Aus der Klinik für Innere Medizin m. S. Kardiologie
der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Messung von Phospholipase D Metaboliten bei Notfall- und Intensivpatienten mit akutem Koronarsyndrom unter besonderer Berücksichtigung der Therapie mit GPIIb/IIIa-Antagonisten

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité -
Universitätsmedizin Berlin

von
Christian Storm
aus Groß Vollstedt

Dekan: Prof. Dr. med. Martin Paul

Gutachter: 1. PD Dr. med. M. Möckel

2. Prof. Dr. med. T. Störk

3. PD Dr. G. Hafner

Datum der Promotion: 29.10.2004

Abstrakt

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss des GPIIb/IIIa- Antagonisten Tirofiban auf die Vollblut-Konzentration des Phospholipase D Metaboliten Cholin (2- hydroxyethyltrimethylammonium, „whole blood cholin“, WBCHO) bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom untersucht. Die Phospholipase D hat eine Schlüsselfunktion bei der Destabilisierung atherosklerostischer Plaques, Aktivierung von Thrombozyten und Sekretion von Matrixmetalloproteinasen durch Makrophagen. Als Analyseverfahren für Cholin wurde die Hochleistungsflüssigkeits-Chromatographie (HPLC) in Verbindung mit der Massenspektrometrie (MS) eingesetzt. Die Klassifikation der Patienten erfolgte nach den aktuellen Richtlinien der European Society of Cardiology (ESC) und des American College of Cardiology (ACC) für das akute Koronarsyndrom. Aus einem Kollektiv von 342 Patienten wurden 32 Patienten mit akutem Koronarsyndrom in diese Studie aufgenommen, in zwei Gruppen mit jeweils 16 Patienten mittels matched pairs Technik unterteilt und analysiert. Eine Gruppe erhielt zusätzlich zur Standard- Therapie Tirofiban. Es wurden Blutabnahmen bei Aufnahme, nach 3-6 Stunden und nach 12-24 Stunden gewonnen. Hieraus wurden Troponin I und T, Myoglobin, Kreatinkinase Isoenzym MB, sowie Vollblut-Cholin bestimmt. Es gab einen signifikanten Verlauf der WBCHO-Konzentration ($p = 0,006$) in der mit Tirofiban behandelten Gruppe im Gegensatz zur Gruppe die nur die Standardtherapie erhielt ($p = 0,174$). Für den Verlauf der Standardmarker (Myoglobin, Kreatinkinase, Troponin I und T), wurde keine signifikante Beeinflussung durch die Therapie mit Tirofiban nachgewiesen. Im Vergleich zu Troponin I und T, Myoglobin und Kreatinkinase hatte WBCHO das zeitlich früheste Maximum. WBCHO könnte als Markersubstanz der Phospholipase D Aktivität zusätzliche Informationen über die Möglichkeit einer Destabilisierung einer atherosklerotischen Plaque bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom geben. Dies könnte in Kombination mit anderen Markern eine verbesserte Risikostratifizierung in der Frühphase des akuten Koronarsyndroms ermöglichen. Zusätzlich scheint ein Monitoring der Tirofiban Therapie durch die WBCHO Konzentration möglich zu sein.

Akutes Koronarsyndrom, GPIIb/IIIa-Antagonist, Phospholipase D, Cholin, HPLC-MS

Abstract

This research work deals with the measurement of the phospholipase D metabolite choline in patients with acute coronary syndrome (ACS) undergoing GPIIb/IIIa antagonist therapy. The influence of GPIIb/IIIa antagonists on concentration levels of the PLD metabolite 2- hydroxyethyltrimethylammonium in blood (whole blood choline, WBCHO) was studied. The activation of phospholipase D (PLD) has a key function in plaque destabilisation, activation of platelets and secretion of matrixmetalloproteinases by macrophages. For the detection of the PLD metabolite WBCHO high pressure liquid chromatography (HPLC) with a mass spectrometer (MS) was used. The classification of patients was performed according to the current guidelines of the European Society of Cardiology (ESC) and the American College of Cardiology (ACC). 32 patients with ACS out of a 342 patient study were included and analysed by matched pairs technique as two groups with 16 patients. One group was treated with Tirofiban (aggrastrat) in addition to standard therapy. Blood samples were taken at admission, after 3-6 hours and after 12-24 hours and in addition to the troponines, myoglobin and creatinkinase Isoenzyme MB, whole blood choline was analyzed. There was a significant (p = 0,006) decrease of WBCHO level in the group treated with Tirofiban in contrast to the reference group with no significant decrease (p = 0,174). The levels of conventional markers as troponin I and T, CK-MB mass and myoglobin had no significant changes in relationship to the Tirofiban therapy. WBCHO had the earliest maximum in contrast to all other markers. We concluded that WBCHO can be used as an additional early risk marker in ACS. Since GPIIb/IIIa- antagonist- therapy may influence WBCHO level, WBCHO has potential to be used for monitoring of therapy.

Acute coronary Syndrome, GPIIb/IIIa-antagonist, phospholipase D, choline, HPLC-MS

Diese Arbeit ist Wiebke Naefe gewidmet

Abkürzungsverzeichnis

ACC	American College of Cardiology
ACS	Acute coronary syndrome (Akutes Koronarsyndrom)
AHA	American Heart Association
AMI	Akuter Myokardinfarkt
AP	Angina Pectoris
CK	Kreatinkinase
CRP	C-reaktives Protein
cTnT /cTnI	Cardiales Troponin T bzw. I
ESC	European Society of Cardiology
GP	Glycoprotein
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IL	Interleukin
kD	Kilo Dalton
LDL	Low Density Lipoprotein
lysoPC	Lysophosphatidylcholin
MS	Massenspektrometrie
NSAID	Non-Steroidal Antiinflamatoric Drugs
oxLDL	Oxidiertes LDL
PKC	Protein Kinase C
PLC	Phospholipase C
PLD	Phospholipase D
PTCA	Percutaneous Transluminal Coronary Angioplasty, (perkutane transluminale Koronarangioplastie)
RhoA	Ras-homology-protein
WBCHO	Whole blood choline, Vollblut-Cholin

Inhaltsverzeichnis

1 EINLEITUNG 10

1.1 DAS AKUTE KORONARSYNDROM 11

1.2 DIAGNOSTIK UND RISIKOSTRATIFIZIERUNG DES AKUTEN KORONARSYNDROMS 12

1.2.1 Notfalldiagnostik und frühe Risikostratifizierung 12

1.2.2 Weiterführende biochemische Diagnostik 14

1.2.2.1 Konventionelle Marker 14

1.2.2.2 Troponin 15

1.2.2.3 C-reaktives Protein und B-Typ natriuretisches Peptid 17

1.2.2.4 Andere biochemische Marker 19

1.2.2.5 Kombination von Marker-Substanzen 22

1.3 MEDIKAMENTÖSE THERAPIE DES AKUTEN KORONARSYNDROMS MIT GPIIB/IIIA-ANTAGONISTEN 23

1.4 PATHOPHYSIOLOGIE DER ATHEROSKLEROTISCHEN PLAQUES 27

1.4.1 Stabile Plaque 28

1.4.2 Instabile Plaque 29

1.5 DER GPIIB/IIIA-REZEPTOR 29

1.6 PHOSPHOLIPASE D 30

1.6.1 Phospholipase D Isoformen 30

1.6.2 Phospholipase D in Makrophagen und Plättchen 31

1.7 VOLLBLUT-CHOLIN 32

1.7.1 Messung der Phospholipase D Aktivität 32

1.7.2 Prognostische Aussagekraft von Cholin 33

2 FRAGESTELLUNG 35

3 METHODIK 36

3.1 STUDIENPROTOKOLL 36

3.1.1 Studienpopulation 36

3.1.2 Einschluss der Studienpatienten 36

3.1.3 Selektion der Gruppen 37

3.1.4 Probengewinnung 37

3.1.5 Probenbearbeitung 37

3.2 ANALYSE- UND TRENNVERFAHREN 38

3.2.1 HPLC 39

3.2.2 Massenspektrometrie mittels Elektrospray-Ionisation 41

3.2.3 Messung und Interpretation 46

3.3 UNTERSUCHTE LABORWERTE 49

3.4 STATISTISCHE AUSWERTUNG 49

4 ERGEBNISSE 50

4.1 CHARAKTERISTIKA DER PATIENTEN 50

4.2 VERLAUF DER MARKER-SUBSTANZEN 52

4.2.1 Verlauf der Troponine 52

4.2.2 Verlauf von Myoglobin 53

4.2.3 Verlauf der Kreatinkinase 54

4.3 WBCHO-VERLAUF 55

5 DISKUSSION 59

5.1 DISKUSSION DER METHODE 59

5.2 DISKUSSION DER ERGEBNISSE 60

6 ZUSAMMENFASSUNG 65

1 Einleitung

Herzkreislauferkrankungen stellen in Deutschland mit 47% pro Jahr die häufigste Todesursache dar. Nach dem Statistischen Bundesamt entsprach dies im Jahre 2001 391.300 Verstorbenen. Unter den Herzkreislauferkrankungen ist das akute Koronarsyndrom (ACS) mit seinen verschiedenen Verlaufsformen anteilig besonders häufig. Das American College of Cardiology (ACC) und die American Heart Association (AHA) haben die verschiedenen Manifestationen des akuten Koronarsyndroms in Ihrer aktuellen Richtlinie (2002) zur Diagnostik und Therapie des akuten Koronarsyndroms, wie in Abbildung 1 schematisch dargestellt, zusammengefasst.

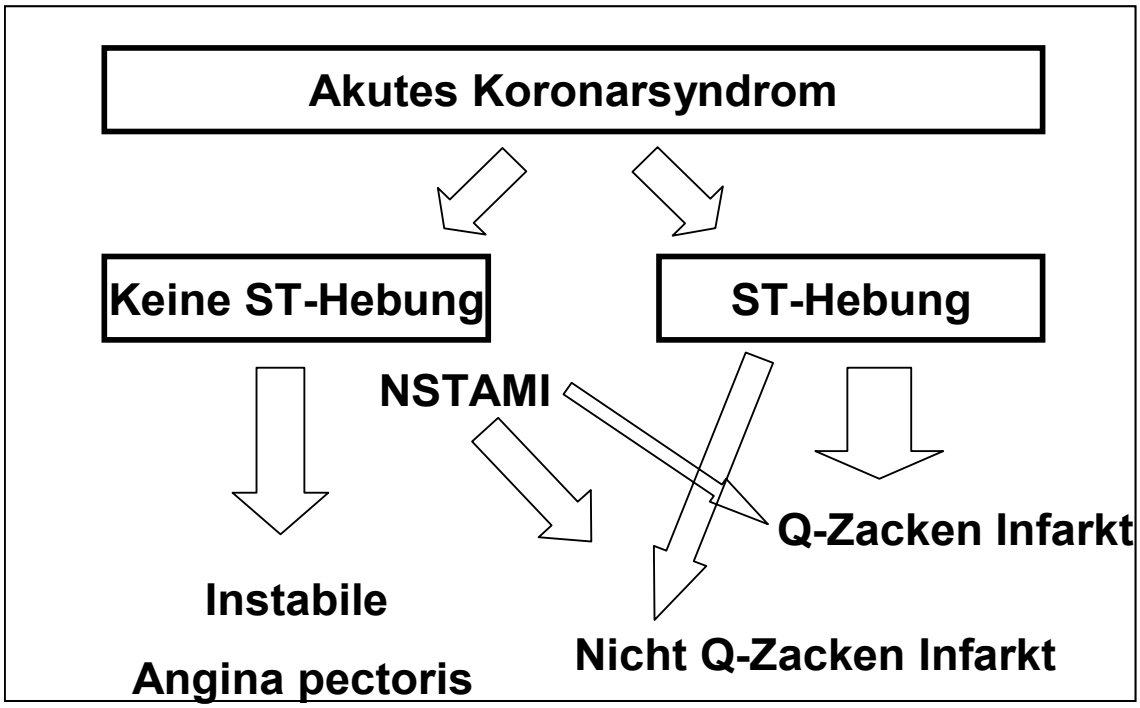


Abbildung 1: Nomenklatur des akuten Koronarsyndroms der ACC/AHA Richtlinie 2002 zum Therapiemanagement von Patienten mit akutem Koronarsyndrom und nicht ST-Hebungs Infarkt übersetzt aus dem Englischen [1]. Das Diagramm verdeutlicht, dass Patienten mit Brustschmerz unterteilt werden müssen, in die Gruppen mit ST-Hebungen und ohne ST-Hebungen. Die meisten Patienten mit ST-Hebung im EKG entwickeln einen Q-Zacken Infarkt und nur ein kleiner Anteil imponiert mit einem nicht-Q-Zacken Infarkt. Patienten, die keine diagnostischen Veränderungen im EKG aufweisen, haben entweder eine instabile Angina Pectoris oder einen Infarkt ohne ST-Hebung im EKG (NSTAMI), wobei die Differenzierung durch den Nachweis oder das Ausbleiben eines Anstiegs kardialer Marker geführt wird.

Die Klassifizierung der akuten Koronarsyndrome durch die ESC/ACC hat durch die Redefinition des Myokardinfarktes eine erhebliche Änderung erfahren.

Besonders Patienten mit ansteigenden Troponin Werten im Rahmen einer Angina Pectoris Episode werden nach der neuen Definition als Myokardinfarkt bezeichnet und nicht mehr als instabile Angina Pectoris eingestuft. Diese Neudefinition ist umstritten und die klinische Umsetzung in Deutschland ist immer noch uneinheitlich. Da die internationale Anerkennung und Umsetzung der ESC/ACC Richtlinie zum akuten Koronarsyndrom aber unstrittig ist, basiert die Klassifikation und Diagnostik des akuten Koronarsyndroms in dieser Arbeit auch auf dieser Neudefinition.

Ursächlich beteiligt an der Entstehung des ACS sind atherosklerotische Gefäßveränderungen, wobei bei diesem Prozess die Thrombozyten eine Schlüsselrolle einnehmen. Besonderen Stellenwert haben hierbei der Glykoprotein-(GP-)IIb/IIIa Oberflächenrezeptor und die intrazelluläre Signalvermittlung der Thrombozyten durch Phospholipase D und dem Spaltprodukt Cholin bei der Plaqueformierung. Weiterhin werden die Diagnostik mit biochemischen Markern, die Therapie mit GPIIb/IIIa-Antagonisten und die Möglichkeiten zur Risikostratifizierung dargestellt.

1.1 Das akute Koronarsyndrom

Nach den aktuellen Richtlinien der American Heart Association (AHA) wird unter dem Oberbegriff des akuten Koronarsyndroms der Infarkt mit ST-Hebung und ohne ST-Hebung und die Instabile Angina Pectoris zusammengefasst [2]. Die Bezeichnungen Nicht-Q-Zacken- und Q-Zacken-Infarkt (Non-Q-wave- und Q-Wave-Infarkt) sind in ihrer klinischen Bedeutung etwas in den Hintergrund getreten, da diese Einteilung häufig erst im Verlauf möglich ist, während für klinische Entscheidungen frühzeitige Differenzierungen notwendig sind. Dennoch können die einzelnen Krankheitsbilder teilweise fließend ineinander übergehen. Aus diesem Grund ist eine frühe eindeutige Diagnosestellung zur schnellen Einleitung der gezielten Therapie in vielen Fällen schwierig. Es wurden viele Neuerungen, entsprechend dem aktuellen Stand der Forschung, in den Ablauf des diagnostischen Vorgehens aufgenommen. Die AHA hat zur Diagnosestellung und Therapie bei Verdacht auf Vorliegen eines akuten Koronarsyndroms die in Kapitel 1.2 dargestellte Vorgehensweise präsentiert.

1.2 Diagnostik und Risikostratifizierung des akuten Koronarsyndroms

Die klinische Diagnostik des akuten Koronarsyndroms lässt sich in die initiale Notfalldiagnostik und die weiterführende Diagnostik gliedern. Zusätzlich zur eigentlichen Diagnostik, erfolgt eine Risikostratifizierung zur Einschätzung der Prognose des Patienten und Auswahl der geeigneten Therapie. Ein wesentliches Standbein der Risikostratifizierung ist die Bestimmung biochemischer Marker [3]. Es erscheint sinnvoll, die einzelnen Substanzen in gesonderten Abschnitten zu betrachten.

1.2.1 Notfalldiagnostik und frühe Risikostratifizierung

Die Diagnostik bei Aufnahme des Patienten lässt sich weiter in die Anamneseerhebung und klinische Untersuchung, die Elektrokardiogramm-(EKG)-Diagnostik und die Diagnostik mit biochemischen Markern unterteilen. Zunächst wird die Anamnese und klinische Symptomatik des Patienten betrachtet. Die Hauptbeschwerdesymptomatik des Patienten mit akutem Koronarsyndrom ist häufig der akute Brustschmerz. Dieser kann z.B. in Arme oder Abdomen ausstrahlen oder auch nur auf den Thorax begrenzt sein. In vielen Fällen kommt noch eine Dyspnoe mit vegetativer Begleitsymptomatik hinzu. Da diese Symptome vielfältige Ursachen haben können, muss in der ersten Untersuchung auch eine nicht-ischämische Ursache wie zum Beispiel eine Perikarditis oder Myokarditis und eine Lungenarterienembolie bedacht werden. Zur weiteren Diagnostik und Abklärung wird ein EKG geschrieben. Zur Differenzierung des akuten Koronarsyndroms wird besonders auf ST-Veränderungen geachtet. Keinesfalls schließt ein normaler EKG-Befund das Vorliegen eines akuten Koronarsyndroms aus. In diesem Zusammenhang sind die häufigsten EKG Veränderungen ST-Strecken-Veränderungen, Q-Veränderungen oder T-Wellen-Veränderungen. Ein erhöhtes Risiko haben auch Patienten mit akutem Koronarsyndrom und Linksschenckelblock oder elektrokardiographischen Zeichen der linksventrikulären Hypertrophie [1]. Nach den aktuellen Empfehlungen der AHA[1] soll der Patient mit akutem Koronarsyndrom nach der Anamnese, der klinischen Untersuchung und den

ersten Schritten der Notfalldiagnostik, entweder der Gruppe mit ST-Hebung im EKG oder der Gruppe ohne ST-Hebung zugeordnet werden.

Zusätzliche Informationen zur Diagnose liefern die biochemischen Marker. Durch sie soll häufig eine Prognose und Therapiefestlegung, sowie eine Eingruppierung in die verschiedenen Subklassen des akuten Koronarsyndroms erfolgen. Die Richtlinien der ESC/ACC zur Redefinition des Myokardinfarktes empfehlen ebenfalls die kardialen Troponine (cTnT/cTnI), wegen ihrer hohen myokardialen Spezifität, eindeutig als die bevorzugten Biomarker für die Diagnostik. Die myokardiale Kreatinkinase (CK-MB) Masse ist entsprechend dem Consensus-Dokument lediglich die beste Alternative, wenn Troponine nicht verfügbar sind. Das kardiale Risiko wird über das mögliche Auftreten von kardialen Ereignissen definiert. Unter kardialen Ereignissen werden in der Regel „major cardiac events“ (MACE) verstanden, wie der plötzliche Herztod, Myokardinfarkt bzw. Reinfarkt, erneute Instabile Angina Pectoris (mit Krankenhausaufnahme), hämodynamische Komplikationen, schwerwiegende Herzrhythmusstörungen und die Notwendigkeit interventioneller oder operativer Koronarinterventionen. Die Wertigkeit der einzelnen oder kombinierten Anwendung kardialer Marker zur Notfalldiagnostik ist kompliziert und wird daher in einzelnen Abschnitten betrachtet (siehe Kapitel 1.2.2).

Neben den biochemischen Methoden haben Risiko Klassifikationen (Scores) immer noch eine wichtige Bedeutung. Neben älteren Klassifikationen wie Peel-Index [4], Norris Prognostic Score [5] und Killip-Klassifikation [6, 7] sind einige besondere Scores und Klassifikationen für das akute Koronarsyndrom von Bedeutung. Zur Klassifizierung der Patienten und Einschätzung des jeweiligen Risikos weiterer kardialer Ereignisse gibt es verschiedene Modelle, von denen hier die Klassifikation nach Braunwald und der TIMI-Risk Score näher beschrieben werden sollen. In der Klassifikation nach Braunwald werden die Patienten mit instabiler Angina Pectoris in drei Stadien, entsprechend der Beschwerden, nach Erstangina (I) und Ruheangina vor (II) oder innerhalb der letzten 48 Stunden (III), eingeteilt. Zusätzlich erlaubt die Einteilung in sekundäre instabile Angina (A), primäre instabile Angina (B) und 2 Wochen post Infarkt (C), eine genauere Differenzierung. Unter Einbeziehung des Troponin-Tests soll die Gruppe IIIB weiter in Test-positiv und Test-negativ unterteilt werden [8, 9].

Troponin-positive Patienten mit akutem Koronarsyndrom werden allerdings nicht mehr als instabile Angina Pectoris, sondern als Myokardinfarkt klassifiziert (Redefinition ESC/ACC 2000). Der TIMI-Risk-Score definiert 7 verschiedene Faktoren, mit deren Hilfe eine Risikostratifizierung möglich ist. Diese sind Alter über 65 Jahre, über drei Atherosklerose-Risikofaktoren, bekannte Koronarstenose größer 50%, Einnahme von Aspirin innerhalb der letzten 7 Tage, wiederholt Angina Pectoris Beschwerden innerhalb der letzten 24 Stunden, erhöhte biochemische Herzmarker und ST-Veränderungen im EKG. Jeder dieser Faktoren gibt jeweils bei Vorliegen einen Punkt. Abhängig von der Summe, ist eine Einschätzung über die Wahrscheinlichkeit weiterer Ereignisse wie Tod oder ischämische Ereignisse möglich [10, 11]. Auch andere Möglichkeiten sind zur Klassifizierung der Risikopatienten evaluiert worden. So soll allein über die Beurteilung der Brustschmerzen oder durch ein mathematisches Model das Risiko für ein kardiales Ereignisse abgeschätzt bzw. berechnet werden [12, 13].

1.2.2 Weiterführende biochemische Diagnostik

Die ausführliche Diagnostik des akuten Koronarsyndroms stützt sich auf biochemische Marker. Hierbei gelten einige aktuell als Goldstandard, andere viel versprechende Marker sind noch in der klinisch-laborchemischen Evaluation.

1.2.2.1 Konventionelle Marker

Unter konventionelle Marker werden im Rahmen dieser Arbeit die myokardiale Kreatinkinase (CK-MB), deren Isoenzyme und Myoglobin verstanden.

Kreatinkinase und Isoenzyme

Die Bestimmung der CK-MB als Masse oder Aktivität wurde bis vor einiger Zeit noch als der Goldstandard der biochemischen Diagnostik des akuten Myokardinfakrtes (AMI) angesehen. Die Bedeutung der CK-MB ist durch Redefinition des AMI im Rahmen der aktuellen Richtlinien der AHA und ACC in den Hintergrund getreten (siehe auch Kapitel 1.2.1). Es besteht aber weitgehend Einigkeit darüber, dass die CK-MB Masse gegenüber der CK-MB

Aktivität zu bevorzugen ist und dass die alleinige Bestimmung der Gesamt-CK zur Infarktdiagnostik obsolet ist. Die Bestimmung weiterer CK-MB-Isoformen scheint zwar vorteilhaft für eine Frühdiagnostik zu sein (<4 Stunden) [2], hat sich aber klinisch bisher nicht durchgesetzt. Die CK-MB Masse ist ein wichtiger prognostischer Marker [14],[15] hat aber das Problem einer langsamen Freisetzungskinetik, so dass eine diagnostische Sicherheit erst nach mehrere Stunden vorliegt.

Myoglobin

Myoglobin kommt als Sauerstoffspeicher in den verschiedenen Muskelzellen von Myokard und Skelettmuskulatur vor. Myoglobin ist als erster Marker schon 2-4 Stunden nach einem Infarkt im Serum nachweisbar. Bereits nach 12-24 Stunden kommt es wieder zu einem Absinken auf den Normalwert. Aufgrund dieser Kinetik ist Myoglobin als eine frühe Markersubstanz zur Diagnostik einsetzbar [16]. Da Myoglobin auch in der Skelettmuskulatur vorkommt, ist es nicht myokardspezifisch, was in diesem Zusammenhang oft problematisch ist. Daher eignet sich Myoglobin in der Frühphase eher in Kombination mit einem Troponin-Test zur Diagnostik und Risikoklassifizierung des akuten Koronarsyndroms [17]. Auch andere Untersuchungen zeigten, dass Myoglobin als zeitlich sehr früher Marker ischämische Veränderungen am Herzmuskelgewebe anzeigen kann, jedoch auch hier aufgrund der geringen Spezifität eine Kombination mit anderen Markern empfohlen wird [16]. Die aktuellen Richtlinien der AHA/ACC empfehlen Myoglobin als Einzelmarker lediglich zum Ausschluss eines akuten ischämischen Ereignisses durch ein negatives Testergebnis. Bei einem positiven Testergebnis wird ein weiterer Test mit erhöhter Spezifität gefordert, um die Diagnose zu bestätigen.

1.2.2.2 Troponin

Zahlreiche Studien belegen die große prognostische Aussagekraft von Troponin I oder Troponin T [18][19][20] Dabei steigt das Sterblichkeitsrisiko mit der Zunahme der Troponin I oder T Konzentration an. Problematisch ist allerdings, wie bei zahlreichen anderen Markern auch, die langsame Freisetzungskinetik der kardialen Troponine und die Zeitspanne vom Schmerzbeginn bis zum

Zeitpunkt einer hohen diagnostischen Sicherheit (>95%), welche bis zu 12 h oder mehr betragen kann [21]. Ein weiteres Problem ist die fehlende Standardisierung der Troponin I Tests. Da von verschiedenen Herstellern Geräte und Methoden zur Bestimmung des TnI Wertes im Serum angeboten werden, kommt es bedingt durch die abweichenden Testverfahren und Antikörper zu unterschiedlichen Messwerten, was die Dringlichkeit für die Einführung eines Standard Verfahrens deutlich macht. Ein erster Schritt ist die Standardisierung der Troponin Cut-offs über die 99%-Percentile und den Variationskoeffizienten mit <10% [22].

In retrospektiven Analysen der CAPTURE Studie (c7E3 Fab Antiplatelet Therapy in Unstable Refractory Angina) profitierten Patienten mit positivem Troponin T Test vom Einsatz eines GPIIb/IIIa-Antagonisten (Abciximab) [23]. Abciximab wurde auch in anderen klinischen Studien eingesetzt (EPIC (Use of a Monoclonal Antibody Directed against the Platelet Glycoprotein IIb/IIIa Receptor in High-Risk Coronary Angioplasty), EPILOG (Evaluation in PTCA to Improve Long-term Outcome with abciximab GP IIb/IIIa blockade), RAPPORT (ReoPro And Primary PTCA Organization and Randomized Trial), EPISTENT;(Evaluation of Platelet IIb/IIIa Inhibitor for Stenting) [24, 25, 26, 27]). Es konnte eine absolute Reduktion für das Erreichen der primären Endpunkte nach 30 Tagen (Tod, Reinfarkt, erneute PTCA, Bypass-OP) bewiesen werden. Einschränkend ist hier das Kollektiv der Patienten, da in alle Studien nur Patienten nach oder vor PTCA eingeschlossen wurden.

Der klinische Einsatz von Eptifibatide wurde in den IMPACT-II (Integrilin to Minimise Platelet Aggregation and Coronary Thrombosis-II) [28] und PURSUIT Studien untersucht (Platelet Glycoprotein IIb/IIIa in Unstable Angina: Receptor Suppression Using Integrilin Therapy) [29]. Hierbei kam es in der IMPACT-II Studie nur unter Low-Dosis-Therapie zu einer signifikanten Reduktion der primären Endpunkte. Das Ergebnis der PURSUIT Studie [29] war eine signifikante Reduktion der primären Endpunkte nach 30 Tagen unter Eptifibatide Therapie. Hier wurden Patienten mit akutem Koronarsyndrom ohne weitere Intervention eingeschlossen, wogegen bei IMPACT-II [28] zusätzlich eine PTCA oder ACVB Operation durchgeführt wurde. In den Studien PRISM (Platelet Receptor Inhibition in Ischemic Syndrome Management) [30], PRISM-

PLUS (Platelet Receptor Inhibition in Ischemic Syndrome Management in Patients limited by Unstable Signs and Symptoms) [31] und RESTORE (Randomized Efficacy Study of Tirofiban for Outcomes and REstenosis) [32] wurde der Einsatz von Tirofiban evaluiert. Subanalysen der PRISM Studie zeigten, dass Troponin T und I positive Patienten von der Therapie mit Tirofiban profitieren [33]. Eine signifikante Reduktion der primären Endpunkte (Tod, Herzinfarkt, Bypass-Intervention) innerhalb der ersten 30 Tage, konnte in der RESTORE Studie für den Einsatz von Tirofiban bewiesen werden [34]. In der PRISM-PLUS Studie konnte eine Reduktion der Ereignisrate (Tod, Herzinfarkt, refraktäre Ischämie) durch die Kombination von Tirofiban mit Aspirin und Heparin erreicht werden [31].

In der GUSTO IV--ACS Studie (Global Use of Strategies To Open Occluded Coronary Arteries IV--Acute Coronary Syndrome) wurde der Einsatz von Abciximab ohne zusätzliche interventionelle Therapie geprüft. Die Therapie führte im Gegensatz zu den anderen Studien bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom zu keiner signifikanten Reduktion der primären Endpunkte [35, 36]. In der TACTICS-TIMI-18 Studie (Treat Angina with Aggrastat and determine Cost of Therapy with an Invasive or Conservative Strategy. Thrombolysis In Myocardial Infarction) erhielten alle Patienten mit akutem Koronarsyndrom ASS, Heparin und Tirofiban und zusätzlich nach Randomisierung eine invasive Therapie mittels PTCA [37]. Es wurde eine signifikante Reduktion für das Erreichen der primären Endpunkte in der früh-invasiven Gruppe festgestellt, wobei besonders Patienten mit erhöhten Troponin Werten profitierten.

1.2.2.3 C-reaktives Protein und B-Typ natriuretisches Peptid

Das C-reaktive Protein (CRP) ist als akute Phase Protein ein wichtiger Mediator in der humoralen Entzündungsreaktion. Es konnte gezeigt werden, das die CRP Bestimmung eine prognostische Einschätzung bei kardiovaskulären Hochrisiko-Patienten erlaubt [38, 39, 40]. Eine CRP Erhöhung bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom ist unabhängig von einem Anstieg der Troponine, weshalb dem CRP besonders in der Frühphase des akuten Koronarsyndroms eine Bedeutung zukommen könnte. Im Gegensatz zu den Troponinen wird deshalb

eine frühe CRP Bestimmung nach Symptombeginn sowie eine engmaschige Verlaufskontrolle vorgeschlagen [40].

Zur prognostischen Beurteilung für kardiale Ereignisse innerhalb von sechs Monaten nach Infarkt zeigte sich die CRP Bestimmung dem Troponin T signifikant überlegen. Dies gilt insbesondere für Patienten nach erfolgter Revaskularisation [41]. Neue Untersuchungen zeigten hier, das CRP positive Patienten mit akutem Koronarsyndrom vom Einsatz eines Medikaments aus der Gruppe der Statine profitierten können. Ob dies eine weitere Therapie-Option ist, muss noch geklärt werden [42, 43]. Generell profitierten Patienten mit akutem Koronarsyndrom von einem frühen Einsatz eines Statins in der MIRACL Studie (Effects of Atorvastatin on Early Recurrent Ischemic Events in Acute Coronary Syndromes) [44]. Aufgrund fehlender kardialer Spezifität des CRP, müssen zahlreiche andere Ursachen mit entzündlicher Genese für eine CRP Erhöhung berücksichtigt werden.

Im Hinblick auf die Therapie mit GPIIb/IIIa-Antagonisten hatten durchgeführte Studien zum Teil ein gegensätzliches Ergebnis. In der GUSTO-IV-ACS Studie war die Therapie mit Abciximab bei erhöhtem CRP mit einem Anstieg der Letalität verbunden [35]. Im Gegensatz dazu wurde im Rahmen des vier Jahres Follow-up der CAPTURE Studie kein Zusammenhang zwischen der CRP-Konzentration und dem Einsatz eines GPIIb/IIIa-Antagonisten gefunden [45]. Inwieweit CRP-positive Patienten von einer Therapie mit GPIIb/IIIa-Antagonisten tatsächlich profitieren, müssen in diesem Fall weitere Studien zeigen.

„B-type natriuretic peptide“ (BNP) wird von Herzmuskelzellen synthetisiert und in Abhängigkeit von der ventrikulären Dilatation freigesetzt. BNP ist ein Neurohormon und greift regulativ in die Einstellung des Blutdrucks über Vasodilatation ein [46].

Für Myokardinfarkt Patienten konnte eine Erhöhung der Plasma BNP-Konzentration nachgewiesen werden [47]. Es wird ein direkter Zusammenhang zwischen einer BNP Erhöhung und dem Schädigungsgrad des Herzmuskels, auch ohne Ausbildung einer Nekrose, vermutet [46]. Andere Studien belegen einen Nutzen der BNP Bestimmung eher für die Langzeitprognose [48]. Obwohl diese Ergebnisse Anlass zu weiteren Studien mit BNP als Risikomarker geben,

ist der BNP Anstieg in erster Linie als Reaktion auf eine Pump-Dysfunktion des Ventrikels zu interpretieren [46] und kann nicht die entzündliche, dynamische Komponente in der Entstehung des akuten Koronarsyndroms anzeigen. Diese fehlende Spezifität für das akute Koronarsyndrom schränkt daher den Einsatz von BNP als Frühmarker deutlich ein. In wieweit der Einsatz von BNP in Kombination mit anderen Markern zur Diagnostik und Risikoklassifizierung des akuten Koronarsyndroms genutzt werden kann, müssen weitere Studien zeigen.

In einer aktuellen Studie aus dem Jahr 2003 wurde das „N-terminal pro-brain natriuretic peptide“ (NT-proBNP) untersucht [49]. BNP entsteht durch enzymatische Spaltung des Prohormons pro-BNP. Hierbei wird das N-terminale Ende des Moleküls abgespalten (NT-proBNP). Anhand des Studienkollektivs aus der GUSTO-IV-ACS Studie konnte gezeigt werden, dass eine Erhöhung von NT-proBNP im Serum mit einem Anstieg der 1-Jahres Mortalität korreliert. Im Vergleich mit Troponin und CRP war das NT-proBNP der stärkere Prädiktor [49].

1.2.2.4 Andere biochemische Marker

Interleukine

Interleukine haben als Zytokine der Immunregulation unter anderem eine wichtige Funktion bei der zellulären Regulation der entzündlich-endothelialen Dysfunktion. Zusätzlich vermitteln Interleukine (IL) zelluläre Adhäsion, womit die Bedeutung auch für das akute Koronarsyndrom deutlich wird. Es wurden verschiedene Studien zu den einzelnen Interleukinen (IL-2, IL-6, IL-8) durchgeführt. Hierbei zeigten sich in Abhängigkeit des jeweiligen Interleukins zum Teil gegensätzliche Ergebnisse. Im akuten Myokardinfarkt kommt es zum Anstieg von IL-6 [50], wogegen die Konzentration von IL-2 und IL-8 abnahm [51]. Alle Studien zu Interleukinen zeigen die enge Verknüpfung der zellulären Mediatoren mit den endothelialen Veränderungen. Interleukine sind nicht herzspezifisch und können somit nur unterstützende Informationen liefern.

Ischämisch verändertes Albumin

Albumin ist ein in der Leber synthetisiertes Protein, welches cirka 60% des

Gesamteiweißes im Blutplasma ausmacht. Unter Sauerstoffmangel entstehen unter anderem freie Radikale, die über eine Enzyminduktion am Albuminmolekül eine N-terminale Sequenzänderung hervorrufen. In ersten Untersuchungen konnte ein Anstieg des ischämisch veränderten Albumins (ischaemia modified Albumin, IMA) bei hypoxisch bedingten kardiovaskulären Veränderungen bewiesen werden [52]. Im Hinblick auf die Frühdiagnostik des akuten Koronarsyndroms könnte hierbei der sehr frühe Anstieg des IMA im Plasma als Reaktion auf eine Hypoxie interessant sein. Folgestudien konnten einen Anstieg der Sensitivität in Kombination mit einem Troponin-I Test belegen. Die Autoren folgern hieraus einen möglichen Gewinn in der Triage des akuten Koronarsyndroms [53].

Annexin V

Annexin V ist ein Calcium bindendes Protein, welches in vielen Geweben des Körpers vorkommt. Es konnte gezeigt werden, dass es nach einem Myokardinfarkt zu einer Konzentrationserhöhung kommt, welche als Reaktion auf die einsetzende Apoptose zu interpretieren ist [54, 55, 56]. Als Marker in der ischämischen Frühphase scheint Annexin V aufgrund der geringen Spezifität jedoch nur eingeschränkt geeignet zu sein [57].

Phospholipase A2

Das Enzym Phospholipase A2 (PLA2) katalysiert die Calciumabhängige Freisetzung von Arachidonsäure (AA) aus der Phospholipidmembran der Zelle. Die Arachidonsäure ist unter anderem an der Bildung des Eicosanoids Thromboxan A2, einem Aktivator der Thrombozytenaggregation, beteiligt. Es konnte gezeigt werden, dass es im Rahmen des akuten Koronarsyndroms zu einer erhöhten Konzentration von PLA2 im Plasma kommt [58]. Aufgrund des ubiquitären Vorkommens des Enzyms im Körper erscheint die Spezifität für das akute Koronarsyndrom eher niedrig [59].

CD40 Ligand

Das transmembrane CD40 Protein wird von verschiedenen Zellen auf der Oberfläche prozessiert. Im Zusammenhang mit der Expression auf Thrombozyten konnte die Funktion des natürlichen Bindungspartners CD40

Ligand (CD40L) bei der Formation von Thromben und der gleichzeitigen Vermittlung der Freisetzung von Chemokinen sowie die erhöhte Expression von Adhäsions-Molekülen nachgewiesen werden [60]. Die durch die Chemokin-Freisetzung vermittelte Rekrutierung von Leukozyten verdeutlicht die Rolle der Thrombozyten im Rahmen einer inflammatorischen Reaktion an der betroffenen Zellwandstruktur. Aktuell wurde im April 2003 eine erneute Auswertung des Patienten Kollektivs der CAPTURE Studie im Hinblick auf ein mögliches erhöhtes Risiko für kardiale Ereignisse durch die verstärkte Expression von CD40 auf den Thrombozyten durchgeführt. Hier zeigte sich bei ACS Patienten mit erhöhter CD40L Konzentration eine signifikant erhöhte Ereignisrate innerhalb von sechs Monaten [61]. Eine hierauf durchgeführte Therapie mit dem GPIIb/IIIa-Antagonisten Abciximab führte zu einer signifikanten Reduktion von kardialen Ereignissen. Im Hinblick auf die Spezifität für myokardiale Prozesse stellt die erhöhte CD40 Expression im Rahmen von Tumorerkrankungen und leukämischen Erkrankungen jedoch eine Einschränkung bei der Diagnostik des akuten Koronarsyndroms dar [62].

Weitere Marker des akuten Koronarsyndroms

Die in Tabelle 1 dargestellten Substanzen sind Marker, die in der Standarddiagnostik des akuten Koronarsyndroms nicht eingesetzt werden, aber in verschiedenen Studien auf ihre mögliche Aussagekraft und Verwendung zur Diagnostik untersucht wurden. In der Tabelle werden zur jeweiligen Substanz deren Eigenschaften in Verbindung mit der Diagnostik genannt und den zugehörigen Literaturstellen gegenübergestellt.

Tabelle 1: Darstellung weitere Marker-Substanzen, welche im Rahmen der Diagnostik des akuten Koronarsyndroms in verschiedenen Untersuchungen evaluiert wurden.

Markersubstanz		**Eigenschaften**	**Literatur**
GPBB	Glykogen Phosphorylase BB	Glykogenolyse Schlüsselenzym, Isoenzym BB liegt im Gehirn und Herz vor, Anstieg bei Hypoxie	[63, 64, 65]
MMP	Matrix-Metalloproteinasen	Enzyme sind bei entzündlichem Gewebeabbau aktiv, d.h. auch nachweisbar bei atheromatösen Plaque-Veränderungen	[66]
TAT	Thrombin-antithrombin-III-Komplex	Konzentration erhöht bei aktivierter plasmatischer Gerinnung, d.h. hyperkoagulatorisches System mit Prognoseverschlechterung bei ACS	[67, 68, 69]
F1.2	Thrombinfragment F1.2	Spaltprodukt der Thrombingenese Anstieg zeigt das thrombembolische Risiko	[70, 71, 72]
ATP	Adenosin-Tri-Phosphat	Konzentrationserhöhung bei Aktivierung der Thrombozyten	[73, 74]
TxA2/ TxB2	Thromboxan A2/ B2	Nachweis des Metaboliten TxA2 über Spaltprodukt TxB2 zur Beurteilung der Zyklooxygenase abhängigen Thrombozyten-Aktivierung	[75, 76, 77]

1.2.2.5 Kombination von Marker-Substanzen

Troponine werden heute wegen ihrer überlegenen Eignung bevorzugt als Marker in der Diagnostik des akuten Koronarsyndroms eingesetzt. Es muss jedoch berücksichtigt werden, dass auch die Troponine als Einzelmarker nur eine eingeschränkte Aussagekraft in der Diagnostik haben, da auch Troponin negative Patienten ein hohes Risiko zur Entwicklung eines akuten Koronarsyndroms haben können [78]. Bei der Kombination von Troponin mit anderen kardialen Markern wie Myoglobin und CK-MB Masse steigt die diagnostische Sicherheit an [16, 17, 79]. Auch die Risikostratifizierung kann durch die Bestimmung von Troponinen in Kombination mit CRP und BNP verbessert werden [38]. Durch die Verwendung von zwei oder mehreren Markern (Multimarker Analyse) kann in der Regel eine größere Anzahl an

Risiko-Patienten erkannt werden [79]. Multimarker Analysen zeigen eine erhöhte Sensitivität bezüglich der Kombination der Marker, auch wenn diese für sich genommen nicht herzspezifisch sind. In einer aktuellen Analyse der Multimarker Strategie bei der Diagnostik des akuten Koronarsyndroms kommen Morrow et al. zu der Schlussfolgerung, dass die Kombination verschiedener Substanzen zur Risikostratifizierung die sicherste Einschätzung des Risikos liefert [3]. Hierbei wird die Kombination von Troponin als herzspezifischer Marker mit Substanzen wie BNP und NT-pro BNP als Marker der hämodynamischen Stressreaktion und CRP als Marker einer inflammatorischen Komponente des akuten Koronarsyndroms empfohlen. Zusätzliche Informationen könnten durch weitere Addition verschiedener Substanzen wie CD40, Matrix-Metalloproteinasen (MMP) und modifiziertes Albumin gewonnen werden [3].

1.3 Medikamentöse Therapie des akuten Koronarsyndroms mit GPIIb/IIIa-Antagonisten

In die Gruppe der GPIIb/IIIa-Antagonisten gehören die Substanzen Eptifibatide, Abciximab und Tirofiban. Diese binden über unterschiedliche Mechanismen an den GPIIb/IIIa-Rezeptor auf der Thrombozyten Oberfläche und hemmen so selektiv die Thrombozyten Aggregation. Hierbei ist die Fibrinogenbindung an den Rezeptor blockiert und dadurch die Vernetzung der Thrombozyten untereinander aufgehoben. Die Bildung komplexer Thromben, insbesondere nach der Plaque Ruptur, wird so verhindert.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde speziell die Wirkung des GPIIb/IIIa-Antagonisten Tirofiban (siehe Abbildung 2) untersucht. Hierbei handelt es sich um ein nicht-peptidisches Tyrosinderivat mit einem Molekulargewicht von 495 kD, welches spezifisch und kompetitiv eine definierte Aminosäuresequenz des Rezeptors imitiert und die Fibrinogenbindung verhindert [80]. In Abbildung 2 ist die Strukturformel von Tirofiban (Aggrastat®, MSD) dargestellt. Die Ergebnisse aktueller Studien zur Tirofibanmedikation werden im Folgenden kurz zusammengefasst.

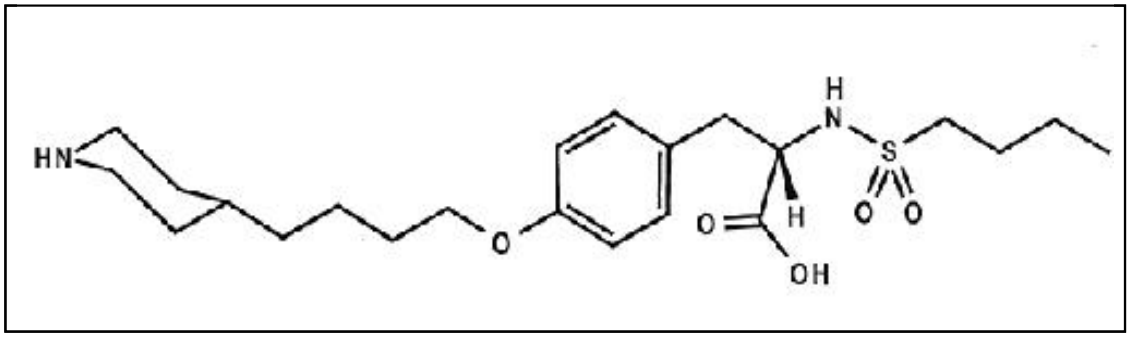


Abbildung 2: Darstellung der Strukturformel von Tirofiban

Seine Wirksamkeit als Thrombozyten Aggregationshemmer konnte in den PRISM, PRISM-PLUS und RESTORE (siehe auch Kapitel 1.2.2.2) Studien nachgewiesen werden. Hierbei ergab sich insgesamt, dass durch zusätzliche Gabe von Tirofiban zur Standardtherapie (Medikation von ASS und Heparin), die Letalität und Morbidität bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom, unabhängig von der weiteren Therapie, günstig beeinflusst werden kann [30, 31, 31, 31].

In die PRISM und PRISM-PLUS Studie wurden ACS Patienten, mit instabiler Angina Pectoris oder akutem Myokardinfarkt ohne Q-Zacken Veränderung, eingeschlossen und zusätzlich zur Standardtherapie mit Heparin oder Tirofiban (PRISM) und Kombination von Heparin und Tirofiban oder nur Heparin (PRISM-PLUS) untersucht. Hierbei gab es zum Teil widersprüchliche Ergebnisse für den Einsatz von Tirofiban. In der PRISM-PLUS Studie hatten besonders Patienten ohne ST-Hebung und mit erhöhtem Troponin I oder T den größten Therapiegewinn durch den Einsatz von Tirofiban. Der Studienarm mit alleiniger Tirofiban Medikation wurde aufgrund erhöhter Letalität abgebrochen. In der PRISM Studie konnte der größte Erfolg mit der Kombination von Tirofiban und Heparin erzielt werden. Die alleinige Therapie mit Tirofiban ergab hier keine erhöhte Letalität. Eine Erklärung hierfür könnte die unterschiedlich lange Einschlussphase sein (PRISM-PLUS innerhalb 12 Stunden, PRISM innerhalb 24 Stunden) und ein unterschiedliches Therapie-Management bezüglich der Dauer der Tirofiban-Infusion (PRISM-PLUS 71,3±20 Stunden, PRISM 48 Stunden). In der PRISM-Plus Studie wurden viele Patienten mit bestehender Heparintherapie eingeschlossen, welche dann bei Randomisierung in die Tirofiban Monotherapiegruppe abgebrochen wurde. Eine Beeinflussung im

Sinne eines Heparin Rebound Phänomens und damit verbundene Erhöhung der ischämischen Ereignisse, ist deshalb ebenfalls nicht auszuschließen. Die Autoren selbst führen auch Zufall als weitere Interpretation dieser Unterschiede an, da die Ereignisrate innerhalb des abgebrochenen Studienteils insgesamt gering war.

In der TACTICS-TIMI-18 Studie erhielten alle Patienten mit akutem Koronarsyndrom ASS, Heparin und Tirofiban, und zusätzlich nach Randomisierung erhielt ein Teil eine invasive Therapie mittels PTCA. Es wurde eine signifikante Reduktion für das Erreichen der primären Endpunkte („Major Cardiac Events"; MACE: plötzlicher Herztod, Myokardinfarkt bzw. Reinfarkt und erneuter instabile Angina Pectoris) in der invasiven Gruppe festgestellt, wobei besonders Patienten mit erhöhten Troponin Werten profitierten [37, 81]. Verschiedene GPIIb/IIIa-Antagonisten wurden in der TARGET Studie (Impact of Clinical Syndrome Acuity on the Differential Response to 2 Glycoprotein IIb/IIIa Inhibitors in Patients Undergoing Coronary Stenting) miteinander verglichen [82]. Hier hatte die Gruppe unter Therapie mit dem chimeren monoklonalen Antikörper Abciximab (c7E3Fab) zunächst eine insgesamt niedrigere Ereignisrate, als die Vergleichsgruppe unter Tirofibantherapie. Dieses Ergebnis konnte im 6-Monate Follow-up statistisch nicht mehr belegt werden [82]. Einschränkend ist hier weiterhin anzumerken, dass lediglich Patienten zur Stent-Implantation eingeschlossen wurden.

In der RESTORE Studie wurden ACS Patienten mit instabiler Angina Pectoris nach PTCA eingeschlossen und mit Tirofiban oder Placebo zusätzlich zur bestehenden Heparin Therapie behandelt [32]. Durch die Tirofiban Therapie konnte hier eine deutliche Reduktion weiterer ischämischer Ereignisse nach PTCA erreicht werden.

Im Vergleich zu den meisten Untersuchungen unter einer Tirofiban Medikation, kommt die GUSTO-IV-ACS Studie, bei der der GPIIb/IIIa-Antagonist Abciximab untersucht wurde, zu einem anderen Ergebnis [35]. Es wurden Patienten mit ACS ohne ST-Hebung und ohne weitere geplante PTCA randomisiert. Die Multicenterstudie mit insgesamt 7800 Patienten konnte keine Reduktion der primären Endpunkte (Tod oder Myokardinfarkt) für die Abciximab Therapie zeigen. Der Vorteil für die GPIIb/IIIa-Therapie war in Subgruppenanalysen der

Tirofiban Studien teilweise auch nur gering in den Gruppen ohne perkutane Intervention, aber statistisch belegbar. Möglicherweise spielt hier auch die längere Thrombozyteninhibierung durch Abciximab im Vergleich zum kleinmolekularen Tirofiban eine Rolle.

Der therapeutische Nutzen für den Patienten mit akutem Koronarsyndrom ist gerade mit den GPIIb/IIIa-Antagonisten besonders in der Frühphase der Erkrankung hoch. Die Identifizierung dieser Risikopatienten gerade in einem frühen Stadium ist häufig schwierig, da hier oft EKG-Veränderungen transient sein können, und kein Anstieg kardialer Marker messbar ist. An dieser Stelle wird der potentielle Vorteil eines Markers deutlich, welcher schon früh ein mögliches Risiko zur Entwicklung von weiteren ischämischen Komplikationen aufzeigen kann. Die Konsequenz, vorausgesetzt das Risiko einer progredienten Verschlechterung der Versorgung des Herzmuskelgewebes wird noch in der Entstehung entdeckt, könnte eine noch schnellere Applikation von GPIIb/IIIa-Antagonisten zur Unterbrechung der dynamischen, thrombozytären Kaskade sein.

Verschiedene Studien zeigen, dass bestimmte Patientengruppen von der Therapie mit einem GPIIb/IIIa-Antagonisten profitieren. In der bereits dargestellten CAPTURE Studie [23] profitierten besonders Troponin positive Patienten vom Einsatz eines GPIIb/IIIa-Antagonisten. In Subanalysen der PRISM-PLUS Studie [83] profitierten ebenfalls Troponin positive Patienten von der Therapie mit Tirofiban durch eine signifikante Senkung von Tod und Myokardinfarkt innerhalb des 30 Tage Follow-up. Es wird zurzeit diskutiert, ob auch Patienten mit ST-Hebungen im EKG vom Einsatz eines GPIIb/IIIa-Antagonisten profitieren könnten. In der INTEGRITI Studie (Integrilin and tenecteplase in acute myocardial infarction) [84] wurde bei Patienten mit ST-Hebungs-Infarkt eine Kombination einer reduzierten Dosis Tenecteplase und Eptifibatide mit der Tenecteplase Monotherapie verglichen. In der angiographischen Kontrolle zeigte sich in der Gruppe unter Kombinationstherapie ein besseres Ergebnis des TIMI Grad 3 Flusses und eine Rückbildung der EKG Veränderungen. Diese Kombination mit einem GPIIb/IIIa-Antagonisten bei ST-Hebungen wird hier aber aufgrund erhöhter Blutungskomplikationen nicht allgemein empfohlen.

Die Guidelines der ESC 2003 zum Management des ST-Hebungs-Infarktes [85] empfehlen den Einsatz der GPIIb/IIIa-Antagonisten ebenfalls nicht generell, da es auch hier insgesamt zu erhöhten Blutungskomplikationen durch den zusätzlichen Einsatz gekommen ist. Da es aber zur Senkung der Reinfarkt-Rate im Rahmen einer percutanen Intervention durch diese medikamentöse Zusatztherapie kommt, könnten GPIIb/IIIa-Antagonisten für Hochrisiko Patienten eingesetzt werden. Diese medikamentöse Therapie von ST-Hebungs-Infarkten und das Risiko von Komplikationen soll laut ESC in weiteren Studien untersucht werden. In der TIGER-PA Studie (Results of the Tirofiban Given in the Emergency Room before Primary Angioplasty Pilot Trial) [86] wurde bei Patienten mit ST-Hebungs-Infarkt in einer Gruppe Tirofiban sofort bei Aufnahme gegeben, und in der Vergleichsgruppe erst während der perkutanen Katheter Intervention. Im 30 Tage Follow-up gab es weniger Ereignisse (Tod, Reinfarkt) in der Gruppe unter Tirofiban Früh-Therapie, jedoch ohne statistische Signifikanz. Ebenfalls nicht signifikant war der Vergleich von Komplikationen durch Blutungen zwischen den Gruppen. Insgesamt wurde eine geringe Blutungs-Rate gefunden. Die frühe Applikation des GPIIb/IIIa-Antagonisten zeigte aber eine signifikant überlegene Wiederherstellung des TIMI Grade 3 Flusses gegenüber der späteren Applikation direkt zum Zeitpunkt der Katheter-Intervention.

Diese Ergebnisse verdeutlichen den weiteren Studienbedarf für den Einsatz von GPIIb/IIIa-Antagonisten, insbesondere im Hinblick auf Komplikationen durch Blutungen, zeigen aber auch ein besseres Ergebnis der Reperfusion durch eine frühe Applikation.

1.4 Pathophysiologie der atherosklerotischen Plaques

Es gibt verschiedene Hypothesen zur Entstehung von Plaques im Rahmen einer Koronarsklerose. Als allgemein anerkannt gilt heute, dass es sich bei der Koronarsklerose nicht primär um eine degenerative Erkrankung handelt. Die Koronarsklerose ist eine entzündlich-fibroproliferative Gefäßwand-Veränderung. Zur Einteilung der verschiedenen Stadien der Plaque-Struktur wird hier die Einteilung nach Stary verwendet.

1.4.1 Stabile Plaque

Die stabile atherosklerotische Plaque ist das Resultat einer chronischen Entzündungsreaktion, an der Endothel, Monozyten, Makrophagen und glatte Muskelzellen beteiligt sind. Auslöser für das stufenweise Entstehen der Plaque ist die endotheliale Dysfunktion, unter der man den Verlust der endothelialen Barrierefunktion und den Verlust zur Fähigkeit der metabolischen Regulation versteht. Die Abnahme der physiologischen Endothelfunktion wird durch die bekannten Risikofaktoren wie Hypercholesterinämie und andere Fettstoffwechselstörungen, arteriellen Bluthochdruck, Rauchen und Diabetes mellitus gefördert, welche in der Framingham Studie erstmalig evaluiert wurden [87].

Die Entstehung der Plaque beginnt mit der aktiven Aufnahme und Einlagerung von „Low density Lipoprotein“ (LDL) in die Intima (Typ I Läsion nach Stary/ AHA). Die anschließende Expression von Adhäsionsmolekülen und Exozytose chemotaktischer Substanzen durch die Endothelzellen führt zur Adhäsion und Migration von Blutmonozyten in die Intima. Das eingedrungene LDL wird durch verschiedene Enzyme und freie Sauerstoffradikale modifiziert, so dass es zur unkontrollierten Aufnahme von oxidiertem LDL in die Makrophagen kommt (Fatty streaks) [88]. Durch Zusammenwirken von Zytokinen und Wachstumsfaktoren aus stimulierten Monozyten, Lymphozyten und Makrophagen werden glatte Muskelzellen aktiviert (Typ II Läsion). Diese produzieren nach Einwanderung in die Intima vor allem Proteine der bindegewebigen Matrix, in denen sich die extrazellulären Lipide aus den zugrunde gegangenen Makrophagen einlagern (Typ III Läsion). Läsionen des Typs I – III führen zu keiner Stenosierung des Gefäßes und finden sich meist auch schon bei Patienten jüngeren Alters. Das extrazelluläre Lipid konfluiert (Typ IV Läsion) und wird durch eine Kappe aus Bindegewebe luminal abgedeckt. Die Plaque ist stabil, wenn diese Kappe eine hohe Zahl an Muskelzellen und nur wenige Entzündungszellen enthält [89]. Hierbei handelt es sich, weitgehend unabhängig vom Stenosegrad des Gefäßes, um das pathomorphologische Korrelat der stabilen Angina Pectoris.

1.4.2 Instabile Plaque

Die instabile Plaque ist durch eine hohe entzündliche Aktivität und einen erhöhten Lipidgehalt gekennzeichnet [88]. Durch Scherkräfte und Ermüdung oder durch eine entzündlich bedingte Erosion kommt es zur Fissur oder Ruptur der Plaquekappe [90]. Plaquefragmente oder eine mögliche Einblutung in die Plaque stellen einen Reiz für das Gerinnungssystem dar. Die zelluläre Komponente des Gerinnungssystems bilden die Thrombozyten. Diese lagern sich an die Plaqueoberfläche an (Adhäsion), so dass es im Verlauf zur Zusammenlagerung von Thrombozyten kommt (Aggregation). Unter Mitwirkung verschiedener Inhaltsstoffe der Thrombozyten (besonders α-Granula) und Faktoren des Gerinnungssystems (v.Willebrand Faktor) kommt es zur Adhäsion der Zellen an das Endothel [91]. Weiterhin führt durch die verletzten Zellen freigesetztes Adenosindiphosphat (ADP) und Adrenalin zur Aggregation, die zunächst reversibel ist. Die irreversible Aggregation wird dann verzögert unter Mitwirkung von Thrombin eingeleitet. Hierbei kommt es zu einer intrazellulären Signaltransduktion, an deren Ende Endoperoxide und Thromboxan A 2 freigesetzt werden [92]. Nach Strukturauflösung und verstärkter Aggregation der Thrombozyten kann es zum partiellen oder kompletten Gefäßverschluss kommen. Die Thrombozytenaggragation wird durch den Glykoprotein-IIbIIIa-(GPIIb/IIIa) Rezeptor unterstützt und verstärkt [80]. Die Thrombozyten exprimieren den Rezeptor auf der Oberfläche, welcher durch die Bindung von Fibrinogen zur Aggregation der Zellen führt. Bei diesem rasch progredienten Verlauf liegt häufig das klinische Bild einer instabilen Angina Pectoris oder eines Myokardinfarktes ohne vorher bekannte Koronarveränderungen und entsprechende Beschwerden vor.

1.5 Der GPIIb/IIIa-Rezeptor

Bei der in Abschnitt 1.4.2 beschriebenen Thrombusbildung nimmt der GPIIb/IIIa-Rezeptor eine Schlüsselposition ein. Bei der Struktur des Rezeptors handelt es sich um ein Membranglykoprotein auf der Thrombozytenoberfläche. Auf einer Zelle können zwischen 60.000 und 100.000 dieser Rezeptoren vorliegen. Der Rezeptor ist ein Heterodimer und besteht aus einer α-

Untereinheit (GPIIb) und einer β-Untereinheit (GPIIIa) [80]. Der Rezeptor bindet Fibrinogen oder andere Glykoproteine nur im aktivierten Zustand. Durch Stimulierung der Thrombozyten ändert sich die Konformation und damit auch die Bindungsfähigkeit des Rezeptors. Zusätzlich kommt es zu einer erhöhten Expression des Rezeptors nach Stimulation. Die Thrombozyten werden durch eine unregelmäßige Gefäßoberfläche oder Defekte im Endothelverband ausreichend stimuliert. Nach Adhäsion der Zellen kommt es zur Aktivierung der Thrombozyten (siehe Kapitel 1.4.2) und zur Zunahme der Affinität des interzellulären Rezeptors für Fibrinogen. Die Bindung von Fibrinogen durch den Rezeptor führt zur Ausbildung von Plättchenaggregaten. Die Überführung von Fibrinogen zu Fibrin durch Thrombin führt dann im Verlauf zur Ausbildung eines Thrombus. Dieser Vorgang lässt sich durch Calcium stimulieren [93].

1.6 Phospholipase D

Bei der Plaque Destabilisierung nimmt die Phospholipase D (PLD) Aktivierung in den beteiligten Zellen (Thrombozyten, Makrophagen und Endothelzellen) eine wichtige Rolle ein. Die PLD hat einige Besonderheiten in der biochemischen Struktur, und ihr kommt eine besondere Schlüsselfunktion in den beteiligten Zellen zu.

1.6.1 Phospholipase D Isoformen

Die Phospholipase D ist Teil eines wichtigen intrazellulären „second Messenger“ Systems. Bei Säugetieren sind zwei Isoformen der PLD bekannt [94]. Funktionell unterscheiden sich die PLD1 und PLD2 dadurch, dass nur die PLD1 durch GTPasen (Guanosintriphosphatasen), RhoA (Ras-homology-protein), ARF (ADP-ribosylation factor) und Protein Kinase C (PKC) stimuliert wird und spezifisch für Phosphatidylcholin (PC) ist [95, 96, 97]. Alle PLD Isoformen hydrolysieren Phosphatidylcholin und generieren Phosphatidat und Cholin [98, 99]. Phosphatidat ist im weiteren Verlauf ein wichtiger Vorläufer verschiedener „second Messenger“ wie beispielsweise Diacylglycerol, das wiederum eine Rolle bei Entzündungsreaktionen und Atherogenese spielt [100]. In Abbildung 3 ist die intrazelluläre Signalübertragung zwischen Plättchen und den bisher bekannten Substanzen graphisch dargestellt. Durch verschiedene

Faktoren kommt es zur Aktivierung der Signalkaskade an der Membran der Thrombozyten. Bei der Aktivierung der Phospholipase D Reaktion wird Cholin freigesetzt. Das Wissen um die Mechanismen der Aktivierung und Signalübertragung der Thrombozyten ist ständigen Änderungen unterworfen, da diese Kaskade noch nicht vollständig aufgeklärt ist.

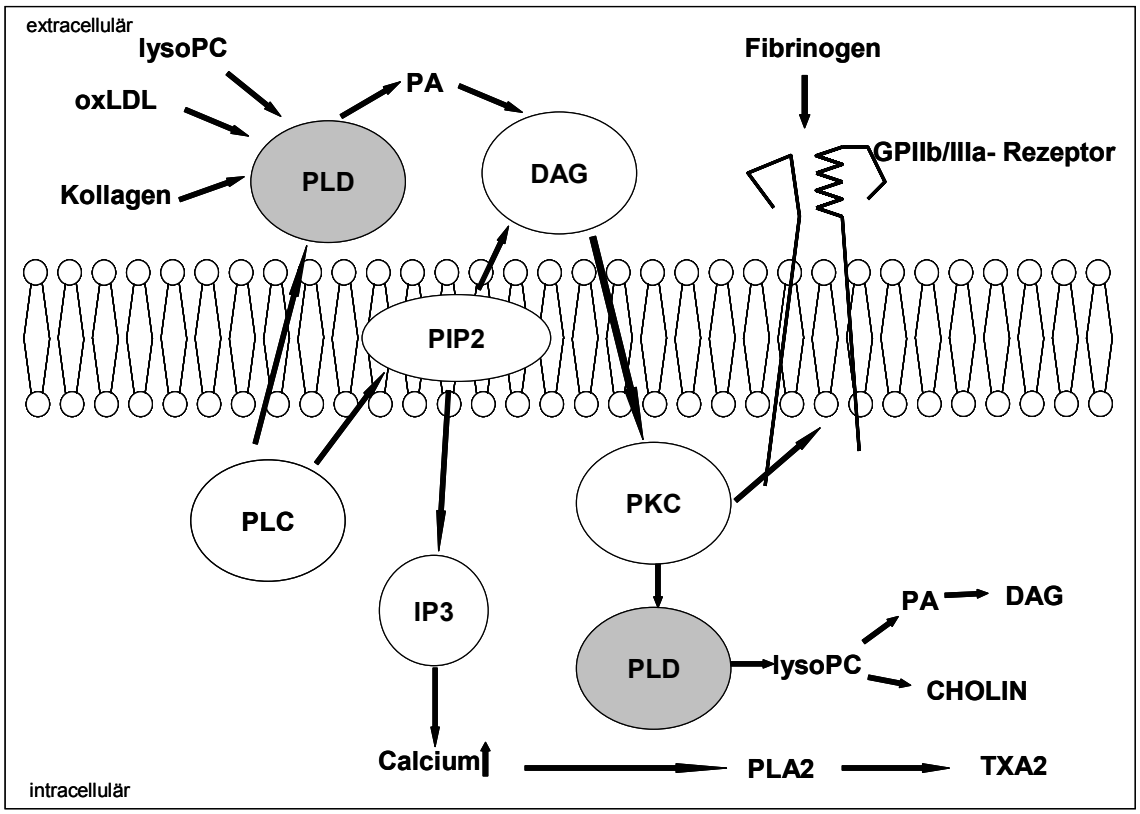


Abbildung 3: Mechanismen der Signalübertragung bei der Thrombozythenaktivierung. PLD: Phospholipase D, PLC: Phospholipase C, PIP2: Phosphoinositol-4,5-biphosphonat, IP3: Inositol-1,4,5-triphosphonat, PKC: Proteinkinase C, DAG: Diacylglycerol, PLA2: Phospholipase A2, TXA2: Thromboxan A2, oxLDL: oxidiertes „low densitiy“ Lipoprotein, PA: Phosphatidat, lyso PC: Lysophosphatidylcholin.

1.6.2 Phospholipase D in Makrophagen und Plättchen

Im Zusammenhang mit der Bildung und Destabilisierung von Plaques kommt der Phospholipase D in Makrophagen und Plättchen eine besondere Bedeutung zu. Experimentell konnte gezeigt werden, dass Plättchen durch Kollagen, Calcium und Thrombin stimuliert werden können. Weiterhin konnte festgestellt werden, dass Makrophagen bei der Sekretion von Matrixmetalloproteinasen eingebunden sind, und die Stimulation durch oxLDL zu einer Aktivierung der

PLD durch Lysophosphatidylcholin (lysoPC) führt [100, 101, 102, 103, 104]. Daher muss angenommen werden, dass die PLD-Aktivierung eine zentrale Bedeutung für verschiedene Signal-Transduktionswege hat, die gemeinsam die Bildung einer instabilen Plaque hervorrufen, bzw. zur erhöhten Aggregation der Thrombozyten führen können [95, 96].

Cholin als komplementäres Spaltprodukt der PLD-Reaktion stellt einen natürlichen Aktivitätsmarker für die PLD dar. Daher wird vermutet, dass Cholin eine prognostische und diagnostische Bedeutung bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom haben könnte, besonders im Hinblick auf die am Ende der Kaskade stehende Aggregation und Entzündungsreaktion. Eine erhöhte PLD-Aktivierung und damit eine erhöhte Cholin Konzentration könnte also als Marker für das Risiko der Plaque Destabilisierung des Patienten genutzt werden. In diesem Zusammenhang muss auch die Frage gestellt und geklärt werden, ob es möglich ist, den Erfolg der Therapie mit einem Thrombozyten Inhibitor aus der Gruppe der GPIIb/IIIa-Antagonisten durch eine Veränderung der Cholin Konzentration zu belegen.

1.7 Vollblut-Cholin

Die Bestimmung der Cholin Konzentration ermöglicht einen Rückschluss auf die Aktivität der Phospholipase D. Wegen intrazellulärer Transportprozesse zwischen Serum und Blutzellen ist dabei die Messung von Cholin in Vollblut (WBCHO) durchzuführen. Die Messung im Vollblut stellt dabei hohe Anforderungen an das Labor.

1.7.1 Messung der Phospholipase D Aktivität

In vorangegangenen experimentellen Studien wurde die Auswertung von hochaufgelösten ^{1}H-NMR-(„Nuclear-Magnetic-Resonance“)-Spektren als Screening-Verfahren eingesetzt. Dazu wurde Vollblut Ultrafiltrat untersucht, das aus Vollblut hergestellt wurde, indem mit einem Ultrafilter alle Substanzen mit einem Gewicht >10000 Dalton abgetrennt wurden. Die Ergebnisse zeigten eine erhöhte Cholin-Konzentration im Vollblut (WBCHO; Whole Blood Cholin) bei Patienten mit ACS. WBCHO konnte als Prediktor für kardiale Ereignisse bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom identifiziert werden [105]. Insbesondere

auch in der Gruppe der Troponin I negative Patienten konnten eine erhöhte WBCHO Konzentration bei Aufnahme als prognostischer Marker für das Erreichen der primären- (kardial bedingter Tod, plötzliche Asystolie) und sekundären- (Arrhytmien, plötzlicher Herztod und koronar Angioplasty) Endpunkte gewertet werden [105]. In der Früherkennung von Risikopatienten ist das Vollblut-Cholin anderen Substanzen überlegen, da es im Falle eines aktivierten thrombozytären Systems direkt detektiert werden kann und nicht erst nach einer zeitlichen Verzögerung ansteigt, wie sie bei anderen Markern durch Auswaschungsprozesse aus dem geschädigten Gewebe entsteht. Hier stellt sich auch die Frage, ob das Vollblut-Cholin zur Verlaufskontrolle von Therapien zur Hemmung der Thrombozyten-Aggregation verwendet werden kann. In vorangegangenen Studien wurde der optimale Cut-off-Wert mittels einer „Receiver-Operating-Characteristics“-Kurve (ROC-Kurve) ermittelt und festgelegt. Auf der Grundlage der Vermutung, dass eine erhöhte Vollblut-Cholin-Konzentration ein Indikator für ein erhöhtes Risiko einer instabilen Plaque ist, wurde diese Berechnung für Patienten mit einer Instabilen Hochrisiko-Angina Pectoris, ohne vollständigen Verschluß eines Koronargefäßes, durchgeführt. In dieses Kollektiv wurden auch Patienten mit minimaler Läsion des Myokards „minor cardial damage“ (Troponin erhöht, CK-MB nicht signifikant erhöht) eingeschlossen. Hierbei lag der Cut-off-Wert für Vollblut-Cholin bei 28,2 µmol/L. Die Vollblut-Cholin Analyse ist patentrechtlich geschützt (DE 19836617C2, PCT/EPP 99/05911).

1.7.2 Prognostische Aussagekraft von Cholin

Im Rahmen der unter 1.7.1 vorgestellten Studie [105] wurde nach der Kaplan-Meier-Methode eine Überlebenszeitanalyse durchgeführt. Untersucht wurden 145 Patienten der Studie mit der Diagnose Akutes Koronarsyndrom. Innerhalb der ersten 30 Tage nach Einschluss in die Studie und Bestimmung der Laborparameter war das Erreichen der primären Endpunkte (kardial bedingter Tod, plötzliche Asystolie) signifikant häufiger, wenn ein positives Cholin Testergebnis (> 28.2 µmol/L) bei Aufnahme des Patienten (18,2% vs. 4,4%, Hazardrate 4,31, 95% Konfidenzintervall 1,96–9,51, p <0,001) vorlag. Erhöhte Cholin Quartile ergaben eine signifikante Erhöhung des Risikos für kardial

bedingten Tod oder eine plötzliche Asystolie (Risikoanstieg 2,5%, 5,1%, 7,5%, 17,5%, Cox Regression p = 0,0013, Log-Rang-Test p = 0,0005). Dies verdeutlicht den möglichen Stellenwert von Vollblut-Cholin (WBCHO) im Rahmen der prognostischen Einschätzung der ACS-Patienten.

2 Fragestellung

Ziel dieser Arbeit war es, den Verlauf des Phospholipase D Metaboliten Cholin (Vollblut-Cholin, whole blood cholin, WBCHO) unter Therapie mit oder ohne Einsatz des Thrombozyten- Aggregationshemmers Tirofiban (GPIIb/IIIa-Antagonist) bei Notfall- und Intensivpatienten mit akutem Koronarsyndrom zu untersuchen.

Es soll beantwortet werden,

1. ob es möglich ist, den Erfolg der Therapie mit einem Thrombozyten Inhibitor aus der Gruppe der GPIIb/IIIa-Antagonisten durch eine Veränderung der Cholin Konzentration zu belegen und
2. ob der Einsatz von GPIIb/IIIa-Antagonisten die Konzentrationen der Standardmarker Troponin, Myoglobin und Kreatinkinase beeinflusst.

3 Methodik

3.1 Studienprotokoll

Das Studienprotokoll beinhaltet die Festlegung der möglichen Patientenpopulation, Ein- und Ausschluss-Kriterien sowie Vorstellung der Studie bei der Ethik Kommission. Zusätzlich wurde im Protokoll die Therapie und Gruppenauswahl der Studienpatienten, sowie die Probengewinnung und Probenvorbereitung festgelegt.

3.1.1 Studienpopulation

In der Rettungsstelle und der Intensivstation der Charité, Campus Virchow Klinikum, wurden 342 Patienten im Zeitraum von August 1999 bis Oktober 2000 in die Studie eingeschlossen. In der Anamnese wurden besonders die aktuellen Beschwerden, Vorerkrankungen einschließlich Familienanamnese, die kardialen Risikofaktoren und die aktuelle Medikation erfragt. Im Anschluss erfolgte die klinische Untersuchung der Patienten. Als letztes wurde die Blutabnahme durchgeführt. Das Studienprotokoll wurde vor der Studie durch die Ethik Kommission der Charité genehmigt. Das Einschlusskriterium für alle Patienten war das Symptom Brustschmerz. Als Ausschlusskriterium wurde ein Hb < 7 g/dL, aktive Blutung, Symptome nicht kardialen Ursprungs und stabile Angina ohne aktuelle Symptome definiert. Die Aufnahme in die Studiengruppe erfolgte dann nach Aufklärung und Einwilligung des Patienten. Um einen möglichst reibungslosen Einschluss der Patienten in die Studie zu gewährleisten, war es erforderlich, eine 24-Stunden-Rufbereitschaft einzurichten. Es wurde jeweils nach 30 Tagen und 12 Monaten ein Follow-up in der Studiengruppe durchgeführt.

3.1.2 Einschluss der Studienpatienten

Bei den Patienten wurde entsprechend des Studienprotokolls eine Anamnese und klinische Untersuchung durchgeführt. Zusätzlich zur Blutentnahme für die Routineparameter wurde eine Vollblutprobe für die WBCHO-Bestimmung abgenommen. Die Therapie erfolgte dann durch den Aufnahmearzt nach denen

im Jahr 1999/2000 aktuellen Guidelines, insbesondere auch der Einsatz eines GPIIb/IIIa-Antagonisten. Die Therapie Entscheidungen wurden ohne Kenntnis der WBCHO Konzentration getroffen.

3.1.3 Selektion der Gruppen

Die Patienten wurden retrospektiv in zwei Gruppen unterteilt. Eine Gruppe erhielt wie unter 3.1.2 beschrieben das Medikament Aggrastat® (GPIIb/IIIa-Antagonist) zusätzlich zur Standardtherapie (im Folgenden Gruppe 1). Die andere Gruppe wurde ohne zusätzliche GPIIb/IIIa-Antagonisten Medikation therapiert (Gruppe 0). Alle Patienten waren nach der ACC/AHA Definition ACS Patienten. Weiterhin sollte die WBCHO-Konzentration bei Aufnahme > 20 µmol/L sein, da speziell der Effekt der Therapie auf Patienten mit aktivierter Phospholipase D untersucht werden sollte. Zur Paar-Bildung wurden Patienten aus Gruppe 1 entsprechenden Patienten aus Gruppe 0 zugeordnet. Hierbei wurden Diagnose, Geschlecht, Alter und Anzahl der Risikofaktoren berücksichtigt (Tabelle 2). Nach diesem Auswahlverfahren lagen 16 Paare zur Analyse vor. Die Analyse entspricht einer retrospektiven „Matched Pairs“ Analyse.

3.1.4 Probengewinnung

Die Bestimmung des WBCHO im zeitlichen Verlauf machte eine zusätzliche Blutabnahme zu der jeweiligen Routineabnahme an drei verschiedenen Zeitpunkten erforderlich. Die erste Probe wurde bei Aufnahme des Patienten, die zweite nach 4-6 Stunden und die dritte nach 12-24 Stunden abgenommen. Zur Blutentnahme wurden Lithium-Heparin/ Kalium-Fluorid Monovetten der Fa. Sarstedt (Deutschland, 9ml Volumen) verwendet. Die Vollblutproben wurden bei -80°C eingefroren und gelagert. Der Transport der Proben bis zum Einfrieren erfolgte auf Eis mit einer maximalen Dauer von 30 Minuten.

3.1.5 Probenbearbeitung

Um die Blutproben für eine weiterführende Cholin-Analytik zugänglich zu machen, wurden alle Bestandteile mit einem Gewicht größer 10000 Dalton mit Ultrafiltern abgetrennt.

Dazu wurden Ultrafilter (Fa. Millipore, UFV4BGC00, Cut-off 10 kD) durch Zentrifugation (3 min bei 3645 x g) mit 2 mL Wasser (Aqua Braun) gewaschen; das Auffanggefäß mit filtriertem Wasser wurde verworfen. Die Filter wurden in ein neues Auffanggefäß (14 mL Falkon Tube) gesteckt. Filter und Falcon Tubes wurden mit der entsprechenden Probennummer beschriftet. Die bei –80°C gelagerten Proben wurden im Wasserbad bei 37°C für 20 min unter Rütteln (60 u/min) kontrolliert aufgetaut. Hiernach wurden die Proben bis zur endgültigen Abfüllung zur Vermeidung ungewollter Enzymreaktionen auf Eis gelagert. Jede Probe von ca. 6-8 mL Vollblut wurde durch Schütteln homogenisiert und aufgeteilt. 2 mL Vollblut wurden als Rückstellprobe bei –80°C wieder eingefroren. Das restliche Vollblut wurde auf 2 Ultrafilter aufgeteilt.
Es erfolgte nun die Zentrifugation in einer Kühlzentrifuge bei 15°C und 3645 x g für 120 min zur Abtrennung der Ultrafiltrate. Diese wurden anschließend homogenisiert und 300µl zur Analyse in ein Glas-Vial (Supelco, Nr. 27087, 1 ml; mit PTFE-Silikon Septum) abgefüllt. Bis zur Analyse wurde das Vial bei –20°C eingefroren. Das verbleibende Ultrafiltrat wurde als Rückstellprobe bei -80°C eingefroren. Der Prozess der Ultrafiltration wurde validiert. Die Wiederfindungsrate von Cholin nach der Ultrafiltration beträgt 100% (siehe Kapitel 3.2.2).

3.2 Analyse- und Trennverfahren

Die Messung von Cholin in der komplexen Matrix Blut stellt besondere Anforderungen an moderne Detektions- und Trennverfahren. In dieser Arbeit wurde die analytische Hochleistungskopplungstechnik HPLC-MS (High Performance Liquid Chromatographie- Massenspektrometrie) eingesetzt.
Mit diesem Verfahren werden komplexe Substanzgemische mittels HPLC analytisch getrennt und online selektiv und spezifisch mit einem Massenspektrometer analaysiert. Die Kopplung der beiden Methoden erfolgte mit einem Electrospray Ionization (ESI-) - Interface (HPLC-ESI-MS).
Für die maßgebliche Weiterentwicklung der ESI als Bindeglied zwischen Trenn- und Detektionstechniken wurde 2002 der Chemie-Nobelpreis an Professor John B. Fenn der Universität Yale verliehen.

3.2.1 HPLC

Als mögliches Trennverfahren zur Untersuchung polarer Substanzen, wie z.B. Cholin in Biomatrices, wird die Chromatographie, insbesondere die Ionentauscher- und die Umkehrphasen- („Reversed Phase“, RP) Chromatographie, in Verbindung mit geeigneten Detektionssystemen eingesetzt. Die Trennung erfolgt durch unterschiedliche Wechselwirkungen der einzelnen Bestandteile des Stoffgemisches mit einer flüssigen mobilen und einer festen stationären Phase. Die Wechselwirkungen sind im Wesentlichen abhängig vom Verteilungskoeffizienten der einzelnen Komponenten des Gemisches. Die stationäre Phase befindet sich bei der HPLC in dicht gepackten, hochdruckstabilen Säulen.

Bei der HPLC bestimmt die Partikelgröße der stationären Phase den Strömungswiderstand. Abhängig davon ist auch der benötigte Druck um die mobile Phase durch die Säule zu pumpen. Die Selektivität der Trennung mittels HPLC erfolgt unter Anderem in Abhängigkeit von Polarität und Partikelgröße der stationären Phase, sowie den pH-Werten von Analyt und mobiler Phase.

Bei der Flüssigkeitschromatographie wird grundsätzlich je nach Eigenschaft der stationären Phase zwischen Normalphasen (NP)- und Umkehrphasen (RP)-Chromatographie unterschieden. Als stationäre Phase der NP-Chromatographie wird überwiegend Kieselgel oder Aluminiumoxid verwendet. Bei der RP-Chromatographie wird die Polarität der stationären Phase durch chemische Anbindung einer hydrophoben Verbindung (meist eine apolare Alkylgruppe unterschiedlicher Länge) an die Trägersubstanz umgekehrt. So erfolgt eine Modifizierung der Trenneigenschaften durch Einbringen funktioneller Gruppen in die stationäre Phase.

Die Trennung der Analyte erfolgt dann aufgrund unterschiedlich starker Wechselwirkungen zu den Alkylgruppen der stationären Phase. In der RP-Chromatographie wird besonders häufig mit Octadecylsilylresten modifiziertes Kieselgel als stationäre Phase eingesetzt (ODS-Säulen, RP-C-18 Material). Die für die Cholin-Trennung eingesetzten ODS-Säulen werden zur Verbesserung der Trenneigenschaften mit EDTA behandelt, um Reste an Schwermetallionen zu entfernen, die besonders bei Substanzen wie Cholin zu Peakverbreiterungen

durch Tailing (Interaktion der Analysesubstanz mit Schwermetallionen der Säule führt häufig zu Peakverbreiterung und erschwert somit die Analyse der einzelnen Peaks) führen. In dieser Arbeit wurde als analytische Säule eine vorbehandelte Inertsil ODS-3 Säule (250x 3.0 mm, Teilchengröße 5 µm; VDS Optilab, Deutschland) verwendet. Die Flussrate betrug 650 µL/min, die analytische Säule wurde im Säulenofen auf 45°C temperiert. Der Druck über der Säule betrug zwischen 105 und 120 bar. Es wurden 5 µL Probenvolumen injiziert.

Bei der RP-Chromatographie besteht die mobile Phase meist aus polaren Lösungsmitteln wie Methanol, Wasser, aquatischen Pufferlösungen oder Acetonitril. Die Wechselwirkungen der Analyte zwischen mobiler und stationärer Phase - bedingt durch unterschiedliche pH-Werte, Polaritäten, Verteilungsgleichgewichte und Hydrophobizitäten - führt zu unterschiedlichen Retentionszeiten der Substanzen und somit zur Trennung.

Wegen der Polarität des Analyt-Ions (Cholin) wird ein spezielles Puffergemisch als mobile Phase eingesetzt. Dieses Puffergemisch wurde speziell für die WBCHO-Analytik entwickelt und setzt sich aus einer wässrigen Lösung von 10 mmol/L monobasischem Natriumphosphat (NaH_2HPO_4), 10 mmol/L dibasischem Natriumphosphat (Na_2HPO_4), 5% (v/v) Acetonitril und 50 mg/L N-Octylsulfat zusammen. Da Vollblut-Proben ohne Probenvorbereitung das Injektionssystem und die Trennsäule schädigen und verstopfen würden, werden Vollblut-Ultrafiltrate analysiert (3.1.5). Sämtliche LC-Parameter wurden für die WBCHO-Analytik hinsichtlich eines hohen Probendurchsatzes und hoher Stabilität optimiert. Die Optimierung erfolgte anhand der Phosphatzusammensetzung (Na_2HPO_4, NaH_2PO_4) und Additivkonzentrationen wie Acetonitril sowie Zusatz verschiedener Modifier (N-Octylsulfat, Natriumdodecylsulfat und Natrium-Pentasulfat). Weiterhin wurden verschiedene analytische Chromatographie Säulen (C-18 polymer Säulen, Spheisorb ODS-2 und Inertsil ODS-3) zur WBCHO-Analytik evaluiert. Ergebnis der Optimierung ist die oben angegebene Eluent-Zusammensetzung, welche die besten Trenneigenschaften in Verbindung mit der ODS-3-Säule für Cholin aufweist.

3.2.2 Massenspektrometrie mittels Elektrospray-Ionisation

Nach Trennung des Stoffgemisches mittels HPLC erfolgt die Detektion der Substanzen. Zur Detektion wird in der Cholin-Analytik wegen seiner Selektivität häufig ein Enzymreaktor eingesetzt, der unter Ausnutzung der Cholinoxidase-Reaktion arbeitet. Da Enzymsysteme bei der Analyse komplexer Matrices anfällig für Kreuzreaktionen sind, ist diese Technik jedoch oft problematisch. Da Cholin kein Absorptions-Spektrum im UV-visuellen Bereich hat, kann auch nicht der in der Chromatographie weit verbreitete Dioden-Array-Detector (DAD) verwendet werden (Messung der Absorptionsspektren von UV-Licht mittels Diodenfeld).

In den letzten Jahren hat sich mit der fortschreitenden Entwicklung von Atmosphärendruck Ionisationstechniken (z.B. Electrospray Ionization, ESI) die Massenspektrometrie (MS) als leistungsfähiges Detektionssystem für die Flüssigchromatographie etabliert. Für viele analytische Fragestellungen ist die Selektivität und Spezifität eines Massenspektrometers sogar so hoch, dass auf eine chromatographische Trennung komplett verzichtet werden kann und so Probleme einer HPLC-MS-Kopplung vermieden werden können. Bei der Analytik komplexer Matrices ist eine chromatographische Vortrennung des Analysats jedoch meistens erforderlich, da es zu Querstörungen mit anderen Matrixbestandteilen kommen kann. Die Kopplung zwischen HPLC und MS ist in diesen Fällen unverzichtbar.

Die ESI-Kopplungstechnik ermöglicht es, die hohe Trennleistung der Chromatographie mit den selektiven und spezifischen Eigenschaften der Massenspektrometrie zu kombinieren und dabei die Probleme dieser Kopplungstechnik (z.B. die Überführung und Ionisierung einer im HPLC-Eluat gelösten Substanz ins Hochvakuum des Massenspektrometers unter Abtrennung der Lösungsmittelmatrix) zu minimieren. Diese Technik wurde daher auch in dieser Arbeit für die Cholin-Analytik eingesetzt.

Die Ionisierungstechnik der ESI ist vergleichsweise schonend, so dass die Analyte vorwiegend als geladene Molekül-Ionen neben wenigen Fragment-Ionen detektiert werden können. Wegen ihrer schonenden Ionisierungseigenschaften ist die ESI auch gut für die Analytik thermolabiler

Substanzen geeignet, die sonst schwer zerstörungsfrei ionisiert und in die Gasphase überführt werden können. Die bei herkömmlichen Massenspektren üblichen komplexen Fragmentierungsmuster (bekannt vor allem aus der Elektronenstoß-Ionisation) treten unter Normalbedingungen der ESI nicht auf. Daher können Fragmentierungsmuster auch nicht zur Identifikation unbekannter Analyte herangezogen werden. Die Identifikation erfolgt meist mit Hilfe von Standards über das Molekül-Ion und die Retentionszeit einer definierten Chromatographie.

Bei der Kopplung eines Massenspektrometers an die HPLC werden die Analyte aus der flüssigen, mobilen Phase abgetrennt und in die Gasphase überführt. Anschließend gelangen die ionisierten Substanzen zur Detektion in den Vakuumbereich des Massenspektrometers. Dieser Prozess wird bei dem in dieser Arbeit eingesetzten Gerät durch eine Orthogonalspray Ionenquelle erreicht, welche besonders robust und stabil bei der Kopplung der HPLC an Massenspektrometer arbeitet. Durch die Robustheit der Orthogonalspray Ionenquelle können sogar massenspektrometrische Analysen mit hochkonzentrierten salzhaltigen Puffersystemen durchgeführt werden. Diese sind mit herkömmlichen linearen Spraysystemen nahezu unmöglich, da das Massenspektrometer durch Bildung von Salzkristallen aus der mobilen Phase verklebt und unbrauchbar wird. Diese Eigenschaft ist besonders bei der Chromatographie polarer und geladener Teilchen wie Cholin wichtig, da diese Substanzen meist nur mit komplexen Puffersystemen getrennt werden können. In Abbildung 4 ist der Aufbau der HPLC-ESI-MS schematisch dargestellt. Es wird die Kopplung der HPLC mit der MS mittels ESI gezeigt, sowie die parallele Detektion mittels DAD zur Kontrolle der Messungen (Qualitätskontrolle der Analyse).

Die mobile Phase der HPLC wird im Sprayraum des ESI-Interface durch die Nebulizer Nadel mit Stickstoff-Gas zu einem Aerosol versprüht, das durch Anlegen einer Hochspannung zwischen Nadel und Transferkapillare ionisiert wird. Durch die Verdampfung des Trennpuffers im Gegenstrom mit Trockengas (ebenfalls Stickstoff) wird die Tröpfchengröße immer weiter reduziert und dabei die Ladungsdichte auf dem Tropfen gleichzeitig erhöht. Der Analyt geht nach vollständiger Verdampfung des Lösungsmittels ionisiert in die Gasphase über.

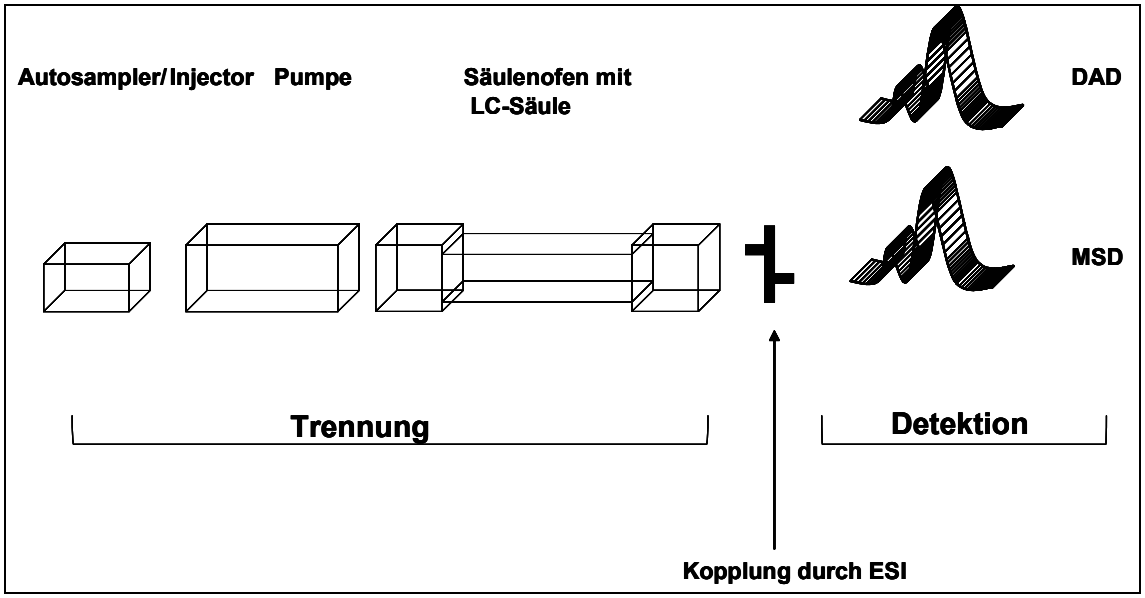


Abbildung 4: Stark vereinfachte schematische Darstellung des Aufbaus der gekoppelten Analyse- und Trennsysteme der HPLC-ESI-MS. Die Probe wird im Autosampler automatisch in den von einer binären Hochdruckpumpe erzeugten HPLC-Fluss injiziert und auf der thermostatisierten LC-Säule getrennt. Danach durchlaufen die Substanzen einen Dioden-Array-Detektor (DAD) und gelangen über das ESI-Interface ionisiert in das Massenspektrometer.

In Abbildung 5 ist das Prinzip der Elektrospray Ionisation dargestellt.

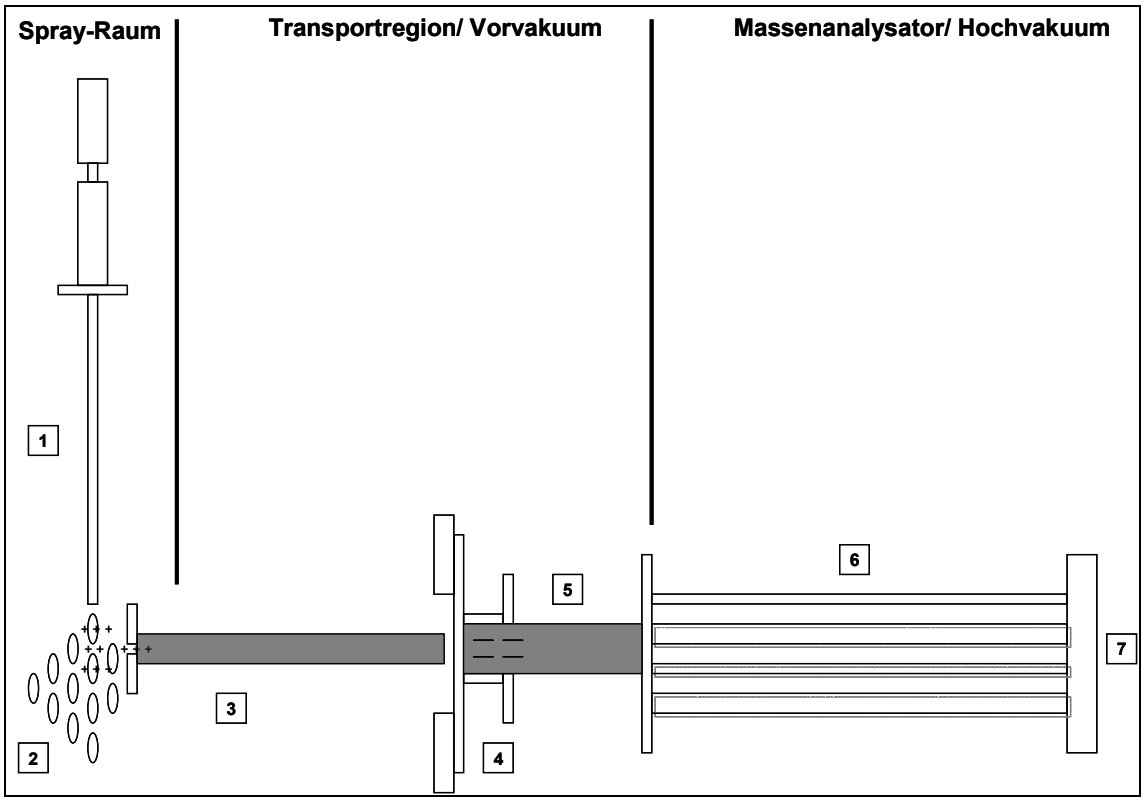


Abbildung 5: Schematische Darstellung der HPLC-ESI MS. Im Spray-Raum wird das HPLC-Eluat zu einem feinen Aerosol versprüht. Die ionisierten Analyte werden elektrostatisch orthogonal über die Transferkapillare und den Octopol in den Analysatorraum überführt und dort massenselektiv detektiert. [1] Nebulizer-Nadel, [2] Aerosol, orthogonal abgelenkte Ionen, [3] Transferkapillare, [4] Skimmer 1 und 2, [5] Octopol, [6] Quadrupol, [7] Multiplier (nähere Erläuterungen siehe laufenden Text unter 3.2.2).

Es wird der Ionenfluss nach Ionisation in den Analysatorraum verdeutlicht. Die geladenen Analyte werden nun durch elektrostatische Anziehung orthogonal aus der Flussrichtung heraus abgelenkt und in die Transferkapillare überführt, durch welche sie in den Vorvakuumsbereich des Massenspektrometers gelangen. Die Lösungsmittelfracht und sich bildende Salzkristalle fließen in HPLC-Sprayrichtung ab, ohne den weiteren Weg der geladenen Analyte ins Massenspektrometer zu beeinträchtigen (Abbildung 5). An den Skimmerblenden werden letzte Flüssigkeits- und Salzrückstände abgeschieden (Die Skimmer sind Blenden, welche den Ionenstrom der schweren Moleküle durch elektromagnetische Fokussierung optimieren und die leichteren Partikel, wie Helium und Lösungsmittelreste abscheiden). Die Analyte gelangen darauf durch den Qctopol (stabförmige Metallelektrode zur weiteren Flussoptimierung)

in den unter Hochvakuum stehenden Analysatorraum. Das im Analysatorraum anliegende Vakuum muss besonders hoch sein, um das Grundrauschen des Gerätes zu minimieren und Entladungen der Analyte durch Kollisionen mit Restluftmolekülen zu verhindern. Die ionisierten Moleküle werden im Quadrupol (vier parallele, stabförmige Metallelektroden, die durch ein Wechsel- und Gleichspannungsfeld beeinflusst werden) des Massenspektrometers entsprechend ihres Masse/ Ladung (m/z) Verhältnisses selektiv getrennt und abschließend mit einem Multiplier (Verstärker, der Ionenkontakt in ein elektronisches Signal umsetzt) detektiert.

Die massenspektrometrische Detektion kann im Full-Scan-Modus und im SIM („Single-Ion-Monitoring“)-Modus erfolgen. Im Full-Scan-Modus wird für jeden Datenpunkt des Chromatogramms ein komplettes Spektrum eines definierten Massenbereiches aufgenommen (z.B. 50 bis 1000 Dalton). Diese Technik ist sinnvoll, wenn man eine Übersicht über ein unbekanntes Substanzgemisch benötigt, um dann die Unbekannten an Hand der Spektreninformationen zu identifizieren. Die Aufnahme eines Full-Scan Spektrums benötigt jedoch vergleichsweise viel Zeit, so dass in einem definierten Abschnitt eines Chromatogramms nur wenige Datenpunkte sind, wodurch die Nachweisempfindlichkeit beeinträchtigt wird. Durch „Single Ion Monitoring“ kann die Nachweisempfindlichkeit ca. um Faktor 10 verbessert werden. Sind die zu analysierenden Ionen bekannt, kann der Scan auf nur wenige, oder gar eine Einzelmassen beschränkt werden. Dadurch lassen sich in der gleichen Zeiteinheit eines Full-Scans ein Vielfaches an Datenpunkten gewinnen, was in der Summe zur wesentlich verbesserten Empfindlichkeit führt. Für die Cholin-Analytik wird daher der selektive SIM-Modus eingesetzt (siehe Kapitel 3.2.3).

Die Massenspektrometrie (MS) mittels Elektrospray Ionisation (ESI) wurde in dieser Arbeit im positiv Modus (Parameter: Fragmentorspannung 100 Volt, Trockengas-Temperatur 350 °C, Nebulizer Gasdruck 20 psi, Vcap 3000 Volt) mit selektivem Ionen Monitoring von positiv geladenen Cholin-Ionen (m/z = 104, Retentionszeit 4,96 min) eingesetzt. Die MS-Parameter wurden für die Cholin-Analytik optimiert. Als Trocken-und Nebulizer Gas wurde 99%-iger, über einen Filter gereinigter, Stickstoff verwendet. Das HPLC-MS Verfahren wurde für einen Konzentrationsbereich des WBCHO von 0,5-1000 µmol/L gemäß

laborinterner Standardarbeitsanweisung (StAA Nr.2, 1999 1. Fassung, „Bestimmung von Cholin in Blutproben mit HPLC/MS“, Abteilung für Innere Medizin mit Schwerpunkt Nephrologie und Intensivmedizin, MS-Labor, CVK, Charite Berlin) und Validierungsprotokoll optimiert.

Zur Kontrolle des Detektionsvorgangs wurde online ein Dioden-Array-Detektor (DAD, Wellenlängen: 200 und 360 nm) eingesetzt. Die genaue technische Herstellerbezeichnung der in dieser Arbeit verwendeten Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie Apparatur lautet: Agilent Technologies HPLC 1100 Series/ Hewlett Packard, bestehend aus einem G1322A Degasser, einer G1322A binären Pumpe, einem G1313A Autosampler, einem G1316A Säulenthermostat und einem G1315A Dioden-Array-Detektor. Das System ist über ein Electrospray-Interface an ein G1946B Massenspektrometer gekoppelt.

3.2.3 Messung und Interpretation

Für die WBCHO-Analyse wurden in verschiedenen Konzentrationen (5, 50, 500 µmol/L) Kalibrierlösungen hergestellt. Die Kalibrationsstandards wurden zur Quantifizierung der Ergebnisse verwendet. Als Lösungsmittel für die Verdünnungsreihe wurde Kochsalzlösung (0,9 %ige NaCl-Lösung) zur Matrix-Nachstellung der Ultrafiltrate verwendet. Eine weitere Absicherung und Kontrolle der Ergebnisse erfolgte durch unabhängig hergestellte Proben zur Qualitätskontrolle (QC) in verschiedenen Verdünnungen (12,5, 125, 200 µmol/L). Nach vier Realproben wurde eine QC-Messung zur Kontrolle durchgeführt und eine neue Kalibrierkurve erstellt. Ein HP Kajak XA PC mit der LC/MSD ChemStation Software (Version 8.03) wurde zur Geräte-Steuerung und Auswertung eingesetzt. Die computer-gestützte Auswertung der Ergebnisse umfasste Peakerkennung, Integration, Kalibrierung und Quantifizierung. Der Reportausdruck liefert neben dem Cholingehalt der Analyseprobe auch die aktuelle Kalibration.

In Abbildung 6 ist das Massenspektrum von Cholin dargestellt. Das ESI-positiv Fullscan Massenspektrum wird durch das positiv geladene Cholin-Molekül-Ion (m/z 104) dominiert. Das Fragment mit m/z 60 entspricht dem protonierten Trimethylammoniumion. In einer WBCHO-Analyse wird selektiv das Molekül-Ion im SIM-Modus (Single-Ion-Monitoring) vermessen.

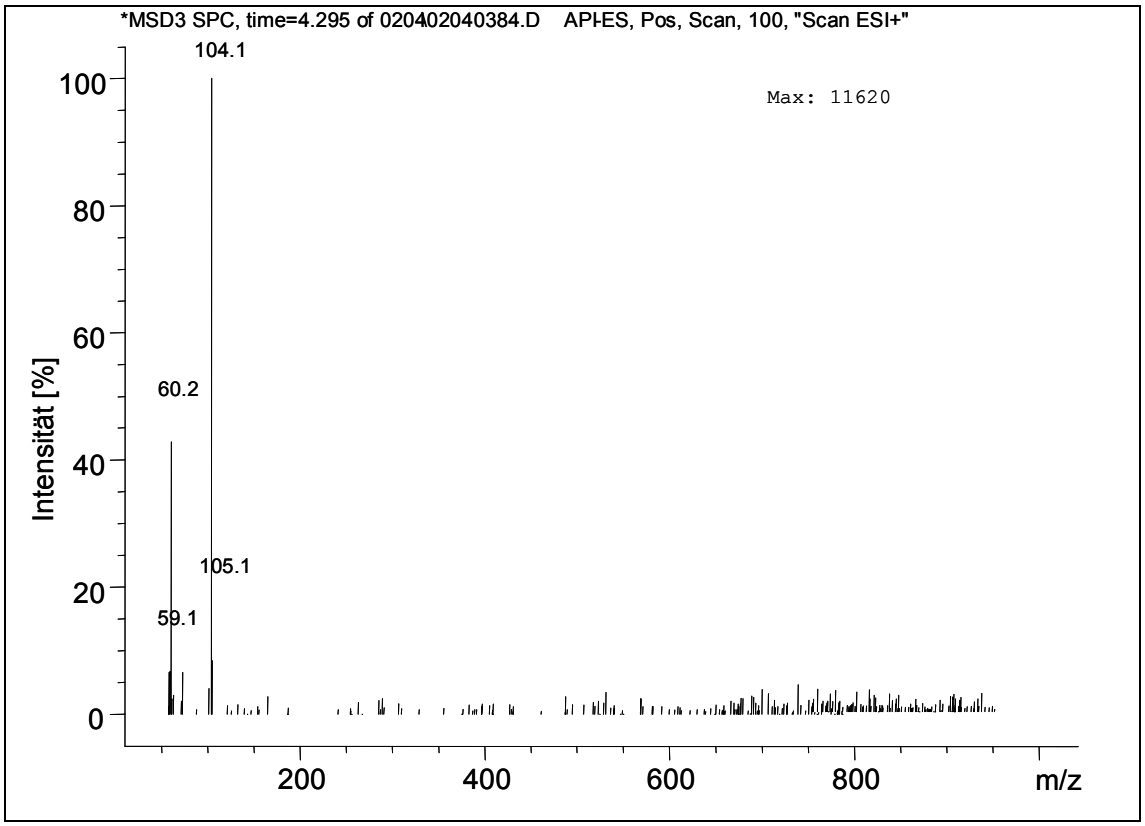


Abbildung 6: ESI-positiv Massenspektrum von Cholin (original Abbildung LC/MSD Chemstation). Das Spektrum wird vom positiv geladenen Cholin-Molekül (m/z 104) dominiert. Das Fragment mit m/z 60 entspricht dem protonierten Trimethylammoniumion.

In Abbildung 7 ist ein Reportausdruck der LC/MSD Chemstation dargestellt. Der Reportausdruck liefert ein massenselektives Chromatogramm der „Selective Ion Monitoring“-Analyse (m/z = 104, ESI positiv, SIM-Modus) (1), den Cholingehalt der Probe (2) in µmol/L und die Kalibrationskurve (3), aus der der Cholingehalt berechnet wird.

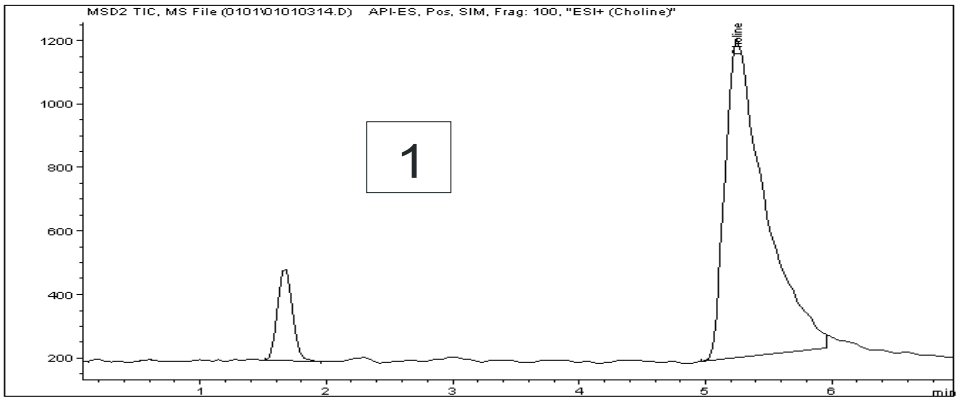
Data File D:\HPCHEM\DATA\0101\01010314.D Sample Name: GH 738

Realproben VBUF
GH 738

Choline Puffer (je 10mM Na2HPO4, NaH2PO4, 50 mg/L N-Oct
ylsulfat, 5% Acetonitril)
C-18-Inertsil-ODS-3 250x3.0, 650 µL/min, 45°C, 5µL

Injection Date	: 13.01.01 00:48:37	Seq. Line :	22
Sample Name	: GH 738	Location :	Vial 19
Acq. Operator	: Danne/Lueders	Inj :	1
		Inj Volume :	5 µl
Sequence File	: D:\HPCHEM\SEQUENCE\0101\0112 1.S		
Method	: D:\HPCHEM\METHODS\0101\0101.M		
Last changed	: 12.01.01 09:43:50 by Danne/Lueders		

SIM ESI + Choline



External Standard Report

Sorted By	:	Signal
Calib. Data Modified	:	Friday, 12. January 2001 19:50:19
Multiplier	:	1.0000
Dilution	:	1.0000

Signal 1: MSD2 TIC, MS File

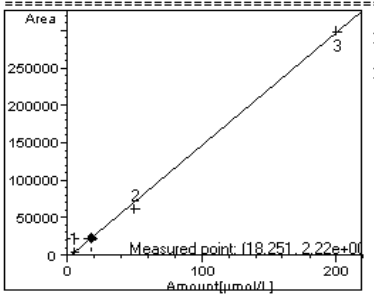
RetTime [min]	Type	Area	Amt/Area	Amount [µmol/L]	Grp	Name
5.250	PB	2.21850e4	8.22665e-4	18.25078		Choline
Totals :				18.25078		

2

Instrument 1 13.01.01 00:56:11 Danne/Lueders

Data File D:\HPCHEM\DATA\0101\01010314.D Sample Name: GH 738

Calibration Curves



Choline at exp. RT: 5.088
MSD2 TIC, MS File
Correlation: 0.99904
Residual Std. Dev.: 7572.57285
Formula: y = mx + b
m: 1508.12567
b: -5339.51136
x: Amount[µmol/L]
y: Area

3

*** End of Report ***

Abbildung 7: Reportausdruck LC/MSD Chemstation. Dargestellt sind ein massenselektives Chromatogramm (1), sowie der Cholingehalt der Probe (2) und die Kalibrationskurve (3).

3.3 Untersuchte Laborwerte

Die gemessenen Laborparameter wurden mit Standard-Methoden bestimmt. Hierbei wurden die Richtwerte der aktuellen Leitlinien der ESC/ACC [78] zugrunde gelegt und berücksichtigt. Die folgenden Parameter wurden im Plasma bestimmt und sind mit der 99-sten Perzentile eines Normalkollektivs angegeben: Troponin I -Stratus (Stratus® CS; Dade Behring; 0.22 µg/L). Myoglobin (Roche; >90 µg/L) und CK-MB Masse (Elecsys 2010; Roche; >7 µg/L). Die Bestimmung durch die Geräte ACS Centaur, Elecsys und Roche wurden im Institut für klinische Chemie der Klinik durchgeführt. Die Messungen am Stratus-Gerät erfolgten direkt bei Aufnahme vor Ort in der Rettungsstelle der Klinik. Als weiterer Parameter wurde WBCHO im Vollblut Ultrafiltrat im Labor der Arbeitsgruppe mittels HPLC-ESI-MS bestimmt.

3.4 Statistische Auswertung

Die statistische Analyse der erhobenen Daten erfolgte mit der SPSS© Software (Version 10.0) und der SAS-Software (SAS Release 8.1). Zur graphischen Darstellung der Ergebnisse wurde SPSS und EXCEL (Microsoft, Office XP professionell) verwendet. Die Analyse mittels Histogramm und Q-Q Plot ergab keine Normalverteilung der Daten innerhalb der selektierten Gruppen. Aus diesem Grund erfolgte eine nicht parametrische Varianzanalyse [106] mit zwei Wiederholungsfaktoren. Die Analyse zu mehr als zwei Zeitpunkten innerhalb der gebildeten Gruppen wurde mit dem Friedman-Test durchgeführt. Die Analyse zwischen den Gruppen an den Abnahmezeitpunkten erfolgte mit dem Wilcoxon-Test für nicht parametrische Daten. Das Signifikanzniveau wurde mit $\alpha=0,05$ angenommen. Die graphische und tabellarische Darstellung und Auswertung der Daten erfolgt durch Angabe des Median, der Perzentile (25;75) und dem 95% Konfidenzintervall.

4 Ergebnisse

Die beiden Patientengruppen, die entweder mit Tirofiban behandelt wurden (Gruppe 1) oder nicht (Gruppe 0), wurden retrospektiv in einer „matched pairs“ Analyse untersucht. Für die gemessenen Laborparameter und das WBCHO ist ein Vergleich des Verlaufs zwischen beiden Gruppen und eine Beurteilung des Verlaufs des jeweiligen Markers innerhalb jeder Gruppe möglich.

4.1 Charakteristika der Patienten

Es wurden zur Charakterisierung der beiden untersuchten Gruppen Basisdaten erhoben. Von den 32 eingeschlossenen Patienten waren 30 männlich und 2 weiblich. Die gesicherten Diagnosen verteilen sich in beiden Gruppen zu 50% (absolut 16) auf Myokardinfarkt mit ST-Hebung (STAMI) und Myokardinfarkte ohne ST-Hebung (NSTAMI). Die Patienten kamen 2,8 ± 2,6 Stunden nach Schmerzbeginn in die Aufnahme. Die Zeit von Schmerzbeginn bis zur ersten Blutabnahme betrug 3,8 ± 3,0 Stunden. In Tabelle 2 sind die Basismerkmale der Gruppen 1 und 0, nach denen die Paar-Bildung erfolgte, dargestellt.

Tabelle 2: Basis Merkmale der Gruppen: *Median, ** absolute Zahlen;( ) Perzentile (25/75)

	Variable		Einheit	Gruppe 1 (n=16)	Gruppe 0 (n=16)
Matching Parameter	Diagnose	STAMI **		8	8
		NSTAMI **		8	8
	Alter		[Jahre]	56,5* (48,00/70,50)	62,50* (58,00/72,50)
	Geschlecht		männlich	15	15
			weiblich	1	1
	Herzfrequenz		[Schläge/min]	89* (66,25/106,00)	78* (66,25/116,50)
	Blutdruck	Systole	[mmHg]	160* (140/180)	146* (132/157)
		Diastole	[mmHg]	80* (80/100)	87* (72/100)
	Body Mass Index		[kg/m²]	26,99* (24,96/30,75)	28,20* (24,20/29,74)
	WBCHO t1>20 **			16	16
	TnI positiv	Abnahme t1 **		14	13
		Abnahme t2**		16	15
	GPIIb/IIIa **			16	0

Tabelle 3 zeigt die Verteilung der Risikofaktoren, bekannte Medikation und akut Medikation, sowie Therapie der Patienten.

Tabelle 3: Darstellung der Risikofaktoren, Medikation und Therapie innerhalb der beiden Patientengruppen.

	Variable	Gruppe 1 (n=16)			Gruppe 0 (n=16)		
		absolut	relative Häufigkeit(%)	Konfidenzintervall	absolut	relative Häufigkeit(%)	Konfidenzintervall
Risikofaktoren	Raucher	11	0,73	[0,4490;0,9221]	7	0,43	[0,1975;0,7012]
	Hyperlipoproteinämie	8	0,50	[0,2465;0,7535]	10	0,62	[0,3543;0,8480]
	arterieller Bluthochdruck	8	0,50	[0,2465;0,7535]	9	0,56	[0,2988;0,8025]
	Diabetes mellitus	4	0,25	[0,0727;0,5238]	5	0,31	[0,1102;0,5866]
	bekannter Herzinfarkt	6	0,37	[0,1520;0,6457]	5	0,31	[0,1102;0,5866]
	bekannte Angina Pectoris	10	0,62	[0,3543;0,8480]	7	0,43	[0,1975;0,7012]
	bekannte PTCA	5	0,31	[0,1102;0,5866]	5	0,31	[0,1102;0,5866]
	begannte ACVB	2	0,12	**[0,0155;0,3835]**	3	0,18	**[0,0405;0,4565]**
bekannte Medikation	β-Blocker	3	0,18	**[0,0405;0,4565]**	2	0,12	**[0,0155;0,3835]**
	Glykoside	1	0,06	**[0,0016;0,3023]**	1	0,06	**[0,0016;0,3023]**
	Ca-Antagonisten	2	0,12	**[0,0155;0,3835]**	2	0,12	**[0,0155;0,3835]**
	ACE-Hemmer	6	0,37	[0,1520;0,6457]	1	0,06	**[0,0016;0,3023]**
	Nitrat	2	0,12	**[0,0155;0,3835]**	3	0,18	**[0,0405;0,4565]**
	ASS	5	0,31	[0,1102;0,5866]	8	0,50	[0,2465;0,7535]
	Lipidsenker	0	0,00	**[0,0000;0,2059]**	2	0,12	**[0,0155;0,3835]**
	Antikoagulation	1	0,06	**[0,0016;0,3023]**	0	0,00	**[0,0000;0,2059]**
Akutmedikation	β-Blocker	8	0,50	[0,2465;0,7535]	10	0,62	[0,3543;0,8480]
	ACE-Hemmer	6	0,37	[0,1520;0,6457]	3	0,18	**[0,0405;0,4565]**
	ASS	15	0,93	[0,6977;0,9984]	12	0,75	[0,4762;0,9273]
	Heparin UF	16	1,00	[0,7941;1,0000]	16	1,00	[0,7941;1,0000]
	Diuretika	4	0,25	[0,0727;0,5238]	1	0,06	**[0,0016;0,3023]**
Therapie	konservativ	1	0,06	**[0,0016;0,3023]**	4	0,25	[0,0727;0,5238]
	Thrombolyse	1	0,06	**[0,0016;0,3023]**	2	0,12	**[0,0155;0,3835]**
	akut PTCA	10	0,62	[0,3543;0,8480]	6	0,37	[0,1520;0,6457]
	CABG OP	1	0,06	**[0,0016;0,3023]**	0	0,00	**[0,0000;0,2059]**
	elektive PTCA	1	0,06	**[0,0016;0,3023]**	4	0,25	[0,0727;0,5238]
	Lyse + Notfall-PTCA	2	0,12	**[0,0155;0,3835]**	0	0,00	**[0,0000;0,2059]**
Klassifikation PTCA	PTCA	0	0,00	**[0,0000;0,2059]**	1	0,06	**[0,0016;0,3023]**
	PTCA + Stent	13	0,81	[0,5435;0,9595]	8	0,50	[0,2465;0,7535]
	PTCA ohne Erfolg	0	0,00	**[0,0000;0,2059]**	1	0,06	**[0,0016;0,3023]**
initiales EKG	normal	3	0,18	**[0,0405;0,4565]**	2	0,12	**[0,0155;0,3835]**
	ST-Senkung/ T-Negativierung	3	0,18	**[0,0405;0,4565]**	6	0,37	[0,1520;0,6457]
	ST-Hebung/ post-AMI ST-Senkung	9	0,56	[0,2988;0,8025]	8	0,50	[0,2465;0,7535]
	Linksschenkelblock	1	0,06	**[0,0016;0,3023]**	0	0,00	**[0,0000;0,2059]**

Zusätzlich zu den Basis Merkmalen der Patienten und den eigentlichen Markern, die beim akuten Koronarsyndrom bestimmt werden, wurden noch weitere Parameter im Routine Labor gemessen. In Tabelle 4 sind diese Parameter entsprechend der Gruppen-Verteilung dargestellt.

Tabelle 4: Routine Laborparameter, Darstellung des Median und der Perzentilen (25/75). Signifikante Unterschiede werde mit dem p-Wert angegeben, bei nicht signifikanten (n.s.) Differenzen erfolgt keine Angabe des p-Wertes.

Variable	Einheit	Gruppe 1	Gruppe 0	p-Wert
C-reaktives Protein	mg/dl	0,65 (0,20/1,55)	0,60 (0,20/0,70)	n.s.
Kreatinin	mg/dl	1,00 (0,82/1,00)	1,00 (0,80/1,40)	n.s.
Harnstoff	mg/dl	35,00 (26,50/42,50)	37,00 (28,00/49,00)	n.s.
Hb	g/dl	14,90 (14,12/15,75)	14,10 (12,95/14,97)	p=0,023
Hkt	%	0,45 (0,42/0,47)	0,42 (0,39/0,45)	n.s.
Cholesterin	mg/%	201,00 (136,25/249,25)	210,00 (175,50/231,00)	n.s.
Triglyceride	mg/dl	168,00 (111,00/209,00)	152,00 (105,50/198,50)	n.s.
Leukozyten	1/µl	11,400 (9,25/12,60)	9,22 (8,36/11,62)	n.s.
Thrombozyten	1/µl	212,50 (192,25/269,00)	233,50 (213,25/275,25)	n.s.

4.2 Verlauf der Marker-Substanzen

Es wurden Troponin I, Troponin T, Myoglobin und die Isoenzyme der Kreatinkinase an allen 3 Abnahmezeitpunkten bestimmt.

4.2.1 Verlauf der Troponine

Bei den Patienten wurde Troponin I (TnI) am Stratus Gerät direkt in der Patientenaufnahme bestimmt. Das TnI Stratus steigt in beiden Gruppen nach der ersten Abnahme weiter an und erreicht in der zweiten Abnahme ein Maximum (Tabelle 5). Zur dritten Abnahme sinken die Werte in beiden Gruppen (0,1), bleiben aber über dem Ausgangswert. In der Varianzanalyse der Gruppen insgesamt zeigte sich eine signifikante Differenz im Zeitverlauf ($p<0,01$). Der Unterschied der Werte über die Zeit innerhalb der Gruppen ist für Gruppe 1 ($p<0,01$) und Gruppe 0 ($p=0,002$) signifikant. Im Vergleich zwischen den Gruppen zum Zeitpunkt t1 ($p=0,266$), t2 ($p=0,093$) und t3 ($p=0,730$) gibt es keine signifikanten Unterschiede. In Abbildung 8 ist der TnI-Verlauf, gemessen im Stratus Gerät, zu den Abnahmezeitpunkten (t1, t2, t3) in den beiden Gruppen

dargestellt.

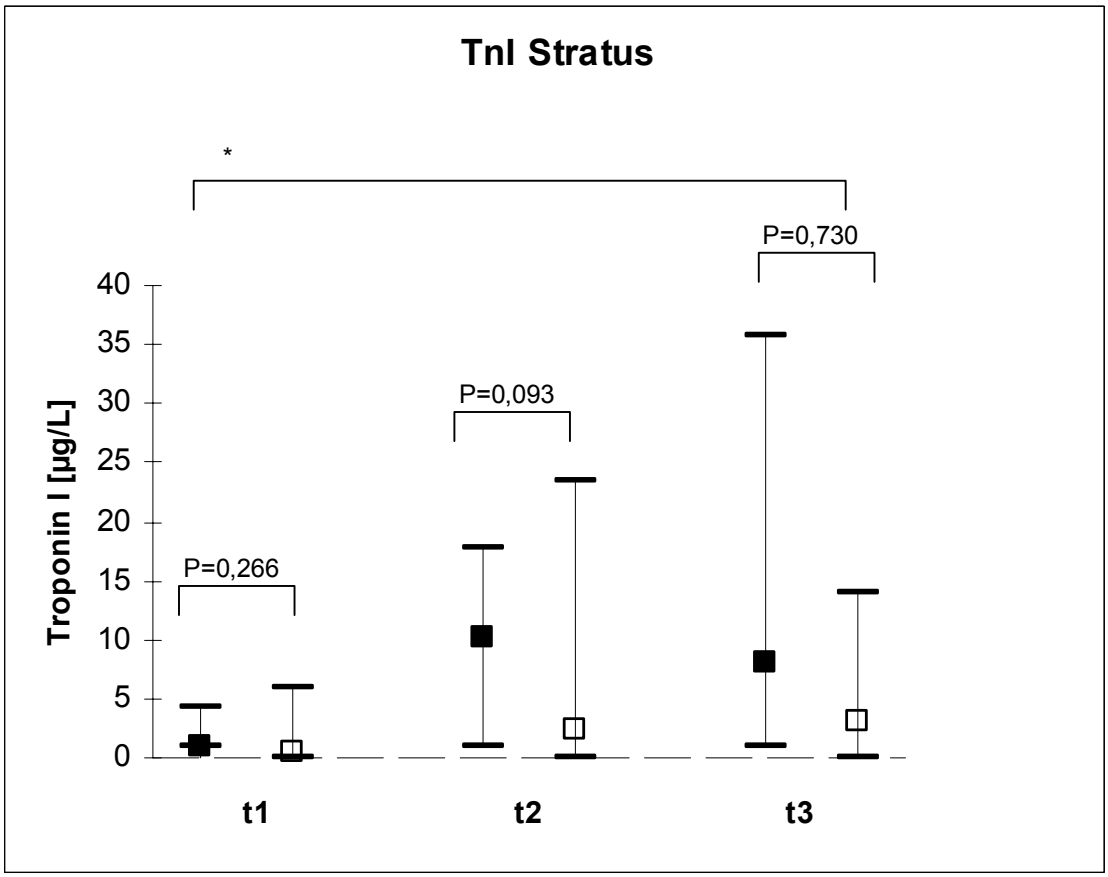


Abbildung 8: Verlauf TnI innerhalb der Gruppen (1= ■ (Gruppe mit zusätzlicher GPIIb/IIIa-Antagonisten Therapie); 0= □ (Gruppe ohne zusätzliche GPIIb/IIIa-Antagonisten Therapie)). Die Blutabnahme Zeitpunkte sind durch t1 (Aufnahme), t2 (4-6h) und t3 (12-24h) angegeben. Dargestellt sind Median mit Perzentilen (25;75), Ausreißer-Werte sind nicht dargestellt;* Verlauf über die Zeit innerhalb Gruppe 0 (p=0,002) und Gruppe 1 (p<0,01).

4.2.2 Verlauf von Myoglobin

Myoglobin wurde durch das Stratus-Gerät bestimmt. Es zeigte sich insgesamt ein Maximum der Werte zum Zeitpunkt t2. Bei der Analyse ergab sich insgesamt ein signifikanter Verlauf über die Zeit (p=0,0015). In der Einzelanalyse der Gruppen lag nur in Gruppe 0 ein signifikanter Unterschied vor (p=0,016). Der Verlauf der Werte innerhalb Gruppe 1 und zwischen den Gruppen zu den Abnahmen t1, t2 und t3 ergab keine signifikanten Unterschiede (Gruppe 1 p=0,062; t1 p=0,796, t2 p=0,266, t3 p=0,346). In Abbildung 9 ist der Myoglobin-Verlauf zu den Abnahmezeitpunkten (t1, t2, t3) in den beiden Gruppen dargestellt.

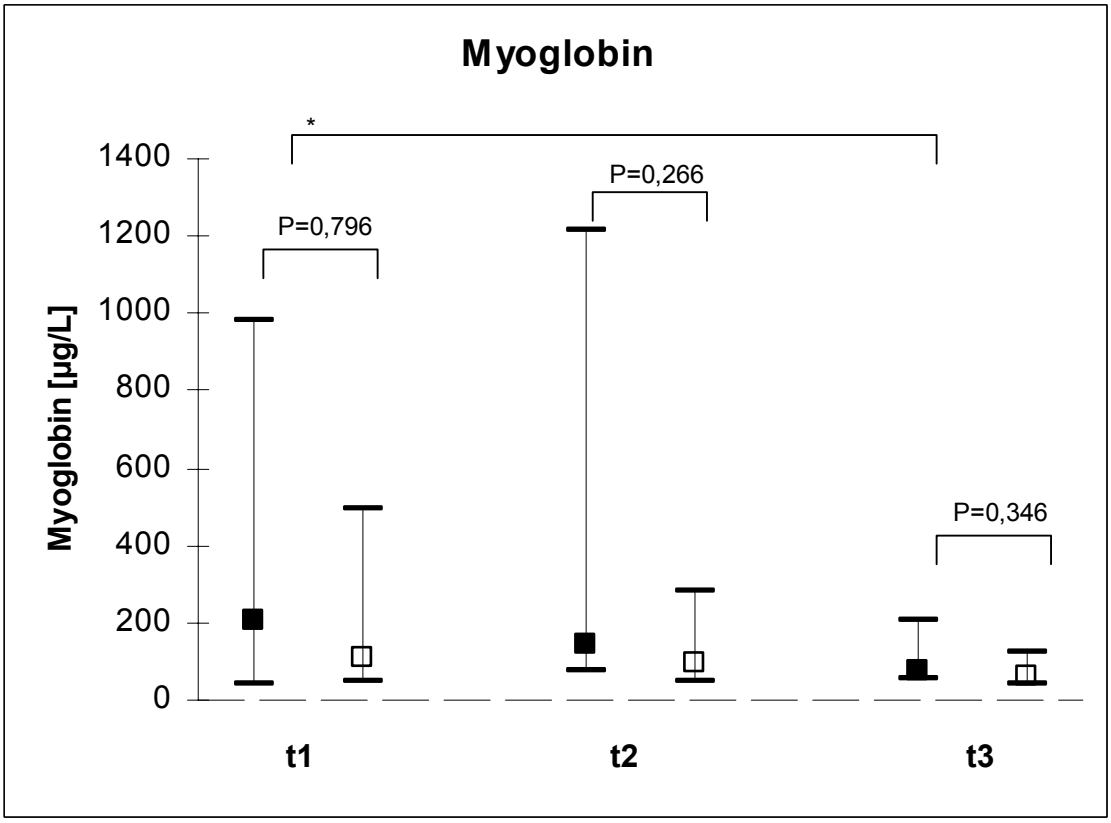


Abbildung 9: Verlauf Myoglobin innerhalb der Gruppen (1= ■ (Gruppe mit zusätzlicher GPIIb/IIIa-Antagonisten Therapie); 0= □ (Gruppe ohne zusätzliche GPIIb/IIIa-Antagonisten Therapie)). Die Blutabnahme Zeitpunkte sind durch t1 (Aufnahme), t2 (4-6h) und t3 (12-24h) angegeben. Dargestellt sind Median mit Perzentilen (25;75), Ausreißer-Werte sind nicht dargestellt;* Verlauf über die Zeit in Gruppe 0 (p=0,016) und Gruppe 1 (p nicht signifikant).

4.2.3 Verlauf der Kreatinkinase

Im Institut für klinische Chemie der Charite wurde die Kreatinkinase (CK) Masse (Isoenzym MB) bestimmt. Für die CK-MB-Masse konnte insgesamt ein signifikanter Verlauf über die Zeit berechnet werden (CK-MB-Masse p=0,0005). In der Berechnung der einzelnen Gruppen lag ein signifikanter Unterschied beider Gruppen vor (Gruppe 0 p=0,047; Gruppe 1 p=0,002). Der statistische Vergleich zwischen den Gruppen zum Zeitpunkt t1, t2 und t3 fiel auch negativ aus (CK-MB-Masse: t1 p=0,179, t2 p=0,215, t3 p=0,684). In Abbildung 7 ist der CK-MB Masse-Verlauf zu den Abnahmezeitpunkten (t1, t2, t3) in den beiden Gruppen dargestellt.

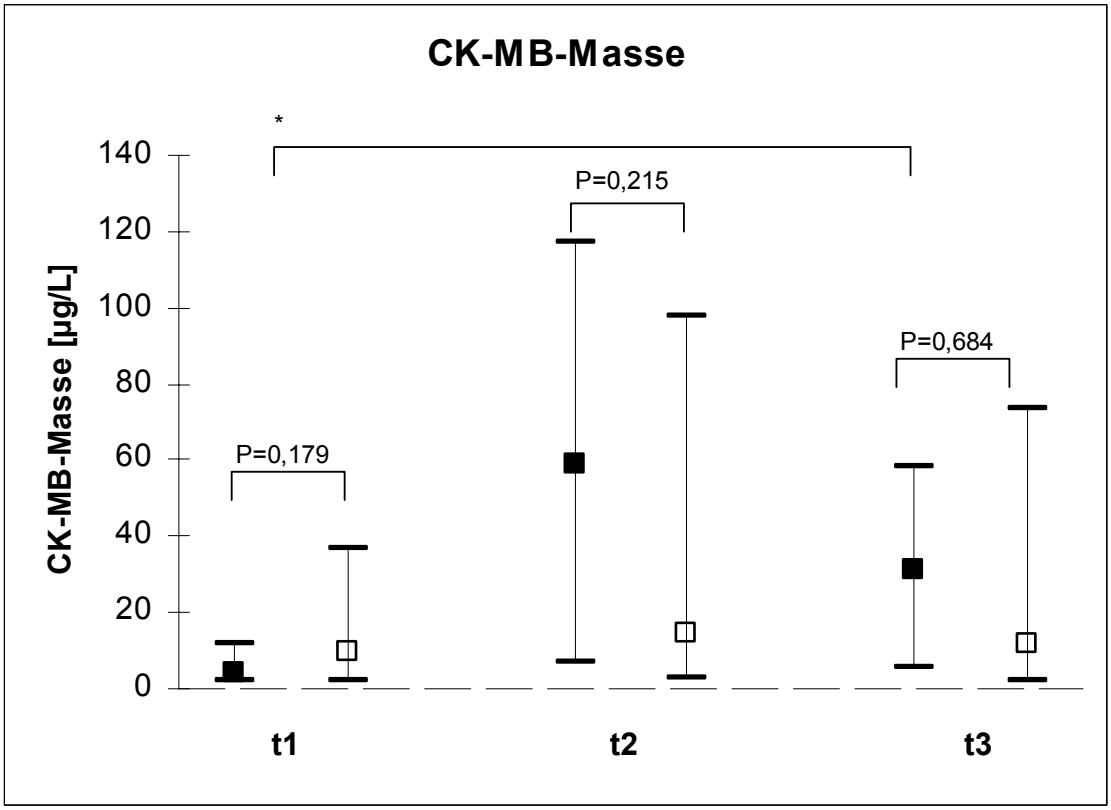


Abbildung 10: Verlauf CK-MB Masse innerhalb der Gruppen (1= ■ (Gruppe mit zusätzlicher GPIIb/IIIa-Antagonisten Therapie); 0= □ (Gruppe ohne zusätzliche GPIIb/IIIa-Antagonisten Therapie)). Die Blutabnahme Zeitpunkte sind durch t1 (Aufnahme), t2 (4-6h) und t3 (12-24h) angegeben. Dargestellt sind Median mit Perzentilen (25;75), Ausreißer-Werte sind nicht dargestellt; * Verlauf über die Zeit in Gruppe 0 (p=0,047) und Gruppe 1 (p=0,002).

4.3 WBCHO-Verlauf

Es wurde der Verlauf der WBCHO-Konzentration über die Zeit (Blutabnahme t1 bis t3) innerhalb der Gruppen 1 und 0 verglichen und der Gesamtverlauf analysiert. Insgesamt lag ein signifikanter Verlauf über die Zeit vor (p=0,00029). Im Vergleich zeigte sich innerhalb der Gruppe 1 eine signifikante Differenz der WBCHO-Konzentration über die Zeit (p=0,006). In der Gruppe 0 konnte hingegen im Verlauf der WBCHO-Konzentration kein signifikanter Unterschied ermittelt werden (p=0,174). Ebenfalls statistisch nicht signifikant war die Differenz zwischen beiden Gruppen zum Zeitpunkt der ersten Blutabnahme, t1, (p=0,163). Zu den Abnahmezeitpunkten t2 und t 3 unterscheiden sich die Gruppen signifikant (t2 p=0,039, t3 p=0,049). In Abbildung 11 ist der WBCHO-Verlauf zu den Abnahmezeitpunkten (t1, t2, t3) in den beiden Gruppen

dargestellt.

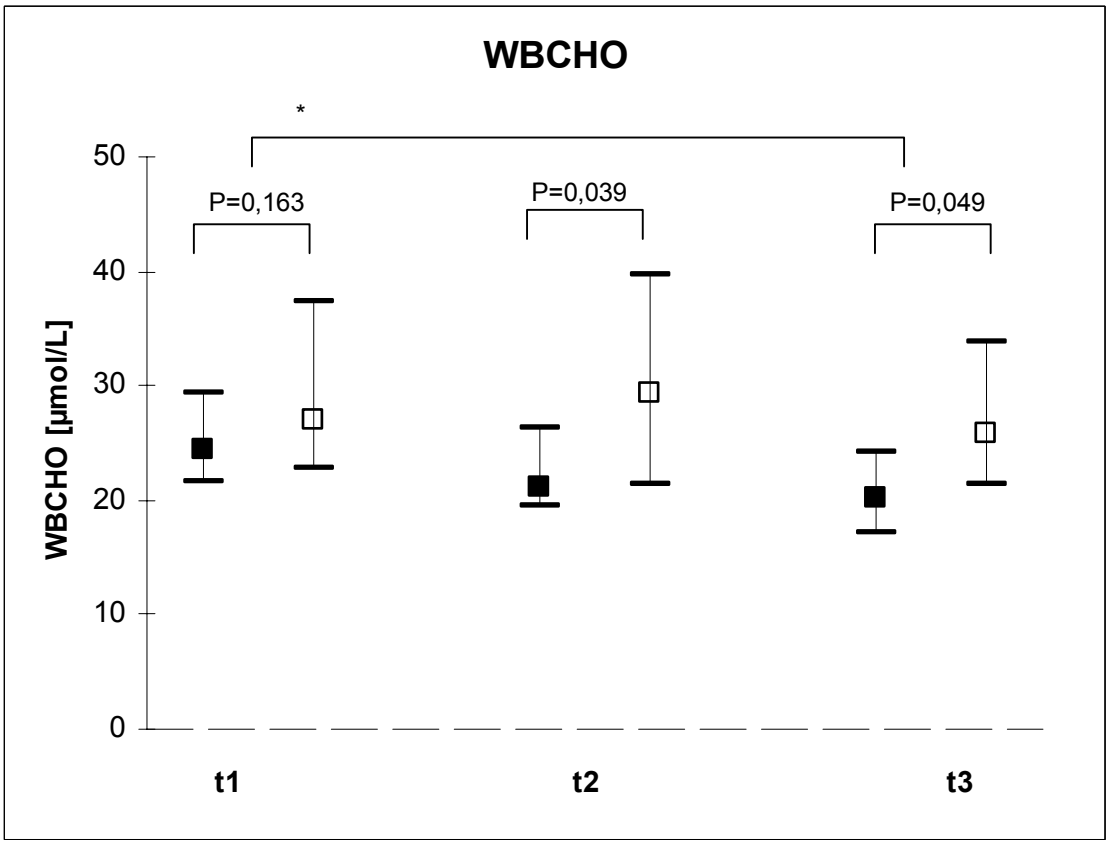


Abbildung 11: Verlauf WBCHO innerhalb der Gruppen (1= ■ (Gruppe mit zusätzlicher GPIIb/IIIa-Antagonisten Therapie); 0= □ (Gruppe ohne zusätzliche GPIIb/IIIa-Antagonisten Therapie)). Die Blutabnahme Zeitpunkte sind durch t1 (Aufnahme), t2 (4-6h) und t3 (12-24h) angegeben. Dargestellt sind Median mit Perzentilen (25;75), Ausreißer-Werte sind nicht dargestellt; * Verlauf über die Zeit in Gruppe 0 (p=0,174) und Gruppe 1 (p=0,006).

In Abbildung 12 wurden zum erleichterten Vergleich mit anderen Arbeiten die Mittelwerte der Gruppenanalysen zu den Abnahmezeitpunkten dargestellt.

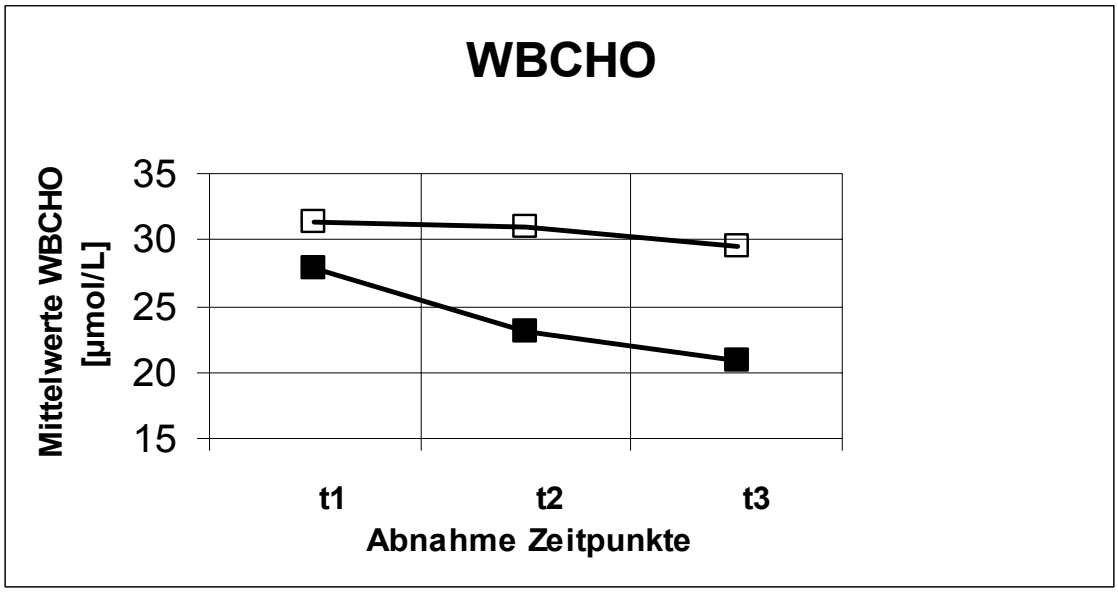


Abbildung 12: Verlauf WBCHO innerhalb der Gruppen (1= ■ (Gruppe mit zusätzlicher GPIIb/IIIa-Antagonisten Therapie); 0= □ (Gruppe ohne zusätzliche GPIIb/IIIa-Antagonisten Therapie)). Die Blutabnahme Zeitpunkte sind durch t1 (Aufnahme), t2 (4-6h) und t3 (12-24h) angegeben. Dargestellt sind Mittelwerte.

Abschließend werden in Tabelle 5 die biochemischen Marker zusammengefasst dargestellt.

Tabelle 5: Zusammenfassung der Marker.* Zentrallabor, ** Stratus. *** HPLC-MS, M (Median), P25 und P75 (Perzentile), [a] Darstellung der p-Werte der Gruppen 1 und 0 im zeitlichen Verlauf von t1 (Aufnahme), t2 (4-6h) und t3 (12-24h).

		Variablen			
		CK MB Masse * [µg/L]	Troponin I ** [µg/L]	Myoglobin ** [µg/L]	WBCHO *** [µmol/L]
Abnahme t1	Gruppe 1	4,13 (2,11/11,89)	0,20 (0,12/4,20)	204,50 (38,75/981,25)	24,36 (21,59/29,37)
	Gruppe 0	9,95 (2,36/36,81)	0,42 (0,28/5,97)	110,50 (45,00/491,75)	27,05 (22,88/37,39)
Abnahme t2	Gruppe 1	59,07 (6,60/117,12)	10,20 (2,04/17,67)	143,50 (78,25/1212,75)	21,20 (19,52/26,31)
	Gruppe 0	14,63 (2,84/97,86)	2,25 (0,37/23,11)	93,50 (48,75/281,25)	29,32 (21,33/39,63)
Abnahme t3	Gruppe 1	31,41 (7,79/58,53)	8,16 (3,37/35,84)	72,00 (41,50/140,00)	20,12 (17,25/24,07)
	Gruppe 0	11,84 (2,18/73,16)	3,14 (0,25/13,85)	62,00 (43,00/121,00)	25,77 (21,46/33,72)
	p-Wert [a]	p (1)=0,002 p (0)=0,047	p (1)<0,01 p (0)=0,002	p (1)=n.s. p (0)=0,016	p (1)=0,006 p(0)=n.s.

5 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob der Einsatz des GPIIb/IIIa-Antagonisten Tirofiban bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom einen Einfluss auf die Konzentration von Vollblut-Cholin, einem biochemischen Marker der Phospholipase-D-Aktivität, hat. Zusätzlich wurde eine mögliche Beeinflussung der Konzentrationen von Troponin, Myoglobin und Kreatinkinase-MB durch die Therapie untersucht.

5.1 Diskussion der Methode

In die vorliegende Arbeit wurden Patienten gemäß den Einschlusskriterien aufgenommen (siehe Kapitel 3.1.1). Das Studiendesign war retrospektiv. Das Studienkollektiv setzt sich zusammen aus Patienten, die zwischen August 1999 bis Oktober 2000 in der Rettungsstelle und der Intensivstation der Charité, Campus Virchow Klinikum, die Einschlusskriterien erfüllt haben. Insgesamt konnte nur eine geringe Fallzahl untersucht werden, da eine allgemeine Empfehlung für den Einsatz von GPIIb/IIIa-Antagonisten für Hochrisiko-Patienten mit akutem Koronarsyndrom durch die ESC erst mit den Guidelines 2003 erfolgte. Die statistischen Ergebnisse der Berechnungen der Gruppen von jeweils 16 Patienten könnten deshalb nur eine eingeschränkte Aussage haben.
Die Analyse der Proben und Messung der Cholin-Vollblut Konzentration erfolgte im eigenen Labor der Arbeitsgruppe mittels HPLC-MS. Die HPLC-MS-Analyse wurde anhand einer eigenen internen Standardarbeitsanweisung zur Bestimmung von Phosphorylcholin-Targetspezies in Blutplasma mit HPLC/MS und eines Labor internen Protokolls validiert und optimiert (siehe Kapitel 3.2.2). Durch die in die Analysephase integrierten Messungen von Kalibrations- und Qualitäts-Kontroll-Lösungen bekannter Konzentrationen (Kalibrations-Lösungen mit Konzentrationen 5, 50, 500 µmol/L und Lösungen zur Qualitätskontrolle 12,5, 125, 200, 400 µmol/L) konnte die Messgenauigkeit überprüft werden. Die Reproduzierbarkeit der Messungen wurde für die verschiedenen Kontroll-Lösungen gemäß Validierungsprotokoll geprüft. Zur Quantifizierung der Spezifität der Ergebnisse wurde eine mögliche Beeinflussung der Analyse durch Medikamente untersucht. Eine Abweichung der Ergebnisse hierdurch

konnte ausgeschlossen werden. Da bisher in keiner Arbeit Vollblut-Cholin bestimmt wurde, liegt hierzu kein Vergleichsmaterial vor.

Vollblut-Cholin ist ein komplementäres Spaltprodukt der Phospholipase D Reaktion, welche eine zentrale Bedeutung für die Signaltransduktion auf humoraler Ebene, besonders bei der Plättchen-Aggregation und Aktivierung, hat (siehe auch 1.6). Mit der Detektion von Vollblut-Cholin ist es möglich, indirekt auf die Aktivität der PLD zu schließen. Hierzu lassen sich zwei Hypothesen aufstellen:

1. erhöhte Cholin Konzentrationen sind Ausdruck einer Plaque Destabilisierung und
2. die Vollblut-Cholin Konzentration steigt in ischämischen Geweben bei hämodynamisch instabilen Patienten im Rahmen der inflammatorischen endothelialen Dysfunktion an.

Es wurde deshalb in dieser Arbeit untersucht, ob eine GPIIb/IIIa-Antagonisten Therapie bei Risiko-Patienten zu einer Beeinflussung der Vollblut-Cholin Konzentration führt („prove of concept“). Als möglicher Hinweis für die Effektivität der Therapie mit Tirofiban wurde eine Abnahme der Vollblut-Cholin Konzentration innerhalb der behandelten Gruppe gewertet. Zusätzlich wurde eine mögliche Beeinflussung der bekannten Standardmarker (Troponine, Kreatinkinase-MB und Myoglobin) durch die Tirofiban Therapie untersucht.

5.2 Diskussion der Ergebnisse

Die Troponine sind zurzeit die wichtigsten Markersubstanzen in der Risikoklassifizierung des akuten Koronarsyndroms und wurden in zahlreichen Studien bereits im Hinblick auf die Diagnostik des akuten Myokardinfarktes untersucht (siehe Kapitel 1.2.2.2). Prognostisch weißt ein erhöhter Troponin-Wert auf eine höhere kardiale Morbidität und Letalität hin. In verschiedenen Studien wurde retrospektiv ermittelt, das Troponin positive Patienten von einer Therapie mit einem GPIIb/IIIa-Antagonisten profitiert haben (PRISM, PRISM-PLUS)[30, 31]. Eine mögliche Beeinflussung der Serum Konzentration der Troponine als Reaktion auf die Therapie wurde hierbei aber nicht untersucht.

Der in dieser Arbeit festgestellte Verlauf der Troponine, innerhalb der

untersuchten Studienpopulation, gibt den entsprechend ihrer Freisetzungskinetik erwarteten und typischen Konzentrationsverlauf über die Zeit wieder. Zwischen den Gruppen 0 und 1 zeigte sich kein signifikant unterschiedlicher Verlauf. In dieser Arbeit hat der zusätzliche Einsatz von Tirofiban keinen Einfluss auf den Verlauf der Konzentration der Troponine (siehe Kapitel 4.2.1). Dies ergab auch die Analyse der Messungen von CK-MB und Myoglobin. Insgesamt kam es im Vergleich der Gruppen nicht zu einer statistisch signifikanten Beeinflussung der Plasma-Konzentration des jeweiligen Markers durch den Einsatz von Tirofiban. Die Konzentrationen von Kreatinkinase-MB und CK-MB Masse verlaufen gemäß ihrer Freisetzungskinetik mit einem erwarteten Maximum zum zweiten Abnahme Zeitpunkt (siehe Kapitel 4.2.3). Der Verlauf des Myoglobins zeigte insgesamt auch ein Maximum zum Zeitpunkt t2.

Bei den gemessenen Substanzen handelt es sich um Enzyme und Proteinkomplexe des intrazellulären Stoffwechsels. Voraussetzung eines Anstiegs der Plasmakonzentration dieser Substanzen ist eine Schädigung der jeweiligen Zelle und Zerstörung der Membran. Da keiner dieser Marker den Vorgang der Aktivierung von Plättchen und Leukozyten erfasst, lässt sich vermuten, dass diese deshalb auch vom Einsatz der GPIIb/IIIa-Antagonisten unbeeinflusst geblieben sind, da ihre Konzentration ausschließlich durch die bereits zugrunde gegangenen Zellen bestimmt wird. Für die Diagnostik sind diese Substanzen geeignet, da sie laut einer aktuellen Studie von Morrow et al., besonders in Kombination, eine hohe Sensitivität und Spezifität erreichen [3]. Dies gilt insbesondere für kardiales Troponin, welches auch zur Klassifizierung des Risikos des einzelnen Patienten geeignet und empfohlen ist. Die verzögerte Freisetzungskinetik dieser Substanzen und das dadurch zeitlich zum Ereignis versetzte späte Maximum im Serum sind für die Diagnostik in der Frühphase problematisch. Mit Myoglobin wurde ein relativ früh anzeigender Marker gefunden, der aber aufgrund geringer Sensitivität und Spezifität nicht als Einzelmarker in der Frühdiagnostik geeignet ist. Im Gegensatz dazu ist WBCHO eine Substanz, die sich in Freisetzungskinetik und Synthese-Ort stark von den Standardmarkern unterscheidet. WBCHO erreicht ein Maximum zum ersten Abnahmezeitpunkt (t1). Ein weiterer Anstieg wurde nicht beobachtet.

Hiermit liegt das Maximum zeitlich deutlich vor denen der anderen Marker. Hier könnte das Potential als möglicher Marker im Frühstadium des Akuten Koronarsyndroms und somit als zusätzliche Entscheidungshilfe zur Einleitung der optimalen Therapie liegen.

Die Plaque-Dynamik kann mit WBCHO relativ früh erfasst und bewertet werden. Dies geschieht zeitlich mehrere Stunden vor Detektion des Zelluntergangs und Freisetzung der bisher bekannten Marker. Der Abfall von WBCHO ist in der mit Tirofiban behandelten Gruppe (1) signifikant, im Gegensatz zur unbehandelten Gruppe (0), welche keinen signifikanten Abfall der WBCHO Konzentration aufweist. Daraus lässt sich ableiten, dass die Therapie mit Tirofiban möglicherweise den Verlauf der WBCHO-Konzentration beeinflusst. WBCHO könnte aus diesem Grund als Kontroll-Substanz während der Therapie mit Tirofiban eingesetzt werden, da das WBCHO den dynamischen Prozess und somit das Ausmaß der Plaque-Destabilisierung und Plättchenaktivierung anzeigt.

Eine weitere Möglichkeit wäre der Einsatz von WBCHO als Marker in der Frühphase der Entwicklung einer instabilen Plaque. Patienten mit unklarer klinischer Symptomatik oder vermeidlich stabiler Angina Pectoris könnten als ersten Hinweis auf eine Neu- oder Weiterentwicklung eines ACS ein erhöhtes WBCHO bei sonst noch unauffälligem biochemischen Labor aufweisen, da in diesem Stadium noch keine Zellen zerstört worden sind. Hiervon könnten auch Patienten mit asymptomatischen Stenosen und hoher Plaque-Dynamik profitieren. Da WBCHO als Signal-Molekül auch im Blut von gesunden Probanden nachweisbar ist, muss der Cut-off Punkt berücksichtigt werden. In Voruntersuchungen konnte gezeigt werden, dass gesunde Probanden eine individuelle WBCHO Konzentration haben, welche aber in einem sehr schmalen Intervall relativ konstant bleibt. WBCHO ist ebenfalls eine primär intrazelluläre Substanz, welche aber im Rahmen der Aktivierung der Thrombozyten vermehrt freigesetzt wird. Hierbei werden verschiedene Mechanismen vermutet. Die beiden wichtigsten sind zum einen Diffusion aufgrund eines Konzentrations-Gradienten an der Thrombozyten Membran, bedingt durch den intrazellulären Konzentrationsanstieg bei erhöhter Thrombozyten Aktivität. Zum anderen gibt es vermutlich auch aktive Membran-Transport-Proteine für Cholin, welche im

Rahmen der Aktivierung zu einem zusätzlichen Transport nach extrazellulär führen. Pathophysiologisch lässt sich eine Beeinflussung der WBCHO Konzentration durch GPIIb/IIIa-Antagonisten durch verschiedene Parameter vermuten. Wie unter 1.6.2 dargestellt, wird Cholin durch die intrazelluläre Phospholipase D Reaktion maßgeblich in Thrombozyten und Makrophagen freigesetzt[104]. Die PLD ist daher vermutlich an der Regulation des GPIIb/IIIa-Rezeptorkomplexes bei der Thrombozyten-Aktivierung beteiligt. Die WBCHO Konzentration ist somit abhängig von der PLD Aktivität und könnte im Umkehrschluss den Aktivierungszustand des thrombozytären Systems anzeigen. Eine wichtige Frage ist, in wie weit diese Ergebnisse bei der Auswahl und Beantwortung der Frage helfen können, welche Patienten vom Einsatz eines GPIIb/IIIa-Antagonisten profitieren.

Es wird zurzeit kontrovers diskutiert, welche Patienten mit akutem Koronarsyndrom mit einem GPIIb/IIIa-Antagonisten behandelt werden sollten und ob im Rahmen dieser Therapie zusätzlich invasiv, mittels Herzkatheter, oder nur konservativ behandelt werden sollte. Die aktuellen Richtlinien der AHA empfehlen den Einsatz von GPIIb/IIIa-Antagonisten wie bereits dargestellt für Risiko Patienten mit ACS ohne ST-Hebung im EKG[1]. Diese Patienten sind meistens mit Aspirin und Heparin vorbehandelt und sollen einer Herzkatheter-Intervention unterzogen werden.

Ebenfalls empfohlen sind GPIIb/IIIa-Antagonisten für ACS Patienten, wenn bei diesen der Troponin T oder Troponin I Test positiv ist, eine kontinuierliche Ischämie vorliegt oder andere Hochrisiko Faktoren. In einer aktuellen Publikation wurde der CD40 Ligand als möglicher Marker für die frühe Therapieentscheidung mit GPIIb/IIIa-Antagonisten und seine mögliche Prognostische Aussagekraft evaluiert [61]. Bei Patienten mit einem Anstieg des CD40L im Serum führte eine GPIIb/IIIa-Antagonisten Therapie zu einer signifikanten Reduktion der primären Endpunkte. Da es aber auch bei Tumor Erkrankungen und chronisch entzündlichen Erkrankungen zur erhöhten Expression von CD40 und Sekretion von CD40L kommt, erscheint das CD40L Molekül nicht zur alleinigen Therapieentscheidung und Selektion der Patienten für eine GPIIb/IIIa-Antagonisten Therapie geeignet (siehe auch Kapitel 1.2.2.4).

Der therapeutische Nutzen von GPIIb/IIIa-Antagonisten scheint in der

Frühphase, bei hoher Aktivität der Thrombozyten, am größten. Diese Hochrisiko Patienten sollten deshalb schon in dieser Phase mit GPIIb/IIIa-Antagonisten behandelt werden. Die Identifizierung und korrekte Klassifizierung nach individuellem Risiko des Patienten in der Frühphase könnte ein erweitertes, zeitlich nah am Ereignis liegendes Einsatzgebiet der GPIIb/IIIa-Antagonisten aufdecken. Dass die Bestimmung von Surrogat-Markern, wie den Troponinen, bei dieser Entscheidung nur bedingt helfen kann, zeigte sich in der GUSTO-IV-ACS Studie, wo Troponin positive Patienten nicht von der Abciximab Therapie profitieren konnten[35].

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass eine Beeinflussung von WBCHO durch GPIIb/IIIa-Antagonisten möglich ist. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass WBCHO in der Frühphase des ACS anderen Substanzen aufgrund eines früh detektierbaren Maximums überlegen ist. In weiteren Studien muss geklärt werden, ob die Aussagekraft von WBCHO in Kombination mit anderen Substanzen erhöht werden kann. Eine Beeinflussung der Konzentration der Standardmarker Troponin, Myoglobin und Kreatinkinase durch den Einsatz der GPIIb/IIIa-Antagonistentherapie gab es in dieser Arbeit nicht.

Zusammenfassend lässt sich vermuten, dass es sich bei WBCHO um einen Marker zur Klassifikation von ACS Risikopatienten handelt. Um möglichst in der Frühphase des ACS eine Therapie einleiten zu können, erscheint die frühe Freisetzung von WBCHO eine weitere Möglichkeit zur Detektion und zum Monitoring der ACS Patienten in der Frühphase zu eröffnen. Im Hinblick auf therapeutische Maßnahmen muss in weiteren Studien belegt werden, ob diese zu einer Beeinflussung der WBCHO Konzentration im Verlauf führen und somit den Therapieerfolg anzeigen könnten. Weiterhin muss die WBCHO Konzentration im Hinblick auf Ihre Beeinflussung durch eine PTCA untersucht werden und die Frage geklärt werden, in wie weit andere GPIIb/IIIa-Antagonisten, neben Tirofiban, die WBCHO Konzentration bei Patienten mit ACS beeinflussen. Für die Zukunft könnte der Einsatz von WBCHO als Frühmarker bei Hochrisiko ACS Patienten zu eine frühen Einleitung mit einem GPIIb/IIIa-Antagonisten und unter Umständen zur Reduktion von invasiven Therapien führen. Zusätzlich scheint ein Monitoring bei der Therapie mit GPIIb/IIIa-Antagonisten durch die WBCHO-Konzentration möglich.

6 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Verlauf des Phospholipase D Metaboliten Cholin bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom untersucht. Besonders berücksichtigt wurde hierbei die Therapie mit dem GPIIb/IIIa-Antagonisten Tirofiban.

Beim akuten Koronarsyndrom stehen nach den aktuellen Richtlinien der AHA, ACC und der ESC die instabile Angina Pectoris, der Nicht-ST-Hebungsinfarkt und der ST-Hebungsinfarkt im Vordergrund. Für die Diagnostik mit biochemischen Markern werden in erster Linie Troponin I und T, Kreatinkinase-MB und Myoglobin empfohlen. Für diese Patientengruppe ist ein Marker, der aufgrund hoher Sensitivität, Spezifität und durch eine frühe Freisetzungskinetik geeignet ist, Patienten in der Frühphase des Akuten Koronarsyndroms zu detektieren, im Sinne einer frühen Therapieeinleitung, besonders wichtig. Eine zentrale Bedeutung für das akute Koronarsyndrom hat unter anderem die atherosklerotische Plaque, bei deren Destabilisierung die Phospholipase D eine Schlüsselfunktion hat. Die Detektion von Cholin im Blut, ein komplementäres Spaltprodukt der PLD Reaktion, ermöglicht es, indirekt auf die Aktivität der PLD zu schließen. Hieraus lassen sich zwei Hypothesen aufstellen:

1. erhöhte Cholin Konzentration sind Ausdruck einer Plaque Destabilisation und
2. die Vollblut-Cholin (WBCHO) Konzentration steigt in ischämischen Geweben bei hämodynamisch instabilen Patienten im Rahmen der inflammatorischen, endothelialen Dysfunktion an.

Ziel der Arbeit war es, zu klären, ob der Einsatz des GPIIb/IIIa-Antagonisten Tirofiban zu einer Beeinflussung der Cholin- und Standardmarker-Konzentration im Blut führt.

Zur Messung von WBCHO wurde die Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie in Verbindung mit der Elektrospray-Massenspektrometrie verwendet (HPLC-ESI-MS). Es wurden 342 Patienten in die Studie eingeschlossen. Aus diesem Kollektiv wurden retrospektiv 32 Patienten mit akutem Koronarsyndrom in diese Arbeit aufgenommen, in zwei Gruppen mit jeweils 16 Patienten mittels „matched pairs“-Technik unterteilt und

analysiert. Eine Gruppe erhielt zusätzlich zur Standard-Therapie Tirofiban. Es wurden Blutabnahmen bei Aufnahme, nach 4-6 Stunden und nach 12-24 Stunden gewonnen und weiterhin ein 30 Tage und 12 Monate Follow-up durchgeführt. Es gab einen signifikanten Verlauf der WBCHO-Konzentration (p= 0,006) in der mit Tirofiban behandelten Gruppe im Gegensatz zur Gruppe die nur die Standardtherapie erhielt (p= 0,174). Es gab keine signifikanten Veränderungen in den Konzentrationen der Standardmarker im Zusammenhang mit der Tirofiban Therapie. Im Vergleich zu Troponin I und T, Myoglobin und Kreatinkinase hatte WBCHO das zeitlich früheste Konzentrations-Maximum. Hier könnte das Potential als möglicher Marker im Frühstadium des ACS und somit als zusätzliche Entscheidungshilfe zur Einleitung der optimalen Therapie liegen. Die Plaque-Dynamik kann mit WBCHO relativ früh erfasst und bewertet werden. Dies geschieht zeitlich mehrere Stunden vor Detektion des Zelluntergangs und Freisetzung der bisher bekannten Marker.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass eine Beeinflussung von WBCHO durch GPIIb/IIIa-Antagonisten möglich ist. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass Vollblut-Cholin in der Frühphase des Akuten Koronarsyndroms anderen Substanzen aufgrund eines früh detektierbaren Konzentrations-Maximums überlegen ist. Eine Beeinflussung der Konzentration der Standardmarker Troponin, Myoglobin und Kreatinkinase durch den Einsatz der GPIIb/IIIa-Antagonistentherapie gab es in dieser Arbeit nicht.

Abschließend lässt sich vermuten, dass es sich bei WBCHO um einen Marker zur Klassifikation von ACS Risikopatienten handelt. Um möglichst in der Frühphase des Akuten Koronarsyndroms eine Therapie einleiten zu können, erscheint die frühe Freisetzung von Vollblut-Cholin eine weitere Möglichkeit in der Diagnostik von ischämischen Myokardveränderungen zu eröffnen.

Literaturverzeichnis

[1] Braunwald, E.; Antman, E. M.; Beasley, J. W.; Califf, R. M.; Cheitlin, M. D.; Hochman, J. S.; Jones, R. H.; Kereiakes, D.; Kupersmith, J.; Levin, T. N.; Pepine, C. J.; Schaeffer, J. W.; Smith, E. E., III; Steward, D. E.; Theroux, P.; Gibbons, R. J.; Alpert, J. S.; Faxon, D. P.; Fuster, V.; Gregoratos, G.; Hiratzka, L. F.; Jacobs, A. K. und Smith, S. C., Jr. (2002): ACC/AHA 2002 guideline update for the management of patients with unstable angina and non-ST-segment elevation myocardial infarction-- summary article: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association task force on practice guidelines (Committee on the Management of Patients With Unstable Angina), J.Am.Coll.Cardiol. (Band 40), Nr. 7, Seite 1366-1374. URL: PM:12383588

[2] Braunwald, E.; Antman, E. M.; Beasley, J. W.; Califf, R. M.; Cheitlin, M. D.; Hochman, J. S.; Jones, R. H.; Kereiakes, D.; Kupersmith, J.; Levin, T. N.; Pepine, C. J.; Schaeffer, J. W.; Smith, E. E., III; Steward, D. E.; Theroux, P.; Gibbons, R. J.; Alpert, J. S.; Eagle, K. A.; Faxon, D. P.; Fuster, V.; Gardner, T. J.; Gregoratos, G.; Russell, R. O. und Smith, S. C., Jr. (2000): ACC/AHA guidelines for the management of patients with unstable angina and non-ST-segment elevation myocardial infarction: executive summary and recommendations. A report of the American College of Cardiology/American Heart Association task force on practice guidelines (committee on the management of patients with unstable angina), Circulation (Band 102), Nr. 10, Seite 1193-1209. URL: PM:10973852

[3] Morrow, D. A. and Braunwald, E. (2003):Future of Biomarkers in Acute Coronary Syndromes: Moving Toward a Multimarker Strategy

[4] Kaponov, K. H.; Penkov, N.; Rachev, S.; Zlateva, Z. und Iordanov, K. (1975): [Quantitative prognosis in acute myocardial infarct; the efficiency of the Peel index and its modificantion with 398 patients], Vutr.Boles. (Band 14), Nr. 4, Seite 90-94. URL: PM:1224602

[5] Christiansen, J. P. und Liang, C. S. (1999): Reappraisal of the Norris score and the prognostic value of left ventricular ejection fraction measurement for in-hospital mortality after acute myocardial infarction, Am.J.Cardiol. (Band 83), Nr. 4, Seite 589-91, A8. URL: PM:10073867

[6] Launbjerg, J.; Berning, J.; Fruergaard, P.; Eliasen, P.; Borch-Johnsen, K.; Eiken, P. und Appleyard, M. (1992): Risk stratification after acute myocardial infarction by means of echocardiographic wall motion scoring and Killip classification, Cardiology (Band 80), Nr. 5-6, Seite 375-381. URL: PM:1451125

[7] DeGeare, V. S.; Boura, J. A.; Grines, L. L.; O'Neill, W. W. und Grines, C. L. (2001): Predictive value of the Killip classification in patients undergoing primary percutaneous coronary intervention for acute myocardial infarction, Am.J.Cardiol. (Band 87), Nr. 9, Seite 1035-1038. URL: PM:11348598

[8] van Miltenburg-van Zijl AJ; Simoons, M. L.; Veerhoek, R. J. und Bossuyt, P. M. (1995):

Incidence and follow-up of Braunwald subgroups in unstable angina pectoris, J.Am.Coll.Cardiol. (Band 25), Nr. 6, Seite 1286-1292. URL: PM:7722122

[9] Hamm, C. W. und Braunwald, E. (2000): A Classification of Unstable Angina Revisited, Circulation (Band 102), Seite 118-122.

[10] Morrow, D. A.; Antman, E. M.; Parsons, L.; de Lemos, J. A.; Cannon, C. P.; Giugliano, R. P.; McCabe, C. H.; Barron, H. V. und Braunwald, E. (2001): Application of the TIMI risk score for ST-elevation MI in the National Registry of Myocardial Infarction 3, JAMA (Band 286), Nr. 11, Seite 1356-1359. URL: PM:11560541

[11] Morrow, D. A.; Antman, E. M.; Charlesworth, A.; Cairns, R.; Murphy, S. A.; de Lemos, J. A.; Giugliano, R. P.; McCabe, C. H. und Braunwald, E. (2000): TIMI risk score for ST-elevation myocardial infarction: A convenient, bedside, clinical score for risk assessment at presentation: An intravenous nPA for treatment of infarcting myocardium early II trial substudy, Circulation (Band 102), Nr. 17, Seite 2031-2037. URL: PM:11044416

[12] Farkouh, M. E.; Smars, P. A.; Reeder, G. S.; Zinsmeister, A. R.; Evans, R. W.; Meloy, T. D.; Kopecky, S. L.; Allen, M.; Allison, T. G.; Gibbons, R. J. und Gabriel, S. E. (1998): A clinical trial of a chest-pain observation unit for patients with unstable angina. Chest Pain Evaluation in the Emergency Room (CHEER) Investigators, N.Engl.J.Med. (Band 339), Nr. 26, Seite 1882-1888. URL: PM:9862943

[13] Sardella, F.; Checchini, M.; Pierini, A.; Riglietti, G. F.; Fenaroli, F.; Negrini, M.; Serpico, S.; Rovey, R. und Omboni, E. (1995): [Chest pain similar to angina. Identification of patients at risk of developing acute coronary failure], Ann.Ital.Med.Int. (Band 10), Nr. 2, Seite 119-124. URL: PM:7619651

[14] Ravkilde, J. (1998): Creatine kinase isoenzyme MB mass, cardiac troponin T, and myosin light chain isotype 1 as serological markers of myocardial injury and their prognostic importance in acute coronary syndrome, Dan.Med.Bull. (Band 45), Nr. 1, Seite 34-50.

[15] Savonitto, S.; Granger, C. B.; Ardissino, D.; Gardner, L.; Cavallini, C.; Galvani, M.; Ottani, F.; White, H. D.; Armstrong, P. W.; Ohman, E. M.; Pieper, K. S.; Califf, R. M. und Topol, E. J. (2002): The prognostic value of creatine kinase elevations extends across the whole spectrum of acute coronary syndromes, J.Am.Coll.Cardiol. (Band 39), Nr. 1, Seite 22-29. URL: PM:11755282

[16] Störk, T.; Wu, A. H.; Müller-Bardorff, M.; Gareis, R.; Müller, R.; Hombach, V.; Katus, H. und Möckel, M. (2000): Diagnostic and prognostic role of myoglobin in patients with suspected acute coronary syndrome. North-Württemberg Infarction Study (NOWIS) Group, Am.J.Cardiol. (Band 86), Nr. 12, Seite 1371-4, A5. URL: PM:11113416

[17] Möckel, M.; Gerhardt, W.; Heller, G., Jr.; Klefisch, F.; Danne, O.; Maske, J.; Müller, C.; Störk, T.; Frei, U. und Wu, A. H. (2001): Validation of NACB and IFCC guidelines for the use of cardiac markers for early diagnosis and risk assessment in patients with acute coronary syndromes, Clin.Chim.Acta (Band 303), Nr. 1-2, Seite 167-179. URL: PM:11163037

[18] Möckel, M.; Störk, T.; Heller, G., Jr.; Röcker, L.; Danne, O.; Darrelmann, K. G.; Eichstädt,

H. und Frei, U. (1998): Troponin T in patients with low grade or atypical angina. Identification of a high risk group for short- and long-term cardiovascular events, Eur.Heart J. (Band 19), Nr. 12, Seite 1802-1807. URL: PM:9886722

[19] Tanasijevic, M. J.; Cannon, C. P. und Antman, E. M. (1999): The role of cardiac troponin-I (cTnI) in risk stratification of patients with unstable coronary artery disease, Clin.Cardiol. (Band 22), Nr. 1, Seite 13-16. URL: PM:9929748

[20] Newby, L. K.; Christenson, R. H.; Ohman, E. M.; Armstrong, P. W.; Thompson, T. D.; Lee, K. L.; Hamm, C. W.; Katus, H. A.; Cianciolo, C.; Granger, C. B.; Topol, E. J. und Califf, R. M. (1998): Value of serial troponin T measures for early and late risk stratification in patients with acute coronary syndromes. The GUSTO-IIa Investigators, Circulation (Band 98), Nr. 18, Seite 1853-1859. URL: PM:9799204

[21] de Winter, R. J.; Fischer, J.; Bholasingh, R.; van Straalen, J. P.; de Jong, T.; Tijssen, J. G. und Sanders, G. T. (2000): C-Reactive protein and cardiac troponin T in risk stratification: differences in optimal timing of tests early after the onset of chest pain, Clin.Chem. (Band 46), Nr. 10, Seite 1597-1603. URL: PM:11017937

[22] Jaffe, A. S.; Ravkilde, J.; Roberts, R.; Naslund, U.; Apple, F. S.; Galvani, M. und Katus, H. (2000): It's time for a change to a troponin standard, Circulation (Band 102), Nr. 11, Seite 1216-1220. URL: PM:10982533

[23] Hamm, C. W.; Heeschen, C.; Goldmann, B.; Vahanian, A.; Adgey, J.; Miguel, C. M.; Rutsch, W.; Berger, J.; Kootstra, J. und Simoons, M. L. (1999): Benefit of abciximab in patients with refractory unstable angina in relation to serum troponin T levels. c7E3 Fab Antiplatelet Therapy in Unstable Refractory Angina (CAPTURE) Study Investigators, N.Engl.J.Med. (Band 340), Nr. 21, Seite 1623-1629. URL: PM:10341274

[24] The EPISTENT Investigators (1998): Randomised placebo-controlled and balloon-angioplasty-controlled trial to assess safety of coronary stenting with use of platelet glycoprotein- IIb/IIIa blockade. Evaluation of Platelet IIb/IIIa Inhibitor for Stenting, Lancet (Band 352), Nr. 9122, Seite 87-92. URL: PM:9672272

[25] The EPIC Investigation (1994): Use of a monoclonal antibody directed against the platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor in high-risk coronary angioplasty., N.Engl.J.Med. (Band 330), Nr. 14, Seite 956-961. URL: PM:8121459

[26] The EPILOG Investigators (1997): Platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor blockade and low-dose heparin during percutaneous coronary revascularization., N.Engl.J.Med. (Band 336), Nr. 24, Seite 1689-1696. URL: PM:9182212

[27] Brener, S. J.; Barr, L. A.; Burchenal, J. E.; Katz, S.; George, B. S.; Jones, A. A.; Cohen, E. D.; Gainey, P. C.; White, H. J.; Cheek, H. B.; Moses, J. W.; Moliterno, D. J.; Effron, M. B. und Topol, E. J. (1998): Randomized, placebo-controlled trial of platelet glycoprotein IIb/IIIa blockade with primary angioplasty for acute myocardial infarction. ReoPro and Primary PTCA Organization and Randomized Trial (RAPPORT) Investigators, Circulation (Band 98), Nr. 8, Seite 734-741. URL: PM:9727542

[28] The Impact-II Investigators (1997): Randomised placebo-controlled trial of effect of eptifibatide on complications of percutaneous coronary intervention: IMPACT-II. Integrilin to Minimise Platelet Aggregation and Coronary Thrombosis-II, Lancet (Band 349), Nr. 9063, Seite 1422-1428. URL: PM:9164315

[29] The PURSUIT Trial Investigators (1998): Inhibition of platelet glycoprotein IIb/IIIa with eptifibatide in patients with acute coronary syndromes. Platelet Glycoprotein IIb/IIIa in Unstable Angina: Receptor Suppression Using Integrilin Therapy, N.Engl.J.Med. (Band 339), Nr. 7, Seite 436-443. URL: PM:9705684

[30] The PRISM Investigators (1998): A comparison of aspirin plus tirofiban with aspirin plus heparin for unstable angina. Platelet Receptor Inhibition in Ischemic Syndrome Management (PRISM) Study Investigators, N.Engl.J.Med. (Band 338), Nr. 21, Seite 1498-1505. URL: PM:9599104

[31] The PRISM-PLUS Investigators (1998): Inhibition of the platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor with tirofiban in unstable angina and non-Q-wave myocardial infarction. Platelet Receptor Inhibition in Ischemic Syndrome Management in Patients Limited by Unstable Signs and Symptoms (PRISM-PLUS) Study Investigators, N.Engl.J.Med. (Band 338), Nr. 21, Seite 1488-1497. URL: PM:9599103

[32] The 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. Randomized Efficacy Study of Tirofiban for Outcomes and REstenosis, Circulation (Band 96), Nr. 5, Seite 1445-1453. URL: PM:9315530

[33] Januzzi, J. L.; Chae, C. U.; Sabatine, M. S. und Jang, I. K. (2001): Elevation in serum troponin I predicts the benefit of tirofiban, J.Thromb.Thrombolysis. (Band 11), Nr. 3, Seite 211-215. URL: PM:11577259

[34] White, J. G.; Burris, S. und Smith, C. M. (1995): Relationship of actin filament assembly to clearance of fibrinogen gold, GPIIb-IIIa complexes on spread platelets, Eur.J.Clin.Invest (Band 25), Nr. 4, Seite 241-249. URL: PM:7541361

[35] Ottervanger, J. P.; Armstrong, P.; Barnathan, E. S.; Boersma, E.; Cooper, J. S.; Ohman, E. M.; James, S.; Topol, E.; Wallentin, L. und Simoons, M. L. (2003): Long-term results after the glycoprotein IIb/IIIa inhibitor abciximab in unstable angina: one-year survival in the GUSTO IV-ACS (Global Use of Strategies To Open Occluded Coronary Arteries IV--Acute Coronary Syndrome) Trial, Circulation (Band 107), Nr. 3, Seite 437-442. URL: PM:12551868

[36] Simoons, M. L. (2001): Effect of glycoprotein IIb/IIIa receptor blocker abciximab on outcome in patients with acute coronary syndromes without early coronary revascularisation: the GUSTO IV-ACS randomised trial, Lancet (Band 357), Nr. 9272, Seite 1915-1924. URL: PM:11425411

[37] Cannon, C. P.; Weintraub, W. S.; Demopoulos, L. A.; Robertson, D. H.; Gormley, G. J. und Braunwald, E. (1998): Invasive versus conservative strategies in unstable angina and non-Q-wave myocardial infarction following treatment with tirofiban: rationale and study design of the international TACTICS-TIMI 18 Trial. Treat Angina with Aggrastat and determine Cost of

Therapy with an Invasive or Conservative Strategy. Thrombolysis In Myocardial Infarction, Am.J.Cardiol. (Band 82), Nr. 6, Seite 731-736. URL: PM:9761082

[38] Möckel, M.; Heller, G., Jr.; Müller, C.; Klefisch, F. R.; Riehle, M.; Searle, J.; Frei, U. und Störk, T. (2000): [C-reactive protein as an independent marker of prognosis in acute coronary syndrome: comparison with troponin T], Z.Kardiol. (Band 89), Nr. 8, Seite 658-666. URL: PM:11013970

[39] Ridker, P. M.; Buring, J. E.; Shih, J.; Matias, M. und Hennekens, C. H. (1998): Prospective study of C-reactive protein and the risk of future cardiovascular events among apparently healthy women, Circulation (Band 98), Nr. 8, Seite 731-733. URL: PM:9727541

[40] Ridker, P. M.; Rifai, N.; Rose, L.; Buring, J. E. und Cook, N. R. (2002): Comparison of C-reactive protein and low-density lipoprotein cholesterol levels in the prediction of first cardiovascular events, N.Engl.J.Med. (Band 347), Nr. 20, Seite 1557-1565. URL: PM:12432042

[41] Heeschen, C.; Hamm, C. W.; Bruemmer, J. und Simoons, M. L. (2000): Predictive value of C-reactive protein and troponin T in patients with unstable angina: a comparative analysis. CAPTURE Investigators. Chimeric c7E3 AntiPlatelet Therapy in Unstable angina REfractory to standard treatment trial, J.Am.Coll.Cardiol. (Band 35), Nr. 6, Seite 1535-1542. URL: PM:10807457

[42] Andrie, R.; Maylahn, M.; Braun, P.; Luderitz, B. und Bauriedel, G. (2002): [C-reactive protein in coronary plaques - Prevalence with acute coronary syndrome], Z.Kardiol. (Band 91), Nr. 11, Seite 913-920. URL: PM:12442194

[43] Ridker, P. M.; Rifai, N.; Clearfield, M.; Downs, J. R.; Weis, S. E.; Miles, J. S. und Gotto, A. M., Jr. (2001): Measurement of C-reactive protein for the targeting of statin therapy in the primary prevention of acute coronary events, N.Engl.J.Med. (Band 344), Nr. 26, Seite 1959-1965. URL: PM:11430324

[44] Schwartz, Gregory G.; Olsson, Andersen G.; and Ezekowitz, Michael D. (2001):Effects of Atorvastatin on Early Recurrent Ischemic Events in Acute Coronary Syndromes

[45] Lenderink, T.; Boersma, E.; Heeschen, C.; Vahanian, A.; de Boer, M. J.; Umans, V.; van den Brand, M. J.; Hamm, C. W. und Simoons, M. L. (2003): Elevated troponin T and C-reactive protein predict impaired outcome for 4 years in patients with refractory unstable angina, and troponin T predicts benefit of treatment with abciximab in combination with PTCA, Eur.Heart J. (Band 24), Nr. 1, Seite 77-85. URL: PM:12559939

[46] de Lemos, J. A. und Morrow, D. A. (2002): Brain natriuretic peptide measurement in acute coronary syndromes: ready for clinical application?, Circulation (Band 106), Nr. 23, Seite 2868-2870. URL: PM:12460861

[47] de Lemos, J. A.; Morrow, D. A.; Bentley, J. H.; Omland, T.; Sabatine, M. S.; McCabe, C. H.; Hall, C.; Cannon, C. P. und Braunwald, E. (2001): The prognostic value of B-type natriuretic peptide in patients with acute coronary syndromes, N.Engl.J.Med. (Band 345), Nr. 14, Seite 1014-1021. URL: PM:11586953

[48] Omland, T.; Persson, A.; Ng, L.; O'Brien, R.; Karlsson, T.; Herlitz, J.; Hartford, M. und

Caidahl, K. (2002): N-terminal pro-B-type natriuretic peptide and long-term mortality in acute coronary syndromes, Circulation (Band 106), Nr. 23, Seite 2913-2918. URL: PM:12460871

[49] James, Stefan K. MD PhD and Lindahl, Bertil MD PhD (2003):N-Terminal Pro-Brain Natriuretic Peptide and Other Risk Markers for Separate Prediction of Mortality and Subsequent Myocardial Infarction in Patients With Unstable Coronary Artery Disease: A Global Utilization of Strategies To Open occluded arteries (GUSTO)-IV Substudy

[50] Kanda, T.; Inoue, M.; Kotajima, N.; Fujimaki, S.; Hoshino, Y.; Kurabayashi, M.; Kobayashi, I. und Tamura, J. (2000): Circulating interleukin-6 and interleukin-6 receptors in patients with acute and recent myocardial infarction, Cardiology (Band 93), Nr. 3, Seite 191-196.

[51] Mazurov, V. I.; Stvolov, S. V.; Linetskaia, N. E. und Baldueva, I. A. (2001): [Levels of anti-inflammatory cytokines interleukin-2, interleukin-8, and soluble interleukin-2 receptor in blood of patients with various forms of ischemic heart disease], Ter.Arkh. (Band 73), Nr. 12, Seite 14-17. URL: PM:11858100

[52] Christenson, R. H.; Duh, S. H.; Sanhai, W. R.; Wu, A. H.; Holtman, V.; Painter, P.; Branham, E.; Apple, F. S.; Murakami, M. und Morris, D. L. (2001): Characteristics of an Albumin Cobalt Binding Test for assessment of acute coronary syndrome patients: a multicenter study, Clin.Chem. (Band 47), Nr. 3, Seite 464-470. URL: PM:11238298

[53] Wu, A. H.; Morris, D. L.; Fletcher, D. R.; Apple, F. S.; Christenson, R. H. und Painter, P. C. (2001): Analysis of the Albumin Cobalt Binding (ACB) test as an adjunct to cardiac troponin I for the early detection of acute myocardial infarction, Cardiovasc.Toxicol. (Band 1), Nr. 2, Seite 147-151. URL: PM:12213987

[54] Dumont, E. A.; Hofstra, L.; van Heerde, W. L.; van den, Eijnde S.; Doevendans, P. A.; DeMuinck, E.; Daemen, M. A.; Smits, J. F.; Frederik, P.; Wellens, H. J.; Daemen, M. J. und Reutelingsperger, C. P. (2000): Cardiomyocyte death induced by myocardial ischemia and reperfusion: measurement with recombinant human annexin-V in a mouse model, Circulation (Band 102), Nr. 13, Seite 1564-1568. URL: PM:11004148

[55] Narayan, P.; Mentzer, R. M., Jr. und Lasley, R. D. (2001): Annexin V staining during reperfusion detects cardiomyocytes with unique properties, Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol (Band 281), Nr. 5, Seite H1931-H1937. URL: PM:11668053

[56] Mallat, Z.; Benamer, H.; Hugel, B.; Benessiano, J.; Steg, P. G.; Freyssinet, J. M. und Tedgui, A. (2000): Elevated levels of shed membrane microparticles with procoagulant potential in the peripheral circulating blood of patients with acute coronary syndromes, Circulation (Band 101), Nr. 8, Seite 841-843. URL: PM:10694520

[57] Peetz, D.; Hafner, G.; Blankenberg, S.; Peivandi, A. A.; Schweigert, R.; Brunner, K.; Dahm, M.; Rupprecht, H. J. und Möckel, M. (2002): Annexin V does not represent a diagnostic alternative to myoglobin for early detection of myocardial infarction, Clin.Lab (Band 48), Nr. 9-10, Seite 517-523. URL: PM:12389712

[58] Kugiyama, K.; Ota, Y.; Sugiyama, S.; Kawano, H.; Doi, H.; Soejima, H.; Miyamoto, S.; Ogawa, H.; Takazoe, K. und Yasue, H. (2000): Prognostic value of plasma levels of secretory

type II phospholipase A2 in patients with unstable angina pectoris, Am.J.Cardiol. (Band 86), Nr. 7, Seite 718-722. URL: PM:11018189

[59] Kugiyama, K.; Ota, Y.; Kawano, H.; Soejima, H.; Ogawa, H.; Sugiyama, S.; Doi, H. und Yasue, H. (2000): Increase in plasma levels of secretory type II phospholipase A(2) in patients with coronary spastic angina, Cardiovasc.Res. (Band 47), Nr. 1, Seite 159-165. URL: PM:10869542

[60] Henn, V.; Slupsky, J. R.; Grafe, M.; Anagnostopoulos, I.; Forster, R.; Muller-Berghaus, G. und Kroczek, R. A. (1998): CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells, Nature (Band 391), Nr. 6667, Seite 591-594. URL: PM:9468137

[61] Heeschen, C.; Dimmeler, S.; Hamm, C. W.; van den Brand, M. J.; Boersma, E.; Zeiher, A. M. und Simoons, M. L. (2003): Soluble CD40 ligand in acute coronary syndromes, N.Engl.J.Med. (Band 348), Nr. 12, Seite 1104-1111. URL: PM:12646667

[62] Pammer, J.; Plettenberg, A.; Weninger, W.; Diller, B.; Mildner, M.; Uthman, A.; Issing, W.; Sturzl, M. und Tschachler, E. (1996): CD40 antigen is expressed by endothelial cells and tumor cells in Kaposi's sarcoma, Am.J.Pathol. (Band 148), Nr. 5, Seite 1387-1396.

[63] Mair, J. (1997): Progress in myocardial damage detection: new biochemical markers for clinicians, Crit Rev.Clin.Lab Sci. (Band 34), Nr. 1, Seite 1-66.

[64] Rabitzsch, G.; Mair, J.; Lechleitner, P.; Noll, F.; Hofmann, U.; Krause, E. G.; Dienstl, F. und Puschendorf, B. (1995): Immunoenzymometric assay of human glycogen phosphorylase isoenzyme BB in diagnosis of ischemic myocardial injury, Clin.Chem. (Band 41), Nr. 7, Seite 966-978. URL: PM:7600699

[65] Newgard, C. B.; Hwang, P. K. und Fletterick, R. J. (1989): The family of glycogen phosphorylases: structure and function, Crit Rev.Biochem.Mol.Biol. (Band 24), Nr. 1, Seite 69-99. URL: PM:2667896

[66] Inokubo, Y.; Hanada, H.; Ishizaka, H.; Fukushi, T.; Kamada, T. und Okumura, K. (2001): Plasma levels of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 are increased in the coronary circulation in patients with acute coronary syndrome, Am.Heart J. (Band 141), Nr. 2, Seite 211-217. URL: PM:11174334

[67] Ehlers, R.; Buttcher, E.; Eltzschig, H. K.; Kazmaier, S.; Szabo, S.; Helber, U. und Hoffmeister, H. M. (2002): Correlation between ST-T-segment changes with markers of hemostasis in patients with acute coronary syndromes, Cardiology (Band 98), Nr. 1-2, Seite 40-45. URL: PM:12373046

[68] Scharfstein, J. S.; Abendschein, D. R.; Eisenberg, P. R.; George, D.; Cannon, C. P.; Becker, R. C.; Sobel, B.; Cupples, L. A.; Braunwald, E. und Loscalzo, J. (1996): Usefulness of fibrinogenolytic and procoagulant markers during thrombolytic therapy in predicting clinical outcomes in acute myocardial infarction. TIMI-5 Investigators. Thrombolysis in Myocardial Infarction, Am.J.Cardiol. (Band 78), Nr. 5, Seite 503-510. URL: PM:8806332

[69] Mair, J.; Genser, N.; Maier, J.; Lechleitner, P.; Dienstl, F. und Puschendorf, B. (1997): Markers of activated coagulation for early diagnosis of acute myocardial infarction,

Clin.Chim.Acta (Band 267), Nr. 2, Seite 239-245. URL: PM:9469256

[70] Parolari, A.; Colli, S.; Mussoni, L.; Eligini, S.; Naliato, M.; Wang, X.; Gandini, S.; Tremoli, E.; Biglioli, P. und Alamanni, F. (2003): Coagulation and fibrinolytic markers in a two-month follow-up of coronary bypass surgery, J.Thorac.Cardiovasc.Surg. (Band 125), Nr. 2, Seite 336-343. URL: PM:12579103

[71] Reganon, E.; Vila, V.; Martinez-Sales, V.; Vaya, A. und Aznar, J. (2002): Inflammation, fibrinogen and thrombin generation in patients with previous myocardial infarction, Haematologica (Band 87), Nr. 7, Seite 740-745. URL: PM:12091125

[72] Kienast, J.; Thompson, S. G.; Raskino, C.; Pelzer, H.; Fechtrup, C.; Ostermann, H. und van de, Loo J. (1993): Prothrombin activation fragment 1 + 2 and thrombin antithrombin III complexes in patients with angina pectoris: relation to the presence and severity of coronary atherosclerosis, Thromb.Haemost. (Band 70), Nr. 4, Seite 550-553. URL: PM:8115978

[73] Oury, C; Toth-Zsamboki, E; Thys, C; Tytgat, J; Vermylen, J; and Hoylaerts, MF (2001):The ATP-gated P2X1 ion channel acts as a positive regulator of platelet responses to collagen

[74] Birk, AV; Broekman, MJ; and Gladek, EM (2002):Role of extracellular ATP metabolism in regulation of platelet reactivity

[75] Vezza, R; Mezzasoma, AM; Venditti, G; and Gresele, P (2002):Prostaglandin endoperoxides and thromboxane A2 activate the same receptor isoforms in human platelets

[76] Lyck, F; Holmvang, L; Grauholt, AM; and Grande, P (1992):Thrombocyte aggregation and serum thromboxane B2 in patients with unstable angina pectoris treated with diltiazem or verapamil

[77] De La Cruz, JP; Villalobos, MA; Escalante, R; Guerrero, A; Arrebola, MM; and Sanchez de La Cuesta, F (2002):Effects of the selective inhibition of platelet thromboxane synthesis on the platelet-subendothelium interaction

[78] Braunwald, E.; Antman, E. M.; Beasley, J. W.; Califf, R. M.; Cheitlin, M. D.; Hochman, J. S.; Jones, R. H.; Kereiakes, D.; Kupersmith, J.; Levin, T. N.; Pepine, C. J.; Schaeffer, J. W.; Smith, E. E., III; Steward, D. E.; Theroux, P.; Alpert, J. S.; Eagle, K. A.; Faxon, D. P.; Fuster, V.; Gardner, T. J.; Gregoratos, G.; Russell, R. O. und Smith, S. C., Jr. (2000): ACC/AHA guidelines for the management of patients with unstable angina and non-ST-segment elevation myocardial infarction. A report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Committee on the Management of Patients With Unstable Angina), J.Am.Coll.Cardiol. (Band 36), Nr. 3, Seite 970-1062. URL: PM:10987629

[79] Newby, L. K.; Storrow, A. B.; Gibler, W. B.; Garvey, J. L.; Tucker, J. F.; Kaplan, A. L.; Schreiber, D. H.; Tuttle, R. H.; McNulty, S. E. und Ohman, E. M. (2001): Bedside multimarker testing for risk stratification in chest pain units: The chest pain evaluation by creatine kinase-MB, myoglobin, and troponin I (CHECKMATE) study, Circulation (Band 103), Nr. 14, Seite 1832-1837. URL: PM:11294799

[80] Coller, B. S. (1995): Blockade of platelet GPIIb/IIIa receptors as an antithrombotic strategy, Circulation (Band 92), Nr. 9, Seite 2373-2380. URL: PM:7586333

[81] Cannon, C. P.; Weintraub, W. S.; Demopoulos, L. A.; Vicari, R.; Frey, M. J.; Lakkis, N.; Neumann, F. J.; Robertson, D. H.; DeLucca, P. T.; DiBattiste, P. M.; Gibson, C. M. und Braunwald, E. (2001): Comparison of early invasive and conservative strategies in patients with unstable coronary syndromes treated with the glycoprotein IIb/IIIa inhibitor tirofiban, N.Engl.J.Med. (Band 344), Nr. 25, Seite 1879-1887. URL: PM:11419424

[82] Stone, Gregg W.; Moliterno, David J.; and Bertrand, Michel (2 A.D.):Impact of Clinical Syndrome Acuity on the Differential Response to 2 Glycoprotein IIb/IIIa Inhibitors in Patients Undergoing Coronary Stenting

[83] Januzzi, J. L.; Chae, C. U.; Sabatine, M. S. und Jang, I. K. (2001): Elevation in serum troponin I predicts the benefit of tirofiban, J.Thromb.Thrombolysis. (Band 11), Nr. 3, Seite 211-215. URL: PM:11577259

[84] Giugliano, RP; Roe, MT; Harrington, RA; Gibson, CM; and Zeymer, U (2003):Combination reperfusion therapy with eptifibatide and reduced dose tenecteplase for ST-elevation myocardial infarction: results of the integrilin ant tenecteplase in acute myocardial infarction (INTEGRITI) Phase II Angiographic Trial

[85] Van de Werf, Frans; Chair; Ardissino, D; Betriu, Amadeo; Cokkinos, Dennis V.; Falk, Erling; Fox, Keith A. A.; Julian, Desmond; Lengyel, Maria; Neumann, Franz-Josef; Ruzyllo, Witold; Thygesen, Christian; Underwood, S. Richard; Vahanian, Alec; Verheugt, Freek W. A.; and Wijns, William (2003):Management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation

[86] Lee, David P.; Herity, Niall A.; Hiatt, Bonnie L.; and Fearon, William F. (2003):Adjunctive Platelet Glycoprotein IIb/IIIa Receptor Inhibition With Tirofiban Before Primary Angioplasty Improves Angiographic Outcomes

[87] Fuster, V.; Badimon, L.; Badimon, J. J. und Chesebro, J. H. (1992): The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes (2), N.Engl.J.Med. (Band 326), Nr. 5, Seite 310-318. URL: PM:1728735

[88] Fuster, V.; Stein, B.; Ambrose, J. A.; Badimon, L.; Badimon, J. J. und Chesebro, J. H. (1990): Atherosclerotic plaque rupture and thrombosis. Evolving concepts, Circulation (Band 82), Nr. 3 Suppl, Seite II47-II59. URL: PM:2203564

[89] Fuster, V.; Badimon, J. J. und Badimon, L. (1992): Clinical-pathological correlations of coronary disease progression and regression, Circulation (Band 86), Nr. 6 Suppl, Seite III1-11. URL: PM:1424042

[90] Kamat, S. G.; Michelson, A. D.; Benoit, S. E.; Moake, J. L.; Rajasekhar, D.; Hellums, J. D.; Kroll, M. H. und Schafer, A. I. (1995): Fibrinolysis inhibits shear stress-induced platelet aggregation, Circulation (Band 92), Nr. 6, Seite 1399-1407. URL: PM:7664419

[91] Kroll, M. H.; Hellums, J. D.; Guo, Z.; Durante, W.; Razdan, K.; Hrbolich, J. K. und Schafer, A. I. (1993): Protein kinase C is activated in platelets subjected to pathological shear stress, J.Biol.Chem. (Band 268), Nr. 5, Seite 3520-3524. URL: PM:8429027

[92] Willerson, J. T. (1995): Conversion from chronic to acute coronary heart disease

syndromes. Role of platelets and platelet products, Tex.Heart Inst.J. (Band 22), Nr. 1, Seite 13-19. URL: PM:7787465

[93] Calvete, J. J.; Rivas, G.; Schafer, W.; McLane, M. A. und Niewiarowski, S. (1993): Glycoprotein IIb peptide 656-667 mimics the fibrinogen gamma chain 402- 411 binding site on platelet integrin GPIIb/IIIa, FEBS Lett. (Band 335), Nr. 1, Seite 132-135. URL: PM:8243658

[94] Meier, K. E.; Gibbs, T. C.; Knoepp, S. M. und Ella, K. M. (1999): Expression of phospholipase D isoforms in mammalian cells, Biochim.Biophys.Acta (Band 1439), Nr. 2, Seite 199-213. URL: PM:10425396

[95] Cox, D. A. und Cohen, M. L. (1996): Lysophosphatidylcholine stimulates phospholipase D in human coronary endothelial cells: role of PKC, Am.J.Physiol (Band 271), Nr. 4 Pt 2, Seite H1706-H1710. URL: PM:8897967

[96] Martinson, E. A.; Scheible, S. und Presek, P. (1994): Inhibition of phospholipase D of human platelets by protein tyrosine kinase inhibitors, Cell Mol.Biol.(Noisy.-le-grand) (Band 40), Nr. 5, Seite 627-634. URL: PM:7526916

[97] Kim, Y.; Han, J. M.; Park, J. B.; Lee, S. D.; Oh, Y. S.; Chung, C.; Lee, T. G.; Kim, J. H.; Park, S. K.; Yoo, J. S.; Suh, P. G. und Ryu, S. H. (1999): Phosphorylation and activation of phospholipase D1 by protein kinase C in vivo: determination of multiple phosphorylation sites, Biochemistry (Band 38), Nr. 32, Seite 10344-10351. URL: PM:10441128

[98] Lindmar, R. und Loffelholz, K. (1992): Phospholipase D in heart: basal activity and stimulation by phorbol esters and aluminum fluoride, Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol. (Band 346), Nr. 6, Seite 607-613. URL: PM:1484561

[99] Appleyard, C. B. und Hillier, K. (1992): Catabolism of platelet-activating factor by human colonic mucosa. Calcium dependence of the catabolizing enzymes, Biochem.Pharmacol. (Band 43), Nr. 12, Seite 2503-2509. URL: PM:1632809

[100] Gomez-Munoz, A.; O'Brien, L.; Hundal, R. und Steinbrecher, U. P. (1999): Lysophosphatidylcholine stimulates phospholipase D activity in mouse peritoneal macrophages, J.Lipid Res. (Band 40), Nr. 6, Seite 988-993. URL: PM:10357830

[101] Chiang, T. M. (1994): Activation of phospholipase D in human platelets by collagen and thrombin and its relationship to platelet aggregation, Biochim.Biophys.Acta (Band 1224), Nr. 1, Seite 147-155. URL: PM:7948037

[102] Huang, R.; Kucera, G. L. und Rittenhouse, S. E. (1991): Elevated cytosolic Ca2+ activates phospholipase D in human platelets, J.Biol.Chem. (Band 266), Nr. 3, Seite 1652-1655. URL: PM:1988442

[103] Williger, B. T.; Ho, W. T. und Exton, J. H. (1999): Phospholipase D mediates matrix metalloproteinase-9 secretion in phorbol ester-stimulated human fibrosarcoma cells, J.Biol.Chem. (Band 274), Nr. 2, Seite 735-738. URL: PM:9873009

[104] Gomez-Munoz, A.; Martens, J. S. und Steinbrecher, U. P. (2000): Stimulation of phospholipase D activity by oxidized LDL in mouse peritoneal macrophages, Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol. (Band 20), Nr. 1, Seite 135-143. URL: PM:10634810

[105] Danne, O.; Möckel, M.; Lueders, C.; Mügge, C.; Zschunke, G. A.; Lufft, H.; Müller, C. und Frei, U. (2003): Prognostic implications of elevated whole blood choline levels in acute coronary syndromes, Am.J.Cardiol. (Band 91), Nr. 9, Seite 1060-1067. URL: PM:12714147

[106] Brunner, E. und Langer, F. (1999): Nichtparametrische Analyse longitudinaler Daten, Seite 20-95, R. Oldenbourg Verlag, München Wien.

Danksagung

Ich danke Herrn PD Dr. Möckel für die freundliche Überlassung des Themas und die Unterstützung bei der Durchführung der verschiedenen Abschnitte der Arbeit. Insbesondere möchte ich mich bei ihm für die guten konstruktiven Vorschläge und Anregungen während der Erarbeitung und Ausführung bedanken.

Ich danke meinem Betreuer Herrn Dr. Danne für die Hilfe und Unterstützung zu jedem Zeitpunkt der Arbeit.

Herrn Dr. rer. nat. Lüders danke ich für die Einarbeitung in die komplexe Materie der HPLC-MS und die Hilfestellung während des experimentellen Teils der Arbeit.

Ich danke Herrn Dr. Thies Krützfeldt für die Durchsicht der Arbeit.

Ich danke Frau Dr. Wegner vom Institut für Statistik der HU-Berlin für die Unterstützung und Beratung.

Ich danke allen Kollegen und Mitarbeitern die mich unterstützt haben.

Meinem Bruder Benjamin danke ich besonders für die Hilfe bei der Erstellung der Online-Version gemäß den Vorschriften zur Online-Publikation.

Lebenslauf

Geburtsdatum: 12. April 1975
Geburtsort: Groß Vollstedt

Schulbildung

1994	Waldorfschule Kiel, allgemeine Fachhochschulreife
1996-1997	Waldorfschule Berlin-Zehlendorf, allgemeine Hochschulreife

Zivildienst

1994-1996	Rettungssanitäter im Rettungsdienst der Berufsfeuerwehr Kiel

Berufsausbildung

1997-1998	Weiterbildung zum Rettungsassistent

Studium

April 1998	Immatrikulation an der Humboldt-Universität zu Berlin Fachbereich Humanmedizin

Prüfungen

April 2000	Ärztliche Vorprüfung
März 2001	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
März 2003	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Juni 2004	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Erklärung an Eides Statt

Hiermit erkläre ich, Christian Storm, geboren am 12.04.1975 in Groß Vollstedt, an Eides Statt, die unter dem Titel:

Messung von Phospholipase D Metaboliten bei Notfall- und Intensivpatienten mit akutem Koronarsyndrom unter besonderer Berücksichtigung der Therapie mit GPIIb/IIIa-Antagonisten

verfasste Dissertation

1. ausschließlich durch mich selbst geschrieben,
2. ohne unzulässige Hilfe Dritter verfasst,
3. die benutzten Hilfsmittel und die zitierte Literatur vollständig angegeben

zu haben.

Die oben genannte Dissertation ist keine auch nur in Teilen wiedergegebene Kopie anderer Arbeiten.

Berlin,

Christian Storm