
Aus der Abteilung für Transfusionsmedizin
der medizinischen Fakultät der Universität Rostock
Leiter: Prof. Dr. med. V. Kiefel

Untersuchungen zur Pathogenese medikamentinduzierter Immunthrombozytopenien

Inauguraldissertation
zur
Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin
der medizinischen Fakultät
der Universität Rostock

Bearbeiter: Tina Höltje
Abgabedatum: Januar 2010

Gutachter:

1. Prof. Dr. med. V. Kiefel; Transfusionsmedizin, Universität Rostock
2. Prof. Dr. med. C. Junghanß; Innere Medizin, Universität Rostock
3. Prof. Dr. med. A. Greinacher; Transfusionsmedizin, Universität Greifswald

Datum der Verteidigung:

15 .Dezember 2010

Inhaltsverzeichnis

1. Thema der vorliegenden Arbeit	1
2. Stand der Forschung	
2.1 Überblick und Einteilung der Thrombopenien	1
2.2 Durch Medikamente induzierte Immunthrombozytopenien	
2.2.1 Thrombozytopenien vom „Chinidin-Typ“	3
2.2.2 Thrombozytopenie durch Abciximab	6
2.2.3 Thrombozytopenie durch Heparin	9
2.2.4 Thrombozytopenie durch Gold	10
2.2.5 Thrombozytopenie durch Penizillin	10
2.2.6 Therapie einer durch Medikamente ausgelösten Immunthrombozytopenie	11
2.3 Pseudothrombozytopenie	11
2.4 Fragestellungen	12
3. Material und Methoden	
3.1 Reagenzien	13
3.2 Blutentnahme und Durchführung der entsprechenden Untersuchungen	16
3.3 Fallbeschreibung: Patient mit verzögter Thrombozytopenie nach Abciximab-Infusion	17
3.4 Isolierung von Thrombozyten für immunologische Tests	19
3.5 Blutausstrich	19
3.6 Nachweis thrombozytärer Antikörper im Serum	20
3.7 Direkter MAIPA	22
3.8 Indirekter MAIPA mit Abciximab-beladenen Plättchen	22
3.9 Indirekter MAIPA mit Fab-Vorabsorption	25
3.10 Teilversuch mit monoklonalem Antikörper 7E3	26
3.11 Absorption von Anti-Maus-IgG mit Maus-IgG gekoppelten Beads	28
3.12 Bestimmung medikamentabhängiger thrombozytärer Antikörper in Blutspenderseren	
3.12.1 Blutspender	29
3.12.2 ELISA zur Bestimmung medikamentabhängiger thrombozytärer Antikörper	29

3.12.3 MAIPA-Assay zum Nachweis medikamentabhängiger thrombozytärer Antikörper	33
3.12.4 Fallbeschreibung: Patient mit Chinidin-Antikörper im Serum	35
3.12.5 Fallbeschreibung: Patientin mit Carbamazepin-induzierter Thrombozytopenie	39
3.13 Statistische Verfahren	41
 4. Ergebnisse	
4.1 Verlauf der Thrombozytenzahlen bei Abciximab behandelten Patienten	42
4.2 Beurteilung der Blutausstriche auf Agglutinate	45
4.3 Zusammenhang der Thrombozytenzahl und Aggregate	46
4.4 Plättchenständige Antikörper GP-PAIgG	47
4.5 Ergebnisse der Untersuchung des Serums eines Patienten bei verzögerter Thrombozytopenie nach Abciximab- Infusion	48
4.6 Ergebnisse bei der Untersuchung auf freie thrombozytäre Antikörper im Serum der Abciximab-Patienten	51
4.6.1 Indirekte MAIPA mit Abciximab-markierten Plättchen	
4.6.2 Antikörperstärke	52
4.7 Befunde des indirekten MAIPA mit monoklonalem AK 7E3 ohne/mit Vorabsorption durch Maus-IgG	53
4.8 Korrelation von Thrombozytenabfall und plättchenständigen Antikörpern	54
4.9 Vergleich freier thrombozytärer Antikörper gegen Abciximab-beladene Thrombozyten mit Auftreten eines Thrombozytenabfalls	55
4.10 Beziehungen zwischen der Entstehung von Aggregaten und plättchenständigen Antikörpern	56
4.11 Korrelation zwischen freien Antikörpern gegen mit Abciximab-beladenen Thrombozyten und plättchenständigen Antikörpern	57
4.12 Ergebnisse der Normalspenderseren bei der Untersuchung auf freie thrombozytäre Antikörper mit Abciximab markierten Plättchen	
Untersuchung der Hemmbarkeit von Antikörpern gegen GPIIb/IIa durch Fab-Fragment	58
4.13 Ergebnisse des ELISA zur Bestimmung medikamentabhängiger thrombozytärer Antikörper	59

5 Diskussion

5.1 Diskussion der Versuchsergebnisse mit Abciximab beladenen Thrombozyten	
5.1.1 Unterscheidung zwischen echter Thrombozytopenie und Pseudothrombozytopenie sowie Ausschluss einer Thrombozytopenie durch Heparin	62
5.1.2 Antikörper gegen Abciximab-beladene Thrombozyten bereits vor Abciximab-Gabe im Serum	64
5.1.3 Keine Reaktion der freien Antikörper mit dem kompletten AK 7E3 nach Vorabsorption	64
5.1.4 Zusammenhänge zwischen plättchenständigen Antikörpern und Thrombozytenabfall, freien AK gegen Abciximab-beladenen Thrombozyten sowie Thrombozytenaggregaten	66
5.1.5 Bewertung und Diskussion der Fallbeschreibung des Patienten mit verzögerter Thrombozytopenie	68
5.1.6 Fazit aus den Untersuchungen in Zusammenhang mit der Literatur und Management bei Auftreten einer Thrombopenie	69
5.2 Bewertung der Testung auf medikamentabhängige Antikörper vom „Chinidintyp“	71
6 Zusammenfassung	74
7 Abkürzungsverzeichnis	76

I Literaturverzeichnis

II Anhang

Eidesstattliche Erklärung

Thesen

Danksagung

1. Thema der vorliegenden Arbeit

Es gibt eine Reihe von Ursachen, die eine Immunthrombozytopenie (<150.000 Thrombozyten/ μ l Vollblut) auslösen können. Dabei spielen differentialdiagnostisch auch Medikamente eine wichtige Rolle. Schon 1928 beobachtete man, dass während der Einnahme von Chinin bei einem Patienten eine Purpura auftrat, die nach Beenden der Therapie wieder verschwand und bei Re-Exposition sich erneut zeigte [Shulman et al., 1994]. Heute sind viele Medikamente bekannt, die eine solche immun-vermittelte Thrombopenie auslösen können. Neben Chinin und Chinidin konnten auch Cotrimoxazol [Kiefel et al., 1987a], Rifampicin [Burgess et al., 2000], Carbamazepin, Diclofenac [Kim et al., 1995], Ibuprofen und Vancomycin [Mizon et al., 1997] mit medikamentenabhängigen Antikörpern in Verbindung gebracht werden [Kiefel, 2003a].

Einem wahrscheinlich ebenfalls immunologisch vermitteltem Mechanismus unterliegt die Thrombozytopenie durch den Glykoprotein IIb/IIIa-Rezeptor-Blocker Abciximab (=ReoPro). Derzeit bestehen allerdings nur Hypothesen, wie es zu einer Thrombozytopenie durch Abciximab-induzierte Antikörper kommt.

2. Stand der Forschung

2.1 Überblick und Einteilung der Thrombopenien

Die Anzahl der im Blut zirkulierenden Thrombozyten ist von mehreren Faktoren abhängig. So hängt die Thrombozytenzahl von der Neubildungsrate im Knochenmark (Thrombozytopoese) ab. Die Lebensdauer der Thrombozyten sowie der Verteilung zwischen den verschiedenen „Kompartimenten“ sind weitere Einflüsse. Somit lassen sich die Thrombozytopenien nach ihrer Ursache in drei große Gruppen gliedern:

1. Ungenügende Thrombozytenproduktion im Knochenmark, die Folge einer malignen hämatologischen Erkrankung sein kann, durch die es z.B. zur Verdrängung der normalen Hämatopoese kommt. Weitere mögliche Ursachen sind eine aplastische Anämie oder ein myelodysplastisches Syndrom. Bei einer Infektion mit dem Parvovirus B19 oder einem Vitamin B₁₂-Mangel muss ebenfalls mit einer verminderten Bildung von Plättchen im Knochenmark gerechnet werden. Auch bei einer Interferon- oder Strahlentherapie kann als unerwünschte Begleiterscheinung die Thrombozytopoese beeinträchtigt werden.

2. Thrombozytopenie durch eine Verteilungsstörung, wie sie bei einer Splenomegalie vorkommt.
3. Thrombozytopenie durch frühzeitigen oder verstärkten Abbau oder Verbrauch der Plättchen in der Zirkulation. Diese Form kann durch vielfältige Ursachen ausgelöst werden (**siehe Tabelle 1**).

Tabelle 1: Ursachen einer Thrombozytopenie durch gesteigerten Thrombozytenumsatz oder Verbrauch

immunologische Ursachen

° im Neugeborenenalter:

- Alloimmunthrombozytopenie des Neugeborenen
- Passive Immunthrombozytopenie des Neugeborenen durch diaplazentär übertragene Antikörper bei Autoimmunthrombozytopenie der Mutter

° Erworbene Formen bei Kindern und Erwachsenen:

- *medikamenteninduzierte Immunthrombozytopenie*
- Autoimmunthrombozytopenische Purpura (= M. Werlhof)
- Sekundärer Immunthrombozytopenie, z.B. in Verbindung mit SLE, rheumatoider Arthritis, Sarkoidose, M. Hodgkin
- Thrombotisch-thrombozytopenische Purpura (Moschkowitz-Syndrom), bei Patienten mit Auto-AK gegen die vWF-spaltende Protease
- Heparin-induzierte Thrombozytopenie Typ II
- Postinfektiöse Immunthrombozytopenie
- Immunthrombozytopenie in Verbindung mit HIV
- Posttransfusionelle Purpura (PTP)

Nicht immunologisch bedingte Ursachen

- dissiminierte intravasale Gerinnung
- mikroangiopathische hämolytische Anämie (TTP, HUS)
- extrakorporale Zirkulation und Massentransfusion

Um einen Überblick über die einzelnen durch Medikamente ausgelösten Thrombozytopenien zu bekommen, sollen nachfolgend die jeweiligen Besonderheiten aufgezeigt werden.

Da die immunvermittelten Thrombozytopenien eine Differentialdiagnose der hämorrhagischen Diathesen durch Medikamente darstellen, werden anschließend die wichtigsten erworbenen Formen aufgezeigt. Als auslösendes Agens können Autoantigene, Alloantigene, Infektionen oder aber Medikamente verantwortlich gemacht werden.

2.2 Durch Medikamente induzierte Immunthrombozytopenien

Die durch Medikamente ausgelösten Immunthrombozytopenien lassen sich nach ihrem Pathomechanismus in verschiedene Typen unterscheiden.

2.2.1 Thrombozytopenien vom „Chinidin-Typ“

Typisch für diese Art von Thrombozytopenie ist, dass medikamentenabhängige Antikörper vom Patienten gebildet werden, die in vitro nur in Anwesenheit der jeweiligen Substanz mit körpereigenen Thrombozyten und Testthrombozyten reagieren.

Neben Chinin sind weitere Medikamente bekannt, bei denen medikamentenabhängige Antikörper im Serum gegen Thrombozyten in vitro nachgewiesen werden konnten. In Tabelle 2 ist eine repräsentative Auswahl solcher Substanzen zu sehen. Immunthrombozytopenien wie sie bei diesen Medikamenten vorkommen, scheinen alle einem ähnlichen Mechanismus zu unterliegen. Bei der Labordiagnostik der medikamentenabhängigen Antikörper kommt erschwerend hinzu, dass teilweise nicht die Substanz selbst, sondern deren Metabolite für die Entstehung solcher medikamentenabhängiger Antikörper verantwortlich sind. Diese Vermutung konnte durch Experimente bestätigt werden, in denen der Urin von Patienten, der die verantwortlichen Metabolite enthielt, in die Testung eingesetzt wurde [Bougie et al., 2001; Eisner et al., 1972; Kiefel et al., 1987a].

Tabelle 2: Medikamente, bei denen eine Auslösung durch medikamentabhängige Antikörper gut belegt ist

Medikament	Literatur (Beispiel)
Chinidin	Stricker et al., 1986
Chinin	Asvadi et al., 2003
Chinidin + Chinin	Chong et al., 1991
Cotrimoxazol	Kiefel et al., 1987a
Rifampizin	Burgess et al., 2000
Nomifensin	Salama et al., 1985
Carbamazepin	George JN., 1998
Diclofenac	Kim et al., 1995
Ibuprofen	George JN., 1998
Vancomycin	Burgess et al, 1997

Thrombozytopenien durch diese medikamentabhängigen Antikörper (drug-dependent antibodies = ddAb) treten typischerweise 6-10 Tagen nach Erstexposition auf [Bougie et al., 2001; Brinker et al., 2002; Mizon et al., 1997]. So lange benötigt das Immunsystem für die Antikörperbildung im Rahmen einer primären Immunisierung. Da ddAb persistieren können, kann es jedoch bei Re-Exposition mit dem Medikament bereits nach kurzer Zeit zu einem extremen Abfall der Plättchenzahl kommen [Shulman et al., 1994]. Der akute Abfall der Thrombozytenzahl ist meist von einer massiv vermehrten Blutungsneigung begleitet, die mit Petechien und Hämatomen einhergeht. Besonders gefürchtet ist dabei die Gefahr der intrazerebralen Blutung [Kiefel et al., 1993]. Die Diagnostik einer Immunthrombozytopenie durch medikamentabhängige Antikörper stützt sich auf eine sorgfältige Anamnese, den Ausschluss anderer Ursachen, die eine Thrombozytopenie hervorrufen können und auf dem Nachweis medikamentabhängiger Antikörper im Serum. Dies gelingt u. a. mit Hilfe der ELISA-Technik oder Plättchenimmunflourenszenz-Tests (PIFT) zum Nachweis thrombozytärer Antikörper. Im Gegensatz zu thrombozytären Autoantikörpern ist dabei zu beachten, dass medikamentabhängige Antikörper nur in Anwesenheit der auslösenden Substanz mit thrombozytären Glykoproteinen reagieren. Je nach Medikament reagieren diese ddAb mit unterschiedlichen Glykoproteinen auf der Thrombozytenmembran. Wie in vielen Versuchen mit Hilfe glykoproteinspezifischer Tests nachgewiesen werden konnte, reagieren Chinin und Chinidin-abhängige Antikörper häufiger mit dem GP-Komplex Ib/IX [Asvadi et al., 2003; Berndt et al., 1985; Chong et al., 1991] gelegentlich mit dem GP IIb/IIIa Komplex [Chong et al., 1991; Christie et al., 1987; Visentin et al., 1991].

Stricker et al. konnten in Versuchen zeigen, dass ddAb auch mit dem Glycoprotein V reagieren.

Er setzte in seinem Test u.a. Plättchen von Patienten mit einem Bernard-Soulier-Syndrom ein, bei denen die Komponenten des GP-Komplexes Ib/ IX/ V fehlen oder stark vermindert sind. Eine Reaktion der ddAb mit diesen Thrombozyten blieb aus.

Obwohl Thrombozytopenien, die durch Chinin und andere Medikamente ausgelöst werden, schon länger bekannt sind, ist der Mechanismus der Antikörperbindung bislang noch nicht vollständig aufgeklärt.

Dabei werden v. a. zwei Mechanismen favorisiert:

- Es könnte zur Bildung so genannter „Neoantigene“ kommen. Diese würden durch Konformationsänderung bei Bindung des Medikaments an den Glykoproteinkomplex der Thrombozyten entstehen [Asvadi et al., 2003; Visentin et al., 1991].
- Das Medikament könnte nicht-kovalent an die Glykoproteine der Plättchenmembran binden und so ein „zusammengesetztes Epitop“ bilden, mit dem der Antikörper reagiert [Aster et al., 1999] (siehe Abbildung 1).

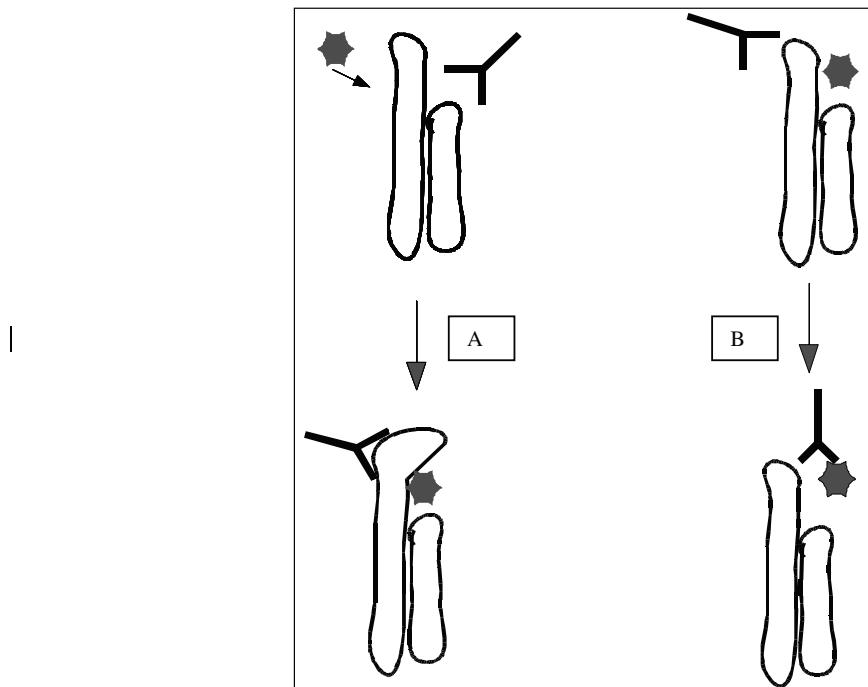


Abbildung 1: Es werden zwei unterschiedliche Mechanismen wie ddAb an die Plättchenglykoproteine binden können, diskutiert. A zeigt, wie das Medikament an das GP bindet. Dies induziert eine Konformationsänderung im GP, woran sich dann die medikamentenabhängigen Antikörper (ddAb) binden. In B ist zu sehen, wie das Medikament an das GP bindet und so ein „zusammengesetztes Epitop“ bildet, an das sich der ddAb binden kann. Aus Aster et al. 1999. Ein weiterer postulierter Mechanismus, die „innocent bystander Theorie“, ist im Text näher erläutert

Ein weiterer in der Literatur erwähnter Mechanismus ist die „innocent-bystander“-Theorie. Sie besagt, dass die Antikörper zunächst mit dem Medikament einen Antikörper-Medikament-Komplex eingehen und dann in einem zweiten Schritt mit der Thrombozytenmembran, wahrscheinlich durch eine Konformationsänderung, reagieren [Aster et. al., 1999; Burgess et al., 2000]. Dieser Immunkomplexmechanismus, bei dem der Antikörper das Medikament bindet und anschließend mit seinem Fc-Rezeptor an die Thrombozytenmembran, scheint jedoch weniger wahrscheinlich. Die meisten medikamentabhängigen Antikörper reagieren nämlich gewebespezifisch mit Glykoproteinen der Thrombozytenmembran, die keine Fc-Rezeptorfunktion aufweisen [Chong et al., 1991; Kiefel et al., 1993; Shulman et al., 1994; Smith et al., 1987; Visentin et al., 1991]. Gegen eine Fc-vermittelten Reaktion sprechen auch Versuche von Christie et al. 1985. Sie konnten zeigen, dass medikamentabhängige Antikörper mit ihrem Fab-Fragment spezifische Glykoproteine erkennen und so an die Thrombozytenmembran binden.

Auch die Hapten-Theorie ist eher unwahrscheinlich. Während Medikamente, die die Bildung von ddAb induzieren, sich nur lose an Strukturen der Zellmembran binden, reagieren Hapten-spezifische Antikörper mit Substanzen, die eine feste Bindung mit Proteinen der Zellmembran eingegangen sind. Diese Beobachtung und die Erkenntnis, dass es bei Überschuss des freien Medikamentes zu keiner Hemmung von ddAb an die Plättchenmembran kommt, sprechen gegen die Hapten-Theorie in diesem Zusammenhang [Aster et al., 1999; Bougie et al., 2002; Kiefel et al., 1993].

2.2.2 Thrombozytopenie durch Abciximab/ReoPro

Anwendungsgebiete und Wirkweise von Abciximab

Abciximab ist ein GP IIb/IIIa-Rezeptor-Antagonist und findet hauptsächlich in der Kardiologie bei der perkutanen Koronarintervention (PTCA) zur Verhinderung arterieller Thrombosen Anwendung. Ferner zum kurzfristigen Einsatz bei Patienten mit instabiler Angina pectoris, die auf eine konventionelle Therapie nicht ansprechen und bei denen eine PTCA vorgesehen ist.

Abciximab bindet sich mit hoher Affinität und Selektivität an das thrombozytäre Glykoprotein IIb/IIIa, wodurch die Bindung von Fibrinogen aber auch des Von-Willebrand-Faktors an diesen Rezeptor blockiert wird. Die Thrombozytenaggregation kann somit effektiv gehemmt und die nachfolgende Thrombusbildung verhindert werden [Mascelli et al., 1998].

Aufbau

Im Aufbau gleicht Abciximab einem rekombinanten Antikörper-Fab-Fragment. Dieses besteht aus den variablen Regionen des murinen monoklonalen Antikörpers 7E3 IgG und der konstanten Domäne humaner Sequenzen [Charles et al., 2004; Curtis et al., 2004; Mascelli et al. 1998,1999]. Somit besitzt Abciximab ein freies Ende einer humanen Immunglobulin G-Sequenz, wie bei einem Fab-Fragment. Die murinen Anteile des monoklonalen Antikörpers 7E3 werden durch die Immunisierung von Mäusen mit humanen Thrombozyten gewonnen. Es konnte nachgewiesen werden, dass die Bestandteile der Maus im Organismus stark immunogen wirken. Deshalb wurden zur Herabsetzung dieser immunogenen Eigenschaften die murinen Sequenzen in humanes Fab₂ Fragment eingebaut, das durch Papainspaltung humaner IgG-Antikörper gewonnen wird [Bishara et al., 2000; Knight et al. 1995; Mascelli et al., 1999]. Dabei entsteht der chimäre Antikörper c7E3 (Abbildung 2). Für die Fibrinogenblockierung am GP IIb/IIIa Komplex ist der murine Teil des Abciximab verantwortlich.

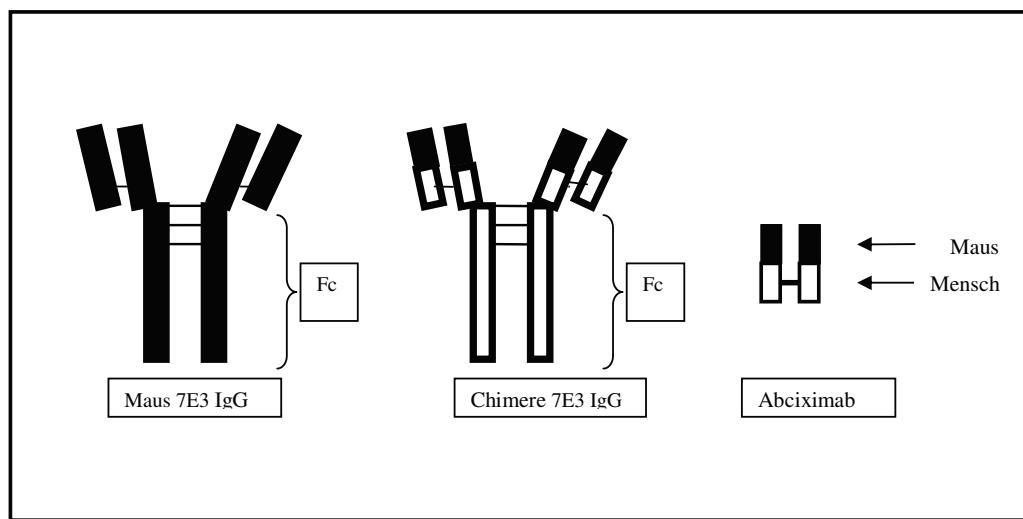


Abbildung 2: Aus Mascelli et al., 1999. Schematische Darstellung der murinen und chimeren IgG Form des monoklonalen Antikörpers 7E3. Durch Papain-Spaltung des chimeren 7E3 Antikörpers entsteht Abciximab

Der Aufbau von Abciximab ist zum Verständnis einiger Experimente in dieser Arbeit wichtig. Einige Menschen können Antikörper gegen die proteolytische Schnittstelle bilden, die auf dem Fab-Fragment nach Verdau von IgG mit Papain entsteht. Solche Antikörper können mit den entsprechenden humanen Sequenzen des Abciximab-Molekülen reagieren.

Klinische Verlauf einer Thrombozytopenie durch Abciximab

Bei der Behandlung mit Abciximab können innerhalb kurzer Zeit (oft schon 2-4 Stunden nach Abciximab-Gabe) schwere Thrombozytopenien als Komplikation auftreten.

Die Inzidenz solcher Thrombozytopenien, die durch Abciximab hervorgerufen werden, liegt bei 1-2% [Curtis et al., 2004; Charles et. al., 2004; Dery et al. 2004; Jubelirer et al., 1999]. Bei Patienten, die zuvor bereits mit Abciximab behandelt wurden, treten Thrombozytopenien mit einer Inzidenz von 5% auf [Curtis et al., 2004]. Schwere Thrombozytopenien, bei denen die Plättchenzahl unter 20.000/ μ l fällt, kommen jedoch mit 0,5-0,9% seltener vor [Berkowitz et al. 1997, 1998; Jubelirer et al., 1999]. Wie bei anderen Thrombopenien, die durch Medikamente hervorgerufen werden, ist auch hier typisch, dass nach Absetzen von Abciximab die Plättchenzahl wieder rasch ansteigt.

Möglicher Pathomechanismus

Der Mechanismus der Auslösung einer Thrombozytopenie nach Gabe von Abciximab scheint ein etwas anderer zu sein als beim „Chinin“-Typ [Aster, 2005]. Über die Einzelheiten bei der Auslösung der rapid entstehenden Thrombozytopenie existieren bislang nur Hypothesen. Der schnelle Abfall könnte laut Curtis et al. [2002] im Vorhandensein so genannter „natürlicher Antikörper“, die bereits vor der ersten Anwendung des Medikaments im Organismus zirkulieren, begründet sein. Diese könnten die murinen Sequenzen innerhalb der hypervariablen Region des Fab-Fragments erkennen und mit den Thrombozyten Immunkomplexe bilden, welche im retikuloendothelialen-System (RES) und der Milz eliminiert würden [Abrams et al., 2004; Curtis et al., 2002; Nurden et al., 1999a; Shell et al., 2002]. Auch Personen, die nach Gabe von Abciximab keine Thrombozytopenie entwickeln können natürliche Antikörper gegen das Fab-Fragment im Serum haben. Im Gegensatz zu Patienten, die eine Thrombozytopenie entwickelten, würden diese jedoch die Papain-gespaltene Seite des Fab-Fragments erkennen [Abrams et al., 2004; Bishara et al., 2000; Curtis et al., 2004].

Eine andere Erklärung stellt auch hier die Bildung so genannter „Neoepitope“ dar. Durch Anlagerung des Medikaments an den GP IIb/IIIa-Komplex könnte es zu einer Konformationsänderung und somit zur Entstehung neuer Epitope auf dem GP-Komplex kommen. Diese auch als „Liganden-induzierte Bindungs Stellen“ (LIBS) bezeichneten Bereiche könnten von humanen Antikörpern erkannt werden [Abrams et al., 2004; Bishara et

al., 2000; Bougie et al., 2002; Curtis et al., 2004; Gawaz et al., 1998) und im RES, Milz oder der Leber eliminiert werden [Bednar et al., 1999] (siehe Abbildung 3).

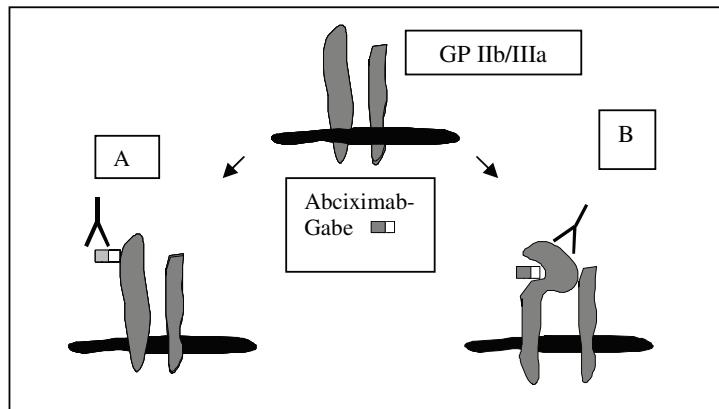


Abbildung 3: Vereinfachte schematische Darstellung über die bisherigen Hypothesen, wie es zur Bindung von Abciximab-abhängigen Antikörpern kommt. In A ist die Bindung der AK an Abciximab zu sehen. B soll die Bildung sog. LIBS zeigen, die durch Abciximab induziert werden und woran sich die AK anschließend binden.

2.2.3 Thrombozytopenie durch Heparin

Die durch Heparin induzierte Thrombozytopenie (HIT) stellt eine häufigere Ursache einer durch Medikamente induzierten Thrombopenie dar. Bei der HIT lassen sich zwei Formen unterscheiden. Die harmlose HIT I ist nicht immunologisch bedingt und nur mit einem mäßigen Thrombozytenabfall kurz nach Heparingabe verbunden. Die Thrombozytenzahlen normalisieren sich bereits unter Heparingabe. Bei der gefährlicheren HIT II handelt es sich um einen immunologisch vermittelten Prozess, bei der Antikörper mit dem Plättchenfaktor 4 (PF4)-Heparin-Komplex reagieren. Dieser Immunkomplex führt, anders als bei den übrigen medikamentös-induzierten Immunthrombopenien, über den plättchenständigen Fc-Rezeptor zu einer Thrombozytenaktivierung. Klinisch tritt die HIT II in der Regel ca. 5-10 Tage nach Erstexposition mit Plättchenzahlen unter 50.000/ μ l in Erscheinung. Bei einer Re-Exposition kann sie jedoch schon wenige Stunden nach erneuter Gabe auftreten. Viel gefürchteter als der Thrombozytenabfall ist die Gefahr thromboembolischer Prozesse, die durch die Thrombinaktivierung entstehen können. Dabei kann es zu venösen oder arteriellen Gefäßverschlüssen mit klinisch schwerwiegenden Folgen kommen [Greinacher et al., 1991; Warkentin et al., 2004b]. Die Diagnostik stützt sich insbesondere auf das klinische Bild und setzt regelmäßige Thrombozytenmessungen vor und während der Heparingabe voraus. Daneben können spezielle Labortests zur Bestätigung der Diagnose herangezogen werden.

Dabei werden die funktionellen Tests (Aggregationstests, ¹⁴ C-Serotonin-Fresetzungstest, „Heparin-induced platelet activation“ Assay) von den sogenannten Antigen-Tests (wie PF4-Heparin Enzym Immunoassay) [Warkentin et al., 2004a] unterschieden.

Zu beachten ist, dass bei Auftreten thromboembolischer Ereignisse unter Heparingabe dies nicht als „Unterdosierung“ des Heparins verkannt wird, sondern das sofortige Absetzen des Heparins eingeleitet wird. Dies sollte in jedem Verdachtsfall auf eine HIT erfolgen. Um weitere thromboembolische Ereignisse zu verhindern, müssen alternative Antikoagulantien eingesetzt werden. Dazu eignen sich Danaparoid, eine heparinähnliche Substanz und rekombinantes Hirudin, sowie neuere Thrombinantagonisten [Chong et al., 2004; Greinacher et al., 2004].

2.2.4 Immunthrombozytopenie durch Gold

Nach Gabe von Goldpräparaten kann es nach Bildung thrombozytärer Autoantikörperbildung zu einem Abfall der Plättchenzahl kommen. Antikörper, die bei Patienten mit goldinduzierter Immunthrombozytopenie auftreten, lassen sich serologisch nicht von den Antikörpern unterscheiden, wie sie bei einer normalen Autoimmunthrombozytopenie vorkommen. Nur durch die Beobachtung des zeitlichen Zusammenhangs zwischen Medikamenteneinnahme und Thrombozytopenie ist eine Differenzierung möglich. Anders als bei anderen medikamentabhangigen Thrombopenien, ist die in-vitro-Reaktion bei der durch Gold induzierten Thrombopenie unabhängig von der Zugabe des Medikaments [Kiefel et al., 1993]. Inzwischen wurde festgestellt, dass das Zielantigen dieser Antikörper das GP V ist [Garner et al., 2007].

2.2.5 Thrombozytopenie durch Penizillin

Auch bei Einnahme von β -Laktam-Antibiotika sind in seltenen Fällen Hämolyse beschrieben worden [Shulman et al., 1994; Kiefel et al.; 1993]. Es ist bekannt, dass Verbindungen mit einem geringen Molekulargewicht (Haptene) die Produktion von Antikörpern stimulieren können, wenn sie sich zuvor kovalent an autologe Strukturen von Blutzellen gebunden haben. Bei einer späteren Exposition kann sich ein Medikamenten-Membran-Protein-Komplex formieren und die gebildeten Antikörper können an diesem Komplex reagieren. Die Folge ist eine Zerstörung vorwiegend von Erythrozyten, aber auch Blutplättchen können betroffen sein [Aster et al., 1999].

2.2.6 Therapie einer durch Medikamente ausgelösten Immunthrombozytopenie

Bei Thrombozytopenien, die durch die beschriebenen immunologischen Reaktionen nach Gabe von Medikamenten ausgelöst werden, ist die wichtigste Maßnahme das sofortige Absetzen des auslösenden Medikaments.

Danach ist in der Regel innerhalb kurzer Zeit ein Anstieg der Plättchenzahl zu beobachten.

Steigen die Thrombozytenzahlen einige Tage nach Beendigung des Medikamentes nicht wesentlich an, so können hochdosiert intravenöse Immunglobuline oder Kortikoide gegeben werden. Bei der durch GP IIb/IIIa-Antagonisten ausgelöste Thrombopenie sind bei Blutungskomplikationen infolge extrem niedriger Thrombozytenzahlen Thrombozytentransfusionen wirksam. Thrombozytopenien die durch andere Medikamente ausgelöst werden, sollten nur bei unmittelbar drohender Gefahr von lebensbedrohlichen Blutungen mit Plättchentransfusionen therapiert werden, [Kereiakes et al., 1996]. Da Thrombozytentransfusionen im Zusammenhang mit medikamentinduzierten Immunthrombozytopenien die Thrombozytenzahl nicht wirksam anheben, ist eine prophylaktische Wirkung nicht zu erwarten [Kiefel et al., 1993].

2.3 Pseudothrombozytopenie

Eine wichtige Differentialdiagnose bei einer Thrombozytopenie stellt die bei Patienten meist spontan beobachtete Pseudothrombopenie dar [Sane et al., 2000; Stiegler et al., 2000]. Sie ist durch Plättchenaggregate insbesondere mit EDTA-antikoagulierten Blutproben charakterisiert. Durch diese Verklumpungen kann es zu einer falsch niedrigen Auszählung des Zellzählgerätes kommen. Deshalb ist die zusätzliche Anfertigung eines Blutausstrichs sinnvoll, um solche Phänomene auszuschließen.

2.4 Fragestellungen

1. Bisher waren die im Zusammenhang mit der Gabe von Abciximab auftretenden Effekte auf Thrombozyten (Auftreten einer Thrombozytopenie, Feststellung von Antikörperbindung an Thrombozyten, Entstehung einer Pseudothrombozytopenie) meist retrospektiv untersucht worden.

Deshalb sollte nun in einer prospektiven Untersuchung geklärt werden, wie häufig natürliche (präformierte) Antikörper gegen Abciximab-beladene Thrombozyten vorkommen, ob freie Antikörper vor Medikamentgabe mit glykoproteinspezifischen Antikörper auf GP IIb/IIIa korrelieren und ob es einen Zusammenhang gibt zwischen der Konzentration der gefundenen Antikörper und dem Ausmaß eines Thrombozytenabfalls und der Wahrscheinlichkeit, mit der es zu einer Pseudothrombozytopenie kommt.

In einem zweiten Schritt sollte versucht werden, die Struktur aufzuklären, mit der Antikörper gegen Abciximab-beladenen Thrombozyten regieren.

2. Bislang wurde davon ausgegangen, dass der Nachweis medikamentenabhängiger Antikörper (ddAb) vom Chinidintyp ein für medikamentinduzierte Immunthrombozytopenien spezifischer Befund ist. Dabei existieren derzeit keine Daten dazu, ob solche Antikörper auch spontan im Serum/Plasma gesunder Individuen vorkommen. Daher wurden 50 Serum gesunder Blutspender in einem ELISA zur Bestimmung medikamentenabhängiger thrombozytärer Antikörper auf das Vorhandensein solcher Antikörper untersucht. Substanzen die bei dieser Untersuchung mit einbezogen wurden, waren:

Chinin, Chinidin, Rifampicin, Cotrimoxazol, Carbamazepin, Vancomycin sowie Ibuprofen.

Ob Patienten, die diese Substanzen einnehmen, ohne dass es zu einer Thrombozytopenie kommt, häufiger medikamentabhängige Antikörper bilden ist ebenfalls nicht bekannt wurde im Rahmen dieser Studie jedoch nicht untersucht.

3.1 Reagenzien

MAIPA

Lösungen/Puffer

Siehe auch ELISA

Substratlösung

4 Tabletten zu je 2 mg 1,2-Phenylendiamin
werden in 12 ml A.dest. in Dunkelheit gelöst
und 5 µl H₂O₂ 30%ig werden unmittelbar vor Gebrauch zugegeben

Puffer

Coating-Puffer (zur Beschichtung der Vertifungen von Mikrotiterplatten mit Protein)

1,59 g Na₂CO₃
0,2 g NaN₃ in 1000 ml in destilliertem Wasser aufgelöst
der pH-Wert sollte bei 9,6 liegen

TBS-Waschpuffer

1,21 g Tris werden in 950 ml isotonischer NaCl gelöst
5 ml Triton X-100
0,5 ml Tween 20
0,5 ml 1M CaCl₂ hinzupipettieren, bis auf 1000 ml mit 0,9%iger NaCl-Lösung
aufgefüllt

Solubisationspuffer

1,21 g Tris werden in 950 ml isotonischer NaCl gelöst
und auf pH-Wert 7,4 eingestellt
danach 5 ml Triton X-100 hinzugegeben
und bis 1000 ml mit NaCl 0,9% aufgefüllt

Antikörper

- Ziege-Anti-Maus-IgG der Firma Dianova, Bestell Nr. 115-005-071
- Peroxidase-markiertes Anti-Human-IgG, Firma Dianova, Bestell Nr. 109-035-098
- Monoklonale Antikörper gegen thrombozytäre Glykoproteine

Glykoprotein	Klon	Hersteller/ Vertrieb
GP IIb/IIIa	P2	Coulter Immunotech
GP Ib/IX	FMC25	Firma Linaris, Best.Nr. MAK 0594
GP Ia/IIa	Gi9	Beckmann-Coulter Best.Nr. IM-0717
GP IIb/IIIa	SW 16	Hiss Diagnostics, Best.Nr. M1637
GP IIb/IIIa	Gi5	Institut für klinische Immunologie und Transfusionsmedizin (Dr. Santoso)
GP IIIa	SZ21	Beckmann-Coulter, Best.Nr. IM-0540

Monoklonale 7E3 Antikörper: Geschenk von Prof. Barry Coller

ReoPro/ Abciximab: Lilly Pharma Holding GmbH

- Beads mit Maus-IgG gekoppelt: Maus-IgG auf CN-Br-Sepharose (Dr. S. Santoso, Universitätklinikum Gießen, Institut für klinische Immunologie und Transfusionsmedizin
- humanes Fab-Fragment: Firma Dianova/ Jackson Immuno-Research, Hamburg

ELISA

Lösungen/Puffer

NaCl 0,9 %

PBS-BSA 2 %

PBS nach Dulbecco 10 x(80 g NaCl, 2 g KCl, 16,92 g Dinatriumhydrogenphosphat x 2 H₂O, 2 g Kaliumdihydrogenphosphat) in 1:10 destilliertem Wasser verdünnen, pH-Wert auf 7,2 einstellen, danach Rinderalbumin bis zu einer BSA-Endkonzentration von 2% hinzugeben

Puffer

Substratpuffer für alkalische Phosphatase, Firma Sigma-Aldrich Chemie GmbH, BestNr. 50942, Tabletten 5 mg

Diethanolamin 44,2 g

Natriumazid 0,1 g

Mg-Chlorid 6 H₂O 0,05 g

Aqua dest. zu 500 ml

Wird mit 1 M HCl eingestellt auf einen pH-Wert von 9,8

Enzymmarkierte Antikörper („Konjugat“)

Alkaline Phosphatase-conjugated Affini Pure F(ab`)₂ Fragment , Goat Anti-Human IgG, Fcγ Fragment specific (minimal cross-reaction to bovine, horse and mouse serum proteins)
Firma Dianova, Best.Nr. 109-056-098

Medikamente

alle hier aufgeführten Medikamente wurden als Reinsubstanzen über die Firma Sigma-Aldrich bezogen

Carbamazepin

Chinin (Quinin)

Chinidin (Quinidine)

Diclofenac Sodium

Rifampicin Crystalline

Sulfamethoxazol

Trimethoprim Crystalline

Vancomycin Hydrochloride

3.2 Blutentnahme und Durchführung der entsprechenden Untersuchungen

Bei den 52 Blutproben der Abciximab-Studie handelte es sich um Proben von Patienten der Abteilung für Kardiologie der Universität Rostock, die im Rahmen invasiver kardiologischer Eingriffe zur Prophylaxe thromboembolischer Komplikationen Abciximab erhielten. Es wurde zu drei verschiedenen Zeitpunkten Blut entnommen. Kurz vor Abciximab-Gabe wurden jeweils ein EDTA-Röhrchen und ein Blutröhrchen ohne gerinnungshemmende Zusätze gewonnen. Diese Proben wurden als „Probe 0“ definiert. Als Probe 1 wurde ein EDTA-Röhrchen 2-4 Stunden nach Abciximab-Gabe entnommen. 24 Stunden nach Abciximab-Gabe wurde eine weitere EDTA-Probe (Probe 2) abgenommen. Die Entnahmzeitpunkte entsprachen denen, die der Hersteller von Abciximab zur Überwachung der Thrombozytenzahl bei Gabe des Medikaments vorschlägt. Die Patienten hatten zuvor der Untersuchung der Proben im Rahmen dieser Studie zugestimmt.

In den EDTA-Proben 0-2 wurden die Thrombozyten bestimmt sowie GP IIb/IIIa spezifische Antikörper, auf den autologen Thrombozyten („direkter MAIPA“) durchgeführt werden. Die Blutausstriche der Proben 0-2 wurden im Lichtmikroskop auf mögliche Thrombozytenaggregate hin untersucht.

Zusätzlich wurden mit Serumprobe 0 freie thrombozytäre Antikörper im indirekten MAIPA bestimmt.

Die Thrombozytenmessung erfolgte im EDTA-Blut mit dem Hämatologieanalysegerät Sysmex KX 21.

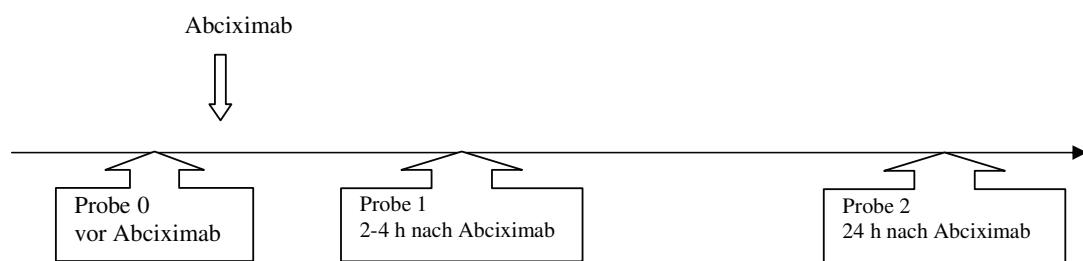


Abbildung 4: Ablauf der Blutentnahmen

3.3 Fallbeschreibung: Patient mit verzögerter Thrombozytopenie nach Abciximab-Infusion

Ein 70jähriger Mann wurde am 27.05.2005 um 21:44 Uhr in die Notaufnahme des Universitätsklinikum Rostock eingeliefert. Wie dem Aufnahmeprotokoll zu entnehmen ist, habe er plötzlich gürtelförmige Oberbauchschmerzen, Übelkeit, Erbrechen sowie Schüttelfrost entwickelt.

Das klinische Labor bei Aufnahme um 21:55 Uhr sah wie folgt aus: Na 138 mmol/l, K 2,7 mmol/l, Ca 2,2 mmol/l, CRP 2,93 mg/l, Trop-T 0,31 ng/ml, CK 250 U/l, CK-MB 13,8 U/l. Die CK stieg im weiteren Verlauf auf einen Maximalwert von 1159 U/l, die CK-MB auf 87,7 U/l.

Im Blutbild zeigte sich keine Anämie, aber eine Leukozytose mit 17.600/ μ l. Die Thrombozyten lagen mit 273.000/ μ l im Referenzbereich. Außer einer leicht verkürzten PTT (22,7 s) waren die weiteren Gerinnungsparameter unauffällig.

Bei Ableitung eines EKGs wurde ein AV-Ersatzrhythmus mit intermittierenden AV-Leitungsstörungen, ST-Anhebung in VB1-3 festgestellt. Im weiteren Verlauf zeigten sich im EKG T-Negativierungen in Ableitung III und aVF. Noch in derselben Nacht wurde eine Notfallkoronarangiographie durchgeführt, bei der folgende Befunde erhoben wurden:

- akuter inferiorer Myokardinfarkt mit anteriorer Ischämie
- bei RCA-Verschluss und kritischer RIVA-Abgangsstenose

Durch die sich anschließende PTCA um 00:03 Uhr konnte der RCA-Verschluss rekanalisiert und zwei Stents implantiert werden.

Zur Vermeidung ischämischer kardialer Komplikationen wurde ca. zehn Minuten vor der Angioplastie 10 ml Abciximab (=ReoPro) als Bolus injiziert. Eine Abciximab-Infusion lief anschließend über einen Perfusor mit 3,2 ml/h für weitere 12 h (bis 13:00 Uhr des Folgetags). Zusätzlich erfolgte die Gabe von 500 IE/h Heparin. Zur Prämedikation wurden 500 mg Aspisol, 1 mg Atropin sowie Dopamin verabreicht. Während der PTCA wurden zudem 20 ml Xylocitin, 0,2 mg Verapamil, 2x 0,5 mg Atropin, 0,125 mg Trinitrosan sowie 10 mg MCP injiziert.

Die orale Medikation der kardiologischen Wacheinheit (KWE) nach erfolgreicher PTCA bestand am 28.05.05 in der Gabe von 75 mg Iscover, 100 mg ASS, 1,25 mg Delix, 300mg Allopurinol, 40 mg Sortis, 1,25 mg Concor.

Bei rückläufigem CK (755 U/l) und CK-MB (42,3 U/l) am 30.05.2005 erfolgte die Übernahme des Patienten auf die Innere Station der Universität Rostock.

Wie bereits auf der KWE geschehen, wurden auch hier zur Überwachung der Thrombozytenzahlen regelmäßig Blutbildkontrollen durchgeführt.

Abbildung 5 zeigt den Verlauf der Thrombozytenzahlen. Es ist zu erkennen, dass die Plättchenzahl am 6. Tag nach Abciximab-Gabe auf 88.000/ μ l und drei Tage später auf 25.000/ μ l abfiel. Der Minimalwert von 19.000/ μ l wurde 10 Tage nach Abciximab-Gabe (07.06.2005) erreicht. Die Thrombozytenzahl blieb bis zum 08.06 unter 25.000/ μ l VB. Erst am 09.06. konnte ein Anstieg auf 41.000 Thrombozyten/ μ l registriert werden, ohne Gabe von Thrombozytenkonzentraten.

Trotz der geringen Thrombozytenzahl zeigte der Patient keine Anzeichen einer Blutungsneigung. Daher konnte der Patient am 10.06.2006 in ein Reha-Zentrum entlassen werden. Dort befanden sich bei Aufnahme die Thrombozytenzahlen mit 141.000/ μ l fast wieder im Normbereich.

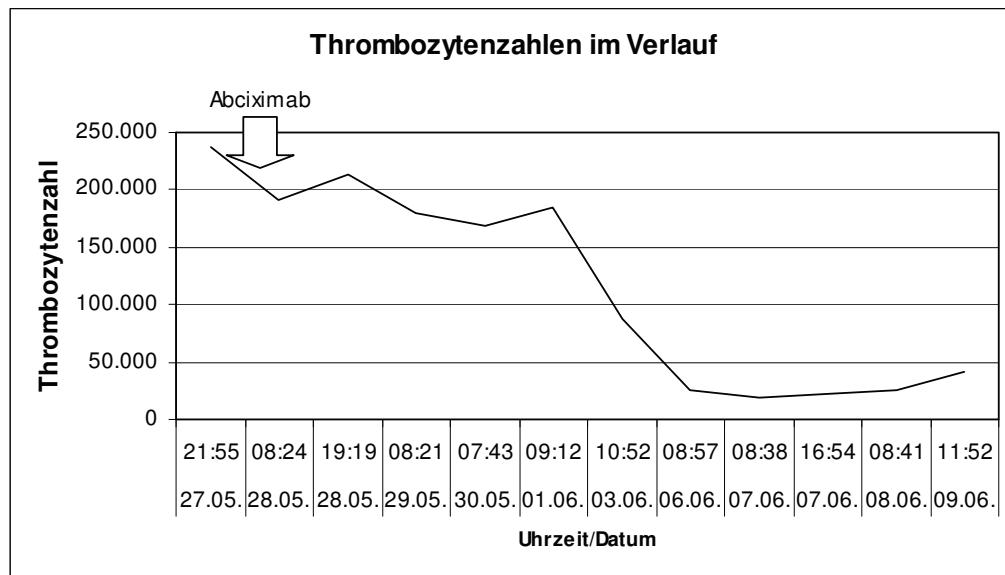


Abbildung 5: Verlauf der Thrombozytenzahlen. Es wird deutlich, dass erst am 6. Tag nach Abciximab-Gabe die Thrombozytenzahl abfällt, und am 10. Tag den Minimalwert von 19.000/ μ l zu erreicht.

3.4 Isolierung von Thrombozyten für immunologische Tests

Für die Untersuchung von Seren oder Plasmen auf thrombozytäre Antikörper wurden Thrombozyten gesunder Spender untersucht.

EDTA-Blut wurde zunächst 20 Minuten bei 120 g zentrifugiert, danach der Überstand des plättchenreichen Plasmas vorsichtig abgenommen. Nach Auffüllen des Überstandes zu gleichen Teilen mit EDTA 0,5 % (welches in NaCl gelöst war und mit Dulbeccos PBS 10 x auf pH 6,5 eingestellt wurde) konnte bei 1700 g 10 Minuten zentrifugiert werden. Danach wurde der Überstand (plättchenarme Plasma) vorsichtig abgekippt und das Thrombozytensediment in isotonischer NaCl-Lösung resuspendiert. Dieser Waschvorgang wurde dreimal bei 1700 g für 10 Minuten wiederholt.

Nach dem letzten Waschvorgang wurde das Thrombozytensediment in 1 ml isotonischer Kochsalzlösung mit 0,1 %iger NaN₃-Lösung resuspendiert.

Erst kurz vor dem Einsatz im ELISA oder MAIPA wurde mit dem Zellcounter die Dichte der Plättchen in den Suspensionen bestimmt und auf eine Thrombozytenzahl von 200.000/ μ l mit 0,1 %igem NaN₃/100 ml isotonischer Kochsalzlösung eingestellt.

3.5 Blutausstrich

Mit dem EDTA-Blut der Proben 0- 2 wurden Blutausstriche angefertigt. Dies diente der Erkennung von Aggregaten.

Die Ausstriche wurden im Mikroskop bei 1000facher Vergrößerung und Ölimmersion beurteilt.

Auswertung

Zur Objektivierung der Thrombozytenaggregate wurden folgende Scores verwendet:

Aggregate	Score	Beschreibung
keine Aggregate	0	
kleine Aggregate bis ca. 10 Thrombozyten	1	
kleine und größere Aggregate	2	zwischen 11 und 19 Thrombozyten/ pro Aggregat; ca. 10-29 μ m*
große Aggregate	3	ca. 20-40 Thr./Aggregat; 30-60 μ m*

*anhand der Erythrozytengröße abgeschätzt

Beispielhaft sind in **Abbildung 14** (S. 45) verschiedene große Aggregate zu sehen. Diese Untersuchung wurde zur Detektion einer möglichen Pseudothrombozytopenie durchgeführt, die als Differentialdiagnose einer echten Thrombozytopenie gilt.

3.6 Nachweis thrombozytärer Antikörper im Serum (indirekter MAIPA-Assay)

Prinzip

Der MAIPA-Assay (monoclonal antibody immobilization of platelet antigens) ist ein glykoproteinspezifischer Test zum Nachweis thrombozytärer Antikörper [Kiefel et al., 1987b; Kiefel, 2000; Kiefel et al., 2003b].

Dabei wird das zu untersuchende Serum mit Testthrombozyten inkubiert, wodurch sich eventuell vorhandene Antikörper an Glykoproteine der Thrombozytenmembran anlagern. Nach dieser ersten Inkubation dient ein Waschschritt der Entfernung ungebundener Antikörper. Durch Zugabe eines monoklonalen glykoproteinspezifischen Antikörpers von der Maus wird das zu interessierende Glykoprotein markiert, das auch als Zielantigen für den zu untersuchenden humanen Antikörper vermutet wird. Anschließend an diese Inkubationsphase werden ungebundene Reste des monoklonalen Antikörpers durch Waschen entfernt und die Thrombozyten durch Zugabe eines Solubilisationspuffers lysiert.

Das so gewonnene Solubilisat wird in Vertiefungen einer Mikrotitplatte die mit Ziege-Anti-Maus-IgG beschichtet sind pipettiert. Das zuvor mit dem spezifischen monoklonalen Antikörper markierte Glykoprotein wird so an die Festphase immobilisiert.

Befindet sich ein humaner Antikörper am Glykoproteinkomplex, so wird dieser mit Enzym-markiertem Substrat (Ziege-Antihuman-IgG) sichtbar gemacht.

Durchführung

Der MAIPA-Assay wurde in Anlehnung an das von Kiefel et. al. (1987b) beschriebene Protokoll durchgeführt.

Dazu wurden $20 * 10^6$ intakte Thrombozyten [Kiefel et al., 2003b] von Spendern mit unterschiedlichem HPA-Muster in Eppendorfröhrchen pipettiert und diese mit 100 μ l NaCl 0,9 % bei 10500 g für eine Minute zentrifugiert.

Nach Absaugen des Überstands konnte das Sediment in 30 µl PBS-BSA 2 % aufgeschwemmt werden. Mit Zugabe von 50 µl Patientenserum bzw. einer Positivkontrolle, wurde der Ansatz bei 37° C für 30 Minuten inkubiert. Als Positivkontrolle diente ein Serum mit Anti-HPA-1a.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der Ansatz mit 100 µl NaCl gewaschen, 30 µl PBS-BSA 2 % sowie 10 µl monoklonaler Antikörper (z.B. Anti-GP IX) zugegeben und für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert.

Eventuell ungebundene Antikörper wurden durch dreimaliges Waschen mit NaCl 0,9% im Reaktionsansatz entfernt. Danach wurde auf das Pellet 100 µl Solubilisationspuffer aufgebracht, gemischt und bei 4 °C 30 Minuten inkubiert. Dieser Vorgang diente der Lysierung der Thromboyzenzellmembran. Die Entfernung partikulärer nicht lysierbarer Bestandteile gelang durch 30-minütige Zentrifugation bei 14.000 g und 4 °C.

Vom Lysat wurden 50 µl in 200 µl TBS-Waschpuffer verdünnt und je 100 µl als Doppelansatz in eine Mikrotiterplatte pipettiert, die mit Ziege Anti-Maus IgG beschichtet worden war. Als Leerwert diente TBS-Waschpuffer. Danach musste der Ansatz für weitere 90 Minuten bei 4° C inkubiert werden. Die Beschichtung der Mikrotiterplatte mit Ziege Anti-Maus IgG erfolgte am Vortag mit 100 µl einer Lösung aus 12 ml „Coating-Puffer“ und 23 µl GAM-IgG der Firma Dianova. Vor Einsatz der Platte im MAIPA musste sie durch viermaliges Waschen „geblockt“ werden, indem mit 200 µl TBS-Waschpuffer pro Vertiefung gewaschen wurde. Das vierte Mal verblieb der Puffer ca.15 Minuten auf der Platte. Das Vorgehen verhindert die Anlagerung von weiteren Proteinen an die Wand der Mikrotiterplatte.

Nach Ende der Inkubationszeit von 90 Minuten mit dem Solubisat wurde die Festphase fünfmal mit je 200 µl TBS-Waschpuffer pro Vertiefung gewaschen. Dann wurde mit 100 µl Konjugat, bestehend aus Ziege-Anti-Human-IgG, für zwei Stunden bei 4° C inkubiert. Nach sechsmaligem Waschen, wurden 100 µl einer Substratlösung in alle Wells gegeben und 15 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Die Substratlösung enthielt 12 ml Aqua dest., in das vier OPD-Tabletten gegeben wurden. Kurz vor dem pipettieren in die Mikrotiterplatte wurden 5 µl 2,5 N H₂O₂ hinzugegeben. Um die Enzymreaktion zu stoppen, mussten 50 µl 2,5 n Schwefelsäure (H₂SO₄) zugegeben werden.

Die Farbreaktion wurde im Photometer bei einer Wellenlänge von 492 nm und einer Referenzwellenlänge von 602 nm bestimmt. Nach Abzug des „blank“-Wertes wurden Reaktionen >0,2 als positiv bewertet.

3.7 Direkter MAIPA:

Prinzip

Im direkten MAIPA werden die sich bereits *in vivo* angelagerten Antikörper an thrombozytäre Glykoproteine zirkulierender („autologer“) Plättchen nachgewiesen. Da bei dieser Fragestellung sich die Antikörper auf den autologen Thrombozyten befinden, werden diese isoliert und gleich mit einem monoklonalen Antikörper inkubiert. Die Inkubation mit dem Humanserum entfällt daher.

Die weiteren Schritte verlaufen ansonsten gleich wie der indirekte Test.

3.8 Indirekter MAIPA mit Abciximab-beladenen Plättchen

Die nachfolgend beschriebenen Experimente dienen dem Nachweis von Antikörpern, die mit GP IIb/IIIa reagieren, an das sich zuvor Abciximab gebunden hatte.

Prinzip

Mit dem folgenden beschriebenen Experiment soll geklärt werden, ob sich Antikörper, die mit Abciximab beladenen Plättchen reagieren, sich auch an Fab-Fragmente aus normalem humanem IgG binden.

Thrombozyten werden mit einer Abciximablösung (1:50 mit 0,9%iger NaCl-Lösung verdünnt) vorinkubiert, das sich dann an den GP IIb/IIIa-Komplex der Thrombozyten bindet. Nach dem Waschen inkubiert man das zu untersuchende Serum mit den Testthrombozyten. Anschließend wird, nach erneutem Waschvorgang, ein monoklonaler Antikörper gegen GP IIIa (SZ 21) zugegeben. Der weitere Verlauf entspricht dem oben beschriebenen indirekten MAIPA.

Bei einem positivem Reaktionsausfall werden die Seren in einem zweiten Versuch mit Fab-Fragment vorinkubiert, welches Bestandteil von Abciximab ist. Anschließend werden die vorabsorbierten und nicht-vorabsorbierten Seren im indirektem MAIPA mit Abciximab eingesetzt. Fällt die Reaktion nach Fab-Absorption der Seren negativ aus (bei positiver Reaktion ohne Absorption), haben sich die Abciximab-abhängigen Antikörper an das Fab-Fragment gebunden. Diese Antikörper lassen sich durch Fab-Fragment hemmen (dies soll in Abschnitt 3.9 nochmals näher erläutert werden)

Durchführung

Dieser Test wurde mit geringen Modifikationen des indirekten MAIPA durchgeführt.

In Eppendorfgefäß wurden 20×10^6 Thrombozyten des Patienten pipettiert, die mit 100 μl isotonischer NaCl-Lösung gewaschen und in 30 μl PBS-BSA 2% aufgeschwemmt wurden. Danach wurden die Thrombozyten für 15 Minuten mit einer Abciximab-Verdünnung (1:50 mit 0,9%iger NaCl-Lösung verdünnt, entspricht einer Abciximab-Konzentration von 0,8 μg) sowie jeweils ein Ansatz mit isotonischer NaCl-Lösung mit einem Volumen von 20 μl bei Raumtemperatur inkubiert [Curtis et al., 2002]. Die anschließenden Waschvorgänge dienten der Entfernung von ungebundenem Abciximab. Nach Zugabe von 30 μl PBS-BSA 2 % wurden nun je 50 μl der zu untersuchenden Seren sowie ein positives Kontrollserum (Anti HPA 1a/ a) hinzupipettiert und gut gemischt. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten bei 37° C wurden die Thrombozyten gewaschen und in 30 μl PBS-BSA 2% suspendiert. Danach wurde der monoklonale Antikörper SZ 21, der gegen eine Determinante auf dem GP IIIa gerichtet ist, mit einem Volumen von 10 μl zugegeben und ebenfalls gut gemischt. Nach Ablauf der Inkubation von 30 Minuten bei 37° C wurde dreimal mit 100 μl 0,9% NaCl-Lösung gewaschen.

Mit Zugabe von 100 μl Solubilisationspuffer auf das Sediment wurden die Thrombozyten 30 Minuten bei 4° C inkubiert und damit lysiert. Der weitere Testverlauf wurde wie bereits beim indirekten MAIPA beschrieben durchgeführt. Zur Veranschaulichung soll **Abbildung 6** dienen.

Eine Reaktionsstärke von >0,3 wurde als positiv bewertet.

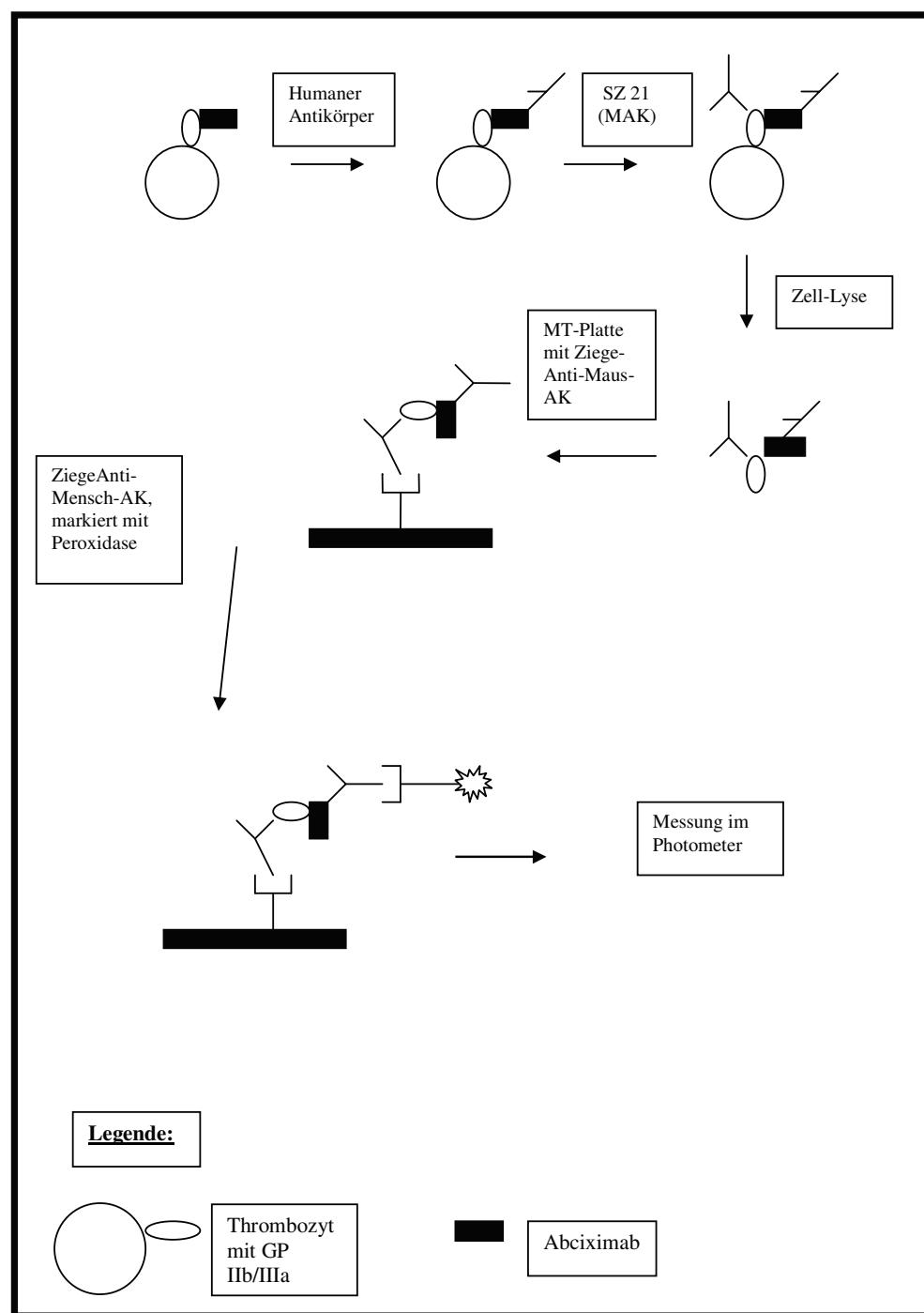


Abbildung 6: Nachweis von Antikörpern gegen den thrombozytären GP-Komplex, der mit Abciximab beladen ist.

MT-Platte= Mikrotiterplatte, AK= Antikörper

3.9 Indirekte MAIPA mit Fab-Vorabsorption

Zur Klärung der Frage, ob Antikörper gegen Thrombozyten, die mit Abciximab beladen sind mit humanem Fab-Fragment reagieren, wurden die zu untersuchenden Seren mit humanen Fab-Fragmenten vorinkubiert.

Durchführung

Die positiven Seren im indirekten MAIPA mit Abciximab-markierten Thrombozyten wurden unterschiedlich mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt, um später der Bestimmung der Antikörperstärke zu dienen (Titrationsversuch). Dann wurden jeder Serumverdünnung 5 µl des humanen Fab-Fragmentes zugegeben und nach sorgfältigem mischen eine Stunde bei 37° C inkubiert. Diese Seren mit Fab-Fragment und die jeweiligen Verdünnungen ohne Fab-Vorabsorption wurden zu 50 µl im MAIPA mit Abciximab-markierten Plättchen eingesetzt. Die weitere Durchführung entspricht dem indirekten MAIPA mit Abciximab-markierten Plättchen.

Auswertung:

hier wurde eine Extinktion erst bei $\geq 0,3$ als positiv gewertet.

Tabelle 3: Auswertungsschema des indirekten MAIPA mit Fab-Vorabsorption

indir. MAIPA ohne Fab	indir. MAIPA mit Fab	Hemmbarkeit mit Fab
positiv ($>0,3$)	positiv ($>0,3$)	nein
positiv	negativ ($<0,3$)	ja

3.10 Teilversuch mit monoklonalem Antikörper 7E3

Fragestellung/ Prinzip

Der als Medikament verwendete Antikörper c7E3 (=Abciximab) ist ein humanisiertes Molekül mit Sequenzen aus variablen Anteilen des kompletten monoklonalen Antikörpers (MAK) 7E3 [Coller et al., 1995; Mascelli et al., 1999]. Um die Frage zu klären, ob die Antikörper in den zu untersuchenden Seren auch mit GP IIb/IIIa reagiert, an das der komplette murine Antikörper 7E3 gebunden ist, wurden Testthrombozyten mit diesem Antikörper vorinkubiert.

Die nächste Frage bestand darin, ob es sich bei positiven Reaktionen um Abciximab-spezifische Antikörper handelt, oder ob natürliche Antikörper gegen Mausbestandteile [Mascelli et. al. 1999, Curtis et. al. 2002] des MAK 7E3 vorliegen.

Da humane Seren nicht selten Antikörper gegen Maus IgG enthalten, die im MAIPA-Assay zu falsch positiven Reaktionen führen, muss bei den Experimenten mit 7E3 bei positiven Resultaten anschließend geklärt werden, ob diese durch solche Anti-Maus spezifischen Antikörper bedingt sind oder nicht. Der in der Routinediagnostik durchgeführte MAIPA-Assay vermeidet solche positiven Reaktionen durch die diagnostisch in diesem Zusammenhang nicht interessierenden Anti-Maus-Antikörper, indem erst die zu untersuchenden Seren mit den Thrombozyten inkubiert werden und dann die monoklonalen murinen Antikörper zum „markieren“ einzelner thrombozytärer Glykoproteine. Da in den hier geplanten Experimenten u.a. nach Antikörpern gegen „Neoantigene“ auf GP IIb/IIIa gesucht wird, an die sich zuvor der murine Antikörper 7E3 gebunden hat, werden positive Seren ein zweites mal untersucht, nachdem sie zuerst mit Beads inkubiert wurden, die mit Maus IgG beladen waren.

Zeigt sich bei Einsatz der vorabsorbierten Seren im 7E3-MAIPA ein negatives Resultat, ist von Maus-IgG-Antikörpern auszugehen.

Die gemeinsame Bewertung aller Ergebnisse des indirekten MAIPA-Assay mit Abciximab-markierten Plättchen (ohne/ mit Fab-Vorabsorption) und der Testung mit dem MAK 7E3 (ohne/ mit Beads) lassen dann Schlüsse auf die Art der Antikörper durch Abciximab zu.

Durchführung

Gewaschene und in 30 μ l PBS-BSA 2% aufgeschwemmte Test-Thrombozyten (20×10^6) wurden für 15 Minuten mit 20 μ l des monoklonalen Antikörper 7E3 bei Raumtemperatur inkubiert. Dieser Antikörper wurde 1:50 mit NaCl-BSA 2% verdünnt (980 μ l NaCl-BSA 2% + 20 μ l MAK). Anschließend wurden die Thrombozyten mit 100 μ l NaCl gewaschen und in 30 μ l PBS-BSA 2% resuspendiert. Dann erfolgte die Zugabe von 50 μ l Serum. Dieser Ansatz wurde bei 37° C für 30 Minuten inkubiert.

Danach wurde 3x mit 100 μ l NaCl gewaschen, je 100 μ l des Solubisationspuffers hinzupipettiert und gut gemischt. Das weitere Vorgehen erfolgte dann wie beim normalen MAIPA.

Auswertung

Als positiv wurden alle Seren mit einer Extinktion $>0,2$ nach Abzug des Leerwertes gewertet. Diese positiven Seren wurden im 7E3-MAIPA mit Beads eingesetzt.

3.11 Absorption von Anti-Maus-IgG mit Maus-IgG gekoppelten Beads

Durchführung

Mit Maus-IgG beladene Beads, (präpariert von Dr. S. Santoso, Institut für Immunologie und Transfusionsmedizin, Universitätsklinikum Gießen) wurden im Eppendorfgefäß eine Minute bei 10000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Sediment in gleichem Volumen isotonischer Kochsalzlösung mit 0,1% Natriumacid (als Konservierungsmittel) resuspendiert. Alternativ konnten die Beads auch in NaCl 0,9% gelagert werden, wobei dann die Gefahr der Verkeimung größer war. Nach erneutem Zentrifugieren bei 10000 g und Abnahme des Überstandes wurde wieder in Natriumacid 0,1% resuspendiert.

Vor Einsatz der Beads wurden diese abzentrifugiert und der Überstand abpipettiert.

Zur Absorption wurden 200 µl Serum auf 50 µl der Beads-Suspension gegeben. Bei Raumtemperatur wurde dieser Ansatz für 30 Minuten inkubiert. Alle zehn Minuten wurden die Beads durchmischt. Dies erreichte man, indem mit dem Finger an das Eppendorfgefäß geklopft wurde.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Ansätze eine Minute bei 10000 g abzentrifugiert. Der Überstand (Serum) wurde nun in ein Eppendorfgefäß mit 50 µl Beads überführt. Die erneute Inkubation und Absorption erfolgte wie bereits beschrieben 30 Minuten bei Raumtemperatur.

Danach wurde bei 10000 g zentrifugiert und der Serum-Überstand konnte im 7E3-MAIPA eingesetzt werden. Dieser wurde, wie beschrieben, mit jeweils einem vorabsorbierten und nicht absorbierten Serum durchgeführt.

Auswertung:

Reaktionen >0,2 wurden als positiv gewertet

3.12 Bestimmung medikamentabhängiger thrombozytärer Antikörper in Blutspender-Seren

3.12.1 Blutspender

Bei der Suche nach medikamentabhängigen Antikörpern wurden 50 Seren analysiert. Diese stammten aus der Blutspendezentrale der Abteilung für Transfusionsmedizin am Universitätsklinikum für Rostock.

Den Blutspendern wurden zu ihrer normalen Blutspende zusätzlich zwei Serumröhrchen zu je 7 ml abgenommen.

Hierzu wurde den Blutspendern der Zweck, zu denen eine Probe von ihnen eingesetzt werden sollte erläutert und sie wurden schriftlich um eine Einwilligung gebeten. Noch am selben Tag der Blutentnahme wurden die Seren zwölf Minuten zentrifugiert, zu einem ml portioniert und eingefroren.

3.12.2 ELISA zum Nachweis medikamentabhängiger thrombozytärer Antikörper

||

Prinzip

Da medikamentabhängige Antikörper nur in Anwesenheit des jeweiligen Medikamentes mit Strukturen auf den Thrombozyten reagieren, wird dem eigentlichen Inkubationsansatz (Serum und Thrombozytensuspension), den Waschlösungen sowie der Konjugatverdünnung das Medikament in je zwei verschiedenen Verdünnungen zugegeben. Nur die Substratlösung bleibt frei von der Medikamentenverdünnung (**siehe Abbildung 8**).

Der Medikamenten-ELISA lehnt sich im Ablauf stark an einem im Labor der Transfusionsmedizin im Universitätsklinikum Rostock verwendeten Enzymimmuntest zum Nachweis normaler thrombozytärer Antikörper mit Thrombozyten in Suspension. Testthrombozyten werden im eigentlichen Inkubationsansatz mit dem zu untersuchenden Serum und der Medikamentenlösung inkubiert. Während der Inkubation können vorhandene Antikörper binden. Nach dem Waschen, das ungebundene Antikörper entfernt, wird mit Konjugat (Goat-Anti-Human-IgG mit alkalischer Phosphatase markiert) inkubiert, das an die humanen Antikörper bindet. Nach dem Waschen wird mit Substrat inkubiert. Dies wandelt die alkalische Phosphatase in ein farbiges Produkt um.

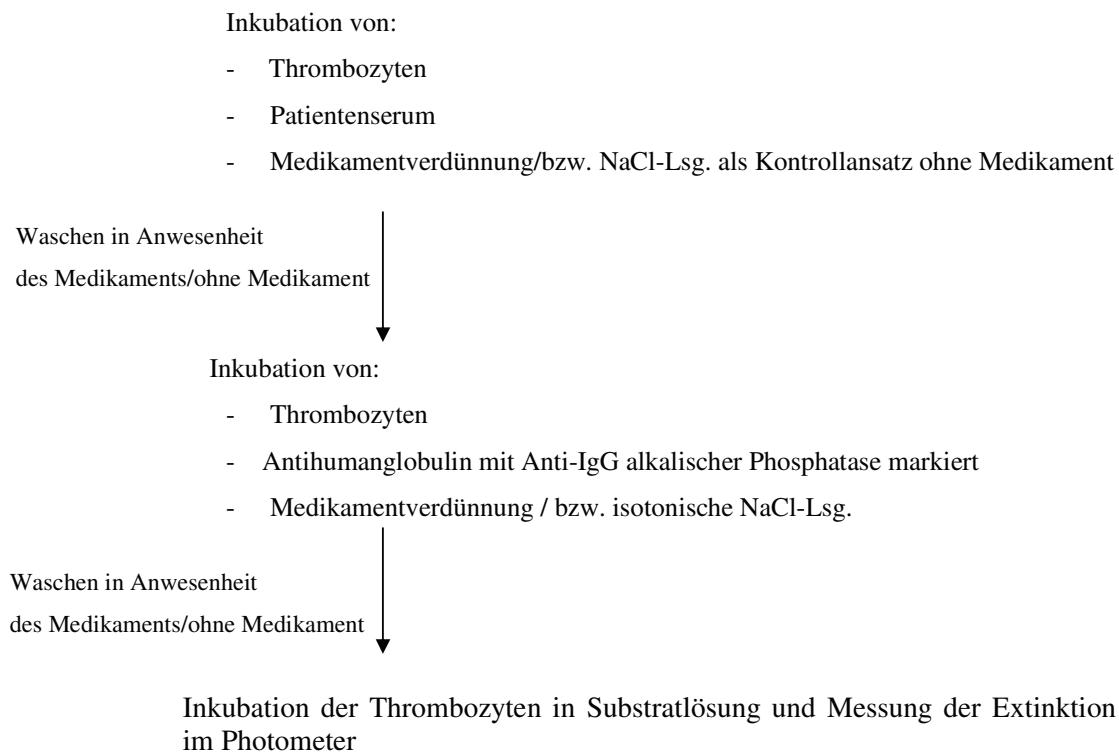


Abbildung 8: Ablauf des ELISA zur Bestimmung von medikamentabhängigen Antikörpern

Durchführung

Obwohl bisher nicht sicher bekannt ist, dass medikamentabhängige thrombozytäre Antikörper mit Alloantigenen auf thrombozytären Glykoproteinen reagieren, wurden Thrombozytensuspensionen von zwei unterschiedlichen Spendern zur Untersuchung der Spenderseren eingesetzt. Dazu wurden $20 \cdot 10^6$ Testthrombozyten pipettiert und mit 100 μl isotonischer NaCl eine Minute bei 10.000 g zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und mit 30 μl PBS-BSA 2 % resuspendiert. Nun wurden 20 μl NaCl-Lösung 0,9%ig bzw. 20 μl der 1:10 und 1:100 Medikamentverdünnung hinzupipettiert. Die Medikamenten-Verdünnungen wurden aus einer Grundverdünnung mit NaCl-BSA 0,2% hergestellt. Diese Grundverdünnung enthielt 10 mg des jeweiligen Medikaments, das in 10 ml 0,9 %iger NaCl aufgelöst wurde.

Im Anschluss wurden die Seren zu 20 μl pipettiert und gut mit der Pipette gemischt. Somit ergaben sich pro Spender sechs Ansätze. Pro Testreihe wurde zusätzlich eine Positivkontrolle und ein Blank-Ansatz mitgeführt. Als Positivkontrolle diente ein Serum mit Anti-HPA-1a Antikörpern, das ebenfalls zu 20 μl pipettiert wurde. Der Blank diente als Leerwert und bestand nur aus den Testzellen die im letzten Schritt mit Substrat inkubiert wurden.

Alle Ansätze wurden für 30 Minuten bei 37° C inkubiert. Im Anschluss daran wurden die Ansätze mit 100 µl isotonischer NaCl gemischt, eine Minute zentrifugiert und der Überstand abgesaugt (= Waschen). Dieser Vorgang wurde danach noch zweimal wiederholt.

Anschließend wurde das Pellet in 100 µl Konjugatverdünnung (Goat-Anti-Human IgG) resuspendiert. Die Konjugatverdünnung für die Positivkontrolle und die NaCl-Ansätze wurde mit NaCl-BSA 2 % hergestellt, für die Medikamentenansätze mit der 1:10 Medikamentenverdünnung. Das Verdünnungsverhältnis betrug, abhängig von der Reaktionsstärke der Antikörper, die in der Konjugataustestung ermittelt wurde, zwischen 1:40000 und 1:50000. Dieser Ansatz wurde erneut bei 37° C für 30 Minuten inkubiert.

Nach viermaligem Waschen wurden die Ansätze in 100 µl Substratlösung resuspendiert. Dazu wurde eine Tablette des Substrats in 5 ml eines Substratpuffers, der zuvor ca. 10 Minuten bei 37° C erwärmt wurde, aufgelöst.

Nach Inkubation des Ansatzes (30 Minuten in Dunkelheit bei 37°C) wurden die Thrombozyten bei 13 000 g eine Minute zentrifugiert. Der Überstand konnte zu 90 µl in eine mit zuvor 50µl NaOH- Lösung beschickte Mikrotiterplatte pipettiert werden. Dadurch wurde die Reaktion gestoppt.

Die Farbveränderungen wurden im Photometer bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen.

Auswertung

Reaktionen > 0,2 nm wurden als positiv gewertet.

Tabelle 5: Bewertung möglicher Resultate des ELISA zum Nachweis medikamentenabhängiger Antikörper

Thrombozyten	Medikament	Serum	Reaktion	Interpretation
+	+	Patient	+	Medikamentabhängige Antikörper
+	-	Patient	-	
+	+	Normalserum	-	
+	-	Normalserum	-	
<hr/>				
+	+	Patient	+	Autoantikörper oder Alloantikörper
+	-	Patient	+	
+	+	Normalserum	-	
+	-	Normalserum	-	
<hr/>				
+	+	Patient	+	unspezifische Adsorption von Ig durch Medikament an Thrombozytenmembran
+	-	Patient	-	
+	+	Normalserum	+	
+	-	Normalserum	-	
<hr/>				
+	+	Patient	-	
+	-	Patient	-	negatives Ergebnis
+	+	Normalserum	-	
+	-	Normalserum	-	

aus: Heparin-induced thrombozytopenia. p. 25-52 [Kiefel, 2004]

3.12.3 MAIPA-Assay zum Nachweis medikamentabhängiger thrombozytärer Antikörper

Prinzip

Da viele medikamentabhängige Antikörper mit den bekannten thrombozytären Glykoproteinen reagieren, wurde ihr Nachweis mit dem MAIPA-Assay versucht.

Dadurch kann u.a. das Glykoprotein bestimmt werden, gegen das der medikamentabhängige Antikörper gerichtet ist. Wie beim ELISA zur Bestimmung von medikamentabhängiger thrombozytärer Antikörper wird auch beim MAIPA mit Medikamenten jeder Lösung das zu untersuchende Medikament in einer Verdünnung beigefügt. Dies soll verhindern, dass die medikament-abhängigen Antikörper sich vom Antigen lösen und beim Waschvorgang entfernt werden.

Durchführung

Die Durchführung erfolgte, mit geringen Modifikationen, wie bereits beim normalen indirekten MAIPA beschrieben. Dem MAIPA mit Medikament wurde jeder Lösung die jeweilige Medikamentenverdünnung (1:10, 1:100 und NaCl) beigefügt. Das Medikament in Reinsubstanz wurde in isotoner Kochsalzlösung aufgelöst. Dazu wurden 10 mg Medikament in 10 ml NaCl-Lösung gebracht (1:2). Aus dieser Grundverdünnung wurden nun die 1:10 und 1:100 Verdünnung mit NaCl 0,9 % hergestellt. Diese NaCl-Verdünnungen dienten dem Waschen der Thrombozyten und der Verdünnung der Reagenzien. Nachdem 20×10^6 Thrombozyten gewaschen (in diesem Schritt noch mit 0,9 %iger NaCl ohne Medikament) und 30 μ l PBS-BSA 2 % aufgebracht wurden, konnten 20 μ l NaCl 0,9 % bzw. deren Medikamentverdünnung und 20 μ l des zu untersuchenden Serums zugegeben werden. Nach dem Mischen wurde dieser Ansatz für 30 Minuten bei 37° C inkubiert. In der Zwischenzeit konnte die 1:10 und 1:100 Verdünnung mit PBS-BSA 2 % sowie die Antikörper-Verdünnungen mit dem jeweils zu testenden Medikament hergestellt werden. Nach dem Waschvorgang wurden 30 μ l PBS-BSA 2 % in die Positivkontrolle und den NaCl-Ansatz pipettiert. In die 1:10 und 1:100 Medikamentenansätze kamen die jeweiligen PBS-BSA-Verdünnungen hinzu. Mit Zugabe von 10 μ l der monoklonalen Antikörper bzw. deren Medikamentenverdünnungen wurde gemischt und wieder bei 37° C für 30 Minuten inkubiert. In dieser Zeit konnten die Medikamentenverdünnungen mit TBS-Waschpuffer und Solubilisationspuffer vorbereitet werden.

Der weitere Ablauf konnte dann genauso durchgeführt werden, wie im indirekten MAIPA beschrieben, mit dem Unterschied, dass bei jedem Waschvorgang die Zugabe der verschiedenen Medikamentenverdünnungen notwendig war. Die Konjugatverdünnungen mit Medikament wurden erst kurz vor Einsatz hergestellt. Nur die Substratlösung blieb frei von Medikament (siehe Abbildung 7).

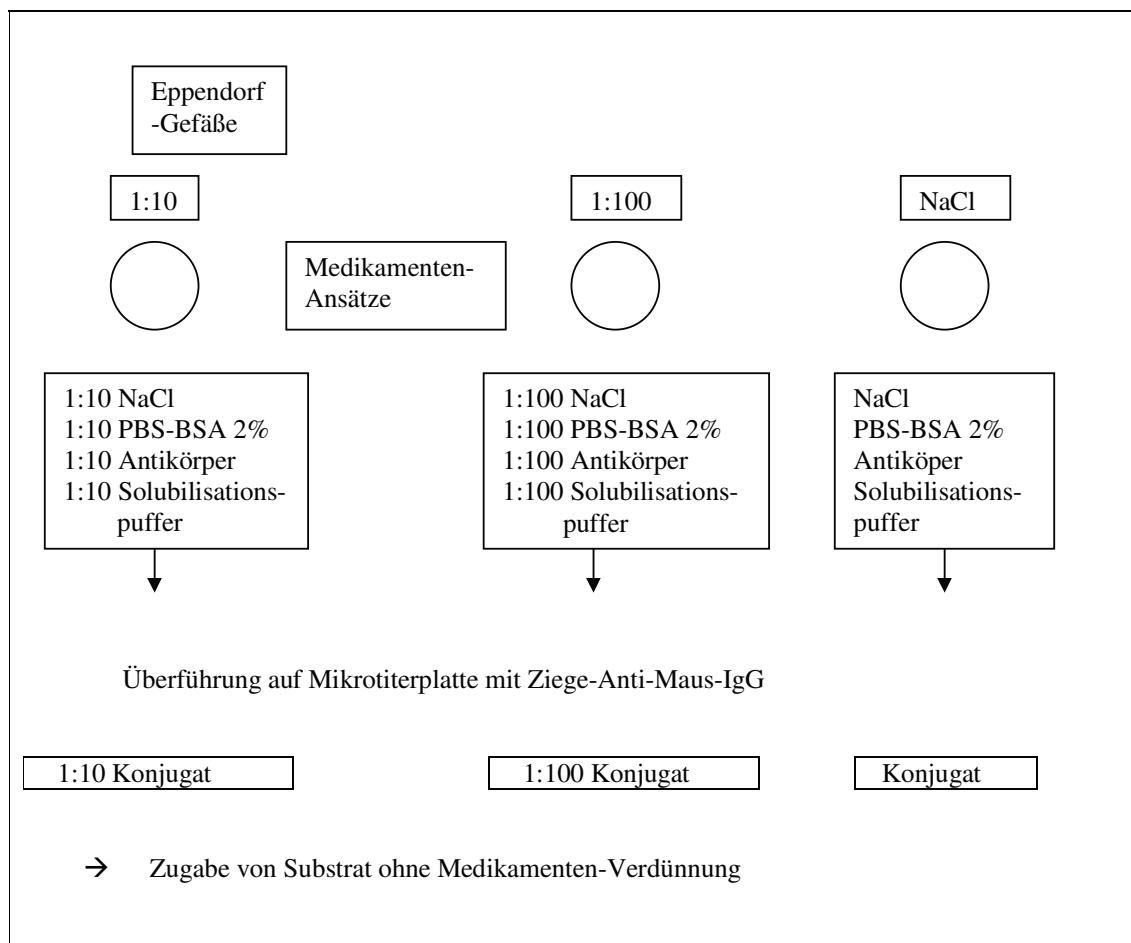


Abbildung 7: Nachweis medikamentabhängiger Antikörper gegen thrombozytäre Glykoproteine. 1:10; 1:100 bedeutet Ansatz enthält 1:10; 1:100 der Ausgangskonzentration der Medikamentenlösung

Auswertung:

Tabelle 4: Bewertung der Ergebnisse beim Medikamenten-MAIPA

Extinktionen >0,2	→ positiv
Positiv im Medikamenten-Ansatz	→ Medikament-abhängiger Antikörper gegen bestimmtes Glykoprotein gerichtet
Positiv im NaCl-Ansatz	→ Antikörper gegen bestimmtes Glykoprotein, Medikament-unabhängig

3.12.4 Fallbeschreibung: Patient mit Chinidin-Antikörper im Serum

Dieses Serum enthält Antikörper, die sich nur in Anwesenheit von Chinidin nachweisen lassen. Das Serum stammt aus dem Institut für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen. Leider gibt es zu dem Patienten keine weiteren Angaben über Thrombozytenzahl, Krankheitsgeschichte sowie dessen Medikation. Es war lediglich bekannt, dass Anlass zur Untersuchung eine Thrombozytopenie nach Gabe von Chinidin war.

ELISA zur Bestimmung medikamentabhängiger Antikörper

Bei Einsatz dieses Serums im ELISA zum Nachweis medikamentabhängiger Antikörper, der mit Chinidin-Verdünnungen von 1:10 und 1:100 durchgeführt wurde, zeigten sich folgende Reaktionen:

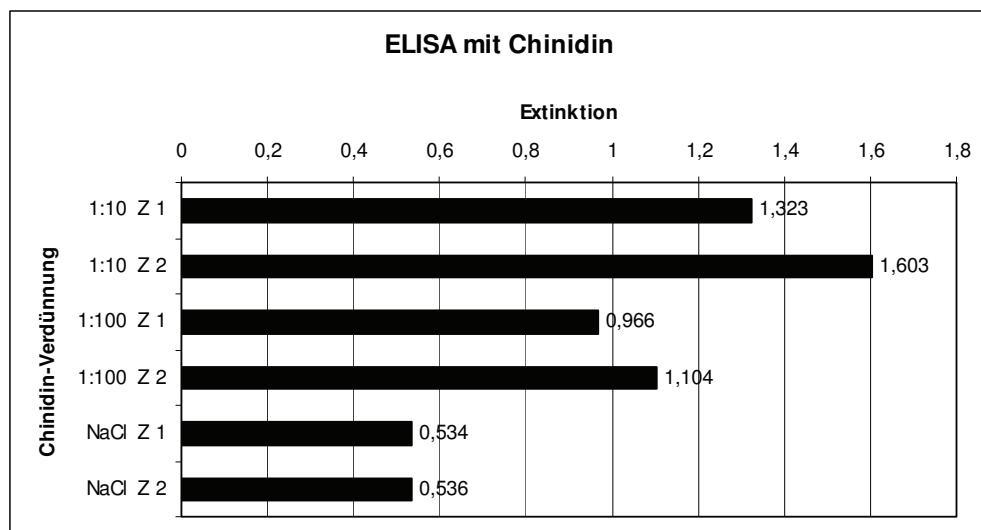


Abbildung 9: Resultate des ELISA zum Nachweis medikamentabhängiger Antikörper. Dargestellt sind die Extinktionen des Serums mit verschiedenen Chinidinverdünnungen bzw. der NaCl-Probe

Da sich nur in Anwesenheit von Chinidin eine deutlich positive Reaktion zeigte, handelt es sich hierbei um Chinidin-abhängige Antikörper.

In einem nächsten Schritt wurde ein Medikamenten-MAIPA mit Chinidin durchgeführt. Dadurch gelang es den Antikörper zu identifizieren und das Glykoprotein, gegen welcher der Antikörper gerichtet ist.

Es wurden folgende monoklonale Antikörper eingesetzt:

<u>Monoklonale Ak</u>	<u>Glykoproteinspezifität</u>
FMC 25	IX
Gi 5	IIb/ IIIa
Sw 16	V
Gi 9	Ia/ IIa

Da die Mehrzahl der Chinidin-abhängigen Antikörper gegen den Glykoprotein-Komplex Ib/ IX gerichtet sind [Asvadi et al., 2003; Chong et al., 1991], wurde bei Einsatz des monoklonalem Antikörper FMC 25 eine Chinidin-Verdünnung bis 1:1000 gewählt und mit zwei verschiedenen Testthrombozyten inkubiert. Die Ansätze mit den anderen monoklonalen Antikörpern wurden bei einer Chinidinverdünnung bis 1:100 durchgeführt und mit jeweils einer Zelle angesetzt.

Wie zu erwarten, reagierte der Chinidin-abhängige Antikörper mit dem Glykoproteinkomplex Ib/IX, da sich nur unter Einsatz des monoklonalen Antikörper FMC 25 eine deutlich positive Reaktion zeigte (siehe **Abbildung 10**).

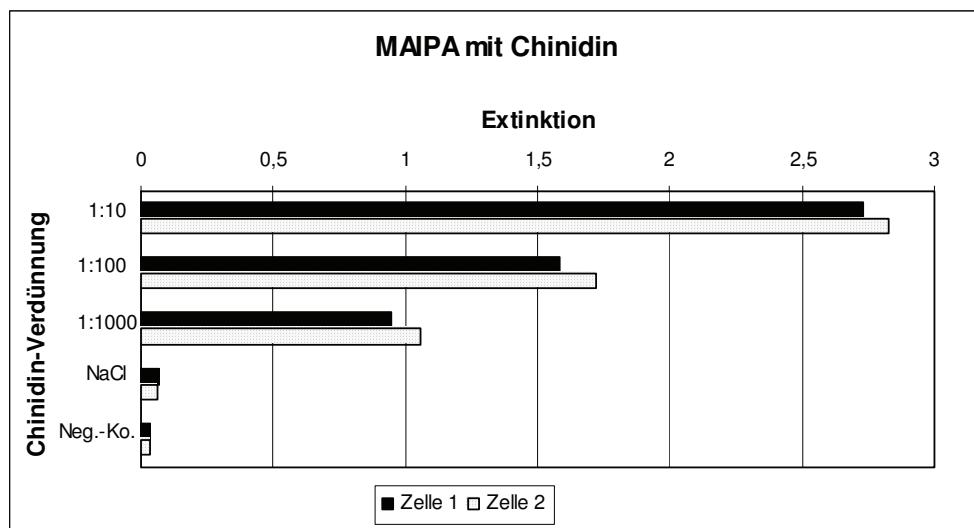


Abbildung 10: im MAIPA mit Chinidin und dem thrombozytären GpIb/IX-Komplex, immobilisiert durch den monoklonalen Antikörper FMC 25 ist eine deutlich positive Reaktion zu sehen. Dies spiegelt das Vorhandensein von Antikörpern gegen das GP IX in Anwesenheit von Chinidin wider.

Wie in **Tabelle 6** sichtbar wird, ist auch eine positive Reaktion ($>0,2$) mit dem Glykoprotein V bei einer Chinidin-Verdünnung von 1:10 zu sehen. Da jedoch im NaCl-Ansatz auch eine positive Reaktion zu sehen war, wurde dies als nicht Chinidin-abhängige Reaktion gewertet.

Tabelle 6: Ergebnisse aus dem Chinidin-MAIPA mit allen eingesetzten monoklonalen Antikörpern. Nur bei Einsatz des MAK FMC 25 fand eine Reaktion statt. Daher handelt es sich hierbei um einen Chinidin-abhängigen Antikörper gegen das GP IX gerichtet ist

Zelle	MAK	Serum	Verdünnung	Extinktion
Z 1	FMC 25	4873 II	1:10	2,73
Z 1	FMC 25	4873 II	1:100	1,58
Z 1	FMC 25	4873 II	1:1000	0,95
Z 1	FMC 25	4873 II	NaCl	0,066
Z 1	FMC 25	Negativ	1:10	0,035
Z 1	FMC 25	Negativ	NaCl	0,080
Z 2	FMC 25	4873 II	1:10	2,83
Z 2	FMC 25	4873 II	1:100	1,72
Z 2	FMC 25	4873 II	1:1000	1,06
Z 2	FMC 25	4873 II	NaCl	0,062
Z 2	FMC 25	Negativ	1:10	0,033
Z 2	FMC 25	Negativ	NaCl	0,038
Z 1	Gi 5	4873 II	1:10	0,08
Z 1	Gi 5	4873 II	1:100	0,03
Z 1	Gi 5	4873 II	NaCl	0,027
Z 1	Gi 5	Negativ	1:10	0,007
Z 1	Gi 5	Negativ	NaCl	0,007
Z 1	SW 16	4873 II	1:10	0,487
Z 1	SW 16	4873 II	1:100	0,036
Z 1	SW 16	4873 II	NaCl	0,42
Z 1	SW 16	Negativ	1:10	0,009
Z 1	SW 16	Negativ	NaCl	0,142
Z 1	Gi 9	4873 II	1:10	0,012
Z 1	Gi 9	4873 II	1:100	0,023
Z 1	Gi 9	4873 II	NaCl	0,055
Z 1	Gi 9	Negativ	1:10	0,006
Z 1	Gi 9	Negativ	NaCl	0,007
Z 1	Gi 5	Positiv	NaCl	1,061

3.12.5 Fallbeschreibung: Patientin mit Carbamazepin-induzierter Thrombozytopenie

Eine damals 75jährige Patientin befand sich 2002 wegen einer Varizellen-Radikulitis und Neuritis in einer Rehabilitationsklinik. Die Medikation bestand dort aus Carbamazepin, Saroten, Ibuprofen, Neurontin, Lorzaar, Tavegil sowie Katadolon.

Aufgrund eines seit Tagen kontinuierlichen Abfalls der Thrombozytenzahl und eines erheblichen Exanthems wurde sie am 17.09.2002 auf die Intensivstation eines Krankenhauses verlegt. Dort wurden am selben Tag 2 Gpt/l Thrombozyten gemessen. Es zeigte sich jedoch keine aktive Blutung. Das Exanthem war im Krankenhaus deutlich rückläufig.

Die Therapie bestand unter anderem im Absetzen aller Medikamente bei einmaliger Gabe von Cortison. Bereits einen Tag später war ein Thrombozytenanstieg von initial 2 Gpt/l auf 16 Gpt/l zu verzeichnen (siehe **Abbildung 11**).

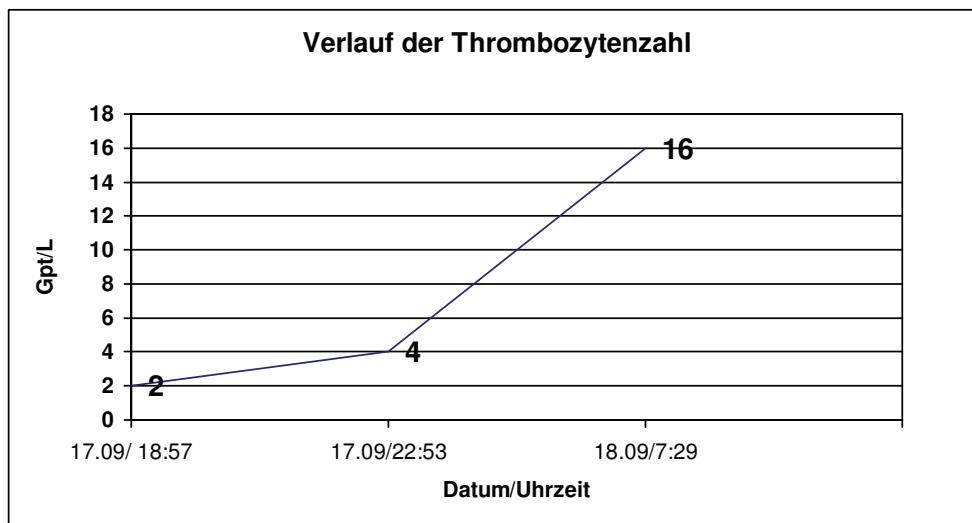


Abbildung 11: Verlauf der Thrombozytenzahl bei der Patientin

Zur weiteren Diagnostik wurde am 17.09. eine EDTA-Probe sowie ein Serumröhrchen in die Transfusionsmedizin Rostock eingesandt. Im direkten MAIPA-Assay war der Glykoproteinkomplex IIb/IIIa autologer Thrombozyten mäßiggradig vermehrt mit IgG beladen. Da die Thrombozytenzahl sehr gering war, konnte die Bestimmung der Antikörperbeladung weiterer Glykoproteine nicht durchgeführt werden. Im Serum fanden sich keine freien Antikörper gegen die thrombozytären Glykoproteine IIb/IIIa, Ib/IX, Ia/IIa und V. Im Blutausstrich wurden keine Thrombozytenaggregate gefunden, so dass nicht von einer Pseudoimmunthrombozytopenie ausgegangen werden konnte.

Um eine Heparin-induzierte-Thrombozytopenie auszuschließen, wurde eine Diagnostik auf Antikörper der heparininduzierten Thrombozytopenie durchgeführt. Dazu wurde als Schnelltest ein Enzymimmunoassay durchgeführt der Antikörper gegen Plättchenfaktor4-Heparin-Komplex nachweist.

Als Bestätigungstest diente der HIPA-Test (Heparin-induced platelet activation assay), einem funktionellen Test [Greinacher et. al. 1991; Eichler et. al. 1999].

In beiden Tests konnten keine durch Heparin-induzierten Antikörper nachgewiesen werden.

Zudem wurde auf weitere Medikament-abhängige Antikörper getestet. Im ELISA zur Bestimmung medikamentabhängiger thrombozytärer Antikörper konnten wiederholt Antikörper gegen Thrombozyten, die nur in Anwesenheit von Carbamazepin reagierten, nachgewiesen werden (**siehe Abbildung 12**).

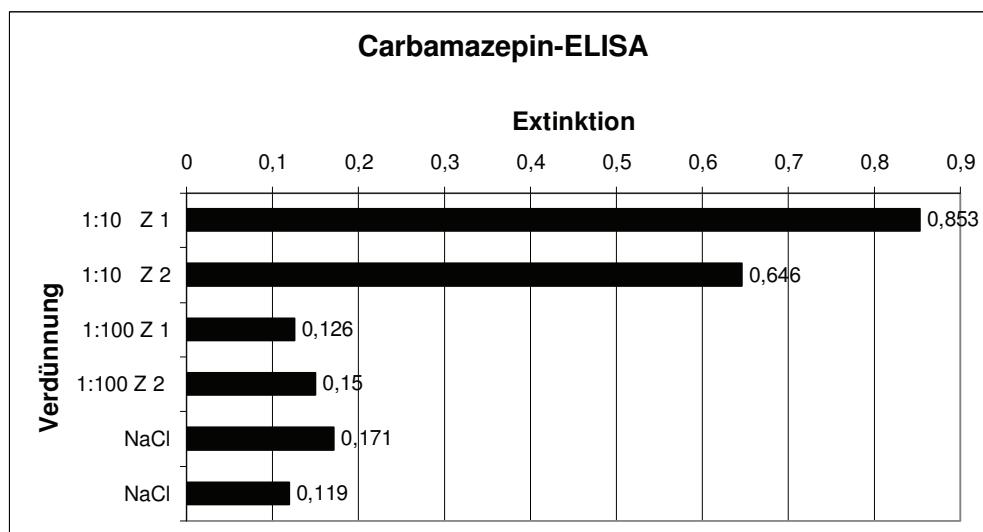


Abbildung 12: Extinktionen im ELISA mit Carbamazepin. Bei einer 1:10-Verdünnung mit Carbamazepin zeigt sich deutlich die Anwesenheit von Carbamazepin-abhängigen Antikörpern.

Wie in **Tabelle 7** zu sehen ist, wurden keine durch Ibuprofen hervorgerufene Antikörper die mit Thrombozyten reagieren, festgestellt.

Tabelle 7: Resultate der Testung auf Ibuprofen-abhängige thrombozytäre Antikörper im ELISA. Da auch die Negativkontrolle leicht erhöht war, konnte hier nicht von Ibuprofen-spezifischen Antikörpern ausgegangen werden.

Zelle	Serum	Medikamentverdünnung	Extinktion
1	Patient	1:10 Ibuprofen	0,269
2	Patient	1:100 Ibuprofen	0,565
1	Patient	1:10 Ibuprofen	0,280
2	Patient	1:100 Ibuprofen	0,586
1	Patient	NaCl	0,334
2	Patient	NaCl	0,620

Beurteilung der Befunde

Bei der Patientin lag damit eine Carbamazepin-induzierte Immunthrombopenie vor.

Gegen welches Glykoprotein dieser Antikörper gerichtet ist, konnte leider in mehreren Versuchen im MAIPA-Assay mit Carbamazepin nicht herausgefunden werden. Dieser war mit allen eingesetzten monoklonalen Antikörpern (FMC 25, SZ 21, SW 16, Gi 5) negativ.

3.13 Statistische Verfahren

Alle statistischen Analysen wurden mit Hilfe der SPSS Software für Windows durchgeführt.

Zur Prüfung der Verteilungsform die den Stichproben zugrunde liegt, wurde der K-S-Lillefors-Test mit allen Größen angewendet.

Da nicht davon ausgegangen wurde, dass die Variablen normalverteilt waren, wurden parameterfreie Tests verwendet. Korrelationsuntersuchungen wurden mit dem Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman berechnet [Krentz, 2002]. Dabei wurde ein $p < 0,05$ als signifikant angesehen.

4.1 Verlauf der Thrombozytenzahlen der Proben von Patienten, die mit Abciximab behandelt wurden

Die Thrombozytenzahlen der jeweiligen Proben wurden zu den verschiedenen Zeitpunkten im Zellzählgerät bestimmt. Als Maß für den Thrombozytenabfall wurde die Thrombozytenzahl der Probe vor Abciximab-Gabe (Ausgangswert) mit dem kleinsten Wert der Probe 1 bzw. Probe 2 in Beziehung gesetzt. Folgende Formel wurde dafür verwendet:

niedrigster Thrombozytenwert	/	Thrombozytenwert vor Abciximab-Gabe
= Thrombozytenabfall		

Der Verlauf der Thrombozytenzahlen ist in **Abbildung 13** dargestellt. Bei fünf der 52 Abciximab-Patienten zeigte sich ein Abfall der Thrombozytenzahl auf unter 0,5 des Ausgangswertes (9,6%). Bei zwei dieser Patientenproben (Lfd.Nr.1 und 20) fand sich sogar ein Abfall der Thrombozytenzahl nach Abciximab-Gabe auf unter 0,25 des Ausgangswertes. Eine Thrombozytopenie (<150000 Thrombozyten/ μ l Vollblut) konnte nach 2-4 Stunden (Proben 1) bei 15 Patientenserien mit initial normwertigen Thrombozytenzahlen festgestellt werden. Bei elf dieser Seren verzeichnete sich im weiteren Verlauf (Probe 2) wieder ein Anstieg (**siehe Tabelle 8**).

Von den Patienten der Lfd.Nr. 2, 32, 37, 46 und 47 standen nur die Proben 0 und 1 zur Verfügung.

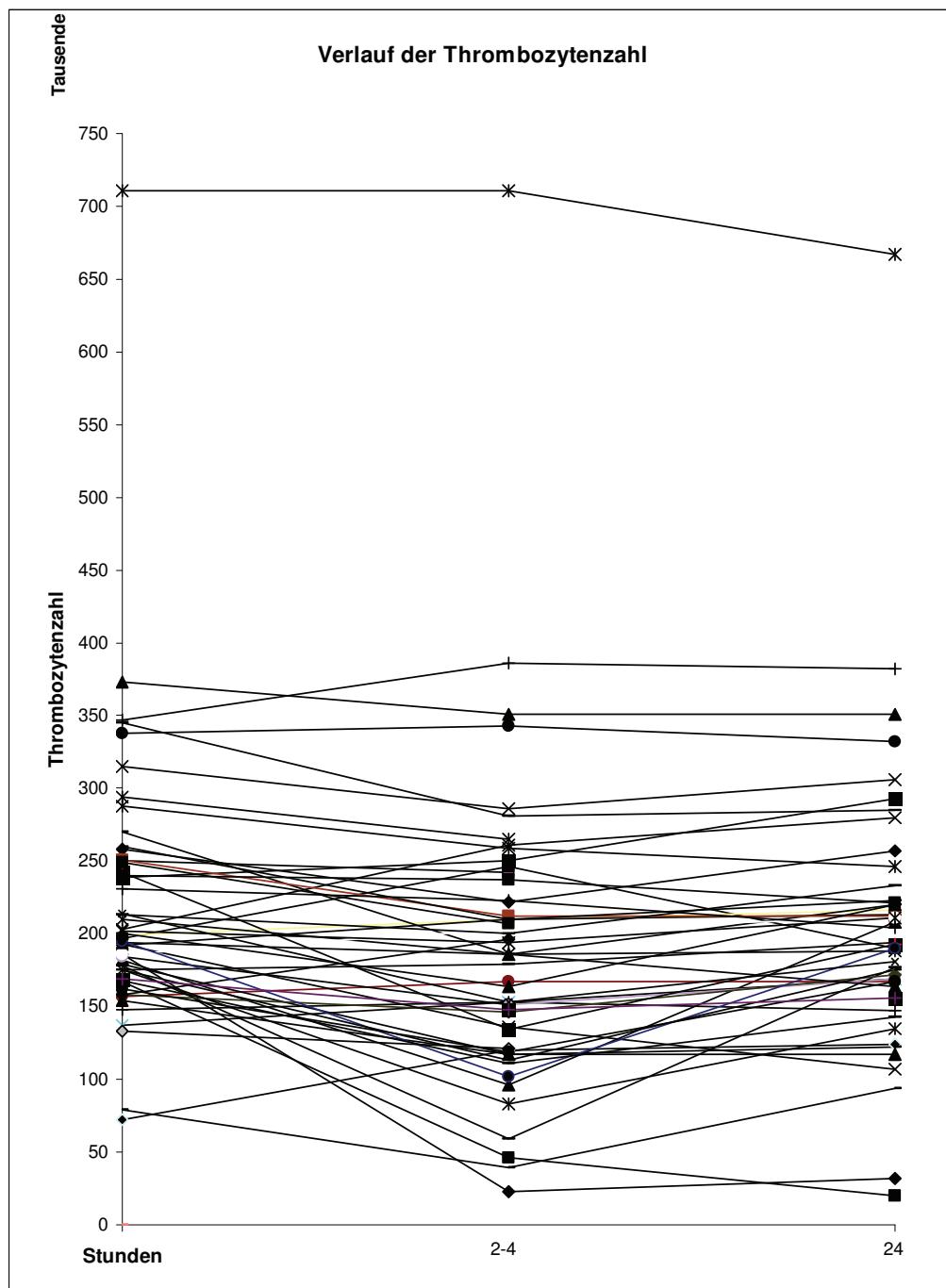


Abbildung 13: Thrombozytenzahlen im Verlauf der Proben 0 (vor Abciximab), Proben 1 sowie P2.

Tabelle 8: Auftreten einer Thrombozytopenie (<150.000 μ l/VB) nach 2-4 h (P 1) und Verlauf nach 24 h (P2)

Lfd.Nr.	Thrombozytenzahl P0	Thrombozytenzahl P1	Thrombozytenzahl P2
1	186000	23000	32000
3	182000	96000	208000
14	175000	83000	135000
20	167000	46000	20000
26	179000	117000	122000
27	178000	59000	177000
28	158000	146000	172000
30	154000	117000	117000
31	193000	136000	107000
34	242000	134000	193000
42	195000	102000	190000
44	175000	113000	175000
45	168000	111000	143000
51	162000	119000	167000
52	169000	148000	156000

Tabelle 9: Deskriptive Statistik der Thrombozytenzahlen

	N	Minimum	Maximum	Median
Thr.zahl P0	52	15800	711000	216400
Thr.zahl P1	52	23000	711000	190460
Thr.zahl P2	47	20000	667000	206430

4.2 Beurteilung der Blautausstriche auf Agglutinate

Thrombozytenagglutinate die vor Abciximab-Gabe (Probe 0) nicht bestanden aber in Probe 1 und/ oder Probe 2 zu finden waren, kamen bei 24 von 52 Seren vor. Entsprechend entwickelten 46,15% Agglutinate nach Abciximab-Gabe.

Wie bei den Thrombozytenproben, standen auch zur Agglutinatbeurteilung die Proben 2 der Lfd.Nr. 2, 32, 37, 46, und 47 nicht zur Verfügung. Zur Definition der Aggregatscores sei auf Abschnitt 3.5 verwiesen. In **Abbildung 14** sind Thrombozytenaggregate des Scores 2 und 3 zu sehen.

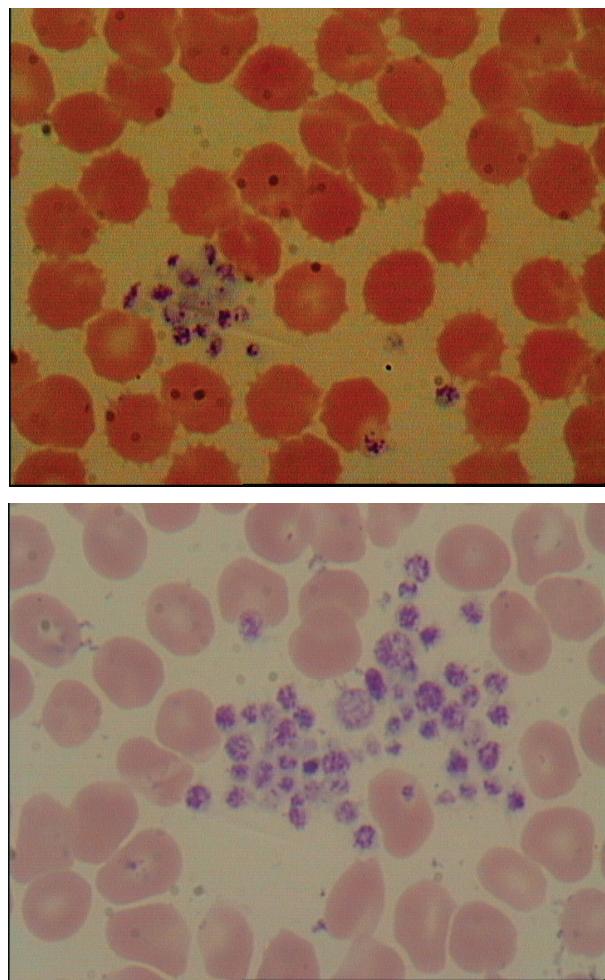


Abbildung 14: Das obere Bild zeigt Thrombozytenaggregate mit dem Score 2. Im unteren Bild sind massive Thrombozytenaggregate (Score 3) zu sehen.

4.3 Zusammenhang der Thrombozytenzahl und Aggregate

Bei vier der fünf Patienten mit einem Abfall der Thrombozytenzahl auf unter 0,5 bzw. unter 0,25 des Ausgangswertes fanden sich Thrombozytenaggregate in den Ausstrichen der Proben 1 und 2, ohne Nachweis von Aggregaten in den Blutausstrichen vor Abciximab-Infusion. Nur die Lfd.Nr. 20 zeigte keine Thrombozytenaggregate (siehe **Tabelle 10**).

Tabelle 10: Beziehung zwischen Thrombozytenzahl bzw. Abfall und Entstehung von Aggregaten

Lfd.Nr.	Thr.zahl P0	Thr.zahl P1	Thr.zahl P2	Thr.abfall P_{min}/P_0	Aggregate	Score (P1/ P2)
1	186000	23000	32000	0,124	Ja	3 / 3
8	79000	39000	94000	0,494	Ja	1 / 3
14	175000	83000	135000	0,474	Ja	1 / 1
20	167000	46000	20000	0,12	Nein	0 / 0
27	178000	59000	177000	0,331	Ja	1 / 0

Von 15 Abciximab-Seren die nach 2-4h einen Abfall der Thrombozytenzahl $<150000/\mu\text{l}$ Vollblut entwickelten, fanden sich bei zwölf Seren Thrombozytenagglutinate in den Ausstrichen 1 und/ oder 2, die vor Abciximab-Gabe (Probe 0) noch nicht vorhanden waren. Nur bei Lfd.Nr. 20, 28, 30 und 52 war keine Bildung von Aggregaten im Verlauf zu erkennen. Die Beziehung zwischen dem Auftreten von Aggregaten und dem Thrombozytenabfall aller Abciximab-Patienten ist in **Abbildung 15** veranschaulicht.

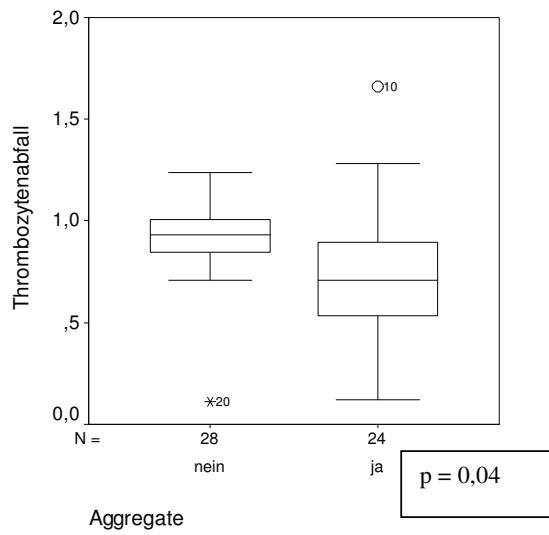


Abbildung 15: Beziehungen zwischen der Entstehung von Aggregaten und der Abnahme der gemessenen Thrombozytenzahl. Wie zu erkennen ist, besteht ein Zusammenhang der beiden Parameter. Balken = Median, * = Extremwert, ° = Ausreißer. P wurde mit dem Mann-Whitney U-Test für zwei unverbundene Stichproben berechnet

4.4 Plättchenständige Antikörper GP-PAIgG (direkte MAIPA)

Wie in **Abbildung 16** zu erkennen ist, wiesen nur die Thrombozyten von einem Patienten (Lfd.Nr. 35) bereits vor Gabe von Abciximab auf den GP-Komplex IIb/IIIa eine vermehrte IgG-Beladung auf, wobei der monoklonale AK SZ 21 zum Immobilisieren verwendet wurde. In den Proben die 2-4 Stunden nach Abciximab-Gabe abgenommen wurden, zeigten 28 der 52 Proben (53,8%) eine erhöhte Beladung der autologen Plättchen mit IgG-Antikörpern. Nach 24 Stunden (Probe 2) hatten 36 Proben vermehrt GP-PAIgG. Zu erwähnen ist, dass zum Zeitpunkt 2 nur 50 Proben zur Testung zur Verfügung standen. Eine ähnlich hohe Anzahl positiver Ergebnisse in Probe 1 und 2 (bei ausschließlich negativen Proben zum Zeitpunkt 0), zeigten sich ebenso bei Einsatz mit dem monoklonalen Antikörper Gi 5. Insgesamt wies die überwiegende Zahl der Patienten ansteigende GP-PAIgG-Werte auf ($p < 0,001$, Friedman-Test für verbundene Stichproben).

Ausschließlich negative Resultate fanden sich zu allen Zeitpunkten im direkten MAIPA bei der Verwendung der monoklonaler Antikörper P2 (Anti-GP IIb/IIIa) und SZ 22 (Anti-GP IIb). Erwartungsgemäß waren auch alle Ansätze negativ, in denen FMC 25 (Anti-GP IX) den GP-Komplex Ib/IX immobilisierte.

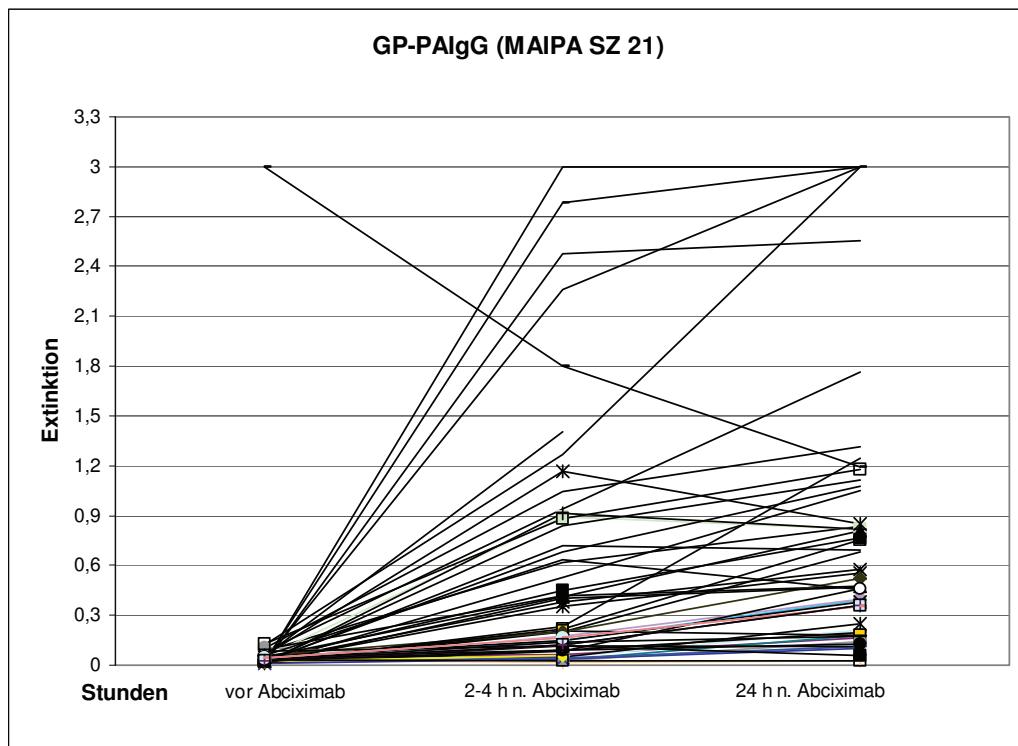


Abbildung 16: Direkte MAIPA mit dem monoklonalen AK SZ 21. Gezeigt wird der Verlauf des Vorhandenseins plättchenständiger thrombozytärer AK vor Abciximab-Gabe bis 24 h nach Infusion

4.5 Ergebnisse der Untersuchung des Serums eines Patienten bei verzögerter Thrombozytopenie nach Abciximab-Infusion

Um eine HIT II auszuschließen bzw. zu bestätigen, wurde eine Diagnostik auf Antikörper der heparininduzierten Thrombozytopenie veranlasst. Im Enzymimmunttest (Antikörper gegen PF4/ Heparinkomplex, PF-Enhanced X-HAT; Firma Diagast; Aachen) sowie im funktionellen Test konnten keine HIT-Antikörper nachgewiesen werden. Thrombozytenaggregate fanden sich nicht im Blutausstrich, daher konnte auch eine Pseudothrombozytopenie ausgeschlossen werden. Zum Nachweis evtl. vorhandener freier Antikörper im Serum oder auf autologen Thrombozyten wurde der MAIPA-Assay durchgeführt. Nur der Glykoproteinkomplex IIb/IIIa der autologen Thrombozyten war grenzwertig mit IgG beladen.

Im MAIPA-Assay mit Abciximab-beladenen Thrombozyten fanden sich starke Antikörper gegen GP IIb/IIIa an das Abciximab gebunden hatte. Im Gegensatz zu anderen

Thrombozytopenien, die sofort nach Abciximab-Gabe auftreten, konnte dieser Antikörper erst bei einer hohen Verdünnungsstufe von 1:256 durch humanes Fab-Fragment gehemmt werden (siehe **Abbildung 17**).

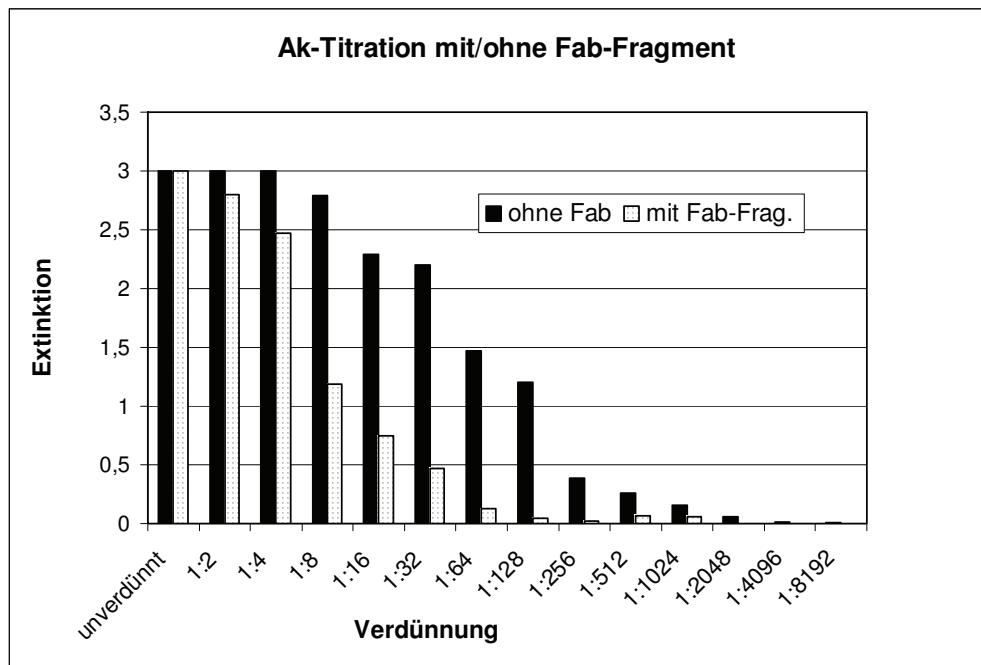


Abbildung 17: Bei Titration des AK und Einsatz im MAIPA mit Abciximab-markierten Plättchen fiel auf, dass dieser AK sehr stark war und erst bei einer hohen Verdünnungsstufe durch humanes Fab-Fragment gehemmt werden konnte.

Um zu testen, ob die Antikörper in diesem Serum (bzw. deren Serumverdünnungen) mit dem monoklonalen Antikörper 7E3 reagieren, wurde der indirekte MAIPA-Assay mit diesem Antikörper durchgeführt. Dabei wurden, wie bereits in Material und Methoden auf (Kapitel 3.10) beschrieben, je zwei Ansätze pro Serumverdünnung in dem Test mitgeführt, wobei ein Ansatz zuvor mit Maus-IgG beladenen Beads inkubiert wurde.

Wie in Abbildung 18 zu erkennen ist, zeigen beide Serumverdünnungen (mit Beads/ohne Beads) starke positive Reaktionen, was für eine hohe Antikörpertiterkonzentration spricht. Die Verdünnungen, die mit Beads inkubiert wurden fielen schwächer aus, als die Reaktionen der Seren ohne Voradsorption. Dennoch zeigte sich bei beiden Ansätzen eine deutlich positive Reaktion. Daher ist von Antikörpern auszugehen, die spezifisch mit 7E3 reagieren und nicht unspezifisch gegen Maus-IgG.

Dies wird weiter verdeutlicht, indem man sich die Werte des im selben Assay eingesetzten Serums Lfd.Nr. 21 ansieht: Bei diesem Serum zeigt sich eine deutlich positive Reaktion mit

einer Extinktion von 1,33 ohne Vorabsorption. Dagegen ist ein negatives Resultat (0,16) bei Vorabsorption durch Maus-IgG beladene Beads zu erkennen.

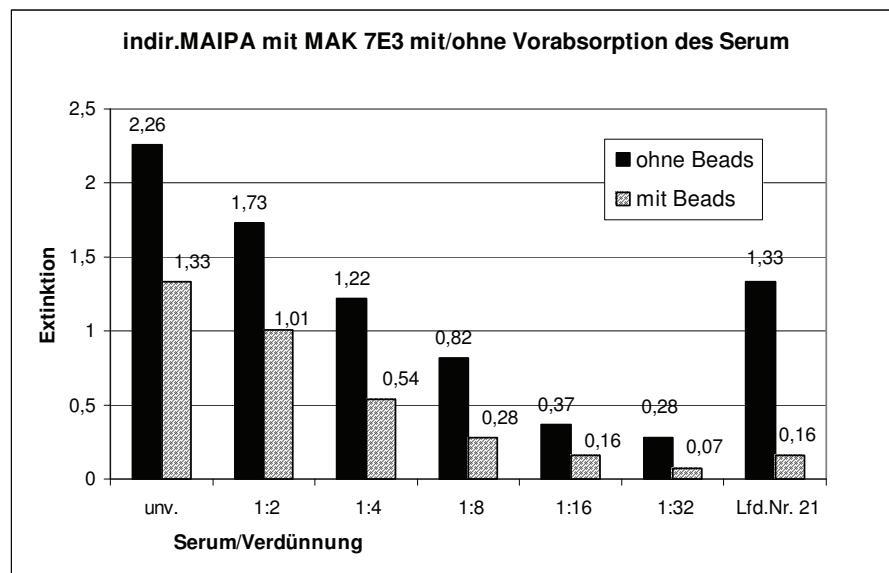


Abbildung 18: Ergebnis des 7E3-MAIPA mit und ohne Vorabsorption des Serums durch Maus-IgG beladene Beads. Trotz Vorabsorption ist eine positive Reaktion zu erkennen. Zum Vergleich ist am letzten Balkenpaar ein anderes Serum (Lfd.Nr. 21) zu sehen. Dies zeigt keine Reaktion bei Vorabsorption

Die Bewertung der Ergebnisse soll im Teil „Diskussion“ (Kapitel 5) näher erläutert werden.

4.6 Ergebnisse bei der Untersuchung auf freie thrombozytäre Antikörper im Serum der mit Abciximab behandelten Patienten

4.6.1 Indirekte MAIPA mit Abciximab-markierten Plättchen

Bei der Untersuchung der Patientenserien auf Antikörper gegen mit Abciximab beladenen Thrombozyten zeigten 13 Seren freie Antikörper gegen mit Abciximab beladene Thrombozyten. Insgesamt wurden 52 Seren (Proben vor Abciximab-Gabe) getestet. Als positiv galt hier eine Extinktion von $\geq 0,3$.

Alle 13 Seren bei denen sich Antikörper im indirekten MAIPA mit Abciximab-markierten Plättchen fanden, konnten durch vorherige Inkubation mit Fab-Fragment gehemmt werden. Dies war daran erkennbar, dass bei Vorabsorption dieser Seren mit humanem Fab-Fragment und Einsatz im Abciximab -MAIPA sich keine Reaktivität mehr zeigte (**Tabelle 11, Abbildung 19**).

Tabelle 11: Vergleich indirekte MAIPA mit Abciximab-inkubierten Plättchen und indirekte MAIPA mit Abciximab-inkubierten Plättchen plus Fab-vorabsorbiertem Serum

Lfd.Nr.	Indir. Abciximab-MAIPA ohne Fab	Indir. Abciximab-MAIPA mit Fab	Hemmbarkeit
1	1,517	0,014	ja
3	0,948	0,214	ja
4	0,389	0,041	ja
8	1,750	0,042	ja
12	0,320	0,036	ja
19	2,427	0,063	ja
26	2,199	0,283	ja
32	1,242	0,036	ja
39	0,525	0,086	ja
43	0,371	0,040	ja
46	0,494	0,042	ja
47	0,362	0,021	ja
48	0,726	0,043	ja

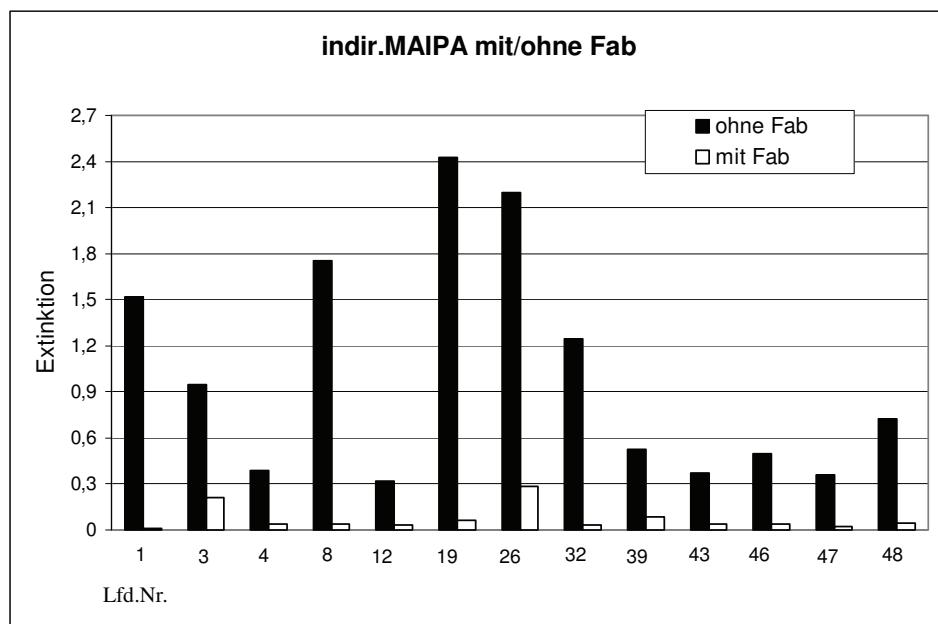


Abbildung 19: Extinktionen ohne Vorabsorption mit Fab-Fragment (schwarze Balken) im Vergleich zur Fab-Vorabsorption (weiße Balken)

4.6.2 Antikörperstärke

Als Antikörpertiter wurde die letzte Verdünnungsstufe angegeben, die noch positiv war. Bei Titration der Antikörper, die gegen mit Abciximab-beladenen Plättchen reagierten, lag der Titer bei allen Seren bei einer Verdünnung über 32.

4.7 Befunde des indirekten MAIPA mit monoklonalem AK 7E3 ohne/mit – Vorabsorption durch Maus-IgG

Von 52 getesteten Seren im Test mit dem monoklonalen AK 7E3 fanden sich fünf mit positiver Reaktion ($>0,2$). Diese positiven Seren wurden in einem zweiten Schritt mit Maus-IgG-gekoppelten Beads vorabsorbiert und im 7E3-MAIPA eingesetzt. Wie in **Abbildung 20** deutlich wird, zeigten alle fünf der zuerst positiven Seren nach Vorabsorption ein negatives Resultat. Die Positivkontrolle mit HPA 1a/a Antikörpern blieb hingegen auch nach Vorabsorption mit IgG-gekoppelten Beads positiv.

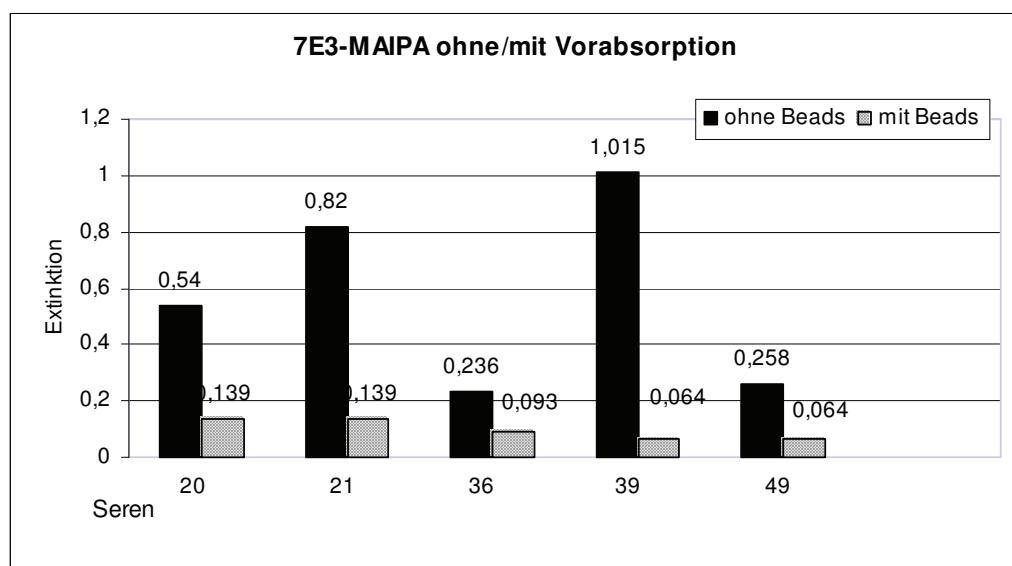


Abbildung 20: 7E3-MAIPA ohne Vorabsorption und mit Vorabsorption durch IgG-gekoppelte Beads im Vergleich

4.8 Korrelation von Thrombozytenabfall und plättchenständigen Antikörpern

Es konnte kein eindeutiger Zusammenhang zwischen plättchenständigen Antikörpern und dem Abfall der Thrombozytenzahlen nachgewiesen werden ($R_s = -0,26$; $p = 0,06$ Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman, **Abbildung 21**).

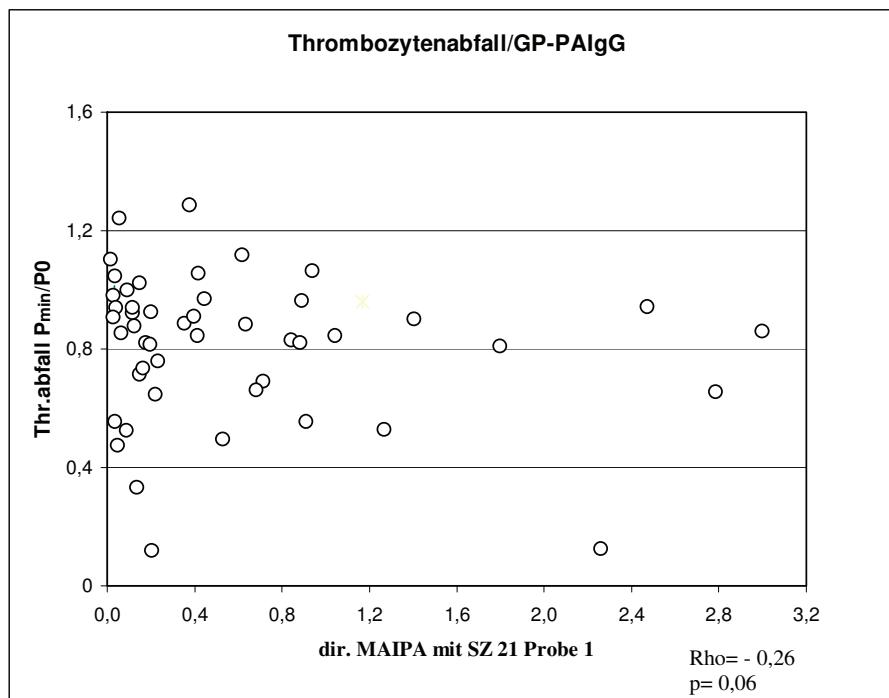


Abbildung 21: Zusammenhang zwischen Thrombozytenabfall und Anwesenheit von plättchenständigen thrombozytären Antikörpern (direkte MAIPA). Thrombozytenabfall auf < 50 % (3/52) und < 25 % (2/52) des Ausgangswerts (P0)

4.9 Vergleich freier thrombozytärer Antikörper gegen Abciximab-beladene Thrombozyten mit Auftreten eines Thrombozytenabfalls

Nur zwei (Lfd.Nr.1 und 8) der fünf Seren von Patienten, bei denen es nach Gabe von Abciximab zu einem Thrombozytenabfall auf mindestens 50% des Ausgangswertes kam, zeigten auch freie Antikörper im indirekten MAIPA mit Abciximab- markierten Plättchen und MAK SZ 21. Es fand sich kein eindeutiger Zusammenhang zwischen freien thrombozytären Antikörpern und Thrombozytenabfall (Spearmans Rangkorrelationskoeffizient, $p= 0,186$) bei den 52 Patienten, die mit Abciximab behandelt wurden. In **Abbildung 22** ist grafisch zu sehen, dass ein Thrombozytenabfall (Werte $<0,5$) nicht regelhaft mit dem Vorhandensein freier Antikörper gegen Abciximab-beladene Thrombozyten (Extinktion $>0,3$) einhergeht.

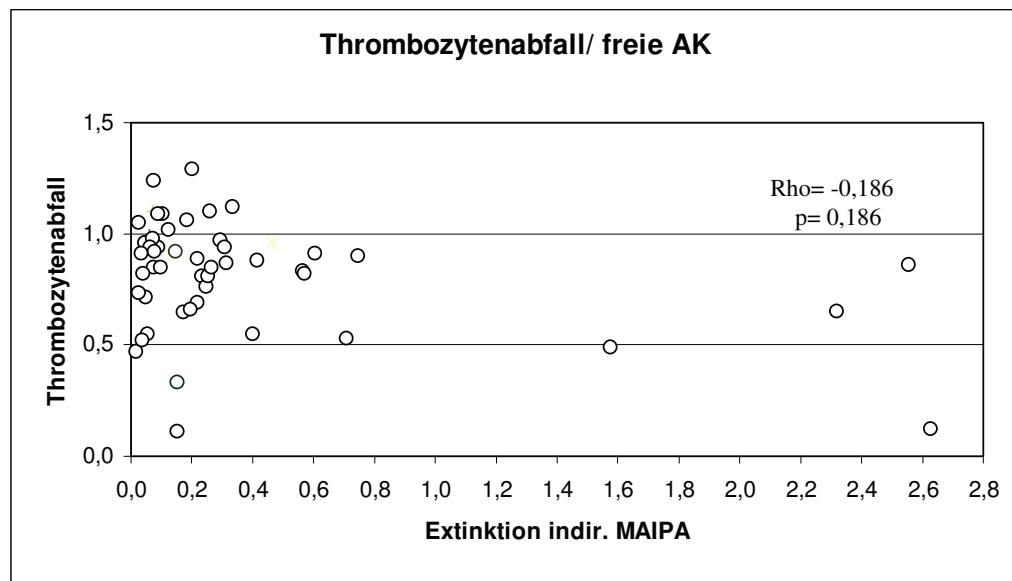


Abbildung 22: Zusammenhang zwischen freien Antikörpern gegen mit Abciximab-beladene Plättchen vor Abciximab-Infusion und Thrombozytenabfall (kleinste Thrombozytenwert/Thrombozytenzahl vor Abciximab).

4.10 Beziehungen zwischen der Entstehung von Thrombozytenaggregaten und plättchenständigen Antikörpern

Bei 28 Patienten, bei denen sich nach 2-4 Stunden plättchenständige Antikörper (positiv im direkten MAIPA unter Verwendung des monoklonalen Antikörpers SZ 21 zum Immobilisieren) fanden, wurden gleichzeitig bei 15 Blutproben Aggregate in den Blutausstrichen gefunden. Entsprechend konnten bei 36 Patienten mit thrombozytären Antikörpern (PAIgG) nach 24 Stunden bei 20 Blutproben die Entwicklung von Agglutinaten beobachtet werden.

Somit hatten 55,6% (20 von 36 Seren) gleichzeitig Aggregate und PAIgG auf den zirkulierenden Thrombozyten nach 24 Stunden.

($p = 0,093$; Mann-Whitney U-Test für zwei unverbundene Stichproben, **Abbildung 23**).

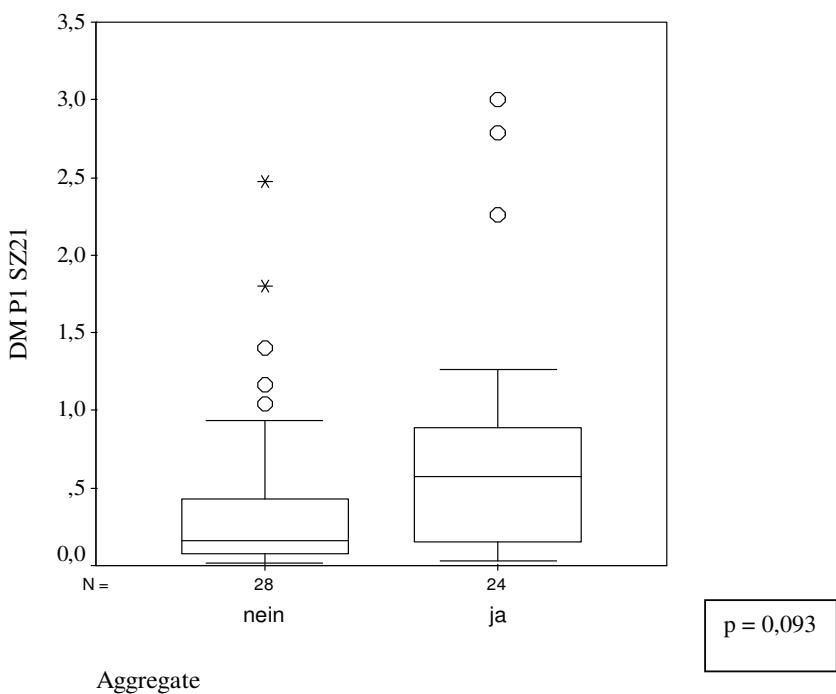


Abbildung 23: Beziehungen zwischen der Entstehung von Aggregaten und plättchenständigen Antikörpern (GP-PAIgG). Wie zu erkennen ist, besteht kein enger Zusammenhang der beiden Parameter. Balken = Median, * = Extremwert, ° = Ausreißer.

4.11 Korrelation zwischen freien Antikörpern gegen mit Abciximab-beladenen Thrombozyten (indirekte Abciximab-MAIPA, Probe 0) und plättchenständigen Antikörpern (direkte MAIPA, GP IIb/IIa, Probe 1)

Bei allen dreizehn Patienten, bei denen Antikörper gegen mit Abciximab-beladenen Thrombozyten vor Abciximab-Gabe im Serum nachgewiesen wurden, konnten auch plättchenständige Antikörper 2-4 Stunden nach Gabe von Abciximab nachgewiesen werden (Probe 1, SZ 21).

Für die Signale bei der Bestimmung von GP-PAIgG auf den zirkulierenden Thrombozyten zum Zeitpunkt der Entnahme 2-4 Stunden nach Abciximab-Infusion und dem Antikörper im Serum, bestimmt in der Probe vor Abciximabgabe, ergab sich ein relativ enger Zusammenhang ($R_s = 0,723$, $p < 0,001$, Spearmans Rangkorrelationskoeffizient,

Abbildung 24

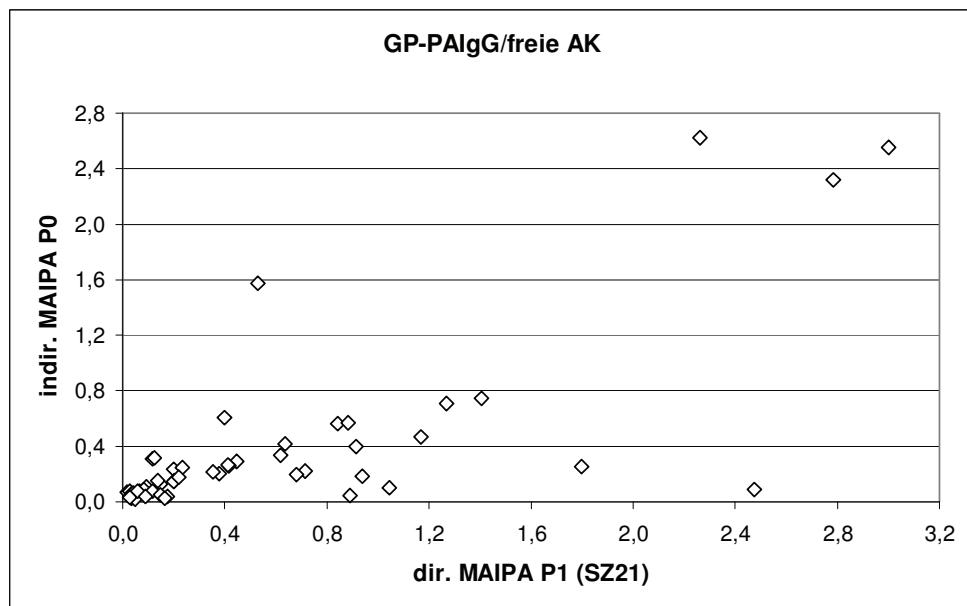


Abbildung 24: Beziehung zwischen dem Vorhandensein thrombozytärer Antikörper (direkte MAIPA, Probe 1) und freien Antikörpern im Serum (indirekte MAIPA mit Abciximab, Probe 0).

4.12 Ergebnisse der Normalspenderseren bei der Untersuchung auf freie thrombozytäre Antikörper mit Abciximab-markierten Plättchen

In 13 von 50 (26%) der getesteten Normalspender-Seren konnten freie Antikörper gegen Abciximab-beladene Thrombozyten nachgewiesen werden (positive indirekte MAIPA-Assay mit Abciximab-beladenen Thrombozyten). Alle Ansätze mit Thrombozyten, die nicht mit Abciximab beladen wurden, waren negativ. Die Antikörper konnten in zwölf Fällen bei einer Serumverdünnung von unter 1:8 nicht mehr nachgewiesen werden. Nur bei einem Serum lag der Antikörper-Titer bei 16 (Lfd.Nr 25).

Untersuchung der Hemmbarkeit von Antikörpern gegen GP IIb/IIIa durch Fab-Fragment

Alle Normalspender-Seren mit Antikörpern gegen Abciximab-beladene Plättchen, wurden in einem weiteren Versuch jeweils mit humanem Fab-Fragment inkubiert. Jedes Serum ließ sich durch humanes Fab-Fragment hemmen (**siehe Abbildung 25**).

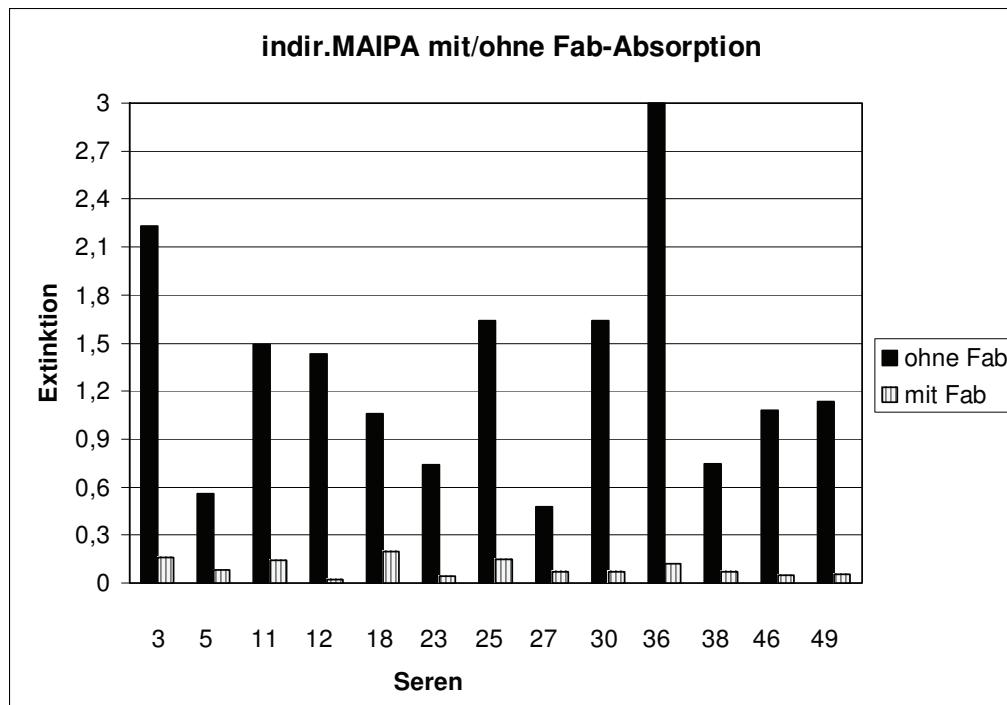


Abbildung 25: deutliche Reaktion der Seren mit Abciximab-beladenen Plättchen und fehlende Reaktion bei Vorabsorption mit humanem Fab-Fragment

Bei Titration der Antikörper mit Abciximab-beladenen Thrombozyten im indirekten MAIPA-Assay bewegte sich die Reaktionstärke im Bereich des unverdünnten Serums bis auf eine maximale Verdünnungsstufe von 1:16.

Auch hier wurde die Verdünnungsstufe, bei der noch ein positives Ergebnis erzielt wurde ($>0,2$) als Titer angegeben.

4.13 Ergebnisse des ELISA zur Bestimmung medikamentenabhängiger thrombozytärer Antikörper

Bei allen 50 Normalspender-Seren konnten keine medikamentenabhängigen Antikörper nachgewiesen werden. Alle Testungen auf die Medikamente Chinidin, Chinin, Rifampicin, Carbamazepin, Vancomycin sowie Ibuprofen fielen negativ aus. Eine Ausnahme bildet die Testung mit Cotrimoxazol (= Trimethoprim + Sulfamethoxazol). Dort lagen die Extinktionen über 0,2. Da jedoch in dieser Testung die Negativ-Kontrolle ebenfalls leicht erhöht ausfiel ist das Ergebnis kritisch zu bewerten (**Tabelle11**).

Beispielhaft sollen nachfolgend in den **Abbildungen 26-27** pro eingesetztes Medikament an jeweils einem Serum die Reaktionen veranschaulicht werden. Es ist zu erkennen, dass anhand der Testreihe eines Normalspenderserums kein positives Resultat (Extinktion $>0,2$) vorlag. Alle anderen 49 Seren verhielten sich mit den jeweiligen Medikamenten ähnlich.

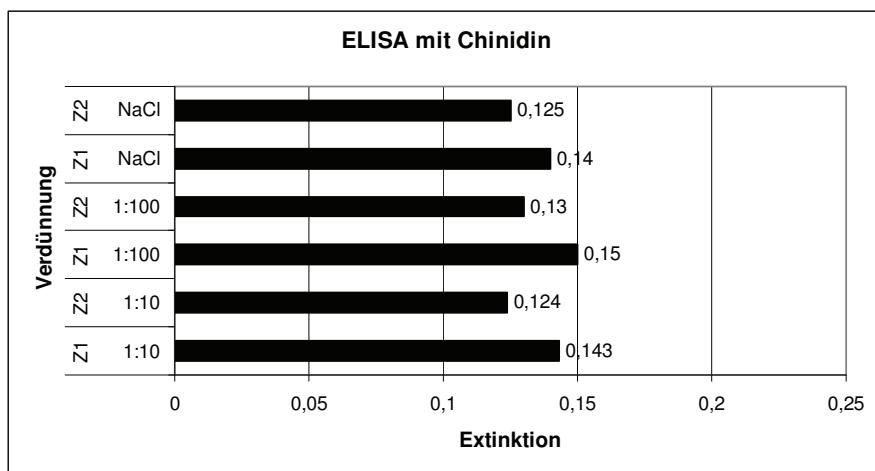


Abbildung 26: ELISA zur Testung Chinidin-abhängiger Antikörper. Gezeigt ist exemplarisch die negative Reaktion eines Serums. Alle Werte lagen unter 0,2. Z = Zelle.

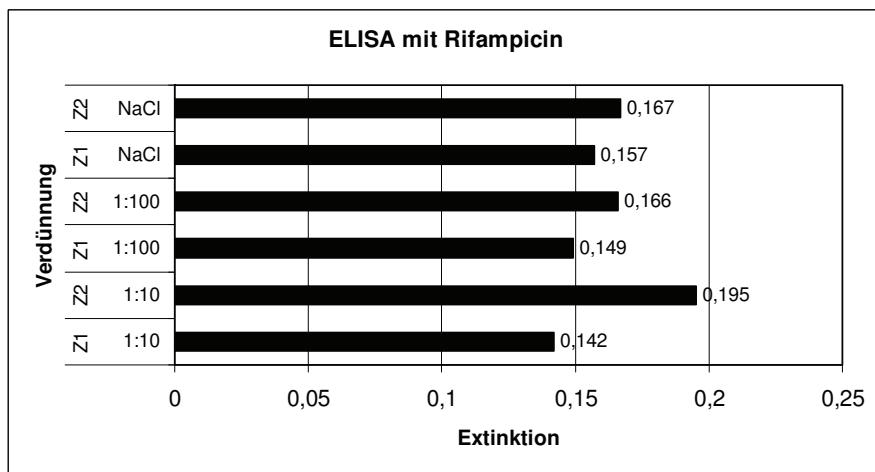


Abbildung 27: ELISA zur Testung Rifampicin-abhängiger Antikörper. Gezeigt ist exemplarisch die negative Reaktion eines Serums. Alle Werte lagen unter 0,2.

Nachfolgend ist die deskriptive Statistik als zusammenfassendes Ergebnis der Untersuchungen im ELISA zur Bestimmung von medikamentabhängigen Antikörpern dargestellt (**siehe Tabelle 11**). Gezeigt sind jeweils nur die Ergebnisse mit Testthrombozyten eines Spenders, wobei die Resultate mit Testthrombozyten eines anderen Spenders ähnliche Werte zeigten.

Tabelle 11: Darstellung der deskriptiven Statistik bei Einsatz der jeweiligen Medikamente im ELISA in den Verdünnungen 1:10, 1:100 bzw. im NaCl-Ansatz

		N	Minimum	Maximum	Mittelwert	Standardabweichung
Chinidin	1:10	50	0,097	0,187	0,132	0,0187
Chinidin	1:100	50	0,098	0,175	0,129	0,0173
NaCl-Ansatz		50	0,088	0,18	0,132	0,0171
Chinin	1:10	50	0,081	0,222	0,126	0,0208
Chinin	1:100	50	0,090	0,203	0,125	0,0197
NaCl-Ansatz		50	0,082	0,215	0,124	0,0212
Carbamazepin	1:10	50	0,085	0,184	0,124	0,0216
Carbamazepin	1:100	50	0,084	0,204	0,120	0,0245
NaCl-Ansatz		50	0,073	0,190	0,118	0,0238
Cotrimoxazol	1:10	50	0,078	0,221	0,132	0,0333
Cotrimoxazol	1:100	50	0,075	0,254	0,132	0,0034
NaCl-Ansatz		50	0,075	0,244	0,126	0,0345
Ibuprofen	1:10	50	0,101	0,196	0,136	0,0211
Ibuprofen	1:100	50	0,101	0,239	0,135	0,0250
NaCl-Ansatz		50	0,105	0,198	0,142	0,0219
Rifampicin	1:10	50	0,089	0,190	0,132	0,0210
Rifampicin	1:100	50	0,098	0,184	0,127	0,0201
NaCl-Ansatz		50	0,094	0,192	0,126	0,0182
Vancomycin	1:10	50	0,096	0,196	0,142	0,0215
Vancomycin	1:100	50	0,101	0,182	0,140	0,0202
NaCl-Ansatz		50	0,106	0,208	0,144	0,0231

5.1 Diskussion der Versuchsergebnisse mit Abciximab beladenen Thrombozyten

5.1.1 Unterscheidung zwischen echter Thrombozytopenie und Pseudothrombopenie sowie Ausschluss einer Thrombozytopenie durch Heparin

Bei Auftreten von Aggregaten im EDTA-Blut kann es zu einer falsch niedrigen Auszählung durch das Zellzählgerät kommen. Das Phänomen, dass wenige Stunden nach Abciximab-Gabe vermehrt Aggregate im EDTA-Blut auftreten, ist bereits bekannt und von einer Reihe von Autoren beschrieben [Christopoulos et al., 1994a/b; Peter et al., 1999; Sane et al., 2000; Schell et al.]. Es fand sich im Blut bei fünf Patienten unter Gabe von Abciximab ein Thrombozytenabfall um mindestens 50% des Ausgangswertes. Da sich bei vier dieser Blutproben Aggregate im Blutaustrich 1 und/ oder 2 fanden (ohne Nachweis im Blutausstrich 0), stellt sich auch hier die Frage nach der so genannten Abciximab-vermittelten Pseudothrombozytopenie.

Nur ein Patient (Lfd.Nr. 20) entwickelte eine Thrombozytopenie (20000/ μ l VB) ohne Nachweis von Aggregaten, bei anfänglich normaler Plättchenzahl. Folgt man der Definition von Sane und Mitarbeiter (2000) hätte daher nur dieser Patient (1,9%) eine „echte“ Thrombozytopenie entwickelt. Die Häufigkeit des Auftretens einer schweren Thrombozytopenie nach Abciximab-Gabe von 1,9% in unseren Untersuchungen liegt in dem Bereich, wie er auch in der Literatur mit 1-2% gemacht wird [Curtis et al., 2004; Charles et al., 2004; Dery et al. 2004; Jubelirer et al., 1999]. Zu erwähnen ist, dass sich bei 7,7 % der Seren Aggregate fanden, bei denen keine Verminderung der Plättchenzahl auffiel (Lfd.Nr. 6, 12, 14 und 23). Bei diesen Seren war sogar ein Anstieg der Thrombozytenzahl im Verlauf zu beobachten. Was wiederum dagegen spricht, dass bei Auftreten von Aggregaten im Ausstrich die Thrombozytenzahlen bei Bestimmung mit einem elektronischen Zählgerät grundsätzlich zu niedrig gemessen werden. Dennoch konnte ein statistisch signifikanter Unterschied ($p=0,04$) hinsichtlich des Thrombozytenabfalls bezüglich der Aggregatbildung nachgewiesen werden.

In der Literatur ist beschrieben [Charles et al., 2004; Christopoulos et al., 1994b; Schell et al., Sane et al. 2000], dass es sich bei 36,3-69,23% aller Thrombozytopenien nach Abciximab-Gabe um eine Pseudothrombozytopenie handelt. Die große Spannweite der Angaben liegt wohl darin begründet, dass eine Pseudothrombozytopenie durch Abciximab von den Beschreibern unterschiedlich definiert wird und verschiedene Referenzbereiche (zwischen <150.000 bis <100.000/ μ l VB) benutzt wurden. Um eine Pseudothrombopenie zu erkennen,

ist es erforderlich einen Blutausstrich anzufertigen. Zur Differenzierung kann auch Citrat-Blut abgenommen werden, da es dort seltener zur Aggregatbildung der Thrombozyten kommen soll (Christopoulos et. al. 1994b, Stiegler et. al. 2000). Dies kann einen unnötigen Abbruch der Therapie mit Abciximab verhindern und eine eventuell geplante Transfusion vermeiden. Shane und Mitarbeiter postulieren den zeitlichen Verlauf eines Thrombozytenabfalls als Kriterium zur Unterscheidung heranzuziehen. Eine echte Thrombozytopenie würde innerhalb der ersten vier Stunden nach Abciximab-Infusion auftreten, wogegen eine Pseudothrombozytopenie erst zu einem späteren Zeitpunkt zu sehen sei. Diese Beobachtung konnten wir nicht machen, da Aggregate in unseren Ausstrichen meist schon nach 2-4 Stunden auftraten.

Warum es nach Abciximab-Infusion zu einer erhöhten Agglutination der Thrombozyten in vitro kommt ist noch nicht völlig geklärt. Jedoch scheint sich der Mechanismus, durch Abciximab hervorgerufen, von der „klassischen“ Pseudothrombozytopenie zu unterscheiden [Schell et. al., 2002; Sane et al., 2000]. Es wird angenommen, dass die Anwesenheit des chimeren Fab-Fragmentes auf der Plättchenoberfläche zu einer erhöhten Anlagerung von IgG führt, welches die Verklumpungen von Thrombozyten fördert [Christopoulos et. al 1994b; Stiegler et al., 1999].

Da alle getesteten Abciximab-Patienten zugleich auch Heparin erhielten, ist nicht ausgeschlossen, dass der Thrombozytenabfall durch HIT-Antikörper bedingt war. Die Thrombozytopenie der Patienten ohne Aggregatbildung trat innerhalb der ersten 24 Stunden auf. Wie bereits in der Einleitung (Kapitel 2.2.3) beschrieben, tritt eine HIT II meist erst nach 5-10 Tagen auf [Greinacher et al., 1991; Warkentin et al., 2004b]. Aufgrund dieser Tatsache und fehlender klinische Hinweise auf Zeichen einer HIT wie z.B. thromboembolische Komplikationen wurde keine zusätzliche Diagnostik zum Nachweis auf HIT-Antikörper durchgeführt.

5.1.2 Antikörper gegen Abciximab-beladene Thrombozyten bereits vor Abciximab-Gabe im Serum

In unseren Versuchen konnte gezeigt werden, dass sich in Patientenserien vor Abciximab-Gabe (Probe 0) sowie in Normalspenderserien Antikörper gegen Plättchen die mit Abciximab beladen wurden, befinden.

Dies weist auf das Vorhandensein so genannter „natürlicher, präformierter Antikörper“ hin. Derartige Antikörper sind bereits in der Literatur mehrfach beschrieben [Abrams et al., 2004; Bednar et al., 1999; Cristopoulos et al., 1994; Curtis et al., 2002]. Auch Curtis und Mitarbeiter [2002] fanden heraus, dass sich bei 74% gesunder Individuen die kein Abciximab erhielten, Antikörper, die durch Fab-Fragment hemmbar sind, befinden. Diese natürlichen Antikörper hätten jedoch keine klinische Bedeutung und würden keine Thrombozytopenie verursachen. Auch in unseren Versuchen konnten alle Antikörper der Normalspenderserien sowie der Patienten vor Abciximab-Gabe komplett durch Fab-Fragment gehemmt werden. Die Ergebnisse unseres Absorptionsversuchs sowie die Tatsache, dass Abciximab durch Papainsspaltung eines Hybridantikörpers gewonnen wird und humanes Fab-Fragment enthält [Mascelli et al., 1999], lassen vermuten, dass diese „harmlosen“ Antikörper mit dem „proteolytischen“ Ende des Fab-Fragment reagieren.

Lediglich bei den Patienten die nach Gabe von Abciximab eine Thrombozytopenie entwickelten, ließen sich in Curtis Versuchen die freien Antikörper gegen Abciximab nicht oder nur schwer durch Fab-Fragment hemmen [Curtis et al., 2002/2004]. Diese Beobachtung wird durch die Untersuchung des Patientenserums mit verzögerter Thrombozytopenie bestätigt. Auch in dem in dieser Arbeit beschriebenen Serum konnten die freien Antikörper gegen Abciximab-beladene Thrombozyten kaum durch Fab-Fragment gehemmt werden (siehe Kapitel 3.3).

5.1.3 Keine Reaktion der freien Antikörper mit dem kompletten Antikörper 7E3 (MAK) nach Vorabsorption

Keines der 52 Patientenserien vor Abciximab-Gabe reagierte in unseren Versuchen mit dem MAK 7E3 nach Vorabsorption mit Maus-IgG beladenen Beads (siehe Abbildung 18). Dies fanden auch Curtis et al. [2002] heraus, als sie „normales“ Serum mit 7E3 beladenen Testthrombozyten inkubierten. Dabei blieb eine Reaktion dieser Seren mit Thrombozyten, die

mit MAK 7E3 inkubiert wurden, aus. In ihren Versuchen zeigte sich nur eine Reaktion der Seren mit dem MAK 7E3 bei Patienten die eine Thrombozytopenie entwickelten.

Ähnlich verhielt es sich in unserem Versuch bei Einsatz des Patientenserums der eine verzögerte Thrombozytopenie entwickelte (Kapitel 4.5). In diesem Fall reagierten die Abciximab-Antikörper, trotz Vorabsorption durch Maus-IgG beladene Beads, mit dem MAK 7E3.

Da 7E3 und Abciximab sich nur die murinen variablen Sequenzen teilen, vermutet man, dass Antikörper von Patienten, die eine Thrombozytopenie entwickeln, mit dem murinen Teil des Abciximab reagieren. Dies bestätigt wiederum den Verdacht, dass

Antikörper „normaler Personen“ das proteolytische (humane) Ende erkennen [Curtis et al., 2002; Charles et al., 2004]. Auch in Versuchen, die Christopoulos und Mitarbeiter [1994] durchführten, blieb eine Reaktion der Patientenserien (ohne Entwicklung einer Thrombopenie) mit dem murinen Teil des Fab-Fragmentes aus. Es zeigte sich nur eine Reaktion der Antikörper mit dem humanen Ende.

Eine mögliche Erklärung, warum fünf unserer Seren mit dem kompletten MAK 7E3 ohne Vorabsorption durch Maus-IgG reagierten, könnte darin bestehen, dass natürliche Antikörper gegen Maus IgG in diesen Seren vorlagen. Diese sind daher auch gegen Determinanten des murinen monoklonalen Antikörpers 7E3 gerichtet [Hewitt et al., 1994; Curtis et al., 2002, 2004; Mascelli et al., 1999]. Dabei ist von keiner spezifischen Reaktion gegen den MAK 7E3 auszugehen, sondern von Antikörpern die mit Mausanteilen des monoklonalen Antikörpers reagieren. Da diese Immunogenität des kompletten Antikörpers 7E3 bekannt ist, entwickelte man deshalb den Antikörper weiter. Wie bereits in der Einleitung erwähnt, wurde dazu der variable Bereich des MAK 7E3 in humane Sequenzen eingebaut. So entstand das humanisierte Antikörperfragment Abciximab, wodurch die Immunogenität deutlich herabgesetzt werden konnte [Knigth et al., 1995; Mascelli et al., 1999].

Bei abschließender Bewertung weisen unsere Versuchsergebnisse (keine Reaktion mit dem kompletten murinen Antikörper 7E3 und Hemmbarkeit der Antikörper durch humanes Fab-Fragment) bei vielen normalen Individuen auf das Vorhandensein natürlicher, vorbestehender Antikörper hin, die gegen das proteolytische Ende des humanen Fab-Fragments gerichtet sind [Abrams et al., 2004; Aster et al., 2005; Cristopoulos et al., 1994a; Curtis et al., 2002]. Diese Antikörper sind jedoch nicht in der Lage, eine Thrombozytopenie auszulösen [Curtis et al., 2004].

Warum es nur bei Antikörpern, die möglicherweise das murine Ende im Fab-Fragment erkennen, zu einer Thrombozytopenie kommt, ist jedoch noch unklar.

Eine andere Hypothese besagt, dass Antikörper im Patientenserum mit veränderten Strukturen im GP IIb/IIa-Komplex (durch Abciximab hervorgerufen) reagieren. Dieser auch als „Neo-Epitop-Theorie“ beschriebene Mechanismus wird von einigen Autoren ebenfalls als Möglichkeit einer Thrombozytopenie durch Abciximab postuliert [Abrams et al., 2004; Bednar et al., 1999; Bougie et al., 2002; Curtis et al., 2004; Gawaz et al., 1998; Jennings et al., 2000; Peter et al., 1998].

Gawaz et al. [1998] zeigten in Versuchen, dass es durch Anlagerung von Abciximab zu einer Konformationsänderung am Glykoproteinkomplex kommt. Die Bildung dieser so genannten Liganden-induzierten Bindungsstellen (LIBS) würde mit einem Thrombozytenabfall korrelieren. Antikörper könnten sich an die veränderte Thrombozytenmembran binden und in bestimmten Fällen eine Thrombozytopenie auslösen [Abrams et al., 2004; Bougie et al., 2002; Curtis et al., 2004; Jennings et al., 2000].

5.1.4 Zusammenhänge zwischen plättchenständigen Antikörpern (GP-PAIgG) und Thrombozytenabfall, freien Antikörpern gegen Abciximab-beladenen Thrombozyten sowie Thrombozytenaggregaten

Vor Abciximab-Gabe konnten nur bei einem Patient plättchenständige Antikörper auf den autologen Thrombozyten nachgewiesen werden. Die Ursache hierfür ist unklar. Wie aus der Akte dieses Patienten hervorgeht, erhielt dieser erstmalig Abciximab. Eine mögliche Autoimmunerkrankung als Ursache ist ebenfalls nicht bekannt.

Nach 2-4 Stunden zeigten sich schon bei 53,8% und nach 24 Stunden bei 72% der Patienten plättchenständige Antikörper. Dies lässt vermuten, dass durch Abciximab-Infusion ein Anstieg plättchenständiger Antikörper (PAIgG) verursacht wird [Christopoulos et al., 1994a/b; Curtis et al., 2002].

Auch in Untersuchungen, die Christopoulos und Mitarbeiter [1994] durchführten, zeigte sich innerhalb eines Tages eine Erhöhung von PAIgG bei Patienten nach Abciximab-Infusion. Der frühe Zeitpunkt des PAIgG-Anstieg nach Infusion untermauert die Hypothese präexistierender Antikörper im Serum.

Auch in unseren Versuchen war der Anstieg PAIgG kaum von der Entwicklung einer Thrombozytopenie abhängig (siehe Kapitel 4.8). Umgekehrt entwickelte z.B. das Serum Nr. 21 eine Thrombozytopenie (keine Aggregate) ohne Nachweis von PAIgG.

Da auch andere Krankheiten die mit einer Thrombozytopenie einhergehen (z.B. AITP, PTP), plättchenständige Antikörper aufweisen, sollte bei der Diagnostik auf Autoantikörper im Labor auf eine eventuelle Abciximab-Gabe hingewiesen werden. Abciximab-Antikörper können nämlich bei der Diagnostik auf Autoantikörper stören und Fehlinterpretationen verursachen.

Der enge Zusammenhang ($\text{Rho} = 0,723$; $p = 0,001$) zwischen freien Antikörpern im Serum vor Abciximab-Gabe und der Entwicklung plättchenständiger Antikörper nach Abciximab-Gabe, könnte durch die gleiche Art bzw. Herkunft dieser Antikörper begründet sein. Eine Erklärung stellen möglicherweise die im Serum schon prä-existierenden Abciximab-abhängigen Antikörper dar [Christopoulos et al., 1994a/b]. Die zunächst vor Abciximab-Gabe noch nicht (im direkten MAIPA) nachweisbaren plättchenständigen Antikörper, könnten sich an Abciximab oder an die durch Abciximab verursachten LIBS binden, jedoch erst nachdem Abciximab in vivo an das GP IIb/IIIa gebunden hat. Bei der Testung auf freie Antikörper im Serum vor Abciximab-Gabe wurde Abciximab in vitro an die Thrombozyten gebunden und so die Gabe von Abciximab in vivo simuliert. Dies ermöglicht eventuell den bereits vorhandenen freien Antikörpern im Serum an Epitope des Abciximab, oder durch Abciximab hervorgerufene Strukturveränderungen der Thrombozytenglykoproteine zu binden. Zu bedenken ist jedoch, dass bei 15 Seren die GP-PAIgG entwickelten, keine freien Antikörper gefunden wurden und nur die Minderheit der Patienten auch eine Thrombozytopenie ausbildete.

Es konnte kein deutlicher Zusammenhang zwischen der Anwesenheit von GP-PAIgG und der Entstehung von Aggregaten nachgewiesen werden ($p=0,095$).

Dennoch ist in der Literatur beschrieben, dass die Entstehung von Thrombozytenaggregaten nach Abciximab-Gabe durch plättchenständige Antikörper bedingt sein könnte [Christopoulos et al., 1994b]. Christopoulos und Mitarbeiter [1994a/b] stellten in Versuchen mit 19 Patientenserien fest, dass das Ausmaß der Aggregatbildung im EDTA-Blut von der Anwesenheit der GP-PAIgG abhängt und mit deren Stärke korreliert.

5.1.5 Bewertung und Diskussion der Fallbeschreibung des Patienten mit verzögerter Thrombozytopenie nach Abciximab-Infusion

Aufgrund der Befundkonstellation handelte es sich bei diesem Patienten sehr wahrscheinlich um eine verzögerte durch Abciximab-induzierte Thrombozytopenie. Dieses Phänomen beschreiben auch Curtis et al., die 2004 dreizehn Fälle einer verzögerten Thrombopenie nach Abciximab-Gabe untersuchten. Auch sie stellten fest, dass sich bei der nach 3-9 Tagen nach Abciximab-Infusion auftretenden Thrombopenie, sehr starke Antikörper gegen Abciximab-beladene Thrombozyten im Serum befanden [Nurden et al., 2004]. Diese Antikörper ließen sich, wie in unserem Versuch, ebenfalls kaum durch humanes Fab-Fragment hemmen. Weitere Fälle einer verzögerten Thrombozytopenie durch Abciximab, die zwischen dem 6. und 12. Tag auftraten, sind in der Literatur zu finden [Jenkins et al., 1998, Nurden et al., 2004; Sharma et al., 2002; Trapolin et al., 2005]. Ebenso wie unserem Fallbeispiel reagierten auch in Curtis [2004] Versuchen die Antikörper spezifisch mit dem kompletten Antikörper 7E3.

Warum es bei diesen Patienten erst nach einigen Tagen zu einer Thrombozytopenie kommt, ist bislang unklar. Dennoch kann man aus den Ergebnissen schließen, dass es sich um eine andere Art Antikörper handelt, wie sie bei Patienten vorkommen die keine Thrombozytopenie entwickeln. Eine Erklärung stellen nach Curtis et al. [2004] die Entstehung neuer Antikörper oder die Transformation schwacher Antikörper zu starken dar, da Abciximab bis zu zwei Wochen nach Infusion im Organismus zirkulieren kann [Nurden et al., 2004].

In unserem Fallbeispiel war es leider nicht möglich, das Serum vor Abfall der Thrombozytenzahl auf Antikörper zu testen. Interessant wäre gewesen, ob in dem Serum bereits zu diesem Zeitpunkt Antikörper vorlagen, die nicht durch Fab-Fragment hemmbar sind.

Eine Thrombopenie im Rahmen einer heparininduzierten Thrombozytopenie konnte bei dem Patienten nahezu ausgeschlossen werden, da hierfür keine klinischen Symptome sprachen. Außerdem wurden Antikörper, wie sie bei HIT-Patienten üblicherweise gefunden werden, nicht nachgewiesen. Eine starke Thrombozytopenie durch ASS oder Clopidogrel, wäre eher ungewöhnlich (laut Fachinformation liegt das Auftreten einer Thrombozytopenie unter 0,1%). Clopidogrel verursacht als unerwünschte Wirkung eher ein Bild der thrombotisch-thrombozytopenischen Purpura (TTP), was jedoch bei dem Patienten nicht vorlag. Der Thrombozytenanstieg des Patienten unter kontinuierlicher Therapie mit Clopidogrel sowie ASS sprechen ebenfalls gegen den Plättchenabfall durch diese beiden Medikamente. Durch

die Kombination von Allopurinol und Delix, wie sie der Patient erhielt, ist ein Thrombozytenabfall beschrieben (Fachinformation, unter 0,1%). Da der Patient diese Medikamente schon länger nahm und auch bei Entlassung auf seinem Medikamentenplan standen, scheint auch dies keine Ursache des Plättchenabfalls gewesen zu sein. Dass die Einnahme der anderen Medikamente eine Immunthrombozytopenie ausgelöst hat, ist nicht sehr wahrscheinlich.

5.1.6 Fazit aus den Untersuchungsergebnissen in Zusammenhang mit der Literatur und Management bei Auftreten einer Thrombozytopenie

Die Untersuchungen in dieser Arbeit zeigen, dass eine Antikörperbestimmung eine Vorhersage einer Thrombopenie nach Gabe von Abciximab nicht erlaubt. Diese Aussage wurde möglich, weil die Bestimmung der Antikörper, im Gegensatz zu den meisten bisher publizierten Untersuchungen auf diesem Gebiet, in dieser prospektiven Untersuchung auch vor der Medikamentengabe erfolgte. Somit bleibt die regelmäßige Kontrolle der Thrombozytenwerte weiterhin wichtiger Bestandteil bei Abciximab-Gabe und sollte im Zusammenhang mit der Klinik gesehen werden. Da Thrombozytopenien in den meisten Fällen innerhalb der ersten 24 Stunden nach Abciximab-Gabe auftreten [Abrams et al., 2004; Berkowitz et al., 1997; Cristopoulos et al., 1994; Jubelirer et al., 1999; Shell et al., 2002], sind Blutbildkontrollen vor Abciximab-Infusion, nach 2-4 sowie nach 24 Stunden durchzuführen. Bei Auftreten einer Thrombozytopenie muss zunächst eine Pseudothrombozytopenie von einer echten Thrombozytopenie abgegrenzt werden, indem ein Blutaussstrich angefertigt und/oder Citratblut abgenommen wird [Jubelirer et al., 1999; Stiegler et al., 2000; Sane et al., 2000; Christopoulos et al., 1994]. Auch andere Ursachen einer Thrombozytopenie müssen differentialdiagnostisch ausgeschlossen werden [van den Bemt et al., 2004; Rothe, 2006]. Dazu sollte neben der Klinik, eine Medikamentenanamnese, HIT-Diagnostik und evtl. auch eine Gerinnungsanalyse erfolgen [Abrams et al., 2004; Berkowitz et al., 1997; Bishara et al., 2000; Jubelirer et al., 1999; Sharma et al., 2002].

Bestätigt sich der Verdacht einer schweren Thrombozytopenie durch Abciximab, sollte dieses unter Abwägung des Risikos eines Gefäßverschlusses abgesetzt werden. Kommt es dennoch zu Blutungskomplikationen, zeigt eine Plättchentransfusion den größten Erfolg [Berkowitz et al., 1997; Bishara et al., 2000; Jubelirer et al., 1999; Sharma et al., 2002]. Beachtet man diese Maßnahmen bei der Behandlung mit Abciximab, so lässt sich das Risiko von

Blutungskomplikation wie GIT-Blutungen oder intrakraniellen Blutungen stark reduzieren [Bishara et al., 2000].

Da sich aus unseren Untersuchungsergebnissen kein eindeutiger Zusammenhang zwischen Thrombozytopenie und freien Antikörpern gegen Abciximab bzw. plättchenständige Antikörpern nachweisen ließ, scheint ein Screening auf derartige Antikörper derzeit nicht sinnvoll um eine mögliche Thrombozytopenie vorhersagen bzw. verhindern zu können [Aster et al. 2004; Nurden 2004]. Wie in der Fallbeschreibung der verzögerten Thrombopenie durch Abciximab erläutert, scheinen die nachgewiesenen Antikörper gegen Abciximab-beladene Thrombozyten nur mit dem murinen Teil des Abciximab zu reagieren. Ließe sich dieses Ergebnis auf alle Thrombopenien durch Abciximab übertragen, so könnte die Untersuchung der Patientenserien nach Abciximab-Infusion auf Antikörper die mit dem MAK 7E3 reagieren und nicht durch Maus-IgG hemmbar sind, als Möglichkeit einer Risikoabschätzung angesehen werden. Auch Curtis et al. [2002] postulieren das Screening von Patienten, die Abciximab ein zweiten Mal erhalten, auf Antikörper die mit dem murinen Teil reagieren. Weiterhin könnte die Testung auf freie Antikörper, die sich nicht durch Fab-Fragment hemmen lassen, zur Abklärung einer Thrombozytopenie durch Abciximab sinnvoll sein.

Um solche Fragestellungen näher zu beleuchten, sind jedoch weitere Untersuchungen nötig.

5.2 Bewertung der Testung medikamentabhängiger Antikörper vom „Chinidintyp“

Mit Hilfe des ELISA zum Nachweis medikamentabhängiger Antikörper konnten in den 50 getesteten Normalspenderseren keine Antikörper, die nur in Anwesenheit der jeweils eingesetzten Substanz (Chinin, Chinidin, Rifampicin, Carbamazepin, Cotrimoxazol, Vancomycin und Ibuprofen) reagieren, nachgewiesen werden. Aufgrund dieser Ergebnisse ist davon auszugehen, dass in Individuen, die zuvor nicht durch die getesteten Substanzen exponiert waren, keine medikamentabhängigen Antikörper vorkommen.

In dieser Studie wurde dagegen nicht untersucht, ob es bei Patienten die mit den untersuchten Medikamenten behandelt werden ohne eine Thrombozytopenie zu entwickeln zur Bildung von medikamentabhängigen Antikörpern kommt. Eine solche Untersuchung steht nach meiner Kenntnis noch aus.

Wie in der Einleitung bereits erwähnt, können auch Metabolite bestimmter Medikamente mit einer medikamentabhängigen Thrombozytopenie in Verbindung gebracht werden [Asvadi et al. 2003; Bougie et al., 2001; Eisner et al., 1972; Kiefel et al., 1987a]. Es ist von einer höheren Zahl als der bislang bekannten Metabolite auszugehen ist [Bougie et al., 2001]. Unsere Untersuchungen beschränkten sich deshalb nur auf Antikörper die durch die Medikamente selbst hervorgerufen werden. Auf die Testung metabolitspezifischer Antikörper wurde verzichtet. Dies wäre mit einem zusätzlich hohen Aufwand und schlechter Durchführbarkeit bei geringer Wahrscheinlichkeit auf positive Ergebnisse verbunden gewesen.

Da medikamentabhängige Antikörper sehr substanzspezifisch reagieren [Asvadi et al., 2003], ist zu erwarten, dass auch metabolitabhängige Antikörper speziell gegen bestimmte Strukturen gerichtet sind. In diesem Fall könnten mögliche metabolitabhängige Antikörper in den Seren nicht mit den in den Test eingesetzten Medikamenten reagieren [Bougie et al., 2001; Salama et al., 1985]. Deshalb schließen unsere Untersuchungen das Vorhandensein metabolitspezifischer Antikörper der getesteten Normalspenderseren nicht vollständig aus. |

Ein weiterer Aspekt stellt die Methodik des Tests zur Bestimmung medikamentabhängiger Antikörper dar und die damit verbundene Sensitivität. Die ELISA-Technik ist eine vielseitig einsetzbare und anerkannte Methode. Jedoch ist die Sensitivität des ELISA zur Bestimmung medikamentabhängiger Antikörper nicht genau bekannt und nach eigenem Erkenntnisstand in der Literatur nicht eindeutig beschrieben [Kiefel 2003a]. Auch bei anderen verfügbaren Tests (z.B. Durchfluszytometrie, Immunpräzipitation) zur Erfassung medikamentabhängiger

Antikörper ist die Sensitivität nicht beschrieben. Leider gibt es bislang keine „Goldstandards“ bei der Testung auf medikamentabhängige Antikörper, daher sind die Tests oft experimenteller Natur [van den Bemt et al., 2004; Cines, 1998; George et al., 1998].

Durch zu geringe Antikörper-Titer in den Normalspender-Seren könnten falsch negative Resultate bei geringer Sensitivität der ELISA-Technik entstehen [Eisner et al., 1972].

Für die Sensitivität des ELISA als Testmethode zur Bestimmung medikamentabhängiger Antikörper sprechen der häufige Einsatz einiger Forscher || [Bougie et al., 2001; Kroll et al., 2000; Mizon et al., 1997] sowie die Ergebnisse unserer Fallbeispiele (siehe Kapitel 3.12.4 und 3.12.5). In diesen Seren von Patienten die das verdächtige Medikament eingenommen hatten und ein Thrombozytenabfall zu verzeichnen war, zeigten sich positive Resultate.

Bei der Testung mit dem ELISA wurde darauf geachtet, dass alle verwendeten Lösungen frisch angesetzt wurden. Die Reinsubstanzen (Medikamente) wurden vor jeder Testung neu gelöst und verdünnt, so dass ein möglicher Zerfall der Medikamente gering gehalten werden konnte.

Die Spezifität (es wird nur das bestimmt, was gemessen werden soll) konnte durch Einsatz negativer Seren gut kontrolliert werden (siehe auch Kapitel Auswertung ELISA).

Weiter zu erwähnen ist, dass nicht in jedem Testansatz gleichzeitig eine Positivkontrolle, die die jeweiligen Antikörper gegen die eingesetzte Substanz enthielt, mitgeführt werden konnte. Dies lag zum einen daran, dass teilweise solche Seren nicht zur Verfügung standen. Andererseits war bei den verfügbaren Positivkontrollen, die die spezifischen ddAb enthielten, nicht genügend Material vorhanden um sie in jedem Testansatz mitführen zu können. Dieses Problem wurde aber durch Einsatz eines Serums, das Antikörper gegen HPA 1a enthielt, gelöst.

||
Wie in der Literatur beschrieben, konnte in verschiedenen Versuchen gezeigt werden, dass ein Medikamentenüberschuss in vitro die medikamentabhängigen Antikörper nicht inhibieren. Daher wird, wie in der Einleitung erwähnt, der Hapten-Mechanismus von vielen Autoren im Zusammenhang mit medikamentabhängigen Antikörpern abgelehnt [Aster et al., 1999; Bougie et al., 2001; Kiefel et al., 1993]. Diese Beobachtung machten wir ebenfalls in unseren Testungen mit ddAb-positiven Seren, da in allen Testungen die 1:10 Medikament-Verdünnungen höhere Reaktionen als die 1:100 Verdünnung zeigten (siehe Fallbeschreibungen). Deshalb ist auszuschließen, dass mögliche medikamentabhängige Antikörper in den Proben durch zu hohe Medikamentenverdünnungen inhibiert wurden und so ein falsch negatives Ergebnis erzeugte.

Da aufgrund unserer Versuche mit Normalspenderseren davon auszugehen ist, dass medikamentabhängige Antikörper in dieser Population nicht vorkommen, scheint diese Art von Antikörper sehr spezifisch nur in Anwesenheit der verursachenden Substanz gebildet zu werden. Dabei reagieren die gebildeten Antikörper mit charakteristischen Strukturen auf den Glykoproteinen der Thrombozytenmembran [Asvadi et al., 2003; Stricker et al., 1986; Visentin et al., 1991]. Die Reaktion des getesteten Serums in dem Chinidin-abhängige Antikörper nachgewiesen werden konnten, reagierte in unserem Versuch unter Einsatz des MAIPA-Assay mit dem GP Ib/IX-Komplex auf den Thrombozyten (siehe Kapitel 3.12.4). Dies bestätigt die Ergebnisse zahlreicher Forscher. Auch sie fanden heraus, dass dieser Komplex die häufigste Zielstruktur der Chinidin-abhängigen Antikörper darstellt [Asvadi et al., 2003; Chong et al., 1991].

6 Zusammenfassung:

Thrombozytopenien können durch unterschiedliche Mechanismen ausgelöst werden. Eine wichtige Differentialdiagnose ist die medikamenteninduzierte Thrombozytopenie. Bei einem Teil der durch Medikamente ausgelösten Thrombozytopenien spielen immunologische Mechanismen eine zentrale Rolle. Neben häufigeren Ursachen wie bei der durch Heparin verursachte Thrombozytopenie müssen auch andere Medikamente wie Chinin, Chinidin, Carbamazepin, Cotrimoxazol, Vancomycin, Rifampicin aber auch Abciximab in Betracht gezogen werden.

Klassisch für eine Thrombozytopenie vom „Chinidin-Typ“ ist, dass sie nur in Anwesenheit der auslösenden Substanz auftritt und nach Absetzen wieder verschwindet. Dies macht man sich auch in der Diagnostik zu Nutze, indem die verdächtige Substanz dem Testansatz zugegeben wird. Bei positivem Testausfall wird dieser mit dem Ansatz ohne Medikament verglichen. Wie in der Literatur bereits beschrieben, reagierte auch in unseren Versuchen der getestete Chinidinantikörper im Patientenserum mit dem GP IX. Weitere Untersuchungen beschäftigten sich mit der Frage, ob sich auch in Individuen, die dieses Medikament nicht einnehmen, Antikörper gegen diese Substanzen befinden. In allen 50 getesteten Normalspenderseren konnten jedoch mit den getesteten Substanzen keine medikamentabhängigen Antikörper, bei Testung im ELISA mit Medikament, nachgewiesen werden. Vernachlässigt man die Antikörper die durch Metabolite der Medikamente hervorgerufen werden und in unseren Untersuchungen nicht eingegangen sind, so ist von spezifischen Antikörpern auszugehen, die nur in Anwesenheit der auszulösenden Substanz in Individuen gebildet werden.

Wie in unseren weiteren prospektiven Untersuchungen gezeigt werden konnte, verhält es sich mit dem GP IIb/IIIa-Rezeptor-Antagonist Abciximab anders. Bei Testung mit Normalspenderseren sowie Patientenserien im MAIPA-Assay fanden sich Antikörper gegen Abciximab bereits vor Abciximabgabe im Serum. Da diese Antikörper alle durch humanes Fab-Fragment gehemmt werden konnten, ist davon auszugehen, dass sie mit dem proteolytischen Ende des rekombinanten Antikörpers Abciximab reagieren. Während Antikörper von Patienten die eine Thrombozytopenie entwickeln nicht durch humanes Fab-Fragment hemmbar waren. Daher ist anzunehmen, dass diese Antikörper mit dem murinen Teil des Abciximab reagieren. Eine unspezifische Reaktion gegen Mausdeterminanten dieser Antikörper konnte ausgeschlossen werden, da das getestete Serum nicht durch Maus-IgG gehemmt werden konnte.

Eine Thrombozytopenie durch Abciximab tritt meist innerhalb der ersten 2-4 Stunden nach Abciximabgabe auf. Dennoch sollte man bei abfallender Plättchenzahl innerhalb der ersten zwölf Tage nach Infusion an Abciximab als Auslöser denken. Dabei sollte immer eine Pseudothrombozytopenie, hervorgerufen durch Thrombozytenaggregate, von einer echten Thrombopenie abgegrenzt werden. Eine Pseudothrombopenie tritt insbesondere bei Patienten, die Abciximab erhalten auf und ist häufiger als eine echte Thrombozytopenie durch Abciximab zu beobachten. Dabei konnte keine Korrelation zwischen freien ($p=0,186$) sowie plättchenständigen ($p=0,06$) Antikörpern mit einem Thrombozytenabfall nachgewiesen werden, so dass das Auftreten dieser Antikörper nicht regelhaft mit einem Plättchenabfall einhergeht. Jedoch zeigten die prospektiven Untersuchungen an 52 Blutproben einen deutlichen Zusammenhang zwischen freien thrombozytären Antikörpern vor Abciximabgabe mit glykoproteinspezifischen Antikörpern auf GP IIb/IIIa nach Abciximabinfusion ($p<0,001$).

Bei der Diagnostik auf thrombozytäre Autoantikörper (GP-PAIgG) bei einer klinisch vermuteten Autoimmunthrombozytopenie sollte stets auf eine Abciximabgabe hingewiesen werden, da sich bereits 2-4 Stunden nach Abciximabgabe bei 53,8% der Patienten sowie nach 24 Stunden bei 72% der Patienten erhöhte PAIgG-Spiegel finden lassen. Die erhöhten PAIgG-Titer nach Abciximabgabe können sich bei der Diagnostik anderer Erkrankungen mit erhöhten plättchenständigen Antikörpern störend auswirken.

7 Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
AITP	Autoimmunthrombozytopenie
ddAb	drug-dependent Antikörper (medikamentabhängige Antikörper)
EDTA	Ethylendiamintetraazetat
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
GP	Glykoprotein
GP-PAIgG	IgG-Antikörper gegen thrombozytäre Glykoproteine
HIT	Heparin-induzierte Thrombozytopenie
HIPA	Heparin-induced platelet activation assay
HUS	hämolytisch-urämisches-Syndrom
Lfd.Nr.	laufende Nummer der Seren
MAIPA	Monoklonal Antibody Immobilization of Platelet Antigens
MAK	monoklonale Antikörper
PTCA	perkutane transluminale Koronaroangioplastie
PTT	partielle Thromboplastinzeit
RCA	rechte Koronararterie
RIVA	Ramus interventrikularis anterior
TTP	thrombotisch-thrombozytopenische Purpura
VB	Vollblut

Literaturverzeichnis

Literaturverzeichnis

Abrams CS, Cines DB. Thrombocytopenia after treatment with platelet glycoprotein IIb/IIIa inhibitors. *Cur Hematol Reports* 2004; 3: 143-147.

Aster RH. Drug-induced immune thrombocytopenia: an overview of pathogenesis. *Seminars in Hematology* 1999; 36 (Suppl. 1): 2-6.

Aster RH, Curtis BR, Bougie DW. Thrombocytopenia resulting from sensitivity to GP IIb-IIa inhibitors. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* 2004; 30(5): 569-577.

Aster RH. Immune thrombocytopenia caused by glycoprotein IIb/IIIa inhibitors. *Chest* 2005; 127(2): 53-58.

Asvadi P, Ahmadi Z, Chong BH. Drug induced thrombocytopenia: localization of the binding site of GP IX-specific quinine-dependent antibodies. *Blood* 2003; 102: 1670-1677.

Bednar B, Cook JJ, Holahan MA, Cunningham ME, Jumes PA, Bednar RA et al. Fibrinogen receptor antagonist-induced thrombocytopenia in chimpanzee and rhesus monkey associated with preexisting drug-dependent antibodies to platelet glycoprotein IIb/IIIa. *Blood* 1999; 94: 587-599.

Van den Bemt P, Meyboom R, Egberts A. Drug-induced immune thrombocytopenia. *Drug Safety* 2004; 27: 1243-1252.

Berkowitz SD, Harrington RA, Rund MM, Tscheng JE. Acute profound thrombocytopenia after c7E3 Fab (Abciximab) therapy. *Circulation* 1997; 95: 809-813.

Berndt MC, Chong BH, Bull HA, Zola H, Castaldi PA. Molecular characterization of quinine/quinidine drug-dependent antibody platelet interaction using monoclonal antibodies. *Blood* 1985; 66: 217-222.

Bishara AI, Hagmeyer KO. Acute profound thrombocytopenia following abciximab therapy. *Ann Pharmacother* 2000; 34: 924-930.

Literaturverzeichnis

Bougie DW, Wilker PR, Wuitschick ED, Curtis BR, Malik M, Levine S, Lind RN. Acute thrombocytopenia after treatment with tirofiban or ebtifibatide is associated with antibodies specific for ligand-occupied GPIIb/IIa. *Blood* 2002; 100: 2071-2076.

Bougie DW, Aster R. Immune thrombocytopenia resulting from sensitivity to metabolites of naproxen and acetaminophen. *Blood* 2001; 97: 3846-3850.

Burgess JK, Lopez JA, Gaudry LE, Chong BH. Rifampicin-dependent antibodies bind a similar or identical epitope to glycoprotein IX-specific quinine dependent antibodies. *Blood* 2000; 95: 1988-1992.

Charles S, Abrams MD, Douglas B, Cines MD. Thrombocytopenia after treatment with platelet glycoprotein II/ IIIa inhibitors. *Current hematology reports* 2004; 3: 143-147.

Chong BH, Du X, Berndt MC, Horn S, Chesterman CN. Charcterization of the binding domains on platelet glycoproteins Ib-IX and IIb/IIIa complexes for the quinine/quinidine-dependent antibodies. *Blood* 1991; 77: 2190-2199.

Chong BH, Magnani HN. Danaparoid for the treatment of Heparin-induced Thrombocytopenia. In: Warkentin TE, Greinacher A, editors. *Heparin-induced thrombocytopenia*. New York: Dekker; 2004. p. 371-396.

Christie DJ, Mullen PC, Aster RH. Fab-mediated binding of drug-dependent antibodies to platelets in quinidine- and quinine-induced thrombocytopenia. *J. Clin. Invest.* 1985; 75:310-340.

Christopoulos CG. Platelet surface IgG in patients receiving infusions of Fab fragments of a chimaeric monoclonal antibody to glycoprotein IIb-IIIa. *Clin Exp Immunol* 1994a; 98: 6-11.

Christopoulos CG, Machin SJ. A new type of pseudothrombocytopenia: EDTA-mediated agglutination of platelets bearing Fab fragments of a chimeric antibody. *British Journal of Hematology* 1994b; 87: 650-652.

Literaturverzeichnis

Cines DB. Glycoprotein IIb/IIIa antagonists: Potential induction and detection of drug-dependent antiplatelet antibodies. *Am Heart J* 1998; 135: 152-159.

Coller BS, Anderson K, Weisman HF. New antiplatelet agents: Platelet GPIIb/IIIa antagonists. *Thromb Haemost* 1995; 74: 302-308.

Curtis BR, Swyers H, Divgi A, Mc Farland JG, Aster RH. Thrombocytopenia after second exposure to abciximab is caused by antibodies that recognize abciximab-coated platelets. *Blood* 2002; 99: 2054-2059.

Curtis BR, Divgi A, Garrity M, Aster RH. Delayed thrombocytopenia after treatment with abciximab: a distinct clinical entity associated with the immune response to the drug. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2004; 2: 985-992.

Dery JP, Lincoff AM, Kereiakes DJ, Browne K, Little T, George BS, et al. Final results of the ReoPro readministration registry. *Am J Cardiol* 2004; 93: 979-984.

Eichler P, Budde U, Haas S, Kroll H, Loreth RM, Meyer O, Pachmann U, Pötzsch B, Schabel A, Albrecht D, Greinacher A. First workshop for detection of heparin-induced antibodies: validation of the heparin-induced platelet activation test (HIPA) in comparison with a PF4/heparin ELISA. *Thrombosis Haemostasis* 1999; 81: 625-629.

Eisner EV, Shahidi NT. Immune thrombocytopenia due to a drug metabolite. *New England Journal of Medicine* 1972; 287: 376-381.

Gawaz M, Ruf A, Neuman FJ, Pogatsa-Murray G, Dickfeld T, Zohlnhöfer D, Schömig A. Effect of glycoprotein IIb/IIIa receptor antagonism on platelet membrane glycoprotein after coronary stent placement. *Thromb Haemost* 1998; 80: 994-1001.

George JN, Raskob GE, Shah SR, Rizvi MA, Hamilton SA, Osborne S, Vondracek T. Drug induced thrombocytopenia: A systematic review of published case reports. *Ann Intern Med* 1998; 129: 886-890.

Literaturverzeichnis

Greinacher A, Michels I, Kiefel V, Mueller-Eckhardt C. A rapid and sensitive test for diagnosing heparin-associated thrombocytopenia. *Thrombosis Haemostasis* 1991; 66: 734-736.

Greinacher A. Lepirudin for the treatment of Heparin-induced Thrombocytopenia. In: Warkentin TE, Greinacher A, editors. *Heparin-induced thrombocytopenia*. New York: Dekker; 2004. p. 397-436.

Hewitt J, Burton IE. Incidence of autoantibodies to GP IIb/IIIa in chronic autoimmune thrombocytopenic purpura may be overstimulated by the MAIPA. *Br. J. Haematol.* 1994; 86: 418- 420.

Jenkins LA, Lau S, Crawford M. Delayed profound thrombozytopenia after c7E3 Fab (Abciximab) therapy. *Circulation* 1998; 1214-1215.

Jennings LK, Haga JH, Slack SM. Differential expression of a ligand-induced binding site (LIBS) by GP IIb/IIIa ligand recognition peptides and parenteral antagonists. *Thromb Haemost*. 2000; 84:1095-1102.

Jubelirer SJ, Koenig B, Bates MC. Acute profound thrombocytopenia following C7E3 Fab (Abciximab) therapy: case reports, review of the literature and implications for therapy. *American Journal of Hematology* 1999; 61: 205-208.

Kereiakes DJ, Essell JH, Abbottsmith, Broderick TM, Runyon JP. Abciximab-associated profound thrombocytopenia: therapy with immunoglobulin and platelet transfusion. *Am J. Cardiol.* 1996; 78: 1161-3.

Kim HL, Kovacs MJ. Diclofenac-associated thrombocytopenia and neutropenia. *Ann Pharmacother* 1995; 29: 713-717.

Kiefel V, Santoso S, Schmidt S, Salama A, Mueller-Eckhardt C. Metabolite-specific (IgG) and drug-specific antibodies (IgG, IgM) in two cases of trimethoprim-sulfamethoxazole-induces immune thrombocytopenia. *Transfusion* 1987a; 27: 262-265.

Literaturverzeichnis

Kiefel V, Santoso S, Weisheit M, Mueller-Eckhardt C. Monoklonal antibody-specific immobilization of platelet antigens (MAIPA): a new tool for the identification of platelet-reactive antibodies. *Blood* 1987b; 70: 1722-1726.

Kiefel V, Mueller-Eckhardt C. Medikamentös induzierte Immunhämozytopenien. *Deutsche medizinische Wochenschrift* 1993; 118: 113-118.

Kiefel V. Nachweis thrombozytärer Antikörper (IgG). *Laborvorschrift Abteilung Transfusionsmedizin Universität Rostock* 2000.

Kiefel V. Immunologische Diagnostik bei Thromozytopenie. *Deutsches Ärzteblatt* 2003a; 100: A 2159-A 2165.

Kiefel V, Santoso S. Nachweis von thrombozytären Antigenen und Antikörpern. In: Mueller-Eckhardt C, Kiefel V. *Transfusionsmedizin*. 3. Aufl. New York: Springer; 2003b. p. 666-670.

Kiefel V. Differential diagnosis of acute thrombocytopenia. In: Warkentin TE, Greinacher A, editors. *Heparin-induced thrombocytopenia*. New York: Dekker; 2004. p. 25-52.

Knight DM, Wagner C, Jordan R, McAleer MF, DeRita R, Fass DN, Coller BS, Weisman HF, Ghrayeb J. The immunogenicity of the 7E3 murine monoclonal Fab antibody fragment variable region is dramatically reduced in humans by substitution of human for murine constant regions. *Molecular Immunology* 1995; 32:1271-1281.

Krentz H. *Statistische Analysen und Datenverwaltung mit SPSS in der Medizin*. Aachen: Shaker; 2002.

Kroll H, Sun QH, Santoso S. Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1) is a target glycoprotein in drug-induced thrombocytopenia. *Blood* 2000; 96: 1409-1414.

Mascelli MA, Lance ET, Lakshmi D, Wagner CL, Weisman HF, Jordan RE. Pharmakodynamische profile of short-term Abciximab treatment demonstrates prolonged platelet inhibition with gradual recovery from GP IIb/ IIIa receptor blockade. *Circulation* 1998; 97: 1680-1688.

Literaturverzeichnis

Mascelli MA, Nakada TN. Pharmacological properties of Abciximab. Hämostaseologie 1999; 19: 101-107.

Mizon P, Kiefel V, Mannessier L, Mueller-Eckhardt C, Goudeemand J. Thrombocytopenia induced by vancomycin-dependent platelet antibody. Vox Sanguinis 1997; 73: 49-51.

Nurden AT, Poujol C, Durrieu-Jais C, Nurden P. Platelet glycoprotein IIb/IIIa inhibitors: basic and clinical aspects. Areroscler Thromb Vasc Biol 1999a; 19: 2835-2840.

Nurden P, Clofent-Sanchez G, Jais C, Bermejo E, Leroux L, Coste P et al. Delayed immunologic thrombocytopenia induced by abciximab. Thromb Haemost 2004; 92: 820-828.

Peter K, Schwarz M, Ylanne J, Kohler B, Moser M, Nordt, Salbach P et al. Induction of Fibrinogen binding and platelet aggregation as a potential intrinsic property of various glycoprotein IIb/IIIa ($\alpha_{IIb}\beta_3$) inhibitors. Blood 1998; 92: 3240-3249.

Peter K, Straub A, Kohler B, Volkmann M, Schwarz M, Kübler W, Bode C. Platelet activation as a potential mechanism of GP IIb/IIIa inhibitor-induced thrombocytopenia. Am J Cardiol 1999; 84: 519-524.

Rothe G. Differentialdiagnose von Thrombozytenstörungen. Dtsch Med Wochenschrift 2006; 131: 219-222.

Salama A, Mueller-Eckhardt C. The role of metabolite-specific antibodies in nomifense-dependent hemolytic anemia. New England Journal of Medicine 1985; 313: 496-474.

Sane DC, Damaraju LV, Topol EJ, Cabot CF, Mascelli MA, Harrington RA, Simoons ML, Califf RM. Occurrence and clinical significance of pseudothrombocytopenia during abciximab therapy. Journal of the American College of Cardiology 2000; 36:75-83.

Sharma S, Bhambi B, Nyitray W, Sharma G, Shambaugh S, Antonescu A, Shukla P. Delayed profound thrombocytopenia presenting 7 days after use of abciximab (ReoPro). J Cardiovasc Pharmacol Therapeut 2002; 7: 21-24.

Literaturverzeichnis

Shell DA, Ganti AK, Levitt R, Potti A. Thrombocytopenia associated with c7E3 Fab (abciximab).Annals of Hematology 2002; 81: 76-79.

Shulman NR, Reid DM. Platelet Immunology. In: Colman RW, Hirsh J, Marder VJ, Salzman EW, editors. Hemostasis and Thrombosis. Philadelphia: Lippincott Company; 1994. p. 414-468.

Smith ME, Diane M, Jones CE, Jordan JV, Kautz CA, Schulman NR. Binding of Quinine- and Quinidine-dependent drug antibodies to platelets is mediated by the Fab domain of the immunoglobulin G and is not Fc dependent. J Clin Invest 1987; 79: 912-917.

Stiegler H, Fischer Y, Steiner S, Strauer BE, Reinauer H. Sudden onset of EDTA-dependent pseudothrombozytopenia after therapy with the glycoprotein IIb/IIIa antagonist c7E3 Fab. Annals of Hematology 2000; 79: 226.

Stricker RB, Shuman MA. Quinine purpura: evidence that glycoprotein V is the target platelet antigen. Blood 1986; 67: 1377-1381.

Trapolin G, Savonitto S, Merlini PA, Caimi MT, Klugmann S. Delayed profound thrombocytopenia after abciximab administration for coronary stenting in acute coronary syndrome. Case reports and review of the literature. Ital Heart J 2005; 6: 647-651.

Visentin GP, Newman PJ, Aster RH. Characteristics of quinine- and quinidine-induced antibodies specific for platelet glycoproteins IIb and IIIa. Blood 1991; 77: 2668-2678.

Warkentin TE, Greinacher A. Laboratory testing for heparin-induced thrombocytopenia. In: Warkentin TE, Greinacher A, editors. Heparin-induced thrombocytopenia. New York: Dekker; 2004a. p. 271-311.

Warkentin TE. Clinical picture of heparin-induced thrombocytopenia. In: Warkentin TE, Greinacher A, editors. Heparin-induced thrombocytopenia. New York: Dekker; 2004b. p. 53-106.

Anhang

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Die Dissertation ist bisher keiner anderen Fakultät vorgelegt worden.

Ich erkläre, dass ich bisher kein Promotionsverfahren erfolglos beendet habe und dass eine Aberkennung eines bereits erworbenen Doktorgrades nicht vorliegt.

.....

Tina Höltje

Anhang

Thesen:

Abciximab-induzierte Thrombozytopenie

1. Es existieren natürliche, vorbestehende Antikörper gegen Abciximab-beladene Thrombozyten auch im Serum gesunden Individuen, die zuvor kein Abciximab erhielten
2. Freie prä-existierende Antikörper vor Abciximab-Gabe korrelieren nicht mit einer Thrombozytopenie nach Abciximab-Infusion
3. „Echte“ Thrombozytopenie nach Abciximab-Gabe ist seltener als Pseudothrombozytopenie
4. Thrombozytopenie tritt in den meisten Fällen innerhalb 24 Stunden nach Abciximab-Gabe auf. Jedoch ist an späteres Auftreten (bis zu 12 Tagen) zu denken
5. Vermehrtes Auftreten von Plättchenaggregaten im EDTA-Blut nach Abciximab-Gabe
6. Antikörper durch Abciximab, die eine Thrombozytopenie auslösen, erkennen vermutlich den murinen Teil des Abciximab. Im Gegensatz dazu erkennen Antikörper, die keine Thrombozytopenie verursachen, das proteolytische Ende des Abciximab.
7. Nach Abciximab-Gabe steigen plättchenständige Antikörper in 53,8% nach 2-4 Stunden und in 72% nach 24 Stunden stark an. Deshalb sollte bei der Diagnostik auf thrombozytäre Antikörper hingewiesen werden.

Medikamentabhängige Antikörper:

1. Chinin, Chinidin, Carbamazepin, Rifampicin, Cotrimoxazol, Ibuprofen, Carbamazepin, Diclofenac und Vancomycin können nach Einnahme eine Thrombozytopenie auslösen.
2. In Normalspenderseren befinden sich keine vorbestehenden medikamentenabhängigen Antikörper mit den getesteten Substanzen (Chinin, Chinidin, Ibuprofen, Carbamazepin, Rifampicin, Cotrimoxazol und Vancomycin). Daher ist davon auszugehen, dass diese medikamentenabhängigen Antikörper erst bei Kontakt mit der entsprechenden Substanz in Individuen gebildet werden.

Anhang

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Kiefel, der mir die Bearbeitung des Themas überließ und das Entstehen der Arbeit stets hilfreich begleitete. Mit zahlreichen konstruktiven Anmerkungen und anregender Kritik trug er sehr zum Gelingen bei.

Weiterhin danke ich den MTA`s der Transfusionsmedizin. Vor allem Frau Lange und Frau Schönberner-Richter aus dem Thrombozytenlabor die mir mit ihren Erfahrungen jederzeit zur Hilfe standen.

Ebenso möchte ich meinen Mann und meinen Freunden für die motivierenden und hilfreichen Worte während des praktischen sowie theoretischen Teils der Dissertation danken.