

Ulf Bertram

Dr. med.

## **Untersuchungen in vitro und ex vivo zur Inhibition und Reversion der Thrombozytenaggregation durch Glykoprotein IIb/IIIa-Rezeptorinhibitoren**

Geboren am 16.04.1976 in Bremen

Reifeprüfung am 28.06.1996 in Landsberg/Lech

Studiengang der Fachrichtung Medizin vom SS 1997 bis WS 2003/2004

Physikum am 25.03.1999 an der Universität Heidelberg

Klinisches Studium in Heidelberg

Praktisches Jahr in Heidelberg

Staatsexamen am 25.11.2003 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Innere Medizin

Doktorvater: Priv.-Doz. Dr. med. J. Ruef

Integrinrezeptoren, insbesondere der Fibrinogenrezeptor GP IIb/IIIa auf Blutplättchen, haben in den letzten Jahren eine große Bedeutung in der Erforschung und der Therapie kardiovaskulärer Krankheiten erhalten. Die Blockade des aktivierten GP IIb/IIIa-Rezeptors als gemeinsame Endstrecke der Thrombozytenaktivierung mit monoklonalen Antikörpern (Abciximab), KGD-Analoga (Eptifibatide) und RGD-Analoga (Tirofiban) ist ein erfolgversprechender Ansatzpunkt in der antithrombotischen Therapie.

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals gezeigt, dass die drei derzeit handelsüblichen GP IIb/IIIa-Inhibitoren Abciximab, Eptifibatide und Tirofiban nicht nur in der Lage sind, die Thrombozytenaggregation zu inhibieren, sondern auch das Potential besitzen, frische Thromben zu disaggregieren.

Mit zwei voneinander unabhängigen Methoden, der turbidimetrischen Thrombozytenaggregationsmessung und einem neu entwickelten Versuchsaufbau mit GP IIb/IIIa-exprimierenden CHO-Zellen, konnte nachgewiesen werden, dass Abciximab, Eptifibatide und Tirofiban zu einer dosisabhängigen Disaggregation frisch gebildeter Thrombozytenaggregate führen. Die Dosierungen der Inhibitoren in den Versuchen entsprachen den bei der klinischen Anwendung erreichten Plasmakonzentrationen.

Es stellte sich heraus, dass die disaggregatorische Wirkung von Eptifibatide in der turbidimetrischen Thrombozytenaggregationsmessung signifikant höher als die von Abciximab

war. Diese Tatsache lässt sich dadurch erklären, dass die GP IIb/IIIa-Rezeptoren aggregierender oder gerade aggregierter Thrombozyten möglicherweise kleinmolekularen Antagonisten, wie Eptifibatid oder Tirofiban, besser zugänglich sind.

Da der Proteaseinhibitor Aprotinin das Disaggregationspotential in den Versuchsreihen nicht beeinflusste, kann der klassische fibrinolytische/proteolytische Mechanismus ausgeschlossen werden; vielmehr scheint die Thrombozytendisaggregation aufgrund eines Rezeptorantagonismus in Konkurrenz mit Fibrinogen zu entstehen.

Die Kombination einer reduzierten Dosis eines Thrombolytikums mit GP IIb/IIIa-Inhibitoren steht derzeit bei der pharmakologischen Therapie eines Myokardinfarkts im Mittelpunkt des Interesses. Zwei multizentrische Studien zur Prüfung dieser Kombinationstherapie dienten einem Teil der vorliegenden Arbeit als Grundlage: Die FASTER-Studie, bei der Tirofiban mit reduzierter TNK-tPA-Dosierung eingesetzt wurde und die GUSTO-V-Studie, bei der Abciximab mit reduzierter Reteplasedosierung appliziert wurde.

In der vorliegenden Arbeit wurde mit der klassischen Thrombozytenaggregometrie, dem Rapid Platelet Function Assay und der Durchflusszytometrie die Thrombozytenblockade unter dem jeweiligem Behandlungsschema evaluiert. Bei allen drei Messmethoden erschien Tirofiban in Kombination mit dem Fibrinolytikum hinsichtlich der Aggregationshemmung potenter als Abciximab. Zu den späteren Messzeitpunkten nach 48h zeigte sich die lange Wirkung von Abciximab. Die turbidimetrische Aggregation und das Rapid Platelet Function Assay ergaben weitgehend identische Werte bezüglich der Thrombozytenaggregationshemmung. Allerdings wurde nur bei letzterem die langanhaltende Wirkung von Abciximab nach 48 und 144 Stunden deutlich. In der Durchflusszytometrie hingegen lässt sich schon nach 24 Stunden kein deutlicher Unterschied zwischen den drei Behandlungsgruppen mehr nachweisen.

Zusätzlich wurde in der vorliegenden Arbeit durchflusszytometrisch untersucht, welchen Einfluss die verwendeten Therapieschemata auf die Interaktion zwischen Thrombozyten und Leukozyten haben. Durch Tirofiban/TNK-tPA wird die Interaktion zwischen Leukozyten und Thrombozyten, wie beispielsweise anhand der CD-45-positiven Neutrophilen gemessen, signifikant zu >90% inhibiert, während dies bei Abciximab/Reteplase 2 Stunden nach Therapiebeginn nur zirka 50% ausmacht.

Parallel hierzu zeigt sich, dass die P-Selectin-Expression auf stimulierten Thrombozyten, über die in erster Linie die Thrombozyten-Leukozyten Interaktion vermittelt wird, durch die Kombination Tirofiban/TNK-tPA nach 2 Stunden gegenüber dem Ausgangswert auch signifikant zu >90% blockiert wird. Während die Kombination Abciximab/Reteplase und Reteplase allein lediglich zu einer geringfügigen, nicht signifikanten Abnahme der P-Selectin-Expression führen.

Insgesamt konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass GP IIb/IIIa-Inhibitoren nicht nur ein antithrombotisches Potential besitzen, sondern zusätzlich in der Lage sind, frisch geformte Thrombozytenaggregate aufzulösen.

Weiterhin wurde gezeigt, dass die Kombinationen aus einem Fibrinolytikum in niedriger Dosierung und einem GP IIb/IIIa-Inhibitor eine ausreichende Thrombozytenblockade erzielen und auch die Interaktion zwischen Thrombozyten und Leukozyten blockierend beeinflussen.