

2. Material und Methoden

2.1 Demographie der Patienten

Die vorliegende Studie war Bestandteil einer größeren Untersuchung an mehreren hundert Patienten durch die Klinik für Kardiologie, Charité, Campus Virchow-Klinikum . Eine Genehmigung von der Ethikkommission der Charité, Campus Virchow-Klinikum lag vor. Von allen Patienten lag weiterhin die Einverständniserklärung zum Einschluss in die Studie vor.

Von den Patienten wurden klinische Basisdaten erfasst:

- Alter
- Geschlecht
- Gewicht

Ferner wurde das Intervall vom Beginn der Schmerzsymptomatik bis zur Initialisierung dokumentiert.

Zu drei Zeitpunkten,

- bei Verlassen der Intensivstation
- bei Verlassen des Krankenhauses
- sechs Wochen nach Verlassen des Krankenhauses

wurden Nachfolgeuntersuchungen hinsichtlich Komplikationen und Folgen des akuten Myokardinfarktes durchgeführt.

Dabei wurden folgende klinische Informationen erfasst:

- instabile Angina Pectoris
- Herzrhythmusstörungen (ventrikuläre Tachykardie, Kammerflimmern)

- Dyspnoe
- kardiale Dekompensation
- Hypotonie (RR < 90 systolisch)
- Apoplektischer Insult
- Niereninsuffizienz (Harnstoff >50 mg/dl, Kreatinin >2 mg/dl)
- Reinfarkt
- erneute Therapienotwendigkeit (Lyse, PTCA, Bypass-Operation)
- Todesfall

2.2 Studiendesign

Zeitraum

Im Rahmen der Studie wurden 30 Patienten mit akutem Myokardinfarkt, welche im Zeitraum von März 1994 bis September 1997 in der Charité, Campus Virchow Klinikum behandelt wurden, eingeschlossen.

Patientengruppen

Die Behandlung bestand aus einem von drei verschiedenen Therapieregimen, basierend auf der Entscheidung des zuerst behandelnden Notarztes.

Für jede der drei Behandlungsgruppen (t-PA-Lyse, Streptokinase-Lyse und PTCA) wurden per Los jeweils 10 Patienten aus dem Pool der o. g. größeren Studie ausgewählt, deren Daten und Blutproben für die vorliegende Untersuchung genutzt wurden.

Kontrollen

14 gesunde Spender mit vergleichbaren klinischen Basisdaten (Alter, Geschlecht, Gewicht) fungierten als Kontrollgruppe.

Einschlusskriterien

Eingeschlossen wurden Patienten mit der Diagnose eines akuten Myokardinfarktes. Die Diagnose wurde basierend auf dem GUSTO-I Protokoll (Global Utilization of Streptokinase t-PA for Occluded Coronary Artery study (17)) gestellt. Demnach wurden Patienten eingeschlossen, die innerhalb von 6 Stunden nach Symptombeginn aufgenommen wurden und über Brustschmerzen von mindestens 20 Minuten Dauer klagten. Weiterhin mussten ST-Hebungen von $\geq 0,1$ mV in zwei oder mehr der Extremitätenableitungen oder von $\geq 0,2$ mV in zwei oder mehr der Brustwandableitungen vorhanden sein, um die Diagnose des akuten Myokardinfarktes zu bestätigen. Im folgenden wurde die Diagnose anhand typischer laborchemischer Parameter bestätigt. Das Schmerz-Lyse- oder Schmerz-PTCA-Intervall war bei allen Patienten weniger als 6 Stunden.

Ausschlusskriterien

- immunologische Begleiterkrankungen (um einen Einfluss auf die betroffenen Zytokinkaskaden auszuschliessen)
- der Patient wies Kontraindikationen sowohl gegen eine Lysetherapie als auch gegen die PTCA auf
- der Patient verweigerte den Einschluss in die Studie

Schema der Blutabnahmen

Von jedem Patienten wurde zu sieben Zeitpunkten 10 mls Blut in EDTA-Röhrchen gefüllt abgenommen:

1. Blutabnahme direkt nach Beginn der Lyse bzw. nach Beginn der PTCA
2. Blutabnahme nach 1 Stunde
3. Blutabnahme nach 2 Stunden
4. Blutabnahme nach 4 Stunden
5. Blutabnahme nach 8 Stunden
6. Blutabnahme nach 12 Stunden
7. Blutabnahme nach 24 Stunden

2.3 Die Therapieregime

Parallel zu den untersuchten drei folgenden Therapieregimen bekamen alle Patienten Heparin und Acetylsalicylsäure entsprechend dem GUSTO-Protokoll (17).

Dabei wurden initial 250 – 500 mg Aspirin p.o. sowie 5000 IE Heparin i.v. gegeben. In der Folge wurden täglich 160 - 325 mg Aspirin p.o. verabreicht. Ferner gab man kontinuierlich über einen Perfusor 1000 IE Heparin pro Stunde i.v., mit Dosisanpassung anhand der aPTT (aktivierte partielle Thromboplastinzeit). Der Zielwert lag zwischen 60 und 85 Sekunden.

Lyse mit t-PA (Actilyse®)

Es wurde das Neuhaus-Schema mit einer akzelerierten Dosierung angewendet (66). Primär wird ein Bolus von 15 mg appliziert, darauf folgend werden 0,75 mg/kg über 30 min gegeben, jedoch nicht mehr als 50 mg, anschließend weitere 0,50 mg/kg über noch einmal 60 min, bis höchstens 35 mg.

Lyse mit Streptokinase (Streptase®)

Bei diesem Regime werden 1,5 Mio. IE Streptokinase über 30 min i.v. als Infusion gegeben. Erst nach der Lyse-Therapie wurde bei diesem Regime Heparin verabreicht.

PTCA

Eine PTCA ist ähnlich einer Linksherzkatheteruntersuchung (Koronarangiographie). Nach Punktion normalerweise einer der Femoralarterien wird mittels der Seldinger-Technik ein etwas größerer Herzkatheter (sogenannter Führungskatheter) benutzt, der in das betroffene Koronargefäß vorgeschoben wird und als "Arbeitskanal" dient. Über diesen Führungskatheter wird ein haarfeiner Draht (sogenannter Führungsdraht) in das betroffene Gefäß bis hinter den stenosierten Abschnitt eingeführt. Dieser Draht dient als Schiene für den darüber vorgeschobenen Ballonkatheter. Dieser besteht aus einem sehr feinen Kunststoffschlauch, der in seiner Spitze einen 1-3 cm langen Ballon besitzt. Dieser Ballon ist bei der Röntgendurchleuchtung sichtbar, und kann somit genau in dem stenosierten Gefäßabschnitt platziert werden. Durch Aufblasen des mit einer Kontrastmittel-Kochsalz-Mischung gefüllten Ballons in eine zylindrische Gestalt wird das Gefäß mit der Stenose

aufgeweitet. Während dieses Vorgangs, der meistens 30-90 Sekunden dauert, fließt kein Blut durch das Gefäß, so dass hierbei Angina pectoris auftreten kann. Die Beschwerden lassen nach, sobald der Ballon entleert und zurückgezogen wird.

2.4 Durchführung der Messungen

Aufarbeitung der Proben

Das in EDTA-Röhrchen gefüllte Blut wurde nach der Abnahme bei 4°C und 3000 U/min für 10 min zentrifugiert. Das gewonnene Plasma wurde in Eppendorf-Röhrchen pipettiert, in Portionen à 200 µl aliquotiert und bei -80°C schockgefroren und gelagert. Unmittelbar vor den Messungen wurden die Proben auf Raumtemperatur aufgetaut.

Messungen

Die Bestimmung der Antigen-Konzentrationen wurde mit Hilfe des ELISA-Verfahrens (enzyme-linked immunosorbent-assay) mit kommerziell erhältlichen standardisierten ELISA-Testkits der Firma R&D Systems GmbH (Wiesbaden, Deutschland) im Doppelansatz durchgeführt. Dabei wurden die löslichen Formen der folgenden Adhäsionsmoleküle gemessen:

- sE-Selektin
- sL-Selektin
- sP-Selektin
- sICAM
- sVCAM
- sPECAM

Kontrollen

Um eine direkte Interaktion zwischen t-PA oder Streptokinase mit den ELISA-Testkits zu untersuchen, wurden zusätzliche Messungen durchgeführt. Dabei wurden Kontrollproben mit Streptokinase (250 U/ml) oder t-PA (1 µg/ml) für 30 min *in vitro* in therapeutischen Dosierungen inkubiert (67).

2.5 Prinzip des Sandwich-ELISA

Das ELISA-Verfahren macht sich die gleichzeitige Bindung mehrerer Antikörper zunutze, die an unterschiedliche, nicht überlappende Epitope des zu bestimmenden Zielmoleküls binden.

Der erste monoklonale spezifische Antikörper wird auf einem festen Träger gebunden. Dazu wird nun eine Testlösung mit unbekannter Antigenkonzentration sowie eine Reihe von Standardlösungen mit bekannter Antigenkonzentration pipettiert. Diese Antigene binden sich spezifisch mit dem vorhandenen Antikörper. Ungebundenes Antigen wird gewaschen, anschließend eine zweite Antikörperpopulation hinzugefügt. Dies ist der mit einem Enzym gekoppelte Indikatorantikörper. Er bindet an einem zweiten Epitop an das zu bestimmende Antigen oder die Standardlösungsantigene. Ungebundene Antikörper werden gewaschen, so dass eine direkte Beziehung zwischen Antigenmenge und enzymmarkiertem Antikörper gegeben ist. Je mehr Antigene vorhanden sind, desto mehr enzymmarkierter Antikörper wird gebunden. Die Resultate der Standardlösungen werden verwendet, um eine Bindungskurve für den zweiten Antikörper als Funktion der Antigenkonzentration zu konstruieren, aus der die Menge des Antigens in den Testlösungen ermittelt werden kann.

Nach Zugabe einer Substratlösung kommt es durch das an den zweiten Antikörper gebundene Enzym zu einem Farbumschlag, welcher linear zu der Menge des gebundenen Enzyms und somit auch zur Menge des gesuchten Antigens ist (Diagramm 2).

Die Konzentration wird photometrisch gemessen und anhand der mitgeführten Standard-Verdünnungsreihe quantifiziert.

Die Messungen wurden anhand der den ELISA-Kits beigefügten Protokolle durchgeführt. Dabei wurden dementsprechend unterschiedliche Inkubationszeiten und Substratmengen benutzt, das beschriebene Prinzip war für die verwendeten ELISA-Kits für alle gemessenen Parameter jedoch identisch.

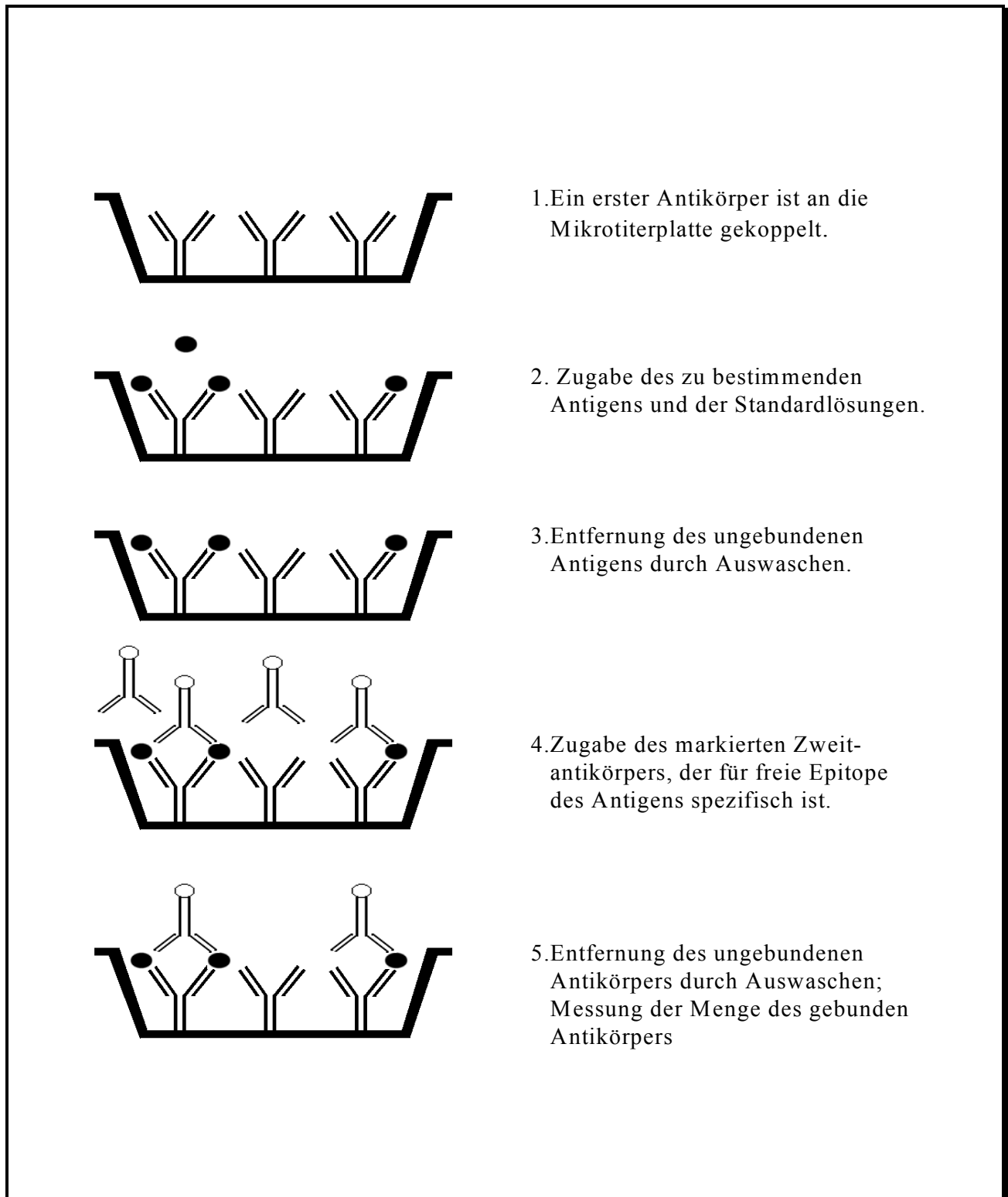


Diagramm 2: Schematische Darstellung des Prinzips des verwendeten Sandwich-ELISA

2.6 Statistische Verfahren

Vergleiche zwischen den drei Behandlungsgruppen wurden mittels des Kruskal-Wallis-Tests vorgenommen. Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen und den Kontrollproben wurden für jeden einzelnen Zeitpunkt mit dem Mann-Whitney U-Test bestimmt. Signifikante intra-individuelle Veränderungen während des Untersuchungszeitraumes wurden mittels des Friedman-Tests untersucht. Unterschiede zwischen Kontrollproben und den mit t-PA oder Streptokinase beladenen Kontrollproben wurden unter Zuhilfenahme des Wilcoxon- Rangsummen Tests bestimmt. Nominelle klinische Daten wurden mit dem Fisher-Test analysiert.

Unterschiede wurden als signifikant betrachtet, wenn ein $p < 0,05$ ermittelt wurde.