87-105. Review.
- <sup>51</sup> Furie B, Celi A, Palabrica TM, Larsen E, Wagner DD, Furie BC; PADGEM, a leukocyte receptor on activated platelets. Biology and application to in vivo medical diagnostics. *Curr Stud Hematol Blood Transfus.* 1991;(58):32-6. Review.
- <sup>52</sup> Jang et al.1994
- <sup>53</sup> Virchow R (1856) *Gesammelte Abhandlungen zur wissenschaftlichen Medicin.* Von Meidinger, Frankfurt a.M.
- <sup>54</sup> Sharis PJ, Cannon, Cosalzcy; Mechanisms that regulate the function of the selectins and their ligands. *Physiol Rev.* 1999 Jan;79(1):181-213. Review.
- <sup>55</sup> Boneu B, Destelle G; Platelet anti-aggregating activity and tolerance of clopidogrel in atherosclerotic patients. *Thromb Haemost.* 1996 Dec;76(6):939-43.
- <sup>56</sup> Lüllmann H, Mohr K; *Pharmakologie und Toxikologie,* Georg Thieme Verlag Stuttgart 1999; S.274
- <sup>57</sup> Topol EJ, Byzova TV, Plow EF. Platelet GP IIb/IIIa blockers. *Lancet.*1999; 353: 227-231.
- <sup>58</sup> Calvete JJ, McLane MA, Stewart GJ, Niewiarowski S; Characterization of the cross-linking site of disintegrins albolabrin, bitistatin, echistatin, and eristostatin on isolated human platelet integrin GPIIb/IIIa. *Biochem Biophys Res Commun.* 1994 Jul 15;202(1):135-40.
- <sup>59</sup> Frishman WH, Burn B, Atac B, Alturk N, Altajar B, Cerrick K; Novel antiplatelet therapies for treatment of patients with ischemic heart disease: inhibitors of the platelet glycoprotein IIb/IIIa integrin receptor. *Am Heart J.* 1995 Oct;130(4):877-92. Review.
- <sup>60</sup> Collier Barry S.; Platelet GP IIb/IIIa Antagonists: The first anti-Integrin Receptor Therapeutics; *J.Clin.Invest.*1999.
- <sup>61</sup> Scarborough RM, Kleinmann NS Phillips DR. Platelet glykoprotein lib/IIIa antagonists: what are the relevant issues concerning their pharmacology and clinical use? *Circulation.* 1999; 100: 439.
- <sup>62</sup> Scarborough RM, Kleinmann NS Phillips DR. Platelet glykoprotein IIb/IIIa antagonists: what are the relevant issues concerning their pharmacology and clinical use? *Circulation.* 1999; 100:437- 444.
- <sup>63</sup> Faul D, Sorkin EM; Abciximab (c7E3 Fab): a review of ist pharmacology and therapeutic potential in ischemic heart disease. *Drugs.* 1994; 48: 583-598.
- <sup>64</sup> Madan M, Tchong JE; Platelet Glycoprotein IIb/IIIa Integrin Blockade: Focus on Acute Myocardial Infarction. *J Invasive Cardiol.* 1998 Mar;10 Suppl A:27A-32A.
- <sup>65</sup> 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.
- <sup>66</sup> Topol EJ, Ferguson JJ, Weisman HF et al. Long-term protection from myocardial ischemic events in a randomized trial of brieintervention. *J Am Med Assoc* 1997; 278:479-84.
- <sup>67</sup> The EPILOG Investigators. Platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor blockade and low dose heparin during percutaneous coronary revascularization. *N Engl J Med* 1997; 336: 1689-96.
- <sup>68</sup> The EPISTENT Investigators. Randomized controlled trial to asses safety of coronary



- stenting with use of abciximab. *Lancet* 1998; 352: 85-90.
- <sup>69</sup> Kapadia SR, Bajzer CT, Ziada KM, Bhatt DL, Wazni OM, Silver MJ, Beven EG, Ouriel K, Yadav JS; Initial experience of platelet glycoprotein IIb/IIIa inhibition with abciximab during carotid stenting: a safe and effective adjunctive therapy. *Stroke* 2001; 32 (10): 2328-32.
- <sup>70</sup> Junghans U, Seitz RJ, Ritzl A, Wittsack HJ, Fink GR, Freund HJ, Siebler M; Ischemic brain tissue salvaged from infarction by the GP IIb/IIIa platelet antagonist tirofiban. *Neurology* 2002; 58 (3): 474-476.
- <sup>71</sup> Iris Baumgärtner, Swiss Cardiovascular Center Bern, University Hospital Freiburgstrasse, Bern Switzerland; Platelet Glykoprotein IIb/IIIa Receptor Antagonists in Peripheral Artery Disease; 2002 Radiologiekongress Paris
- <sup>72</sup> Gawaz M, Ruf A, Neumann FJ, Pogatsa-Murray G, Dickfeld T, Zohlnhofer D, Schomig A; Effect of glycoprotein IIb-IIIa receptor antagonism on platelet membrane glycoproteins after coronary stent placement; *Thromb Haemost.* 1998 Dec; 80(6): 994-1001.
- <sup>73</sup> Renda G, Rocca B, Crocchiolo R, Cristofaro RD, Landolfi R; Research Center on Pathophysiology of Haemostasis, Catholic University School of Medicine, Rome, Italy. *Thromb Haemost.* 2003 Feb; 89(2): 348-54.
- <sup>74</sup> Gorchakova O, Koch W, Mehilli J, Beckerath Nv N, Schwaiger M, Schomig A, Kastrati A; PI(A) polymorphism of the glycoprotein IIIa and efficacy of reperfusion therapy in patients with acute myocardial infarction; *Thromb Haemost.* 2004 Jan; 91(1): 141-5.
- <sup>75</sup> Wheeler GL, Braden GA, Bray PF, Marciniak SJ, Mascelli MA, Sane DC; Reduced inhibition by abciximab in platelets with the PIA2 polymorphism; *Am Heart J.* 2002 Jan; 143(1): 76-82.
- <sup>76</sup> 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 GP IIIa PI(A) polymorphisms display different sensitivities to agonists; *Circulation.* 2000 Mar 7; 101(9): 1013-8.
- <sup>77</sup> Weber AA, Jacobs C, Meila D, Weber S, Zotz RB, Scharf RE, Kelm M, Strauer BE, Schror K; No evidence for an influence of the human platelet antigen-1 polymorphism on the antiplatelet effects of glycoprotein IIb/IIIa inhibitors; *Pharmacogenetics.* 2002 Oct; 12(7): 581-3.
- <sup>78</sup> Weber AA, Meila D, Jacobs C, Weber S, Kelm M, Strauer BE, Zotz RB, Scharf RE, Schror K; Low incidence of paradoxical platelet activation by glycoprotein IIb/IIIa inhibitors; *Thromb Res.* 2002 Apr 1; 106(1): 25-9.
- <sup>79</sup> SPEED; Trial of abciximab with and without low-dose reteplase for acute myocardial infarction. Strategies for Patency Enhancement in the Emergency Department (SPEED) Group; *Circulation* 2000; 101 (24): 2788-94.
- <sup>80</sup> Herrmann HC, Moliterno DJ, Ohman EM, Stebbins AL, Bode C, Betriu A, Forycki F, Miklin JS, Bachinsky WB, Lincoff AM, Califf RM, Topol EJ; Facilitation of early percutaneous coronary intervention after reteplase with or without abciximab in acute myocardial infarction: result from the Gusto-4 Trial; *J Am Coll Cardiol* 2000; 36 (5): 1489-99.
- <sup>81</sup> Califf RM; Glykoprotein IIb/IIIa blockade and thrombolytics: early lessons from the SPEED and Gusto IV trials. *Am Heart J* 1999; 138 (1 PT 2): S12-5.
- <sup>82</sup> Topol EJ; The GUSTO V Investigators; Reperfusion therapy for acute myocardial infarction

with fibrinolytic therapy or combination reduced fibrinolytic therapy and platelet glycoprotein IIb/IIIa inhibition: the GUSTO V randomised trial. *Lancet* 2001; 357 (9272): 1905-14.

- <sup>83</sup> Hideo et al.1996
- <sup>84</sup> Collier BS; Monitoring platelet GP IIb/IIIa antagonist therapy. *Circulation* 1997; 96: 3828-3832.
- <sup>85</sup> Collier BS, Kutok JL; Partial inhibition of platelet aggregation and fibrinogen binding by a murine monoclonal antibody to GPIIIa: requirement for antibody bivalency. *Thromb Haemost.* 1994 Dec;72(6):964-72.
- <sup>86</sup> Gawaz M, Neumann FJ, Schönig A. Evaluation of platelet membrane glycoproteins in coronary artery disease: consequences for diagnosis and therapy. *Circulation.* 1999; 99: E1-E11.
- <sup>87</sup> Mascelli MA, Lance ET, Damaraju L, et al. Pharmacodynamic profile of short-term abciximab treatment demonstrates prolonged platelet inhibition with gradual recovery from GP IIb/IIIa receptor blockade. *Circulation* 1998; 97: 1680-1688.
- <sup>88</sup> Li JM, Podolsky RS, Rohrer MJ, Cutler BS, Massie MT, Barnard MR, Michelson AD; Adhesion of activated platelets to venous endothelial cells is mediated via GPIIb/IIIa. *J Surg Res.* 1996 Mar;61(2):543-8.
- <sup>89</sup> Peter K, Kohler B, Straub A, Ruef J, Moser M, Nordt Th, Olschewski M, Ohman M, Kübler W, Bode Ch; Flow Cytometric Monitoring of Glycoprotein IIb/IIIa Blockade and Platelet Function in Patients With Acute Myocardial Infarction Receiving Reteplase, Abciximab, and Ticlopidine. *Circulation.* 2000;102: 1490-1496.
- <sup>90</sup> Hideo et al.1996
- <sup>91</sup> Collier BS, Kutok JL; Partial inhibition of platelet aggregation and fibrinogen binding by a murine monoclonal antibody to GPIIIa: requirement for antibody bivalency. *Thromb Haemost.* 1994 Dec;72(6):964-72.
- <sup>92</sup> Marshall LR, Brogden FE, Roper TS, Barr AI. Antenatal platelet antibody testing by flow cytometry-results of a pilot study. *Transfusion* 1994; 34: 961-965
- <sup>93</sup> Garratty G, Arndt P. Applications of flow cytofluorometry to transfusion science. *Transfusion* 1995; 35:157-178.
- <sup>94</sup> Gawaz M, Neumann FJ, Schömig A. Evaluation of platelet membrane glycoproteins in coronary artery disease: consequences for diagnosis and therapy. *Circulation.* 1999; 99: E1-E11.
- <sup>95</sup> Peter K, Straub A, Kohler B, et al. Platelet Activation as a potential mechanism of GP IIb/IIIa inhibitor-induced thrombozytopenia. *Am J Cardiol.* 1999;84: 519-524.
- <sup>96</sup> Quinn M, Deering Adele, Stewart M, Cox D, Foley B, Fitzgerald D. Quantifying GP IIb/IIIa Receptor Bining Using 2 Monoclonal Antibodies. *Circulation.* 1999; 99: 2231-2238.
- <sup>97</sup> Smith JW, Steinhubl SR, Lincoff AM, et al. Rapid platelet-function assay: an automated and quantitative cartridge-based method. *Circulation.* 1999; 99: 620-625.
- <sup>98</sup> Tepe G, Duda SH, Erley CM, Schott U, Albes J, Claussen CD. Platelet glykoprotein IIb/IIIa receptor antagonist used in conjunktion with thrombolysis for peripheral artery thrombosis. *AJR* 1999; 172 (May, in press).
- <sup>99</sup> Peter K, Straub A, Kohler B, Ruef J, Moser M, Nordt Th, Olschewski M, Ohma M, Kübler W,

- Bode Ch; Flowcytometric Monitoring of Glycoprotein IIb/IIIa Blockade and Platelet Function in Patients With Acute Myocardial Infarction Receiving Reteplase, Abciximab, and Ticlopidine. *Circulation*. 2000; 102: 1490-1496.
- <sup>100</sup> Mascelli MA, Lance ET, Damaraju L, et al. Pharmacodynamic profile of short-term abciximab treatment demonstrates prolonged platelet inhibition with gradual recovery from GP IIb/IIIa receptor blockade. *Circulation*. 1998; 97: 1680-1688.
- <sup>101</sup> Weiss EJ, Bray PF, Tayback M, Schulman SP, Kickler TS, Becker LC, Weiss JL, Gertenblith 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: 1090-1094.
- <sup>102</sup> Nicholson NS, Panzer-Knodle SWG, Haas NF, Taite BB, Szalony JA, Page JD, Feigen LP, Lansky DM, Salyers AK. Assessment of platelet function assays. *Am Heart J*. 1998; 135: 170-178.
- <sup>103</sup> Michelson AD et al. 2002
- <sup>104</sup> Tepe G, Luz O, Hahn U, Pereira P, König C, Ziemer G, Claussen CD, Duda SH; Pulsed spray lysis with reteplase in peripheral arterial occlusions- technique and initial results. *Rofo Fortschr. Geb. Rontgenstr. Neuen Bildgeb. Verfahren* 2000; 172(9): 780-784.
- <sup>105</sup> Kalmár P., Irrgang E., Cardiac Surgery in Germany during 1996. A report by the German society for thoracic and endovascular surgery. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1996; 8(6): 315-322.
- <sup>106</sup> Butenas et al., Antiplatelet agents in tissue factor-induced blood coagulation. *Bloodjournal* 2001; 97(8): 2314-2322.
- <sup>107</sup> Moser M, Nordt T, Ruef J, Kohler B, Schmittner M, Smalling R, Kubler W, Bode C; Platelet function during and after thrombolytic therapy for acute myocardial infarction with reteplase, alteplase, or streptokinase. *Circulation* 1999; 100(18): 1858-1864.
- <sup>108</sup> Ueda T, Hatakeyama T, Sakaki S, Ohta S, Kumon Y, Uraoka T; Changes in coagulation and fibrinolytic system after local intra-arterial thrombolysis for acute ischemic stroke. *Neurol.Med.Chir*. 1995; 35(3): 136-43
- <sup>109</sup> Taomoto K, Asada M, Kanazawa Y, Matsumoto S: Usefulness of Measurement of Plasma  $\beta$ -Tg in Cerebrovascular Disease, *Stroke* 1983; 14: 518-24.
- <sup>110</sup> Lande K, Gjesdal K, Os I, Kjeldsen SE, Eide I, Westheim A Hjermann I; Does Arterial Rather than Venous Plasma  $\beta$ -Thromboglobulin Better Reflect in Vivo Platelet Release Reaction? *Thromb Haemost* 1985; 54: 547.
- <sup>111</sup> Fiane AE, Videm V Mollnes TE, Hogasen K, Hovig T; Inhibition of platelet aggregation by the GP IIb/IIIa antagonist reopro does not significantly prolong xenograft survival in an ex vivo model. *Transpl Int* 1999; 12(5): 323-33
- <sup>112</sup> Nicholson NS et al. 1998
- <sup>113</sup> Bojesen SE, Juul K, Schnohr P, Tybjaerg-Hansen A, Nordestgaard BG; Platelet glycoprotein IIb/IIIa PI(A2)/PI(A2) homozygosity associated with risk of ischemic cardiovascular disease and myocardial infarction in young men: the Copenhagen City Heart Study. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2003 Jun;14(4):369-77.
- <sup>114</sup> Wheeler GI et al. 2002
- <sup>115</sup> Sun QH, Liu CY, Wang R, Paddock C, Newman PJ. Disruption of the long-range GPIIIa

Cys(5)-Cys(435) disulfide bond results in the production of constitutively active GPIIb-IIIa (alpha(IIb)beta(3)) integrin complexes. *Blood*. 2002 Jun 15;99(12):4449-56.

<sup>116</sup> Weber AA et al. 2002

<sup>117</sup> Weber AA et al. 2002

<sup>118</sup> Renda G et al. 2003

<sup>119</sup> Vinciguerra C, Bordet JC, Beaune G, Grenier C, Dechavanne M, Negrier C. Description of 10 new mutations in platelet glycoprotein IIb (alphaIIb) and glycoprotein IIIa (beta3) genes. *Haematol*. 2001 Oct;115(1):131-9.

<sup>120</sup> Srivastava A, Usher S, Nelson EJ, Jayandharan G, Shaji RV, Chandy M, Seligsohn U, Peretz H. Prenatal diagnosis of Glanzmann thrombasthenia. *Blood*. 2003 Jun 15; 101(12):4808-15. Epub 2003 Feb 27.

<sup>121</sup> Duda SH, Tepe G, Luz O, Ouriel K, Dietz K, Hahn U, Peireira P, Marsalek P, Ziemer G, Erley CM, Claussen CD; Peripheral arterial occlusion: treatment with abciximab plus urokinase versus with urokinase alone a randomized pilot trial (the PROMPT Study). *Platelet Receptor Antibodies in Order to Manage Peripheral Artery Thrombosis*. *Radiology*. 2001; 221(3): 689-696.

<sup>122</sup> Gawaz M et al. 1998

## Danksagung

Folgenden Personen und Abteilungen gilt mein außerordentlicher Dank:

- Herr Dr. Enno Rodegerdts für die gute Betreuung meiner Arbeit
- Herr Prof. Dr. Stefan Duda für die Erteilung der Arbeit und der organisatorischen Unterstützung
- Herr PD Dr. Gunnar Tepe für die Betreuung bei der Bearbeitung der TAT und  $\beta$ -Thromboglobulin-Werte sowie für die Korrektur der Arbeit
- alle nichtgenannten Personen der Abteilung für Radiologie der Universitätsklinik Tübingen
- den Kollegen der Strahlentherapeutischen Abteilung für die Unterstützung in Labor und am Flowcytometer
- den Kollegen der Inneren Abteilung für die Unterstützung bei der Besorgung von Trockeneis
- den Kollegen des Laboratoriums des Herz- und Gefäßzentrums Prof. Dr. Wenz allen voran Frau Doris Armbruster für die Mitarbeit bei der TAT und  $\beta$ -Thromboglobulinauswertung
- den Kollegen des Laboratoriums in der Waldhörnlestraße 22 für die Besorgung des Kits
- den Kollegen der Abteilung für Gefäßchirurgie allen voran Dr. Andreas Straub für die Hilfe bei der Blutentnahme
- den Putzfrauen für die Reinigung



## Tabellarischer Lebenslauf

Name: Ralf Jochen Andler (Rufname: Ralf)

Geboren: 23.10.1976 in Reutlingen

Religion: evangelisch

Familienstand: ledig

Eltern: Helmut Andler (Diplom-Ingenieur)  
Anneliese Andler (Krankenschwester)

Schulbesuch: 1983-1987 Grundschule Gomaringen  
1987-1996 Gymnasium Mössingen  
Abschluss: allgemeine Hochschulreife

Zivildienst: 09/1996 – 09/1997: Hohberghaus Bretten

Studium: 10/1997: Studienbeginn Medizin Universität Tübingen  
SS 1999: Physikum  
SS 2000: 1. Staatsexamen  
04/2003: 2. Staatsexamen  
04/2003: PJ im Krankenhaus Friedrichshafen  
12.05.2004: 3. Staatsexamen