

Andreas Straub
Dr. med.

Die Durchflußzytometrie als Methode zur Überwachung der therapeutischen Thrombozyteninhibition

Geboren am 25.8.1973 in Saarbrücken
Reifeprüfung am 27.5.1992 in Neckargemünd
Studiengang der Fachrichtung Medizin vom SS 1994 bis WS 2000/2001
Physikum am 19.3.1996 an der Universität Heidelberg
Klinisches Studium in Heidelberg
Praktisches Jahr in Heidelberg (Universitätsklinikum) und Laufen (Kantonsspital) / Schweiz
Staatsexamen am 14.11.2000 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Innere Medizin
Doktorvater: Herr Prof. Dr. med. Ch. Bode

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, ein Meßsystem zu etablieren, das die Überwachung der Thrombozytenfunktion unter dem Einfluß thrombozyteninhibierender Pharmaka erlaubt. Hierbei sollte insbesondere der Einfluß des gegen den Fibrinogenrezeptor GP IIb/IIIa gerichteten chimären Mensch/Maus Fab-Fragmentes Abciximab aber auch des kleinmolekularen GP IIb/IIIa-Inhibitors Tirofiban, sowie des ADP-Rezeptor-Antagonists Ticlopidin auf die Funktion von Thrombozyten untersucht werden.

Zu diesem Zweck wurden zwei Meßsysteme auf der Basis der Durchflußzytometrie entwickelt und miteinander beziehungsweise mit der konventionellen Thrombozytenaggregometrie verglichen. Die Meßmethodik wurde zuerst im Rahmen von *in vitro* Versuchen etabliert. In weiteren Versuchen wurde unter klinischen Bedingungen die Thrombozytenfunktion bei 49 Patienten, die im akuten Myokardinfarkt mit Abciximab, Ticlopidin und dem Fibrinolytikum Reteplase behandelt wurden, untersucht.

Die Bindung von Abciximab an Thrombozyten wurde direkt mit einem gegen Mausequenzen gerichteten, fluoreszenzgekoppelten Antikörper in der FACS-Analyse erfaßt. Hierbei wurde der Prozentsatz der Thrombozyten, an die dieser Antikörper gebunden hatte, ermittelt. In Blut, das zehn Minuten, zwei Stunden und zwölf Stunden nach Verabreichung von Abciximab abgenommen wurde, konnte eine maximale Abciximab-Bindung an Thrombozyten nachgewiesen werden. Nach Beendigung der zwölfstündigen Abciximab-Infusion begann dessen Bindung kontinuierlich abzunehmen., war aber noch nach sieben Tagen nachweisbar.

Weiterhin wurde das Ausmaß der funktionellen GP IIb/IIIa-Blockade anhand der Bindung eines Anti-Fibrinogen Antikörpers beziehungsweise des für GP IIb/IIIa aktivations-spezifischen PAC-1-Antikörpers in der FACS-Analyse ermittelt. Es zeigte sich eine inverse

Korrelation der Fibrinogen- und der PAC-1-Bindung mit der Abciximab-Bindung unter GP IIb/IIIa-Inhibition.

Die Thrombozytenaggregation war zehn Minuten nach Therapiebeginn mit Abciximab maximal inhibiert. Dabei gingen erniedrigte Aggregationswerte mit einer erniedrigten Fibrinogen- und PAC-1-Bindung an GP IIb/IIIa einher.

Um die Blockade des thrombozytären ADP-Rezeptors zu untersuchen, wurde eine Patientengruppe, die neben Abciximab das Pharmakon Ticlopidin erhalten hatte, mit einer Patientengruppe, die kein Ticlopidin erhalten hatte verglichen. Bei diesem Vergleich zeigte sich, daß die Hemmung der Thrombozytenfunktion, die in den ersten 24 Stunden durch Abciximab erzeugt wurde, unter der zusätzlichen Verabreichung von Ticlopidin im weiteren Therapieverlauf erhalten blieb und mit der FACS-Analyse beziehungsweise mit der Aggregometrie erfaßbar war.

Das Fibrinolytikum Reteplase beeinflusste die Bindung von Abciximab an Thrombozyten nicht und führte zu keiner Aktivierung der Thrombozyten. Dies wurde in der Durchflußzytometrie anhand der Expression des Thrombozytenaktivationsmarkers P-Selectin, der Fibrinogenbindung und der Bindung des PAC-1-Antikörpers nachgewiesen.

Um eine Aussage über die Thrombozyten-Leukozyten Interaktion unter dem Einfluß von GP IIb/IIIa-Inhibitoren treffen zu können wurde durchflußzytometrisch die Aggregationsfähigkeit von Thrombozyten, sowie der Leukozytenanteil der erfaßten Thrombozyten- und Aggregatpopulationen bestimmt. Unter dem Einfluß der GP IIb/IIIa-Inhibitoren Abciximab beziehungsweise Tirofiban konnte eine deutliche Hemmung der Aggregationsfähigkeit von Thrombozyten nachgewiesen werden. Darüberhinaus zeigte sich eine Abnahme des Leukozytenanteils und der P-Selectin-Expression der Thrombozytenaggregate unter der Therapie mit Abciximab.

Eine mögliche Komplikation der Therapie mit GP IIb/IIIa-Inhibitoren ist die Entwicklung einer Thrombozytopenie. Bei einem der in dieser Arbeit untersuchten Patienten entwickelte sich ein signifikanter Thrombozytenabfall nach Verabreichung von Abciximab. Parallel zu diesem Thrombozytenabfall konnte zehn Minuten nach Therapiebeginn eine erhöhte Fibrinogen- und PAC-1-Bindung sowie eine erhöhte Expression von P-Selectin auf den Thrombozyten in der FACS-Analyse erfaßt werden. Darüberhinaus konnten zu den Meßzeitpunkten bis 144 h nach Therapiebeginn Thrombozytenaggregate in Blutaussstrichen nachgewiesen werden. Weitere in vitro Versuche mit dem Blut dieses Patienten wurden mehrere Wochen nach dem Auftreten der Thrombozytopenie durchgeführt. Bei diesen Experimenten konnte eine Induktion der Fibrinogen- und der PAC-1-Bindung, ein Anstieg

der P-Selectin-Expression und die Bildung von Thrombozytenaggregaten nach der Inkubation von Vollblut mit Abciximab nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse sprechen für eine Thrombozytenaktivierung durch Abciximab als möglichem Mechanismus der GP IIb/IIIa-Inhibitor assoziierten Thrombozytopenie.

Insgesamt konnte somit ein durchflußzytometrisches Meßsystem zur Überwachung der therapeutischen Inhibition von Thrombozyten entwickelt werden, das eine Differenzierung zwischen den Effekten von GP IIb/IIIa-Inhibitoren, ADP-Antagonisten und Fibrinolytika bei Patienten, die mit diesen Medikamenten behandelt werden, ermöglicht.