

**INZIDENZ UND CHARAKTERISIERUNG VON
GPIIB/IIIA-ANTAGONISTEN-ABHÄNGIGEN
ANTITHROMBOZYTÄREN ANTIKÖRPERN**

ANA LINDA NÚÑEZ BRESGEN

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Medizin des
Fachbereichs Humanmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2008

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2008

© 2008 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



VVB LAUFERSWEILER VERLAG
édition scientifique

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

**Inzidenz und Charakterisierung von
GPIIb/IIIa-Antagonisten-abhängigen
antithrombozytären Antikörpern**

**INAUGURALDISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Medizin
des Fachbereichs Humanmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen**

vorgelegt von

**Ana Linda Núñez Bresgen
aus Madrid**

Gießen 2007

Aus der Medizinischen Klinik I
- Abteilung Kardiologie / Angiologie -
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen
Leiter: Prof. Dr. med. H. Tillmanns

Gutachter: Prof. Dr. med. R. Voss

Gutachter: Prof. Dr. med. B. Kemkes-Matthes

Tag der Disputation: 21. April 2008

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis	VI
1 EINLEITUNG	1
1.1 Thrombozyten.....	1
1.1.1 Entdeckung.....	1
1.1.2 Thrombozytenmorphologie.....	1
1.1.3 Thrombozytenfunktion	2
1.2 Ursachen einer Thrombozytopenie	3
1.2.1 Medikamentinduzierte Thrombozytopenien	3
1.2.1.1 Pathogenese.....	4
1.2.1.2 Klinik.....	6
1.2.1.3 Therapie.....	7
1.3 Der Glykoproteinkomplex IIb/IIIa	8
1.4 Thrombozytenaggregationshemmer: Abciximab, Tirofiban, Eptifibatid	10
1.4.1 Anwendungsgebiet.....	10
1.4.2 Wirkungsort.....	10
1.4.3 Pharmakologische Merkmale	10
1.4.4 Abciximab (ReoPro®).....	12
1.4.4.1 Kreuzreaktionen.....	12
1.4.4.2 Nebenwirkung: Thrombozytopenie.....	12
1.4.4.2.1 Inzidenz.....	12
1.4.4.2.2 Generelle Risikofaktoren.....	15
1.4.4.2.3 Wiederholte Gabe von Abciximab	15
1.4.5 Tirofiban (Aggrastat®).....	16
1.4.5.1 Nebenwirkung: Thrombozytopenie.....	16
1.4.5.1.1 Inzidenz.....	16
1.4.5.1.2 Wiederholte Gabe von Tirofiban	16
1.4.6 Eptifibatid (Integrilin®).....	18
1.4.6.1 Nebenwirkung: Thrombozytopenie.....	18
1.4.6.1.1 Inzidenz.....	18
1.4.6.1.2 Generelle Risikofaktoren.....	18
1.4.6.1.3 Wiederholte Gabe von Eptifibatid	19
2 ZIELSETZUNG	21
3 MATERIAL UND METHODEN	23
3.1 ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay).....	23
3.1.1 Prinzip.....	23
3.1.2 Reagenzien	23
3.1.3 Testablauf	24
3.1.4 Auswertung der Ergebnisse.....	24
3.2 MAIPA (Monoclonal Antibody Immobilization of Platelet Antigens).....	25
3.2.1 Prinzip.....	25

3.2.2	Reagenzien	25
3.2.3	Testablauf des MAIPA (indirekter/direkter) mit/ohne Abciximab	27
3.2.4	Modifikation des MAIPA zur Detektion der Immunglobulinklassen.....	28
3.3	Durchflusszytometer	29
3.3.1	Prinzip.....	29
3.3.2	Reagenzien	29
3.3.3	Testablauf	30
3.3.3.1	Thrombozyten isolieren	30
3.3.3.2	Thrombozyten fixieren	30
3.3.3.3	Hinzugabe von Medikament und Patientenserum.....	30
3.3.3.4	Fluoreszenz-Messung	31
3.4	Immunpräzipitation / Immunoblot / Westernblot mit Immundetektion.....	32
3.4.1	Prinzip.....	32
3.4.2	Reagenzien	32
3.4.3	Testablauf	35
3.4.3.1	Plättchengewinnung aus Frischblut.....	35
3.4.3.2	Biotinmarkierung.....	36
3.4.3.3	Preclear des Zell-Lysates.....	36
3.4.3.4	SDS-Page (Polyacrylamidgel-Elektrophorese).....	37
3.4.3.5	Blot	37
3.4.3.6	Beurteilung.....	37
3.5	Methoden unter Verwendung von transfizierten Zelllinien (CHO-Zellen).....	38
3.5.1	Reagenzien	38
3.5.2	Testablauf	39
3.5.2.1	Teilen der CHO-Zellen.....	39
3.5.2.2	Vorbereitung der CHO-Zellen um diese im MAIPA bzw. Durchflusszytometer einzusetzen..	40
3.5.2.3	Aktivierung des GPIIb/IIIa mit RGDW.....	40
4	ERGEBNISSE.....	41
4.1	Kollektive.....	41
4.1.1	Patientenkollektiv mit GPIIb/IIIa-Antagonisten induzierter Thrombozytopenie (Retrospektive Untersuchung)	41
4.1.1.1	Abciximab-induzierte Thrombozytopenie	41
4.1.1.1.1	Klinischer Verlauf vs. direkter MAIPA	43
4.1.1.2	Tirofiban-induzierte Thrombozytopenie	44
4.1.1.3	Eptifibatid-induzierte Thrombozytopenie	45
4.1.2	Patientenkollektiv mit Herzkatheteruntersuchung (Prospektive Untersuchung)	46
4.1.3	Kontrollkollektiv (Prospektive Untersuchung).....	50
4.2	Nachweis und Charakterisierung von Abciximab-abhängigen Antikörpern bei Patienten mit Abciximab-induzierter Thrombozytopenie	51
4.2.1	ELISA	51
4.2.2	Durchflusszytometer	52
4.2.3	Immunpräzipitation.....	53
4.2.4	Indirekter / Direkter MAIPA	54
4.2.4.1	Indirekter MAIPA	54
4.2.4.2	Direkter MAIPA	55
4.2.5	Immunglobulinklasse(n) der Abciximab-abhängigen Antikörper	56
4.2.6	Immunglobulinklasse(n) der präformierten Antikörper (Kontrollkollektiv).....	57
4.2.7	Bindungslokalisation der Abciximab-induzierten Antikörper auf Thrombozyten/CHO-Zellen	58
4.2.8	Bindungsverhalten in Abhängigkeit vom GPIIb/IIIa-Polymorphismus	59
4.2.9	Bindungsverhalten der Abciximab-abhängigen Antikörper (in Abhängigkeit des Aktivierungszustand des Glykoproteinkomplex)	60
4.3	Nachweis und Charakterisierung von Tirofiban-/Eptifibatid-abhängigen Antikörpern bei Patienten mit Tirofiban-/ Eptifibatid-induzierter Thrombozytopenie	61

4.3.1	Tirofiban	61
4.3.1.1	Durchflusszytometer	61
4.3.1.2	Epitopenmapping der Tirofiban-abhängige Antikörper (Patienten- vs. Kontrollkollektiv).....	62
4.3.2	Eptifibatid	63
4.3.2.1	Durchflusszytometer	63
4.3.2.2	ELISA	64
4.4	Vergleich: Abciximab-, Tirofiban- und Eptifibatid-abhängige Antikörper (Patientenkollektiv)	65
4.4.1	Epitopenmapping	65
4.4.2	Kreuzreaktionen	66
4.5	Untersuchungen der Patientenseren mit Herzkatheteruntersuchung	67
4.5.1	Klinischer Verlauf vs. direkter MAIPA	67
4.5.2	Thrombozytenabfall in Abhängigkeit von der Darreichungsform des Medikamentes Abciximab ..	68
4.5.3	Häufigkeitsverteilung der Abciximab-abhängigen Antikörper (Vergleich zwischen Spenderkollektiv und Patienten).....	69
5	DISKUSSION	70
5.1	Zusammenfassung der Ergebnisse	70
5.2	Thrombozytopeniehäufigkeit.....	71
5.3	Zeitraum bis zur Thrombozytopenieentwicklung	72
5.4	Antikörpernachweis	73
5.5	Antikörperart	74
5.6	Präformierte Antikörper.....	75
5.7	Bindungsverhalten der einzelnen Antikörper an den GPIIb/IIIa-Komplex	77
5.8	Ausblick	81
6	ZUSAMMENFASSUNG / SUMMARY	82
6.1	Zusammenfassung	82
6.2	Summary.....	83
7	ANHANG.....	X
7.1	Literaturverzeichnis	X
7.2	Erklärung	XXXII
7.3	Danksagung	XXXIII
7.4	Tabellarischer Lebenslauf.....	XXXIV
7.5	Abstract	XXXV
7.6	Vortrag / Poster.....	XXXV

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Individueller Thrombozytenverlauf vs. direkter MAIPA.	43
Abbildung 2	ELISA-Test für Abciximab-abhängige Antikörper.	51
Abbildung 3	Durchflusszytometrische Thrombozytenanalyse (Abciximab).	52
Abbildung 4	Immunpräzipitation.	53
Abbildung 5	Antikörpertiter der Abciximab-abhängigen Antikörper.	54
Abbildung 6	Bindungsverhalten der Abciximab-abhängigen Antikörper (Kollektiv 4.1.1.1).	55
Abbildung 7	Immunglobulinklasse(n).	56
Abbildung 8	Bindungsunterschiede der Abciximab-abhängigen Antikörper auf Thrombozyten oder CHO-Zellen (= transfizierte Zelllinien).	58
Abbildung 9	Das Bindungsverhalten der medikament-abhängigen Antikörper bei den unterschiedlichen Genotypen der menschlichen Thrombozyten (PI^A1/PI^A1 ; PI^A2/PI^A2).	59
Abbildung 10	Bindungsverhalten der Abciximab-abhängigen Antikörper in Abhängigkeit vom Aktivierungszustand des Glykoproteinkomplex IIb/IIIa.	60
Abbildung 11	Durchflusszytometrische Thrombozytenanalyse (Tirofiban).	61
Abbildung 12	Epitopenmapping für Tirofiban-abhängige Antikörper (Patienten- [E.K.;U.S.;H.B.] und Kontrollkollektiv [J.H.;C.D.;W.U.]).	62
Abbildung 13	Durchflusszytometrische Thrombozytenanalyse (Eptifibatid).	63
Abbildung 14	ELISA-Test für Eptifibatid-abhängige Antikörper.	64
Abbildung 15	Epitopenmapping für Abciximab-, Tirofiban- und Eptifibatid-abhängige Antikörper (Patientenkollektiv).	65
Abbildung 16	Kreuzreaktionen zwischen den einzelnen Thrombozytenaggregationhemmern.	66
Abbildung 17	Thrombozytenverlauf vs. direkter MAIPA.	67

Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1</i>	<i>Übersicht über die drei GPIIb/IIIa–Inhibitoren: Abciximab, Tirofiban und Eptifibatid.</i>	<i>11</i>
<i>Tabelle 2</i>	<i>Thrombozytopenieentstehung unter Abciximab in verschiedenen prospektiven klinischen Studien in der interventionellen Kardiologie.</i>	<i>14</i>
<i>Tabelle 3</i>	<i>Thrombozytopenieentstehung unter Tirofiban in verschiedenen prospektiven klinischen Studien in der interventionellen Kardiologie.</i>	<i>17</i>
<i>Tabelle 4</i>	<i>Thrombozytopenieentstehung unter Eptifibatid in verschiedenen prospektiven klinischen Studien in der interventionellen Kardiologie.</i>	<i>20</i>
<i>Tabelle 5</i>	<i>Monoklonale Antikörper.</i>	<i>26</i>
<i>Tabelle 6</i>	<i>8 Patienten, die unter einer Abciximabtherapie eine Thrombozytopenie entwickelten.</i>	<i>41</i>
<i>Tabelle 7</i>	<i>3 Patienten, die unter einer Tirofibantherapie eine Thrombozytopenie entwickelten.</i>	<i>44</i>
<i>Tabelle 8</i>	<i>2 Patienten, die unter einer Eptifibatidtherapie eine Thrombozytopenie entwickelten.</i>	<i>45</i>
<i>Tabelle 9</i>	<i>33 Patienten aus der Medizinischen Klinik II im Universitätsklinikum Gießen, die im Rahmen einer Herzkatheteruntersuchung 1998/1999 das Medikament Abciximab erhielten.</i>	<i>47</i>
<i>Tabelle 10</i>	<i>Immunglobulin-Häufigkeitsverteilung im Spenderkollektiv.</i>	<i>57</i>
<i>Tabelle 11</i>	<i>Vergleich zwischen dem gesunden Spenderkollektiv (100) und Patienten (33), die im Rahmen einer Herzkatheteruntersuchung Abciximab erhielten.</i>	<i>69</i>

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
ACUTE II	Antithrombotic Combination Using Tirofiban and Enoxaprin
ad	hinzu
ADP	Adenosindiphosphat
Ala	Alanin (Aminosäure)
AMI	Akuter Myokardinfarkt
Angio	Angiographie
Aqua dest.	Aqua destillata
Arg	Arginin (Aminosäure)
Asp	Asparaginsäure (Aminosäure)
ASS	Acetylsalicylsäure
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CAPTURE	chimeric 7E3 antiplatelet in unstable angina reactory to standard treatment trial
CD	Cluster of Differentiation
CHO-Zellen	Chinese Hamster Ovary-Zellen
d.h.	das heißt
ECL	Enhanced Chemie Luminiscence
EDTA	Ethylene Diamine Tetraacetic Acid (Äthylen-Diamin-Tetra-Azetat; Äthylendiamintetraessigsäure)
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EPIC	Evaluation of IIb-IIIa platelet receptorantagonist 7E3 in preventing ischemic complications trial
EPILOG	Evaluation of PTCA to improve long term outcome by c7E3 GPIIb/IIIa receptorblockade trial
EPISTENT	EPILOG-Stent-Studie
et al.	et altera (und weitere)
etc.	et cetera
Fa.	Firma
Fab	fragment antigen binding

FACS	fluorescence activated cell sorter
Fc	fragment crystalline
FITC	Fluoresceinisothiocyanat (Fluoreszenzmolekül)
FL 1/FL 2	first/second fluorescence
g	Gramm
Geschl.	Geschlecht
ggf.	gegebenenfalls
Gi5/16	Gießen5/16
Gln	Glutamin (Aminosäure)
Gly	Glycin (Aminosäure)
GP	Glykoprotein
HIPA	Heparin-induced Platelet Activation
HIT	Heparin-induzierte Thrombozytopenie
HPA	Human platelet antigen
ICAM	Intercellular adhesion molecule
I.E.	Internationale Einheit
Ig A/ E/ G/ M	Immunglobulin A/ E/ G/ M
IMPACT I	Integrilin to Minimise Platelet Aggregation and Prevent Coronary Thrombosis
IMPACT II	Integrilin to Minimize Platelet Aggregation and Prevent Coronary Thrombosis II
IMPACT AMI	Integrilin to Minimise Platelet Aggregation and Prevent Coronary Thrombosis in Acute Myocardial Infarction
Inf.	Infusion
i.v.	intra venös
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
KGD	Lysin-Glycin-Aspartat
KHK	Koronare Herzkrankheit
l	Liter
LIBS	Ligandeninduzierte Bindungsstellen
Lys	Lysin (Aminosäure)

M	molare Lösung
m	männlich
mA	Milliampere
MAIPA	Monoclonal Antibody Immobilization of Platelet Antigens
mAk	monoklonale(r) Antikörper
mg	Milligramm
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mM	Millimol
MW	Molekulargewicht
n	Gesamtzahl
nl	Nanoliter
nm	Nanometer
Nr.	Nummer
n.u.	nicht untersucht
Pat.	Patient
PBS	phosphate buffered saline
PECAM 1	platelet endothelial cell adhesion molecule-1
pH	Potenz und Maß für Wasserstoffionenkonzentration
PI [^]	Platelet Antigen
PMNs	polymorphonuclear neutrophils
PRISM	Platelet receptor inhibition for ischemic syndrome management study
PRISM PLUS	Platelet receptor inhibition for ischemic syndrome management study plus
PTCA	Percutaneous Transluminal Coronary Angioplasty (perkutane transluminale Koronarangioplastie)
PURSUIT	Platelet IIb-IIIa underpriming the receptor for suppression of unstable ischemia trial
RES	retikuloendotheliales System
RESTORE	Randomized Efficacy Study of Tirofiban for Outcomes and Restenosis
RGD	Arg-Gly-Asp (Arginin-Glycin-Aspartat)
RGDW	Arg-Gly-Asp-Trp (Arginin-Glycin-Aspartat-Tryptophan)
s.c.	subcutan
SDS	Sodium Dodecylsulfate (Natriumdodecylsulfat)

sog.	sogenannte/n/r/s
Std.	Stunde(n)
Tabl.	Tabletten
TEMED	Tetramethylethyldiamin
Thro	Thrombozyten
Tirofiban	Tirofibanhydrochlorid
TXA 2	Thromboxan 2
u.a.	unter anderem
UFH	unfraktioniertes Heparin
UpM	Umdrehungen pro Minute
Val	Valin (Aminosäure)
vs.	versus
w	weiblich
\bar{X}	Mittelwert
z.B.	zum Beispiel
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
%	Prozent
<	kleiner
>	größer
α	alpha
β	beta
©	Copyright
®	eingetragene Marke
TM	Trademark, eingetragene Marke

1 Einleitung

1.1 Thrombozyten

1.1.1 Entdeckung

Im Jahre 1882 berichtete Giulio Bizzozero (1816–1901) erstmals über „einen von den rothen und den weissen Blutkörperchen verschiedenen constanten Formenbestandtheiles des Blutes“ und beschrieb die Blutplättchen als einen „dritten morphologischen Blutbestandtheil[...]“ [14].

Zudem erkannten Eberth und Schimmelbusch 1886/88 die Wichtigkeit der Thrombozyten zur Bildung eines blutstillenden Pfropfs, die Bedeutung des plasmatischen Gerinnungssystems und vor allem die Unterscheidung dessen von der Plättchenvermittelten Hämostase. Eberth und Schimmelbusch unterschieden darüber hinaus als erste die Vorgänge Adhäsion und Aggregation. Sie formulierten, dass „unter Umständen sich ein Thrombus bildet, der erst in Gestalt einer einfachen Blutplättchenschicht die verletzte Stelle der Gefäßwand überzieht, dass an diese neue Plättchen antreiben und festkleben und der Thrombus so durch Apposition sich mehr und mehr vergrößert“ [45] [46].

1.1.2 Thrombozytenmorphologie

Thrombozyten sind kernlose, scheibenförmige korpuskuläre Blutkörperchen mit einem Durchmesser von 2–4µm und einer Dicke von 0,5–0,75µm. Im ruhenden Zustand zeichnen sie sich durch eine diskoide Form aus. Nach Aktivierung durch ADP, Thrombin oder Adhäsion kommt es zur Formveränderung mit Vergrößerung der Oberfläche durch Ausbildung von sog. Pseudopodien. Die Thrombozyten entstehen im Knochenmark durch Zytoplasmaabschnürung aus Megakaryozyten. 150.000–300.000 Thrombozyten pro µl Blut zirkulieren für ungefähr sieben Tage im peripheren Blut bis sie im retikulären System der Leber, Milz und Lunge abgebaut werden. Die Milz ist zudem Speicherort von etwa einem Drittel der Blutplättchen, die im Austausch mit dem zirkulierenden Anteil stehen. [60] [139] Die Thrombozytenbildung wird durch den Wachstumsfaktor Thrombopoetin reguliert, der hauptsächlich in der Leber, aber auch in den Nieren gebildet wird. Thrombopoetin wirkt auf alle Stufen der Thrombopoese.

1.1.3 Thrombozytenfunktion

Die Hauptaufgabe der Thrombozyten besteht in der Aufrechterhaltung der Hämostase und somit der Thrombenbildung im Verlauf der physiologischen Blutstillung nach Verletzungen der Gefäßendothelien. Dabei kommt es zu folgenden Reaktionsschritten: Adhäsion, Bildung von Pseudopodien, Freisetzung der Thrombozytengranula (einschließlich ADP, Serotonin, Fibrinogen, lysosomaler Enzyme und des Antiheparin-Faktors (Plättchenfaktor 4)) und Aggregation, um das Gefäßlumen zur Umgebung hin abzudichten und die aus der Verletzung resultierenden Blutung zum Stillstand zu bringen. [73] [129]

Die Bedeutung der Thrombozyten bei der Atherogenese und Progression der Atherosklerose ist hinreichend untersucht worden und für die Pathophysiologie der koronaren Herzerkrankung sehr entscheidend. Trotz verbesserten Lebensstandards und des Einsatzes neuer Medikamente gelten kardiovaskuläre Erkrankungen mit einem terminal häufigen thrombotischen Verschlussereignis in den Industriestaaten weltweit noch immer als Haupttodesursache [21] [22]. Die Entwicklung von Strategien, die eine deutliche Verbesserung bewirken, ist in diesem Zusammenhang von außerordentlich großer Bedeutung. Wichtige Thrombozytenfunktionen werden durch verschiedene membranständige Glykoproteine vermittelt, welche in der Therapie der arteriellen Verschlusskrankheit, der KHK, des akuten Koronarsyndroms, etc. berücksichtigt werden.

1.2 Ursachen einer Thrombozytopenie

Definitionsgemäß liegt eine Thrombozytopenie vor, wenn die Plättchenzahl $<150.000/\mu\text{l}$ beträgt [129]. Eine Thrombozytopenie kann hereditär bedingt sein oder erworben werden, nämlich möglicherweise durch eine Thrombozytenbildungsstörung -im Sinne einer generalisierte Knochenmarkinsuffizienz oder einer aplastischen Anämie- durch eine Thrombozyten-Verteilungsstörung als Folge einer Splenomegalie, durch einen gesteigerten Thrombozytenabbau, Verdünnung oder Verluste durch massive Transfusionen und/oder durch Kombination verschiedener Störungen hervorgerufen werden. Bei einer Pseudothrombozytopenie handelt es sich um ein artifizielles In-vitro-Phänomen ohne Krankheitswert. Dieses Phänomen tritt am häufigsten im EDTA-Blut auf, ist jedoch auch in Zitrat- und Heparinblut zu beobachten und nimmt mit der Zeit zwischen Blutabnahme und Blutbestimmung zu. [34] [89] [134] [153]

1.2.1 Medikamentinduzierte Thrombozytopenien

Ein Medikament kommt als Auslöser der Thrombozytopenie in Frage, wenn folgende Merkmale erfüllt sind [64]:

- a) Das Medikament wurde eingenommen, bevor die Thrombozytopenie auftrat und nach Absetzen des Medikamentes normalisierte sich ihre Zahl wieder.
- b) Andere Ursachen einer Thrombozytopenie wurden ausgeschlossen.
- c) Eine wiederholte Exposition führt zur erneuten Thrombozytopenie.

Über eine große Anzahl von Medikamenten (>150) wurde berichtet, die eine medikamentinduzierte Thrombozytopenie verursachen können. Die Auswahl erstreckt sich von Antithrombotika, Analgetika, Antibiotika, Sedativa, Tranquilizer, Antikonvulsiva, Diuretika, Antiarrhythmika bis zu Antazida [4] [63] [71]. Es existieren zahlreiche Veröffentlichungen von medikamentinduzierten Immunthrombozytopenien nach Gabe von Chinin, Chinidin, Ranitidin, Rifampicin, Heparin, Aspirin, Gold, etc. [15] [18] [30] [42] [56] [68] [98] [105].

1.2.1.1 Pathogenese

Mögliche Pathomechanismen einer Thrombozytenschädigung durch medikamentinduzierte Antikörper:

Allgemeine Aspekte der medikamentinduzierten Thrombozytopenie:

- a) Beim Hapten-Typ kommt es nach stattgefundenener Immunisierung und Wiedereinnahme des Medikamentes zur Anlagerung des Medikamentes oder seiner Metabolite an die Thrombozytenoberfläche und zur Bildung immunogener Neoantigene. Durch Anlagerung medikament-abhängiger Antikörper und nachfolgender Komplementaktivierung kommt es zur Zerstörung zirkulierender Blutplättchen. [5] [30] [63] [71] [113]
- b) Das Medikament (oder deren Metabolite [47] [48] [110]) induziert durch geringfügige Strukturveränderungen an Membranmolekülen echte Autoantikörper, die an die Glykoproteine auf der Plättchenmembran meist ohne Komplementaktivierung binden, ohne dass das Medikament anwesend sein muss (medikament-unabhängige Antikörper). Dies führt durch extravasale Phagozytose zu einer protrahierten, langsamen Thrombozytendestruktion. Prototyp eines Medikamentes vom Autoimmuntyp ist Gold. [5] [18] [71] [98] [112]
- c) Das Medikament bindet an normale Plasmaproteine, um einen immunologischen Komplex zu formen. Antikörper reagieren mit diesem Komplex und aktivieren das Plättchen über den Fc-Rezeptor (Heparin). [5] [71]
- d) Medikamente können auch direkt toxisch auf zirkulierende Plättchen wirken [3]. Medikamente wie Protamin, Bleomycin, Ristocetin, Desmopressin, Hematin und Mitomycin können durch nicht-immunologische Mittel zur Plättchendestruktion führen. [4]

Spezielle Aspekte der GPIIb/IIIa-Antagonisten:

- a) Das Medikament bindet an den Fibrinogen-Rezeptor (GPIIb/IIIa), um eine Konformationsänderung zu induzieren (LIBS), die von Antikörpern erkannt wird oder eine Antikörperbildung induziert [5] [71]. In der Veröffentlichung von Cines, Curtis, Kecskes und Lance wird von präformierten Antikörpern in einem normalen Kollektiv berichtet, die gegen ein Epitop auf dem GPIIb/IIIa-Komplex gerichtet sind [32] [39] [83] [95]. Alternativ induziert der Rezeptor-Medikamenten-Komplex selbst

eine Immunantwort, so dass der neugebildete Antikörper direkt gegen den Antagonisten oder den Rezeptorkomplex gerichtet ist und es zur Beseitigung der Thrombozyten im retikuloendotheliale System (RES) bzw. der Milz kommt. [6] [7] [9] [85] [102] [103] [138] [141] Hierdurch wird entweder das Medikament selbst als Antigen entdeckt, die LIBS-Region bildet ein Antigen bzw. der LIBS-Abciximab-Komplex bildet ein Antigen oder die Medikamentenbindung induziert eine Signalkaskade ins Innere, welches die Plättchen aktiviert [5] [81] [103] [121] [132]. Es ist jedoch weiterhin unklar, welche Funktion die LIBS-Regionen darstellen [81]. Es wird vermutet, dass nur bei einigen Patienten mit einem bestimmten Polymorphismus des GPIIb/IIIa-Komplexes ein Neoepitop sich nach der Medikamentenbindung ausbildet. Diese Vorstellung könnte auch die Tatsache unterstützen, dass sich nur in einer Minderheit eine Thrombozytopenie ausbildet. [32]

- b) Da Abciximab kein Fc-Anteil besitzt, macht es die Hypothese zunichte, dass Thrombozyten mit Abciximab auf ihren GPIIb/IIIa-Rezeptoren aus der Zirkulation herausgefiltert werden (durch den Fc-Rezeptor der Makrophagen des RES). Dies schließt allerdings nicht aus, dass der GPIIb/IIIa-Inhibitor paradoxerweise das Plättchen aktiviert und es durch eine Plättchenaggregation und nachfolgender Entfernung aus der Blutzirkulation zur Thrombozytopenie kommt. [9] [121]
- c) Die Möglichkeit der Thrombozytopenieentstehung durch Knochenmarkspenetration des GPIIb/IIIa-Antagonisten Abciximab und die anschließende Störung der Thrombopoese scheinen unwahrscheinlich zu sein [118].

Die Bindungsstellen von medikamentinduzierten Antikörpern sind außerordentlich heterogen und wurden sowohl auf den GPIIb/IX (Ib beta = CD 42c; Ib alpha = CD 42b; IX = CD 42a)- [10] [94], auf dem GPIIb/IIIa (CD 41)-Komplex [31] [113], als auch auf dem Glykoprotein V (CD 42d) nachgewiesen [144]. Kroll et al. konnten zeigen, dass über das PECAM 1 (CD 31) medikamentinduzierte Antikörper mit den Thrombozyten interagieren können [93].

In vielen Fällen ist kein Nachweis der Targets gelungen.

Hypothesen für die Entstehung von Epitopen bzw. Neoantigenen bei einer medikamentinduzierten Thrombozytopenie [5]:

- a) Das Medikament bindet nicht-kovalent an ein oder mehrere Plättchen-Glykoproteine. Dies induziert eine Konformationsänderung, welches ein Epitop an einer anderen Stelle im Glykoprotein verursacht, für welches der Antikörper spezifisch ist.
- b) Das Medikament bindet an das Protein und ist somit Teil eines kombinierten Epitopes (Teil Medikament, Teil Protein), welches für den Antikörper spezifisch ist.
- c) Die dritte Möglichkeit ist, dass das Medikament sich an die Fab-Region des Antikörpers bindet und sich dadurch die antigene Bindungsseite des Antikörpers in dieser Weise neugestaltet, dass ein oder mehrere Epitope auf dem Glykoprotein der Plättchen erkannt werden.

1.2.1.2 Klinik

Klinische Symptome treten 7–10 Tage (5–7 Tage [65] bzw. 8 Tage [120]) nach der ersten Medikamentengabe auf; bei einer Reexposition können sich die Symptome auch innerhalb weniger Stunden manifestieren [69]. Bei der „klassischen“ medikamentinduzierten Thrombozytopenie fällt die Plättchenzahl typischerweise $<20.000/\mu\text{l}$ ab, und es sind Petechien und hämorrhagische Blasen in der Mundöffnung zu erkennen [69]. Allerdings können Thrombozytopenien, hervorgerufen durch Carbimazol-abhängige Antikörper gegen PECAM 1, auch relativ mild ausfallen [93]. Die heparin-induzierte Thrombozytopenie (HIT) ist demgegenüber charakterisiert durch das Risiko von venösen oder arteriellen Thrombosen [29] und der Thrombozytentiefpunkt liegt im Mittel bei: $30.000\text{--}55.000/\mu\text{l}$ [23].

Der Nachweis eines medikament-abhängigen thrombozytären Antikörpers kann im Komplementbindungstest, in Antiglobulinbindungstests wie ELISA, im Immunfluoreszenztest oder in glykoproteinspezifischen Tests (MAIPA) erfolgen. Der Immunfluoreszenztest als sehr zeitaufwendige Methode ist im klinischen Alltag als Notfallanalytik eher ungeeignet. Der große Vorteil der Durchflusszytometrie beruht 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 und ist somit vor allem für wissenschaftliche Fragestellungen von Bedeutung.

Interessanterweise können medikament-abhängige Antikörper nicht nur Spezifität für das verabreichte Medikament, sondern auch für dessen Metabolite haben, so dass bei in vitro-Tests keine Antikörper im Serum nachweisbar sind [38] [87].

1.2.1.3 Therapie

Das Management der Thrombozytopenie basiert auf drei Grundregeln: frühes Erkennen, unterstützende Therapie und das zukünftige Vermeiden des Medikamentes [141].

Die erste und wichtigste therapeutische Maßnahme bei der Behandlung der medikamentinduzierten Thrombozytopenie besteht im Weglassen der (vermutlich) auslösenden Substanz. Mit der Medikamentenausschwemmung normalisiert sich die Plättchenzahl schnell zu normalen Werten (≤ 7 Tage nach dem Symptombeginn) [33] [143]. Die Thrombozytopenie-Dauer kann allerdings auch länger andauern (≥ 30 Tage) als das Medikament im Körper verbleibt [71].

Um das Ereignis einer Thrombozytopenie zu minimieren, sollte die Plättchenzahl jeweils vor der Behandlung, 2–4 Stunden nach der Bolusinjektion sowie nach 24 Stunden bestimmt werden. Im Falle eines akuten Abfalls sollte man die Bestimmung wiederholen. Dafür sollten separate Röhrchen mit jeweils Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), Zitrat oder Heparin verwendet werden, um eine aufgrund in vitro Antikoagulation ausgelöste Pseudothrombozytopenie auszuschließen. [25]

Glukokortikoide haben gezeigt, dass sie den Zeitraum der medikamentinduzierten Thrombozytopenie nicht verkürzen konnten [111] [120].

Plättchentransfusionen waren gewöhnlich nicht hilfreich und nur von vorübergehendem Erfolg, da die transfundierten Plättchen schnell zerstört wurden. Dennoch überleben sie für einige Stunden und helfen, die Blutung zu beherrschen. [111] [155] Im Fall einer Abciximab-induzierten Thrombozytopenie ist die Gabe von Thrombozytenkonzentraten in der Lage die thrombozytenaggregationshemmende Wirkung von Abciximab aufzuheben [25].

Für die Plättchentransfusion ist von Bedeutung, dass man die unterschiedlichen Halbwertszeiten der GPIIb/IIIa-Antagonisten kennt. Da Abciximab eine hohe Bindungsaffinität zu GPIIb/IIIa besitzt und schnell aus der Blutzirkulation verschwindet, ist die Neuverteilung auf die transfundierten Plättchen langsam. [69]

1.3 Der Glykoproteinkomplex IIb/IIIa

Für die menschlichen Thrombozyten sind bisher fünf unterschiedliche Integrine beschrieben worden, drei der β_1 -Klasse, wie den Kollagenrezeptor ($= \alpha_2\beta_1 = \text{GPIa/IIa}$), den Fibronectin-Rezeptor ($= \alpha_5\beta_1 = \text{GPIc/IIa}$) und den Laminin-Rezeptor ($= \alpha_6\beta_1 = \text{GPIc'/IIa}$), und zwei der β_3 -Klasse, wie den Vitronectin-Rezeptor ($= \alpha_V\beta_3 = \text{GP}\alpha_V/\text{IIIa}$) und den Fibrinogen-Rezeptor ($= \alpha_{IIb}\beta_3 = \text{GPIIb/IIIa}$) [61].

Die genetische Lokalisation des GPIIb/IIIa liegt auf dem Chromosom 17 [116]. Auf jedem zirkulierendem Plättchen findet man ca. 60.000–80.000 GPIIb/IIIa-Komplexe [97] [154]. Es ist prozentual das am häufigsten vorkommende Membranglykoprotein (1-2% aller Plättchenproteine) [80]. Der größte Teil (70%) ist auf der Thrombozytenoberfläche/Plasmamembran zu finden, ein kleiner Teil (30%) als interne Reserve in α -Granula oder als Bestandteil des offenen kanalikulären Systems. Dieses intrazelluläre Speicherpotential wird nach Thrombozytenaktivierung an die Zelloberfläche abgegeben. [35] [150] [158] [160]

Der Rezeptor wird auf Thrombozyten, auf Osteoklasten, auf Tumorzellen, auf Endothel und glatter Muskulatur exprimiert.

Der Rezeptor besteht aus zwei unabhängigen Anteilen GPIIb (α_{IIb} -Kette) (MW 140.000) und GPIIIa (β_3 -Kette) (MW 105.000), die jeweils aus einer großen extrazellulären Domäne, einer kleinen transmembranösen Region und einem kurzen zytoplasmatischen Anteil bestehen [122] [124] [150]. Die α_{IIb} -Untereinheit (140 kDa) splittet sich in eine große (125 kDa) und in eine kleine (25 kDa) Untereinheit auf. Die β_3 -Untereinheit (GPIIIa) ist eine singuläre Polypeptidkette mit einem Molekulargewicht von 105 kDa. [27] [122] [150]

Die Fibrinogenbindung an den GPIIb/IIIa-Komplex erfolgt über drei Bindungsstellen: die Dodekapeptid-Sequenz auf den γ -Ketten des Fibrinogens (Lys-Gln-Ala-Gly-Asp-Val, KQAGDV), die vom GPIIb erkannt wird, sowie über Lys-Gly-Asp-(KGD)- und Arg-Gly-Asp-(RGD)-Sequenz auf den α -Ketten des Fibrinogen, die vom GPIIIa erkannt werden [57] [97] [125].

Die RGD-Bindungsstelle wird u.a. von den Glykoproteinantagonisten Tirofiban, Lamifiban, Xemilofiban und Fradafiban blockiert, die KGD-Sequenz von Eptifibatid und an welchem Ort Abciximab mit dem Rezeptor in Wechselwirkung tritt, ist bisher ungeklärt [115] [152].

Zwei Funktionszustände des GPIIb/IIIa-Komplexes werden unterschieden. Einerseits den ruhenden oder inaktivierten Rezeptorkomplex und andererseits den aktivierten hochaffinen Funktionszustand des Glykoproteinrezeptors. Auf nicht-stimulierten Blutplättchen kann der

GPIIb/IIIa-Komplex RGD-enthaltende, lösliche Glykoproteine (wie z.B. Fibrinogen, von-Willebrand-Faktor, Vitronektin oder Fibronektin) nicht binden. Durch Stimulierung der Thrombozyten mit Agonisten kommt es jedoch zur Konformationsänderung des GPIIb/IIIa-Rezeptors, wodurch eine Bindung von löslichem Fibrinogen ermöglicht wird. Andererseits können kleine, RGD-enthaltende Peptide auch aktivierungsunabhängig direkt an den GPIIb/IIIa-Komplex binden. [124] [126] Beide Bindungsmöglichkeiten führen zu einer weiteren Konformationsänderung des GPIIb/IIIa (Liganden besetzter Zustand) und damit zur Induktion von LIBS. Die RGD-Sequenz innerhalb von Liganden verursacht demnach sowohl die Bindung selbst als auch eine sekundäre Konformationsänderung, die zur Expression von kryptogenen Neoepitopen, wie LIBS führt. [123] [126]

1.4 Thrombozytenaggregationshemmer: Abciximab, Tirofiban, Eptifibatid

1.4.1 Anwendungsgebiet

Die drei GPIIb/IIIa-Antagonisten sind u.a. angezeigt zur Vermeidung ischämischer kardialer Komplikationen bei Hochrisikopatienten vor geplanter Akut-PTCA bzw. direkt nach PTCA, bei therapieresistenter instabiler Angina pectoris, Non-Q-wave-Myokardinfarkt oder akutes Koronarsyndrom (mit Troponinerhöhung), und sie können in Kombination mit Heparin und ASS verabreicht werden [25].

1.4.2 Wirkungsort

Der Wirkungsort von Abciximab, wie auch der von Tirofiban und Eptifibatid, liegt in der zentralen Schnittstelle aller Aktivierungswege, nämlich in der Bindungsstelle von Fibrinogen, von-Willebrand-Faktor und anderen Agonisten an den GPIIb/IIIa-Rezeptor, wodurch eine Aggregationshemmung die Folge ist [123] [25]. Sie wirken somit im Gegensatz zu ASS und Heparin unabhängig von der Art des aktivierten Stimulus, und durch diesen zentralen Wirkansatz wird eine vollständige Blockade der Thrombozytenaggregation ermöglicht [25].

Die Adhäsionsfähigkeit der Plättchen an der verletzten Stelle wird durch Abciximab nicht beeinflusst, so dass der primäre Wundverschluss gewährleistet ist [25]. Auch auf andere Plättchenfunktionen, wie z.B. die Thromboxansynthese und die Freisetzung von Granulainhaltsstoffen (Sekretionsreaktion), wird durch die pharmakologische Blockade von GPIIb/IIIa kein Einfluss genommen [74].

1.4.3 Pharmakologische Merkmale

Während das Wirkprinzip dieser Fibrinogenrezeptorantagonisten identisch ist, unterscheiden sich die einzelnen Substanzen in ihren pharmakologischen, strukturellen Eigenschaften und auch in ihrer Spezifität für den GPIIb/IIIa-Rezeptor. Die jeweiligen pharmakodynamischen und -kinetischen Eigenschaften bzw. Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen Abciximab, Tirofiban und Eptifibatid können der Tabelle 1 entnommen werden.

Tabelle 1 Übersicht über die drei GPIIb/IIIa-Inhibitoren: Abciximab, Tirofiban und Eptifibatid.

	Abciximab	Tirofiban	Eptifibatid	Literaturverzeichnis
Hersteller bzw. pharmazeutisches Unternehmen	Centocor; Lilly	Merck & Co.; MSD Sharp & Dohme	COR/Schering-Plough; SP Europe	[25] [137]
Zulassungsjahr	1995	1998	1999	[25]
Applikationsform	i.v.	i.v.	i.v.	[25] [69]
Molekulargewicht (kDa)	45.000	495	800	[62] [91] [161]
Chemische Struktur	chimäres Fab-Fragment	RGD Peptidomimetik	zyklisches KGD-Peptid	[44] [69] [72] [91]
Rezeptorspezifität	Kreuzreaktion mit $\alpha_v\beta_3$ (Vitronektin), $\alpha_M\beta_2$ (MAC-1)	GPIIb/IIIa-selektiv	GPIIb/IIIa-selektiv	[44] [62] [90] [149]
Rezeptorbindung	nicht kompetitiv	kompetitiv	kompetitiv	[66]
Rezeptoraffinität	hoch	hoch	hoch	[16]
Wirkungseintritt nach i.v. Gabe	Minuten	Minuten	Minuten	[62] [161]
Halbwertszeit				
- Plasma	kurz; <10 Minuten	dosisabhängig; 1,5 Stunden	dosisabhängig; 2,5 Stunden	[62] [161]
- Rezeptor	lang; >12 Stunden	dosisabhängig; 4-6 Stunden	dosisabhängig; 4-6 Stunden	[62] [107] [161]
Reversibilität	langsam (≥ 12 Stunden)	schnell (4-8 Stunden)	schnell (4 Stunden)	[44] [62] [147] [149]
Eliminationsweg	alternde Thrombozyten	ca. 65% renal, ca. 25% Fäzes	ca. 50% renal	[25] [91] [96]
Intrinsische Aktivität (LIBS-Induktion)	+	+	+	[62]
Induktion einer Antikörperantwort	Ja; 5–6% der Patienten	nein	nein	[16] [53] [72] [90] [124]
Entstehungszeit einer Thrombozytopenie	0,5 Tage Bolus+Infusion; 1,68 Tage Plazebo	Bisher keine Veröffentlichung	Gesamt:4 Tage; 4 Tage Plazebo	[9] [108]
Pseudothrombopenie	Inzidenz ca. 2,1% (Plazebo 0,6%)	Bisher keine Veröffentlichung	Bisher keine Veröffentlichung	[134] [138]

1.4.4 Abciximab (ReoPro[®])

1.4.4.1 Kreuzreaktionen

Abciximab, das chimäre Mensch-Maus Fab-Fragment c7E3, reagiert nicht nur mit GPIIb/IIIa sondern es gibt auch bisher nicht geklärte Kreuzreaktionen mit zwei anderen Rezeptoren: dem ($\alpha_v\beta_3$ -) Vitronektin (CD 51/CD 61)-Rezeptor und der aktivierten Form des $\alpha_M\beta_2$ (Mac-1; CD 11b/CD 18)-Rezeptors [25] [36]. Die Rezeptoraffinität des monoklonalen Antikörpers Abciximab ist für den GPIIb/IIIa- und für den Vitronektin-Rezeptor identisch, so dass es zur Aufteilung von Abciximab zwischen den beiden Rezeptoren kommt [62].

Der $\alpha_v\beta_3$ -Rezeptor vermittelt die koagulatorische Eigenschaft der Plättchen und die Wachstumseigenschaften der Intima- sowie der glatten Muskelzellen. Durch die Blockade dieses Rezeptors kann eine Intimahyperplasie nach einer Gefäßverletzung vorgebeugt werden und damit eine Restenose [36]. Durch diese zweiseitige Wirkung verhindert Abciximab wirksamer den raschen Anstieg der Thrombinbildung, der einer Plättchenaktivierung folgt, als Mittel, die nur GPIIb/IIIa alleine hemmen [25].

1.4.4.2 Nebenwirkung: Thrombozytopenie

1.4.4.2.1 Inzidenz

Die Inzidenz der Thrombozytopenie $<100.000/\mu\text{l}$ betrug in den einzelnen Studien bei den Patienten, die mit Abciximab behandelt wurden 2,5–5,6%, im Vergleich zur plazebobehandelten Gruppe mit 1,3–3,3%. Thrombozytopenien $<50.000/\mu\text{l}$ kamen in 0,4–1,6% der Patienten vor unter Abciximab, gegenüber 0–0,7% unter Plazebo. Die zusammen betrachteten Daten der 5.461 Patienten in der EPIC-, EPILOG- und CAPTURE-Studie zeigen, dass eine Thrombozytopenie $<100.000/\mu\text{l}$ signifikant höher unter einer Abciximab-Therapie (Bolus + Infusion) war als unter Plazebo (3,7% vs. 2%) und $<50.000/\mu\text{l}$ sich ebenfalls unterschied (1,1% vs. 0,5%). Akute Plättchenabfälle $<20.000/\mu\text{l}$ innerhalb von 24 Stunden nach Medikamentengabe wurde in 0,3–0,7% der Patienten beobachtet, die zum ersten Mal mit Abciximab therapiert wurden. [55]

Die höchste Rate an Thrombozytopenien gab es in der CAPTURE-Studie (5,6% vs. 1,3%). Ein Grund dafür könnte die längere Therapie mit Abciximab sein als in anderen Studien (Abciximab-Gabe für 17–25 Stunden vor PTCA, sowie für 1 Stunden nach PTCA). Diese Hypothese beruht auf der Beobachtung, dass in der EPIC-Studie die Patienten, die Bolus

und Infusion erhielten, eine höhere Rate an Thrombozytopenien hatten als Patienten, die nur einen Abciximab-Bolus erhielten.

Die niedrigste Rate an Thrombozytopenien wurde in der EPILOG-Studie beobachtet, bei der mit unterschiedlichen Heparindosen (100 I.E./kg KG oder 70 I.E./kg KG) therapiert wurde. Bei Gabe von Abciximab und der Standarddosis an Heparin (100 I.E./kg KG) wurde die Thrombozytenzahl um 12,9%, bei der niedrigdosierten Heparingabe (70 I.E./kg KG) um 11,7% und bei Patienten mit Plazebo und Standarddosis an Heparin um 8,4% reduziert. Dadurch wird vermutet, dass eine komplexe Interaktion zwischen Abciximab und Heparin existiert. [84] [103]

Weitere Einzelheiten über die verschiedenen prospektiven klinischen Multizenter-Studien können der Tabelle 2 entnommen werden.

Tabelle 2 Thrombozytopenieentstehung unter Abciximab in verschiedenen prospektiven klinischen Studien in der interventionellen Kardiologie.

STUDIE	n	Medikament	Anzahl der Patienten	Thrombozytopenie: <100.000/ μ l (%)	Thrombozytopenie: <50.000/ μ l (%)	Pseudothrombozytopenie (%)
EPIC 1994 [49]	2.099	Abciximab Bolus 0,25mg/kg KG + 12h-Infusion 10 μ g/min	708	5,2	1,6	Abciximab: Bolus + Infusion 1,1 [9] [75]
		Abciximab Bolus 0,25mg/kg KG	695	3,6	0,3	Abciximab: Bolus 2,6 [9]
		Plazebo	696	3,4	0,7	Plazebo: 1,3 [9]
EPILOG 1997 [50]	2.792	Abciximab Bolus 0,25mg/kg KG + 12h-Infusion 0,125 μ g/kg/min + Standarddosierung Heparin (100 I.E./kg KG Bolus)	918	2,6	0,9	Abciximab: 1,9 [134]
		Abciximab Bolus 0,25mg/kg KG + 12h-Infusion 0,125 μ g/kg/min + Niedrigdosierung Heparin (70 I.E./kg KG Bolus)	936	2,5	0,4	Plazebo: 0,2 [134]
		Plazebo + Standarddosierung Heparin (100 I.E./kg KG Bolus)	939	1,5	0,4	
CAPTURE 1997 [26]	1.265	Abciximab Bolus 0,25mg/kg KG + Infusion 10 μ g/min	635	5,6	1,6	Abciximab: 4,0 [134]
		Plazebo	630	1,3	0	Plazebo: 0,6 [134]
EPISTENT 1998 [51]	2.399	Abciximab Bolus 0,25mg/kg KG + Infusion 0,125 μ g/kg/min + Stent	794	2,8	1,1	Abciximab: 2,1 [134]
		Abciximab + Angioplastie	796	2,6	0,9	
		Plazebo + Stent	809	0	0	Plazebo: 0,2 [134]

1.4.4.2.2 Generelle Risikofaktoren

Eine Datenanalyse zeigte, dass ein Alter >65 Jahre, ein Gewicht <90 kg, eine vorrausgehende Thrombozytenzahl von <150.000/ μ l und eine Therapie mit dem Thrombozytenaggregationshemmer Abciximab prädisponiert eine Thrombozytopenie zu entwickeln [9] [103]. Das Risiko eine Thrombozytopenie zu bekommen, steigt mit der Anzahl der Risikofaktoren (Risikofaktoren: Plättchenzahl <200.000/ μ l / Alter >65 Jahre / Gewicht <90kg) (0 Risikofaktoren = 1,8%; 1 Risikofaktor = 2,3%; 2 Risikofaktoren = 8,0%; 3 Risikofaktoren = 9,8%) [9]. Thrombozytopenien kamen in der EPIC-Studie zusätzlich zu den oben genannten Risikofaktoren häufiger bei Patienten mit Gefäßerkrankungen (15% vs. 9%), höherem Alter (64 Jahre vs. 60 Jahre) und einer 3-Gefäß-Koronar-Erkrankung vor (26% vs. 14%) [8]. In gleicher Weise erhöht die Zugabe einer Infusion (10 μ g/min) zu einer Bolusgabe (0,25mg/kg), im Gegensatz zur alleinigen Bolusgabe, das Risiko einer Thrombozytopenie [13].

1.4.4.2.3 Wiederholte Gabe von Abciximab

Bei wiederholter Gabe des GPIIb/IIIa-Antagonisten kam es zur Entstehung einer Thrombozytopenie <100.000/ μ l in 3,5% und eine akute Thrombozytopenie <20.000/ μ l in weniger als 1% der Fälle [148]. Die Thrombozytopenie entwickelte sich innerhalb von 12 Stunden nach der letzten Abciximab-Infusion (Median 4 Stunden). Die Intervalle zwischen den Abciximab-Expositionen lagen zwischen 2–15 Wochen. [40]

Die Rate an Thrombozytopenien und die Thrombozytopeniedauer scheint bei erneuter Gabe von Abciximab höher als bei einmaliger Gabe zu sein [12] [54] [101]. Die gesamte Rate an Thrombozytopenien lag bei 4,4%; die akute Thrombozytopenie (<20.000/ μ l) wurde bei 2,2% beobachtet [103]. Die Rate der Thrombozytopenie beträgt nach einer wiederholten Gabe von Abciximab nach >2 Wochen: 1%; nach <2 Wochen: 12% [101] [104]. Nach einer zweiten Gabe von Abciximab trat die Thrombozytopenie 3-4x häufiger auf als nach der ersten Exposition und ebenfalls häufiger, wenn die Intervalle zwischen den einzelnen Expositionen nur 2–3 Wochen betragen [40] [149].

Die Kombinationsfähigkeit der einzelnen GPIIb/IIIa-Antagonisten und deren resultierenden Folgen wurde untersucht und es konnten keine Thrombozytopenien <50.000/ μ l festgestellt werden. Milde Thrombozytopenien (<100.000/ μ l) wurden bei einem Patienten in der Tirofiban-Abciximab Gruppe, bei keinem Patienten in der Eptifibatid-Abciximab-Gruppe und bei zwei Patienten in der Abciximab-Gruppe beobachtet. [99]

1.4.5 Tirofiban (Aggrastat[®])

Tirofiban ist ein nicht-peptidisches Tyrosinderivat, das selektiv und kompetitiv den Glykoprotein IIb/IIIa-Rezeptor der Thrombozyten hemmt. Tirofiban ist der erste nicht-peptidische GPIIb/IIIa-Rezeptorantagonist, der aus dem Schlangengift Echistatin (afrikanische Viper: *Echis carinatus*) entwickelt wurde, welches aufgrund einer RGD-Sequenz thrombozytenaggregationshemmende Eigenschaften besitzt [106].

1.4.5.1 Nebenwirkung: Thrombozytopenie

1.4.5.1.1 Inzidenz

Laut der Fachinformation des Arzneimittels Tirofiban betrug der Prozentsatz von Patienten mit einer Thrombozytenabnahme auf $<90.000/\mu\text{l}$ 1,5% und mit einer Thrombozytenabnahme auf $<50.000/\mu\text{l}$ 0,3%, wobei dieser Rückgang nach Absetzen von Tirofiban reversibel war. Selten kam es unter der Therapie zu einem akuten und/oder starken Abfall der Thrombozytenzahl $<20.000/\mu\text{l}$, der von Schüttelfrost, leichtem Fieber oder Blutungskomplikationen begleitet sein kann. [25]

Die Rate an Thrombozytopenien unter Abciximab ist höher als bei Tirofiban oder Eptifibatid [103] [149]. Vergleicht man die beiden Medikamente Tirofiban und Abciximab hinsichtlich der Thrombozytopenie-Inzidenz miteinander, so wird Vorweggesagtes verdeutlicht [151]:

<100.000 Thrombozyten/ μl	= Tirofiban: 0,5%	Abciximab: 2,4%
<50.000 Thrombozyten/ μl	= Tirofiban: 0,1%	Abciximab: 0,9%
<20.000 Thrombozyten/ μl	= Tirofiban: 0,0%	Abciximab: 0,3%

Die Tabelle 3 veranschaulicht Unterschiede im Vergleich zu Abciximab oder Eptifibatid bzw. Unterschiede/Gemeinsamkeiten zwischen den einzelnen Studienergebnissen.

In der PRISM- (1,1% vs. 0,4% bzw. 0,4% vs. 0,1%) und in der PRISM-PLUS-Studie (1,9% vs. 0,8% bzw. 0,5% vs. 0,3%) sieht man eine Zunahme der Thrombozytopenien bei Patienten unter Tirofiban im Vergleich zur Kontrollgruppe.

1.4.5.1.2 Wiederholte Gabe von Tirofiban

Bei einem veröffentlichten Fall wird von zwei akut auftretenden Thrombozytopenien (3.000–4.000/ μl), im Abstand von 5 Monaten, jeweils nach einer kardialen Intervention bei ein und dem gleichen Patienten berichtet. Es fiel u.a. auf, dass sich die Thrombozytopenie bei der zweiten Gabe schneller entwickelte (12 Stunden vs. 5 Stunden) [52].

Tabelle 3 Thrombozytopenieentstehung unter Tirofiban in verschiedenen prospektiven klinischen Studien in der interventionellen Kardiologie.

STUDIE	n	Medikament	Anzahl der Patienten	Thrombozytopenie: <100.000/ μ l (%)	Thrombozytopenie: <50.000/ μ l (%)
RESTORE 1997 [131]	2.141	Tirofiban (10 μ g/kg KG Bolus + 0,15 μ g/kg/min Infusion)	1.071	1,1	0,2
		Plazebo	1.070	0,9	0,1
PRISM 1998 [127]	3.232	Tirofiban (0,6 μ g/kg KG über 30 Minuten + 0,15 μ g/kg/min Infusion über 47,5 Std.)	1.616	1,1	0,4
		Plazebo	1.616	0,4	0,1
PRISM-PLUS 1998 [128]	1.915	Tirofiban (0,6 μ g/kg KG über 30 Minuten + 0,15 μ g/kg/min Infusion)	345		
		Heparin (5.000 I.E. Bolus + 1.000 I.E./Std.)	797	0,8	0,3
		Tirofiban (0,4 μ g/kg KG über 30 Minuten + 0,1 μ g/kg/min Infusion) + Heparin (5.000 I.E. Bolus + 1.000 I.E./Std.)	773	1,9	0,5
ACUTE II 2002 [2]	525	160-325mg/Tag ASS + Tirofiban (Initialinfusion 0,4 μ g/kg/min über 30 Minuten, Erhaltungsinfusion 0,1 μ g/kg/min)	210	0,5	
		UFH: intravenöser Bolus mit 5.000 I.E., Erhaltungsinfusion 1.000 I.E./Std. + 160-325mg/Tag ASS + Tirofiban (Initialinfusion 0,4 μ g/kg/min über 30 Minuten, Erhaltungsinfusion 0,1 μ g/kg/min) + Enoxaparin: s.c. Injektion von 1,0mg/kg KG alle 12 Std. für 24-96 Std.	315	0,3	

1.4.6 Eptifibatid (Integrilin®)

In den letzten Jahren konnten unterschiedliche Substanzen als GPIIb/IIIa-Rezeptor-Antagonisten entwickelt werden. Dazu gehören monoklonale Antikörper wie Abciximab, nicht peptidische Substanzen wie Tirofiban und zyklische Peptide. Die Struktur des zyklischen Heptapeptid Eptifibatid beruht auf einer 73-Amino-Peptidsäure, die *barbourin* genannt wird. Barbourin gehört zu der Familie der Disintegrine, wird in Vipergift gefunden und hat die ungewöhnliche Fähigkeit, sich an Integrine zu binden. Dieses Schlangengift ist spezifisch, zeigt eine hohe Affinität nur für GPIIb/IIIa und bindet über die KGD-Sequenz an das Glykoprotein. [90] [124] [136]

1.4.6.1 Nebenwirkung: Thrombozytopenie

1.4.6.1.1 Inzidenz

In der PURSUIT-Studie ist die Rate an Thrombozytopenien $<100.000/\mu\text{l}$ und $<50.000/\mu\text{l}$ unter Eptifibatid und in der Placebo-Gruppe nahezu identisch (6,7% vs. 6,8% bzw. 0,1% vs. 0,2%) [72] [103] [108]. Auch die Arzneimittelinformation beschreibt, dass den klinischen Ergebnissen zufolge die Inzidenz der Thrombozytopenie niedrig und der mit Eptifibatid oder mit Placebo behandelten Patienten ähnlich war [25].

In einer Veröffentlichung von Tcheng et al. wird eine Thrombozytopenierate von 2% (2 von 101 behandelten Eptifibatid-Patienten entwickeln eine Thrombozytopenie mit $98.000/\mu\text{l}$ und $99.000/\mu\text{l}$ (4-Stunden/12-Stunden-Infusion)) beschrieben [147]. Zu einem ähnlichen Ergebnis kommt ebenso Khaykin et al. mit einer Inzidenzrate von 1,3% (4 von 305 Patienten entwickelten eine Thrombozytopenie unter $100.000/\mu\text{l}$) [86]. In Folge der Resultate von Hongo et al. aus dem Jahre 2001 ist die Inzidenz der Thrombozytopenie bzw. der akuten Thrombozytopenie und das Ausmaß des Thrombozytenabfalls unbeeinflusst von der Anzahl der Eptifibatid-Bolusgabe [76].

Zudem kommt man in der Studie von Suleiman et al. zu dem Ergebnis, dass eine Thrombozytopenie häufiger bei Abciximab behandelten Patienten auftritt als in der Eptifibatid-Gruppe (6% vs. 0%) [145].

1.4.6.1.2 Generelle Risikofaktoren

Alle Patienten, die eine Thrombozytopenie entwickelten, waren generell älter, hatten ein niedrigeres Gewicht, hatten keine weiße Hautfarbe und eine niedrigere Plättchenzahl im Vorfeld ($212.000/\mu\text{l}$ bei einer Thrombozytopenie vs. $226.000/\mu\text{l}$ bei keiner

Thrombozytopenie) [103] [108]. Dazu kommt, dass sie eine größere Anzahl an kardialen Risikofaktoren, häufiger Diabetes mellitus hatten und eine höhere Inzidenz an vorrangegangenen Myokardinfarkten und peripherer Gefäßerkrankung vorwiesen [108].

1.4.6.1.3 Wiederholte Gabe von Eptifibatid

In der Literatur sind bisher nur wenige Fälle beschrieben worden, die bei erneuter Gabe des GPIIb/IIIa-Antagonisten Eptifibatid eine Thrombozytopenie entwickelten. Die geschilderten Kasuistiken entwickelten nach der Bolusgabe innerhalb von <3–11 Stunden den Thrombozytentiefpunkt (3.000–29.000/ μ l). [76] [119]

Bei zwei Patienten ist bei einer anschließenden Exposition mit Eptifibatid an eine Abciximabtherapie in der Vorgeschichte eine Thrombozytopenie entstanden [76].

Ein anderer Fallbericht zeigt eine problemlose Eptifibatidgabe bei einem Patienten, der zuvor unter Abciximab eine akute Thrombozytopenie entwickelte [37].

Tabelle 4 Thrombozytopenieentstehung unter Eptifibatid in verschiedenen prospektiven klinischen Studien in der interventionellen Kardiologie.

STUDIE	n	Medikament	Anzahl der Patienten	Thrombozytopenie: <100.000/ μ l (%)	Thrombozytopenie: <50.000/ μ l (%)
IMPACT-II 1997 [78]	4.010	Eptifibatid	2.682		
		Eptifibatid Bolus 135 μ g/kg KG + 20-24h-Infusion 0,5 μ g/kg/min	1.349	3,2	0,2 [151]
		Eptifibatid Bolus 135 μ g/kg KG + 20-24h-Infusion 0,75 μ g/kg/min	1.333	2,8	0,4 [151]
		Plazebo	1.328	2,7	0,6 [151]
PURSUIT 1998 [130]	10.948	Eptifibatid	6.209	6,8	0,2
		Eptifibatid Bolus 180 μ g/kg KG + Infusion 1,3 μ g/kg/min	1.487		
		Eptifibatid Bolus 180 μ g/kg KG + Infusion 2,0 μ g/kg/min	4.722		
		Plazebo	4.739	6,7	0,1
IMPACT-I 1995 [77]	150	Eptifibatid	101		
		Eptifibatid Bolus 90 μ g/kg KG + 4h-Infusion 1,0 μ g/kg/min	52	6	0
		Eptifibatid Bolus 90 μ g/kg KG + 12h-Infusion 1,0 μ g/kg/min	49	0	0
		Plazebo	49		
IMPACT-AMI 1997 [79]	180	Eptifibatid Bolus 36 μ g/kg KG - 180 μ g/kg KG + Infusion 0,2 μ g/kg/min - 0,75 μ g/kg/min	125	11	0
		Plazebo	55	8	0

2 Zielsetzung

Ziel dieser vorliegenden klinischen und experimentellen Arbeit bestand darin, Hintergründe und Zusammenhänge einer medikamentinduzierten Thrombozytopenie durch Glykoprotein IIb/IIIa-Rezeptorantagonisten (Abciximab, Tirofiban und Eptifibatid) genauer zu hinterfragen und nachzuweisen. Dazu untersuchte die vorliegende Arbeit retrospektiv und prospektiv die Seren von unterschiedlichen Patientenkollektiven auf immunologische Gründe und Mechanismen der medikamentinduzierten Thrombozytopenie.

Die Ergebnisse sollen durch folgende verschiedene Untersuchungsmethoden überprüft werden: ELISA (= Nachweis freier Antikörper im Serum), Durchflusszytometer (= Nachweis zellgebundener Antikörper), Immunpräzipitation (= Nachweis von Glykoproteinen) und indirekter/direkter MAIPA (= Nachweis freier oder zellgebundener Antikörper).

Des Weiteren standen konkrete Fragen offen:

- Liegt der Thrombozytopenie durch GPIIb/IIIa-Rezeptorantagonisten (Abciximab, Tirofiban und Eptifibatid) eine immunologische Ursache zugrunde ?
- Nachweis und Charakterisierung von Abciximab-/Tirofiban-/Eptifibatid-abhängigen Antikörpern bei Patienten mit Abciximab-/Tirofiban-/Eptifibatid-induzierter Thrombozytopenie und bei Patienten vor/nach einer Herzkatheteruntersuchung.
- Prospektiver Thrombozytenverlauf nach Gabe eines GPIIb/IIIa-Rezeptorantagonisten (Einflüsse durch präexistente Antikörper, durch neu aufgetretene Antikörper oder durch die Darreichungsform des Medikamentes ?).
- Die Frequenz / die Häufigkeit der medikament-abhängigen Antikörper in der Normalbevölkerung ?
- Ist der Abciximab-assoziierte Antikörper mit einer erhöhten Thrombozytopenierate assoziiert ?
- Gibt es einen Zusammenhang zwischen dem GPIIb/IIIa-Polymorphismus und dem Bindungsverhalten des medikament-abhängigen Antikörper ?
- Gibt es einen Zusammenhang zwischen dem Aktivierungszustand des Thrombozyten und dem Bindungsverhalten des Antikörpers ?

-
- Gibt es Kreuzreaktion zwischen den einzelnen medikament-abhängigen Antikörpern ?
 - Die Epitoplokalisation der Medikamente / medikament-abhängigen Antikörper auf dem GPIIb/IIIa-Komplex ?

Da die vorliegende klinische Studie u.a. auf die freiwillige Zusammenarbeit bzw. die Zusendung an Probenmaterial angewiesen war, konnte nur eine begrenzte Anzahl an Patienten untersucht werden.

3 Material und Methoden

3.1 ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

3.1.1 Prinzip

Im ELISA, einem spezifischen Antikörper-Antigen-Suchtest, koppelt man den jeweiligen unmarkierten Partner der Antigen-Antikörper-Reaktion an einen festen Träger. Der Enzymmarker wird entweder mit einem löslichen Reaktionspartner oder einem zweiten Antikörper verbunden. Bei dem von uns eingesetzten Enzym handelt es sich um die alkalische Phosphatase. Die Bindung des Antiköpers wird mittels p-Nitrophenylphosphat als Substratlösung sichtbar gemacht.

3.1.2 Reagenzien

- | | |
|--------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| A: Abciximab, ReoPro©: | Vertrieb: Lilly Deutschland GmbH |
| B: Tirofiban, Aggrastat©: | Pharmazeutischer Unternehmer: MSD Sharp & Dohme GmbH |
| C: Eptifibatid, Integrilin©: | Pharmazeutischer Unternehmer: SP Europe, Belgien; Fa. Essex Pharma, Hersteller: SP Labo N.V.; Belgien |
| D: 2% Rinderalbumin (BSA = Bovines Serum Albumin)/PBS: | 1ml 22% Rinderalbumin (Ortho-Clinical Diagnostik) in 9ml PBS (PBS (10x) (Gibco) 1:10 in H ₂ O, pH 7,2) |
| E: Ziege-Anti-Human IgG: | Dianova, Hamburg |
| F: Substratlösung: | 5mg p-Nitrophenylphosphat, gelöst in 5ml Diäthanolaminpuffer, pH 9,8 (Sigma) |

3.1.3 Testablauf

2×10^7 Testthrombozyten wurden mit 20 μ l Serum und mit 10 μ l des zu untersuchenden Medikamentes (A) für 30 min bei 37°C inkubiert. Hiernach wurden die Plättchen dreimal in 100 μ l isotonischer Kochsalzlösung mit 0,2% Rinderalbumin (D) gewaschen und in 100 μ l der austitrierten Verdünnung des alkalischen Phosphatase markierten Ziege-Anti-Human-IgG (E) (verdünnt in PBS-BSA 2%, pH 7,2) resuspendiert. Nach einer weiteren Inkubationsperiode von 30 min bei Raumtemperatur wurden die Thrombozyten erneut viermal gewaschen und das Pellet in 100 μ l Substratlösung (F) resuspendiert. Die ganze Suspension wurde in ein Eppendorfgefäß überführt, welches man dann 30 min bei Raumtemperatur in der Dunkelheit inkubieren ließ. Bei dem Nachweis medikament-abhängiger-Antikörper gegen Tirofiban bzw. Eptifibatid (B/C) wurde bei jedem Waschschrift das Medikament in einer 1:10-Verdünnung hinzugegeben.

Danach wurden alle Ansätze 1 min bei 10.000UpM in der Biofuge abzentrifugiert und je 90 μ l der Überstände in eine Flachboden-Mikrotiterplatte überführt, in deren Löcher zuvor je 50 μ l NaOH vorgelegt worden waren, um die Reaktion zu stoppen. Bei jedem Experiment wird ein Blank-Ansatz mitgeführt. Die Substratlösung (F) wird in der Dunkelheit mit 2×10^7 nicht sensibilisierten Thrombozyten inkubiert. Die Messung der optischen Dichte der Ansätze erfolgte im Titertek Multiscan Photometer bei 405nm und die Resultate werden als Extinktionswerte angegeben.

3.1.4 Auswertung der Ergebnisse

Bei jedem Versuch wurde ein Leerwert, bestehend aus nicht sensibilisierten Thrombozyten und Substratlösung, von den gemittelten Extinktionen subtrahiert.

3.2 MAIPA (Monoclonal Antibody Immobilization of Platelet Antigens)

3.2.1 Prinzip

Der MAIPA-Test wurde wie Kiefel et al. es 1992 beschrieb durchgeführt [88]. Er dient dem Nachweis freier oder gebundener thrombozytärer Antikörper durch Immobilisation von Thrombozytenantigenen mittels glykoproteinspezifischer monoklonaler Antikörper. Bei speziellen Fragestellungen ist die Hinzugabe von Medikamenten zur Identifizierung medikament-abhängiger Antikörpern notwendig.

3.2.2 Reagenzien

A:	Ziege-Anti-Maus Fc-Fragment	IgG,	Dianova; Hamburg Verdünnung 1:500 in Lösung B
B:	Puffer zur Beschichtung der Platten:		1,59g Na ₂ CO ₃ 2,93g NaHCO ₃ 0,20g NaN ₃ in 1.000ml H ₂ O lösen, pH 9,6
C:	2% Rinderalbumin (BSA = Bovines Serum Albumin)/PBS:		1ml 22% Rinderalbumin (Ortho-Clinical Diagnostik) in 9ml PBS (PBS (10x) (Gibco) 1:10 in H ₂ O, pH 7,2)
D:	Tris-Puffer zur Solubilisation:		1,21g Tris/l, pH 7,4 eingestellt mit 3 NHCl 0,5% Triton X 100
E:	Tris-Waschpuffer:		wie Lösung D, zusätzlich 1,5ml Tween 20 1,5ml 1 M CaCl ₂ -Lösung (21,9g CaCl ₂ , in 100ml H ₂ O)
F:	Ziege-Anti-Human IgG (Fc)		(Dianova; Hamburg) konjugiert mit Peroxidase, Verdünnung 1:3.000 in Lösung E

G:	OPD Tabletten:	2mg/Tabl. enthält 2,9% 1,2-Phenolyendiamin dihydrochlorid (DAKO) 2 Tabl. ad 6ml H ₂ O und 2,5µl H ₂ O ₂
H:	2,5 NH ₂ SO ₄ :	95-98% Schwefelsäure
I:	Abciximab, ReoPro®:	Vertrieb: Lilly Deutschland GmbH
J:	Tirofiban, Aggrastat®:	Pharmazeutischer Unternehmer: MSD Sharp & Dohme GmbH
K:	Eptifibatid, Integrilin®:	Pharmazeutischer Unternehmer: SP Europe, Belgien; Fa. Essex Pharma, Hersteller: SP Labo N.V.; Belgien
L:	Ziege-Anti-Maus IgG, Fc-Fragment (Dianova, Hamburg)	Konzentration: 1,0mg/ml, Verdünnung 1:40 in Lösung C
M:	Streptavidin	Dianova; Hamburg

Im Rahmen der MAIPA-Testung wurden die folgenden monoklonalen Antikörper eingesetzt:

Tabelle 5 Monoklonale Antikörper.

Name	Spezifität	Herkunft	Charakterisiert durch...
Gi5	GPIIb/IIIa	Gießen, Deutschland	Santoso et al. [135]
FMC25	GPIX	Adelaide, Australien	Berndt et al. [11]
P2	GPIIb/IIIa	Fa. Immunotech, Frankreich	McGregor et al. [109]

Name	Spezifität	Herkunft	Charakterisiert durch...
Gi16	GP1Ib	Gießen, Deutschland	Großjohann et al. [70]
SZ21	GP1IIa	Fa. Immunotech, Frankreich	Ruan et al. [133]
7G2	GP1IIa	St. Louis, Missouri	Brown and Goodwin [24]

3.2.3 Testablauf des MAIPA (indirekter/direkter) mit/ohne Abciximab

Bei der Untersuchung von Antikörpern wurden 2×10^7 Thrombozyten bzw. 1×10^6 CHO-Zellen pro Einzelansatz eingesetzt. Diese wurden in 1,5ml Probengefäße 1 min bei 10.000UpM bzw. die CHO-Zellen bei 1.500UpM zentrifugiert. Zu dem Sediment wurde 10µl Abciximab (0,02mg/ml) (I) bzw. 30µl NaCl pH 6,5 und 30µl 2% Rinderalbumin/PBS (C) hinzugegeben und hinterher 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend sind die Thrombozyten für 1 min bei 10.000UpM bzw. die CHO-Zellen bei 1.500UpM zentrifugiert worden. Dann wurde der Überstand abgesaugt und 20µl des zu untersuchenden Serums zu den 30µl 2% Rinderalbumin/PBS (C) pipettiert. Das Gemisch wurde im Anschluss an eine Inkubation von 30 min bei 37°C einmal mit 100ml isotonischer Kochsalzlösung gewaschen. Wollte man die Antikörperbeladung auf den Thrombozyten nachweisen, so fing man ab dem folgenden Schritt an, den Nachweis zu erbringen. Es wurde im weiteren Verlauf zentrifugiert, der Überstand abgesaugt, 30ml 2% Rinderalbumin/PBS (C) und 10µl Gi5 (bzw. ein anderer mAk) hinzugegeben. Nach einer erneuten Inkubation von 30 min bei 37°C wurde der Ansatz dreimal mit 100µl NaCl aufgeschwemmt, zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Nach der letzten Sedimentation wurden die Plättchen oder CHO-Zellen in 100µl Tris-Puffer (D) zur Solubilisation aufgenommen und 30 min bei 4°C inkubiert. Es folgt eine 30-minütige Zentrifugation bei 13.000UpM bei 4°C. Danach wurde 50µl Überstand vorsichtig abgehoben und in 200ml Tris-Waschpuffer (E) verdünnt. Eine Mikrotiterplatte, die über Nacht mit 100µl pro Loch mit einer 1:500 Verdünnung eines Ziege-Anti-Maus Antikörpers (A) beschichtet worden war, wurde mit Tris-Waschpuffer (E) zuvor fünfmal gewaschen und mit dem gleichen Puffer 15–30 min geblockt. Im Anschluss daran wurde in jedes Loch 100µl des Gemisches aus Überstand und Waschpuffers pipettiert und für 90 min bei 4°C inkubiert. Aus den 250µl Solubilisationsverdünnungen

wurden jeweils Doppelansätze à 100µl hergestellt. Nach erneutem fünfmaligem Waschen mit Tris-Waschpuffer (E) wurden 100µl Ziege-Anti-Human IgG (F) je Vertiefung hinzupipettiert und 120 min bei 4°C inkubiert. Nach diesem Vorgang wurde die Platte sechsmal mit Tris-Waschpuffer (E) gewaschen und in jedes Loch 100µl des Gemisches (G) gegeben. Nach 15 min Inkubationszeit bei Raumtemperatur im Dunkeln wurde die Farbreaktion mit 50µl 2,5 NH₂SO₄ (H) pro Loch gestoppt. Die Extinktionen der Ansätze wurde im Photometer bei 492nm und 690nm gemessen und als Extinktionswerte angegeben.

Zur Auswertung der Ergebnisse wurden von den gemittelten Extinktionen der Zweifachansätze der Plattenleerwert subtrahiert.

Der Nachweis medikament-abhängiger Antikörper gegen Tirofiban bzw. Eptifibatid ist etwas modifiziert in dem Sinne, dass die Thrombozyten zu Anfang nicht mit Tirofiban (J) oder Eptifibatid (K) inkubiert wurden, sondern es wurden zu Serum und 2% Rinderalbumin/PBS (C) unverdünnt 30µl Tirofiban (0,25mg/ml) (J) bzw. Eptifibatid (1mg/ml) (K) hinzugegeben. Bei jedem Waschschrift bzw. Hinzugabe von 2% Rinderalbumin/PBS (C), NaCl, mAk Gi5 (bzw. ein anderer mAk), Solubilisationspuffer (D), von TBS (E) und von Konjugat (F) wurde ein Konzentrationsverhältnisverhältnis von 0,25mg/ml Tirofiban bzw. 1mg/ml Eptifibatid hergestellt.

3.2.4 Modifikation des MAIPA zur Detektion der Immunglobulinklassen

Dieser Test, der der Immunglobulindifferenzierung/-klassifizierung dient, wird in der gleichen Weise durchgeführt wie die Vorangegangenen. Zu Anfang wurden 4×10^7 Thrombozyten pro Einzelansatz eingesetzt, mit dem zu untersuchenden Serum (20µl) inkubiert und im Versuchsablauf neben 20µl Gi5 als monoklonaler Antikörper, der biotinmarkierte Ziege-Anti-Maus-Antikörper (L) dazugegeben (20µl). Es folgt die Inkubation, die Solubilisation, das Zentrifugieren vor dem Entnehmen des Lysats und das Überführen auf die vorbereiteten Mikrotiterplatten. Die Mikrotiterplatten wurde mit 100µl Streptavidin (M) (Verdünnung 1:500) über Nacht bei 4°C beschichtet. Es schließt sich eine erneute Inkubation an. Danach wird 100µl des angesetzten Konjugats (Peroxidase konjugierter Ziege-Anti-Human-Antikörper mit (E) verdünnt: IgG 1:3000 / IgM 1:1800 / IgA 1:500) dazugegeben und bei 4°C inkubiert. Die Fortsetzung des Testablaufs (wiederholtes Waschen der Titerplatte mit Tris-Waschpuffer (E), hinzugeben des Gemisch (G) in jedes Loch 100µl, etc.) ist unter 3.2.3 zu entnehmen.

3.3 Durchflusszytometer

3.3.1 Prinzip

Suspendierte Einzelzellen werden an einem fokussierten Laser vorbeigeführt. Dabei senden die Zellen in Abhängigkeit vom Zelltyp und der Probenvorbereitung charakteristische Lichtsignale aus, die mittels geeigneter Detektoren nachgewiesen werden. Somit kann man Rückschlüsse auf zelluläre Eigenschaften wie z.B. Oberflächenantigene, intrazelluläre, funktionelle und zellmembranabhängige Parameter schließen. Wir nutzten diese Methode, um u.a. Reaktionen auf der Thrombozytenoberfläche nachzuweisen.

3.3.2 Reagenzien

A: Waschpuffer:	3,72g EDTA in 1l PBS 1x, (PBS (10x) (Gibco)) 1:10 in Aqua dest., pH 7,4)
B: 4% PFA:	400mg Paraformaldehyd 10ml PBS 1x, pH 7,2 300µl 3 M NaO bei 56°C lösen 300µl 3 M HCl pH 7,0-7,4 eingestellt mit HCl / NaOH
C: PBS:	PBS 1x pH 7,4 (hergestellt aus 100ml PBS (10x) (Gibco) und 900ml H ₂ O)
D: Abciximab, ReoPro ©:	Vertrieb: Lilly Deutschland GmbH
E: 2% Rinderalbumin (BSA = Bovines Serum Albumin)/PBS:	10ml 22% Rinderalbumin, (Ortho-Clinical Diagnostik) in 100ml PBS (PBS (10x) (Gibco)) 1:10 in H ₂ O, pH 7,2)
F: RAH (sekundärer Antikörper):	IgG/FITC, Rabbit F(ab') ₂ (Dako)

3.3.3 Testablauf

3.3.3.1 Thrombozyten isolieren

Zunächst wurden die zu isolierenden Thrombozyten, abgenommen mit Mikro-Flo-Spritzen, in 9ml EDTA-Röhrchen 30 min in Schräglage bei 37°C stehengelassen. Danach wurde bei 800UpM 20 min zentrifugiert und das plättchenreiche Plasma in 13ml Probengefäße pipettiert. Hinterher wurde das plättchenreiche Plasma noch dreimal mit 5ml Waschpuffer (A) resuspendiert und jeweils 10 min bei 3.000UpM zentrifugiert. Nach dem letzten Resuspendieren, vor dem dritten Waschschrift, wurden die Thrombozyten auf $10^6/\mu\text{l}$ (= $10^9/\text{ml}$) eingestellt.

3.3.3.2 Thrombozyten fixieren

Nun wurden die Plättchen 1:2 mit 2% PFA (B) versetzt und 3 min bei Raumtemperatur stehengelassen. Anschließend wurde mit 5ml PBS 1x pH 7,4 (C) verdünnt und 10 min bei 3.000UpM zentrifugiert. Dann wurde der Überstand dekantiert und noch zweimal mit PBS 1x pH 7,4 (C) gewaschen. Vor dem letzten Abzentrifugieren wurden die Zellen gezählt, absolute Zellzahl berechnet und Thrombozyten nach dem dritten Waschschrift auf $10^8/\text{ml}$ eingestellt.

3.3.3.3 Hinzugabe von Medikament und Patientenserum

Im Anschluss daran wurde in jedes 1,5ml Probengefäß 10^8 Thrombozyten/ml pipettiert, 1 min bei 10.000UpM abzentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Sediment mit 100 μl Abciximab (0,02mg/ml) (D) bzw. mit 100 μl PBS 1x pH 7,4 (C) versetzt. Dieses Gemisch ist dann für 30 min bei 37°C inkubiert worden, bevor es einmal mit PBS 1x pH 7,4 (C) gewaschen wurde. Darauf wurde jeder Ansatz mit 30 μl Rinderalbumin 2% (E) und 50 μl Patientenserum versetzt und 30 min bei 37°C inkubiert. Jetzt wurde dreimal mit jeweils 100 μl PBS 1x pH 7,4 (C) gewaschen und jeweils 1 min bei 10.000UpM zentrifugiert, bevor im Anschluss 40 μl sekundärer Antikörper RAH 1:40 (F) verdünnt mit Rinderalbumin 2% (E) hinzugegeben wird. Nach einer Inkubation von 30 min bei 37°C im Dunkeln wurde erneut dreimal mit jeweils 100 μl PBS 1x pH 7,4 (C) gewaschen und jeweils eine Minute bei 10.000UpM zentrifugiert. Nach dem dritten Waschschrift wurde jeder Ansatz mit 300 μl PBS 1x pH 7,4 (C) resuspendiert und in ein 5ml Rundbodenröhrchen mit 300 μl PBS 1x pH 7,4 (C) überführt.

3.3.3.4 Fluoreszenz-Messung

Sämtliche Messungen wurden an einem FACScan-Durchflusszytometer (Fa. Becton-Dickinson, Heidelberg) durchgeführt. Ein Computer analysiert die Informationen, und die Auswertung der Daten erfolgte durch das am Gerät angeschlossene Datenverarbeitungsprogramm mit der Software CELLQuest.

Der Messbereich wird selektiv auf die Plättchenpopulation eingestellt, d.h. es wird ein Analysenfenster definiert, welches die selektive Betrachtung der Zellen innerhalb des Fensters ermöglicht, während Detritus und andere Zellpopulationen nicht gemessen werden. Der Registrierbereich wurde vor jeder Messreihe konstant auf diesen Bereich eingestellt.

Anschließend lassen sich die so eingestellten Thrombozyten in Form eines Histogramms darstellen. Bei der Histogramm-Abbildung handelt es sich um eine Ein-Parameter-Darstellung, bei der die x-Achse des Diagramms die Fluoreszenzintensität bezeichnet, während die y-Achse die Anzahl der Ereignisse (Zellzahl) abbildet. Ein Signal schwacher Intensität wird dabei auf der linken Seite der x-Achse abgebildet, ein stärkeres Signal rechts davon.

3.4 Immunpräzipitation / Immunoblot / Westernblot mit Immundetektion

3.4.1 Prinzip

Die Immunpräzipitation ist eine Methode zur Isolation von Antigenen aus dem Zelllysat mittels im Überschuss eingesetzter spezifischer Antikörper. Diese Methode dient dem Nachweis von Glykoproteinen. Hierbei kommt es zur Trennung von Proteinmolekülen durch Polyacrylamid-Elektrophorese in Banden verschiedener Molekulargewichte, anschließender Antigentransfer auf Nitrozellulosemembran und Reaktion mit enzymatisch oder radioaktiv markierten Anti-Antikörpern, wodurch die gesuchten Antigenbanden sichtbar gemacht werden.

3.4.2 Reagenzien

A: ACD-A:	22,0g/l Natriumcitrat-Dihydrat 7,3g/l Zitronensäure 24,5g/l Glucose-Monohydrat; Hersteller: NPBI; NL-Emmer-Compascum Vertrieb: NPBI-Biotrans GmbH; Dreleice
B: PGE 1:	Prostaglandin E1, Fa. Serva, 1mg, mit 1.000µl abs. Äthanol gelöst (1mg/ml)
C: Waschpuffer 1:	1.000ml PBS 1x mit Ca pH 7,4 einstellen 3,7224g EDTA
D: Biotin:	NHS-LC-Biotin, MW 556,58 über Fa. Pierce 27,83mg Biotin in 1ml Waschpuffer 1; 1 min bei 13.000UpM zentrifugieren und Überstand weiterverwenden.
E: Waschpuffer 2:	20mM Tris 2,42g 5mM Glycin 0,3754g 10mM EDTA 3,722g

		140mM NaCl	8,182g
		in 1.000ml H ₂ O lösen und pH 7,4 einstellen	
F:	IPB (Immuno Precipitation Buffer; Lysepuffer):	50mM Tris	3,03g
		150mM NaCl	500ml (0,9%)
		mit HCl pH 7,4 einstellen	
		1% Triton x-100	5ml
G:	PMSF:	Appli Chem GmbH, Darmstadt	
H:	Leupeptin:	Fa. Sigma, 475,6g/l	
I:	Sepharose:	Protein A Sepharose beads CL-4B, Pharmacia Biotech	
J:	BSA:	Bovine Serum Albumine (BSA, Serva), 100mg/ml H ₂ O	
K:		300g Acrylamid	
		8g Bisacrylamid	
		ad 1.000ml mit H ₂ O	
L:		36,3g Tris ad 100ml mit H ₂ O,	
		mit 12 N HCl auf pH 8,8 einstellen	
M:		10g SDS (Natriumdodecylsulfat) ad 100ml mit	
		H ₂ O	
N:		3,0g Tris ad 50ml mit H ₂ O, mit 1 N HCl auf pH	
		6,8 einstellen	
O:	Probenpuffer:	1,0ml Lösung M	
		1,0ml Lösung N	

	1,0ml Glycerin
	0,1ml 0,1% Bromphenolblau (100mg Bromphenolblau, in 100ml H ₂ O)
	1,9ml H ₂ O
P: Laufpuffer:	(10-fach konzentriert); Rotophorese; Fa. C. Roth GmbH & Co. Zusammensetzung: 0,25 M Tris 1,92 M Glycin 1% (g/v) SDS destilliertes, deionisiertes Wasser
Q: Trenngel 7,5%:	11,40ml H ₂ O 2,33ml Lösung L 4,80ml Lösung K 188µl Lösung M 25µl TEMED 625µl 1,25% Ammoniumpersulfat
R: Sammelgel 5%:	2,0ml Lösung K 1,25ml Lösung N 100µl Lösung M 6,8ml H ₂ O 15µl TEMED 375µl 1,25% Ammoniumpersulfat
S: Fixierungslösung:	250ml Isopropanol 100ml Eisessig ad 1000ml mit H ₂ O
T: RAH (Rabbit Anti Human):	RAH 1:40 (Dako)
RAM (Rabbit Anti Mouse):	RAM 1:40 (Dako)

U: Transferpuffer:	20 mM Tris	12,1g
	150 mM Glycin	56,3g
	in 4.000ml H ₂ O lösen	
	20% Methanol	
	mit Methanol ad 5.000ml, pH 8,3-8,5	
V: ECL-Waschlösung:	20 mM Tris	2,42g/l
	154 mM NaCl	1l 0,9%
	0,05% Tween 20	500µl/l
	ad 1.000ml H ₂ O, mit HCl pH 7,4 einstellen	
W: Blockierungslösung:	1,5% BSA	
	ad 100ml Waschlösung V	
X: Streptavidin-HRP:	Streptavidin-Peroxydase-Konjugat, Fa. Amersham (1:3.000 in Lösung W)	
Y: ECL-1 / ECL-2:	ECL Western blotting detection system, Fa. Amershan Biosciences; England	
Z: Nitrozellulose-Membran:	Hybound™-C Extra; Fa. Amersham International plc; England	

3.4.3 Testablauf

3.4.3.1 Plättchengewinnung aus Frischblut

Zunächst wurden pro Röhrchen 1,5ml ACD-A (A), 10µl PGE 1 (B) und 9ml Frischblut vorsichtig durchmischt und für 30 min in Schräglage bei 37°C stehengelassen. Dann wurde zentrifugiert, das plättchenreiche Plasma in 5ml Röhrchen pipettiert, 5ml vorgewärmter Waschpuffer 1 (C) hinzugegeben und erneut 10 min bei 2.000UpM zentrifugiert. Insgesamt sollte dreimal gewaschen werden.

3.4.3.2 Biotinmarkierung

Anschließend wurden die Thrombozyten mit Waschpuffer 1 (C) auf $2 \times 10^6/\mu\text{l}$ bzw. auf $2 \times 10^9/\text{ml}$ eingestellt und in je 1ml-Portionen auf Polyröhrchen verteilt. Diese werden dann für 5 min auf Eis gekühlt.

Jeweils 100 μl Biotin-Verdünnung (D) zu 1ml Zellen wurden hinzugegeben (Endkonzentration 5 mM) und für 30 min auf Eis bei 4°C inkubiert. Zu diesem Ansatz wurden dann nach der Inkubation 5ml kalter Waschpuffer 2 (E) gegeben und 10 min bei 4°C inkubiert. Dies wurde noch zweimal mit Waschpuffer 2 (E) für 10 min wiederholt.

Nach dem letzten Waschen wurde das Pellet mit 500 μl Waschpuffer 2 resuspendiert und die Zellen mit IPB (F), PMSF (G) und Leupeptin (H) auf $1 \times 10^9/\text{ml}$ bzw. $1 \times 10^6/\mu\text{l}$ eingestellt. Es folgte eine 30-minütige Inkubation bei 4°C. Anschließend wurde für 30 min bei 13.000UpM bei 4°C zentrifugiert, bevor ca. 600 μl Lysat abgenommen wurden.

3.4.3.3 Preclear des Zell-Lysates

Je 100 μl Protein Sepharose beads (I) wurden 1x mit 500 μl IPB (F) (1 min bei 10.000UpM) gewaschen, bevor dann 600 μl Lysat, 20 μl Normal Human Serum und 80 μl BSA (J) (100mg/ml) dazupipetiert wurde und für 30 min bei Raumtemperatur auf dem Rotator inkubiert. Danach erfolgte eine Zentrifugation bei 10.000UpM für 1 min. Im Anschluss daran wurde das Preclearing wiederholt, d.h. Lysat wurde auf die frisch gewaschenen Protein Sepharose beads (I) gegeben. 20 μl Normal Human Serum kamen hinzu und wurden 30 min lang bei Raumtemperatur auf dem Rotator inkubiert. Hinterher folgte eine 1-minütige Zentrifugation bei 10.000UpM, bevor die Überstände gepoolt und nochmal für 1 min bei 13.000UpM abzentrifugiert wurden.

Über Nacht werden die Ansätze bei 4°C inkubiert. Dafür wurden 100 μl Lysat, 50 μl Patientenserum und 50 μl Abciximab (1mg/ml) zusammen pipetiert und auf dem Rotator nachts durchgemischt. Morgens wurden die Ansätze bei Raumtemperatur auf dem Überkopfmischer mit 5 μl RAH bzw. RAM (T) inkubiert und im Anschluss eine Minute bei 13.000UpM zentrifugiert, bevor der Überstand auf die gewaschenen Protein Sepharose beads (I) gegeben wurde. Danach erfolgte eine fünfmalige Waschung mit IPB-Puffer (F). Nach dem 4. Waschschrift wurden die Protein Sepharose beads in neue Eppendorf-Hütchen überführt und nach dem letzten Waschen der Überstand abgesaugt. Die Proben wurden nun mit 50 μl Probenpuffer (O) resuspendiert, 3 min bei 100°C gekocht und weiterverarbeitet. 40 μl wurden in die vorbereiteten Aussparungen im Sammelgel pipetiert.

3.4.3.4 SDS-Page (Polyacrylamidgel-Elektrophorese)

Zwischen zwei Glasplatten wurde ein Trenngel (Q) gegossen. Nach dessen Polymerisierung wurde es mit einem Sammelgel (R) überschichtet, in dem ein Kunststoffkamm Löcher für die einzelnen Proben ausgespartete. In die vorgesehenen Aussparungen wurden nun je 50µl Probenpuffer (O) gegeben und das Gel mit einer Stromstärke von 10mA über Nacht äquilibriert. Im Anschluss daran wurden die für die Immunpräzipitation vorbereiteten Proben in die Löcher gegeben und ein Stromfluss von 20mA hergestellt.

3.4.3.5 Blot

Anschließend wurde das Gel in einen Blot bei einer Stromstärke von 200mA unter Wasserkühlung auf Nitrocellulose (Z) transferiert. Nun wurde die geblottete Nitrocellulose mit PBS gewaschen und für 1 Stunde bei Raumtemperatur mit 1,5% BSA (J) in ECL-Waschpuffer (V) geblockt. Nach dem Entfernen der überschüssigen Blockierlösung (W), wurde das Konjugat (X) für 30 min bei Raumtemperatur auf einem Schüttler dazu gegeben. Dann wurde achtmal mit ECL-Waschpuffer (V) gewaschen, bevor in einer Dunkelkammer 5ml ECL-1 und 5ml ECL-2 (Y) für eine Minute bei Raumtemperatur auf die Nitrocellulose (Z) einwirkte. Diverse Filme wurden mit der Nitrocellulose (Z) in einer Filmkassette mit verschiedenen Zeiten exponiert.

3.4.3.6 Beurteilung

Nach Entwicklung des Röntgenfilms wurden die sichtbaren Banden mit denen eines MW-Standards verglichen und aus den ermittelten MW auf das präzipitierte Glykoprotein oder dessen Fragment geschlossen.

3.5 Methoden unter Verwendung von transfizierten Zelllinien (CHO-Zellen)

Auf transfizierten CHO-Zellen werden rekombinante GPIIb/IIIa-Allele (PI^{A1}, PI^{A2}) exprämiert, um u.a. zeigen zu können, in welcher Weise der GP-Polymorphismus den medikament-abhängigen-Antikörper beeinflusst.

3.5.1 Reagenzien

CHO-Zellen: Chinesische-Hamster-Ovar (CHO)-Zellen; Chinese Hamster Ovary cells (Zelllinie: CHO-K1) Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (38124 Braunschweig)

A: Gewebekulturflaschen: 250ml, 75 cm² Wachstumsfläche; Fa. Falcon

B: MEM (MEM Alpha Medium 500ml
with Glutamax-I without
Ribonucleosides, W/O
Deoxyribonucleosides):

C: FCS (Foetal Calf Serum, Fa. Gibco BRL
hitzeinaktiviert 30 min, 56°C)
(dialysiert):

D: Penicillin/Streptomycin Fa. PAA
(10.000U/ml):

E: Natriumpyruvat (Sodium Fa. Gibco BRL
Pyruvat MEM; 100mM, liquid):

F: Geneticin (G-418 Sulphate): Fa. Gibco/BRL

G: Zeocin: Fa. Invitrogen

H: Zellkulturmedium 1 (für Pla₂- Lösung B 450ml

	transformierte Zellen):	Lösung C	50ml
		Lösung D	2,5ml
		Lösung E	5ml
I:	Zellkulturmedium 2 (für nicht-transformierte Zellen):	Lösung H	180ml
		Lösung F	20ml
		Lösung G	1ml
J:	DPBS (Dulbecco's Phospahte Buffered Saline (1*) without Calcuim and Magnesium):	Fa. PAA	
K:	Acutase™:	Fa. PAA	
L:	PBS:	PBS 1x (PBS (10x) (Gibco) 1:10 in H ₂ O), pH 7,2	
M:	4% PFA:	400mg Paraformaldehyd 10ml PBS 1x (PBS (10x) (Gibco) 1:10 in H ₂ O), pH 7,2 300µl 3 M NaO bei 56°C lösen 300µl 3 M HCl pH 7,0-7,4 eingestellt mit HCl / NaOH	

3.5.2 Testablauf

3.5.2.1 Teilen der CHO-Zellen

Das Zellkulturmedium wurde aus den bei 37°C inkubierten Zellflaschen mit Zellrasen entfernt und die Zellen anschließend zweimal mit 7ml vorgewärmten DPBS gewaschen. Daraufhin erfolgte die Zugabe von 1ml Acutase, die für ca. 2–5 Sekunden auf die Zellen einwirkte. Infolgedessen wurden die Zellen vom Boden gelöst und die Reaktion durch Zugabe von 6,5ml Zellkulturmedium 1 bzw. 2 gestoppt. Nun wurde mehrmals vorsichtig resuspendiert und in eine neue Kulturflasche mit 15ml vorgelegtem Zellkulturmedium 1 bzw. 2 0,8ml der Zellsuspension überführt.

3.5.2.2 Vorbereitung der CHO-Zellen um diese im MAIPA bzw. Durchflusszytometer einzusetzen

Gleiche Vorgehensweise wie beim Splitten der CHO-Zellen, doch statt diese am Ende in eine Zellkulturflasche zu überführen, wurden diese in ein 50ml Blue-Cap Röhrchen pipettiert. Danach wurde die Zellsuspension für 5 min bei 1.200UpM zentrifugiert. Anschließend wurde das Sediment mit ca. 7ml PBS 1x pH 7,2 resuspendiert, bevor es erneut für 5 min bei 1.200UpM zentrifugiert wurde. Dann wurde das Sediment für 3 min im Dunkeln bei Raumtemperatur mit 2% PFA fixiert und im Anschluss noch zweimal mit jeweils 5ml PBS 1x pH 7,2 bei 1.200UpM gewaschen. Nun erfolgte die Resuspension der Zellen in ca. 2ml PBS 1x pH 7,2 und die Einstellung mit Hilfe einer Neubauerkammer. Dazu wurden die CHO-Zellen 1:5 oder 1:10 mit isotonischer Kochsalzlösung verdünnt und am Mikroskop ausgezählt. Jeweils die in den vier Eckquadraten gelegenen Zellen wurden gezählt und daraus der Mittelwert errechnet. Um die Zellzahl pro μl zu erhalten, wurde der Mittelwert mit dem Verdünnungsfaktor und dem Kammerfaktor multipliziert und daraus 1×10^6 Zellen berechnet. Diese berechnete Zellzahl wurde dann für jeden Ansatz im MAIPA bzw. im Durchflusszytometer eingesetzt.

3.5.2.3 Aktivierung des GPIIb/IIIa mit RGDW

Zunächst wurden die Thrombozyten zweimal mit PBS/RA/ NaN_3 gewaschen und abgelöst. Nach dem letzten Waschen folgte die Resuspension in 2ml Puffer und die Zählung der Thrombozyten in der Kammer, um die Thrombozyten auf 2×10^7 Zellen einzustellen. Anschließend wurden die Zellen in eine Mikrotiterplatte pipetiert, in die ebenfalls RGDW (Produkt: H-D-Arg-Gly-Asp-Trp-OH; Fa. Bachem, Feinchemikalien AG) bzw. NaCl hinzukam (Endkonzentration 1mM), um eine Aktivierung zu erreichen. Dieses Gemisch ließ man 5 min bei Raumtemperatur inkubieren, bevor 30 μl Abciximab (1mg/ml) bzw. NaCl hinzugegeben wurde. Dann erfolgte eine Inkubation bei Raumtemperatur für 30 min. Nach einer Zentrifugation von 1.200UpM für 90 Sekunden wurde erneut dreimal mit PBS/RA/ NaN_3 gewaschen, bevor 40 μl RAH-FITC hinzu pipetiert wurde. Hieran schloss sich eine 30-minütige Inkubation im Dunkeln bei 4°C. Es folgte die Messung am Durchflusszytometer.

4 Ergebnisse

4.1 Kollektive

Um dem Thema möglichst umfassend gerecht zu werden, wurden vier klinisch-definierte Patientengruppen und eine Kontrollgruppe vorgesehen. Für nachfolgend aufgeführte Untersuchungen bildeten wir fünf Kollektive, bestehend aus insgesamt 146 Personen. Die Seren dieser fünf Kollektive wurden unterschiedlichen Testverfahren (ELISA, MAIPA, Durchflusszytometer und Immunpräzipitation) unterzogen und miteinander verglichen.

4.1.1 Patientenkollektiv mit GPIIb/IIIa-Antagonisten induzierter Thrombozytopenie (Retrospektive Untersuchung)

4.1.1.1 Abciximab-induzierte Thrombozytopenie

Tabelle 6 8 Patienten, die unter einer Abciximabtherapie eine Thrombozytopenie entwickelten.

Pat.-Nr.	Name	Alter	Geschlecht	Diagnose	Intervention	Thro/nl vor	Thro/nl nach
1	H. W.	64	m	KHK	PTCA	120	2
2	M. M.	60	w	AMI	PTCA	227	11
3	J. F.	65	m	KHK	PTCA, Stent	169	22
4	G. W.	46	m	KHK	PTCA	418	1
5	J.-K. H.	68	m	KHK	PTCA	201	13
6	K.-H. K.	55	m	KHK	PTCA, Stent	185	4
7	W. O.	65	m	AMI	PTCA	260	50
8	K.-L. F.	73	m	AMI	PTCA	272	71
\bar{X}		62				231,5	21,8

Das erste Kollektiv, retrospektiv beobachtet, bestehend aus acht Patienten aus auswärtigen Krankenhäusern, erhielt aufgrund oben genannter Diagnosen bzw. Interventionen während des stationären Aufenthaltes Abciximab. Laborchemisch zeigte sich nach Erhalt des Medikamentes eine Thrombozytopenie, so dass eine Probe mit der Frage einer medikamentinduzierten Thrombozytopenie dem Institut für Immunologie und Transfusionsmedizin in Gießen zugesandt wurde.

Im klinischen Verlauf betrug die Thrombozytenzahl vor der Abciximabgabe 120.000/ μ l-418.000/ μ l. Der tiefste Punkt wurde mit folgenden Plättchenzahlen registriert: 1.000/ μ l-71.000/ μ l. Innerhalb von ≤ 1 Tag nach Gabe des Medikamentes entwickelten die Patienten eine Thrombozytopenie, wobei die Thrombozytenzahl nach 2-5 Tagen wieder $>100.000/\mu$ l stieg.

An eine HIT und eine Pseudothrombozytopenie als mögliche Differentialdiagnosen wurde gedacht und mittels HIPA, Plättchenfaktor 4-ELISA und Blutausstrich ausgeschlossen. Bei Einnahme weiterer Medikamente (ASS, Tiklid, Sortis, Ticlopidin, etc.) konnten für diese im ELISA keine Antikörper gefunden werden.

4.1.1.1.1 Klinischer Verlauf vs. direkter MAIPA

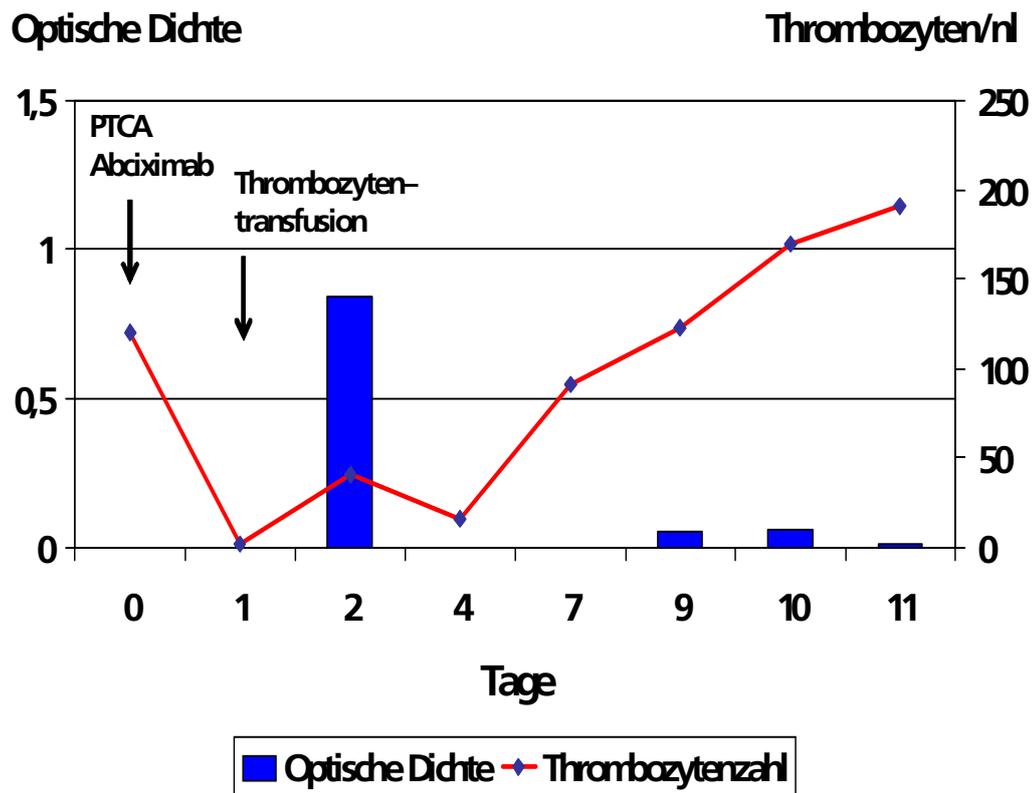


Abbildung 1 Individueller Thrombozytenverlauf vs. direkter MAIPA.
Individueller Thrombozytenverlauf des Patienten H.W., verglichen mit der Thrombozyten-Antikörperbelastung anhand des MAIPA, nach Abciximabtherapie.

Exemplarisch der Thrombozytenverlauf über 11 Tage bei einem Patienten (H.W.) der oben acht erwähnten. Im Rahmen einer PTCA erhielt der Patient H.W. das Medikament Abciximab, wodurch es innerhalb eines Tages zu einer schweren Thrombozytopenie ($<2.000/\mu\text{l}$) kam. Eine bestehende Blutungsneigung machte eine Thrombozytentransfusion erforderlich. Am 2. Tag nach der Abciximab-Gabe und während des Thrombozytopeniezeitpunktes konnte im direkten MAIPA eine starke Antikörperbelastung auf den Thrombozyten nachgewiesen werden. An den darauffolgenden Tagen normalisierte sich die Thrombozytenzahl wieder und gleichzeitig lässt die Antikörperbesetzung auf den Thrombozyten nach bzw. ist kaum noch nachweisbar.

4.1.1.2 Tirofiban-induzierte Thrombozytopenie

Tabelle 7 3 Patienten, die unter einer Tirofibantherapie eine Thrombozytopenie entwickelten.

Pat-Nr.	Name	Alter	Geschlecht	Diagnose	Intervention	Thr/nl vor	Thr/nl nach
1	E. K.	72	w	AMI	PTCA, Stent	259	16
2	U. S.	49	m	KHK	PTCA, Stent	310	31
3	H. B.	71	m	KHK		323	7
\bar{X}		64				279,3	18

Bei drei Patienten, retrospektiv beobachtet, die im Rahmen einer PTCA bzw. Stentimplantation den Thrombozytenaggregationshemmer Tirofiban erhielten, fiel die Thrombozytenzahl innerhalb von 12 Stunden–2 Tagen auf den Tiefstwert mit 7.000–31.000/ μ l. Bis zur Normalisierung mit einer Plättchenzahl >100.000/ μ l dauerte es ca. 4 Tage.

Der Patient U.S. erhielt im Abstand von 11 Tagen zum zweiten Mal das Medikament Tirofiban, wobei es bei der ersten Exposition zu keiner Thrombozytopenieentwicklung kam.

4.1.1.3 Eptifibatid-induzierte Thrombozytopenie

Tabelle 8 2 Patienten, die unter einer Eptifibatidtherapie eine Thrombozytopenie entwickelten.

Pat.-Nr.	Name	Alter	Geschlecht	Diagnose	Intervention	Thr/nl vor	Thr/nl nach
1	A.S.	68	w	KHK		310	0
2	H.S.	64	w	Instabile Angina	PTCA, Stent	196	29
\bar{x}		66				253	14,5

Zwei Patienten zeigten unter Eptifibatidgabe innerhalb eines Tages einen Thrombozytenabfall auf 0–29.000/ μ l. Die Thrombozytenzahl stieg innerhalb von 4 Tagen wieder auf über 100.000/ μ l. Trotz gleichzeitiger Heparin-gabe konnte dies als Ursache der Thrombozytopenie durch HIPA bzw. Plättchenfaktor 4-ELISA ausgeschlossen werden.

4.1.2 Patientenkollektiv mit Herzkatheteruntersuchung (Prospektive Untersuchung)

33 Patienten (26 männlich, 7 weiblich; Alter: 41–78 Jahre) der Medizinischen Klinik II im Universitätsklinikum Gießen, die im Rahmen einer Herzkatheteruntersuchung 1998/99 das Medikament Abciximab erhielten, wurden prospektiv auf einen Thrombozytenabfall und Antikörper im Serum hin untersucht. Hierzu wurde vor Abciximab-Gabe das Serum der Patienten auf Antikörper untersucht und nach Medikamentengabe die Entwicklung einer eventuell auftretenden Thrombozytopenie laborchemisch verfolgt.

Die Dosis und die Dauer der Abciximabgabe wurden ebenfalls in Hinblick auf eine mögliche Thrombozytopenieentwicklung berücksichtigt.

Eine Übersicht über die demographischen Daten und die Laborparameter dieser Studienpatienten gibt die Tabelle 9 wieder.

Tabelle 9 33 Patienten aus der Medizinischen Klinik II im Universitätsklinikum Gießen, die im Rahmen einer Herzkatheteruntersuchung 1998/1999 das Medikament Abciximab erhielten.

Name	Alter	Geschlecht	Diagnose	Intervention	i.v.-Dosis	Thrombozyten vor Medikamentengabe	Thrombozytentiefpunkt	Thrombozytennormalisierung	Thrombozytenabfall, um
K. V.	69	w	KHK, AMI	PTCA, Stent	12h-Inf.	436.000/ μ l	Nach 2-3 Std.: 15.000/ μ l	Nach 20 Std.: 391.000/ μ l	97%
D. B.	77	w	KHK, AMI	PTCA, Stent	20mg	278.000/ μ l	Nach 43 Std.: 142.000/ μ l	Nach 4 Tagen: 204.000/ μ l	49%
E. B.	72	m	KHK AMI	PTCA, Stent	30mg, 12h-Inf.	174.000/ μ l	Nach 4 Std.: 242.000/ μ l		0%
F. P.	73	m	KHK, AMI	PTCA-Dilatation	20mg	134.000/ μ l	Nach 3 Tagen: 59.000/ μ l	Nach 7 Tagen: 143.000/ μ l	56%
E. W.	68	m	KHK	Angiographie		174.000/ μ l	Nach 10 Std.: 188.000/ μ l		0%
W. L.	49	m	KHK	PTCA, Stent	20mg, 12h-Inf.	304.000/ μ l	Nach 6 Std.: 224.000/ μ l	Nach 3 Tagen: 314.000/ μ l	26%
E. K.	71	m	KHK, AMI	PTCA, Stent und Dilatation	20mg	148.000/ μ l	Nach 1 Tag: 59.000/ μ l		60%
I. B.	73	w	KHK	PTCA, Stent,		253.000/ μ l	Nach 43 Std.: 88.000/ μ l	Nach 4 Tagen: 151.000/ μ l	65%
H. K.	58	m	KHK	PTCA, Stent	20mg, 12h-Inf.	266.000/ μ l	Nach 1 Tag: 121.000/ μ l		55%
J. G.	65	w	KHK	PTCA, Stent		265.000/ μ l	Nach 1 Tag: 29.000/ μ l	Nach 4 Tagen: 122.000/ μ l	89%
U. E.-K.	43	w	KHK	Angiographie, PTCA, Stent	18mg, 12h-Inf.	137.000/ μ l	Nach 22 Std.: 95.000/ μ l	Nach 48 Std.: 122.000/ μ l	31%

W. J.	64	m	KHK,	PTCA, Stent		228.000/µl	Nach 9 Std.: 206.000/µl		10%
H. S.	52	m	KHK, AMI	PTCA, Dilatation	20mg, 12h-Inf.	249.000/µl	Nach 1 Tag: 228.000/µl		8%
B. M.	58	m	KHK, AMI	PTCA, Stent	20mg, 12h-Inf.	192.000/µl	Nach 1 Tag: 161.000/µl		16%
H. K.	73	m	KHK	PTCA, Stent	10mg	175.000/µl	Nach 2 Tagen: 99.000/µl		43%
H. P.	73	m	KHK, AMI	PTCA, Stent	18mg, 12h-Inf.	161.000/µl	Nach 1 Tag: 121.000/µl	Nach 2 Tagen: 135.000/µl	25%
E. H.	77	m	KHK	PTCA	20mg	256.000/µl	Nach 1 Tag: 205.000/µl	Nach 6 Tagen: 283.000/µl	20%
L. B.	77	w	KHK, AMI	PTCA, Stent	16mg	340.000/µl	Nach 1 Tag: 293.000/µl	Nach 3 Tagen: 352.000/µl	14%
M. V.	54	m	KHK, AMI	PTCA, Stent	20mg	232.000/µl	Nach 1 Tag: 149.000/µl	Nach 2 Tagen: 195.000/µl	36%
F. G.	61	m	KHK, AMI	PTCA, Stent	20mg, 12h-Inf.	190.000/µl	Nach 1 Tag: 171.000/µl	Nach 2 Tagen: 218.000/µl	10%
B. M.	52	m	KHK, AMI	PTCA, Stent	10mg, 12h-Inf.	292.000/µl	Nach 1 Tag: 279.000/µl	Nach 4 Tagen: 294.000/µl	5%
K. H.	59	m	KHK, AMI	PTCA, Stent	20mg	286.000/µl	Nach 2 Tagen: 249.000/µl		13%
E. S.	63	m	KHK, AMI	Angiographie	20mg, 12h-Inf.	280.000/µl	231.000/µl	Nach 1 Tag: 318.000/µl	18%
E. B.	78	m	KHK, AMI	PTCA, Stent	18mg	222.000/µl	Nach 2 Tagen: 185.000/µl	Nach 4 Tagen: 219.000/µl	17%

W. L.	75	m	KHK	PTCA, Stent	20mg, 12h-Inf.	108.000/ μ l	Nach 1 Tag: 63.000/ μ l	Nach 6 Tagen: 145.000/ μ l	42%
E. R.	68	w	KHK, AMI	PTCA, Stent	20mg, 12h-Inf.	200.000/ μ l	161.000/ μ l	Nach 2 Tagen: 190.000/ μ l	20%
K. M.	73	m	KHK, AMI	PTCA, Stent	19mg, 12h-Inf.	249.000/ μ l	Nach 1 Tag: 171.000/ μ l	Nach 2 Tagen: 215.000/ μ l	31%
H. M.	55	m	KHK, AMI	PTCA, Stent	15mg, 12h-Inf.	356.000/ μ l	281.000/ μ l	Nach 1 Tag: 319.000/ μ l	21%
E. K.	78	m	KHK	PTCA, Stent	20mg, 12h-Inf.	134.000/ μ l	Nach 1 Tag: 109.000/ μ l	Nach 4 Tagen: 133.000/ μ l	19%
W. S.	63	m	KHK, AMI	PTCA, Stent	20mg, 12h-Inf.	164.000/ μ l	144.000/ μ l	Nach 2 Tagen: 170.000/ μ l	12%
W. R.	61	m	KHK, AMI	PTCA, Dilatation		203.000/ μ l	Nach 1 Tag: 169.000/ μ l	Nach 3 Tagen: 183.000/ μ l	17%
I. D.	41	m	KHK, AMI	PTCA, Stent	20mg, 12h-Inf.	221.000/ μ l	177.000/ μ l	Nach 1 Tag: 230.000/ μ l	20%
B. E.	55	m	KHK, AMI	PTCA, Stent	10mg	253.000/ μ l	Nach 1 Tag: 228.000/ μ l		10%
\bar{X}	64,5					229.000/μl	162.000/μl		30%

4.1.3 Kontrollkollektiv (Prospektive Untersuchung)

100 gesunde Blutspender (63 männlich, 37 weiblich; Alter: 19–69 Jahre) dienten als Kontrollkollektiv. Die Individuen dieser Gruppe sind niemals zuvor mit einem GPIIb/IIIa-Antagonisten (Abciximab, Tirofiban und/oder Eptifibatid) behandelt worden.

4.2 Nachweis und Charakterisierung von Abciximab-abhängigen Antikörpern bei Patienten mit Abciximab-induzierter Thrombozytopenie

4.2.1 ELISA

Serologische Untersuchungen des aus dem Abciximab-Kollektiv (siehe Tabelle 6) stammenden Patienten (H.W.) verdeutlichen, dass Abciximab-abhängige Antikörper im Thrombozytenbindungstest nur in Anwesenheit von Abciximab nachweisbar sind und nicht in Anwesenheit eines anderen mAk gegen den Glykoproteinkomplex IIb/IIIa (mAk Gi5).

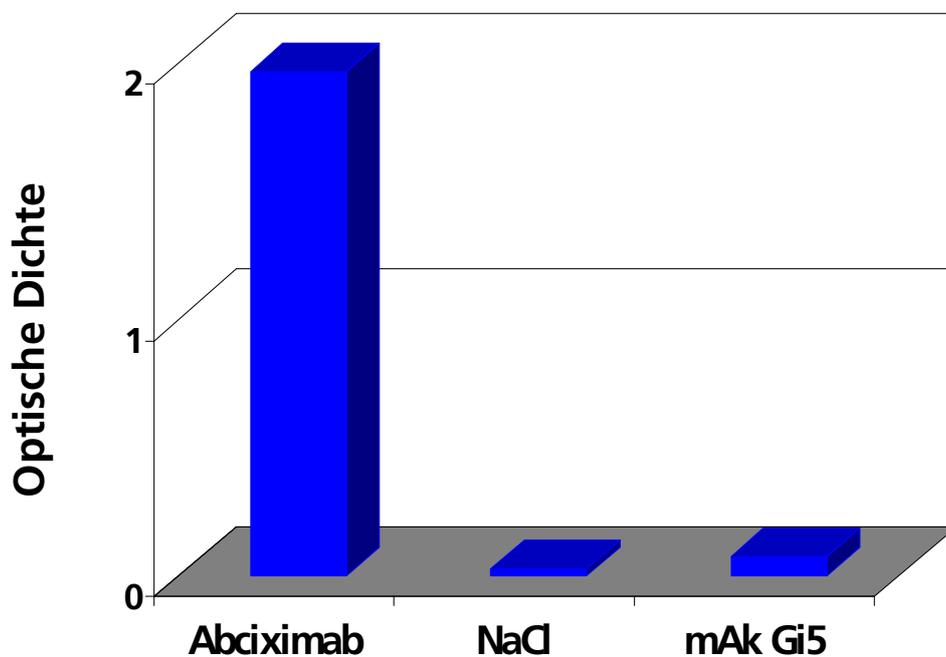


Abbildung 2 ELISA-Test für Abciximab-abhängige Antikörper. Der ELISA-Test verdeutlicht, dass Abciximab-abhängige Antikörper nur nach Vorinkubation mit Abciximab mit dem GPIIb/IIIa reagieren.

4.2.2 Durchflusszytometer

Darüber hinaus findet man im Serum des gleichen Patienten (H.W.) auf paraformaldehydfixierten Thrombozyten Abciximab-abhängige Antikörper. Die Graphik, mit der x-Achse zur Ermittlung der Fluoreszenzintensität und der y-Achse, die die Anzahl der Ereignisse widerspiegelt, veranschaulicht mit einem stärkeren Signal rechts auf der x-Achse unter Hinzugabe von Abciximab, dass es zu einer vermehrten Antikörperbeladung an den GPIIb/IIIa-Komplex kommt.

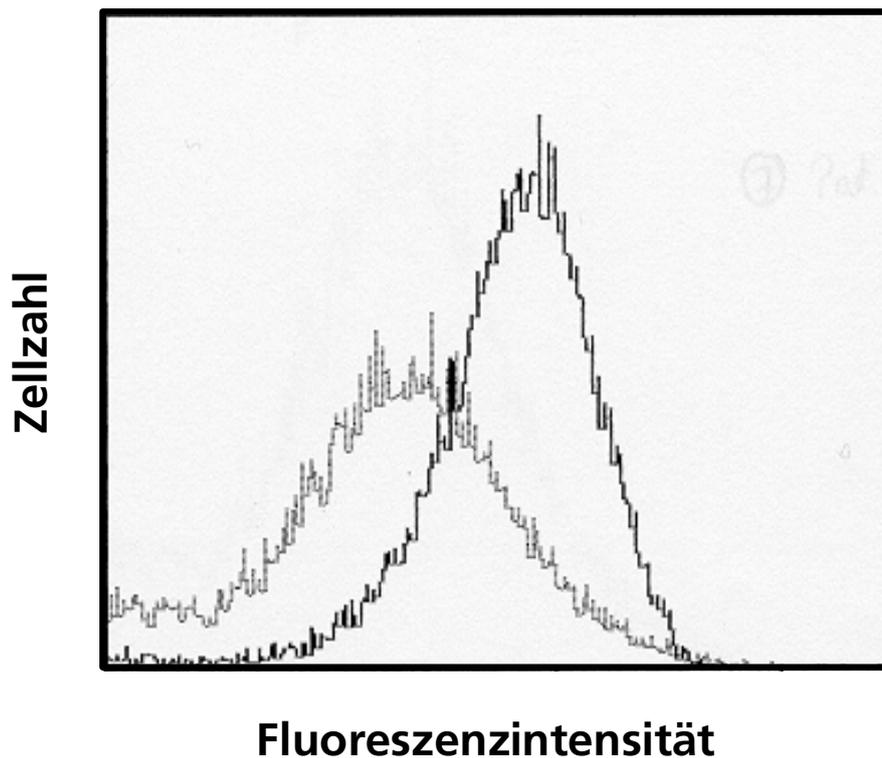


Abbildung 3 Durchflusszytometrische Thrombozytenanalyse (Abciximab).
Durchflusszytometrische Analyse der Thrombozyten. Die Thrombozyten werden anhand der plättchenspezifischen Immunreaktion und ihres charakteristischen Streulichtverhaltens identifiziert. Danach wird die Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Hinzugabe von Abciximab (links ohne Abciximab; rechts mit Abciximab) anhand des Patientenserums H.W. analysiert. Deutlich ist eine Zunahme der Fluoreszenzintensität unter Abciximab zu erkennen.

4.2.3 Immunpräzipitation

In einer weiteren Nachweismethode, der Immunpräzipitation, ist zu erkennen, dass nur der Glykoproteinkomplex präzipitiert wurde, an den der Abciximab-abhängige Antikörper, unter Hinzugabe des Medikamentes, zuvor gebunden hatte. Die Proben wurden durch Gelelektrophorese aufgetrennt.

Somit ist neben den zwei positiv ausfallenden Kontrollen (Bande 1 & Bande 2) nur die Bande 3, bei einem relativen Molekulargewicht von etwa 160 kDa, entsprechend den beiden Untereinheiten GPIIb und GPIIIa des Integrins auf humanen Thrombozyten, sichtbar.

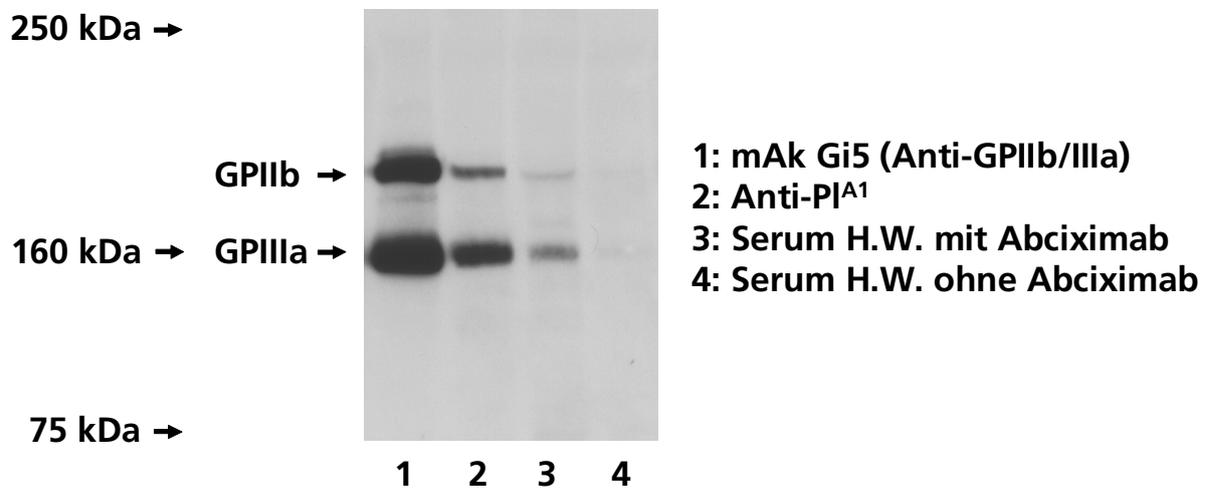


Abbildung 4 Immunpräzipitation. Trennung von Proteinmolekülen durch Polyacrylamid-Elektrophorese in Banden verschiedener Molekulargewichte, anschließender Antigentransfer auf Nitrozellulosemembran und Reaktion mit enzymatisch oder radioaktiv markierten Anti-Antikörpern, wodurch die gesuchten Antigenbanden sichtbar gemacht werden. Fehlende Bandendarstellung in Abwesenheit von Abciximab.

4.2.4 Indirekter / Direkter MAIPA

Auch mittels indirekter bzw. direkter MAIPA konnte in der retrospektiven Gruppe, der durch Abciximab-induzierten Thrombozytopenien, eine Antikörperbeladung auf autologen Thrombozyten bzw. medikament-abhängige Antikörper belegt werden.

4.2.4.1 Indirekter MAIPA

In Abbildung 5 ist eine stärkere Antikörperantwort im indirekten MAIPA, der dem Nachweis von zirkulierenden Antikörpern dient, unter der Zugabe von Abciximab im Vergleich zur Testung mit NaCl 0,9% zu erkennen. In allen 8 Seren zeigte sich, in unterschiedlicher Weise, ausschließlich und nur bei Vorinkubation mit Abciximab eine Antikörperantwort.

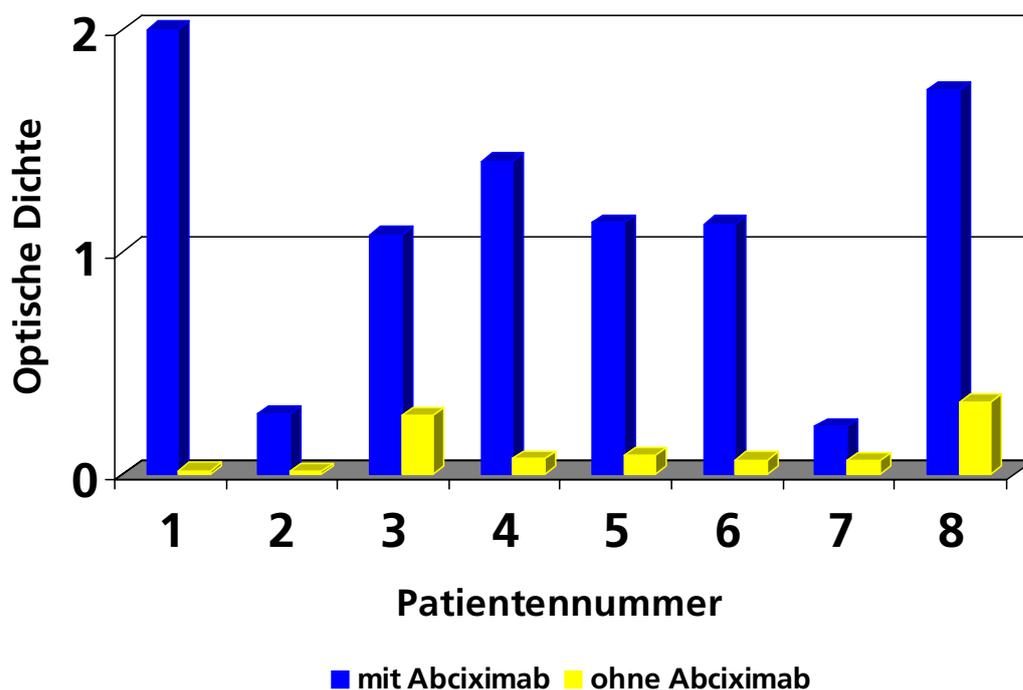


Abbildung 5 Antikörpertiter der Abciximab-abhängigen Antikörper. Antikörpertiter, getestet im indirekten MAIPA, im Vergleich mit und ohne Abciximab, bei 8 Patienten mit nachweislicher Thrombozytopenie nach Abciximabtherapie (Kollektiv 4.1.1.1). Nur bei Vorinkubation mit Abciximab zeigt sich eine Antikörperantwort.

4.2.4.2 Direkter MAIPA

Ergänzend kann aus dem Balkendiagramm entnommen werden, dass die Antikörper an den GPIIb/IIIa-Komplex und nicht an den GPIb/IX-Komplex binden. Die IgG-Beladung der Glykoproteinkomplexe Ib/IX lag immer im Normbereich.

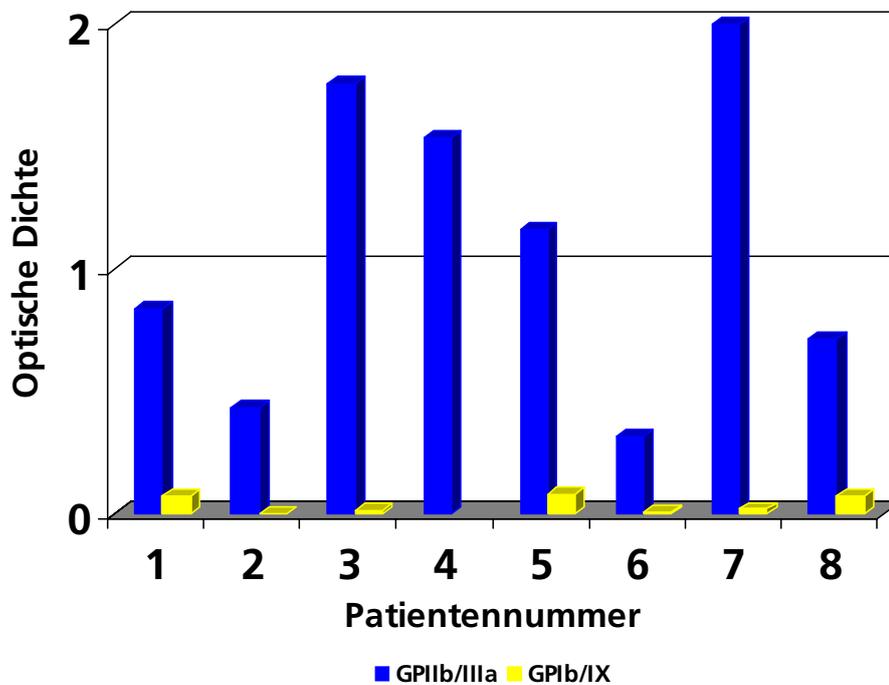


Abbildung 6 Bindungsverhalten der Abciximab-abhängigen Antikörper (Kollektiv 4.1.1.1). Ausschließliche Bindung an den GPIIb/IIIa-Komplex.

4.2.5 Immunglobulinklasse(n) der Abciximab-abhängigen Antikörper

Um die Frage zu klären um welche Immunglobulinklasse(n) es sich bei den Patienten mit einer Abciximab-induzierten Thrombozytopenie handelt, wurden die Seren im indirekten MAIPA überprüft. Deutlich lässt sich erkennen, dass neben IgM und IgA, überwiegend IgG-Antikörper, als Antikörper der sekundären Immunantwort, daran beteiligt sind.

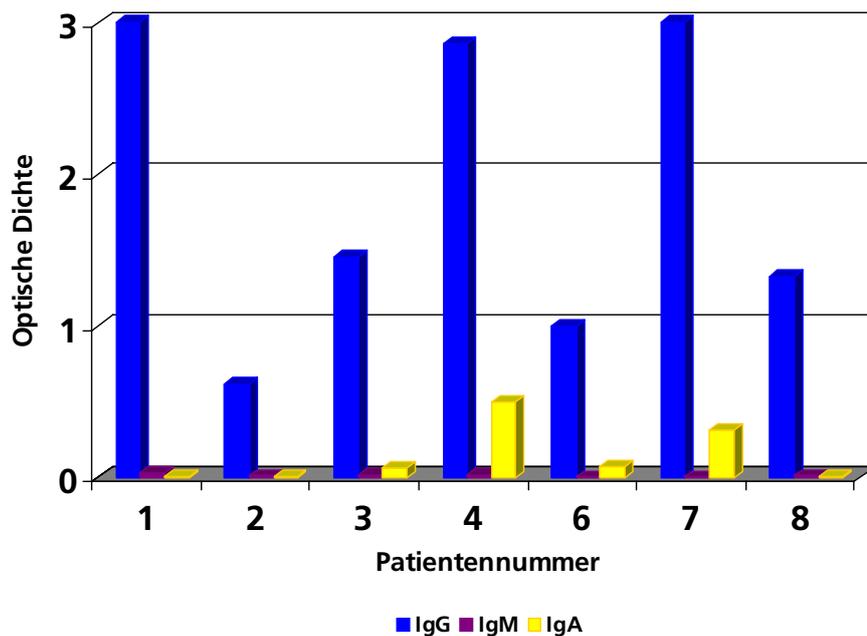


Abbildung 7 Immunglobulinklasse(n). Abciximab-abhängige Antikörper, bei Patienten mit einer Thrombozytopenieentwicklung (siehe Kollektiv 4.1.1.1), wurden mittels indirektem MAIPA auf ihre jeweilige Immunglobulinklasse(n) untersucht. Nachweis von überwiegend Immunglobulinklasse IgG.

4.2.6 Immunglobulinklasse(n) der präformierten Antikörper (Kontrollkollektiv)

Die gesunden Spenderseren mit Antikörpernachweis wurden ebenfalls im indirekten MAIPA mit Streptavidin getestet, um die vorliegende Immunglobulinklasse der präformierten Antikörper herauszufinden, die für die Thrombozytopenie verantwortlich sein könnte. Offensichtlich scheint hauptsächlich die IgG-Klasse und nicht die IgM-Klasse daran teilzuhaben. Die Prävalenz der präformierten Antikörper gegen Tirofiban und Eptifibatid ist beträchtlich niedriger als gegen Abciximab (3% vs. 1% vs. 40%).

Tabelle 10 Immunglobulin-Häufigkeitsverteilung im Spenderkollektiv.

n=100	IgG	IgM	IgA
Abciximab	40	0	3
Tirofiban	3	n.u.	n.u.
Eptifibatid	1	n.u.	n.u.

4.2.7 Bindungslokalisation der Abciximab-induzierten Antikörper auf Thrombozyten/CHO-Zellen

Mit Hilfe von verschiedenen monoklonalen Antikörpern (Gi16, Gi5, P2 und SZ21), eingesetzt im MAIPA-Test, ist es möglich, die Bindungs-Epitope der Abciximab-induzierten Antikörper zu detektieren. Nicht nur auf Thrombozyten, sondern auch auf CHO-Zellen, ist der medikament-abhängige Antikörper nicht durch den monoklonalen Antikörper P2 nachweisbar. P2-Antikörper und Abciximab binden an derselben Stelle; somit findet eine Konkurrenz um das Epitop statt.

Es ist kein Unterschied im Bindungsverhalten der Antikörper bei Thrombozyten oder CHO-Zellen zu erkennen.

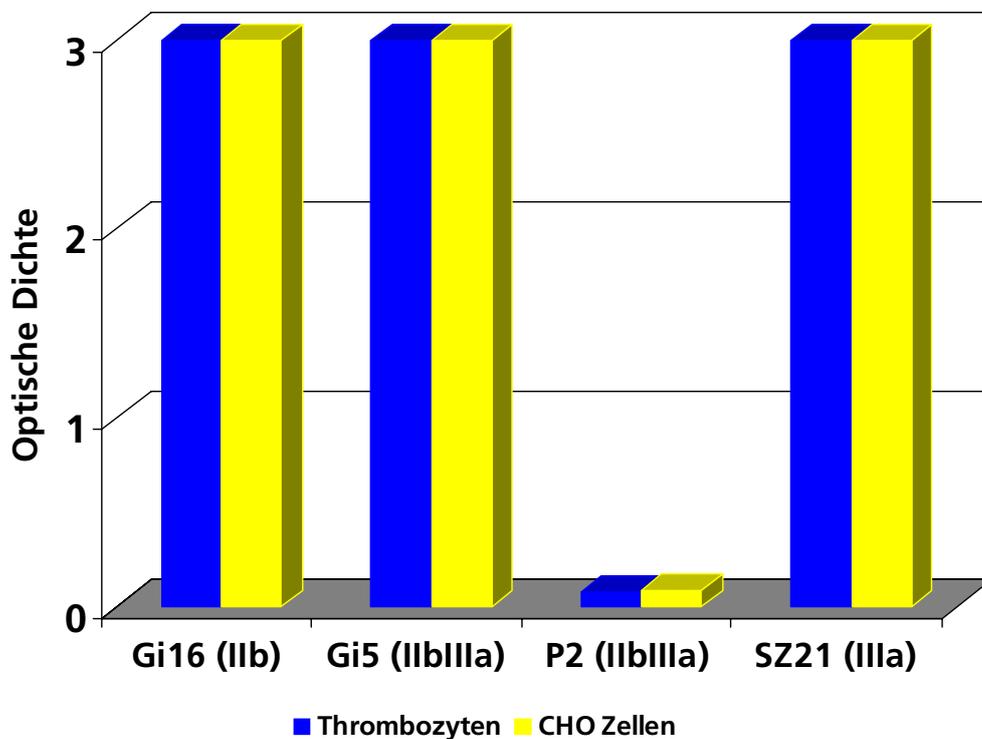


Abbildung 8 Bindungsunterschiede der Abciximab-abhängigen Antikörper auf Thrombozyten oder CHO-Zellen (= transfizierte Zelllinien). Der Abciximab-abhängige Antikörper zeigt in seinem Bindungsverhalten keinen Unterschied zwischen Thrombozyten oder CHO-Zellen. Kein Nachweis der Abciximab-abhängigen Antikörper bei Hinzugabe des mAK P2.

4.2.8 Bindungsverhalten in Abhängigkeit vom GPIIb/IIIa-Polymorphismus

Mittels durchflusszytometrischer Untersuchungen machen die aufgeführten Histogramme deutlich, dass das Bindungsverhalten der medikament-abhängigen Antikörper, sowohl bei der erkrankten Person (Patient H.W.; Kollektiv 4.1.1.1), als auch bei der Kontrollperson (Spender X.M.), unabhängig vom genetischen GPIIb/IIIa-Polymorphismus (PI^{A1}/PI^{A1} ; PI^{A2}/PI^{A2}) ist.

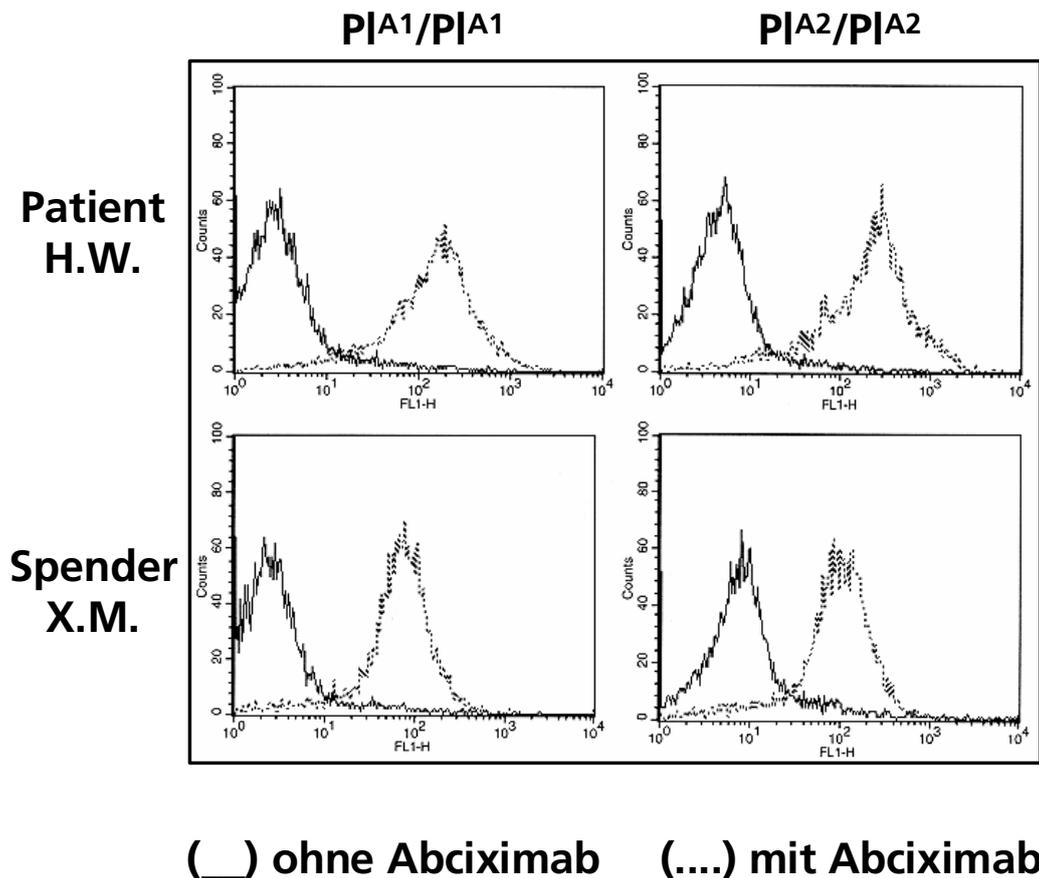


Abbildung 9 Das Bindungsverhalten der medikament-abhängigen Antikörper bei den unterschiedlichen Genotypen der menschlichen Thrombozyten (PI^{A1}/PI^{A1} ; PI^{A2}/PI^{A2}). Der GPIIb/IIIa-Polymorphismus beeinflusst das Bindungsverhalten der Abciximab-abhängigen Antikörper weder bei gesunden Spendern (= Kontrollpersonen), noch bei Patienten mit einer Abciximab-induzierten Thrombozytopenie.

4.2.9 Bindungsverhalten der Abciximab-abhängigen Antikörper (in Abhängigkeit des Aktivierungszustand des Glykoproteinkomplex)

Um die Frage zu klären, ob der Funktionszustand (ruhender bzw. inaktiverer Rezeptorkomplex und aktivierter hochaffiner Funktionszustand) des Glykoproteinrezeptors einen Einfluss auf das Bindungsverhalten hat, und somit unter Umständen die entdeckten Antikörper lediglich an aktivierten Thrombozyten binden und damit nachweisbar sind, wurden im Durchflusszytometer IIb/IIIa-exprimierende CHO-Zellen eingesetzt, die mit RGDW gezielt aktiviert wurden. Das Integrin IIb/IIIa auf den transfizierten CHO-Zellen kann nicht aus dem Zellinneren selbst aktiviert werden und bindet lösliches Fibrinogen in der gleichen Weise wie physiologisch aktivierte Thrombozyten [142].

Es ist ersichtlich, dass Abciximab-abhängige Antikörper mit aktivierten bzw. nicht aktivierten CHO-Zellen in der gleichen Weise reagieren. Bei Verwendung des Patientenserums H.W. und des Spenderserums X.M. wurde beobachtet, dass durch Zugabe des Medikamentes es zur nahezu gleichen Rechtsverschiebung auf der Abszisse kommt, egal ob die Plättchen zuvor durch RGDW aktiviert wurden oder nicht. Die Antikörperantwort ist bei aktivierten wie nichtaktivierten nahezu gleich.

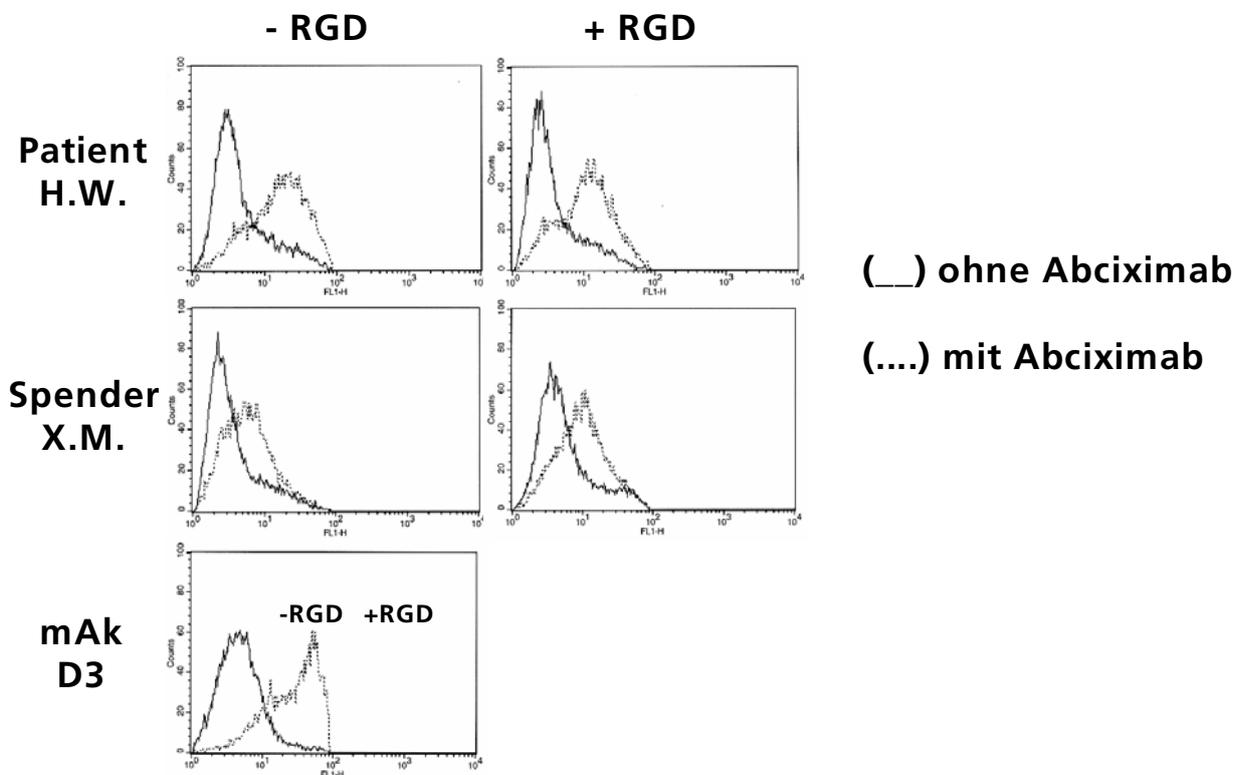


Abbildung 10 Bindungsverhalten der Abciximab-abhängigen Antikörper in Abhängigkeit vom Aktivierungszustand des Glykoproteinkomplex IIb/IIIa. Die Bindung des Abciximab-abhängigen Antikörper von Patienten und gesunden Kontrollpersonen (Spendern) wird nicht durch den Aktivierungszustand des GPIIb/IIIa-Komplex beeinflusst.

4.3 Nachweis und Charakterisierung von Tirofiban-/Eptifibatid-abhängigen Antikörpern bei Patienten mit Tirofiban-/Eptifibatid-induzierter Thrombozytopenie

4.3.1 Tirofiban

4.3.1.1 Durchflusszytometer

Es zeigte sich, wie auch in dem ersten Kollektiv mit Abciximab, dass unter Hinzugabe von Tirofiban auf den Thrombozyten im Durchflusszytometer eine verstärkte Antikörperbeladung zu finden ist. Links auf der Abszisse ohne Hinzugabe von Tirofiban, rechts mit Tirofiban.

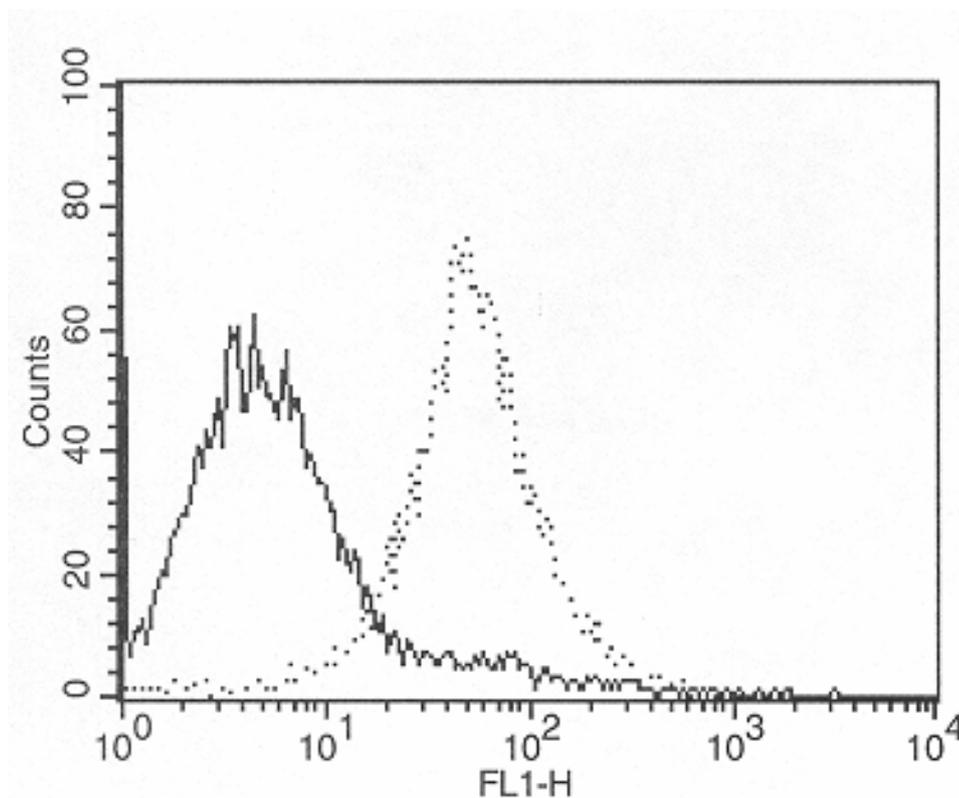


Abbildung 11 Durchflusszytometrische Thrombozytenanalyse (Tirofiban). Dargestellt ist die Fluoreszenzintensität (x-Achse) in Bezug zur gezählten Zellzahl (Counts 1–100; y-Achse). Zunahme der Fluoreszenzintensität unter Hinzugabe von Tirofiban.

4.3.1.2 Epitopenmapping der Tirofiban-abhängige Antikörper (Patienten- vs. Kontrollkollektiv)

Tirofiban-abhängige Antikörper der Patienten (E.K.;U.S.;H.B.), die eine Thrombozytopenie entwickelten und diejenigen aus dem gesunden Kontrollkollektiv (J.H.;C.D.;W.U.), binden an unterschiedliche Epitope auf dem GPIIb/IIIa-Komplex. Es existiert kein einheitliches Epitop. Die Epitope der medikament-abhängigen Antikörper gegen verschiedene GPIIb/IIIa-Antagonisten sind heterogen. Der Antikörper P2 (IIbIIIa) z.B. reagiert bei diesen 6 Patienten in unterschiedlicher Weise, besonders bei dem Patienten U.S., so dass man von einem unterschiedlichen Bindungsepitop ausgehen muss.

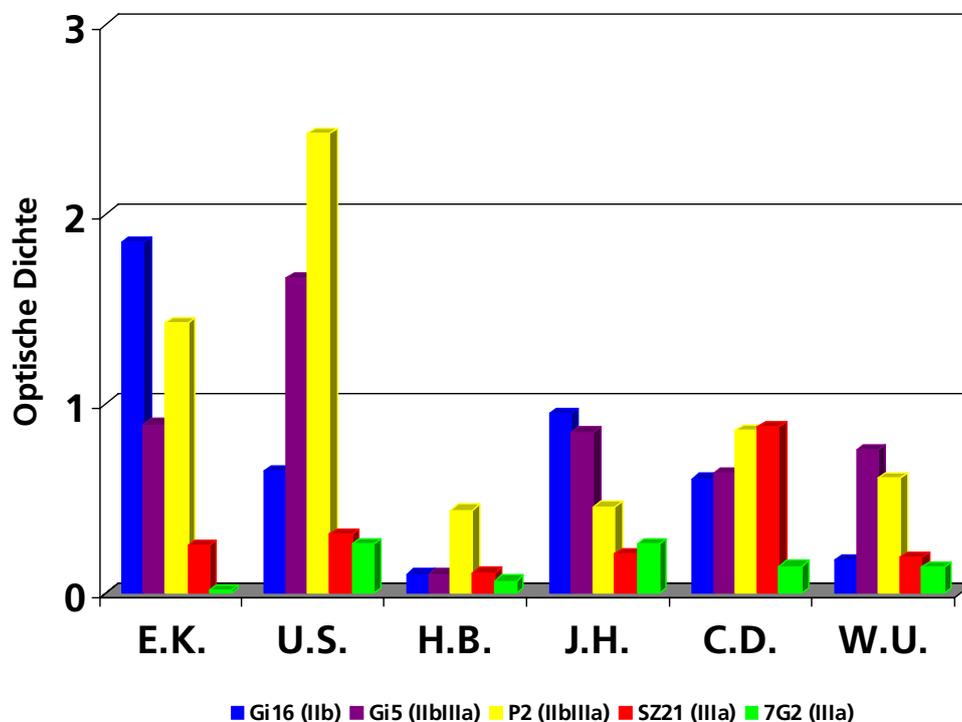


Abbildung 12 Epitopenmapping für Tirofiban-abhängige Antikörper (Patienten- [E.K.;U.S.;H.B.] und Kontrollkollektiv [J.H.;C.D.;W.U.]). Heterogenes Bindungsverhalten der Tirofiban-abhängigen Antikörper an den unterschiedlichen Epitopen.

4.3.2 Eptifibatid

4.3.2.1 Durchflusszytometer

Doch nicht nur mit dem Thrombozytenaggregationshemmer Abciximab und Tirofiban, sondern auch mittels Eptifibatid, lässt sich eine vermehrte Antikörperantwort im Durchflusszytometer darstellen.

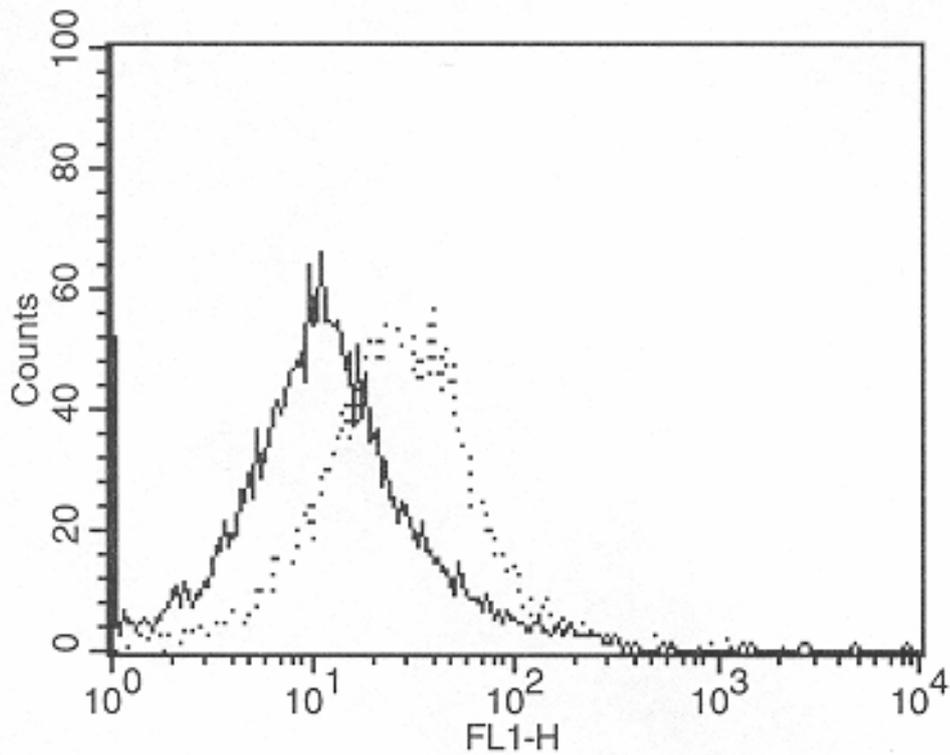


Abbildung 13 Durchflusszytometrische Thrombozytenanalyse (Eptifibatid). Dargestellt ist die Fluoreszenzintensität (x-Achse) in Bezug zur gezählten Zellzahl (Counts 1–100; y-Achse). Zunahme der Fluoreszenzintensität unter Hinzugabe von Eptifibatid.

4.3.2.2 ELISA

Der Med.-ELISA unterstützt vorangehende Ergebnisse, indem er beweist, dass die vorliegenden Patienten des dritten Patientenkollektivs, bei Zugabe von Eptifibatid eine stärkere Antwort aufweisen, als ohne. Die gleiche Beobachtung konnte man bei Abbildung 2, hier allerdings für Abciximab-abhängige Antikörper, machen.

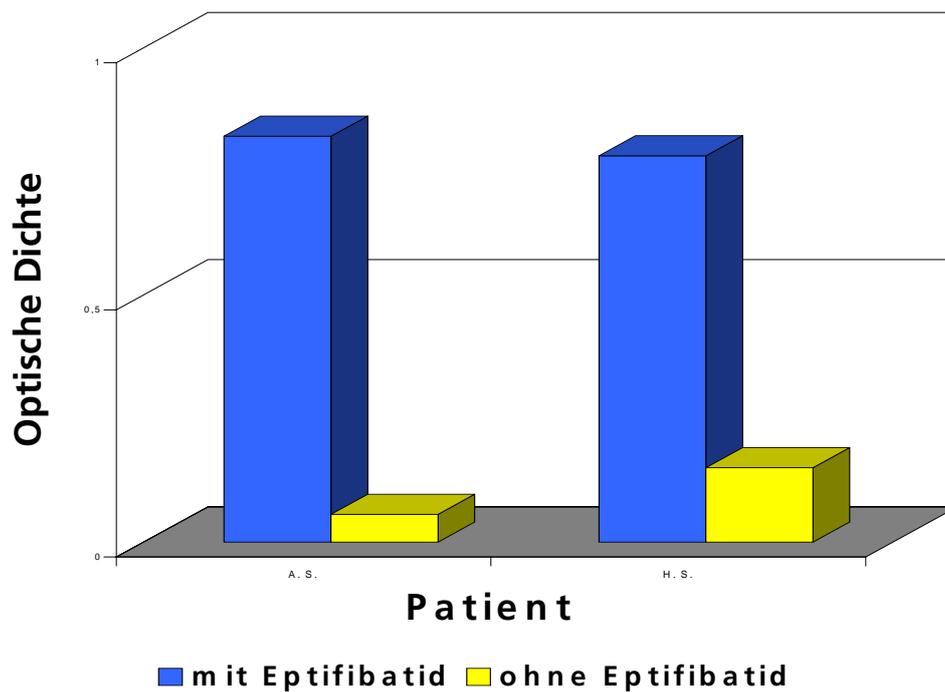


Abbildung 14 ELISA-Test für Eptifibatid-abhängige Antikörper. Bei beiden Patienten, die nach einer Eptifibatidtherapie eine Thrombozytopenie entwickelten, lassen sich in Gegenwart des Medikamentes Eptifibatid medikament-abhängige Antikörper nachweisen.

4.4 Vergleich: Abciximab-, Tirofiban- und Eptifibatid-abhängige Antikörper (Patientenkollektiv)

4.4.1 Epitopenmapping

Die medikament-abhängigen Antikörper, die gegen den GPIIb/IIIa-Komplex gerichtet sind, benutzen unterschiedliche Epitope auf der Thrombozytenoberfläche. Lediglich Abciximab-abhängige Antikörper sind durch den Antikörper P2 auf den Thrombozyten nicht nachweisbar.

Das Säulendiagramm zeigt variable Bindungslokalisationen der einzelnen medikament-abhängigen Antikörper innerhalb einer Antikörpergruppe und im Vergleich der drei Antikörper miteinander.

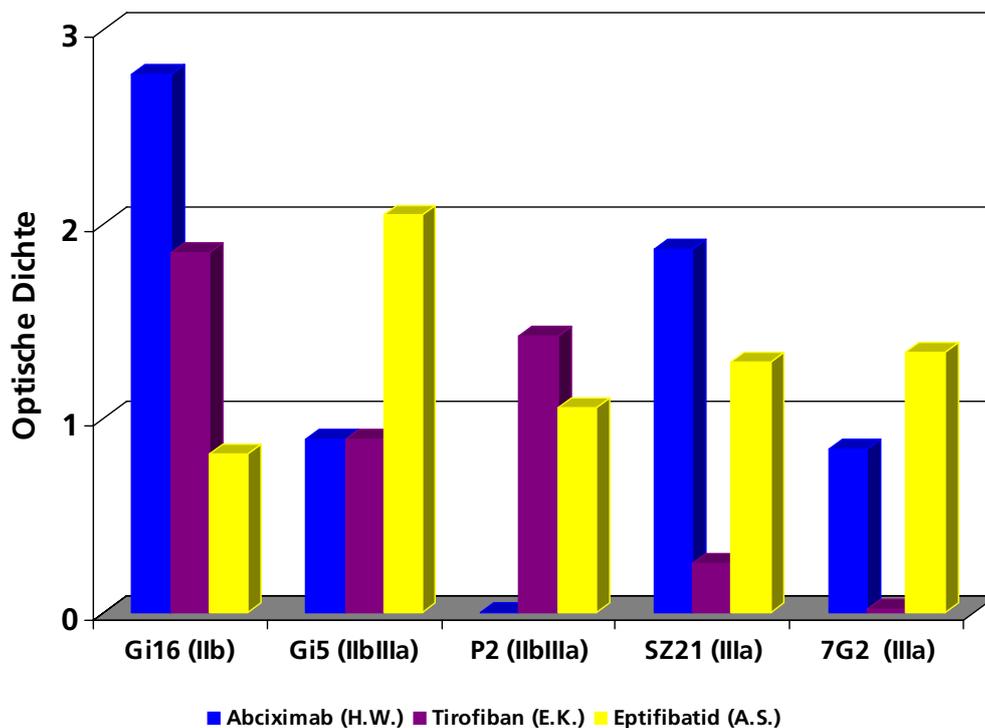


Abbildung 15 Epitopenmapping für Abciximab-, Tirofiban- und Eptifibatid-abhängige Antikörper (Patientenkollektiv). Heterogenes Bindungsverhalten der einzelnen medikament-abhängigen Antikörper innerhalb einer Antikörpergruppe und im Vergleich untereinander.

4.4.2 Kreuzreaktionen

Neben dem Polymorphismus und den unterschiedlichen Bindungsepitopen ist es auch von Interesse, ob Kreuzreaktionen zwischen den einzelnen Thrombozytenaggregationshemmern vorkommen.

Keiner der Antikörper reagiert mit Thrombozyten, die mit einem der beiden anderen Medikamente beladen sind. Diese Antikörper scheinen damit spezifisch für das Medikament zu sein, es gibt keine Kreuzreaktionen mit anderen GPIIb/IIIa-Inhibitoren, und es wird keine Antikörper-Bindung verhindert.

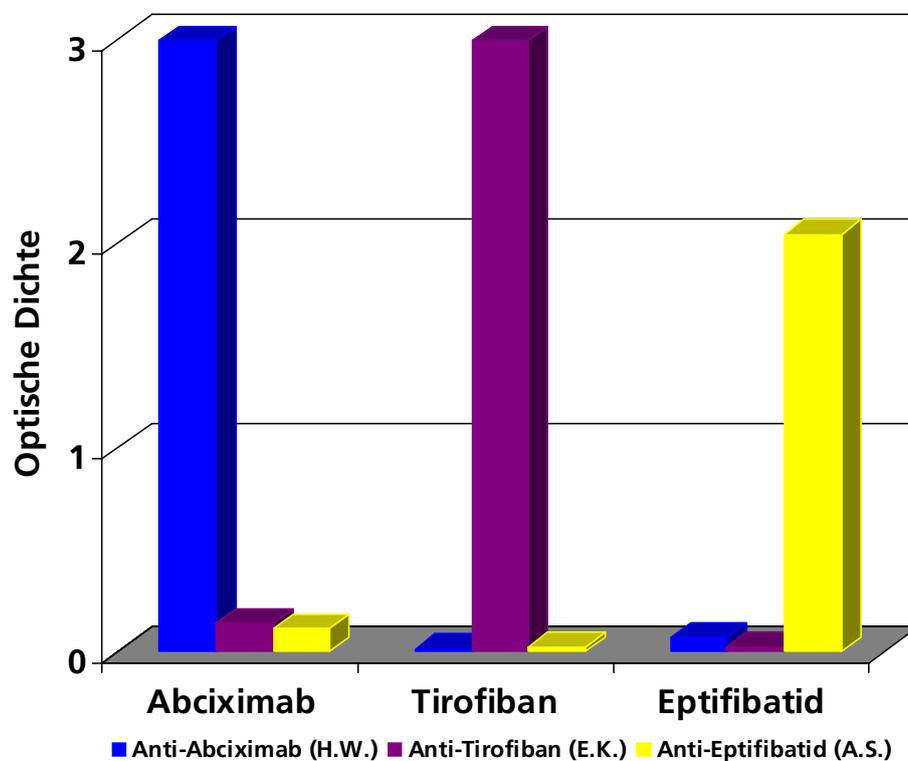


Abbildung 16 Kreuzreaktionen zwischen den einzelnen Thrombozytenaggregationhemmern. Es bestehen keine Kreuzreaktionen zwischen den einzelnen Thrombozytenaggregationshemmern Abciximab, Tirofiban und Eptifibatid. Eine thrombozytäre Antikörperbindung wird somit gegenseitig nicht verhindert.

4.5 Untersuchungen der Patientenseren mit Herzkatheteruntersuchung

4.5.1 Klinischer Verlauf vs. direkter MAIPA

Anhand folgender prospektiv angelegter Untersuchung ist ersichtlich, dass eine Antikörperbeladung nicht zwingend eine Thrombozytopenie nachsichzieht. Fünf Patienten, die alle nach einer Herzkatheteruntersuchung Abciximab erhielten, entwickelten nach 1 Tag trotz eines teilweise ausgeprägten Antikörperbesatz auf dem GPIIb/IIIa-Komplex nach Medikamentenapplikation, erkennbar mittels MAIPA-Extinktion (optische Dichte), keinen signifikanten Thrombozytenabfall. In allen Testseren konnte nach der Herzkatheteruntersuchung/Abciximab-Applikation und nach Vorinkubation mit dem Medikament Abciximab im indirekten MAIPA ein Abciximab-abhängiger Antikörper nachgewiesen werden.

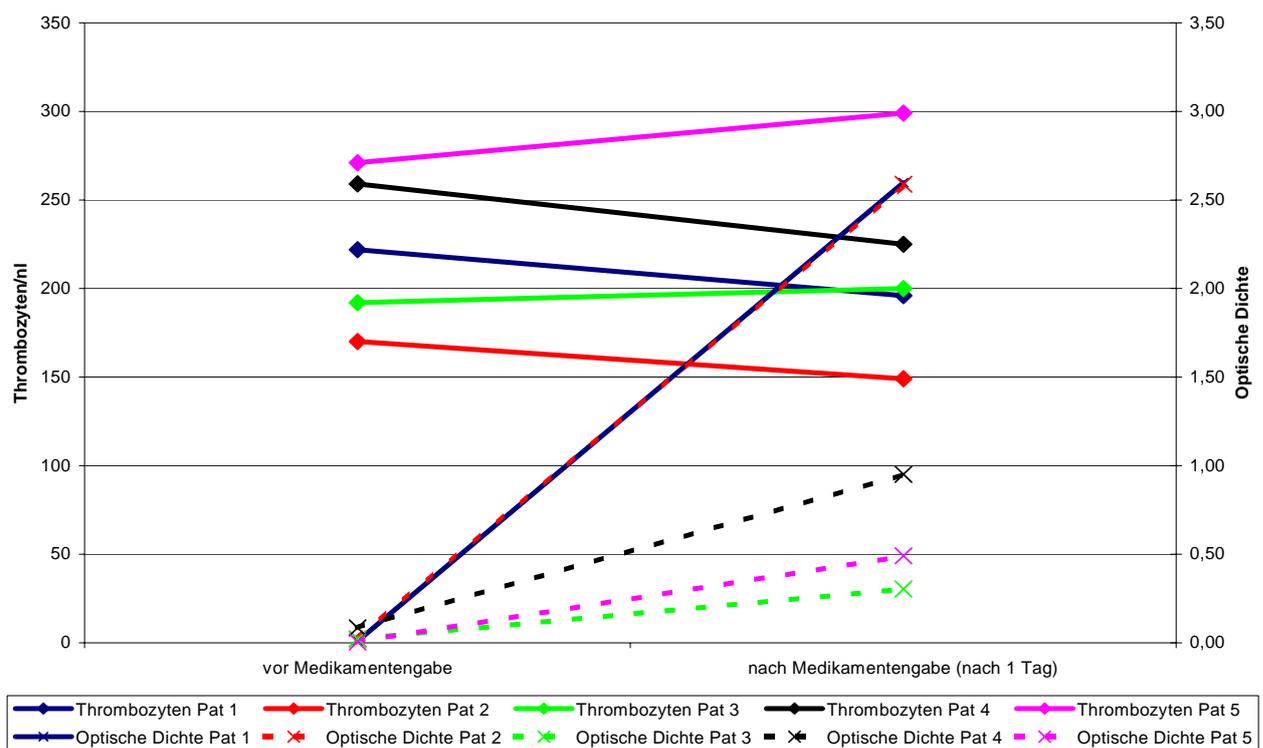


Abbildung 17 Thrombozytenverlauf vs. direkter MAIPA.
Keine Korrelation zwischen Thrombozytenverlauf und Antikörperbeladung auf den Thrombozyten (direkter MAIPA) erkennbar.

4.5.2 Thrombozytenabfall in Abhängigkeit von der Darreichungsform des Medikamentes Abciximab

Laut Tabelle 9 ist bei den 33 Patienten, welche vor/während/nach einer Herzkatheteruntersuchung das Medikament Abciximab erhielten, eine unterschiedliche Abciximabdosis bzw. Darreichungsform (Bolus, Infusion, Bolus und Infusion) verabreicht worden. Es zeigt sich bei 28 Patienten mit Angaben zur Medikamentendosis, dass nach einer Abciximab-Bolusgabe prozentuell häufiger eine Thrombozytopenie sich entwickelt als nach einer Kombination aus Abciximab-Bolus plus Abciximab-Infusion (50% vs. 23,5%).

Einige Patienten erhielten bei der Herzkatheteruntersuchung Heparin i.v. (5000-15.000 I.E.). Für diese fand sich im HIPA-Test und im Heparin-Plättchenfaktor 4-ELISA-Test kein sicherer Hinweis auf das Vorliegen eines Antikörpers der Heparin-assoziierten Thrombozytopenie.

4.5.3 Häufigkeitsverteilung der Abciximab-abhängigen Antikörper (Vergleich zwischen Spenderkollektiv und Patienten)

Tabelle 11 Vergleich zwischen dem gesunden Spenderkollektiv (100) und Patienten (33), die im Rahmen einer Herzkatheteruntersuchung Abciximab erhielten. Häufigkeitsverteilung von Abciximab-abhängigen Antikörpern, ermittelt durch Antikörperextinktionen, getestet im MAIPA, und prozentualer Thrombozytenabfall unter Abciximab.

	Extinktion im indirekten MAIPA				
	<0,2	0,2-0,4	0,4-0,8	0,8-1,6	>1,6
Thrombozytenabfall der 33 Patienten					
<25% (n=19)	12	3	3	-	1
25-50% (n=8)	4	1	2	1	-
>50% (n=6) *	2	1	-	1	2
Summe (%)	18 (55)	5 (15)	5 (15)	2 (6)	3 (9)
Gesundes Kollektiv (n=100)	60	14	11	7	8

*) p <0,05 (U-Test nach Wilcoxon, Mann und Whitney)

Die Tabelle veranschaulicht ein Testergebnis von 33 Patienten, die in der Medizinischen Klinik in Gießen im Rahmen einer Herzkatheteruntersuchung Abciximab erhielten, und von 100 gesunden Spendern, welche auf medikament-abhängige Antikörper hin untersucht wurden.

Es fällt auf, dass im gesunden Kollektiv überraschenderweise Antikörper vorhanden sind.

Die prozentuale Häufigkeit der Antikörper differierte nicht zwischen den einzelnen Vergleichsgruppen (45% vs. 40%), aber die Stärke der Abciximab-abhängigen Antikörper war signifikant höher bei den Patienten, die einen Thrombozytenabfall über 50% hatten im Gegensatz zu denen, die mit der Zahl der Plättchen konstant blieben. Bei einem Thrombozytenabfall von unter bzw. gleich 50% konnte man im MAIPA eher niedrigere Extinktionswerte messen.

Trotzdem zeigt sich, dass der eine Parameter (Ausmaß des Thrombozytenabfall) nicht zwingend eine Konsequenz des anderen Parameter darstellt (Stärke der MAIPA-Extinktion) oder andersrum (siehe auch 4.5.1).

5 Diskussion

5.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen,

- (1) dass a.e. eine immunologische Ursache der Thrombozytopenie durch GPIIb/IIIa-Rezeptorantagonisten zugrunde liegt.
- (2) dass medikament-abhängige Antikörper sowohl im gesunden Spenderkollektiv, als auch im Patientenkollektiv mit verschiedensten Untersuchungsmethoden nachgewiesen werden konnte.
- (3) dass der Nachweis nur in Anwesenheit des Thrombozytenaggregationshemmer gelang.
- (4) dass präformierte Antikörper womöglich einen Risikofaktor für eine Thrombozytopenieentstehung darstellen und der Antikörpertiter mit dem Ausmaß der Thrombozytopenie korreliert.
- (5) dass die Medikamentendarreichungsform (Infusion/Bolus), die Medikamentenart (Abciximab/Tirofiban/Eptifibatid) und die Begleitmedikation (Heparin, etc.) auf eine Thrombozytopenieentstehung Einfluss nimmt.
- (6) dass die medikament-abhängigen Antikörper überwiegend der Immunglobulinklasse IgG zugehörig sind.
- (7) dass die medikament-abhängigen Antikörper ein heterogenes Bindungsverhalten aufweisen.
- (8) eine fehlende Kreuzreaktionen zwischen den einzelnen medikament-abhängigen Antikörpern.
- (9) dass das Bindungsverhalten der medikament-abhängigen Antikörper vom Polymorphismus und dem Aktivierungszustand des GPIIb/IIIa-Rezeptor unabhängig ist.
- (10) dass die Zweitgabe bzw. die Re-Exposition eines Thrombozytenaggregationshemmers eventuell eine Thrombozytopenie als beschleunigte Immunantwort hervorruft.

5.2 Thrombozytopeniehäufigkeit

Vorangehende größere Studien konnten eine unterschiedliche Thrombozytopeniehäufigkeit in Verbindung mit einer GPIIb/IIIa-Rezeptor-Antagonisten-Gabe nachweisen.

In der vorliegenden Arbeit wurde anhand von 33 Patienten, die sich einer Herzkatheteruntersuchung unterzogen mussten, u.a. gezeigt, dass sich unter der Kombination Abciximab-Bolus + Abciximab-Infusion (= 17 Patienten) insgesamt weniger Thrombozytopenien entwickelten als bei einer alleinigen Abciximab-Bolusgabe (= 10 Patienten) (23,5% vs. 50%) (siehe Tabelle 9 und 4.5.2). Eine Korrelation zwischen der Darreichungsform und dem Ausmaß des Thrombozytenabfalls konnte hier nicht hergestellt werden. Tendenziell zeigte sich aber eher ein deutlicher Thrombozytenabfall nach alleiniger Bolusgabe. Diese Aussage steht dem Ergebnis der EPIC-Studie entgegen. Begleitmedikationen (Heparin) als Ursache einer Thrombozytopenie (z.B. HIT) konnten ausgeschlossen werden. Ein Zusammenhang zwischen der zusätzlichen i.v. Heparin-gabe und der Thrombozytopenieentwicklung unter Abciximab konnte nicht festgestellt werden. Dies widerspricht der Feststellung aus der EPILOG-Studie.

Im Vergleich treten unter Abciximab häufiger Thrombozytopenien auf als unter Tirofiban oder Eptifibatid. Ursächlich könnte die unterschiedliche Häufigkeit an präformierten Antikörpern in der Normalbevölkerung sein.

5.3 Zeitraum bis zur Thrombozytopenieentwicklung

Beobachtet man den Thrombozytenverlauf in zeitlichem Zusammenhang mit der Abciximab-Applikation, so fällt auf, dass eine Abciximab-induzierte Thrombozytopenie vorwiegend akut auftritt, d.h. wenige Stunden bis 3 Tage nach Therapiebeginn bei unserem prospektiv untersuchtem Patientenkollektiv (n=33) (siehe Tabelle 9) und innerhalb eines Tages bei unserem 8-köpfigen Patientenkollektiv (siehe Tabelle 6).

Eine mögliche Erklärung für diese unterschiedliche Zeitspanne bis zur Thrombozytopenieentwicklung wäre, dass initial die Antikörper durch autologe Thrombozyten absorbiert werden [41]. Nimmt die Zahl an Antikörpern zu, so resultiert eine Thrombozytenzerstörung und die Autoabsorption ist nicht länger gewährleistet, so dass freie Antikörper im Serum nachweisbar sind.

Daraus schlussfolgern wir, dass die neue Antikörperbildung unterschiedlich schnell ist oder dass die schwachen präexistierenden Antikörper langsam zu höheren Titern stimuliert werden. Auch wäre denkbar, dass eine Epitop-Formation oft nur inkomplett oder nur vorübergehend in vivo vorhanden ist und es so zu oben erwähntem Phänomen kommt.

Für Tirofiban und Eptifibatid haben wir, wie auch bei Abciximab, eine Thrombozytopenieentstehung innerhalb von Stunden beobachten (12 Stunden – 2 Tage). Neben dieser gleichen Feststellung [20] werden Einzelfälle in der Literatur beschrieben, bei denen eine Tirofiban-induzierte Thrombozytopenie mit einer Thrombozytenzahl von unter 13.000/ μ l erst nach über 6 Tagen (7–9 Tage) auftrat [19]. Daher ist denkbar, dass in vivo eventuell eine Thrombozytenaktivierung den persistierenden Antikörpern es dennoch ermöglicht eine Bindung, auch bei Abwesenheit des Medikamentes, denn Tirofiban besitzt eine Halbwertszeit von ca. 2 Stunden, einzugehen.

Bei allen drei intravenös zu applizierenden Thrombozytenaggregationshemmern zeigte sich in der vorliegenden Arbeit ein erneuter Thrombozytenanstieg auf Normwerte bzw. Ausgangswerte nach 1–7 Tagen. Vereinzelt wird beschrieben, dass eine ausgeprägte Thrombozytopenie, innerhalb weniger Stunden nach Abciximabgabe entstanden, für 21 Tage bis zu einer spontanen Wiederherstellung bestehen bleiben kann [100]. Mulot et al. [114] haben zeigen können, dass sich eine Thrombozytopenie nach Tirofibangabe schneller erholt als nach einer Abciximabgabe. Dabei sollte man die verschiedenen pharmakologischen Eigenschaften der Medikamente nicht außer Acht lassen (Dauer der Rezeptorbindung, Substanz/Rezeptor-Verhältnis, Eliminationsweg, etc.), so dass dieses Phänomen dadurch eventuell erklärt werden kann.

5.4 Antikörpernachweis

Durch verschiedenste Untersuchungstechniken (ELISA, Durchflusszytometer, Immunpräzipitation, MAIPA) gelang es uns Antikörper in den jeweiligen Kollektiven nachzuweisen. Der Beleg konnte allerdings nur in Anwesenheit des Medikamentes (Abciximab, Tirofiban, Eptifibatid) erbracht werden.

Das prozentuale Verhältnis der nachweisbaren Antikörper in zwei Vergleichsgruppen, nämlich dem gesunden Kollektiv und dem Patientenkollektiv (n=33), welches sich einer PTCA unterziehen musste und Abciximab erhielt, ist überraschenderweise in dieser Arbeit nahezu übereinstimmend (40% vs. 45%). Andere Studien konnten IgG-Antikörper gegen Abciximab-beladene Plättchen in einem höheren Prozentsatz nachweisen (94%) [39].

Ein Patient (H.W.) entwickelte im direkten MAIPA während der akuten Phase der Abciximab-induzierten Thrombozytopenie eine erhöhte Konzentration der plättchenassoziierten IgG auf den GPIIb/IIIa-Komplexen. Nach Beendigung dieser akuten Phase bzw. nach der Dissoziation vom Rezeptor, ist im direkten MAIPA keine Antikörperbeladung mehr erkennbar, jedoch sind durch den indirekten MAIPA weiterhin Antikörper im Serum zu beobachten (siehe Abbildung 1).

In einer daraufhin von uns prospektiv angelegten Untersuchung zeigte sich, dass eine Antikörperbeladung auf dem GPIIb/IIIa-Komplex nicht zwingend eine Thrombozytopenie zur Folge hat (siehe Abbildung 17). Trotz eines teilweise ausgeprägten Antikörperbesatz durch Abciximab-abhängige Antikörper ließen sich nahezu gleichbleibende Thrombozytenzahlen vorweisen. Es müssen also noch weitere Voraussetzungen vorliegen, damit eine Thrombozytopenie entsteht.

Verglichen mit dem klinischen Verlauf der Patienten, zeigte sich ein Zusammenhang zwischen der Antikörperstärke (= gemessene Extinktion im MAIPA) und dem Ausmaß des Thrombozytenabfalls (siehe 4.5.3). Ob sich aber hierbei von einem Parameter auf den anderen schließen lässt und ob man Anhand der Höhe des Antikörpertiters eine Aussage über die Wahrscheinlichkeit einer Thrombopenieentwicklung treffen kann, bleibt noch ungeklärt. Aus diesem Grunde sollten weitere Untersuchungen vor und nach der Therapie folgen, um die Nebenwirkungsinzidenz besser einzuschätzen und ggf. minimieren zu können.

5.5 Antikörperart

Im gesunden Kollektiv und im Patientenkollektiv mit Abciximab-abhängigen Antikörpern wurden mit Hilfe des MAIPA überwiegend Immunglobuline der Subklasse IgG gefunden. Diese Beobachtung deckt sich mit der vorhandenen Literatur für Tirofiban-, Eptifibatid- [20] und für Abciximab-abhängige Antikörper [40] [41].

Da die Immunglobulinklasse IgG Antikörper der sekundären Immunantwort darstellen, stellt sich demnach die Frage, warum es nach erstmaliger Applikation eines GPIIb/IIIa-Antagonisten innerhalb von Stunden oder Tagen zu einer Immunreaktion kommt, ohne dass der Patient eine vorherige Sensibilisierung durchgemacht hat.

5.6 Präformierte Antikörper

Es gibt verschiedenste Überlegungen (präformierte Antikörper, Lyse durch Komplementaktivierung, Phagozytose durch das RES, intrinsische Aktivität der GPIIb/IIIa-Rezeptorantagonisten, etc.), wie es durch intravenöse GPIIb/IIIa-Antagonisten zu dieser Art der medikamentinduzierten Thrombozytopenie kommen kann.

Die Autoimmunthrombozytopenie (AITP), die auch als idiopathische thrombozytopenische Purpura (ITP) oder als Morbus Werlhof bezeichnet wird, ist meist bedingt durch die Bildung von Autoantikörpern, die mit Determinanten auf den thrombozytären Glykoproteinen IIb/IIIa, Ib/IX oder V reagieren und eine Thrombozytopenie auslösen. Angesichts der IgG-Besetzung auf den GPIIb/IIIa-Komplexen ist daran zu denken, dass eine Autoimmunthrombozytopenie vorgetäuscht werden kann. Dies ist bei der Diagnosefindung mit zu berücksichtigen und es sollten immer klinische Informationen hinzugezogen werden.

Erstmals in den Jahren 1998/1999/2000 wurde von präexistierenden medikamentabhängigen Antikörpern in einem gesunden Kollektiv berichtet [7] [39] [92]. Die Tatsache, dass eine Thrombozytopenie bereits nach der ersten Exposition auftritt, unterstützt die Hypothese der präformierten oder natürlich vorkommenden Antikörper, welche nicht erst nach vorangegangener Sensibilisierung gebildet werden. Es werden also immunologische Gründe diskutiert. Das Vorhandensein von Antikörpern gegen Abciximab-induzierte Neoepitope oder gegen den Abciximab-Glykoprotein IIb/IIIa-Rezeptor-Komplex scheint, wie auch schon Madan et al. [103] beschreiben, die wahrscheinlichste Annahme für die Entstehung einer Abciximab-assoziierten Thrombozytopenie zu sein.

Wie in der Studie von Curtis et al. [39] [40], konnten auch in dieser Studie solche präformierten IgG/IgM-Antikörper, die mit Abciximab-beladenen Plättchen reagierten, in einer gesunden Population nachgewiesen werden. Zu beachten ist, dass Curtis et al. 1998 in 10% (15/150) Antikörper und 2002 in 74% (77/104) Antikörper in der gesunden Population gefunden hat. In der vorliegenden Arbeit ist von einer differenten Prävalenz auszugehen (40%) (40/100).

Bougie et al. [20] wiesen keine Tirofiban- oder Eptifibatid-abhängigen Antikörper in einem 100-köpfigen Kontrollkollektiv nach, wohingegen in hiesiger Studie bei drei gesunden Spendern bzw. bei einem gesunden Spender Antikörper gefunden werden konnten. Ausschließlich bei 2 von 23 Patienten, die Tirofiban oder Eptifibatid erhielten, aber keine

signifikante Thrombozytopenie entwickelten, beobachteten Bougie et al. extrem hochtitrige Titer für Tirofiban-abhängige Antikörper [20].

Abrams et al. fanden 2004 präformierte Antikörper für mehrere GPIIb/IIIa-Antagonisten zusammengefasst in annähernd 1% bei 1.032 untersuchten gesunden Personen [1].

Präformierte Antikörper scheinen sich allerdings qualitativ von den Antikörpern bei Patienten mit einer Thrombozytopenieentstehung zu unterscheiden. Curtis und seine Mitarbeiter postulieren, dass die beiden verschiedenen Antikörper unterschiedliche Bindungs epitope am Abciximab, gebunden an den Thrombozyten, aufweisen [41]. Auch könnte die Aktivität der präformierten Antikörper schwächer ausgeprägt sein. Ob hier ein Zusammenhang mit einer Thrombozytopenieentstehung zu sehen ist, ist unklar.

Zudem könnten präformierte Antikörper oder induzierte Antikörper bewirken, dass das jeweilige thrombozytenhemmende Medikament eine verkürzte Ansprechdauer und/oder eine verminderte Ansprechrate besitzt.

5.7 Bindungsverhalten der einzelnen Antikörper an den GPIIb/IIIa-Komplex

Medikament-abhängige Antikörper gegen den Thrombozytenaggregationshemmer Abciximab, Tirofiban oder Eptifibatid sind spezifisch für diesen [103] und erkennen bzw. erzeugen jeweils neue und verschiedene Epitope auf dem GPIIb/IIIa-Komplex.

Die genaue Bindungslokalisation der Antikörper ist noch spekulativ und wurde noch nicht gefunden. Mit der vorliegenden Arbeit konnten wir nachweisen, dass kein homogenes Reaktionsmuster vorliegt und dass die einzelnen Abciximab-, Tirofiban- und Eptifibatid-abhängigen Antikörper an unterschiedliche Epitope auf dem GPIIb/IIIa-Komplex binden. Sowohl bei den Patienten, als auch bei dem Spenderkollektiv, lässt sich dieses vollkommen heterogene Bindungsmuster darstellen (siehe Abbildung 15). Dieser variable Bindungseffekt zeigt, dass der Antikörper nicht ausschließlich spezifisch für ein einzelnes Epitop bzw. LIBS ist und dass es gemeinsame Bindungsstellen gibt.

Eine Kreuzreaktion zwischen den jeweiligen medikament-abhängigen Antikörpern und den verschiedenen Epitopen auf dem GPIIb/IIIa-Komplex konnte im indirekten MAIPA-Test ausgeschlossen werden (siehe Abbildung 16).

Da in den Ergebnissen ausnahmslos nur eine Antikörperantwort zu erkennen war bei Zugabe von Thrombozytenaggregationshemmern, lässt dies vermuten, dass durch das Medikament eventuell eine Konformationsänderung (LIBS) bzw. Neoantigene entstehen, die erst dem zuvor bestehenden Antikörper es ermöglichen, mit dem GPIIb/IIIa in Kontakt zu treten. Dies ist auch der Grund dafür, dass in der akuten Phase der Thrombozytopenie (nach der Gabe des Medikamentes) eine Antikörperbeladung im direkten MAIPA nachweisbar ist und im weiteren Verlauf nur noch Antikörper durch den indirekten MAIPA im Serum nachzuweisen sind.

Die LIBS-Induktion (= intrinsische Aktivität) kann in verschiedenem Maße von den einzelnen GPIIb/IIIa-Antagonisten ausgelöst werden [59]. Diese Unterschiede könnten für eine mögliche Thrombozytopenieentstehung pathophysiologisch von Bedeutung sein.

Interessant ist auch, dass die Thrombozytenzahl unter Abciximabtherapie invers mit der LIBS-Expression zu korrelieren scheint [58]. Ob hier ein Zusammenhang besteht, ist bisher unklar.

Eine akute Thrombozytopenie nach Eptifibatid-Gabe begründen Tanaka et al. [146] dadurch, dass es eine vorübergehende Neuverteilung der Plättchen in die Leber gibt und dass die Thrombozyten, bedingt durch entstehende LIBS, durch das RES erkannt und aufgenommen werden können. Tierversuche konnten zeigen, dass man diese Thrombozytopenie durch eine Vorbehandlung mit Abciximab oder durch intravenöse humane Immunglobuline abschwächen kann [146].

Indem wir eine stabile CHO-Zelllinie, die den menschlichen rekombinanten GPIIb/IIIa-Rezeptor exprämiert, gezielt durch RGDW aktivierten bzw. inaktivierten, konnten wir beweisen, dass Abciximab-abhängige Antikörper (des Patienten- und des Spenderkollektivs) an den GPIIb/IIIa-Komplex binden können, ohne dass dieser zuvor durch Thrombin, Adrenalin oder ADP aktiviert werden muss. Sie sind in der Lage, an aktivierte und ruhende GPIIb/IIIa-Komplexe zu binden und sind damit unabhängig vom Aktivierungszustand des Thrombozyten.

In einer Arbeit von Peter et al. [121] aktiviert Abciximab selbst den Thrombozyten und ruft über eine Reihe von intrazellulären Signaltransduktionskaskaden und einer Plättchenaggregation eine Thrombozytopenie hervor. Paradoxerweise scheinen die GPIIb/IIIa-Antagonisten die Thrombozyten unter gewissen Umständen aktivieren oder inaktivieren zu können [1].

Hier werden also nicht-immunologische Gründe für die Entstehung einer Thrombozytopenie diskutiert.

Es gibt Hinweise, dass thrombozytäre Polymorphismen das Adhäsions- und Aggregationsverhalten der Thrombozyten beeinflussen [117]. Der PI^A -Polymorphismus auf dem GPIIIa-Komplex ist genotypisch in der Bevölkerung in folgender Art verteilt: $PI^{A1/A1}$ 71,9%, $PI^{A1/A2}$ 24,7% und $PI^{A2/A2}$ 3,4% [67]. Forschungsergebnissen zufolge, scheint ein Polymorphismus des GPIIIa (HPA-1b, PI^{A2}) mit einem erhöhten Risiko für die Entstehung koronarer Erkrankungen und die Entwicklung eines Myokardinfarkts verbunden zu sein [17] [157], sowie Einfluss auf die Restenoserate nach koronarer Stentimplantation zu nehmen [82]. Diese genetischen Variationen könnten möglicherweise eine thrombozytäre

Hyperaktivität bedingen. Die Frage der Relevanz dieses Polymorphismus bedarf noch immer einer abschließenden Klärung.

Mit Hilfe von durchflusszytometrischen Untersuchungen wurde verdeutlicht, dass die unterschiedlichen Genotypen der menschlichen Thrombozyten (PI^{A1}/PI^{A1} ; PI^{A2}/PI^{A2}) sich nicht auf den Nachweis der Abciximab-induzierten Antikörper auswirken (siehe Abbildung 9). Demnach binden in vitro diese Antikörper an beide Genotypen mit gleicher Intensität. Es existieren allerdings auch andere Ergebnisse und Meinungen über die Hemmung der Plättchenaggregation durch Abciximab in Abhängigkeit vom PI^A -Genotyp. So wird eine relative Resistenz der PI^{A2}/PI^{A2} -positiven Patienten, sowie eine verringerte Abciximabwirkung für PI^{A1}/PI^{A2} -Thrombozyten in der Literatur beschrieben [159].

Wie auch in der hiesigen Arbeit konnte Weber et al. 2002 feststellen, dass der Polymorphismus der menschlichen Plättchenantigene keinen Einfluss auf das Bindungsverhalten der drei GPIIb/IIIa-Inhibitoren hat und somit die Wirksamkeit unabhängig vom Polymorphismus ist [156].

Ein Polymorphismus scheint die Antikörperbildung, die Antikörperbindung und die Bindung des Thrombozytenaggregationshemmer Abciximab nicht zu beeinflussen.

Es fällt auf, dass der Patient U.S. in der Abbildung 12 die stärkste Antikörperantwort mit dem Antikörper P2 besitzt. Dem Patienten wurde das Medikament Tirofiban zum zweiten Mal verabreicht. Er entwickelte erst nach der zweiten Exposition eine Thrombozytopenie. Daraus folgern wir, dass neben der Überlegung einer eventuell anderen Darreichungsdosis auch andere Mechanismen an dieser Nebenwirkung beteiligt sind. So kann mutmaßlich nach erneuter Gabe ein Booster-Effekt, d.h. eine beschleunigte sekundäre Immunantwort, nach stattgehabter Immunisierung vorliegen. In der Literatur wird von einem ähnlichen Fall berichtet, bei dem erst nach Re-Exposition mit Eptifibatid eine Thrombozytopenie nachweisbar war [28]. Da der Abstand der erneuten GPIIb/IIIa-Antagonisten-Gabe u.a. entscheidend für eine Thrombozytopenieantwort ist, liegt womöglich eine Potenzierung und/oder eine Summierung der medikament-abhängigen Antikörper durch die wiederholte Gabe vor.

Bei Patienten mit einer Thrombozytopenieentwicklung nach einer ersten und nach einer zweiten Abciximabexposition konnten Curtis et al. ebenso einen höheren Antikörpertiter, nämlich einen ca. 10-fach höheren, nach zweiter Exposition feststellen [39].

In der Studie von Bougie et al. [20] wird darüber spekuliert, dass die erste Exposition einen schwachen Antikörper zu einem potenteren entwickeln lässt, welcher nun in der Lage ist, eine Thrombozytopenie bei erneuter Gabe entstehen zu lassen.

Diese Überlegungen könnten auch die Tatsache, dass nach einer zweiten Gabe von Abciximab die Thrombozytopenie drei- bis viermal häufiger auftritt als nach der ersten Exposition, erklären.

5.8 Ausblick

In der gesunden Population konnten präformierte IgG-Antikörper nachgewiesen werden, die einen Risikofaktor darstellen und nach Gabe eines Thrombozytenaggregationshemmers eine Thrombozytopenie induzieren könnten. Diese im Vorfeld existierenden Antikörper könnten mit dem Medikament eine Bindung eingehen und zusammen oder alleine den GPIIb/IIIa-Komplex bzw. eine LIBS-Region oder Neoepitope besetzen.

Es wäre also unter Umständen noch die Anwesenheit von Antikörpern neben den in der Literatur aufgeführten Risikofaktoren (Alter, Gewicht, vorrausgehende Thrombozytenzahl, Therapie mit einem Thrombozytenaggregationshemmer [12] [103]) zu berücksichtigen und vor Applikation des Medikamentes in Erwägung zu ziehen bzw. Vorkehrungen zu treffen. Dafür allerdings wäre ein schneller und sicherer Test zur Risikoeinschätzung erforderlich. Seifert et al. [140] berichten, dass die Thrombozytopenie-Inzidenz durch einen vorgeschalteten Screeningtest auf das 10-fache reduziert werden kann. Dies verdeutlicht die bedeutende klinische Relevanz dieser Thematik.

Ob man allerdings jeden Patienten im Voraus auf Antikörper untersuchen sollte, bleibt zunächst noch in Frage gestellt. Auch in einer kürzlich erschienen Arbeit von Abrams and Cines [1] wird diese Überlegung durchdacht.

Vielleicht wäre dies zu beachten bei denjenigen Patienten, die nach vorrangegangener Thrombozytopenie erneut den gleichen Thrombozytenaggregationshemmer erhalten sollten. Der Wechsel auf ein anderes intravenöses Medikament wäre ebenfalls eine Möglichkeit, das erneute Auftreten einer Thrombozytopenie zu verhindern [37], denn laut Abbildung 16 gibt es keine Kreuzreaktion zwischen Antikörpern und Thrombozyten, die mit einem anderen Medikament beladen sind. Allerdings sollte man die wenigen veröffentlichten Fallbeispiele mit den verschiedenen Kombinationen der einzelnen GPIIb/IIIa-Antagonisten mit anschließender Thrombozytopenie nicht ganz außer Acht lassen [43] [76] [99].

Ferner ist zu berücksichtigen, dass ebenso Faktoren wie individuelle Thrombozytenzahl, GPIIb/IIIa-Dichte bzw. Polymorphismus, Vorhandensein von Thromboserisikofaktoren (Faktor V Leiden, Hypercholesterinämie, Prothrombinvariationen, etc.) und unterschiedliche Metabolismus- / Eliminationsraten Einfluss auf die Medikamentenwirkung nehmen.

6 Zusammenfassung / Summary

6.1 Zusammenfassung

Die medikamentinduzierte Thrombozytopenie durch Abciximab, Tirofiban und/oder Eptifibatid wird in der klinischen Beobachtung, bei zunehmendem Einsatz dieser Medikamente in der interventionellen Kardiologie, in unterschiedlichem Maße gesehen. Am häufigsten tritt sie unter Abciximab auf. Die Ursache ist bis heute nicht eindeutig zu belegen. Zwei Ätiologien werden vermutet: ein immunologischer Pathomechanismus durch Antikörper vermittelt und eine nicht-immunologische Ursache durch das Medikament selbst.

Diese klinisch-experimentelle Arbeit befasst sich mit der Antikörpervermittelten Thrombozytopenie. Dazu untersuchten wir die verschiedenen Kollektive auf Antikörper hin. Hierbei ließen sich bei Patienten unter einer Abciximab-/Tirofiban-/Eptifibatidtherapie, bei Patienten mit einer Herzkatheteruntersuchung und bei dem gesunden Spenderkollektiv medikament-abhängige Antikörper mit verschiedensten Untersuchungsmethoden (ELISA, Durchflusszytometer, Immunpräzipitation, MAIPA) nachweisen. Präformierte Antikörper konnten gefunden werden und werden als mögliche Ursache für die Thrombozytopenie angenommen. Erstaunlicherweise spiegelt sich die Häufigkeitsverteilung der Antikörperstärke im gesunden Kollektiv ebenfalls im Patientenkollektiv wieder (40% vs. 45%). Die Höhe des Antikörpertiters scheint dabei mit dem Ausmaß einer Thrombozytopenie zu korrelieren.

Die Prävalenz der präformierten Antikörper im Spenderkollektiv gegen Tirofiban und Eptifibatid war beträchtlich niedriger (1% und 3%).

Die nachgewiesenen Antikörper sind überwiegend Immunglobuline der Subklasse IgG.

Die Bindungsepitope der Antikörper sind sehr heterogen und das Bindungsverhalten der Antikörper ist jeweils bei Patienten/Spendern unabhängig vom GPIIb/IIIa-Polymorphismus und dem Aktivierungszustand des GPIIb/IIIa-Komplex.

In dieser Studie konnten keine Kreuzreaktionen zwischen den einzelnen Antikörpern gefunden werden. Dies ist von besonderer Wichtigkeit für eine eventuelle Therapieumstellung nach aufgetretener Nebenwirkung.

Nach der ersten Medikamentapplikation scheint eine Boosterung mit Erhöhung des Antikörpertiters stattzufinden, so dass eine erneute Applikation mit dem gleichen Medikament zu einer ausgeprägteren und/oder beschleunigt auftretenden unerwünschten Nebenwirkung führen kann.

Die beschriebenen Ergebnisse haben sowohl Konsequenz für die Therapie mit einem GPIIb/IIIa-Antagonisten als auch für die Nachbeobachtung. Um eine Thrombozytopenie als lebensbedrohliche Nebenwirkung zu vermeiden, sollte u.a. ggf. eine Antikörpertestung im Vorfeld durchgeführt werden. Auch muss an eine falsch positive Serologie-Testung bei AITP (Autoimmunthrombozytopenie) -Verdacht nach Abciximab-Gabe gedacht werden.

6.2 Summary

Platelets play a central role in the pathogenesis of coronary artery disease and acute myocardial infarction. The drug-dependent acute thrombocytopenia by abciximab, tirofiban and/or eptifibatid has been observed in different tests. Thrombocytopenia is most frequently after receiving the drug abciximab. The mechanism how the drug causes thrombocytopenia is not yet known. There are two speculations: an immunologic one, caused by drug-dependent antibodies, and a non-immunologic one by the drug itself.

Sera from healthy blood donors, sera from patients treated with abciximab, tirofiban or eptifibatid and patients with intracardial catheter were screened in this study and we found drug-dependent antibodies. We used different test methods to determine the antibodies (ELISA, flowcytometry, immunoprecipitation assays, MAIPA). We found in our patients preformed antibodies which could be seen as a possible cause of thrombocytopenia. We concluded that in some patients thrombocytopenia, followed by the injection of abciximab, tirofiban or eptifibatid, is induced by drug-dependent antibodies that cause immunologic findings similar to autoimmune thrombocytopenia.

In our study, the frequency of antibodies concentration did not differ in both populations (33 patients who received abciximab and 100 healthy donors) (45% vs. 40%). The titer of abciximab drug-dependent antibodies was significantly higher in patient who had a decrease of their platelet count above 50% compared to patients with stable platelet count. The prevalence of preformed drug-dependent antibodies against tirofiban and eptifibatid was considerably lower (3/100 and 1/100).

The most of the scientifically proven antibodies belonged to the immunoglobulin class IgG. Analysis of sera with a panel of mAbs and stable transfectants demonstrate that epitopes of drug-dependent antibodies against different GPIIb/IIIa antagonist are heterogeneous. The binding of the antibodies is independent of the GPIIb/IIIa-polymorphism and the activity of the GPIIb/IIIa-complex.

Cross reactivity between the antibodies could not be established in this study. One consequence is that we could shift the drug without any considerable effect.

These antibodies are mostly performed but may occasionally be induced after preceding exposure. The second drug-exposition leads to boost the antibodies with an acceleration of the side-effect.

These results are very important for the treatment with GPIIb/IIIa-antagonist. To avoid the life-threatening side effect with developing thrombocytopenia it can be important to analyse the sera of performed antibodies before the treatment. Furthermore it is necessary to know, that the drug exposition with abcixmab can show a wrong positive result for autoimmunthrombocytopenia.

7 Anhang

7.1 Literaturverzeichnis

- [1] Abrams, C.S.; Cines, D.B.:
Thrombocytopenia after treatment with platelet glycoprotein IIb/IIIa inhibitors.
Curr Hematol Rep 3. (2004): 143-147
- [2] "The ACUTE II study":
Randomized double-blind safety study of enoxaparin versus unfractionated heparin in patients with non-ST-segment elevation acute coronary syndromes treated with tirofiban and aspirin: the ACUTE II study. The Antithrombotic Combination Using Tirofiban and Enoxaparin.
Am Heart J 144. (2002): 470-477
- [3] Aster, R.H.:
Thrombocytopenia due to enhanced platelet destruction.
In: Williams W.J. et al.:
Hematology (1983): 1298-1338
- [4] Aster, R.H.; George, J.N.:
Thrombocytopenia due to enhanced platelet destruction by immunologic mechanisms.
In: Williams WJ, et al.:
Hematology (1990): 1370-1398
- [5] Aster, R.H.:
Drug-induced immune thrombocytopenia: an overview of pathogenesis.
Semin Hematol 36. (1999): 2-6
- [6] Bednar, B.; Bednar, R.A.; Cook, J.J.; et al.:
Drug-dependent Antibodies Against GPIIb/IIIa Induce Thrombocytopenia.
Circulation 94. (1996): I-99

-
- [7] Bednar, B.; Cook, J.J.; Holahan, M.A.; Cunningham, M.E.; Jumes, P.A.; Bednar, R.A.; Hartman, G.D.; Gould, R.J.:
Fibrinogen Receptor Antagonist-Induced Thrombocytopenia in Chimpanzee and Rhesus Monkey Associated With Preexisting Drug-Dependent Antibodies to Platelet Glycoproteins IIb/IIIa.
Blood 94. (1999): 587-599
- [8] Berkowitz, S.D.; Sane, D.C.; Shavender, J.H.; Sigmon, K.N.; Topol, E.J.; Califf, R.M.:
Analysis of the occurrence and clinical significance of thrombocytopenia with c7E3 (abciximab) in the EPIC trial (abstr.).
J Am Coll Cardiol 27. (1996): 82A
- [9] Berkowitz, S.D.; Sane, D.C.; Sigmon, K.N.; Shavender, J.H.; Harrington, R.A.; Tcheng, J.H.; Topol, E.J.; Califf, R.M.:
Occurrence and Clinical Significance of Thrombocytopenia in a Population Undergoing High-Risk Percutaneous Coronary Revascularization.
J Am Coll Cardiol 32. (1998): 311-319
- [10] Berndt, M.C.; Chong, B.H.; Bull, H.A.; Zola, H.; Castaldi, P.A.:
Molecular characterization of quinine/quinidine drug-dependent antibody platelet interaction using monoclonal antibodies.
Blood 66. (1985): 1292-1301
- [11] Berndt, M.C.; Chong, B.H.; Bull, H.A.; Zola, H.; Castaldi, P.A.:
Molecular characterization of quinine/quinidine drug-dependent antibody platelet interaction using monoclonal antibodies.
Blood 66. (1985): 1292-1301
- [12] Billheimer, J.T.; Dicker, I.B.; Wynn, R.; Bradley, J.D.; Cromley, D.A.; Godonis, H.E.; Grimminger, L.C.; He, B.; Kieras, C.J.; Pedicord, D.L.; Spitz, S.M.; Thomas, B.E.; Zolotarjova, N.I.; Gorko, M.A.; Hollis, G.F.; Daly, R.N.; Stern, A.M.; Seiffert, D.:
Evidence that thrombocytopenia observed in humans treated with orally bioavailable glycoprotein IIb/IIIa antagonist is immune mediated.
Blood 99. (2002): 3540-3546

-
- [13] Bishara, A.I.; Hagmeyer, K.O.:
Acute profound thrombocytopenia following abciximab therapy.
Ann Pharmacother 34. (2000): 924-30
- [14] Bizzozero, J.:
Über einen neuen Formenbestandteil des Blutes und dessen Rolle bei der Thrombose
und Blutgerinnung.
Arch Path Anat Physiol Klin Med 90. (1882): 261-332
- [15] Blajchman, M.A.; Lowry, R.C.; Pettit, J.E.; Stradling, P.:
Rifampicin-induced immune thrombocytopenia.
Br Med J 3. (1970): 24-26
- [16] Blankenship, J.C.:
Bleeding complications of glycoprotein IIb-IIIb receptor inhibitors.
Am Heart J 138. (1999): 287-296
- [17] Bojesen, S.E.; Juul, K.; Schnohr, P.; Tybjaerg-Hansen, A.; Nordestgaard, B.G.:
Platelet glycoprotein IIb/IIIa P1(A2)/P1(A2) homozygosity associated with risk of
ischemic cardiovascular disease and myocardial infarction in young men: the
Copenhagen City Heart Study.
Blood Coagul Fibrinolysis. 14 (2003):369-77
- [18] von dem Borne, A.E.G.Kr.; Pegels, J.G.; van der Stadt, R.J.;van der Plas-van Dalen,
C.M.; Helmerhorst, F.M.:
Thrombocytopenia associated with gold therapy: a drug-induced autoimmune
disease?
Br J Haematol 63. (1986): 509-516
- [19] Bosco, A.; Kidson-Gerber, G.; Dunkley, S.:
Delayed tirofiban-induced thrombocytopenia: two case reports.
J Thromb Haemost 3. (2005): 1109-1110

-
- [20] Bougie, D.W.; Wilker, P.R.; Wuitschick, E.D.; Curtis, B.R.; Malik, M.; Levine, S.; Lind, R.N.; Pereira, J.; Aster, R.:
Acute thrombocytopenia after treatment with tirofiban or eptifibatide is associated with antibodies specific for ligand-occupied GPIIb/IIIa.
Blood 100. (2002): 2071-2076
- [21] Braunwald, E.:
Shattuck lecture - cardiovascular medicine at the turn of the millennium: triumphs, concerns, and oppurtunities.
N Engl J Med 337. (1997): 1360-1369
- [22] Breslow, J.L.:
Cardivascular disease burden increases.
NIH funding decreases. Nat Med 3. (1997): 600-1
- [23] Brieger, D.B.; Mak, K.-H.; Kottke-Marchant, K.; Topol, E.J.:
Heparin-induced thrombocytopenia.
J Am Coll Cardiol 31. (1998): 1449-1459
- [24] Brown, E.J.; Goodwin, J.L:
Fibronectin receptors of phagocytes characterization of the Arg-Gly-Asp binding proteins of human monocytes and polymorphonuclear leukocytes.
J Exp Med 167. (1988): 777-793
- [25] Bundesverband der Pharmazeutischen Industrie e.V.; Postfach 12 55; 88322 Aulendorf: „Fachinfo-Service“ für das Arzneimittel: Abciximab (Mai 1999); Tirofiban (April 2002); Eptifibatide (Oktober 2002).
- [26] The CAPTURE investigators:
Randomised placebo-controlled trial of abciximab before and during coronary intervention in refractory unstable angina: the CAPTURE study.
Lancet 349. (1997): 1429-1435

-
- [27] Carrell, N.A.; Fitzgerald, L.A.; Steiner, B.; Erickson, H.P.; Phillips, D.R.:
Structure of Human Platelet Membrane Glycoproteins IIb and IIIa as Determined by
Electron Microscopy.
J Biol Chem 260. (1985): 1743-1749
- [28] Cheema, A.A.; Teklinski, A.H.; Maria, V.; Chilukuri, K.; Frank, J.J.; Gosselin, M.O.:
Recurrent Acute Profound Thrombocytopenia Related to Readministration of
Eptifibatide.
J Interv Cardiol 19. (2006): 99-103
- [29] Chong, B.H.:
Heparin-induced thrombocytopenia.
Aust N Z J Med 22. (1992): 145-152
- [30] Christie, D.J.; Mullen, P.C., Aster, R.H.:
Fab-mediated binding of drug-dependent antibodies to platelets in quinidine- and
quinine-induced thrombocytopenia.
J Clin Invest 75. (1985): 310-314
- [31] Christie, D.J.; Mullen, P.C.; Aster, R.H.:
Quinine- and quinidine-induced platelet antibodies can react with GPIIb/IIIa.
Br J Haematol 67. (1987): 213-219
- [32] Cines, D.B.:
Glycoprotein IIb/IIIa antagonists: Potential induction and detection of drug-dependent
antiplatelet antibodies.
Am Heart J 135. (1998): 152-159
- [33] Coblyn, J.S.; Weinblatt, M.; Holdsworth, D.; Glass, D.:
Gold-induced thrombocytopenia: A clinical and immunogenetic study of twenty-three
patients.
Ann Intern Med 95. (1981): 178-181
- [34] Cohen, A.M.; Cycowitz, Z.; Mittelman, M.; Lewinski, U.H.; Gardyn, J.:
The incidence of pseudothrombocytopenia in automatic blood analyzers.
Haematologia 30. (2000): 117-121

- [35] Coller, B.S.;.....:
Platelet GPIIb/IIIa antagonist: the first anti-integrin receptor therapeutics.
J Clin Invest 99. (1997): 1467-1471
- [36] Coller, B.S.:
Potential non-glycoprotein IIb/IIIa effects of abciximab.
Am Heart J 138. (1999): 1-5
- [37] Coto, H.:
Platelet receptor glycoprotein IIb/IIIa inhibition with eptifibatide in a patient with thrombocytopenia after treatment with abciximab.
J Invasive Cardiol 12. (2000): 528-531
- [38] Curtis, B.R.; McFarland, J.G.;Wu, G.-G.; Visentin, G.P.; Aster, R.H.:
Antibodies in Sulfonamide-Induced Immune Thrombocytopenia Recognize Calcium-Dependent Epitopes on the Glycoprotein IIb/IIIa Complex.
Blood 84. (1994): 176-183
- [39] Curtis, B.R.; McFarland, J.G.; Garrity, M.M.; Aster, R.H.:
Thrombocytopenia induced by abciximab: studies of pathogenesis.
Blood 92. (1998): 181 A
- [40] Curtis, B.R.; Swyers, J.; Divgi, A.; McFarland, J.G.; Aster, R.H.:
Thrombozytopenia after second exposure to abciximab is caused by antibodies that recognize abciximab-coated platelets.
Blood 99. (2002): 2054-2059
- [41] Curtis, B.R.; Divgi, A.; Garrity, M.; Aster, R.H.:
Delayed thrombocytopenia after treatment with abciximab: a distinct clinical entity associated with the immune response to the drug.
J Thomb Haemost 2. (2004): 985-992
- [42] Dodds, W.N.; Davidson, R.J.L.:
Thrombocytopenia due to slow release oxprenolol.
Lancet (1978): 683

-
- [43] Dorsch, M.P.; Montague, D.; Rodgers, J.E.; Patterson, C.:
Abciximab-associated thrombocytopenia after previous tirofiban-related
thrombocytopenia.
Pharmacotherapy 26. (2006): 423-427
- [44] Dyke, C.M., :
Safety of glycoprotein IIb/IIIa inhibitors: A heart surgeon`s perspective.
Am Heart J 138. (1999): 307-316
- [45] Eberth, J.C.; Schimmelbusch, C.:
Experimentele Untersuchungen über Thrombose.
Virchow`s Archiv 105. (1886): 331-350
- [46] Eberth, K.J.; Schimmelbusch, C.:
Die Thrombose nach Versuchen und Leichenbefunden.
Stuttgart: Ferdinand Enke, 1888
- [47] Eisner, E.V.; Kasper, K.:
Immune thrombocytopenia due to a metabolite of para-aminosalicylic acid.
Am J Med 53. (1972): 790-796
- [48] Eisner, E.V.; Shaidi, N.T.:
Immune thrombocytopenia due to a drug metabolite.
N Engl J Med 287. (1972): 376-381
- [49] The EPIC investigators:
Use of monoclonal antibody directed against the platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor
in high-risk coronary angioplasty.
N Engl J Med 330. (1994): 956-9661
- [50] The EPILOG investigators:
Platelet Glycoprotein IIb/IIIa Receptor Blockade And Low-Dose Heparin During
Percutaneous Coronary Revascularization.
N Engl J Med 336. (1997): 1689-1696

- [51] The EPISTENT Investigators:
Randomised placebo-controlled and balloon-angioplasty-controlled trial to assess safety of coronary stenting with use of platelet glycoprotein-IIb/IIIa blockade.
Lancet 352. (1998): 87-92
- [52] Eryonucu, B.; Tuncer, M.; Erkoc, R.:
Repetitive profound thrombocytopenia after treatment with tirofiban: a case report.
Cardiovasc Drugs Ther. 18. (2004): 503-505
- [53] Faulds, D.; Sorkin, E.M.:
Abciximab (c7E3 Fab): a review of its pharmacology and therapeutic potential in ischaemic heart disease.
Drugs 48. (1994): 583-598
- [54] Ferguson, J.J., Kereiakes, D.J., Adgey, A.A.J.; Fox, K.A.A.; Hillegass, W.B.; Pfisterer, M.; Vassanelli, C.:
Safe use of platelet GPIIb/IIIa inhibitors.
Am Heart J 135. (1998): 77-89
- [55] Foster, R.H.; Wisemann, L.R.:
Abciximab. An updated review of its use in ischaemic heart disease.
Drugs 56. (1998): 629-665
- [56] Garg, S.K.; Sarker, C.R.:
Aspirin-induced thrombocytopenia on an immune basis.
Am J Med Sci 267. (1974): 129-132
- [57] Gawaz, M.; Loftus, J.C.; Bajt, M.L.; Frojmovic, M.M.; Plow, E.F.; Ginsberg, M.H.:
Ligand Bridging Mediates Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ (Platelet GPIIb-IIIa) Dependent Homotypic and Heterotypic Cell-Cell Interactions.
J Clin Invest 88. (1991): 1128-1134

-
- [58] Gawaz, M.; Ruf, A.; Neumann, F.-J.; Pogátsa-Murray, G.; Dickfeld, T.; Zohlnhöfer, D.; Schömig, A.:
Effect of Glycoprotein IIb/IIIa Receptor Antagonism on Platelet Membrane Glycoproteins after Coronary Stent Placement.
Thromb Haemost 80. (1998): 994-1001
- [59] Gawaz, M.; Neumann, F.J.; Schömig, A.:
Evaluation of platelet membrane glycoproteins in coronary artery disease.
Circulation 99. (1999): e1-e11
- [60] Gawaz, M.:
Thrombozyten und primäre Hämostase.
In: Gawaz, M. (Ed.). Das Blutplättchen.
Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York (1999): 4-24
- [61] Gawaz, M.:
Thrombozytäre Membranglykoproteine.
In: Gawaz, M. (Ed.). Das Blutplättchen.
Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York (1999): 30-41
- [62] Gawaz, M.:
Antithrombozytäre Substanzen.
In: Gawaz, M. (Ed.). Das Blutplättchen.
Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York (1999): 54-79
- [63] Gawaz, M.:
Medikamenteninduzierte Thrombozytopenie.
In: Gawaz, M. (Ed.). Das Blutplättchen.
Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York (1999): 80-84
- [64] George, J.N.; Berkowitz, S.D.; Raksob, G.E.:
Platelets: acute thrombocytopenia.
American Society of Hematology Education Program Book (1998): 371-383

-
- [65] George, J.N.; Raskob, G.E.; Rizvi, S.S.; Rizvi, M.A.; Hamilton, S.A.; Osborne, S.; Vondracek, T.:
Drug-induced thrombocytopenia: a systemic review of published case reports.
Ann Intern Med 129. (1998): 886-90
- [66] Goa, K.L.; Noble, S.:
Eptifibatide.
Drugs 57. (1999): 439-462
- [67] Gorchakova, O.; Koch, W.; Mehilli, J.; von Beckerath, N.; Schwaiger, M.; Schomig, A.; Kastrati, A.:
PIA polymorphism of the glycoprotein IIa and efficacy of reperfusion therapy in patients with acute myocardial infarction.
Thromb Haemost 91. (2004): 141-145
- [68] Grandjean, L.C.:
A case of purpura haemorrhagica after administration of quinine with specific thrombocytolysis demonstrated in vitro.
Acta Med Scand 131. (1948): 165-170
- [69] Greinacher, A.; Eichler, P.; Lubenow, N.; Kiefel, V.:
Drug-induced and drug-dependent immune thrombocytopenias.
Rev Clin Exp Hematol 5.3. (2001): 166-200
- [70] Großjohann, B.; Eichler, P.; Greinacher, A.; Santoso, S.; Kroll, H.:
Ceftriaxone causes drug-induced immune thrombocytopenia and hemolytic anemia: characterization of targets on platelets and red blood cells.
Transfusion 44. (2004): 1033-1040
- [71] Hackett, T.; Kelton, J.G.; Powers, P.:
Drug-Induced Platelet Destruction.
Semin Thromb Hemost 8. (1982): 116-137
- [72] Harrington, R.A.:
Overview of clinical trials glycoprotein IIb-IIIa inhibitors in acute coronary syndromes.
Am Heart J 138. (1999): 276-286

- [73] Hoffbrand, A.V.; Petit, J.E.:
Thrombozyten, Blutgerinnung und Hämostase.
In: Grundlagen der Hämatologie.
Steinkopff Verlag Darmstadt; GmbH & Co. KG, Darmstadt; 1996: 207-225
- [74] Hohlfeld, T.:
Neue Therapiestrategien zur Thrombozytenaggregationshemmung.
MedReport 25. (2001): 5-6
- [75] Holmes, M.B.; Kabbani, S.; Watkins, M.W.; Battle, R.W.; Schneider, D.J.:
Abciximab-Associated Pseudothrombocytopenia.
Circulation 101. (2000): 938-939
- [76] Hongo, R.H.; Brent, B.N.:
Association of Eptifibatide and Acute Profound Thrombocytopenia.
Am J Cardiol 88. (2001): 428-431
- [77] "IMPACT Investigators":
Multicenter, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial of the Platelet
Integrin Glycoprotein IIb/IIIa Blocker Integrilin in Elective Coronary Intervention.
Circulation 91. (1995): 2151-2157
- [78] "The IMPACT-II-Study":
Randomised placebo-controlled trial of effect of eprifibatide on complications of
percutaneous coronary intervention: IMPACT-II.
Lancet 349. (1997): 1422-1428
- [79] "IMPACT-AMI-Study":
Combined accelerated Tissue-Plasminogen Activator and Platelet Glycoprotein IIb/IIIa
Integrin Receptor Blockade With Integrilin in Acute Myocardial Infarction.
Circulation 95. (1997): 846-854
- [80] Jennings, L.K.; Phillips, D.R.:
Purification of Glycoproteins IIb and IIIa from Human Platelet Plasma Membranes and
Characterization of a Calcium-dependent Glycoprotein IIb-IIIa Complex.
J Biol Chem 257. (1982): 10458-10466

- [81] Jennings, L.K.; White, M.M.:
Expression of ligand-induced binding sites on glycoprotein IIb/IIIa complexes and the effect of various inhibitors.
Am Heart J 135. (1998): 179-183
- [82] Kastrati, A.; Schömig, A.; Seyfarth, M.; Koch, W.; Elezi, S.; Böttiger, C.; Mehilli, J.; Schömig, K.; von Beckerath, N.:
PI^A polymorphism of platelet glycoprotein IIIa and risk of restenosis after coronary stent placement.
Circulation 99. (1999) 1005-1010
- [83] Kecskes, M.; Stockelberg, D.;...:
ReoPro induced severe thrombozytopenia.
Blood 92. (1998): 180 A (Abstract 729)
- [84] Kereiakes, D.J.; Berkowitz, S.D.; Anderson, K.; Simoons, M.; Vahanian, A.; Lincoff, A.M.; Tcheng, J.E.; Weisman, H.; Califf, R.M.; Topol, E.J.:
Abciximab associated thrombozytopenia: evidence for a complex interaction with heparin (abstract).
J Am Coll Cardiol 31. (1998): 55A
- [85] Kereiakes, D.J.; Berkowitz, S.D.; Lincoff, A.M.; Tcheng, J.E.; Wolski, K.; Achenbach, R.; Melsheimer, R.; Anderson, K.; Califf, R.M.; Topol, E.J.:
Clinical correlates and course of thrombocytopenia during percutaneous coronary intervention in the era of abciximab platelet glycoprotein IIb/IIIa blockade.
Am Heart J 140. (2000): 74-80
- [86] Khaykin, Y; Paradiso-Hardy, F.L.; Madan, M.:
Acute thrombocytopenia associated with eptifibatide therapy.
Can J Cardiol 19. (2003): 797-801
- [87] Kiefel, V.; Santoso, S.; Schmidt, S.; Salama, A.; Mueller-Eckhardt, C.:
Metabolite-specific (IgG) and drug-specific antibodies (IgG, IgM) in two cases of trimethoprim-sulfamethoxazole-induced immune thrombocytopenia.
Transfusion 27. (1987): 262-265

-
- [88] Kiefel, V.:
The MAIPA assay and its applications in immunohaematology.
Transfusion 2. (1992): 181-188
- [89] Kjeldsberg, C.R.; Hershgold, E.J.:
Spurious thrombocytopenia.
JAMA 227. (1974): 628-630
- [90] Kleiman, N.S.:
Pharmacokinetics and pharmacodynamics of glycoprotein IIb-IIIa inhibitors.
Am Heart J 138. (1999): 263-275
- [91] Kondo, K.; Umemura, K.:
Clinical Pharmacokinetics of tirofiban, a Nonpeptide Glycoprotein IIb/IIIa Receptor Antagonist.
Clin Pharmacokinet 41. (2002): 187-195
- [92] Kroll, H.; Núñez Bresgen, A. L.; Giptner, A.:
Thrombocytopenia due to the fibrinogen receptor antagonist abciximab may caused by drug-dependent antibodies.
44. Jahrestagung der Gesellschaft für Thrombose- und Hämostaseforschung (GTH)
16.-19.02.2000; 31 A
- [93] Kroll, H.; Sun, Q.-H.; Santoso, S.:
Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM 1) is a target glycoprotein in drug-induced thrombocytopenia.
Blood 96. (2000): 1409-1414
- [94] Kunicki, T.J.; Russell, N.; Nurden, A.T.; Aster, R.H.; Caen, J.P.:
Further studies of the human platelet receptor for quinine- and quinidine-dependent antibodies.
J Immunol 126. (1981): 398-402
- [95] Lance, E.; Jordan, B.; Preston, A.; Mace, K.; Schaible, T.; Mascelli, M.A.:
Recruitment of pre-existing anti-Fab immunoglobulins to platelets does not affect the safety, pharmacokinetics or pharmacodynamics of ReoPro.
Blood 86. (1995): 902 a

- [96] Leclerc, J.R.:
Platelet glycoprotein IIb/IIIa antagonists: Lessons learned from clinical trials and future directions.
Critical Care Medicine 30. (2002): 332-340
- [97] Lefkovits, J.; Plow, E.F.; Topol, E.T.:
Platelet Glycoprotein IIb/IIIa Receptors in Cardiovascular Medicine.
N Engl J Med 332. (1995): 1553-1559
- [98] Lerner, W.; Caruso, R.; Faig, D.; Karpatkin, S.:
Drug-dependent and non-drug-dependent antiplatelet antibody in drug-induced immunologic thrombocytopenic purpura.
Blood 66. (1985): 306-311
- [99] Lev, E.I.; Osende, J.I.; Richard, M.F.; Robbins, J.A.; Delfin, J.A., Rodriguez, O.; Sharma, S.K.; Jayasundera, T.; Badimon, J.J.; Marmur, J.D.:
Administration of abciximab to patients receiving tirofiban or eptifibatide: effect on platelet function.
J Am Coll Cardiol 37. (2001): 847-855
- [100] Lown, J.A.; Hughes, A.S.; Cannell, P.:
Prolonged profound abciximab associated immune thrombocytopenia complicated by transient multispecific platelet antibodies.
Heart 90 (2004): e55
- [101] Madan, M.; Durham, N.C.; Kereiakes, D.J.; Rund, M.; Anderson, L.; Tudor, G.; Berkowitz, S.D.; Sketch, M.H.; Phillips, H.R.; Tcheng, J.E.:
Abciximab Readministration for Coronary Intervention: Is it safe?
Circulation 96. (1997): I-162
- [102] Madan, M.; Berkowitz, S.D.; Tcheng, J.E.:
Glycoprotein IIb/IIIa Integrin Blockade.
Circulation 98. (1998): 2629-2635
- [103] Madan, M.; Berkowitz, S.D.:
Understanding thrombocytopenia and antigenicity with glycoprotein IIb-IIIa inhibitors.
Am Heart J 138. (1999): 317-326

- [104] Madan, M.; Kereiakes, D.J.; Hermiller, J.B.; Rund, M.M.; Tudor, G.; Anderson, L.; McDonald, M.B.; Berkowitz, S.D.; Sketch, M.H.; Phillips, H.R.; Tcheng, J.E.:
Efficacy of abciximab readministration in coronary intervention.
Am J Cardiol 85. (2000): 435-440
- [105] Manohitharajah, S.M.; Jenkins, W.J.; Roberts, P.D.; Clarke, R.C.:
Methyldopa and associated thrombocytopenia.
BMJ 1. (1971): 494
- [106] Marwick, C.:
Nature's Agents Help Heal Humans – Some Now Take Steps to Reciprocate.
JAMA 279. (1998): 1679-1681
- [107] Mascelli, M.A.; Lance, E.T.; Damaraju, L.; Wgner, C.L.; Weisman, H.F.; Jordan, R.E.:
Pharmacodynamic Profile of Short-term Abciximab Treatment Demonstrates
Prolonged Platelet Inhibition With Gradual Recovery From GPIIb/IIIa Receptor
Blockade.
Circulation 97. (1998): 1680-1688
- [108] McClure, M.W.; Berkowitz, S.D.; Sparapani, R.; Tuttle, R.; Kleiman, N.S.; Berdan, L.G.;
Lincoff, A.M.; Deckers, J.; Diaz, R.; Karsch, K.R.; Gretler, D.; Kitt, M.; Simoons, M.;
Topol, E.J.; Califf, R.M.; Harrington, R.A.:
Clinical Significance of Thrombocytopenia During a Non-ST-Elevation Acute Coronary
Syndrome. The Platelet Glycoprotein IIb/IIIa in Unstable Angina: Receptor Suppression
Using Integrilin Therapy (PURSUIT) Trial Experience.
Circulation 99. (1999): 2892-2900
- [109] McGregor, J.L.; Brocher, J.; Wild, F.; Follea, G.; Trzeciak, M.-C.; James, E.;
Dechavanne, M.; McGregor, L.; Clemetson, K.J.:
Monoclonal Antibodies against Platelet Membrane Glycoproteins
Eur J Biochem 131. (1983): 427-436
- [110] Meyer, T.; Herrmann, C.; Wiegand, V.; Mathias, B.; Kiefel, V.; Mueller-Eckhardt, C.:
Immune thrombocytopenia associated with hemorrhagic diathesis due to ibuprofen
administration.
Clin Investig 71. (1993): 413-415

- [111] Moss, R.A.; Castro, O.:
Platelet transfusion for quinidine-induced thrombocytopenia.
N Engl J Med 288. (1973): 522-523
- [112] Mueller-Eckhardt, C.; Salama, A.:
Drug-induced immune cytopenias: a unifying pathogenetic concept with special emphasis on the role of drug metabolites.
Transfusion Medicine Reviews 4. (1990): 69-77
- [113] Mueller-Eckhardt, C.:
Welchen Beitrag leisten immunologische Methoden bei der Diagnostik von Immunthrombozytopenien?
(1992)
- [114] Mulot, A.; Moulin, F.; Fohlen-Walter, A.; Angioi, M.; Sghaier, M.; Carreaux, J.P.; Lecomte, T.; De Maistre, E.:
Practical approach to the diagnosis and management of thrombocytopenia associated with tirofiban treatment.
Am J Hematol 77. (2004): 67-71
- [115] Neumann, F.-J.; Gawaz, M.; Schömig, A.:
Glykoproteine der Thrombozytenmembran als Angriffspunkt für pharmakologische Interventionen in der Therapie der koronaren Herzkrankheit.
Dtsch Med Wschr 122. (1997): 1224-1230
- [116] Nurden, A.T.:
Polymorphism of Human Platelet Membrane Glycoproteins: Structure and Clinical Significance.
Thromb Haemost 74. (1995): 345-351
- [117] Nurden, A.T.:
Polymorphism of platelet receptors as risk factors in coronary thrombosis.
European Heart Journal 17. (1996): 1293-1294
- [118] Nurden, A.T.; Poujol, C.; Durrieu-Jai, C.; Nurden, P.:
Platelet glycoprotein IIb/IIIa inhibitors.
Arterioscler Thromb Vasc Biol 19. (1999): 2835-2840

- [119]Paradiso-Hardy, F.L.; Madan, M.; Radhakrishnan, S.; Hurden, S.; Cohen, E.A.:
Severe Thrombocytopenia Possibly Related to Readministration of Eptifibatide.
Catheter CardioVasc Interv 24. (2001): 63-67
- [120]Pedersen-Bjergaard, U; Andersen, M.; Hansen, P.B.:
Drug-induced thrombocytopenia: Clinical data on 309 cases and the effect of
corticosteroid therapy.
Eur J Clin Pharmacol 52. (1997): 183-189
- [121]Peter, K.; Straub, A.; Volkmann, M.; Schwarz, M.; Kubler, W.; Bode, C.:
Platelet activation as a potential mechanism of GPIIb/IIIa inhibitor-induced
thrombocytopenia.
Am J Cardiol 84. (1999): 519-524
- [122]Phillips, D.R.; Charo, I.F.; Parise, L.V.; Fitzgerald, L.A.:
The Platelet Membrane Glycoprotein IIb-IIIa Complex.
Blood 71. (1988): 831-843
- [123]Phillips, D.R.; Charo, I.F.; Scarborough, R.M.:
GPIIb-IIIa: The Responsive Integrin.
Cell 65. (1991): 359-362
- [124]Phillips, D.R.; Scarborough, R.M.:
Clinical pharmacology of eptifibatide.
Am J Cardiol 80. (1997): 11B-20B
- [125]Plow, E.F.; Ginsberg, M.H.:
Cellular adhesion. GPIIb-IIIa as a prototypic adhesion receptor.
In Collier, B.S. (ed.): Progress in Hemostasis and Thrombosis. (Saunders: Philadelphia
1989): 117-156
- [126]Plow, E.F.; D'Souza, S.E.; Ginsberg, M.H.:
Ligand Binding to GPIIb-IIIa: A Status Report.
Semin Thromb Memost 18. (1992): 324-332

[127] PRISM investigators:

A comparison of aspirin plus tirofiban with aspirin plus heparin for unstable angina.
N Engl J Med 338. (1998): 1498-1505

[128] PRISM-PLUS investigators:

Inhibition of the platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor with tirofiban in unstable angina and non-q-wave myocardial infarction.
N Engl J Med 338. (1998): 1488-1497

[129] Pschyrembel Klinisches Wörterbuch 257. Auflage

Berlin; New York: de Gruyter, 1994

[130] „The PURSUIT-Study“:

Inhibition of platelet glycoprotein IIb/IIIa with eptifibatide in patients with acute coronary syndromes.
N Engl J Med 339. (1998): 436-443

[131] The RESTORE investigators:

Effects of Platelet Glycoprotein IIb/IIIa Blockade With Tirofiban on Adverse Cardiac Events in Patients With Unstable Angina or Acute Myocardial Infarction Undergoing Coronary Angioplasty.
Circulation 96. (1997): 1445-1453

[132] Rizvi, M.A.; Shah, R.S.; Raskob, G.E.; George, J.N.:

Drug-induced thrombocytopenia.
Cur Opin Hematol 6. (1999): 349-353

[133] Ruan, C.; Du, X.; Wan, H.; Hu, X.; Xi, X.; Li, P.:

Characterisation of the fibrinogen binding sites using monoclonal antibodies to human platelet membrane glycoproteins IIb/IIIa.
Thromb Haemost 58. (1987): 243

[134] Sane, D.C.; Damaraju, L.V.; Topol, E.J.; Cabot, C.F.; Mascelli, M.A.; Harrington, R.A.; Simoons, M.L.; Califf, R.M.:

Occurrence and clinical significance of pseudothrombocytopenia during anciximab therapy.
J Am Coll Cardiol 36. (2000): 75-83

- [135] Santoso, S.; Lohmeyer, J.; Rennich, H.; Clemetson, K.J.; Mueller-Eckhardt, C.:
Platelet surface antigens: Analysis by monoclonal antibodies.
Blut 48. (1984): 161-170
- [136] Scarborough, R.M.; Rose, J.W.; Hsu, M.A.; Phillips, D.R.; Fried, V.A.; Campbell, A.M.;
Nannizzi, L.; Charo I.F.:
Barbourin: a GPIIb/IIIa-specific integrin antagonist from the venom of *Sistrurus M.*
Barbouri.
J Biol Chem 266. (1991): 9359-9362
- [137] Scarborough, R.M.; Kleiman, N.S.; Phillips, D.R.:
Platelet Glycoprotein IIb/IIIa Antagonists. What are the relevant issues concerning
their pharmacology and clinical use ?
Circulation 100. (1999): 437-444
- [138] Schell, D.A.; Ganti, A.K.; Levitt, R.; Potti, A.:
Thrombocytopenia associated with c7E3 Fab (abciximab).
Ann Hematol 8. (2002)1: 76-79
- [139] Schrör, K.:
Thrombozyten (Physis Spezial; 67).
München, Verlag Urban und Vogel 1993: 1-19
- [140] Seiffert, D.; Stern, A.M.; Ebling, W.; Rossi, R.J.; Barrett, Y.C.; Wynn, R.; Hollis, G.F.;
He, B.; Kieras, C.J.; Pedicord, D.L.; Cromley, D.A.; Hua, T.A.; Stein, R.B.; Daly, R.N.;
Sferruzza, A.; Pieniaszek, H.J.; Billkeimer, J.:
Prospektive testing for drug-dependent antibodies reduces the incidence of
thrombocytopenia observed with the small molecule glycoprotein IIb/IIIa antagonist
roxifiban: implications for the etiology og thrombocytopenia.
Blood 101. (2003): 58-63
- [141] Sharma, S.; Bhambi, B.; Nyitray, W.; Sharma, G.; Shambaugh, S.; Antonescu, A.;
Shukla, P.; Denny, E.:
Delayed profound Thrombocytopenia Presenting 7 Days After use of Abciximab
(ReoPro).
J Cardivasc Pharmacol Ther 7. (2002): 21-24

- [142] Shattil, S.J.; Newmann, P.J.:
Integrins: dynamic scaffolds for adhesion and signaling in platelets.
Blood 104. (2004): 1606-1615
- [143] Stafford, B.T.; Crosby, W.H.:
Late onset of Gold-Induced Thrombocytopenia. With a Practical Note on Injections of
Dimercaprol.
JAMA 239. (1978): 50-51
- [144] Stricker, R.B.; Shuman, M.A.:
Quinidine purpura: Evidence that glycoprotein V is a target platelet antigen.
Blood 67. (1986): 1377-1381
- [145] Suleiman, M.; Gruberg, L.; Hammermann, H.; Aronson, D.; Halabi, M.; Goldberg, A.;
Grenadier, E.; Boulus, M.; Markiewicz, W.; Beyar, R.:
Comparison of Two Platelet Glycoprotein IIb/IIIa Inhibitors, Eptifibatid and
Abciximab: Outcomes, Complications and Thrombocytopenia During Percutaneous
Coronary Intervention.
J Invasive Cardiol 15. (2003): 319-323
- [146] Tanaka, K.A.; Kator, N.; Kelly, A.B.; Kotze, H.; Marzec, U.; Hanson, S.R.:
In vivo platelet redistribution and acute transient thrombocytopenia after eptifibatid
injection in baboons.
Thromb Res 115. (2005): 79-87
- [147] Tcheng, J.E.; Harrington, R.A.; Kottke-Marchant, K.; Kleimann, N.S.; et al.:
Multicenter, Randomized; Double-Blind; Placebo-Controlled Trial of the Platelet
Integrin Glycoprotein IIb/IIIa Blocker Integrelin in Elective coronary Intervention.
Circulation 91. (1995): 2151-2157
- [148] Tcheng, J.E.; Kereiakes, D.J.; Braden, G.A.; Jordan, R.E.; Mascelli, M.A.; Langrall,
M.A.; Efron, M.B.:
Readministration of abciximab: Interim report of the ReoPro Readministration
Registry.
Am Heart J 138. (1999): 33-38

[149]Tcheng, J.E.:

Clinical challenges of platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor inhibitor therapy: Bleeding, reversal, thrombocytopenia, and retreatment.

Am Heart J 139. (2000): 38-45

[150]Topol, E.J.; Byzova, T.V.; Plow, E.F.:

Platelet GPIIb-IIIa blockers.

Lancet 353. (1999): 227-231

[151]Topol, E.J.; Moliterno, D.J.; Hermann, H.C.; Power, E.R.; Grines, C.L.; Cohen, D.J.;

Cohen, E.A.; Bertrand, M.; Neumann, F.J.; Stone, G.W.; DiBattiste, P.; Demopolos, L.:

Comparison of two platelet glycoprotein IIb/IIIa inhibitors, tirofiban and abciximab, for the prevention of ischemic events with percutaneous coronary revascularization.

N Engl J Med 344. (2001): 1888-1894

[152]Verstraete, M.:

Synthetic Inhibitors of Platelet Glycoprotein IIb/IIIa in Clinical Development.

Circulation 101. (2000): e 76

[153]van Vliet, H.H.D.M.; Kappers-Klunne, M.C.; Abels, J.:

Pseudothrombocytopenia: a cold autoantibody against platelet glycoprotein GPIIb.

Br J Haematol 62. (1986): 501-511

[154]Wagner, C.L.; Mascelli, M.A.; Neblock, D.S.; Weisman, H.F.; Collier, B.S.; Jordan, R.E.:

Analysis of GPIIb/IIIa Receptor Number by Quantification of 7E3 Binding to Human Platelets.

Blood 88. (1996): 907-914

[155]Wazny, L.D.; Ariano, R.E.:

Evaluation and management of the drug-induced thrombocytopenia in the acutely ill patient.

Pharmacotherapy 20. (2000): 292-307

- [156] Weber, A.A.; Jacobs, C.; Meila, D.; Weber, S.; Zotz, R.B.; Scharf, R.E.; Kelm, M.; Strauer, B.E.; Schror, K.:
No evidence for an influence of the human platelet antigen-1-polymorphism on the antiplatelet effects of glycoprotein IIb/IIIa inhibitors.
Pharmacogenetics 12. (2002): 581-583
- [157] Weiss, E.J.; Bray, P.F.; Tayback, M.; Schulman, S.P.; Kickler, T.S.; Becker, L.C.; Weiss, J.L.; Gertenblith, G.; Goldschmidt-Clermont, P.J.:
A polymorphism of a platelet glycoprotein receptor as an inherited risk factor for coronary thrombosis.
N Engl J Med 334. (1996): 1090-1094
- [158] Wencel-Drake, J.D.; Plow, E.F.; Kunicki, T.J.; Woods, V.L.; Keller, D.M.; Ginsberg, M.H.:
Localization of internal pools of membrane glycoproteins involved in platelet adhaesive responses.
Am J Pathol 124. (1986): 324-334
- [159] Wheeler, G.L.; Braden, G.A.; Bray, P.F.; Marciniak, S.J.; Macelli, M.A.; Sane, D.C.:
Reduced inhibition by abcixiamb in platelets with the PI^{A2} polymorphism.
Am Heart J 143. (2002): 76-82
- [160] Woods, V.L. Jr; Wolff, L.E.; Keller, D.M.:
Resting platelets contain a substantial centrally located pool of glycoprotein IIb-IIIa complex which may be accessible to some but not other extracellular proteins.
J Biol Chem 261. (1986): 15242-15251
- [161] Zeymer, U.; Neuhaus, K.-L.:
Glycoprotein-IIb/IIIa-Rezeptorantagonisten zur Verbesserung der thrombolytischen und interventionellen Therapie bei Patienten mit akutem Herzinfarkt.
Dtsch Med Wschr 125. (2000): 1297-1300

7.2 Erklärung

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

Gießen, im November 2007

(Ana Linda Núñez Bresgen)

7.3 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die mir bei der Erstellung dieser Arbeit behilflich waren.

Ein besonderer Dank gilt dabei meinem Doktorvater, Prof. Dr. med. Reinhard Voss, bis 05/2007 Oberarzt an der Medizinischen Klinik I (Kardiologie/Angiologie) des Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH (Standort Gießen) und seit 05/2007 Chefarzt der Fachabteilung für Innere Medizin am Gemeinschaftsklinikum Koblenz-Mayen (St. Elisabeth Mayen), für die freundliche Überlassung des Themas. Zudem möchte ich mich herzlich bedanken für die Bereitstellung der Blutprodukte und für die Hilfe bei der Zusammentragung der dazugehörigen persönlichen Patientendaten. Dank seiner Kooperation und Kompetenz wurde mir die praktische Durchführung, die Datenerhebung und Auswertung erst ermöglicht.

Meinem Betreuer, Dr. med. Hartmut Kroll, bis 10/2005 Oberarzt am Institut für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen und seit 10/2005 Institutsleiter des DRK Blutspendedienst Dessau, danke ich für die stets freundliche und kompetente Betreuung während dem experimentellen bzw. schriftlichen Teil der Doktorarbeit und für die kontinuierliche Beratung und Unterstützung bei dieser Arbeit.

Den Mitarbeiterinnen des Thrombozytenlabors danke ich für die intensive Einweisung in die labortechnischen Methoden und ihre stete freundliche Unterstützung und Mithilfe bei vielen praktischen und organisatorischen Aufgaben.

Für die tatkräftige Unterstützung während der Doktorarbeit möchte ich mich bei meiner gesamten Familie, besonders bei meiner Mutter, Hildegard Núñez, geb. Bresgen, von ganzem Herzen bedanken.

7.4 Tabellarischer Lebenslauf

Persönliche Daten

Familienname:	Núñez Bresgen
Vorname:	Ana Linda
Geburtsdatum:	17. November 1975
Geburtsort:	Madrid
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Familienstand:	ledig

Schulbildung

1982 - 1986	Grundschule Koblenz-Neukarthause in Koblenz
1986 - 1995	Staatliches Gymnasium auf der Karthause in Koblenz
Juni 1995	Erlangung der allgemeinen Hochschulreife

Hochschulstudium

Oktober 1995	Einschreibung an der Justus-Liebig-Universität in Gießen; Fachbereich: Humanmedizin
01.09.1997	Ärztliche Vorprüfung
27.08.1998	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
02.04.2001	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
14.05.2002	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Praktisches Jahr

30.04.01 - 19.08.01	Innere Medizin in der Medizinischen Klinik und Poliklinik III, Universitätsklinikum Gießen
20.08.01 - 09.12.01	Rheumatologie in der Kerckhoff Klinik, Bad Nauheim
10.12.01 - 31.03.02	Allgemein- und Unfallchirurgie am Universitätsklinikum Gießen

Berufstätigkeit

01.11.2002 - 01.05.2004	Ärztin im Praktikum in der Klinik für Gastroenterologie und Allgemeine Innere Medizin am Städtischen Klinikum Solingen (Chefarzt Prof. Dr. med. G. Lux), Akademisches Lehrkrankenhaus der Universität Köln
Seit dem 01.05.2004	Assistenzärztin in der Klinik für Gastroenterologie und Allgemeine Innere Medizin am Städtischen Klinikum Solingen (Chefarzt Prof. Dr. med. G. Lux), Akademisches Lehrkrankenhaus der Universität Köln

7.5 Abstract

Kroll, H.; Nunez Bresgen, A. L.; Giptner, A.: Thrombocytopenia due to the fibrinogen receptor antagonist abciximab may caused by drug-dependent antibodies. 44. Jahrestagung der Gesellschaft für Thrombose- und Hämostaseforschung (GTH) 16.-19.02.2000; 31 A

Kroll, H.; Nunez Bresgen, A. L.; Voss, R.; Santoso, S.: Drug-dependent anitbodies in thrombocytopenia due to the GP IIb/IIIa antagonists abciximab, tirofiban, and eptifibatide. Blood 2001; 98 (suppl 1): 519a

7.6 Vortrag / Poster

Kroll, H.; Nunez Bresgen, A. L.; Voss, R.; Santoso, S.: Drug-dependent anitbodies in thrombocytopenia due to the GP IIb/IIIa antagonists abciximab, tirofiban, and eptifibatide. 43rd Annual Meeting of the American Society of Hematology, Orlando, 7.-11. Dezember 2001

édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN 3-8359-5282-X



9 1 7 8 3 8 3 5 1 9 5 2 8 2 9