

Aus dem Herzzentrum
Klinik und Poliklinik für Kardiologie/Angiologie
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
Direktor: Prof.Dr. Thomas Meinertz

**Der Effekt von Glykoprotein-IIb/IIIa-Rezeptorantagonisten auf die
Endothelfunktion bei Patienten mit symptomatischer koronarer
Herzerkrankung**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von

Isabel Ollmann
aus Hamburg

Hamburg 2006

Angenommen vom Fachbereich
der Universität Hamburg am: 24.07.2006

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs
Medizin der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: PD. Dr. T. Heitzer

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in: Prof. Dr. J. Westendorf
Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in: PD Dr. J. Kähler

Meinen Eltern in Liebe und Dankbarkeit gewidmet

Teile dieser Arbeit sind bereits veröffentlicht worden:

Heitzer T, **Ollmann I**, Köke K, Meinertz T, Münzel T (2003) Platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor blockade improves vascular nitric oxide bioavailability in patients with coronary artery disease. *Circulation* 108: 536-541

Abkürzungsverzeichnis

ACh	Acetylcholin
ADMA	asymmetrisches Dimethyl-Arginin
ADP	Adenosin-Diphosphat
CD40L	CD40 Ligand
cGMP	zyklisches Guanosin-Monophosphat
EDHF	Endothelium derived hyperpolarization factor
EDRF	Endothelium derived relaxing factor
GP	Glykoprotein
ICAM-1	intercellular adhesion molecule-1
LIBS	Ligandeninduzierte Bindungsstelle
L-NMMA	N ^G -monomethyl-L-Arginin
MCP-1	monocyte chemotactic protein-1
NaCl	Kochsalz
NAD(P)H	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
NPN	Nitroprussid-Natrium
PAI-1	Plasminogen Aktivator Inhibitor-1
PTCA	Perkutane transluminale Koronarangioplastie
RANTES	Regulated on activation normal T cell expressed and secreted
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RPFA	Rapid platelet function assay
sGC	lösliche Guanylcyclase
TNF- α	Tumor Nekrose Faktor- α
t-PA	Tissue-type Plasminogen Activator
UBF	Unterarmblutfluss
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule-1
vWF	von Willebrand Faktor

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG.....	3
1.1	ENDOTHELFUNKTION.....	4
1.2	MÖGLICHE PATHOMECHANISMEN DER ENDOTHELDYSFUNKTION.....	6
1.3	THROMBOZYTEN-INTERAKTIONEN UND ENDOTHELDYSFUNKTION BEI KORONARER HERZERKRANKUNG	8
1.4	WIRKMECHANISMUS DER GP-IIb/IIIa-REZEPTORANTAGONISTEN.....	10
1.4.1	Der Glykoprotein-IIb/IIIa-Rezeptor	10
1.4.2	Wirkstoffe	12
1.5	THROMBOZYTEN UND MIKROVASKULÄRE PERFUSION.....	13
1.6	ZIEL UND FRAGESTELLUNG	15
2	MATERIAL UND METHODEN	17
2.1	PATIENTENAUSWAHL.....	17
2.2	UNTERSUCHUNGSMETHODE.....	18
2.3	UNTERSUCHUNGSABLAUF	19
2.4	UNTERSUCHUNGSPROTOKOLLE	20
2.4.1	Untersuchungsprotokoll 1.....	20
2.4.2	Untersuchungsprotokoll 2.....	22
2.4.3	Untersuchungsprotokoll 3.....	22
2.5	CHOLINESTERASE-AKTIVITÄTSTEST	23
2.6	THROMBOZYTEN-FUNKTIONSTEST	23
2.7	STUDIENENDPUNKTE	24
2.8	STATISTISCHE ANALYSEN.....	24
3	ERGEBNISSE.....	26
3.1	EFFEKT DER GLYKOPROTEIN-IIb/IIIa-REZEPTORBLOCKADE MIT TIROFIBAN AUF DIE ENDOTHELABHÄNGIGE UND -UNABHÄNGIGE VASODILATATION	27
3.1.1	Effekt von Tirofiban auf die endothelabhängige Vasodilatation.....	27
3.1.2	Effekt von Tirofiban auf die L-NMMA-induzierte Vasokonstriktion bei gleichzeitiger Acetylcholin-Infusion	28
3.1.3	Effekt von Tirofiban auf die endothelunabhängige Vasodilatation	28
3.2	EFFEKT DER GLYKOPROTEIN-IIb/IIIa-REZEPTORBLOCKADE MIT TIROFIBAN AUF DIE ENDOTHELABHÄNGIGE UND -UNABHÄNGIGE VASODILATATION SECHS STUNDEN NACH ENDE DER INFUSION	29
3.2.1	Effekt von Tirofiban auf die endothelabhängige Vasodilatation sechs Stunden nach Infusionsende	29
3.2.2	Effekt von Tirofiban auf die endothelunabhängige Vasodilatation sechs Stunden nach Infusionsende.....	30

3.2.3	Effekt von Tirofiban auf die Thrombozytenfunktion in vitro	31
3.3	EFFEKT DER GLYKOPROTEIN-IIb/IIIa-REZEPTORBLOCKADE MIT EPTIFIBATIDE AUF DIE ENDOTHELABHÄNGIGE UND –UNABHÄNGIGE VASODILATATION	32
3.3.1	Effekt von Eptifibatide auf die endothelabhängige Vasodilatation.....	32
3.3.2	Effekt von Eptifibatide auf die L-NMMA-induzierte Vasokonstriktion bei gleichzeitiger Acetylcholin-Infusion	33
3.3.3	Effekt von Eptifibatide auf die endothelunabhängige Vasodilatation.....	34
4	DISKUSSION.....	36
4.1	WIRKUNG DER GP-IIb/IIIa-REZEPTORBLOCKADE AUF DIE MIKROVASKULÄRE PERFUSION.....	37
4.2	WECHSELWIRKUNGEN ZWISCHEN ENDOTHELZELLEN UND THROMBOZYTEN	39
4.3	OXIDATIVER STRESS UND AKTIVIERTE THROMBOZYTEN	41
4.4	INFLAMMATION UND THROMBOZYTEN	43
4.4.1	Wechselwirkungen zwischen Thrombozyten und Leukozyten.....	43
4.4.2	Rolle des CD40/CD40 Ligand Systems	45
4.5	AUSBLICK	48
5	ZUSAMMENFASSUNG	49
6	LITERATURVERZEICHNIS.....	51
7	ANHANG.....	67
7.1	DANKSAGUNG	67
7.2	LEBENS LAUF.....	68
7.3	EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG.....	69

1 EINLEITUNG

Die koronare Herzerkrankung gehört in Deutschland trotz verbesserter Aufklärung und Entwicklung neuer Medikamente nach wie vor zu den Haupttodesursachen [Statistisches Bundesamt in Wiesbaden, 2002].

Sie beruht auf atherosklerotischen Ablagerungen in den Herzkranzgefäßen, an deren pathophysiologischem Anfang die Endothelläsion steht. Bei defektem Endothel kommt es im Rahmen einer Entzündungsreaktion durch Einlagerung von Low-density lipoprotein cholesterol, Schaumzellbildung und Expression von Adhäsionsmolekülen zur Plaquebildung. Bei Ruptur einer solchen Plaque kommt es zu Thrombozytenaktivierung mit Bildung wandständiger Thromben [Ross, 1999], was zum Bild des akuten ischämischen Koronarsyndroms führt [Fuster, 1992]. Durch die Aktivierung der Thrombozyten werden außerdem die Endothelzellen stimuliert und zur Expression inflammatorischer Faktoren angeregt [Henn, 1998]. Somit scheinen die heterotypen Interaktionen zwischen aktivierten Thrombozyten und Endothelzellen eine wichtige Rolle bei der Entstehung atherosklerotischer Prozesse zu spielen.

Mehrere große Studien der letzten Jahre haben gezeigt, dass durch den Einsatz von Glykoprotein-IIb/IIIa-Rezeptorantagonisten, welche die gemeinsame Endstrecke der Thrombozytenaggregation hemmen, eine Reduzierung der thrombotischen Komplikationen nach Stentimplantation oder bei akuten Koronarsyndromen erreichbar ist [Harrington, 1999] [Boersma, 2002] [Karvouni, 2003]. Ferner wurde eine Verbesserung der myokardialen mikrovaskulären Perfusion beobachtet [Neumann, 1998] [de Lemos, 2000]. Bereits vor einiger Zeit wurde publiziert, dass die GP-IIb/IIIa-Rezeptorblockade bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung einen günstigen Effekt auf die endothelabhängige Vasodilatation nach Stentimplantation hat [Aymong, 2002]. Derselbe positive Einfluss wurde auch bei durch septischen Schock ausgelöster Endotheldysfunktion im Tiermodell nachgewiesen [Pu, 2001].

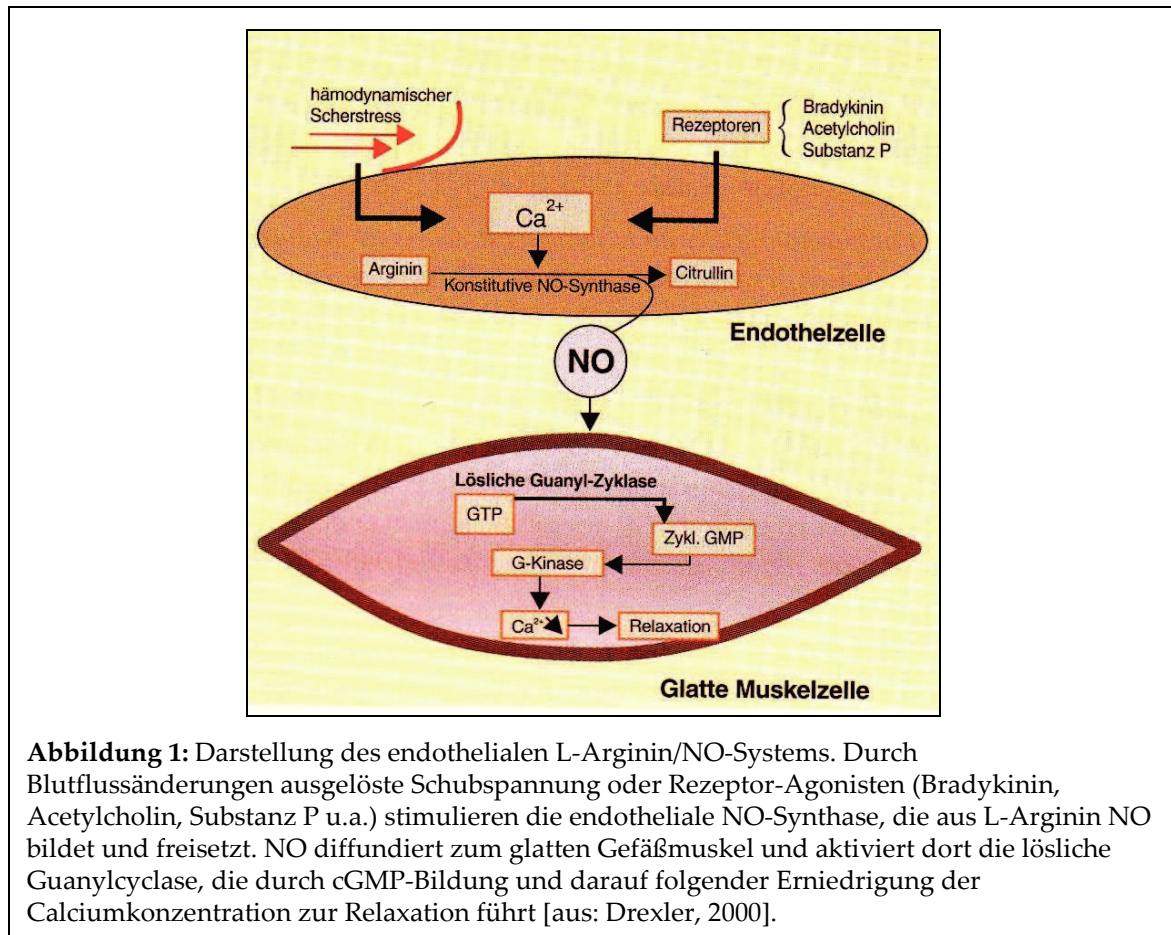
Bisher nicht geklärt worden ist jedoch, ob mit Hilfe der GP-IIb/IIIa-Rezeptorblockade die Endothelfunktion bei Patienten mit symptomatischer koronarer Herzerkrankung auch unabhängig von Thrombusbildung und Koronarintervention verbessert werden kann.

1.1 Endothelfunktion

Das Endothel ist eine einschichtige Lage von Zellen und wurde lange Zeit lediglich als mechanische Barriere gesehen, die den Blutstrom von der Gefäßwand trennt. Heute ist jedoch nachgewiesen, dass es neben der Innenauskleidung der Gefäße auch für die Regulation des Gefäßtonus, die Thrombozytenaggregation, die Adhäsion von Monozyten und Leukozyten und für die Proliferation glatter Muskelzellen eine Rolle spielt [Cohen, 1995], in dem es viele vasoaktive Substanzen selbst bildet und freisetzt sowie andere um- oder abbaut [Vane, 1990]. Ein Schlüsselmolekül im Rahmen der komplexen Endothelfunktion ist Stickstoffmonoxid (NO). Im Jahr 1980 beschrieben Furchgott und Zawadzki, dass Acetylcholin nur bei intaktem Endothel vasodilatierend wirkt. Bei geschädigtem Endothel kommt es aber infolge direkter Acetylcholinwirkung am glatten Gefäßmuskel zu einer Vasokonstriktion [Furchgott, 1980]. Sie machten eine vom Endothel freigesetzte Substanz ausfindig, die sie „Endothelium derived relaxing factor“ (EDRF) nannten und die später als Stickstoffmonoxid (NO) identifiziert wurde. NO wird mit Hilfe des Enzyms NO-Synthase (NOS III) aus der Aminosäure L-Arginin gebildet [Palmer, 1987].

Das gebildete NO diffundiert zum Lumen und ruft dort sowohl eine Hemmung der Thrombozytenadhäsion und -aggregation [Radomski, 1987] - und verhindert damit die Bildung vasokonstriktiver Substanzen wie Serotonin und Thromboxan A₂ - als auch eine Hemmung der Leukozytenadhäsion und -infiltration [Kubes, 1991] hervor und blockiert somit einen wichtigen Initialschritt in der Pathogenese der Atherosklerose. Außerdem diffundiert NO

zum glatten Gefäßmuskel und führt über eine Stimulation der löslichen Guanylcyclase (sGC) mit darauf folgender Konzentrationserhöhung des zyklischen Guanodin-Monophosphates (cGMP) zur vaskulären Relaxation [Waldman, 1988].



Weiterhin ist gezeigt worden, dass NO in hohen Konzentrationen die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen hemmt [von der Leyen, 1995]. Bei mechanischer Entfernung des Endothels kommt es im Experiment zur raschen Ablagerung von Thrombozyten und Leukozyten, verstärkter Neointima-Bildung und zur Steigerung des Gefäßtonus.

Die endothelabhängige Vasodilatation erfolgt sowohl durch basale als auch stimulierte Freisetzung von NO. Dabei spielen Scherkräfte und pulsatile Dehnung, die bei Blutflussänderungen am Endothel wirksam werden, die wichtigste Rolle. Weiterhin kann es durch zirkulierende oder lokale Agonisten

wie Acetylcholin, Bradykinin, Substanz P, Serotonin oder Adenosin-Diphosphat (ADP) zur NO-Ausschüttung kommen [Moncada, 1991].

Inhibiert man die endotheliale NO-Bildung durch Infusion von Arginin-Analoga wie dem N^G-monomethyl-L-Arginin (L-NMMA), fällt bei gesunden Personen der Ruheblutfluss um ca. 30-40% ab [Vallance, 1989]. Daraus lässt sich der Anteil an basal freigesetztem NO ablesen. Dosisabhängige Anstiege des Blutdrucks bei systemischer Infusion von L-NMMA sind ebenfalls beobachtet worden [Stamler, 1994]. Dies lässt darauf schließen, dass eine kontinuierliche endotheliale NO-Freisetzung die Gefäße permanent in einem relaxierten Zustand hält, der für die Regulation des Blutflusses und Blutdruckes von großer Wichtigkeit ist. Es wurde bei In-vitro-Untersuchungen beobachtet, dass eine Blutflusssteigerung nur bei intaktem Endothel zu einer Dilatation führt; bei Gefäßen, deren Endothel entfernt wurde, zeigte sich keine Reaktion.

1.2 Mögliche Pathomechanismen der Endotheldysfunktion

Die verminderte Bioverfügbarkeit des endothelialen NO stellt eine wichtige Komponente der Endotheldysfunktion dar. Störungen, die zu einer verminderten NO-Aktivität führen, können entweder die Synthese von NO oder den Abbau bzw. die Antagonisierung von NO betreffen.

Die verstärkte Inaktivierung von NO ist in erster Linie auf die vermehrte Bildung freier Sauerstoffradikale, vor allem Superoxidanionen (O_2^-) - bezeichnet als oxidativer Stress - zurückzuführen, die rasch mit NO reagieren [Gryglewski, 1986]. Dabei bilden sich hochtoxische Metabolite wie Peroxynitrite ($ONOO^-$), die das Endothel schädigen können [Beckman, 1996].

Durch Experimente mit Cholesterin-gefütterten Kaninchen wurde nachgewiesen, dass in atherosklerotischen Gefäßen aufgrund einer erhöhten Superoxidproduktion eine gesteigerte NO-Inaktivierung stattfindet [Ohara, 1993]. Durch Verabreichung von Superoxid-Dismutase konnte die Endothelfunktion positiv beeinflusst werden [Mugge, 1991]. Tierexperimente

zeigten, dass eine erhöhte Konzentration von Sauerstoffradikalen zur gestörten Endothelfunktion beiträgt [Keaney, 1995]. Auch bei einer Untersuchung bezüglich der Prognose von Patienten mit koronarer Herzkrankheit wurde deutlich, dass Endotheldysfunktion und oxidativer Stress das Risiko für das Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse erhöhen [Heitzer, 2001]. Wichtig erscheint im Zusammenhang mit der jetzigen Studie vor allem die Tatsache, dass aktivierte Thrombozyten selbst reaktive Sauerstoffpezies (ROS) bilden können [Wachowicz, 2002] und so entscheidend zur Endotheldysfunktion beitragen.

Ferner kann eine verminderte Verfügbarkeit von Substraten und Kofaktoren der NO-Synthase zu einem Mangel an NO führen. Dafür sprechen die positiven Wirkungen auf die endotheliale Vasodilatation bei Patienten mit Hypercholesterinämie, denen L-Arginin [Drexler, 1991] und Tetrahydrobiopterin (BH₄), ein wichtiger Kofaktor der NO-Synthase, [Stroes, 1997] verabreicht wurde. Weitere Studien zeigten, dass die NO-Synthase bei einem Mangel an Tetrahydrobiopterin und L-Arginin selbst Sauerstoffradikale bildet [Cosentino, 1998] [Vergnani, 2000].

Weitere Mechanismen der Endotheldysfunktion sind eine selektive Störung der Gi-Proteine, die an bestimmte Rezeptoren gekoppelt sind (u.a. für aggregierende Thrombozyten, Thrombin, Serotonin) und die vermehrte Bildung von asymmetrischem Dimethyl-Arginin (ADMA), das L-Arginin kompetitiv hemmt [Shimokawa, 1991] [Boger, 1998] [Loscalzo, 2000].

Die verminderte NO-Verfügbarkeit hat neben der abgeschwächten endothelabhängigen Relaxation der Koronargefäße auch andere Funktionsstörungen des Endothels zur Folge, wie u.a. vermehrte Leukozyten- und Monozytenadhäsion, Intimaproliferation und Neigung zur Thrombozytenaggregation. Eine Dysfunktion führt somit dazu, dass das

Endothel seine ursprünglich athrombogene Oberfläche verliert und es zu Plaque- bzw. Thrombusbildung kommen kann [Fuster, 1992].

1.3 Thrombozyten-Interaktionen und Endotheldysfunktion bei koronarer Herzerkrankung

Die Endotheldysfunktion ist das erste klinisch fassbare Korrelat für ein Frühstadium der Atherosklerose und bezeichnet im engeren Sinne Störungen, die auf eine verminderte NO-Aktivität oder NO-Verfügbarkeit zurückzuführen sind und mit einer verminderten endothelabhängigen Vasodilatation einhergehen. Umfangreiche klinische Studien haben gezeigt, dass dabei gleichzeitig auch andere essentielle Funktionen des Endothels beeinträchtigt sind. Daher wird die gestörte endothelabhängige Vasodilatation als Indikator für eine funktionelle Endothelschädigung interpretiert, jedoch nicht mit ihr gleichgesetzt.

Im Tierversuch zeigte sich, dass intaktes Endothel eine wichtige Rolle beim Schutz vor Thrombenbildung, Atherosklerose und Vasokonstriktion spielt [Badimon, 1992]. In mehreren Studien wurde beobachtet, dass sowohl bei Patienten mit manifester Atherosklerose als auch bereits bei Vorliegen kardiovaskulärer Risikofaktoren die endothelabhängige Vasodilatation in den koronaren und peripheren Gefäßen reduziert ist [Vita, 1990] [Anderson, 1995].

Schon früh wurde von Ludmer et al. gezeigt, dass bei Koronargefäßen mit endothelialer Dysfunktion die Acetylcholin-Zufuhr nicht zu einer Vasodilatation, sondern zu einer Vasokonstriktion führt [Ludmer, 1986]. Durch weitere Untersuchungen wurde deutlich, dass die Störung der endothelabhängigen Vasodilatation nicht nur atherosklerotische Gefäße betrifft, sondern auch in glattwandigen Koronarabschnitten von Patienten mit Atherosklerose in anderen Gefäßgebieten und in Patienten mit atypischer

Angina pectoris und normalem Koronarangiogramm auftreten kann [Werns, 1989] [Vrints, 1992].

In-vivo-Untersuchungen bei Patienten mit Atherosklerose zeigten, dass die verminderte Vasodilatation nach Acetylcholin-Gabe zum Großteil durch eine verminderte NO-Verfügbarkeit bedingt ist [Quyyumi, 1997]. So wurde ebenfalls nachgewiesen, dass in atherosklerotischen Koronararterien sowohl die basale als auch die stimulierte Freisetzung von NO vermindert ist [Chester, 1990]. Das bedeutet aber auch, dass die hemmende Wirkung von NO auf die Thrombozytenaggregation bei diesen Patienten reduziert ist.

Endotheldysfunktion und verminderte NO-Bioverfügbarkeit, wie sie bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit vorkommen, prädisponieren offenbar zu gestörten Wechselwirkungen zwischen Endothelzellen und Thrombozyten sowie ungehinderter Thrombozytenaktivierung und damit einhergehender Vasokonstriktion. Dies demonstrierten die Arbeitsgruppen um Cohen und Houston bereits vor zwanzig Jahren. Dabei ist von Bedeutung, dass diese Vasokonstriktion durch Thrombozyten prinzipiell nur an geschädigtem oder vollständig entferntem Endothel möglich ist, während intaktes Endothel die Gefäße vor Vasokonstriktion schützt. Wichtig sind in diesem Zusammenhang vasoaktive Substanzen wie Thromboxan A_2 und Serotonin, die von Thrombozyten selbst freigesetzt werden [Cohen, 1983] [Houston, 1986]. Daher erscheint es möglich, durch eine wirksame Thrombozytenhemmung diese vasokonstriktorisches Effekte zu vermindern. Tatsächlich wurde bereits in vitro gezeigt, dass mit Hilfe von GP-IIb/IIIa-Rezeptorblockade die Thrombozyten-induzierte Vasokonstriktion verhindert werden kann [Sheu, 1997].

Gesteigerte Thrombozytenaktivierung führt nicht nur zu Vasokonstriktion, sondern auch – wie neueste Untersuchungen gezeigt haben – zu Entzündungsprozessen, die eine entscheidende Rolle in der Pathogenese thrombotischer Koronar-Ereignisse spielen.

Zum einen sind hier heterotype Interaktionen zu nennen, die in Form von Aggregaten zwischen Thrombozyten und Leukozyten atherosklerotische Läsionen verursachen [Huo, 2003]. Zum anderen kann das Oberflächenmolekül CD40L, das auf aktivierten Thrombozyten vermehrt exprimiert wird, auf den Endothelzellen inflammatorische Prozesse induzieren [Henn, 1998]. Außerdem führen die heterotypen Interaktionen von Thrombozyten und Leukozyten zu einer verstärkten Aktivierung von Leukozyten, die wiederum Sauerstoffradikale freisetzen und dadurch das Endothel schädigen können. Ferner wird durch Thrombozyten die Produktion von diversen inflammatorisch wirkenden Chemokinen und Zytokinen aus Endothelzellen und Leukozyten gefördert. So könnten durch eine wirksame Thrombozytenhemmung auch Entzündungsreaktionen vermindert werden. In der Tat konnten Neumann et al. bereits anti-inflammatorische Effekte durch Gabe von GP-IIb/IIIa-Rezeptorantagonisten nachweisen [Neumann, 1999].

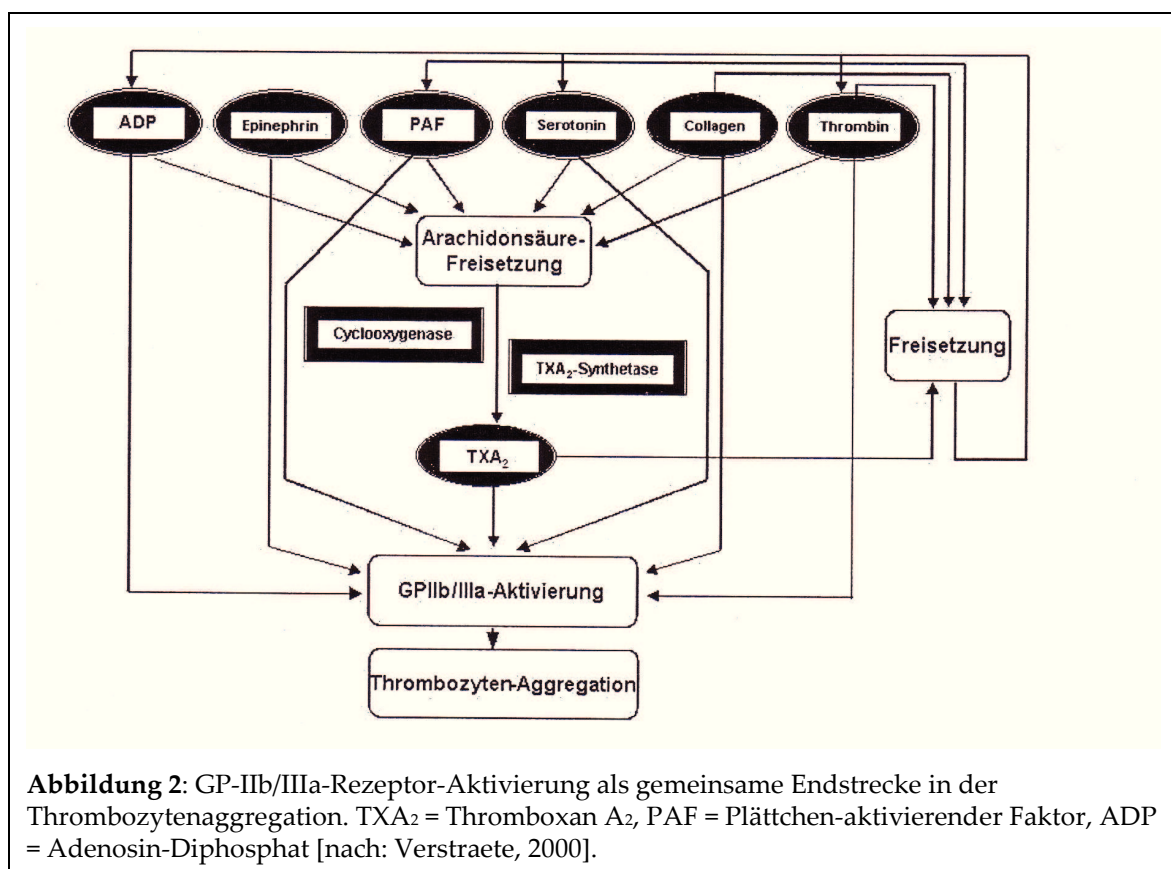
1.4 Wirkmechanismus der GP-IIb/IIIa-Rezeptorantagonisten

1.4.1 Der Glykoprotein-IIb/IIIa-Rezeptor

Infolge einer Gefäßschädigung durch Ruptur einer atherosklerotischen Plaque werden subendotheliale Stoffe wie Kollagen, Fibronectin und von Willebrand Faktor (vWF) frei gesetzt, die sich mit der Thrombozytenoberfläche verbinden. Dadurch kommt es zu einer Aktivierung der Thrombozyten und ihrer GP-IIb/IIIa-Rezeptoren. Diese Rezeptoren stellen die wichtigste Schaltstelle zur Thrombozytenaktivierung dar und gehören zur Gruppe der Integrine, bestehend aus einer α IIb- und einer β 3-Untereinheit, die durch nicht-kovalente Calcium-abhängige Bindungen verbunden sind [Gawaz, 1999].

Unter physiologischen Bedingungen befinden sich die GP-IIb/IIIa-Rezeptoren im Ruhezustand und haben nur eine geringe Affinität zu Fibrinogen. Die Aktivierung der Thrombozyten durch verschiedene Substanzen – wie u.a. das durch Gefäßwandverletzung freigesetzte Kollagen oder im Thrombozyten

selbst gebildetes ADP, Serotonin und Thromboxan A₂ – führt zu einer Konformationsänderung der Rezeptoren, deren Affinität zu Fibrinogen dadurch immens ansteigt. Die Quervernetzung mit anderen Thrombozyten wird dann vermittelt durch ein Fibrinogenmolekül, welches als Brücke zwischen den jeweiligen GP-IIb/IIIa-Rezeptoren dient [Gawaz, 1991]. Der GP-IIb/IIIa-Rezeptor stellt somit die gemeinsame Endstrecke in der Thrombozytenaggregation dar, unabhängig von dem Agonisten, der die Aktivierung initiiert hat [Phillips, 1991].

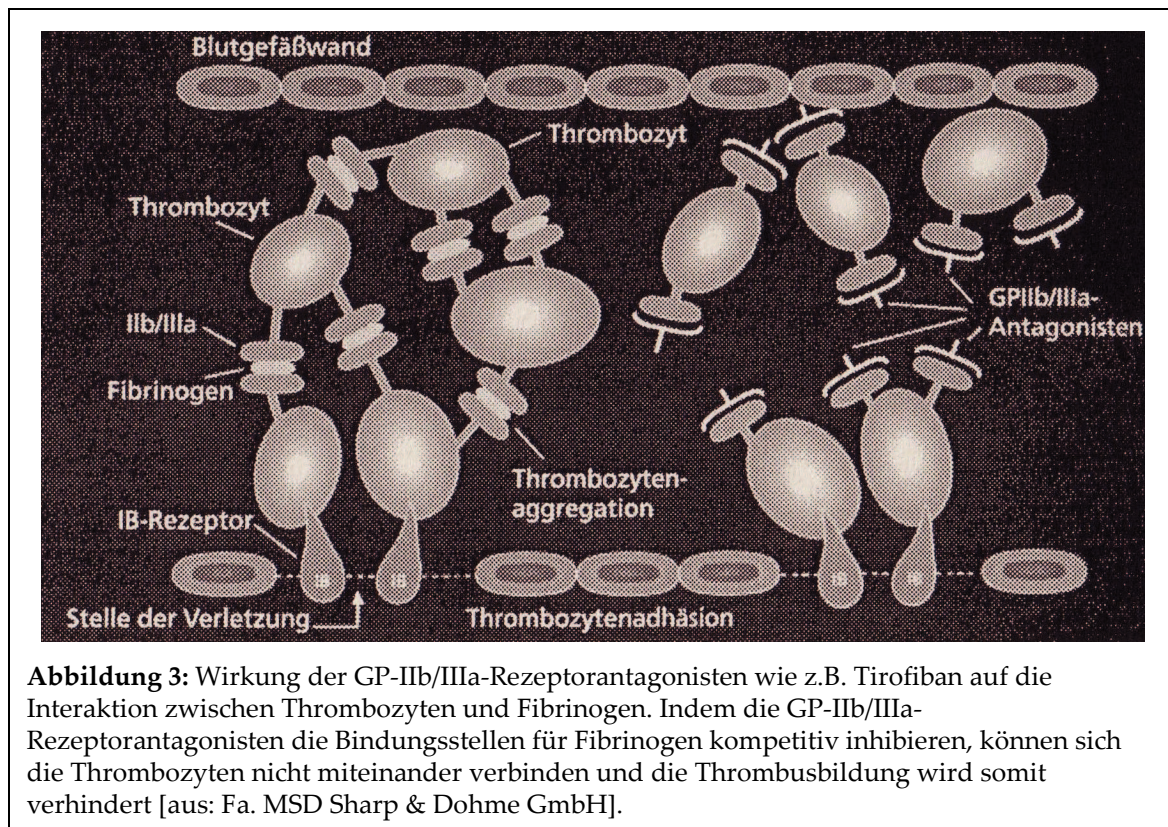


Zusätzlich führt die Aktivierung der Thrombozyten zu sekundären Konformationsänderungen am Rezeptor mit Freilegung ligandeninduzierter Bindungsstellen (LIBS), die zum so genannten „Outside-in signaling“ führen, das heißt der GP-IIb/IIIa-Rezeptor wirkt außerdem als Primärrezeptor in das Zellinnere. Die LIBS-Aktivierung führt zur Ausschüttung der α -Granula und zur Produktion vasokonstriktorischer und Thrombozytenaggregation auslösender Stoffe wie ADP, Serotonin und Thromboxan A₂ [Gawaz, 1999].

Während an der Thrombozytenadhäsion mehrere Membranglykoproteine beteiligt sind, beruht die Aggregation ausschließlich auf einer Interaktion zwischen aktivierten GP-IIb/IIIa-Rezeptoren und Fibrinogen [Lefkovits, 1995]. Somit ist es möglich, durch Blockade mit GP-IIb/IIIa-Rezeptorantagonisten die Thrombozytenaggregation zu unterdrücken. Bereits 1985 gelang es Collier et al., einen murinen Antikörper zu entwickeln, der im Tiermodell erfolgreich zur Blockade der Thrombozytenaggregation eingesetzt wurde [Collier, 1985]. Dies führte zur Entwicklung der Substanzen mit sehr potenter antiaggregatorischer Wirkung, den Glykoprotein-IIb/IIIa-Rezeptorantagonisten.

1.4.2 Wirkstoffe

Der erste für die Behandlung am Menschen zugelassene Wirkstoff war 1994 Abciximab [Lefkovits, 1996], ein humanisiertes c7E3 Fab-Antikörperfragment der Maus, das irreversibel nicht-kompetitiv den thrombozytären GP-IIb/IIIa-Rezeptor blockiert [Faulds, 1994]. Da die Fibrinogen-bindende Aminosäuresequenz Arginin-Glycin-Aspartat (RGD) identifiziert wurde [Plow, 1992] [Ginsberg, 1995], kann prinzipiell jede Substanz, die diese Bindungssequenz simuliert, an den GP-IIb/IIIa-Rezeptor binden und ihn somit blockieren. So kam es zur Entwicklung synthetischer Substanzen in Form von Peptiden wie z.B. Tirofiban und Eptifibatide, deren Wirksamkeit in mehreren großen klinischen Studien nachgewiesen wurde [Boersma, 2002].



Tirofiban (Aggrastat®) ist ein Peptidomimetikum, das durch Nachahmung der RGD-Sequenz mit Fibrinogen kompetitiv um die Bindung an den GP-IIb/IIIa-Rezeptor konkurriert. Eptifibatid (Integrilin®) ist ein niedermolekulares Peptid, das ebenfalls kompetitiv mit Fibrinogen um die GP-IIb/IIIa-Rezeptorbindung konkurriert. Es enthält außerdem eine KGD-Sequenz (Lysin-Glycin-Aspartat), welche die Bindung von Fibrinogen inhibiert [Coller, 2001].

Es handelt sich dabei in beiden Fällen um einen hochselektiven reversiblen Wirkmechanismus mit schnellem Wirkungseintritt und -verlust. Dies bedingt eine gute Steuerbarkeit der Substanzen.

1.5 Thrombozyten und mikrovaskuläre Perfusion

Mit Hilfe von GP-IIb/IIIa-Rezeptorblockern, die die Endstrecke der Thrombozytenaggregation hemmen, wird sowohl eine Steigerung des epikardialen als auch des mikrovaskulären Flusses erzielt [Neumann, 1998] [de Lemos, 2000]. Dies wird meist damit begründet, dass eine Thrombusbildung

und die damit verbundene Gefäßverengung verhindert werden. Allerdings können aktivierte Thrombozyten auch ohne Thrombus eine mikrovaskuläre Vasokonstriktion verursachen, in dem sie bereits genannte vasoaktive Substanzen ausschütten. Durch wirksame Thrombozytenhemmung könnte dem somit entgegen gewirkt werden. Dies wiederum würde sich dann günstig auf die mikrovaskuläre Perfusion auswirken. Die Forschungsgruppe um Yao und Willerson demonstrierte dies schon vor einiger Zeit mit dem Thrombozytenaggregationshemmer Clopidogrel [Yao, 1993]. Auch nach Gabe von GP-IIb/IIIa-Rezeptorantagonisten wurde dieser positive Effekt im Rahmen von Tierexperimenten gezeigt [Shen, 2000] [Pu, 2001]. Bei Patienten nach Stentimplantation wurde ebenfalls eine verbesserte koronare Perfusion und endotheliale Vasodilatation beschrieben [Aymong, 2002]. Nicht untersucht wurde jedoch bisher, ob diese Wirkung auch ohne Koronarintervention bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung durch GP-IIb/IIIa-Rezeptorblockade hervorgerufen werden kann.

1.6 Ziel und Fragestellung

Neben ihrer Neigung zur Aggregation können aktivierte Thrombozyten auch durch Freisetzung vasokonstriktorischer Substanzen wie ADP, Thromboxan A₂ oder Serotonin wesentlich zu einer verminderten Perfusion der Mikrozirkulation beitragen. Es ist bereits gezeigt worden, dass der Einsatz von GP-IIb/IIIa-Rezeptorblockern im Rahmen von Koronarinterventionen sowohl den epikardialen Fluss und die mikrovaskuläre Perfusion als auch die Endothelfunktion verbessert. Nicht untersucht wurde jedoch bisher, ob ein positiver Effekt auf die Endothelfunktion auch ohne Thrombusbildung und Koronarintervention erzielt werden kann.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, herauszufinden, inwieweit mit einer Thrombozytenhemmung durch GP-IIb/IIIa-Rezeptorantagonisten die endothelvermittelte Vasodilatation verbessert werden kann. Dazu wurde mit Hilfe der Venenverschlussplethysmographie der Effekt der Glykoprotein-IIb/IIIa-Rezeptorblockade auf die endothelabhängige und –unabhängige Vasodilatation peripherer Widerstandsgefäße bei Patienten mit symptomatischer koronarer Herzkrankheit untersucht. Auch die endotheliale NO-Verfügbarkeit wurde durch L-NMMA-induzierte Hemmung der NO-Synthase mit untersucht.

- Zunächst sollte die Wirkung der GP-IIb/IIIa-Rezeptorblockade mit Tirofiban auf die endothelabhängige und –unabhängige Gefäßrelaxation bei Patienten mit symptomatischer koronarer Herzkrankheit untersucht werden. Zusätzlich sollte mit Hilfe der Infusion des NOS-Inhibitors L-NMMA sowohl die basale als auch die stimulierte NO-Aktivität geprüft werden. Eine Untergruppe von Patienten wurde sechs Stunden nach Ende der Tirofiban-Infusion erneut untersucht.

-
- In-vitro-Untersuchungen sollten klären, inwieweit die verwendeten GP-IIb/IIIa-Rezeptorantagonisten Tirofiban und Eptifibatide die Thrombozytenaggregation hemmen, um einen möglichen Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der Inhibierung der Thrombozytenfunktion und der Wirkung der Substanzen auf die Endothelfunktion herzustellen.
 - Auch die Wirkung der GP-IIb/IIIa-Rezeptorblockade mit Eptifibatide auf die endothelabhängige und –unabhängige Gefäßrelaxation sollte bei Patienten mit symptomatischer koronarer Herzkrankheit untersucht werden, um zu prüfen, ob ein möglicher Effekt eher der Substanzklasse der GP-IIb/IIIa-Rezeptoren oder dem jeweiligen Wirkstoff selbst zuzuschreiben ist. Auch hier sollte außerdem die basale und die stimulierte NO-Verfügbarkeit geprüft werden.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Patientenauswahl

Es wurden insgesamt 40 Patienten mit symptomatischer koronarer Herzerkrankung untersucht, bei denen eine angiographisch dokumentierte signifikante Stenose mindestens eines Herzkranzgefäßes vorlag. Im weiteren Verlauf war bei diesen Patienten eine PTCA sowie eine begleitende Therapie mit Glykoprotein-IIb/IIIa- Rezeptorantagonisten im Sinne von Tirofiban (Aggrastat[®], MSD Sharp & Dohme GmbH) oder Eptifibatide (Integrilin[®], Essex Pharma GmbH) geplant.

Ausschlusskriterien bestanden für Personen mit akutem Myokardinfarkt, Herzinsuffizienz, unkontrolliertem Hypertonus, erhöhter Blutungsneigung sowie mit anderen schwerwiegenden chronischen Grunderkrankungen nicht-kardialer Genese.

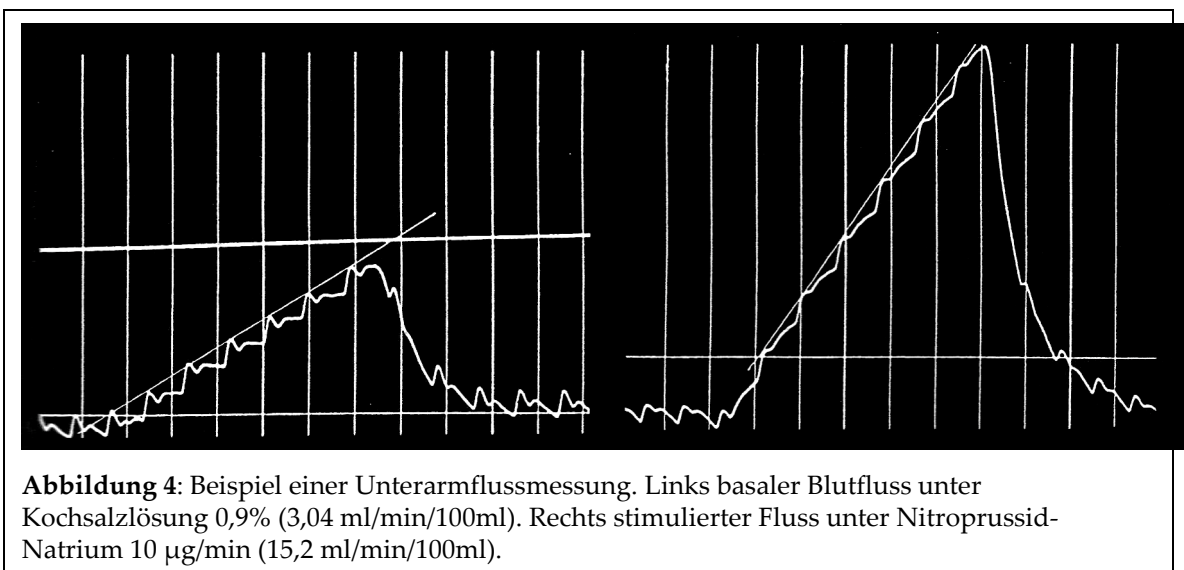
Antihypertensive Medikamente wie ACE-Hemmer, Beta-Blocker, Calciumantagonisten oder langwirksame Nitrate wurden mindestens 18 Stunden vor Beginn der Untersuchung abgesetzt. Keiner der Patienten erhielt vorher eine Therapie mit GP-IIa/IIIb- Rezeptorantagonisten für wenigstens 60 Tage. Alle Patienten wurden mit einer täglichen Dosis von 100 mg Aspirin behandelt.

Bei allen Patienten wurde der Unterarmblutfluss mittels Venenverschlussplethysmographie gemessen, wobei 27 Teilnehmer mit Tirofiban und 13 mit Eptifibatide behandelt wurden.

Das Studienprotokoll wurde von der zuständigen Ethik- Kommission geprüft und genehmigt. Alle Probanden gaben nach einem Aufklärungsgespräch ihr schriftliches Einverständnis.

2.2 Untersuchungsmethode

Der Unterarmblutfluss wurde mit Hilfe der venösen Okklusionsplethysmographie bestimmt, welche nach folgendem Prinzip funktioniert: Legt man am Oberarm eine Blutdruckmanschette an und pumpt diese soweit auf, dass nur noch der arterielle Einstrom möglich ist, nicht aber der venöse Abfluss, kommt es zu einer Volumenzunahme des Arms im distal der Manschette gelegenen Bereich, die sich proportional zum arteriellen Einstrom verhält. Durch diese Volumenzunahme kommt es zu einer Änderung des Umfangs, jedoch nicht zu einer Lageänderung. Diese Umfangsänderung wird mit Hilfe eines Dehnungsmessstreifens gemessen. Bei diesem handelt es sich um einen mit Quecksilber gefüllten Silikonschlauch, der an der Stelle des Unterarmes mit dem größten Umfang eng angelegt wird. Die Dehnungsänderung des Quecksilbers wird mittels einer Wheatstonsche Brücke im Plethysmographen als Widerstandsänderung erfasst, in eine Signalspannung umgewandelt und in Abhängigkeit von der Zeit graphisch dargestellt. So ergibt sich der Blutfluss in Milliliter pro Minute pro 100 ml Unterarmvolumen (ml/min/100ml). Abbildung 4 zeigt ein Beispiel einer Unterarmflussmessung.



2.3 Untersuchungsablauf

Alle Untersuchungen fanden bei einer Raumtemperatur von ca. 23° C statt. Unter Lokalanästhesie mit Lidocain® 2% wurde unter sterilen Bedingungen am liegenden Patienten ein Verweilkatheter der Größe 20 G in die Arteria brachialis des nicht-dominanten Armes eingeführt, welcher etwa auf Höhe des rechten Ventrikels gelagert wurde. Während einer 20minütigen Ruhezeit, die dazu diente, mögliche Verfälschungen des basalen Unterarmblutflusses durch die Punktion auszugleichen und so bei den Probanden stabile Ausgangsmessungen zu erzielen, wurde über eine Infusionspumpe (Braun, Melsungen) eine 0,9%ige Kochsalzlösung mit einer Geschwindigkeit von 0,4 ml/min infundiert, was für die gesamte Untersuchungsdauer beibehalten wurde. Weiterhin wurde ein Quecksilberdehnungsmessstreifen an der breitesten Stelle des Unterarms angelegt, der an den Plethysmographen (Hokanson, Washington DC, USA) angeschlossen war, um die Volumenänderung zu erfassen. Der Plethysmograph seinerseits wurde zur Datenerfassung mit einem Macintosh Personal Computer verbunden. Um den venösen Abfluss zu verhindern, wurde eine am Oberarm angebrachte Blutdruckmanschette durch ein spezielles Kompressorsystem für ca. 5 Sekunden auf 40 mmHG aufgepumpt und wieder abgelassen. Der Arm des Probanden wurde auf einem Keilkissen ein wenig hoch gelagert, um einen raschen venösen Abstrom nach Ablassen der Manschette zu gewährleisten. Eine Kinderblutdruckmanschette wurde am Handgelenk angelegt und während der Messungen auf 200 mmHG aufgepumpt, um Schwankungen durch Blutzirkulationen an der Hand auszuschließen. Die Flusskurven wurden - bei einer Messdauer von 5-7 Minuten pro Messpunkt - alle 10 Sekunden über einen Zeitraum von 5 Sekunden aufgezeichnet. Für die Berechnung des mittleren Flusses wurden jeweils sieben aufeinander folgende Messungen ausgewertet. Der Blutfluss wurde in ml/ min/100ml Unterarmvolumen angegeben.

Vor jeder Flussmessung unter Infusion der vasoaktiven Testsubstanzen wurde zunächst der basale Ruhefluss bestimmt. Nach der Maximaldosis jeder Substanz wurde eine Auswaschphase bis zum erneuten Erreichen des Basalflusses zwischengeschaltet.

Zur Beurteilung der endothelabhängigen Vasorelaxation wurde Acetylcholin (Miovisin, Farmigea) in steigenden Dosisstufen von 7,5 µg/min – 15 µg/min – 30 µg/min infundiert. Anschließend erfolgte parallel dazu eine Infusion mit dem NOS-Inhibitor N^G-monomethyl-L-Arginin (L-NMMA) in einer Dosierung von 16 µmol/min, um den NO-induzierten Anteil der Blutflusssteigerung bei der Acetylcholin-Infusion zu erfassen. Zur Beurteilung der endothelunabhängigen Gefäßrelaxation wurde Nitroprussid-Natrium (Nipruss, Schwarz Pharma) in Konzentrationen von 1 µg/min – 3 µg/min – 10 µg/min infundiert, welches direkt am glatten Gefäßmuskel vasodilatierend wirkt. Jede Dosierung ist über mindestens 5-7 Minuten appliziert worden, die Messung des Blutflusses erfolgte während der letzten beiden Minuten. Die Applikation der Substanzen erfolgte randomisiert, um jeden durch die Reihenfolge der Infusionen entstehenden Einfluss zu vermeiden. Am freien Arm wurde den Probanden ein intravenöser Verweilkatheter der Größe 20 G für die Infusion der Glykoprotein-IIb/IIIa-Rezeptorantagonisten gelegt.

2.4 Untersuchungsprotokolle

2.4.1 Untersuchungsprotokoll 1

Die Wirkung der Glykoprotein-IIb/IIIa- Rezeptorblockade mit Tirofiban auf die endothelabhängige und –unabhängige Vasodilatation bei Patienten mit symptomatischer koronarer Herzerkrankung

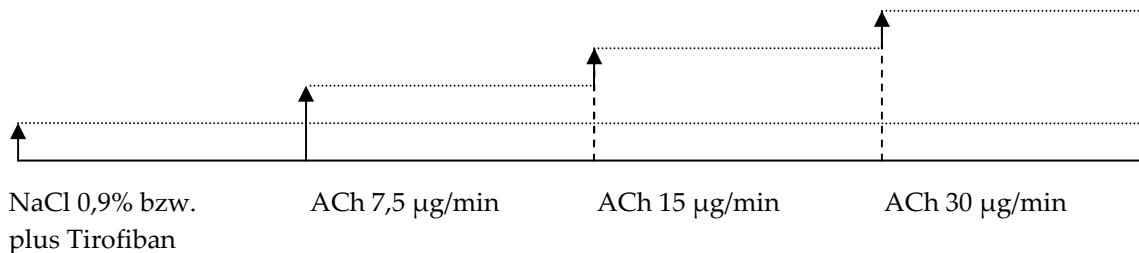
Untersucht wurden 27 Patienten mit angiographisch gesicherter koronarer Herzerkrankung bei bevorstehender PTCA (Gruppe A). Nach Bestimmung des basalen Ruheflusses unter physiologischer Kochsalzlösung wurde die endothelabhängige Vasodilatation mittels Acetylcholin-Infusion in steigender Konzentration von 7,5 – 15 – 30 µg/min gemessen. Zur Beurteilung der

endothelunabhängigen Vasodilatation wurde Nitroprussid-Natrium in steigender Dosierung von 1 – 3 – 10 $\mu\text{g}/\text{min}$ intraarteriell verabreicht. Des Weiteren wurde unter laufender L-NMMA-Infusion (Dosis: 16 $\mu\text{mol}/\text{min}$) gleichzeitig die Dosierungsreihe von Acetylcholin 7,5 – 15 – 30 $\mu\text{g}/\text{min}$ wiederholt, um den NO-induzierten Anteil der Blutflusssteigerung bei der Acetylcholin-Infusion zu ermitteln.

Nach einer intravenösen Bolusgabe von Tirofiban (Dosis: 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ Körpergewicht) sowie folgender intravenöser Verabreichung von weiteren 0,15 μg Tirofiban $\times \text{kg}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ für 30 Minuten [RESTORE-Investigators, 1997] [PRISM-PLUS-Investigators, 1998] wurden die oben dargestellten Messungen unter kontinuierlicher Tirofiban-Infusion wiederholt.

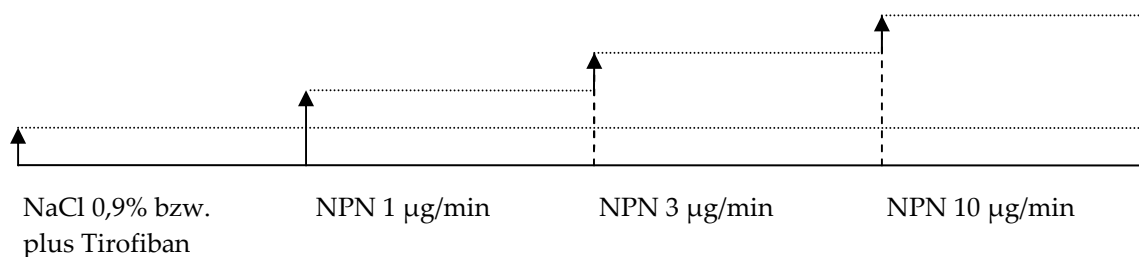
I. Endothelabhängige Vasodilatation des Patientenkollektivs aus Gruppe A:

Acetylcholin (ACh) 7,5 – 15 – 30 $\mu\text{g}/\text{min}$



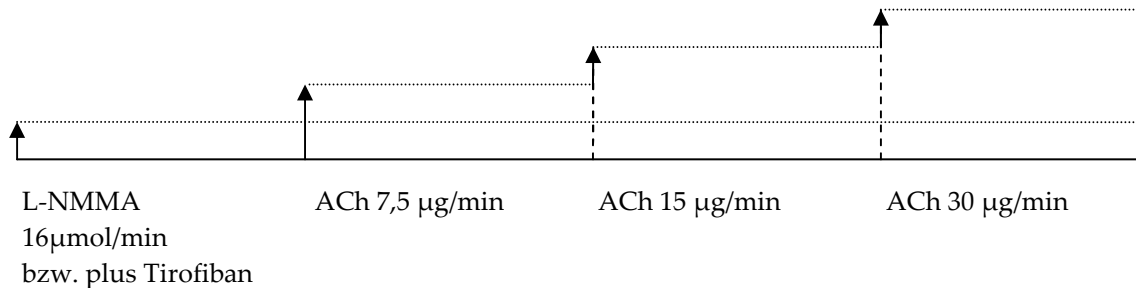
II. Endothelunabhängige Vasodilatation des Patientenkollektivs aus Gruppe A:

Nitroprussid-Natrium (NPN) 1 – 3 – 10 $\mu\text{g}/\text{min}$



III. Hemmung der NO-induzierten Blutflusssteigerung des Patientenkollektivs aus Gruppe A:

L-NMMA 16 $\mu\text{mol}/\text{min}$ plus Acetylcholin (ACh) 7,5 – 15 – 30 $\mu\text{g}/\text{min}$



2.4.2 Untersuchungsprotokoll 2

Die Wirkung der Glykoprotein-IIb/IIIa-Rezeptorblockade mit Tirofiban sechs Stunden nach Ende der Infusion auf die endothelabhängige und –unabhängige Vasodilatation bei Patienten mit symptomatischer koronarer Herzerkrankung

Bei 10 der 27 Patienten aus Gruppe A wurde sechs Stunden nach Ende der Tirofiban-Infusion sowohl die endothelabhängige als auch die endothelunabhängige Vasodilatation erneut gemessen, um die Dauer der Wirkung von Tirofiban zu beurteilen. Dafür wurden - wie in Protokoll 1 beschrieben - nach Bestimmung des Basalflusses zunächst Acetylcholin sowie Nitroprussid-Natrium intraarteriell verabreicht. Danach erfolgte eine Wiederholung der Dosierungsreihe von Acetylcholin unter Koinfusion von L-NMMA.

2.4.3 Untersuchungsprotokoll 3

Die Wirkung der Glykoprotein-IIb/IIIa- Rezeptorblockade mit Eptifibatide auf die endothelabhängige und –unabhängige Vasodilatation bei Patienten mit symptomatischer koronarer Herzerkrankung

Untersucht wurden 13 Patienten mit angiographisch dokumentierter koronarer Herzerkrankung und geplanter PTCA. Zunächst wurde - wie in Protokoll 1 aufgezeigt - nach Messung des Basalflusses die endothelabhängige

Vasodilatation mittels Acetylcholin und die endothelunabhängige Vasodilatation mittels Nitroprussid-Natrium bestimmt, sowie der NO-vermittelte Anteil der Flusssteigerung mit Hilfe von L-NMMA. Danach wurde den Probanden ein intravenöser Bolus von Eptifibatide (Dosis: 180 µg/kg Körpergewicht) verabreicht, auf den eine konstante Infusion von $2 \mu\text{g} \times \text{kg}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ für 30 Minuten folgte [ESPRIT-Investigators, 2000]. Nach dieser Zeit wurden die oben dargestellten Messungen bei fortlaufender Eptifibatide-Infusion wiederholt.

2.5 Cholinesterase-Aktivitätstest

Um einen möglichen Einfluss der Cholinesterase auf die Messergebnisse beurteilen zu können, wurde vor und während der Glykoprotein-IIb/IIIa-Rezeptorblockade die Cholinesterase-Aktivität im Plasma mittels Cholinesterase-Aktivitätstest (Enzymatic activity-kinetic test, Roche) bestimmt.

2.6 Thrombozyten-Funktionstest

Die Thrombozytenfunktion wurde an folgenden drei Punkten bestimmt:

1. Basaler Ruhefluss (Ausgangswert) unmittelbar vor Bolusgabe der Glykoprotein-IIb/IIIa-Rezeptorantagonisten, 2. dreißig Minuten nach Bolusgabe während fortlaufender Infusion und 3. sechs Stunden nach Ende der Infusion.

Dazu wurden Blutproben aus der Arteria brachialis entnommen und durch in speziellen Blutröhrchen enthaltenes Phe-Pro-Arg Chloromethyl Keton (PPACK) antikoaguliert. Um nun in vitro die Wirkung der GPIIb/IIIa-Rezeptorblockade auf die Thrombozytenaggregation zu ermitteln, wurde der von Smith et al. beschriebene „Rapid platelet-function assay“ (Ultegra® RPFA-TRAP, Accumetrics products, Radiometer GmbH) verwendet [Smith, 1999]. Dieser erlaubt in der direkten Behandlungsumgebung eine Erfassung der Thrombozytenaggregation, gemessen in Form einer Zunahme der

Lichtdurchlässigkeit, die das Ultegra System Analysatorgerät innerhalb von drei Minuten anzeigt. Im Analysatorgerät werden mit Fibrinogen bedeckte Polystyrenperlen, die sich mit aktivierten Thrombozyten verbinden können, zusammen mit dem antikoagulierten Vollblut gemischt. Das Ergebnis kann als Zunahme der Lichtdurchlässigkeit auf dem Display abgelesen werden. Bei Patienten, deren Thrombozytenfunktion durch die GPIIb/IIIa-Rezeptorantagonisten gehemmt ist, verbinden sich die Thrombozyten nicht mit den Fibrinogen bedeckten Polystyrenperlen, und die Lichtdurchlässigkeit steigt nur langsam oder gar nicht an. Die RPFA-Daten werden im Folgenden als Prozentanteile der Ausgangswerte vor Verabreichung der Glykoprotein-IIb/IIIa-Rezeptorantagonisten dargestellt.

2.7 Studienendpunkte

Der primäre Studienendpunkt war die Wirkung der Behandlung mit Tirofiban auf die Dosis-Wirkungskurven von Acetylcholin. Der dafür benötigte Stichprobenumfang wurde für eine statistische Teststärke von $\beta = 80\%$ und ein Signifikanzniveau von $\alpha < 0,05$ berechnet. Die Dosis-Wirkungskurven von L-NMMA stellten sekundäre Studienendpunkte dar.

2.8 Statistische Analysen

Alle Werte sind als Mittelwert \pm SEM wiedergegeben. Zum Vergleich der Probandengruppen hinsichtlich der klinischen Charakteristika wurde der ungepaarte t-Test verwandt. Die Dosis-Wirkungskurven von Acetylcholin, Nitroprussid-Natrium und L-NMMA mit oder ohne Glykoprotein-IIb/IIIa-Rezeptorblockade wurden mit Techniken der Zweifach-Klassifikations-Varianzanalyse (two-way ANOVA) für wiederholte Messungen untersucht, und die Signifikanz der Differenz der Mittelwerte wurde mit dem Scheffé'-Test

ermittelt. Bei einem p-Wert von $< 0,05$ wurde von statistischer Signifikanz ausgegangen.

3 ERGEBNISSE

Es wurden 40 männliche Patienten mit symptomatischer und angiographisch dokumentierter koronarer Herzerkrankung untersucht, bei denen im Verlauf desselben Tages eine PTCA geplant war.

27 Probanden wurden mit Tirofiban behandelt (Gruppe A), die übrigen 13 erhielten Eptifibatide (Gruppe B). Zwischen beiden Gruppen bestand bezüglich Alter, Blutfettwerten, Rauchgewohnheiten und Myokardinfarkt in der Anamnese kein signifikanter Unterschied.

Die genauen Daten der Patientenmerkmale können der Tabelle 1 entnommen werden.

MERKMAL \ GRUPPE	GRUPPE A: TIROFIBAN-BEHANDLUNG (N=27)	GRUPPE B: EPTIFIBATIDE-BEHANDLUNG (N=13)
Alter (Jahre)	64 ± 3	63 ± 4
Body mass index (kg/m ²)	27,2 ± 0,6	27,8 ± 0,5
Hypertonus	13	6
Raucher	14	7
Diabetes mellitus	4	3
Hypercholesterinämie	17	8
Mehrgefäßerkrankung	20	9
Myokardinfarkt in der Anamnese	11	5
Unterarmvolumen (Liter)	1,04 ± 0,08	1,07 ± 0,11

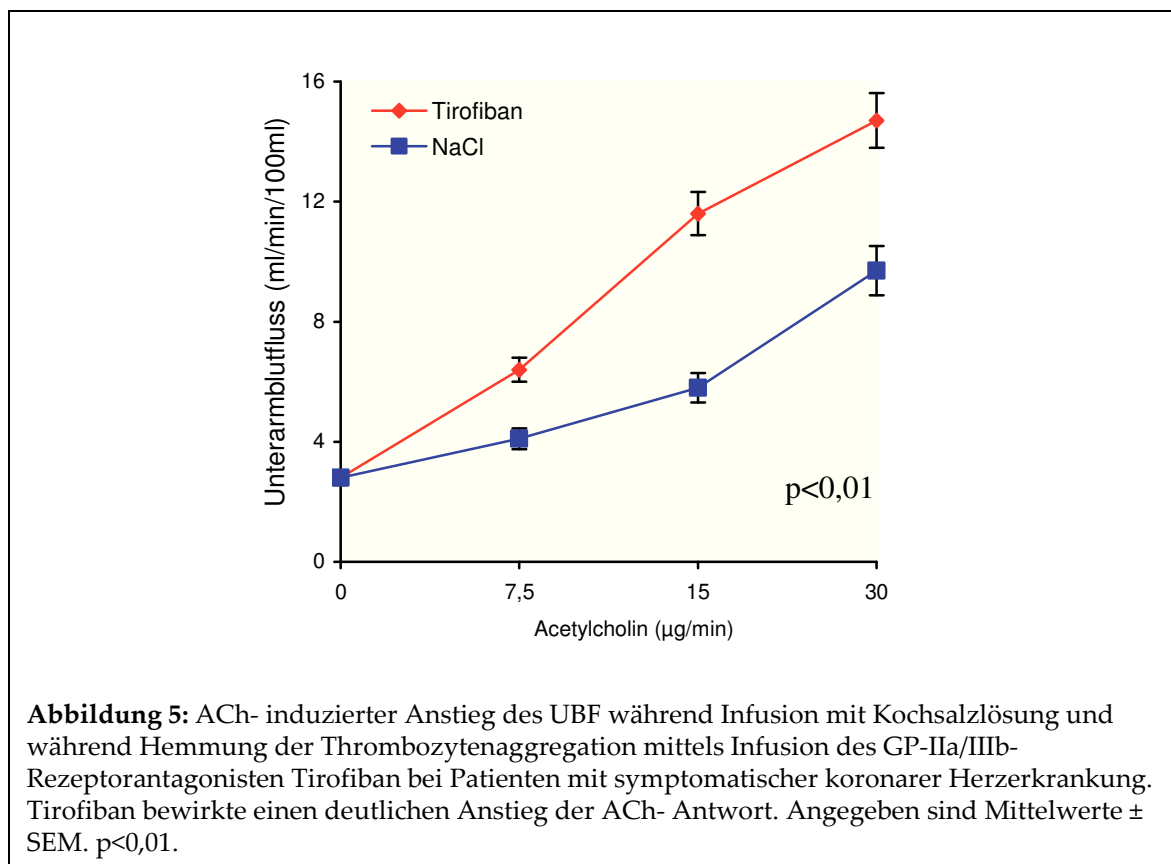
Tabelle 1: Merkmale der Studiengruppen in Mittelwerten ± SEM.

Die Cholinesterase- Aktivität im Plasma wurde – wie unter 2.5 beschrieben – vor (basaler Ruhefluss) und während der Infusion mit den GP-IIa/IIIb-Rezeptorantagonisten gemessen und zeigte keine Veränderung: die Cholinesterase-Aktivität im Plasma zeigte vergleichbare Werte vor und während der Infusion mit den GP-IIa/IIIb-Rezeptorantagonisten ($5,4 \pm 0,2$ versus $5,5 \pm 0,2$ kU/l), die Differenz der Mittelwerte ist nicht signifikant.

3.1 Effekt der Glykoprotein-IIb/IIIa-Rezeptorblockade mit Tirofiban auf die endothelabhängige und –unabhängige Vasodilatation

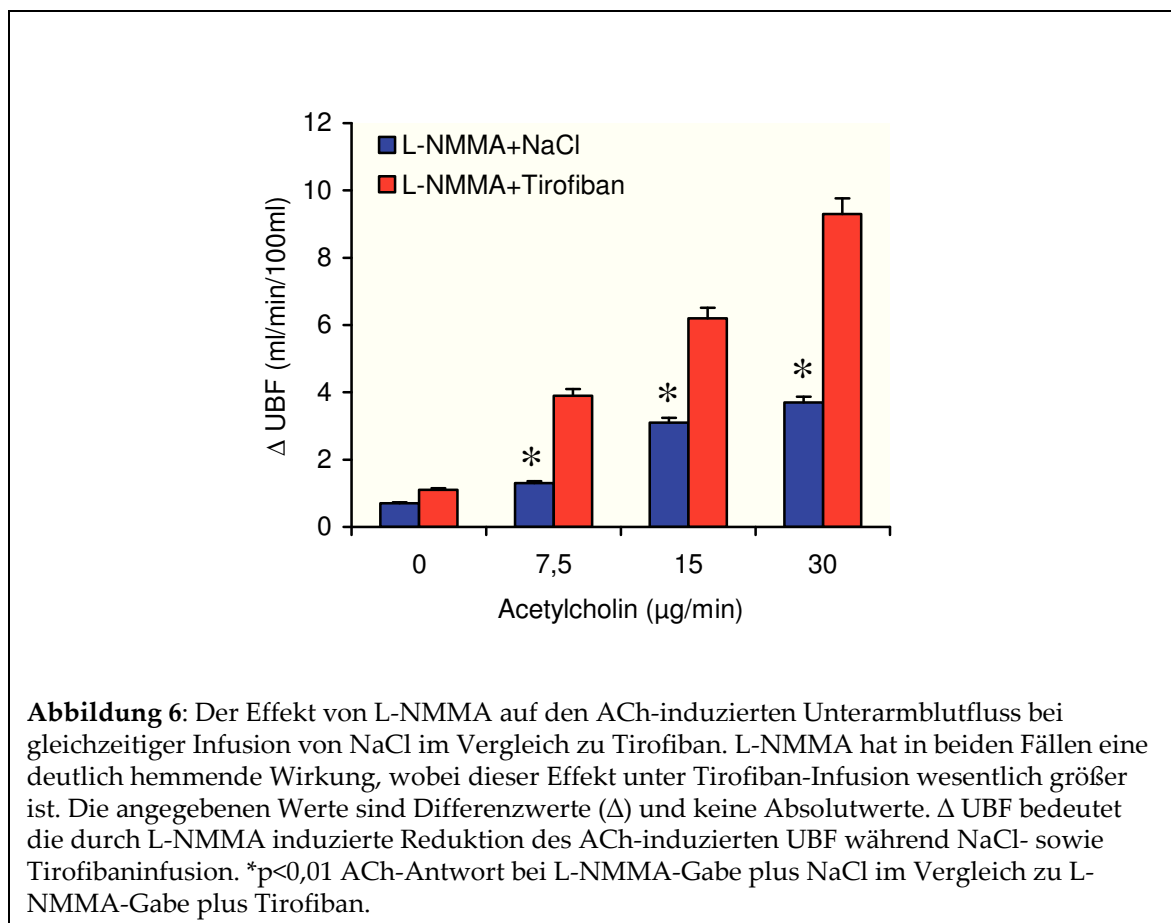
3.1.1 Effekt von Tirofiban auf die endothelabhängige Vasodilatation

Zur Beurteilung der endothelabhängigen Vasodilatation wurde bei fortlaufender Dauerinfusion mit physiologischer Kochsalzlösung Acetylcholin über die Arteria brachialis infundiert. Dabei zeigte sich eine Steigerung des Unterarmblutflusses des Patientenkollektivs aus Gruppe A von $2,8 \pm 0,1$ auf maximal $9,7 \pm 1,1$ ml/min/100ml Unterarmvolumen. Die anschließende Infusion mit dem GP-IIa/IIIb- Rezeptorantagonisten Tirofiban verbesserte die dosisabhängige ACh - induzierte Vasodilatation signifikant und bewirkte eine Erhöhung des maximalen ACh - vermittelten UBF- Anstieges von $9,7 \pm 1,1$ mit NaCl auf $14,7 \pm 1,3$ ml/min/100ml. Vgl. Abb. 5.



3.1.2 Effekt von Tirofiban auf die L-NMMA-induzierte Vasokonstriktion bei gleichzeitiger Acetylcholin-Infusion

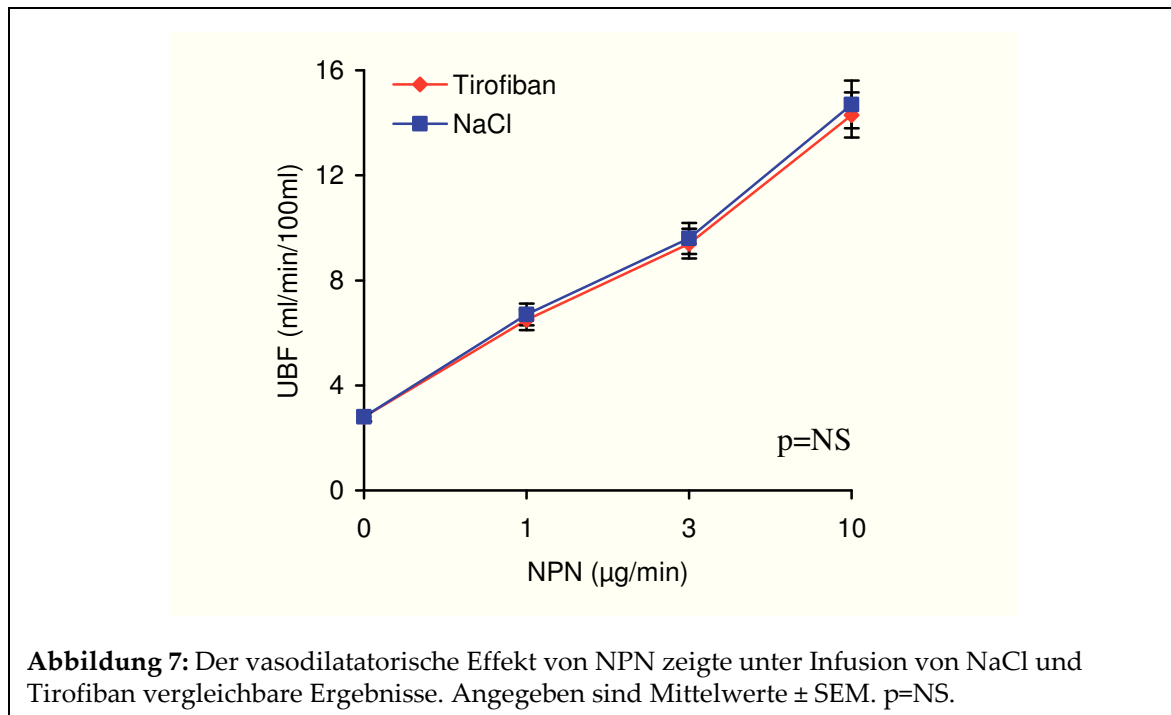
Die Inhibierung der NO- Synthese durch intraarterielle Verabreichung von N^G-monomethyl-L-arginin (L-NMMA) bewirkte eine Abnahme des basalen Ruheflusses. Des Weiteren induzierte die Koinfusion von L-NMMA eine deutliche Reduktion der ACh - vermittelten Blutflusssteigerung um $3,7 \pm 0,1$ ml/min/100ml mit L-NMMA plus ACh bei der maximalen ACh-Dosis. Die Messwerte sind als Differenzwerte (Δ) angegeben, nicht als Absolutwerte. Während der Tirofiban-Infusion zeigte sich im Vergleich dazu eine deutlich größere Wirkung der L-NMMA- Blockade auf die ACh- Antwort. Vgl. Abb. 6.



3.1.3 Effekt von Tirofiban auf die endothelunabhängige Vasodilatation

Um die endothelunabhängige Vasodilatation zu überprüfen, wurde Nitroprussid-Natrium intraarteriell verabreicht und bewirkte dosisabhängig

eine Steigerung des Blutflusses am Unterarm. Dieser wurde durch die anschließende Infusion von Tirofiban nicht beeinflusst. Der UBF stieg von $6,7 \pm 0,3$ (NPN $1 \mu\text{g}/\text{min}$) auf $14,7 \pm 1,1$ (NPN $10 \mu\text{g}/\text{min}$) unter NaCl-Infusion und von $6,5 \pm 0,4$ (NPN $1 \mu\text{g}/\text{min}$) auf $14,3 \pm 1,1$ ml/min/100ml Unterarmvolumen (NPN $10 \mu\text{g}/\text{min}$) unter Tirofiban-Infusion. Vgl. Abb.7.



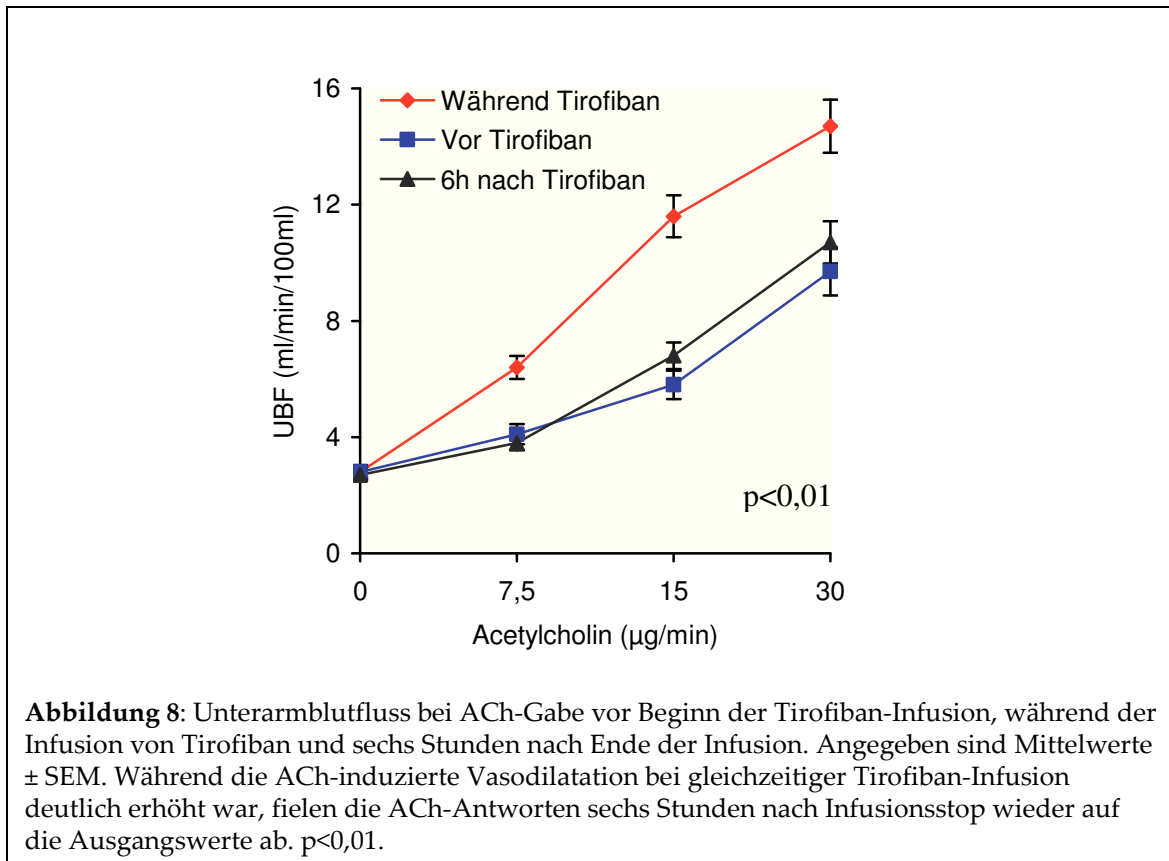
3.2 Effekt der Glykoprotein-IIb/IIIa-Rezeptorblockade mit Tirofiban auf die endothelabhängige und -unabhängige Vasodilatation sechs Stunden nach Ende der Infusion

Um die Wirkungsdauer von Tirofiban zu überprüfen, wurde sechs Stunden nach Ende der Infusion bei einer Untergruppe von 10 Probanden aus Gruppe A erneut eine Unterarmflussmessung sowie der unter 2.6 beschriebene Thrombozyten-Funktionstest durchgeführt.

3.2.1 Effekt von Tirofiban auf die endothelabhängige Vasodilatation sechs Stunden nach Infusionsende

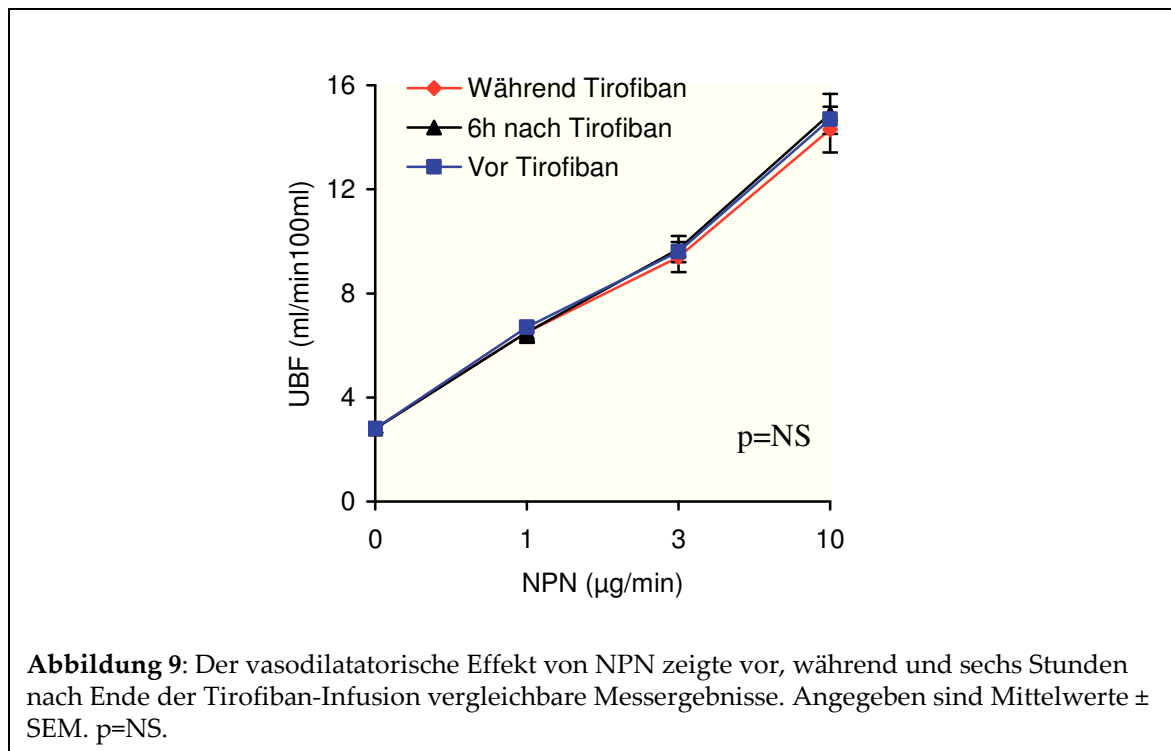
Wie unter 3.1.1 beschrieben war die endothelabhängige ACh-vermittelte Vasodilatation bei gleichzeitiger Tirofiban-Infusion deutlich erhöht. Dieser

Effekt war jedoch sechs Stunden nach Infusionsstop nicht mehr zu verzeichnen, vielmehr waren die gemessenen Werte der ACh-Antworten vergleichbar mit denen bei Untersuchungsbeginn vor Verabreichung von Tirofiban. Der Unterarmblutfluss stieg von $2,7 \pm 0,2$ (ACh-Ausgangswert: $2,8 \pm 0,1$) auf maximal $10,7 \pm 1,3$ (ACh-Ausgangswert: $9,7 \pm 1,1$) ml/min/100ml. Vgl. Abb.8.



3.2.2 Effekt von Tirofiban auf die endothelunabhängige Vasodilatation sechs Stunden nach Infusionsende

Die endothelunabhängige Vasodilatation, gemessen mit NPN, zeigte - wie unter 3.1.3 aufgezeigt - bei gleichzeitiger Tirofiban-Infusion keine Veränderung. Auch sechs Stunden nach Ende der Infusion waren die gemessenen Werte mit den NPN-Ausgangswerten vergleichbar. Der Unterarmblutfluss stieg jetzt von $6,5 \pm 0,2$ (NPN $1\mu\text{g}/\text{min}$) auf maximal $14,9 \pm 0,9$ (NPN $10\mu\text{g}/\text{min}$) im Vergleich zu $6,7 \pm 0,3$ (NPN $1\mu\text{g}/\text{min}$) auf maximal $14,7 \pm 1,1$ ml/min/100ml (NPN $10\mu\text{g}/\text{min}$) vor Beginn der Tirofiban-Infusion. Vgl. Abb.9.



3.2.3 Effekt von Tirofiban auf die Thrombozytenfunktion in vitro

Zur Beurteilung der Thrombozytenfunktion in vitro wurde der – unter 2.6 beschriebene - Rapid platelet-function assay (Ultegra®) verwendet. Während der Hemmung der Thrombozytenfunktion durch Tirofiban war die Thrombozytenaggregation signifikant reduziert auf $18 \pm 8\%$ des Ausgangswertes unmittelbar vor Bolusgabe bzw. Infusionsbeginn. Sechs Stunden nach Ende der Tirofiban-Infusion stiegen die Werte jedoch erneut an auf $76 \pm 7\%$ des Ausgangswertes. Vgl. Abb.10.

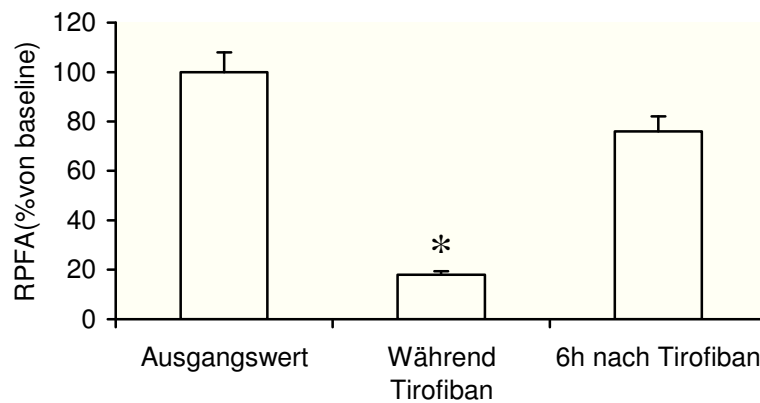
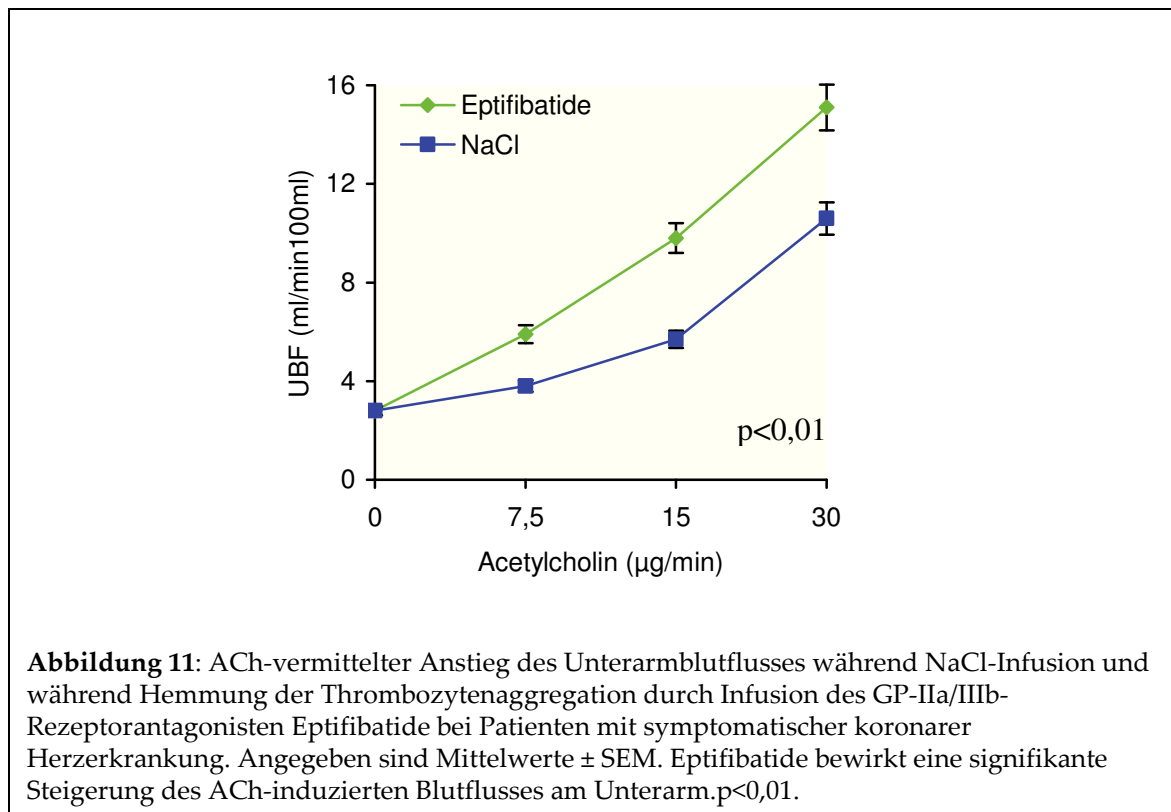


Abbildung 10: Der Effekt von Tirofiban auf die Thrombozytenfunktion gemessen mittels Rapid platelet-function assay (Ultegra®). Die RPFA-Daten sind Prozentanteile der Ausgangswerte, gemessen unmittelbar vor Verabreichung von Tirofiban. Unter Tirofiban-Infusion zeigte sich eine deutliche Reduktion der Thrombozytenaggregation, verglichen mit dem Ausgangswert. Sechs Stunden nach Ende der Infusion erreichte die Thrombozytenaggregation allerdings fast wieder Werte, vergleichbar mit dem Ausgangswert. * $p < 0,001$ Thrombozytenaggregation bei Tirofiban-Infusion im Vergleich zum Ausgangswert und sechs Stunden nach Ende der Infusion.

3.3 Effekt der Glykoprotein-IIb/IIIa-Rezeptorblockade mit Eptifibatide auf die endothelabhängige und –unabhängige Vasodilatation

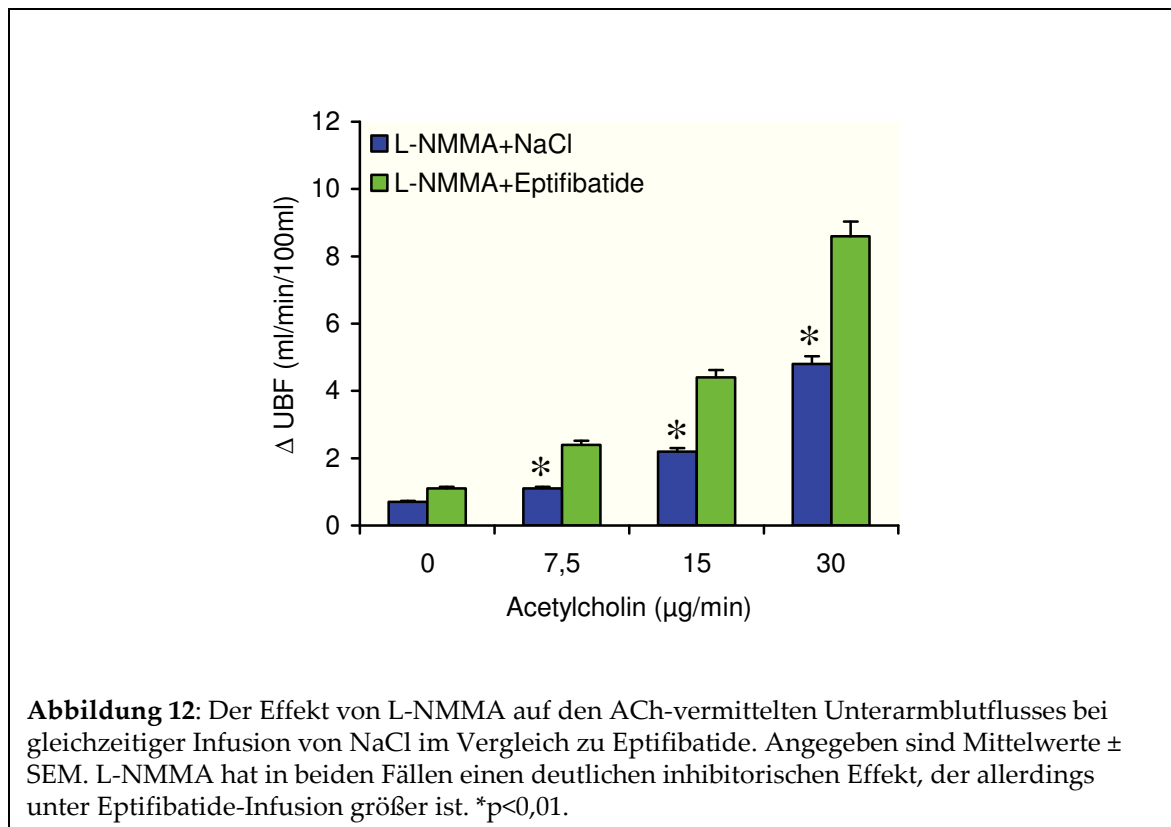
3.3.1 Effekt von Eptifibatide auf die endothelabhängige Vasodilatation

Um die endothelabhängige Vasodilatation zu prüfen, wurde - wie unter 3.1.1 beschrieben - Acetylcholin intraarteriell infundiert. Dies steigerte dosisabhängig den Blutfluss am Unterarm des Patientenkollektivs aus Gruppe B von $2,8 \pm 0,1$ auf maximal $10,6 \pm 1,1$ ml/min/100ml Unterarmvolumen. Die folgende Verabreichung des GP-IIa/IIIb-Rezeptorantagonisten Eptifibatide steigerte die dosisabhängige ACh-induzierte Vasodilatation signifikant von $10,6 \pm 1,1$ mit NaCl auf $15,1 \pm 1,2$ ml/min/100ml. Vgl. Abb.11. Die Infusion mit Eptifibatide bewirkte außerdem eine 90%ige Inhibierung der Thrombozytenfunktion in vitro, gemessen mittels Ultegra®.



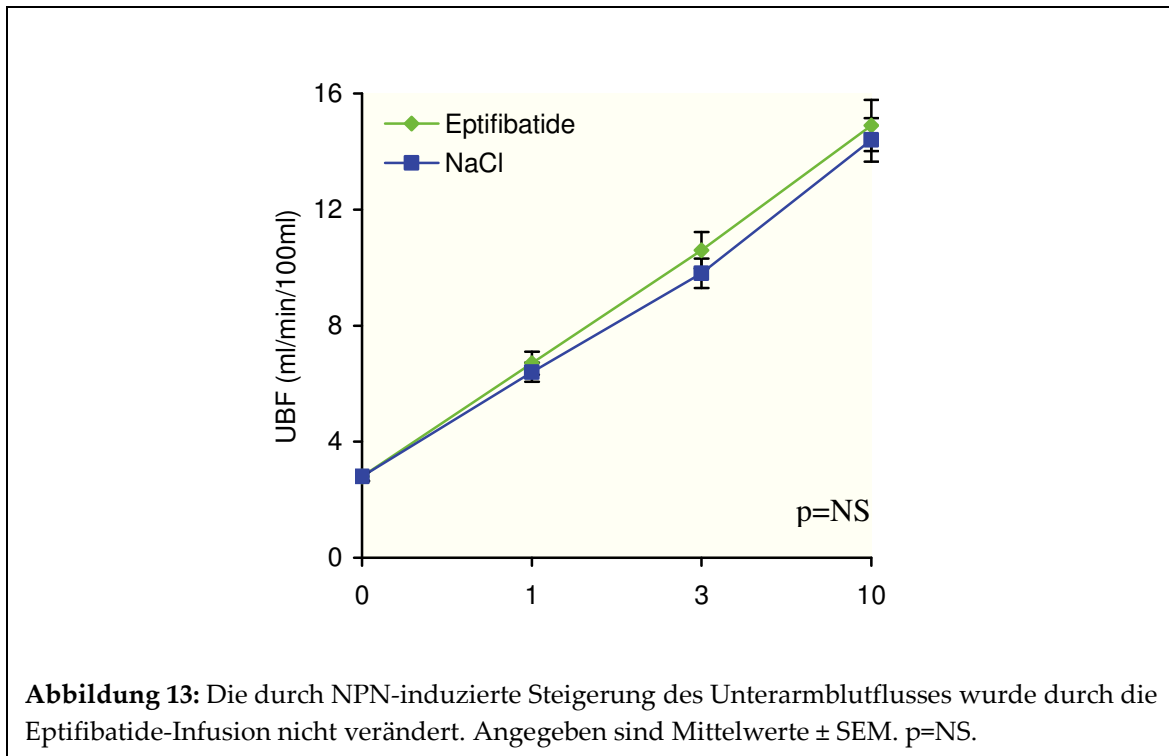
3.3.2 Effekt von Eptifibatide auf die L-NMMA-induzierte Vasokonstriktion bei gleichzeitiger Acetylcholin-Infusion

Die intraarterielle Gabe des NOS-Inhibitors L-NMMA bewirkte eine deutliche Reduktion des basalen Blutflusses am Unterarm. Die Koinfusion von L-NMMA verringerte außerdem die ACh-induzierte Vasodilatation deutlich um $4,8 \pm 0,9$ ml/min/100ml unter L-NMMA plus ACh bei der maximalen ACh-Dosis. Dieser inhibitorische Effekt von L-NMMA auf die ACh-Antwort war jedoch unter Eptifibatide-Infusion deutlich stärker (Abnahme des UBF um $8,6 \pm 1,1$ ml/min/100ml unter ACh plus Eptifibatide plus L-NMMA). Angegeben sind – wie auch unter 3.1.2 – Differenzwerte (Δ) und keine Absolutwerte. Vgl. Abb.12.



3.3.3 Effekt von Eptifibatide auf die endothelunabhängige Vasodilatation

Zur Beurteilung der endothelunabhängigen Vasodilatation wurde Nitroprussid-Natrium in die Arteria brachialis infundiert. Dies bewirkte dosisabhängig eine Steigerung des Unterarmblutflusses, welcher von der darauf folgenden Verabreichung von Eptifibatide nicht verändert wurde. Der UBF stieg von $6,4 \pm 0,3$ (NPN $1 \mu\text{g}/\text{min}$) auf maximal $14,5 \pm 0,9$ (NPN $10 \mu\text{g}/\text{min}$) unter NaCl-Infusion und von $6,6 \pm 0,2$ (NPN $1 \mu\text{g}/\text{min}$) auf maximal $14,8 \pm 1,3 \text{ ml}/\text{min}/100\text{ml}$ (NPN $10 \mu\text{g}/\text{min}$) unter Eptifibatide-Infusion. Vgl. Abb. 13.



4 DISKUSSION

Durch Hemmung der Thrombozytenaggregation mit Hilfe der Glykoprotein-IIb/IIIa-Rezeptorblockade wird bei Patienten nach Ballondilatation im Rahmen einer Akutbehandlung bei Myokardinfarkt nachweislich sowohl der epikardiale Fluss als auch die mikrovaskuläre Perfusion verbessert [Neumann, 1998]. Auch ein positiver Effekt auf die endothelabhängige Vasodilatation nach Stentimplantation wurde vor kurzem beschrieben [Aymong, 2002]. Ob durch den Einsatz von GP-IIb/IIIa-Rezeptorantagonisten die Endothelfunktion auch unabhängig von Thrombusbildung und Koronarintervention verbessert werden kann und welche Mechanismen dem zugrunde liegen, ist jedoch noch ungeklärt.

Mit den vorliegenden Ergebnissen konnten wir zeigen, dass die Acetylcholin-induzierte endothelabhängige Vasodilatation peripherer Widerstandsgefäße bei Patienten mit symptomatischer koronarer Herzkrankheit mit Hilfe von GP-IIb/IIIa-Rezeptorantagonisten signifikant gesteigert werden kann. Da durch Acetylcholin-Infusion außer NO auch andere Vasodilatoren wie Prostacyclin und EDHF aus dem Endothel freigesetzt werden, wurde zusätzlich der Effekt einer selektiven NOS-Inhibierung mit L-NMMA untersucht. Damit lässt sich prüfen, welcher Anteil an der gesamten ACh-induzierten Blutflusszunahme durch NO vermittelt wird. Während der Koinfusion von L-NMMA war unter GP-IIb/IIIa-Rezeptorblockade eine deutlich größere Abnahme der Acetylcholin-stimulierten Vasodilatation zu verzeichnen. Somit ist der beobachtete positive Effekt auf die endothelabhängige Vasodilatation zum großen Teil auf eine gesteigerte NO-Bioverfügbarkeit zurückzuführen. Sechs Stunden nach Ende der Infusion mit Tirofiban war diese positive Wirkung jedoch nicht mehr zu beobachten, was darauf hindeutet, dass die Verbesserung der Endothelfunktion eng mit der Thrombozytenaggregationshemmung assoziiert ist. Die In-vitro-Untersuchungen mittels Ultegra® ergaben, dass während der GP-IIb/IIIa-

Rezeptorblockade und der gesteigerten endothelabhängigen Vasodilatation eine ca. 80-90%ige Inhibierung der Thrombozytenfunktion stattfand. Sechs Stunden nach Infusionsende war die Thrombozytenfunktion noch zu ca. 25% gehemmt, während die endothelabhängige Vasodilatation wieder auf Werte, vergleichbar mit denen vor Infusionsbeginn abgenommen hatte.

Auch die GP-IIb/IIIa-Rezeptorblockade mit Eptifibatide zeigte ähnlich günstige Auswirkungen auf die endothelabhängige Vasodilatation. Dies legt die Vermutung nahe, dass nicht ein einzelner Wirkstoff, sondern vielmehr die Substanzklasse der GP-IIb/IIIa-Rezeptorantagonisten diesen positiven Effekt hervorruft. Auf die endothelunabhängige Vasodilatation, gemessen mittels Nitroprussid-Natrium, hatte die Verabreichung beider Substanzen keinen Einfluss.

Diese Befunde weisen darauf hin, dass die Thrombozytenaktivierung wesentlich zu endothelialer Dysfunktion und verminderter NO-Bioverfügbarkeit bei Patienten mit symptomatischer koronarer Herzerkrankung beiträgt.

4.1 Wirkung der GP-IIb/IIIa-Rezeptorblockade auf die mikrovaskuläre Perfusion

Durch den Einsatz der GP-IIb/IIIa-Rezeptorantagonisten, die die gemeinsame Endstrecke der Thrombozytenaggregation hemmen, kann das Risiko für das Auftreten thrombotischer Komplikationen gesenkt werden. Dies gilt insbesondere im Zusammenhang mit Hoch-Risiko-PTCA, aber auch bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom. Dabei erfolgt neben der Verbesserung des epikardialen Flusses auch eine Steigerung des mikrovaskulären Flusses [Neumann, 1998] [de Lemos, 2000]. Der hierbei wirksame Mechanismus ist vermutlich dadurch zu erklären, dass eine Thrombusbildung mit nachfolgender Gefäßverengung verhindert wird. Allerdings ist eine verminderte

mikrovaskuläre Perfusion nicht nur durch luminale Obstruktion bedingt. Im Tierexperiment konnte nachgewiesen werden, dass aktivierte Thrombozyten auch ohne gefäßverengenden epikardialen Thrombus eine mikrovaskuläre Vasokonstriktion hervorrufen [Barrabes, 2000] [Taylor, 2002].

Mittels GP-IIb/IIIa-Rezeptorblockade könnte somit die Thrombozytenaktivierung und die damit verbundene Ausschüttung vasokonstriktorischer Substanzen verhindert werden, was sich wiederum positiv auf die mikrovaskuläre Perfusion auswirken würde. In der Tat wurde dies bereits vor mehr als zehn Jahren nach Gabe von Clopidogrel gezeigt, was zumindest zum Teil durch Antagonisierung eben dieser vasokonstriktiven Substanzen wie z.B. Thromboxan A₂ erklärt wurde [Yao, 1993]. Sheu et al. demonstrierten in vitro, dass eine über die RGD-Sequenz vermittelte GP-IIb/IIIa-Rezeptorblockade mit dem aus Schlangengift gewonnenem Disintegrin Triflavin eine Thrombozyteninduzierte Vasokonstriktion verhindert [Sheu, 1997].

Auch in weiteren Tierexperimenten wurde ein günstiger Effekt auf die Gefäßfunktion beschrieben. Beispielsweise wurde bei - durch septischen Schock ausgelöster - Endotheldysfunktion von Kaninchen ein positiver Effekt der GP-IIb/IIIa-Rezeptorblockade auf die endothelabhängige Vasodilatation nachgewiesen [Pu, 2001]. Des Weiteren wurde bei Schweinen mit progressiver Koronarstenose gezeigt, dass mittels GP-IIb/IIIa-Rezeptorblockade die vasodilatatorische Reaktion der distalen Gefäße aufrechterhalten werden kann, während dies mit Hilfe von Heparin oder Aspirin nicht möglich war [Shen, 2000].

Erst kürzlich wurde publiziert, dass Tirofiban im Tierexperiment den mikrovaskulären Fluss in der Reperfusionphase nach passagerem Koronargefäßverschluss verbessert. Interessant dabei ist, dass dieser positive Effekt auf die kapilläre Funktion gerade *ohne* Thrombus zu beobachten war [Kunichika, 2004].

Mit der vorliegenden Studie konnten die günstigen Auswirkungen der GP-IIb/IIIa-Rezeptorblockade auf die Gefäßfunktion, die bereits in diversen Tierexperimenten beschrieben wurden, durch Untersuchungen an Patienten mit symptomatischer koronarer Herzkrankheit bestätigt werden. Es zeigte sich eine Verbesserung der Acetylcholin-vermittelten endothelabhängigen sowie eine unbeeinflusste endothelunabhängige Vasodilatation in den peripheren Widerstandsgefäßen. Bestätigung fanden unsere Befunde durch die Untersuchungen von Warnholtz et al., die kürzlich zu dem Ergebnis kamen, dass eine PTCA selbst zu endothelialer Dysfunktion führt, was aber wiederum durch den Einsatz von Tirofiban verhindert werden kann [Warnholtz, 2005].

Nicht nur zur Verhinderung der Thrombozytenaggregation, sondern auch zur Hemmung der Thrombozyten-vermittelten Vasokonstriktion, stellt intaktes Endothel eine unabdingbare Voraussetzung dar [Cohen, 1983] [Houston, 1986]. Aymong et al. beobachteten als erste bei koronaren Interventionen, dass die Verabreichung des GP-IIb/IIIa-Rezeptorantikörpers Abciximab eine verbesserte endothelabhängige Vasodilatation nach Acetylcholin-Infusion hervorruft [Aymong, 2002].

Die Untersuchungen der vorliegenden Studie zeigten, dass mit Hilfe der GP-IIb/IIIa-Rezeptorblockade die Endothelfunktion durch gesteigerte endotheliale NO-Bioverfügbarkeit in den peripheren Widerstandsgefäßen verbessert wird. In diesem Zusammenhang spielen offenbar auch gestörte Wechselwirkungen zwischen Thrombozyten und Endothelzellen eine entscheidende Rolle.

4.2 Wechselwirkungen zwischen Endothelzellen und Thrombozyten

Die Endotheldysfunktion ist hauptsächlich durch eine verminderte NO-Bioverfügbarkeit gekennzeichnet und stellt das erste klinisch fassbare Korrelat für ein Frühstadium der Atherosklerose dar.

Zwischen Endothelzellen und Thrombozyten bestehen Wechselwirkungen, indem sie sich gegenseitig in ihrem Stoffwechsel beeinflussen. Endothelzellen hemmen Thrombozyten direkt, indem sie die beiden vasodilatorischen Substanzen NO und Prostacyclin direkt in den Blutstrom sezernieren. NO wird aber auch von Thrombozyten selbst gebildet. So zeigen beispielsweise Mäuse, denen das Gen für die endotheliale NO-Synthase in den Thrombozyten fehlt, verkürzte Blutungszeiten [Freedman, 1999]. Außerdem wird das Aggregationsverhalten der Thrombozyten sowohl direkt als auch indirekt durch eine Reihe von Faktoren, die ebenfalls vom Endothel gebildet werden (vWF, tissue-type Plasminogen Activator (t-PA), Plasminogen Activator Inhibitor (PAI-1), Thrombomodulin u.a.), beeinflusst [Pearson, 1999].

Ferner weisen viele Befunde darauf hin, dass die Wechselwirkungen zwischen Thrombozyten und Gefäßwand durch funktionsfähige Endothelzellen entscheidend moduliert werden. So kommt es bei intaktem Endothel zur arteriellen Vasodilatation durch Freisetzung von ADP und ATP aus aktivierten Thrombozyten. Im Gegensatz dazu ist bei isolierten Arterien ohne Endothelschicht oder mit Endotheldysfunktion eine Vasokonstriktion durch aggregierende Thrombozyten zu beobachten. Dies wird vermutlich durch die Freisetzung vasoaktiver Substanzen wie Thromboxan A₂, Serotonin [Cohen, 1983] [Houston, 1986] oder freier Sauerstoffradikaler [Oskarsson, 1997] herbeigeführt, die von den Thrombozyten selbst gebildet werden. Intaktes Endothel spielt also eine wichtige modulierende Rolle bei Einwirkung von vasokonstriktorisch wirksamen Stoffen, die von aktivierten Thrombozyten freigesetzt werden. Bei einer Endotheldysfunktion könnte sich somit das Gleichgewicht zwischen vasodilatorischen und vasokonstriktorischen Substanzen zugunsten der Vasokonstriktion verschieben. So haben mehrere Studien gezeigt, dass sowohl bei Atherosklerose als auch schon bei Vorliegen ihrer Risikofaktoren eine unzureichende endotheliale Vasodilatation zu verzeichnen ist. Auch eine verminderte inhibitorische Wirkung des

endothelialen NO auf die Thrombozytenaggregation wurde beobachtet [Diodati, 1998] [Andrews, 2001].

Die Patienten mit symptomatischer koronarer Herzkrankheit in der vorliegenden Studie zeigten ebenfalls eine verminderte endothelabhängige Vasodilatation sowie eine reduzierte Wirkung des selektiven NOS-Inhibitors L-NMMA auf diese stimulierte Vasodilatation, was auf eine verminderte NO-Bioverfügbarkeit schließen lässt. Durch diese abgeschwächte NO-Verfügbarkeit weisen die Patienten vermutlich eine erhöhte Neigung zu gestörten Interaktionen zwischen Thrombozyten und Gefäßwand bzw. Endothelzellen auf. Dabei ist offenbar gleichzeitig ein Überschuss an vasokonstriktorisch wirksamen Substanzen vorhanden, die von Thrombozyten gebildet werden. Diese Interaktionen wurden in unserer Studie durch Gabe von GP-IIb/IIIa-Rezeptorantagonisten positiv beeinflusst. Von Bedeutung dürfte in diesem Zusammenhang auch oxidativer Stress sein, der von aktivierten Thrombozyten selbst erzeugt wird.

4.3 Oxidativer Stress und aktivierte Thrombozyten

Die gesteigerte Inaktivierung von NO ist ein wichtiger Mechanismus der Endotheldysfunktion und vor allem auf die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), d.h. auf so genannten oxidativen Stress zurückzuführen [Cai, 2000].

In der Entstehung der symptomatischen koronaren Herzkrankheit stellen aktivierte Thrombozyten, die trotz Aspirinbehandlung vorhanden sind, einen wichtigen Pathomechanismus dar [Serebruany, 2001]. Dabei wurde eine gesteigerte Thrombozytenaggregation sowie eine verminderte inhibitorische Wirkung von NO auf dieses Aggregationsverhalten beobachtet [Chirkov, 1999]. Thrombozyten können – ähnlich wie das Endothel – selbst NO bilden, das sowohl die Aggregation [Radomski, 1990] als auch die Anziehung weiterer Thrombozyten hemmt [Freedman, 1997] [Loscalzo, 2001]. Bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom findet eine verminderte thrombozytäre NO-

Freisetzung statt im Vergleich zu Patienten mit stabiler Angina pectoris [Freedman, 1998]. Dies deutet darauf hin, dass die reduzierte NO-Konzentration an der Entstehung akuter Koronarsyndrome beteiligt sein könnte, indem sie zur Anziehung weiterer Thrombozyten und damit zur Thrombusbildung beiträgt. So wurde beispielsweise erst kürzlich gezeigt, dass reduzierte NO-Bioverfügbarkeit bei Diabetes zu gesteigerter Thrombozytenaktivierung führt [Schäfer, 2004].

Der genaue Mechanismus, der zu einer gestörten Thrombozytenfunktion führt, ist noch nicht genau bekannt, aber viele Untersuchungen lassen den Schluss zu, dass gesteigerter oxidativer Stress dabei eine wichtige Rolle spielt [Iuliano, 1997] [Takajo, 2001]. Beispielsweise wurde schon vor mehr als zehn Jahren an stenosierten und Endothel-verletzten Koronararterien von Hunden demonstriert, dass ROS einen wichtigen Anteil in der Beeinflussung der Thrombozytenaggregation haben [Yao, 1993a]. Einige Befunde weisen darauf hin, dass aktivierte Thrombozyten selbst oxidativen Stress erzeugen, indem sie beispielsweise Superoxidanionen bilden [Wachowicz, 2002] [Krötz, 2004] und so die NO-Bioverfügbarkeit erniedrigen. Die Superoxidanionen-Produktion ist möglicherweise durch Aktivierung des thrombozytären Enzyms Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-(Phosphat)-Oxidase (NAD(P)H-Oxidase) zu erklären. Dieses Enzym wird durch Proteinkinase C stimuliert. Schließlich kommt es über eine gesteigerte Verfügbarkeit von freigesetztem ADP zu einer vermehrten Anziehung weiterer Thrombozyten [Krötz, 2002]. Des Weiteren wurde im Tierexperiment beobachtet, dass die NO-Synthase der Thrombozyten bei einem Mangel ihres Kofaktors Tetrahydrobiopterin vermehrt Superoxidanionen bildet [Kanaya, 2001]. Etwas später zeigten Dixon et al. bei Patienten mit dekompensierter Herzinsuffizienz, dass auch durch Entkopplung der NO-Synthase eine gesteigerte Superoxidanionen-Produktion stattfindet. Dabei wurde gleichzeitig eine schlechtere Endothelfunktion sowie eine verminderte thrombozytäre NO-Bildung - im Vergleich zu Patienten mit funktioneller NO-

Synthese oder Kontrollpersonen - beobachtet [Dixon, 2003]. Aus all diesen Befunden lässt sich folgern, dass eine gestörte Thrombozytenaktivierung sowohl eine Ursache als auch eine Folge von gesteigertem oxidativen Stress sein könnte [Iuliano, 1997].

Somit lässt sich zusammenfassen, dass vermutlich eine gesteigerte thrombozytäre Produktion von ROS zusammen mit einer verminderten NO-Bioverfügbarkeit zu einer gestörten Thrombozytenfunktion bei Patienten mit symptomatischer koronarer Herzkrankheit führt. Dadurch kommt es auch zu einer Inhibierung der endothelialen NO-Aktivität, die eine Endotheldysfunktion zusätzlich verstärkt. Durch die Hemmung der Thrombozytenaggregation mit Hilfe der GP-IIb/IIIa-Rezeptorantagonisten kann möglicherweise die Bildung von thrombozytären ROS verhindert werden, so dass NO vor Inaktivierung geschützt wird. Dieses Konzept wird durch die Befunde von Chakrabarti et al. belegt, die zeigten, dass mit Hilfe der GP-IIb/IIIa-Rezeptorblockade einerseits die thrombozytäre Freisetzung von ROS vermindert und andererseits die thrombozytäre NO-Produktion gesteigert werden kann [Chakrabarti, 2004].

Die verminderte thrombozytäre Produktion von oxidativem Stress ist somit ein weiterer möglicher Mechanismus, mit dem die positiven Effekte der GP-IIb/IIIa-Rezeptorblockade auf die Endothelfunktion und auf die endotheliale NO-Bioverfügbarkeit in dieser Studie zu erklären sind.

4.4 Inflammation und Thrombozyten

4.4.1 Wechselwirkungen zwischen Thrombozyten und Leukozyten

Neben der vermehrten Aktivierung zirkulierender Thrombozyten sind Entzündungsreaktionen in der Pathogenese thrombotischer Ereignisse relevant. So regen aktivierte Thrombozyten das Endothel zur Expression von verschiedenen inflammatorisch wirkenden Chemokinen, Zytokinen und Adhäsionsmolekülen (wie ICAM-1, MCP-1, Endothelin u.a.) an [Gawaz, 1998],

von denen die meisten an der Mobilisation, Bindung und Aktivierung von Leukozyten beteiligt sind, welche wiederum eine wichtige Rolle bei der Entstehung atherosklerotischer Prozesse spielen.

So wird bei Patienten mit akuter Myokardischämie neben einer verstärkten Thrombozytenaktivierung auch eine erhöhte Aktivierung zirkulierender Leukozyten beobachtet, die von gesteigerter Freisetzung proinflammatorischer Zytokine begleitet ist [Lindemann, 2001]. Bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom werden neben dieser verstärkten Aktivierung zirkulierender Leukozyten auch vermehrt Wechselwirkungen zwischen Thrombozyten und Neutrophilen beobachtet [Ott, 1996]. Huo et al. konnten zeigen, dass aktivierte Thrombozyten die Bindung von Leukozyten an das Adhäsionsmolekül vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) sowie deren Adhäsion an entzündliches oder atherosklerotisch verändertes Endothel fördern [Huo, 2003]. Aktivierte Neutrophile setzen auch Sauerstoffradikale frei, die Zellschäden in der Mikromuskulatur verursachen und dadurch zu Reperfusionsschäden nach Wiedereröffnung eines verschlossenen Gefäßes führen können [Engler, 1989]. Insbesondere zirkulierende Neutrophile und Monozyten tragen zu systemischen Entzündungsreaktionen bei akuter Myokardischämie bei, während Lymphozyten kaum aktiviert werden [Takeshita, 1997].

So setzen aktivierte Thrombozyten beispielsweise das proinflammatorisch wirkende Chemokin RANTES (regulated on activation normal T cell expressed and secreted) frei, welches u.a. als Signal für einen vermehrten Einstrom von Monozyten an entzündetem Endothel fungiert [von Hundelshausen, 2001] [von Hundelshausen, 2005]. Mittels GP-IIb/IIIa-Rezeptorblockade könnte dies also verhindert werden, so dass weniger Wechselwirkungen zwischen Thrombozyten und Leukozyten stattfinden und sich weniger Thrombozyten-Leukozyten-Aggregate ausbilden.

Die vermehrte Zytokinsynthese und auch die Freisetzung von Sauerstoffradikalen aus Leukozyten wird unter anderem durch das

thrombozytäre P-Selektin vermittelt [Nagata, 1993], welches außerdem zur Adhäsion von Neutrophilen an das Endothel und damit zur Migration in das perivaskuläre Gewebe im Rahmen myokardialer Reperfusion beiträgt [Kogaki, 1999]. Daneben führen auch abgespaltene Mikropartikel aktivierter Thrombozyten zur Leukozytenadhäsion und -aktivierung [Forlow, 2000].

Es wurde gezeigt, dass die heterotypen Interaktionen zwischen Thrombozyten und Leukozyten beim akuten Koronarsyndrom [Huo, 2003], mittels GP-IIb/IIIa-Rezeptorblockade signifikant vermindert werden können [Neumann, 1999]. Die Inhibierung der genannten heterotypen Interaktionen vermindert die Freisetzung von freien Sauerstoffradikalen aus aktivierten Leukozyten und verringert somit oxidativen Stress. Dies ist ein weiterer möglicher Mechanismus, mit dem sich die Verbesserung der Endothelfunktion und der endothelialen NO-Bioverfügbarkeit in dieser Studie erklären lässt.

4.4.2 Rolle des CD40/CD40 Ligand Systems

Während der Aktivierung der Thrombozyten und ihrer GP-IIb/IIIa-Rezeptoren kommt es zur Expression des Oberflächenmoleküls CD40 Ligand (CD40L), das sonst im Inneren verborgen liegt. Es handelt sich dabei um ein transmembranes Protein, welches strukturell mit dem Zytokin Tumor Nekrose Faktor- α (TNF- α) verwandt ist und ursprünglich auf CD4-positiven T-Zellen identifiziert wurde. Es besitzt außerdem eine proinflammatorische Wirkung. Immer mehr Untersuchungen belegen seine große Bedeutung hinsichtlich der Entwicklung und des Fortschreitens von kardiovaskulären Erkrankungen, indem es an CD40 auf Endothelzellen bindet [Phipps, 2000] und so die Expression bereits genannter Chemokine, Zytokine und Adhäsionsmoleküle hervorruft [Henn, 1998]. Somit kommt aktivierten Thrombozyten eine besondere Rolle bei der Initiation von inflammatorischen Prozessen zu, die wesentlich an der Entstehung der Atherosklerose beteiligt sind.

Es wurde gezeigt, dass die endothelabhängige Vasodilatation durch inflammatorische Reaktionen deutlich vermindert wird. In vivo wurde beobachtet, dass ein gesteigertes Niveau von gebundenem und löslichem CD40L bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom vorhanden ist [Aukrust, 1999]. Daraus wurde gefolgert, dass hohe Konzentrationen von CD40L möglicherweise das Fortschreiten der Erkrankung bei diesen Patienten begünstigen.

Im Experiment mit atherosklerotischen Plaques bei Mäusen wurde deutlich, dass weniger Plaquerupturen und somit auch weniger Thrombusbildung auftreten, wenn das Gen für CD40L ausgeschaltet oder die CD40L-CD40-Interaktion durch Antikörperbehandlung blockiert wird. Die Plaques zeigten dabei einen deutlich geringeren Gehalt an Leukozyten und somit eine erhöhte Stabilität [Lutgens, 2000].

Besondere Bedeutung kommt den In-vitro-Befunden von Urbich et al. zu, die demonstrierten, dass CD40L die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies in Endothelzellen steigert. Dieser oxidative Stress inaktiviert endotheliales NO und führt so zur Endotheldysfunktion [Urbich, 2002].

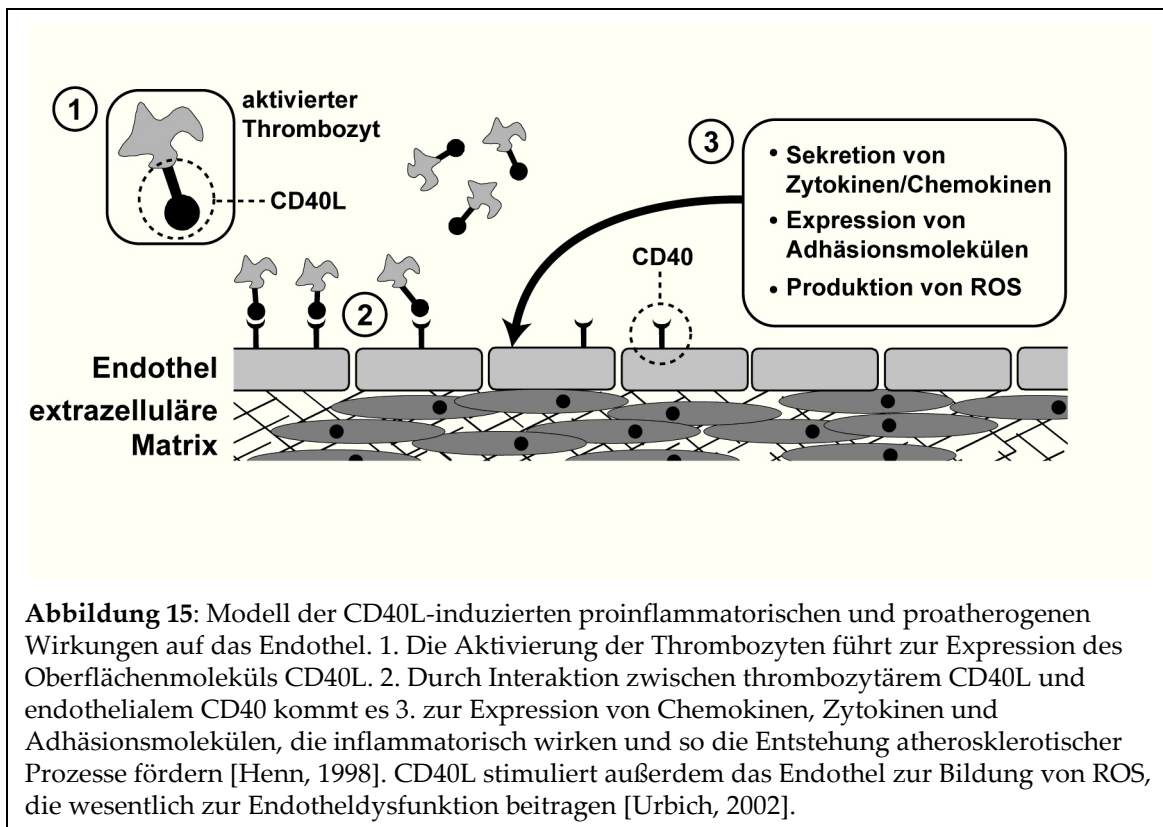


Abbildung 15: Modell der CD40L-induzierten proinflammatorischen und proatherogenen Wirkungen auf das Endothel. 1. Die Aktivierung der Thrombozyten führt zur Expression des Oberflächenmoleküls CD40L. 2. Durch Interaktion zwischen thrombozytärem CD40L und endotheliale CD40 kommt es 3. zur Expression von Chemokinen, Zytokinen und Adhäsionsmolekülen, die inflammatorisch wirken und so die Entstehung atherosklerotischer Prozesse fördern [Henn, 1998]. CD40L stimuliert außerdem das Endothel zur Bildung von ROS, die wesentlich zur Endotheldysfunktion beitragen [Urbich, 2002].

Erst vor kurzem wurde demonstriert, dass die Verabreichung von GP-IIb/IIIa-Rezeptorantagonisten eine inhibitorische Wirkung auf die Expression von CD40L in vitro hat [Nannizzi-Alaimo, 2003]. Furman et al. bestätigten diese Ergebnisse zunächst in vitro [Furman, 2004] und später auch in vivo bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom, bei denen eine PTCA durchgeführt wurde. Es zeigten sich dabei neben einer verminderten Plasmakonzentration von löslichem CD40L auch weniger Leukozyten-Thrombozyten-Aggregate [Furman, 2005].

Die Blockade von CD40L stellt somit einen weiteren möglichen Mechanismus dar, der den positiven Effekt der GP-IIb/IIIa-Rezeptorblockade auf die Endothelfunktion und auf die endotheliale NO-Bioverfügbarkeit in dieser Studie erklärt.

4.5 Ausblick

Endotheldysfunktion bei Patienten mit symptomatischer koronarer Herzkrankheit wurde sowohl in peripheren als auch in koronaren Widerstandsgefäßen nachgewiesen [Drexler, 1997]. Mit der hier vorgestellten Studie konnte gezeigt werden, dass mit Hilfe von GP-IIb/IIIa-Rezeptorantagonisten eine signifikante Verbesserung der Endothelfunktion peripherer Widerstandsgefäße erreicht wird.

Da vorliegende Untersuchungsergebnisse vermuten lassen, dass Thrombozyten sowohl als Marker als auch als Mediator bezüglich der Endotheldysfunktion fungieren, findet sich hier ein neuer Ansatzpunkt für das Verständnis der endothelialen Dysfunktion. Durch den Einsatz der GP-IIb/IIIa-Rezeptorantagonisten kann also nicht nur die Thrombusbildung verhindert, sondern auch die Endothelfunktion per se bei Patienten mit symptomatischer koronarer Herzkrankheit verbessert werden. Um einen noch besseren Einblick in die Interaktionen zwischen aktivierten Thrombozyten und Endothelzellen zu gewinnen, wären weitere Untersuchungen erforderlich. Dabei könnte beispielsweise die Wirkung der GP-IIb/IIIa-Rezeptorantagonisten auf die thrombozytäre NAD(P)H-Oxidase sowie auf die NO-Synthase-vermittelte Superoxidanionen-Produktion bei Patienten mit symptomatischer koronarer Herzerkrankung untersucht werden.

Weiterhin könnte im Zusammenhang mit der thrombozytären CD40L-Expression experimentell untersucht werden, inwieweit mit einer selektiven CD40L-Blockade die Endothelfunktion verbessert werden kann.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Mit Hilfe der Glykoprotein-IIb/IIIa-Rezeptorantagonisten kann nachweislich die Rate an thrombotischen Komplikationen bei Patienten mit symptomatischer koronarer Herzkrankheit, insbesondere im Zusammenhang mit PTCA, gesenkt werden. Dabei wird nicht nur der epikardiale Fluss, sondern auch die mikrovaskuläre Perfusion verbessert, was offenbar auf eine Hemmung dysfunktioneller Wechselwirkungen zwischen aktivierten Thrombozyten und Endothelzellen zurückzuführen ist. Ziel der vorliegenden Studie war es, den Effekt der GP-IIb/IIIa-Rezeptorblockade mit Tirofiban und Eptifibatide auf die Endothelfunktion peripherer Widerstandsgefäße einschließlich der NO-Bioverfügbarkeit bei Patienten mit symptomatischer koronarer Herzkrankheit zu untersuchen.

Einbezogen wurden insgesamt 40 Patienten mit bevorstehender PTCA, bei denen die endothelabhängige und -unabhängige Vasodilatation mittels Unterarmplethysmographie mit und ohne Verabreichung von GP-IIb/IIIa-Rezeptorantagonisten gemessen wurde. Dabei zeigten sich unter GP-IIb/IIIa-Rezeptorblockade jeweils eine gesteigerte endothelabhängige Vasodilatation sowie eine größere inhibitorische Wirkung dieser Vasodilatation durch L-NMMA, während die endothelunabhängige Vasodilatation unverändert blieb. Sechs Stunden nach Infusionsende war kein günstiger Einfluss mehr auf die endothelabhängige Relaxation zu beobachten. Aus diesen Befunden lässt sich schließen, dass der positive Effekt von Tirofiban und Eptifibatide auf die Endothelfunktion offenbar mit einer vermehrten NO-Bioverfügbarkeit zusammenhängt.

Dieser positive Einfluss der GP-IIb/IIIa-Rezeptorblockade ist vermutlich mit einer Hemmung der gestörten Wechselwirkungen zwischen aktivierten Thrombozyten und Endothelzellen zu erklären.

Erhöhter oxidativer Stress, der von Thrombozyten selbst gebildet wird, trägt entscheidend zur Endotheldysfunktion und verminderter NO-Aktivität bei und kann mittels GP-IIb/IIIa-Rezeptorblockade verhindert werden. Auch die Aggregation von Thrombozyten mit Leukozyten sowie die Expression des proinflammatorisch wirkenden thrombozytären CD40L, das durch Interaktion mit endothelialelem CD40 das Fortschreiten kardiovaskulärer Erkrankungen fördert, kann gehemmt werden. Weiterhin wird zusätzlich die Freisetzung von thrombozytärem NO gefördert, das die Endothelfunktion entscheidend verbessert.

Diese Befunde weisen darauf hin, dass die Thrombozytenaktivierung nicht nur als Marker, sondern auch als wichtiger Mediator der Endotheldysfunktion anzusehen ist.

6 LITERATURVERZEICHNIS

Anderson TJ, Uehata A, Gerhard MD, Meredith IT, Knab S, Delagrangé D, Lieberman EH, Ganz P, Creager MA, Yeung AC (1995) Close relation of endothelial function in the human coronary and peripheral circulations. *J Am Coll Cardiol* 26 : 1235-1241

Andrews NP, Husain M, Dakak N, Quyyumi AA (2001) Platelet inhibitory effect of nitric oxide in the human coronary circulation: impact of endothelial dysfunction. *J Am Coll Cardiol* 37 : 510-516

Aukrust P, Muller F, Ueland T, Berget T, Aaser E, Brunsvig A, Solum NO, Forfang K, Froland SS, Gullestad L (1999) Enhanced levels of soluble and membrane-bound CD40 ligand in patients with unstable angina: possible reflection of T lymphocyte and platelet involvement in the pathogenesis of acute coronary syndromes. *Circulation* 100 : 614-620

Aymong ED, Curtis MJ, Yousseff M, Graham MM, Shewchuk L, Leschuk W, Anderson TJ (2002) Abciximab attenuates coronary microvascular endothelial dysfunction after coronary stenting. *Circulation* 105 : 2981-2985

Badimon L, Badimon JJ, Penny W, Webster MW, Chesebro JH, Fuster V (1992) Endothelium and atherosclerosis. *J Hypertens Suppl* 10 : S43-50

Barrabes JA, Garcia-Dorado D, Soriano B, Solares J, Puigfel Y, Trobo L, Garcia-Lafuente A, Soler-Soler J (2000) Dynamic intracoronary thrombosis does not cause significant downstream platelet embolization. *Cardiovasc Res* 47 : 265-273

Beckman JS, Koppenol WH (1996) Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, the ugly. *Am J Physiol* 271 : C1424-1437

Boersma E, Harrington RA, Moliterno DJ, White H, Theroux P, Van de Werf F, de Torbal A, Armstrong PW, Wallentin LC, Wilcox RG, Simes J, Califf RM, Topol EJ, Simoons ML (2002) Platelet glycoprotein IIb-IIIa inhibitors in acute coronary syndromes: a meta analysis of all major randomised clinical trials. *Lancet* 359 : 189-198

Boger RH, Bode-Boger SM, Szuba A, Tsao PS, Chan JR, Tangphao O, Blaschke TF, Cooke JP (1998) Asymmetric dimethylarginine (ADMA): a novel risk factor for endothelial dysfunction: its role in hypercholesterolemia. *Circulation* 98 : 1842-1847

Cai H, Harrison DG (2000) Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases. The role of oxidant stress. *Circ Res* 87 : 840-844

Chakrabarti S, Clutton P, Varghese S, Cox D, Mascelli MA, Freedman JE (2004) Glycoprotein IIb/IIIa inhibition enhances platelet nitric oxide release. *Thromb Res* 113 : 225-233

Chester AH, O'Neil GS, Moncada S, Tadjkarimi S, Yacoub MH (1990) Low basal and stimulated release of nitric oxide in atherosclerotic epicardial coronary arteries. *Lancet* 336 : 897-900

Chirkov YY, Holmes AS, Chirkova LP, Horowitz JD (1999) Nitrate resistance in platelets from patients with stable angina pectoris. *Circulation* 100 : 129-134

Cohen RA, Shepherd JT, Vanhoutte PM (1983) Inhibitory role of the endothelium in the response of isolated coronary arteries to platelets. *Science* 221 : 273-274

Cohen RA (1995) The role of nitric oxide and other endothelium-derived vasoactive substances in vascular disease. *Prog Cardiovasc Dis* 38 : 105-128

Coller BS, Scudder LE (1985) Inhibition of dog platelet function by in vivo infusion of F(ab')₂ fragments of a monoclonal antibody to the platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor. *Blood* 66 : 1456-1459

Coller BS (2001) Anti-GPIIb/IIIa drugs: current strategies and future directions. *Thromb Haemost* 86 : 427-443

Cosentino F, Patton S, d'Uscio LV, Werner ER, Werner-Felmayer G, Moreau P, Malinski T, Lüscher TF (1998) Tetrahydrobiopterin alters superoxide and nitric oxide release in prehypertensive rats. *J Clin Invest* 101 : 1530-1537

Diodati JG, Dakak N, Gilligan DM, Quyyumi AA (1998) Effect of atherosclerosis on endothelium-dependent inhibition of platelet activation in humans. *Circulation* 98 : 17-24

Dixon LJ, Morgan DR, Hughes SM, McGrath LT, El-Sherbeeney NA, Plumb RD, Devine A, Leahey W, Johnston GD, McVeigh GE (2003) Functional consequences of endothelial nitric oxide synthase uncoupling in congestive heart failure. *Circulation* 107 : 1725-1728

Drexler H, Zeiher AM, Meinzer K, Just H (1991) Correction of endothelial dysfunction in coronary microcirculation of hypercholesterolemic patients by L-arginine. *Lancet* 338 : 1546-1550

Drexler H (1997) Endothelial dysfunction: clinical implications. *Prog Cardiovasc Dis* 39 : 287-324

Drexler H (2000) Endothelfunktion bei kardiovaskulären Erkrankungen. 1.Aufl., Bremen: UNI-MED

Engler RL (1989) Free radical and granulocyte-mediated injury during myocardial ischemia and reperfusion. *Am J Cardiol* 63 : 19E-23E

ESPRIT-Investigators (2000) Novel dosing regimen of eptifibatide in planned coronary stent implantation: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 356 : 2037-2044

Faulds D, Sorkin EM (1994) Abciximab (c7E3 Fab). A review of its pharmacology and therapeutic potential in ischaemic heart disease. *Drugs* 48 : 583-598

Forlow SB, McEver RP, Nollert MU (2000) Leukocyte-leucocyte interactions mediated by platelet microparticles under flow. *Blood* 95 : 1317-1323

Freedman JE, Loscalzo J, Barnard MR, Alpert C, Keaney JF, Michelson AD (1997) Nitric oxide released from activated platelets inhibits platelet recruitment. *J Clin Invest* 100 : 350-356

Freedman JE, Ting B, Hankin B, Loscalzo J, Keaney JF jr., Vita JA (1998) Impaired platelet production of nitric oxide predicts presence of acute coronary syndromes. *Circulation* 98 : 1481-1486

Freedman JE, Sauter R, Battinelli EM, Ault K, Knowles C, Huang PL, Loscalzo J (1999) Deficient platelet-derived nitric oxide and enhanced hemostasis in mice lacking the NOSIII gene. *Circ Res* 84 : 1416-1421

Furchgott RF, Zawadzki JV (1980) The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288 : 373-376

Furman MI, Krueger LA, Linden MD, Barnard MR, Frelinger AL, Michelson AD (2004) Release of soluble CD40L from platelets is regulated by glycoprotein IIb/IIIa and actin polymerization. *J Am Coll Cardiol* 43 : 2319-2325

Furman MI, Krueger LA, Linden MD, Fox LD, Ball SP, Barnard MR, Frelinger AL, Michelson AD (2005) GPIIb-IIIa antagonists reduce thromboinflammatory processes in patients with acute coronary syndromes undergoing percutaneous coronary intervention. *Thromb Haemost* 3 : 312-320

Fuster V, Badimon L, Badimon JJ, Chesebro JH (1992) The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes. *N Engl J Med* 326 : 242-250

Gawaz M, Loftus JC, Bajit ML, Frojmovic MM, Plow EF, Ginsberg MH (1991) Ligand bridging mediates integrin alphaIIb beta3 (platelet GP IIb-IIIa) dependent homotypic and heterotypic cell-cell interactions. *J Clin Invest* 8 : 1128-1134

Gawaz M, Neumann FJ, Dickfeld T, Koch W, Laugwitz KL, Adelsberger H, Langenbrink K, Page S, Neumeier D, Schömig A, Brand K (1998) Activated platelets induce monocyte chemotactic protein-1 secretion and surface expression of intercellular adhesion molecule-1 on endothelial cells. *Circulation* 98 : 1164-1171

Gawaz M, Neumann FJ, Schömig A (1999) Evaluation of platelet membrane glycoproteins in coronary artery disease - consequences for diagnosis and therapy. *Circulation* 99 : E1-11

Ginsberg MH, Loftus JC (1995) Platelet integrins. *Thromb Haemost* 74 : 352-359

Gryglewski RJ, Palmer RMJ, Moncada S (1986) Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. *Nature* 320 : 454-456

Harrington RA (1999) Overview of clinical trials of glycoprotein IIb-IIIa inhibitors in acute coronary syndromes. *Am Heart J* 138 : 276-286

Henn V, Slupsky JR, Grafe M, Anagnostopoulos I, Forster R, Muller-Berghaus G, Kroczeck RA (1998) CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature* 391 : 591-594

Heitzer T, Schlinzig T, Krohn K, Meinertz T, Münzel T (2001) Endothelial dysfunction, oxidative stress, and risk of cardiovascular events in patients with coronary artery disease. *Circulation* 104 : 2673-78

Houston DS, Shepherd JT, Vanhoutte PM (1986) Aggregating human platelets cause direct contraction and endothelium-dependent relaxation of isolated

canine coronary arteries. Role of serotonin, thromboxane A₂, and adenine nucleotides. *J Clin Invest* 78 : 539-544

Hundelshausen P von, Weber KS, Huo Y, Proudfoot AE, Nelson PJ, Ley K, Weber C (2001) RANTES deposition by platelets triggers monocyte arrest on inflamed and atherosclerotic endothelium. *Circulation* 103 : 1772-1777

Hundelshausen P von, Koenen RR, Sack M, Mause MF, Adriaens W, Proudfoot AE, Hackeng TM, Weber C (2005) Heterophilic interactions of platelet factor 4 and RANTES promote monocyte arrest on endothelium. *Blood* 105 : 924-930

Huo Y, Schober A, Forlow SB, Smith DF, Hyman MC, Jung S, Littman DR, Weber C, Ley K (2003) Circulating activated platelets exacerbate atherosclerosis in mice deficient apolipoprotein E. *Nat Med* 9 : 61-67

Iuliano L, Colavita AR, Leo R, Practico D, Violi F (1997) Oxygen free radical and platelet activation. *Free Radic Biol Med* 22 : 999-1006

Kanaya S, Ikeda H, Haramaki N, Murohara T, Imaizumi T (2001) Intraplatelet tetrahydrobiopterin plays an important role in regulating canine coronary arterial thrombosis by modulating intraplatelet nitric oxide and superoxide generation. *Circulation* 104 : 2478-2484

Karvouni E, Katritsis DG, Ioannidis JP (2003) Intravenous glycoprotein IIb/IIIa receptor antagonists reduce mortality after percutaneous coronary stenting. *J Am Coll Cardiol* 41 : 26-32

Keaney JF Jr., Vita JA (1995) Atherosclerosis, oxidative stress, and antioxidant protection in endothelium-derived relaxing factor action. *Prog Cardiovasc Dis* 38: 129-154

Kogaki S, Sawa Y, Sano T, Matsushita T, Ohata T, Kurotobi S, Tojo SJ, Matsuda H, Okada S (1999) Selectin on activated platelets enhances neutrophil endothelial adherence in myocardial reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 43: 968-973

Krötz F, Sohn HY, Gloe T, Zahler S, Riexinger T, Schiele TM, Becker BF, Theisen K, Klauss V, Pohl U (2002) NAD(P)H oxidase-dependent platelet superoxide anion release increases platelet recruitment. *Blood* 100 : 917-924

Krötz F, Sohn HY, Pohl U (2004) Reactive oxygen species. Players in the platelet game. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24 : 1988-1996

Kubes P, Suzuki M, Granger DN (1991) Nitric oxide: an endogenous modulator of leucocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci USA* 88 : 4651-4655

Kunichika H, Ben-Yehuda O, Lafitte S, Kunichika N, Peters B, DeMaria AN (2004) Effects of glycoprotein IIb/IIIa inhibition on microvascular flow after coronary reperfusion. *J Am Coll Cardiol* 43 : 276-283

Lefkovits J, Plow EF, Topol EJ (1995) Platelet glycoprotein IIb/IIIa receptors in cardiovascular medicine. *N Engl J Med* 332 : 1553-1559

Lefkovits J, Topol EJ (1996) Platelet glycoprotein receptor IIb/IIIa antagonists in coronary artery disease. *Eur Heart J* 17 : 9-18

Lemos JA de, Antman EM, Gibson CM, McCabe CH, Giugliano RP, Murphy SA, Coulter SA, Anderson K, Scherer J, Frey MJ, Van der Wieken R, Van der Werf F, Braunwald E (2000) Abciximab improves both epicardial flow and myocardial reperfusion in ST-elevation myocardial infarction. Observations from the TIMI 14 Trial. *Circulation* 101 : 239-243

Leyen HE von der, Gibbons GH, Morishita R, Lewis NP, Zhang L, Nakajima M, Kaneda Y, Cooke JP, Dzau VJ (1995) Gene therapy inhibiting neointimal vascular lesion: in vivo transfer of endothelial cell nitric oxide synthase gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 92 : 1137-1141

Lindemann S, Tolley ND, Dixon DA, McIntyre TM, Prescott SM, Zimmermann GA, Weyrich AS (2001) Activated platelets mediate inflammatory signaling by regulated interleukin 1beta synthesis. *J Cell Biol* 154 : 485-490

Loscalzo J (2000) What we know and don't know about L-arginine and NO. *Circulation* 101 : 2126-2129

Loscalzo J (2001) Nitric oxide insufficiency, platelet activation, and arterial thrombosis. *Circ Res* 88 : 756-762

Ludmer PL, Selwyn AP, Shook TL, Wayne RR, Mudge GH, Wayne AR, Ganz P (1986) Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med* 315 : 1046-1051

Lutgens E, Cleutjens KB, Heeneman S, Kotliansky VE, Burkly LC, Daemen MJ (2000) Both early and delayed anti-CD40 L antibody treatment induces a stable plaque phenotype. *Proc Natl Acad Sci USA* 97 : 7464-7469

Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA (1991) Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev* 43 : 109-142

Mugge A, Elwell JH, Peterson TE, Hofmeyer TG, Heistad DD, Harrison DG (1991) Chronic treatment with polyethylene-glycolated superoxide dismutase partially restores endothelium-dependent vascular relaxations in cholesterol-fed rabbits. *Circ Res* 69 : 1293-1300

Nagata K, Tsuji T, Todoroki N, Katagiri Y, Tanoue K, Yamazaki H, Hanai N, Irimura T (1993) Activated platelets induce superoxide anion release by monocytes and neutrophil through P-selectin (CD62). *J Immunol* 151: 3267-3273

Nannizzi-Alaimo L, Alves VL, Phillips DR (2003) Inhibitory effects of glycoprotein IIb/IIIa antagonists and aspirin on the release of soluble CD40 ligand during platelet stimulation. *Circulation* 107 : 1123-1128

Neumann FJ, Blasini R, Schmitt C, Alt E, Dirschinger J, Gawaz M, Kastrati A, Schömig A (1998) Effect of glycoprotein IIb/IIIa receptor blockade on recovery of coronary flow and left ventricular function after the placement of coronary-artery stents in acute myocardial infarction. *Circulation* 98 : 2695-2701

Neumann FJ, Zohlnhofer D, Fakhoury L, Ott I, Gawaz M, Schömig A (1999) Effect of glycoprotein IIb/IIIa receptor blockade on platelet-leucocyte interaction and surface expression of the leucocyte integrin Mac-1 in acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 34 : 1420-1426

Ohara Y, Peterson TE, Harrison DG (1993) Hypercholesterolemia increases endothelial superoxide anion production. *J Clin Invest* 91 : 2546-2551

Oskarsson HJ, Hofmeyer TG (1997) Diabetic human platelets release a substance that inhibits platelet-mediated vasodilation. *Am J Physiol* 273 : H371-379

Ott I, Neumann FJ, Gawaz M, Schmitt M, Schömig A (1996) Increased neutrophil-platelet adhesion in patients with unstable angina. *Circulation* 94 : 1239-1246

Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S (1987) Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327 : 524-526

Pearson JD (1999) Endothelial cell function and thrombosis. *Baillieres Best Pract Res Clin Haematol* 12 : 329-341

Phillips DR, Charo IF, Scarbourogh RM (1991) GPIIb/IIIa: the responsive integrin. *Cell* 65 : 359-362

Phipps RP (2000) Atherosclerosis: the emerging role of inflammation and the CD40-CD40 ligand system. *Proc Natl Acad Sci USA* 97 : 6930-6932

Plow EF, D'Souza SE, Ginsberg MH (1992) Ligand binding to GPIIb-IIIa: a status report. *Semin Thromb Hemost* 18 : 324-332

PRISM-PLUS-Investigators (1998) Inhibition of the platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor with Tirofiban in unstable angina and non Q-wave myocardial infarction. *N Engl J Med* 338 : 1488-1497

Pu Q, Wiel E, Corseaux D, Bordet R, Azrin MA, Ezekowitz MD, Lund N, Jude B, Vallet B (2001) Beneficial effect of glycoprotein IIb/IIIa inhibitor (AZ-1) on

endothelium in Escherichia coli endotoxin-induced shock. *Crit Care Med* 29 : 1181-1188

Quyyumi AA, Dakak N, Mulcahy D, Andrews NP, Husain S, Panza JA, Cannon RO (1997) Nitric oxide activity in the atherosclerotic human coronary circulation. *J Am Coll Cardiol* 29 : 308-317

Radomski MW, Palmer RM, Moncada S (1987) Comparative pharmacology of endothelium- derived relaxing factor, nitric oxide and prostacyclin in platelets. *Br J Pharmacol* 92 : 181-187

Radomski MW, Palmer RM, Moncada S (1990) An L-arginine/nitric oxide pathway present in human platelets regulates aggregation. *Proc Natl Acad Sci USA* 87 : 5193-5197

RESTORE-Investigators (1997) 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 : 1445-1453

Ross R (1999) Mechanisms of disease: Atherosclerosis - an inflammatory disease. *N Engl J Med* 340 : 115-126

Schäfer A, Alp NJ, Cai S, Lygate CA, Neubauer S, Eigenthaler M, Bauersachs J, Channon KM (2004) Reduced vascular NO bioavailability in diabetes increases platelet activation in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24 : 1720-1726

Serebruany VL, Cummings CC, Malinin AI, Steinhubl SR, Gurbel P (2001) Uniform platelet activation exists before coronary stent implantation despite aspirin therapy. *Am Heart J* 142 : 611-616

Shen YT, Wiedmann RT, Lynch JJ jr., Gould RJ (2000) Platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor inhibitor preserves coronary flow reserve during progressive coronary arteriostenosis in swine. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20 : 2309-2315

Sheu JR, Yen MH, Hung WC, Lee YM, Su CH, Huang TF (1997) Triflavin inhibits platelet-induced vasoconstriction in de-endothelialized aorta. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17 : 3461-3468

Shimokawa H, Flavahan NA, Vanhoutte PM (1991) Loss of endothelial pertussis toxin-sensitive G-protein function in atherosclerotic porcine coronary arteries. *Circulation* 83 : 652-660

Smith JW, Steinhubl SR, Lincoff AM, Coleman JC, Lee TT, Hillman RS, Collier BS (1999) Rapid platelet - function assay. An automated and quantitative cartridge-based method. *Circulation* 99 : 620-625

Stamler JS, Loh E, Roddy MA, Currie KE, Creager MA (1994) Nitric oxide regulates basal systemic and pulmonary vascular resistance in healthy humans. *Circulation* 89 : 2035-2040

Stroes E, Kastelein J, Cosentino F, Erkelens W, Wever R, Koomans H, Lüscher T, Rabelink T (1997) Tetrahydrobiopterin restores endothelial function in hypercholesterolemia. *J Clin Invest* 99 : 41-46

Takajo Y, Ikeda H, Haramaki N, Murohara T, Imaizumi T (2001) Augmented oxidative stress of platelets in chronic smokers. Mechanisms of impaired platelet-derived nitric oxide bioactivity and augmented platelet aggregability. *J Am Coll Cardiol* 38 : 1320-1327

Takeshita S, Isshiki T, Ochiai M, Ishikawa T, Nishiyama Y, Fusano T, Toyozumi H, Kondo K, Ono Y, Sato T (1997) Systemic inflammatory responses in acute coronary syndrome: increased activity observed in polymorphonuclear leukocytes but not T lymphocytes. *Atherosclerosis* 135 : 187-192

Taylor AJ, Bobik A, Berndt MC, Ramsay D, Jennings G (2002) Experimental rupture of atherosclerotic lesions increases distal vascular resistance: a limiting factor to the success of infarct angioplasty. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22 : 153-160

Urbich C, Dernbach E, Aicher A, Zeiher AM, Dimmeler S (2002) CD40 ligand inhibits endothelial cell migration by increasing production of endothelial reactive oxygen species. *Circulation* 106 : 981-986

Vallance P, Collier J, Moncada S (1989) Effects endothelium-derived nitric oxide on peripheral arteriolar tone in man. *Lancet* 2 : 997-1000

Vane JR, Änggard EE, Botting RM (1990) Regulatory functions of the vascular endothelium. *N Engl J Med* 323 : 27-36

Vergnani L, Hatrik S, Ricci F, Passaro A, Manzoli N, Zhuliali G, Brovkovich V, Fellin R, Malinski T (2000) Effect of native and oxidized low-density lipoprotein on endothelial nitric oxide and superoxide production - key role of L-arginine availability. *Circulation* 101 : 1261-1266

Verstraete M (2000) Synthetic inhibitors of platelet glycoprotein IIb/IIIa in clinical development. *Circulation* 101 : E76-80

Vita JA, Treasure CB, Nabel EG, McLenachan JM, Fish RD, Yeung AC, Vekshtein VI, Selwyn AP, Ganz P (1990) Coronary vasomotor response to acetylcholine relates to risk factors for coronary artery disease. *Circulation* 81 : 491-497

Vrints CJ, Bult H, Hitter E, Herman AG, Snoeck JP (1992) Impaired endothelium-dependent cholinergic coronary vasodilation in patients with angina and normal coronary arteriograms. *J Am Coll Cardiol* 19 : 21-31

Wachowicz B, Olas B, Zbikowska HM, Buczynski A (2002) Generation of reactive oxygen species in blood platelets. *Platelets* 13 : 175-182

Waldman SA, Murad F (1988) Biochemical mechanisms underlying vascular smooth muscle relaxation: the guanylate cyclase-cyclic GMP system. *J Cardiovasc Pharmacol* 12 Suppl 5 : S115-118

Warnholtz A, Ostad MA, Heitzer T, Goldmann BU, Nowak G, Munzel T (2005) Effect of Tirofiban on percutaneous coronary intervention-induced endothelial dysfunction in patients with stable coronary artery disease. *J Am Cardiol* 95 : 20-23

Werns SW, Walton JA, Hsia HH, Nabel EG, Sanz ML, Pitt B (1989) Evidence of endothelial dysfunction in angiographically normal coronary arteries of patients with coronary artery disease. *Circulation* 79 : 287-291

Yao SK, McNatt J, Cui K, Anderson HV, Maffrand JP, Buja LM, Willerson JT (1993) Combined ADP and Thromboxan A₂ antagonism prevents cyclic flow variations in stenosed and endothelium-injured arteries in nonhuman primates. *Circulation* 88 : 2888-2893

Yao SK, Ober JC, Gonenne A, Clubb FJ, Krishnaswami A, Ferguson JJ, Anderson HV, Gorecki M, Buja LM, Willerson JT (1993a) Active oxygen species play a role in mediating platelet aggregation and cyclic flow variations in severely stenosed and endothelium-injured coronary arteries. *Circ Res* 73 : 952-967

7 ANHANG

7.1 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt PD Dr. Thomas Heitzer für die freundliche Überlassung des Themas und die stetige fachliche Begleitung, von der ich in hohem Ausmaß profitieren konnte. Durch ihn wurde ich in das elementare Fach der Inneren Medizin, die Kardiologie, eingeführt.

Mein Dank gilt außerdem Gaby Frost, die uns bei der Materialbestellung zur Seite stand und uns den Umgang mit Infusionen und anderen technischen Einzelheiten der Untersuchung näher brachte.

Katharina Köke danke ich für die gute und freundschaftliche Zusammenarbeit.

Zuletzt sei auch den Patienten gedankt für ihr Vertrauen und ihre Bereitschaft, sich für die Untersuchungen zur Verfügung zu stellen.

7.2 Lebenslauf

Isabel Ollmann

geb. am 06.01.1980 in Hamburg

Ausbildung

08/86-07/99	Grundschule und Gymnasium, Hamburg. Abitur im Juli 1999.
08/84-07/98	Koreanische Schule, Hamburg. Abschluss im Juli 1998.
Seit 10/99	Medizinstudium am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf.
09/2001	Physikum
08/2002	Erstes Staatsexamen
09/2004	Zweites Staatsexamen
11/2005	Drittes Staatsexamen
10/04-09/05	PJ in Edinburgh/Schottland, Incheon/Südkorea und Hamburg

7.3 Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht an einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.