

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin
Pädiatrische Hämatologie und Onkologie
- Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Heribert Jürgens -

**Interaktion systemisch wirksamer Antimykotika mit der
Aggregation humaner Thrombozyten in vitro**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae

der medizinischen Fakultät

der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von

Christine Maria Edelbusch

aus Lüdinghausen

2011

Gedruckt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der
Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Wilhelm Schmitz

1. Berichterstatter: Apl. Prof. Dr. med. Andreas Groll

2. Berichterstatter: Apl. Prof. Dr. med. Rolf Mesters

Tag der mündlichen Prüfung: 26.05.2011

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Ich gebe hiermit die Erklärung ab, dass ich die Dissertation mit dem Titel:

Interaktion systemisch wirksamer Antimykotika mit der Aggregation humaner Thrombozyten in vitro

in der Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin, Pädiatrische Hämatologie und Onkologie

unter Anleitung von Herrn Apl. Prof. Dr. med. Andreas Groll

1. selbstständig angefertigt,
2. nur unter Benutzung der im Literaturverzeichnis angegebenen Arbeit angefertigt und sonst kein anderes gedrucktes oder ungedrucktes Material verwendet,
3. keine unerlaubte fremde Hilfe in Anspruch genommen,
4. sie weder in der gegenwärtigen noch in einer anderen Fassung einer in- oder ausländischen Fakultät als Dissertation, Semesterarbeit, Prüfungsarbeit, oder zur Erlangung eines akademischen Grades, vorgelegt habe.

Münster, 01.06.2011

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin
Pädiatrische Hämatologie und Onkologie
- Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Heribert Jürgens -
Referent: Apl. Prof. Dr. med. Andreas Groll
Koreferent: Apl. Prof. Dr. med. Rolf Mesters

ZUSAMMENFASSUNG

Interaktion systemisch wirksamer Antimykotika mit der Aggregation humaner Thrombozyten in vitro

Edelbusch, Christine Maria

Einführung: Patienten mit Krebserkrankungen und invasiven Pilzinfektionen haben ein hohes Risiko für Blutungen sowohl aufgrund verminderter Thrombozytenzahlen als auch der Neigung einiger Pilze zur Gefäßarrosion. Über eine mögliche Interaktion von Antimykotika mit der Thrombozytenaggregation und nachfolgend weiter erhöhtem Blutungsrisiko ist wenig bekannt.

Material und Methoden: Vollblut von zehn medikamentenfreien gesunden Freiwilligen wurde in vitro mit den kommerziell erhältlichen i.v.-Zubereitungen der Antimykotika Amphotericin B Deoxycholat, Amphotericin B Colloidal Dispersion, Amphotericin B Lipid Complex, liposomalem Amphotericin B, liposomalem Nystatin, Fluconazol, Itraconazol, Voriconazol, Flucytosin, Anidulafungin und Caspofungin versetzt und verschiedene Plasmakonzentrationen nach Gabe von Standarddosierungen im steady state simuliert. Die Thrombozytenaggregation wurde mit dem Multiplate®-Impedanzaggregometer (Dynabyte, München) nach Aktivierung der Blutplättchen mit ADP, Kollagen oder TRAP-6 (Thrombin receptor activating protein) untersucht. Blutproben ohne Zugabe von Medikamenten dienten als Kontrolle.

Ergebnisse: Im Vergleich zu der Kontrollgruppe ohne Medikamente reduzierten Amphotericin B Colloidal Dispersion, Amphotericin B Lipid Complex, liposomales Amphotericin B und liposomales Nystatin signifikant und konzentrationsabhängig die Thrombozytenaggregation um 15 bis 20 % bei einer fünffachen der bei therapeutischer Anwendung maximal beobachteten mittleren Plasmakonzentration. Im Gegensatz dazu führten Amphotericin B Deoxycholat und in Dimethylsulfoxid (DMSO) aufgelöstes Amphotericin B-Pulver zu keinem messbaren Effekt. Fluconazol, Itraconazol und Voriconazol zeigten eine konzentrationsunabhängige Inhibition der Thrombozytenaggregation nach Aktivierung der Blutplättchen mit Kollagen (Fluconazol) und ADP (Voriconazol und Itraconazol). Flucytosin, Anidulafungin und Caspofungin hatten keinen Effekt auf die Thrombozytenaggregation.

Tag der mündlichen Prüfung: 26.05.2011

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	4
2. Material und Methoden	5
2.1 Studiendesign	5
2.2 Probanden	5
2.3 Probenentnahme	6
2.4 Medikamente	6
2.5 Untersucher Konzentrationsbereich und Vorbereitung der Proben	8
2.6 Messgerät	10
2.7 Durchführung der Messung	16
2.8 Amphotericin B-Pulver	16
2.9 Datenerfassung von 15 auf Acetylsalicylsäure eingestellten Patienten.....	17
2.10 Validierung der Multiplate®-Methode.....	17
2.11 Statistik	18
3. Ergebnisse.....	20
3.1 Polyen-Antimykotika	20
3.1.1 Amphotericin B Deoxycholat (DAMB)	20
3.1.2 Amphotericin B Lipid Complex (ABLC).....	23
3.1.3 Liposomales Amphotericin B (LAMB).....	26
3.1.4 Amphotericin B Colloidal Dispersion (ABCD)	29
3.1.5 Liposomales Nystatin	32
3.1.6 Amphotericin B-Pulver.....	35
3.2 Triazol-Antimykotika	41
3.2.1 Fluconazol	41
3.2.2 Itraconazol	44
3.2.3 Voriconazol	47
3.3 Flucytosin	50
3.4 Echinocandin-Antimykotika.....	53
3.4.1 Caspofungin.....	53
3.4.2 Anidulafungin.....	56
3.5 Zusammenfassung der Ergebnisse der getesteten Antimykotika	59
3.6 Auf Acetylsalicylsäure eingestellte Patienten	60
3.7 Validierung	62

4. Diskussion	65
4.1 Pilzinfektionen.....	65
4.1.1 <i>Candida</i> spp.....	66
4.1.2 <i>Aspergillus</i> spp.	66
4.1.3 Zygomyceten	67
4.1.4 <i>Cryptococcus neoformans</i>	67
4.2 Antimykotika.....	67
4.2.1 Polyen-Antimykotika.....	67
4.2.2 Azol-Antimykotika.....	74
4.2.3 Allylamine	76
4.2.4 Morpholine	76
4.2.5 Flucytosin	76
4.2.6 Echinocandin-Antimykotika.....	77
4.3 Thrombozyten und deren Funktion	78
4.4 Thrombozytenfunktionsdiagnostik.....	80
4.4.1 Blutungszeit.....	80
4.4.2 In-vitro Blutungszeit.....	81
4.4.3 Thrombozytenaggregometrie.....	81
4.4.4 Durchflusszytometrie.....	82
4.4.5 Thrombelastographie/-metrie	82
4.5 Impedanzaggregometrie mit dem Multiplate®-Instrument.....	83
4.6 Evaluation des Multiplate®-Instrumentes.....	84
4.7 Klinische Anwendung des Multiplate®-Instrumentes	86
4.8 Einordnung der Studie in den wissenschaftlichen Zusammenhang	87
4.9 Wirkung von antibakteriellen Substanzen auf die Thrombozytenaggregation ...	89
4.10 Diskussion der Studienergebnisse	91
4.10.1 Polyen-Antimykotika	91
4.10.2 Triazol-Antimykotika	98
4.10.3 Flucytosin	100
4.10.4 Echinocandin-Antimykotika.....	100
4.11 Grenzen der vorgelegten Arbeit	101
4.12 Relevanz der Studienergebnisse für die Klinik	102
4.13 Zusammenfassung	106
5. Literaturverzeichnis.....	108
6. Abkürzungsverzeichnis	129

7. Lebenslauf 130

1. Einleitung

In den letzten drei Jahrzehnten ist die Häufigkeit invasiver Pilzinfektionen gestiegen (Fridkin and Jarvis 1996, Groll et al. 1996, Koch et al. 2004, Zupanić-Krmek and Nemet 2004), insbesondere bei Patienten mit hämatologischen Neoplasien (Abelson et al. 2005, Anaissie 1992, Bodey 1977, Funai et al. 1995, Pfaffenbach et al. 1994, Rosen et al. 2005, Saral 1991). Gründe für die Häufigkeitszunahme invasiver Pilzinfektionen sind die steigende Anzahl immunsupprimierter Patienten im Rahmen von Hochdosischemotherapien, Transplantationen, Neutropenie, Therapie mit Corticosteroiden, Antibiotikabehandlung, Malnutrition, HIV-Infektion sowie eine gestörte Hautbarriere bei Verbrennungen oder zentralen Venenkathetern (Bodey 1977, Chamilos et al. 2006, Fridkin and Jarvis 1996, López et al. 1998, Nucci and Colombo 2002, Zupanić-Krmek and Nemet 2004, Zupanić-Krmek et al. 2004). Als wichtigster Risikofaktor für eine systemische Pilzinfektion wird die Neutropenie angesehen (Nucci and Colombo 2002, O'Donnell et al. 1994, Pagano et al. 2001, Rosen et al. 2005, Samonis and Bafaloukos 1992, Zupanić-Krmek and Nemet 2004). Besonders Patienten mit hämatologischen Systemerkrankungen haben ein hohes Risiko für eine Neutropenie sowohl aufgrund der Verdrängung der normalen Hämatopoese als auch aufgrund intensiver Chemotherapien einschließlich der Knochenmark- oder Blutstammzelltransplantation. Weitere Folge dieser Erkrankungen bzw. ihrer Behandlung auf die Hämatopoese sind neben der Anämie die Thrombozytopenie, die in einer erhöhten Blutungsgefahr resultiert. In der Tat stellen hämatologisch-onkologische Patienten die zahlenmäßig größte Gruppe von Patienten, die Thrombozytentransfusionen benötigen.

Abgesehen von der durch die maligne Grunderkrankung hervorgerufenen Blutungsneigung gehen auch invasive Pilzinfektionen selbst häufig mit einem erhöhten Blutungsrisiko einher: Schimmelpilze der Gattung *Aspergillus* wie auch die Zygomyceten wachsen bevorzugt in Blutgefäße ein mit dem Resultat thrombotisch bedingter hämorrhagischer Infarkte bzw. Gefäßarrosion und Blutung (Böcker 2004). So stellen für Patienten mit invasiver pulmonaler Aspergillose massive pulmonale Hämorrhagien eine häufige Todesursache dar (Albelda et al. 1985, Caillot et al. 1995, Caillot et al. 1997, Gorelik et al. 2000, Horger et al. 2005, Pagano et al. 1995).

Ob therapeutisch oder prophylaktisch eingesetzte Antimykotika über eine Beeinflussung der Thrombozytenaggregation einen zusätzlichen Effekt auf die Gefahr potentiell lebensbedrohlicher Blutungen bei hämatologisch-onkologischen Patienten haben können, ist

bislang nur in Ansätzen für die Gruppe der antimykotischen Azole untersucht (Ishikawa et al. 1986, Steinhilber et al. 1990). Ziel der vorliegenden Arbeit war daher die Untersuchung der Frage, ob systemisch wirksame Antimykotika mit der Aggregation humaner Thrombozyten interagieren und ob Unterschiede zwischen den verschiedenen Substanzklassen bestehen.

2. Material und Methoden

2.1 Studiendesign

In dem Zeitraum von September 2007 bis September 2009 wurden Blutproben von gesunden Probanden entnommen. Es standen insgesamt 26 gesunde Freiwillige zwischen 22 und 56 Jahren zur Verfügung. Je nach Verfügbarkeit der Probanden am Tag der vorgesehenen Experimente wurde pro getestetem Medikament bei jeweils zehn dieser 26 Probanden Blut abgenommen.

Das entnommene Blut wurde *in vitro* mit steigenden Konzentrationen von elf verschiedenen systemischen Antimykotika versetzt. Die Konzentrationen wurden so gewählt, dass sie die Konzentrationsbereiche nach Standarddosierungen bis zum fünffachen der mittleren Spitzendosis der jeweiligen Substanz umfassten. Es wurden die kommerziell erhältlichen i.v.-Zubereitungen der Antimykotika Amphotericin B Deoxycholat (DAMB), Amphotericin B Lipid Complex (ABLC), liposomales Amphotericin B (LAMB), Amphotericin B Colloidal Dispersion (ABCD), liposomales Nystatin, Fluconazol, Itraconazol, Voriconazol, Flucytosin, Caspofungin und Anidulafungin verwendet. Blutproben ohne Zugabe von Medikamenten dienten als Kontrolle.

Anschließend wurden das mit den Antimykotika versetzte Blut und die Kontrollproben mithilfe des Multiplate®-Instruments (Dynabyte, München) untersucht. Dieses Gerät misst mit der Methode der Impedanzaggregometrie die Thrombozytenfunktion im Vollblut. Das Multiplate®-Instrument stellt die Messergebnisse grafisch in Form von Aggregationskurven dar. Als Parameter für die Thrombozytenaggregation wurde die *Area under the aggregation curve* (AUAC) verwendet und mit Hilfe gepaarter, nicht-parametrischer statistischer Tests analysiert.

Als Validierung des Multiplate®-Assays wurden Mehrfachmessungen an einem Tag und im Verlauf mehrerer Tage durchgeführt. Die Multiplate®-Testergebnisse von 15 mit Acetylsalicylsäure behandelten Patienten wurden als Positivkontrolle der Hemmung der Thrombozytenaggregation gewählt.

2.2 Probanden

Es standen insgesamt 26 gesunde Probanden zwischen 22 und 56 Jahren zur Verfügung (Mittelwert 35,5 Jahre). Unter ihnen waren 13 Frauen und 13 Männer.

Von diesen 26 Freiwilligen wurde je nach Verfügbarkeit bei zehn Probanden pro getestetem Medikament Blut abgenommen. So wurde bei einigen Probanden nur ein Mal, bei anderen Probanden bis zu 6 Mal Blut abgenommen, sodass mit den Blutproben eines Spenders bis zu 12 Medikamente getestet wurden.

Voraussetzungen zur Teilnahme an der Studie waren ein Alter über 18 Jahren und das Fehlen einer Medikamenteneinnahme (einschließlich Kontrazeptiva) für mindestens 14 Tage vor der Blutentnahme. Die Blutentnahmen fanden mit Einverständnis der Probanden nach vollständiger Information über Hintergrund und Ziele der Untersuchung statt.

2.3 Probenentnahme

Die Blutproben wurden durch standardisierte periphervenöse Punktion gewonnen und in 4,5 ml TI-Röhrchen (Sarstedt®) asserviert. Die Röhrchen enthalten einen Thrombininhibitor, welcher auf das freie Kalzium in der Probe keinen Einfluss hat und somit die Plättchenfunktion nicht stört. Nach Punktion der Vene wurde der Stauschlauch entfernt, um die Thrombozyten nicht vor Beginn der Messung zu aktivieren. Aus dem gleichen Grund wurden die Röhrchen nach der Abnahme nur leicht geschwenkt, keinen Erschütterungen ausgesetzt und vor Beginn der Messung 30 Minuten lang nicht bewegt.

2.4 Medikamente

Die Auswahl der Antimykotika wurde bestimmt durch die Verfügbarkeit von Zubereitungen zur intravenösen Anwendung zum Zeitpunkt der Durchführung der Experimente. Es wurden die kommerziell erhältlichen i.v.-Lösungen der Antimykotika Amphotericin B Deoxycholat (DAMB), Amphotericin B Lipid Complex (ABLC), liposomales Amphotericin B (LAMB), Amphotericin B Colloidal Dispersion (ABCD), liposomales Nystatin, Fluconazol, Itraconazol, Voriconazol, Flucytosin, Caspofungin und Anidulafungin verwendet.

Zur Herstellung der Lösung von Amphotericin B Deoxycholat (DAMB) wurde kommerziell erhältliches Fungizone® (Bristol-Myers Squibb, Princeton, New Jersey) verwendet; das lyophilisierte Pulver wurde in destilliertem Wasser aufgelöst und dann mit 5%iger Glucose entsprechend der Empfehlung des Herstellers zu einer Endkonzentration von 0,005 mg/ml verdünnt.

Amphotericin B Lipid Complex (ABLC) (Abelcet®; Zeneus Pharma Limited, Oxford, United Kingdom) ist als 100 mg Ampulle mit 5 mg/ml Lösung erhältlich. Diese Lösung wurde vor Gebrauch mit 5%iger Glucose zu einer Konzentration von 0,05 mg/ml verdünnt.

Liposomales Amphotericin B (LAMB) (AmBisome®; Gilead Sciences GmbH, Foster

City, Californien) liegt als lyophilisiertes Pulver vor. Das Pulver wurde mit 12 ml destilliertem Wasser aufgelöst und dann mit 5%iger Glucose zu einer Endkonzentration von 0,4 mg/ml weiter verdünnt.

Amphotericin B Colloidal Dispersion (ABCD) (Amphotec®; Sequus Pharmaceuticals Inc, Menlo Park, Californien) ist als lyophilisiertes Pulver erhältlich. Es wurde mit 10 ml destilliertem Wasser aufgelöst und dann mit 5%iger Glucose zu einer Konzentration von 0,05 mg/ml weiter verdünnt.

Für eine gesonderte Versuchsreihe haben wir 10 mg Amphotericin B-Pulver (Amphotericin B, BioChemica, AppliChem GmbH) mithilfe eines Ultraschallbades in 100 µl Dimethylsulfoxid (DMSO) und 900 µl 5%iger Glucose aufgelöst. Diese Lösung wurde mit 5%iger Glucose bis zu einer Konzentration von 0,01 mg/ml verdünnt.

Zur Herstellung einer Lösung von liposomalem Nystatin wurde die Prüfsubstanz Nyotran® (Aronex Pharmaceuticals, The Woodlands, Texas) verwendet; das Pulver wurde mit 0,9%igem Natriumchlorid aufgelöst und dann mit 5%iger Glucose bis zu einer Konzentration von 0,01 mg/ml verdünnt.

Fluconazol (Diflucan®; Pfizer Pharma GmbH, Berlin, Deutschland) ist als 100 mg Ampulle in einer 2 mg/ml Lösung erhältlich. Diese Lösung wurde mit 0,9%igem Natriumchlorid zu einer Konzentration von 0,2 mg/ml verdünnt.

Itraconazol (Sempera®; Ortho Biotech, Biopharmaceutical Division of Janssen-Cilag GmbH, Beerse, Belgien) wurde zunächst mit dem vom Hersteller mitgelieferten Lösungsmittel zu einer Konzentration von 10 mg/ml verdünnt und anschließend mit 0,9%igem Natriumchlorid zu einer Endkonzentration von 0,033 mg/ml weiter verdünnt.

Voriconazol (Vfend®, Pfizer Pharma GmbH, Berlin, Deutschland) liegt als lyophilisiertes Pulver vor. Das Pulver wurde in 19 ml destilliertem Wasser aufgelöst und dann mit 0,9%igem Natriumchlorid bis zu einer Konzentration von 0,1 µg/ml verdünnt.

Flucytosin (Ancotil®, Valeant Pharmaceuticals Germany GmbH, Eschborn, Deutschland) ist in 2500 mg Ampullen mit einer Konzentration von 10 mg/ml erhältlich. Diese Lösung wurde mit 0,9%igem Natriumchlorid zu einer Konzentration von 1 mg/ml weiter verdünnt.

Caspofungin (Candidas®, MSD Sharp & Dohme GmbH, Haar, Deutschland) ist als lyophilisiertes Pulver in 50 mg Ampullen erhältlich. Das Pulver wurde mit 10,5 ml destilliertem Wasser aufgelöst und dann mit 0,9%igem Natriumchlorid zu einer Endkonzentration von 0,05 mg/ml weiter verdünnt.

Zur Herstellung einer Lösung von Anidulafungin wurde Ecalta® (Pfizer Pharma GmbH, Berlin, Deutschland) verwendet. Das lyophilisierte Pulver wurde in dem mitgelieferten Lösungsmittel aufgelöst und mit 0,9%igem Natriumchlorid zu einer Konzentration von 0,033

mg/ml verdünnt.

2.5 Untersucher Konzentrationsbereich und Vorbereitung der Proben

Es wurde sowohl Vollblut ohne Medikament als auch Vollblut mit vier verschiedenen Konzentrationen der oben genannten Antimykotika untersucht.

Die minimalen und maximalen Medikamentenspiegel im Plasma im steady state nach Gabe von Standard-Dosierungen wurden publizierten Pharmakokinetik-Studien entnommen (Adedoyin et al. 2000, Amantea et al. 1999, Bekersky et al. 2002, Boogaerts et al. 2001, Cossum et al. 1996, Dowell et al. 2005, Kami et al. 2001, Purkins et al. 2002, Stone et al. 2002, Vermes et al. 2000, Walsh et al. 1998); unter der Annahme eines Hämatokrits von 50 % wurden die minimale und die maximale Blutkonzentration berechnet. Die Normalwerte des Hämatokrits betragen bei Männern 38-52 % und bei Frauen 36-46 % (Harrison 2005). Zur Vereinfachung der Berechnung der Blutkonzentration wurde für alle Berechnungen ein Hämatokrit von 50 % angenommen (s. Tabelle 1).

Zur Vorbereitung der Proben wurden die Infusionslösungen der Antimykotika nach Angaben der Hersteller mit 0,9%igem Natriumchlorid bzw. 5%iger Glucose bzw. destilliertem Wasser seriell verdünnt (siehe Abschnitt 2.4). Um einen Effekt durch die Verdünnung bzw. des Lösungsmittels so weit wie möglich auszuschließen, wurde als obere Grenze für die Menge der Antimykotikum-Lösung im Ansatz 50 µl Lösung zu 950 µl Vollblut festgelegt. Kontrollproben ohne Medikament wurden mit 50 µl Lösungsmittel (0,9%iges Natriumchlorid, 5%ige Glucose, destilliertes Wasser) zu 950 µl Vollblut versetzt.

In vier separaten Reagenzgläsern wurden für jede Blutprobe jedes Probanden die minimale, die maximale, die Doppelte der maximalen und die Fünffache der maximalen Konzentration jedes Antimykotikums eingestellt. 300 µl dieser mit Antimykotikum versetzten Blutproben und eine Probe ohne Medikament wurden zusammen mit jeweils 300 µl 0,9%igem Natriumchlorid und jeweils mit 20 µl Adenosindiphosphat (ADP), 20 µl Kollagen bzw. 20 µl Thrombin receptor activating peptide (TRAP-6) zur Messung der Thrombozytenaggregation gemischt.

Die Werte der Pharmakokinetik-Studien und die daraus berechneten Blutkonzentrationen wurden zur Vereinfachung des Pipettierens gerundet. So wurden Werte von unter einem µg/ml auf ein Zehntel µg/ml gerundet, Werte zwischen ein und fünf µg/ml wurden auf einen halben µg/ml gerundet und Werte größer als fünf µg/ml wurden auf ein µg/ml gerundet.

<u>Medikament</u>	<u>Referenzstudie</u>	<u>Dosierung des Antimykotikums in der Referenzstudie</u>	<u>Konzentration [µg/ml]</u>					
			<u>Cmin im Plasma</u>	<u>Cmax im Plasma</u>	<u>Cmin im Vollblut</u>	<u>Cmax im Vollblut</u>	<u>x2 Cmax im Vollblut</u>	<u>x5 Cmax im Vollblut</u>
<u>DAMB</u>	Bekersky et al. 2002	0,6 mg/kg IV	0,3	1,5	0,2	0,8	1,6	4
<u>ABLC</u>	Adedoyin et al. 2000	5 mg/kg IV			0,8	2,5	5	12,5
<u>LAMB</u>	Walsh et al. 1998	5 mg/kg/Tag IV	9	91	4,5	46	92	230
<u>ABCD</u>	Amantea et al. 1999	4 mg/kg IV	1	3	0,5	1,5	3	7,5
<u>Lip. Nvystatin</u>	Cossum et al. 1996	4 mg/kg/Tag			0,2	24	48	120
<u>Fluconazol</u>	Kami et al. 2001	400 mg pro Tag IV	10	16	5	8	16	40
<u>Vori-conazol</u>	Purkins et al. 2002	8 mg/kg/Tag IV in 2 Einzeldosen	2	5	1	2,5	5	12,5
<u>Itraconazol</u>	Boogaerts et al. 2001	200 mg/Tag IV	0,5	2,5	0,3	1,5	3	7,5
<u>Flucytosin</u>	Vermes et al. 2000		Zielwert ≥ 25	Zielwert ≤ 100	13	50	100	250
<u>Caspo-fungin</u>	Stone et al. 2002	50 mg/Tag	1,5	9	0,8	5	10	25
<u>Anidula-fungin</u>	Dowell et al. 2005	Loading dose von 200 mg und Erhaltungsdosis von 100 mg/Tag IV	3	8	1,5	4	8	20

Tabelle 1: Plasma- und Blutkonzentrationen der elf Antimykotika

Dargestellt sind die mittleren minimalen und maximalen Plasmakonzentrationen der elf Antimykotika entsprechend den Daten der angegebenen Pharmakokinetik-Studien. Aus diesen Plasmakonzentrationen wurde unter Annahme eines Hämatokrit von 50% die minimale und maximale Vollblutkonzentration berechnet und die zweifache und fünffache der maximalen Vollblutkonzentration bestimmt.

DAMB (Amphotericin B Deoxycholat), ABLC (Amphotericin B Lipid Complex), LAMB (liposomales Amphotericin B), ABCD (Amphotericin B Colloidal Dispersion), Cmin (minimale Konzentration), Cmax (maximale Konzentration), x2 Cmax (doppelte maximale Konzentration), x5 Cmax (fünffache maximale Konzentration)

2.6 Messgerät

Alle Messungen wurden mit dem Multiplate[®]-Instrument durchgeführt. Das Multiplate[®]-Instrument ist ein Messsystem für die Thrombozytenfunktion im Vollblut. Das Multiplate[®]-System beruht auf der Methode der Impedanzaggregometrie. Zwei Elektroden werden in eine zirkulierende Blut- oder Plasmaprobe eingetaucht. Sobald Thrombozyten aggregieren, akkumulieren sie an den Elektroden und ändern den elektrischen Widerstand (die Impedanz) zwischen den Elektroden. Die Widerstandsänderungen werden fortlaufend aufgezeichnet (<http://www.multiplate.net>).

Der Begriff Multiplate[®] ist von dem Ausdruck "multiple platelet function analyzer" abgeleitet. "Multiple" steht hier für die multiplen Elektroden der Multiplate[®]-Messzelle, die multiplen Kanäle des Instrumentes sowie für die multiplen Tests, die am Multiplate[®]-Instrument für die Thrombozytendiagnostik zur Verfügung stehen. Das Multiplate[®]-Instrument besitzt fünf Messkanäle für parallele Tests. Die Auswertung und Dokumentation ist in dem auf Windows XP basierenden Messsystem integriert.

Es werden Einwegmesszellen verwendet, die vor jeder Messung in die fünf Messpositionen des Multiplate[®]-Instrumentes gesteckt werden. Die Einwegmesszellen enthalten einen mit Polytetrafluorethylen (PTFE) beschichteten Rührstab und zwei Sensoreinheiten, um eine Doppelmessung bei jeder Analyse zu ermöglichen. Durch diese Multiple Electrode Aggregometry (MEA) ist eine Qualitätskontrolle der Analyse möglich (<http://www.multiplate.net>) (Abbildung 1).

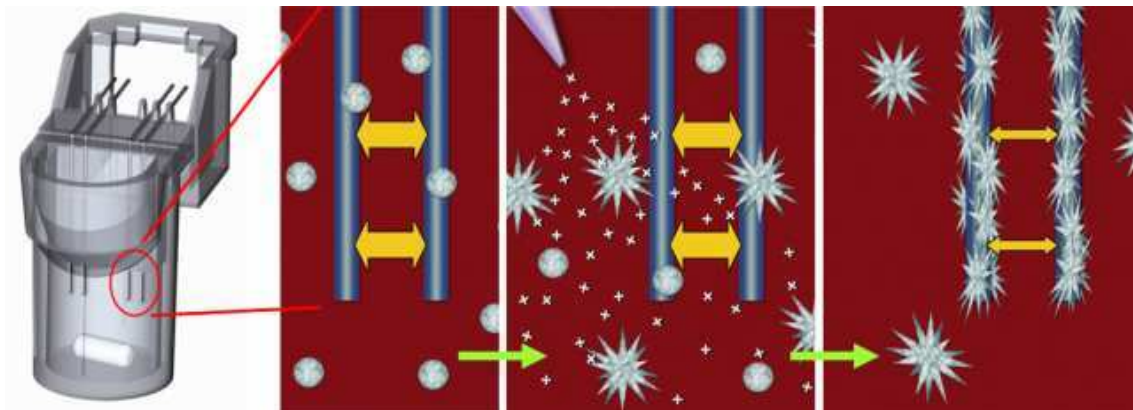


Abbildung 1: Prinzip der Multiplate[®]-Analyse (<http://www.multiplate.net/>)

Schematische Darstellung einer Einwegmesszelle mit zwei Sensoreinheiten, die wiederum aus jeweils zwei Elektroden bestehen. Im rechten Teil der Abbildung sieht man schematisch, wie die Thrombozyten nach Zugabe eines Aktivators an die Elektroden adhären und an der Oberfläche der Sensordrähte aggregieren, was eine Widerstandsänderung zwischen den beiden Elektroden bewirkt.

Untersuchte Parameter

Das Multiplate®-Instrument stellt die Messergebnisse grafisch in Form von zwei Aggregationskurven der Doppelmessung und als gemittelte Füllkurve dar. Es werden drei Aggregationsparameter numerisch als Mittelwert der Doppelbestimmung angezeigt: Die *Aggregation*, die dem Anstieg der Impedanz im Verlauf der Analyse entspricht, die *Velocity*, die die maximale Steigung der Aggregationskurve angibt und die *Area under the aggregation curve (AUAC)*, die der Fläche unter der Aggregationskurve entspricht. Der Impedanzanstieg wird in frei gewählte "aggregation units" (AU) umgerechnet und gegen die Zeit aufgetragen. Die AUAC wird in AU*min angegeben (s. Abbildung 2). Als Endpunkt der Messung in der vorgelegten Untersuchung wurde die AUAC ausgewählt, da sie im Gegensatz zu den Parametern Aggregation und Velocity die gesamte Kinetik des Messsignals erfasst.

Die Doppelmessungen werden elektronisch auf Präzision und Korrelation kontrolliert. Als Kriterien für die Kontrolle dienen die Korrelation der beiden Einzelmessungen sowie die Abweichung beider Einzelmessungen vom Mittelwert. Der definierte Grenzwert für den minimalen Korrelationskoeffizienten beträgt 0,98, für die maximal zulässige Abweichung vom Mittelwert 20% (<http://www.multiplate.net>).

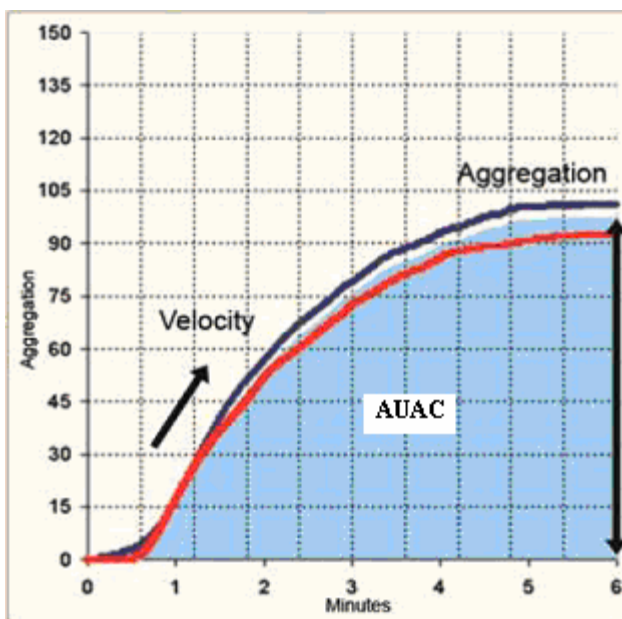


Abbildung 2: Grafische Darstellung der Messparameter (<http://www.multiplate.net/>)

Zu Beginn jeder Messung (0 Minuten) wird entweder Adenosindiphosphat, Kollagen oder Thrombin receptor activating peptide (TRAP-6) als Aktivator der Thrombozytenaggregation in die Messzellen gegeben. Daraufhin aggregieren die Thrombozyten, messbar als Zunahme der Impedanz zwischen den Elektroden. In dieser Abbildung ist die Zunahme der Thrombozytenaggregation gegen die Zeit aufgetragen. Dargestellt sind die maximale *Aggregation*, die *Velocity*, die die maximale Steigung der Aggregationskurve angibt und die *Area under the aggregation curve (AUAC)*, die der Fläche unter der Aggregationskurve entspricht (hier dargestellt als gemittelte Füllkurve (blau)).

Testreagenzien

Für die differenzierte Thrombozytendiagnostik am Multiplate®-Instrument sind mehrere Testreagenzien verfügbar. Dies erlaubt, einzelne Aktivierungswege differenziert zu erfassen und somit Defekte und Medikamenteneffekte differenziert zu charakterisieren (s. Abbildung 3).

In dieser Studie wurden die Aktivatoren Adenosindiphosphat, Kollagen und Thrombin receptor activating peptide 6 (TRAP-6) verwendet.

- **Adenosindiphosphat** stimuliert die Thrombozytenaktivierung über verschiedene ADP-Rezeptoren, die der P2-Purinrezeptorenfamilie angehören. Die wichtigsten Vertreter dieser Gruppe sind der P2Y1- und der P2Y12-Rezeptor. ADP verursacht durch Bindung an seine Rezeptoren die Bildung von Thromboxan A₂, Proteinphosphorylierungen, eine Erhöhung der zytoplasmatischen Kalziumionenkonzentration sowie eine Expression des Fibrinogenrezeptors (Harbrecht 1998). Der membranständige Fibrinogen-Rezeptor Integrin α IIb β 3 erfährt eine Konformationsänderung, sodass er Fibrinogen statt mit geringer nun mit hoher Affinität bindet. Die anschließend starke Bindung an Fibrinogen ist die Basis für eine starke Quervernetzung mit anderen Thrombozyten und führt außerdem zu einer erneuten Aktivierungsverstärkung ins Zellinnere. Es kommt zu einer Änderung der Plasmamembran-Orientierung („Flip“), wodurch nun negativ geladene Phospholipide nach außen freigelegt werden. Durch Umlagerungen des Zytoskeletts und Ausstülpung von Pseudopodien vergrößern die Thrombozyten ihre Oberfläche um ein Mehrfaches. Gerinnungsfaktoren lagern sich an dieser Oberfläche an und katalysieren durch Umwandlung von Prothrombin (F II) eine lokale, massive Generation von Thrombin (F IIa). Der P2Y12-Rezeptor für ADP wird durch Clopidogrel, Prasugrel und Tiklopidin gehemmt.
- **Kollagen** bewirkt eine von-Willebrand-Faktor(vWF)-abhängige Adhäsion von Thrombozyten und aktiviert auf der Thrombozytenoberfläche die Kollagenrezeptoren Glykoprotein (GP) Ia-IIa und GP VI. Dies führt zur Freisetzung endogener Arachidonsäure, dem Substrat des thrombozytären Enzyms Cyclooxygenase (COX). Diese wandelt die Arachidonsäure zu Thromboxan A₂, einem potenten Plättchenaktivator um. Außerdem führt die Aktivierung der Kollagenrezeptoren zu Phosphoinositidhydrolyse, Proteinphosphorylierungen, einer Erhöhung des zytoplasmatischen Kalziums sowie einem „shape change“ der Thrombozyten durch Kontraktion der Aktin-Myosinkomponenten des thrombozytären Zytoskeletts. Die stimulierten Thrombozyten runden sich ab und bilden Pseudopodien (Echinosphärozyten), die es den Thrombozyten ermöglichen, in einen verzahnten

Kontakt zu treten (Harbrecht 1998, Morgenstern 1998). Die Aktivierung der Thrombozyten führt zudem zur Expression des Rezeptorkomplexes GP IIb/IIIa auf der Thrombozytenmembran, an den Plasmafibrinogen und aus den aktivierten Blutplättchen freigesetztes Fibrinogen und Thrombospondin binden. Dadurch kommt es zur Bildung eines Thrombozytenaggregats. Da die Cyclooxygenase eine zentrale Rolle in diesem Aktivierungsweg spielt, können die Thrombozyten bei Einnahme bzw. Zugabe von Acetylsalicylsäure, welche zu einer irreversiblen Hemmung der Cyclooxygenase führt, kaum mit Kollagen aktiviert werden.

- **Thrombin receptor activating peptide 6 (TRAP-6)** stimuliert den Thrombin-Rezeptor an der Thrombozytenoberfläche. Dies bewirkt die Phosphoinositidhydrolyse, die Bildung von Thromboxan A₂, Proteinphosphorylierungen, einen zytoplasmatischen Kalziumionenanstieg, einen „shape change“ der Thrombozyten, die Sekretion granulärer Inhaltsstoffe sowie die Exposition des Fibrinogenrezeptors (Harbrecht 1998). Die weiteren Schritte zur Thrombozytenaggregation entsprechen denen nach Aktivierung durch Adenosindiphosphat und Kollagen. TRAP-6 ist ein sehr starker Aktivator der Thrombozytenaggregation. Seine Wirkung wird durch Acetylsalicylsäure oder Clopidogrel nicht blockiert. Die Medikamentengruppe der GP IIb/IIIa-Rezeptorantagonisten (z.B. Abciximab, Tirofiban, Eptifibatid) verhindert die Bindung von Fibrinogen, von Willebrand-Faktor und anderen Adhäsionsliganden und führt somit zu einer Hemmung der Thrombozytenaggregation, gleichgültig ob die Thrombozyten mit ADP, Kollagen oder TRAP aktiviert werden. Somit ermöglicht der Test mit TRAP-6 die Erfassung der Wirkung von GPIIb/IIIa-Antagonisten auch in Proben von Patienten, die mit Acetylsalicylsäure oder Clopidogrel therapiert sind.

Für spezielle hämostaseologische Fragestellungen sind zusätzlich folgende Tests möglich:

- **ASPI:** Aktivierung mittels Arachidonsäure, dem Substrat der Cyclooxygenase (COX).
- **ADP HS:** Die Zugabe des endogenen Inhibitors Prostaglandin E₁ (PGE₁) erhöht die Sensitivität von ADP HS (high sensitive) gegenüber den Effekten von Clopidogrel und verwandten Medikamenten im Vergleich zum ADP.
- **RISTO:** Ristocetin ist ein Peptidantibiotikum der Vancomycin-Gruppe. Als Cofaktor des von-Willebrand-Faktors induziert es die Aggregation von Thrombozyten über den GPIb-Rezeptor der Thrombozytenmembran. Ein negativer Ristocetin-Test liegt bei einem Mangel bzw. Fehlen des von-Willebrand-Faktors (von-Willebrand-Jürgens-Syndrom) oder pathologischem Defekt von GPIb (Bernard-Soulier-Syndrom) vor.

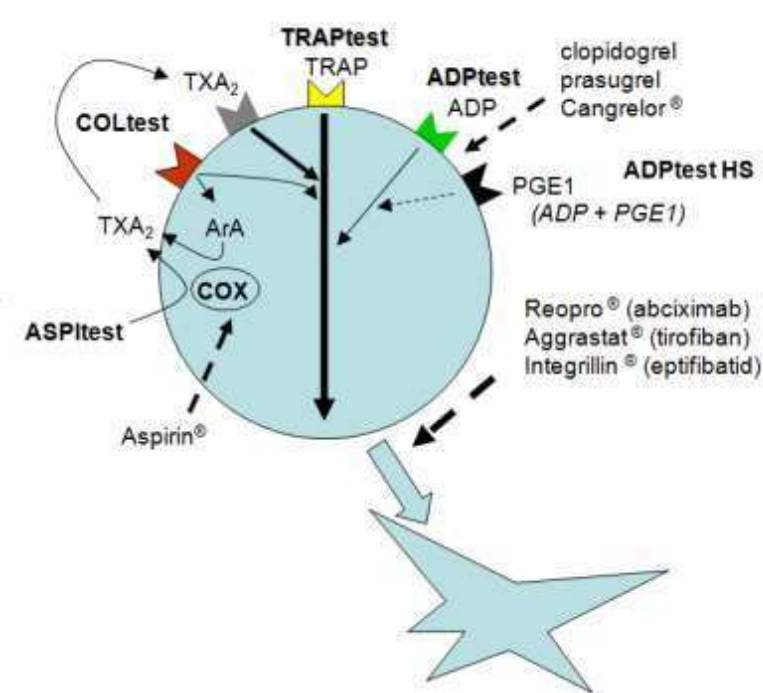


Abbildung 3: Funktionsweise der verschiedenen Testreagenzien (<http://www.multiplate.net/>)

Die Abbildung 3 zeigt schematisch die unterschiedlichen Rezeptoren auf der Oberfläche eines Thrombozyten und die Aktivierungswege der Blutplättchen durch die verschiedenen Testreagenzien. Zusätzlich sind die häufigsten in der Klinik eingesetzten Thrombozytenaggregationshemmer und deren Interaktion mit den jeweiligen Aktivierungswegen dargestellt.

Abciximab, Tirofiban und Eptifibatid sind GPIIb/IIIa-Antagonisten. ASPItest (Zugabe von Arachidonsäure), COLtest (Zugabe von Kollagen), TRAPtest (Zugabe von Thrombin receptor activating peptide 6), ADPtest (Zugabe von Adenosindiphosphat), TXA₂ (Thromboxan A₂), PGE1 (Prostaglandin 1)

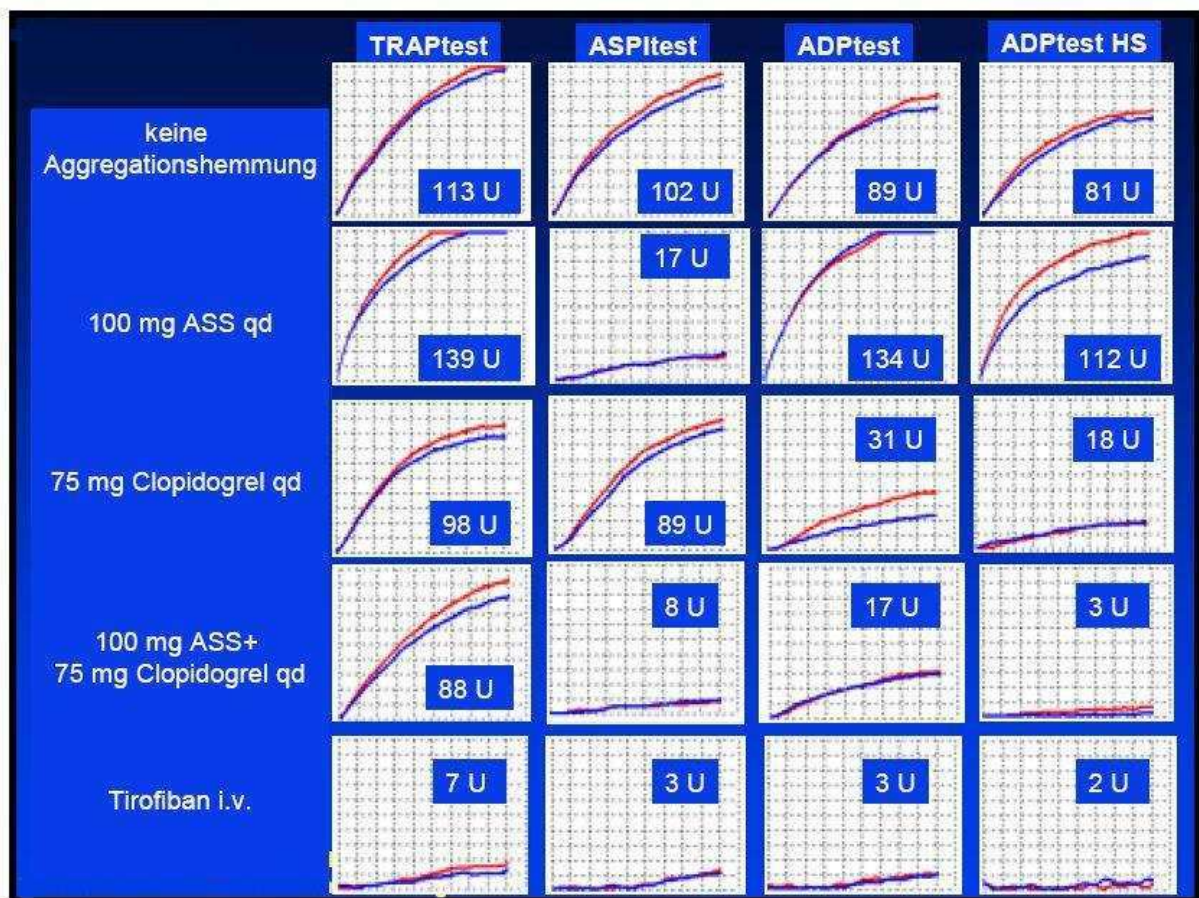


Abbildung 4: Auswirkung von Thrombozytenaggregationshemmern auf die Ergebnisse der verschiedenen Tests des Multiplate®-Instruments (<http://www.multiplate.net/>)

Abbildung 4 zeigt die Ergebnisse der verschiedenen Tests des Multiplate®-Instruments bei Einnahme von verschiedenen Thrombozytenaggregationshemmern. Nach Einnahme von Acetylsalicylsäure (ASS) kann die Thrombozytenaggregation nicht mit Arachidonsäure (ASPItest) und auch nicht mit Kollagen (nicht dargestellt) aktiviert werden. Clopidogrel führt zu einer Inhibition des Aktivierungsweges mit Adenosindiphosphat (ADPtest). Nach Einnahme von Acetylsalicylsäure und Clopidogrel sind entsprechend beide Aktivierungswege gehemmt. Tirofiban führt als GPIIb/IIIa-Antagonist zu einer Hemmung der Thrombozytenaggregation nach Aktivierung mit Thrombin receptor activating peptide (TRAP), Arachidonsäure (ASPItest), Adenosindiphosphat (ADP) und Kollagen (<http://www.transfusionsmedizin.uk-erlangen.de>)

Referenzwerte für die Multiplate®-Methode

Der Hersteller des Multiplate®-Instruments in Deutschland hat Validierungsstudien an Normalprobanden durchgeführt und so Referenzbereiche für die Multiplate®-Analyse erstellt. Nach der aktuellsten Analyse vom Juli 2006 wurden folgende Werte für die Analyse im Thrombininhibitor-Blut angegeben:

Parameter/Einheit	ADP	Kollagen	TRAP
Volumen des Aktivators [μ l]	20	20	20
Endkonzentration	6,4 μ M	3,2 μ g/ml	32 μ M
Probanden [N]	206	74	74
5 % Percentile der AUAC	534	459	941
95 % Percentile der AUAC	1220	1166	1563
Referenzbereich der AUAC	534 - 1220	459 – 1166	941 – 1563

Tabelle 2: Referenzbereiche der AUAC (*Area under the aggregation curve*) (in AU*min) für die Multiplate®-Analyse im Thrombininhibitor-Blut vom Juli 2006 für die drei Aktivatoren ADP, Kollagen und TRAP

AUAC (area under the aggregation curve), ADP (Adenosindiphosphat), TRAP (Thrombin receptor activating peptide)

2.7 Durchführung der Messung

Nach Einsetzen der Einwegmesszellen in die fünf Messkanäle und Anschließen der Sensorkabel wurden jeweils 300 μ l auf 37°C vorgewärmtes NaCl 0,9 % in die Messzellen pipettiert. Hinzu wurden 300 μ l Vollblut gegeben, welches vorher mit einer bestimmten Konzentration eines Antimykotikums gemischt wurde. Daraufhin wurde eine drei-minütige Inkubationszeit abgewartet. Anschließend wurden die Messungen durch Zufügen von jeweils 20 μ l eines Aktivators der Thrombozytenaggregation gestartet. Nach Ablauf der 6-minütigen Messung wurde das Ergebnis ausgedruckt, die Messzellen wurden entfernt und die Kanäle für eine neue Messung freigegeben.

Für jedes der elf verschiedenen Antimykotika wurden mit dem Blut von jeweils zehn Probanden jeweils 6 Messreihen durchgeführt; und zwar jeweils eine Messreihe für Vollblut ohne Medikament, eine Messreihe für Vollblut mit Zugabe des Lösungsmittels (Aqua ad iniectabilia oder 5% Glucose) und vier Messreihen von Vollblut mit der minimalen, der maximalen, der Doppelten der maximalen und der Fünffachen der maximalen Blutkonzentration des Antimykotikums. Jede dieser Messreihen bestand aus 3 Einzelmessungen für die Aktivierung der Thrombozyten mit jeweils ADP, Kollagen und TRAP.

Insgesamt wurden so für die Testung der elf Antimykotika ca. 1980 Einzelmessungen durchgeführt.

2.8 Amphotericin B-Pulver

Um zu differenzieren, ob der Wirkstoff Amphotericin B oder dessen Lipidcarrier einen Effekt auf die Thrombozytenfunktion haben, wurde in dieser Studie Amphotericin B-Pulver in

Dimethylsulfoxid (DMSO) und Glucose aufgelöst und dessen Wirkung auf die Thrombozytenaggregation im Multiplate®-Instrument getestet. Dazu wurde 10 mg Amphotericin B-Pulver in 100 µl DMSO und 900 µl 5%iger-Glucose aufgelöst und diese Lösung mit 5%iger-Glucose weiter verdünnt. Es wurden Plasmakonzentrationen von 0,25 µg/ml, 1,5 µg/ml, 3 µg/ml, 10 µg/ml und 100 µg/ml in Vollblut wie beschrieben hergestellt, um den Konzentrationsbereich der getesteten Amphotericin B Präparate Amphotericin B Deoxycholat, Amphotericin B Colloidal Dispersion, Amphotericin B Lipid Complex und liposomales Amphotericin B zu simulieren. Zusätzlich wurde Blut, lediglich versetzt mit DMSO getestet, um eine Wirkung des Lösungsmittels DMSO auf die Thrombozytenfunktion auszuschließen.

2.9 Datenerfassung von 15 auf Acetylsalicylsäure eingestellten Patienten

In der klinischen Praxis besteht eine wichtige Indikation des Multiplate®-Instruments in der Kontrolle von Patienten, die Acetylsalicylsäure zur Gerinnungshemmung einnehmen. Mithilfe des Kollagen- und des Arachidonsäure(Aspi-)-Tests kann die Inhibition der Thrombozytenaggregation durch Acetylsalicylsäure überprüft werden. Die Wirkung von Acetylsalicylsäure beruht auf einer irreversiblen Hemmung der Prostaglandin-H₂-Synthase, durch Hemmung der Cyclooxygenasen COX-1 und COX-2. Diese Enzyme katalysieren die Bildung von entzündungsverstärkenden Prostaglandinen und Thromboxan A₂, das u. a. thrombozytenaktivierend wirkt. Da Thrombozyten aufgrund des fehlenden Zellkerns keine Enzyme nachbilden können, ist die gerinnungshemmende Wirkung auf sie irreversibel - die Wirkungsdauer deckt sich daher mit der Überlebenszeit der Thrombozyten (8–11 Tage).

Für diese Studie wurden die Multiplate®-Testergebnisse von 15 mit Acetylsalicylsäure behandelten Patienten erfasst, um anhand dieser „Positivkontrolle“ zu zeigen, wie sich Medikamentenwirkungen, wie sie bei den verschiedenen Antimykotika eventuell auftreten könnten, sich darstellen können. Als Negativkontrolle dienten wie bereits beschrieben Blutproben ohne Zugabe von Medikamenten.

2.10 Validierung der Multiplate®-Methode

In dieser Studie wurde eine Versuchsreihe zur Präzision und Retest-Reliabilität der Multiplate®-Methode durchgeführt, um zu zeigen, inwieweit die gemessenen Daten bei Mehrfachmessungen an einem Tag und im Verlauf mehrerer Tage reproduzierbar sind. Dazu wurde einer Probandin an drei Tagen Blut abgenommen und es wurden jeweils für ADP, Kollagen und TRAP parallel an drei Messkanälen dreifach Messungen für Null-Werte und Werte mit Eptifibatid (Integrilin®) durchgeführt.

Eptifibatid ist ein GP IIb/IIIa-Rezeptorantagonist, der die Bindung von Fibrinogen, von

Willebrand-Faktor und anderen Adhäsionsliganden verhindert. Eptifibatid führt zu einer Hemmung der Thrombozytenaggregation, gleichgültig ob die Thrombozyten mit ADP, Kollagen oder TRAP aktiviert werden. Zur Überprüfung der Multiplate®-Methode wurde Eptifibatid in einer Konzentration von 0,25 µg/ml Blut eingesetzt; Voruntersuchungen und Studien der Pharmakokinetik der Substanzen haben gezeigt, dass diese Konzentration eine ungefähr 50%ige Hemmung der Thrombozytenaggregation verursacht, entsprechend einer AUAC zwischen 200 und 400 AU*min. Dadurch sollte gezeigt werden, dass die Multiplate®-Methode auch in diesem Wertebereich sicher und reproduzierbar misst, so dass gewährleistet ist, dass die durch Antimykotika eventuell verursachte Hemmung der Thrombozyten zuverlässig mit dem Multiplate®-Instrument abgebildet werden kann.

2.11 Statistik

Grundlage für die Auswertung unserer Ergebnisse war die *Area under the aggregation curve* (AUAC) als Parameter für die Thrombozytenaggregation. Eine Wirkung der verschiedenen Antimykotika auf die Thrombozytenfunktion wurde definiert als eine Änderung der AUAC-Werte nach Zugabe der Antimykotika im Vergleich zu den Negativkontrollen ohne Medikament.

Die statistische Berechnung erfolgte mittels InStat Programm, Version 3.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Die AUAC-Werte nach Messung der verschiedenen Konzentrationen der elf Antimykotika wurden mithilfe der Friedman-Varianzanalyse für nicht-parametrische, abhängige Stichproben untersucht. Bei signifikanten Testergebnissen wurden Unterschiede zwischen den Ergebnissen der verschiedenen Konzentrationen der Antimykotika mit dem Korrekturverfahren von Dunn für multiple Stichproben berechnet.

Für alle statistischen Berechnungen wurde $\alpha < 5 \%$ als signifikant angesehen. Zur grafischen Darstellung der Ergebnisse wurden die Programme Microsoft® Excel 2002 und SPSS 16.0 verwendet.

Für alle Boxplots gilt: Die Box repräsentiert die Werte zwischen dem 25%- und dem 75%-Perzentil. Der Median wird durch den weißen Strich innerhalb der Box dargestellt.

Die T-Balken, die von den Boxen ausgehen, werden als Fühler oder Whisker bezeichnet. Die Länge beträgt das 1,5-Fache der Höhe der Box oder falls keine Fälle bzw. Zeilen mit Werten in diesem Bereich vorhanden sind, wird die Länge durch den maximalen bzw. minimalen Wert festgelegt. Bei einer Normalverteilung der Daten wird erwartet, dass circa 95 % der Daten innerhalb der Whisker liegen.

Ausreißer werden durch Punkte dargestellt. Ausreißer sind Werte, deren Abstand vom

25%-Perzentil nach unten bzw. vom 75%-Perzentil nach oben zwischen dem 1,5fachen und dem 3fachen der Boxhöhe liegt. Extreme Werte werden durch Sternchen dargestellt. Der Abstand extremer Werte von dem 25%- oder dem 75%-Perzentil beträgt mehr als das Dreifache der Boxhöhe.

3. Ergebnisse

3.1 Polyen-Antimykotika

3.1.1 Amphotericin B Deoxycholat (DAMB)

Tabelle 3 und Abbildung 5 zeigen den Effekt des Antimykotikums Amphotericin B Deoxycholat (DAMB) auf die AUAC (*Area under the aggregation curve*) als Parameter für die Thrombozytenaggregation.

Sowohl für Adenosindiphosphat (ADP), als auch für Kollagen und Thrombin receptor activating peptide (TRAP) zeigte sich keine statistisch signifikante Veränderung der Thrombozytenaggregation bei verschiedenen Konzentrationen des Antimykotikums im Vergleich zu den Referenzwerten von Vollblut bzw. Vollblut nach Zugabe von 5%iger Glucose.

	ADP						Kollagen						TRAP-6					
	0'	Glucose	Cmin	Cmax	x2 Cmax	x5 Cmax	0'	Glucose	Cmin	Cmax	x2 Cmax	x5 Cmax	0'	Glucose	Cmin	Cmax	x2 Cmax	x5 Cmax
Mittelwert	726	727	714	690	717	698	798	741	799	700	768	821	1060	1062	1060	992	999	1047
Median	691	756	773	735	729	752	829	731	850	766	807	865	1079	1054	1084	965	988	1016
SD	147	143	19	177	209	212	137	107	233	218	230	258	111	109	138	120	132	23
SEM	46	45	62	56	66	67	43	34	74	69	73	82	35	34	44	38	42	74
95% CI min	621	624	574	563	567	547	700	665	633	544	604	637	981	984	961	906	905	880
95% CI max	831	829	853	817	866	850	896	817	966	856	932	1006	1139	1140	1159	1078	1093	1213
Minimum	542	457	270	299	437	391	585	591	395	304	290	287	861	933	769	766	738	628
Maximum	944	917	931	866	1026	947	977	927	1047	968	1081	1173	1196	1232	1290	1159	1175	1393

Tabelle 3: AUAC (Area under the aggregation curve) (in AU*min) als Endpunkt der Thrombozytenaggregation nach Inkubation mit Amphotericin B Deoxycholat (DAMB). Dargestellt ist die deskriptive Statistik für 10 Probanden nach Zugabe von Adenosindiphosphat (ADP), Kollagen und Thrombin receptor activating peptide 6 (TRAP-6).

p=0,7915 für ADP, p=0,1079 für Kollagen und p=0,1828 für TRAP-6 (Friedman-ANOVA, n.s.).

SD (Standardabweichung), SEM (Standardfehler des Mittelwertes), 95% CI min (untere Grenze des 95% Konfidenzintervalls), 95% CI max (obere Grenze des 95% Konfidenzintervalls), 0' (Kontrollproben von Vollblut ohne Zugabe von Medikamenten), Glucose (Vollblut mit Zugabe von 5%iger Glucose), Cmin (minimale Konzentration), Cmax (maximale Konzentration), x2 Cmax (doppelte maximale Konzentration), x5 Cmax (fünffache maximale Konzentration)

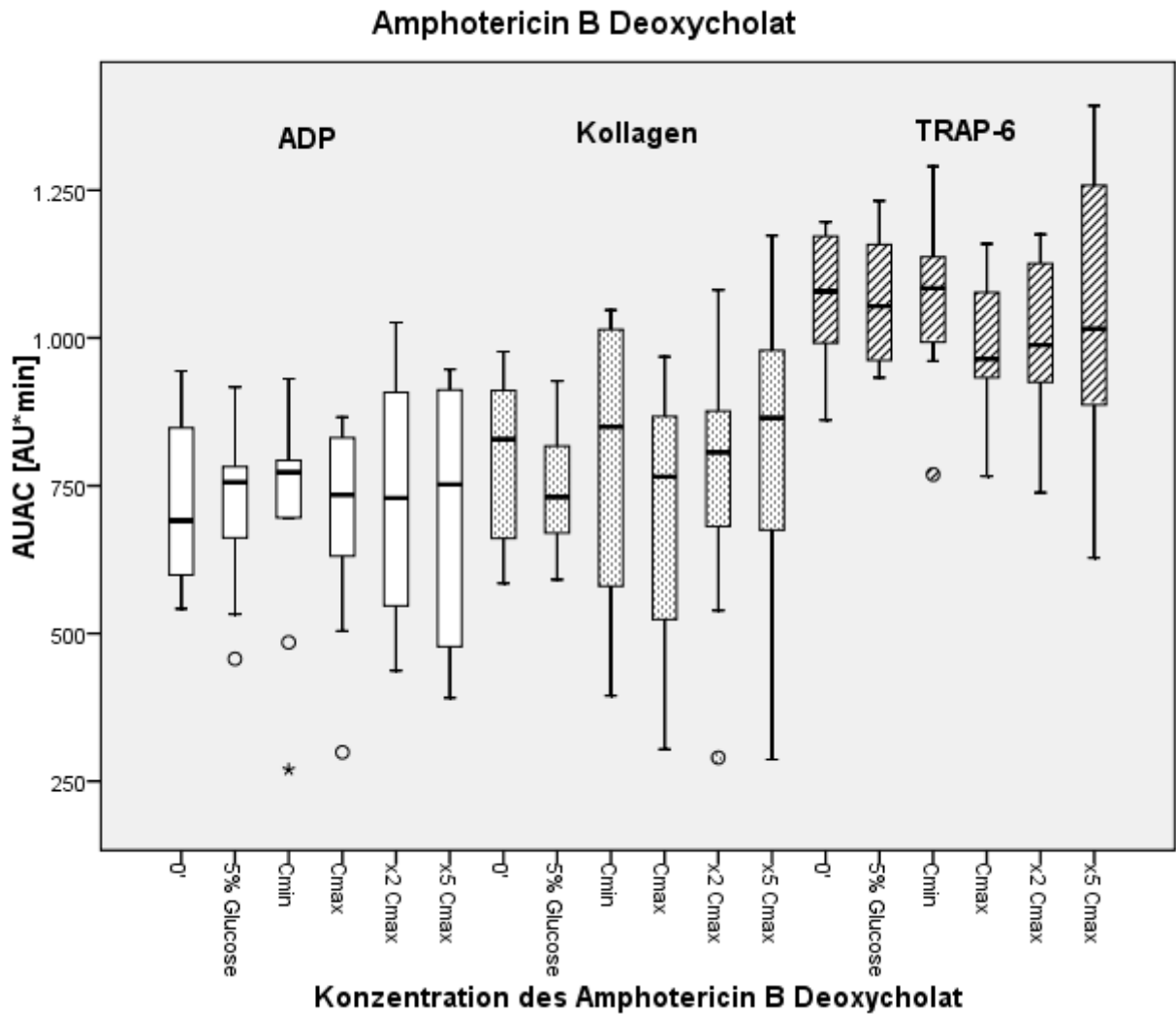


Abbildung 5: Darstellung der AUAC (*Area under the aggregation curve*) nach Inkubation mit Amphotericin B Deoxycholat (DAMB).

$p=0,7915$ für Adenosindiphosphat (ADP), $p=0,1079$ für Kollagen und $p=0,1828$ für Thrombin receptor activating peptide 6 (TRAP-6) (Friedman-ANOVA, n.s.).

0' (Kontrollproben von Vollblut ohne Zugabe von Medikamenten), 5% Glucose (Vollblut mit Zugabe von 5%iger Glucose), Cmin (minimale Konzentration), Cmax (maximale Konzentration), x2 Cmax (doppelte maximale Konzentration), x5 Cmax (fünffache maximale Konzentration).

3.1.2 Amphotericin B Lipid Complex (ABLC)

Tabelle 4 und Abbildung 6 zeigen den Effekt des Antimykotikums Amphotericin B Lipid Complex (ABLC) auf die Thrombozytenaggregation.

Für steigende Konzentrationen dieses Polyen-Antimykotikums und Aktivierung der Thrombozyten mit Adenosindiphosphat (ADP) wurde eine reduzierte Aggregation der Thrombozyten beobachtet ($p=0,0012$). Im Vergleich zum Referenzwert ohne Medikament war der mittlere AUAC-Wert (*Area under the aggregation curve*) der fünffachen Plasmakonzentration um 19,3 % reduziert, gegenüber der Kontrollmessung mit alleiniger Zugabe von Glucose um 19,4% und im Vergleich zum AUAC-Wert der minimalen Plasmakonzentration war der Wert der fünffachen Plasmakonzentration um 18 % signifikant reduziert (für Null-Wert vs. x5 Cmax $p<0,01$, für Glucose vs. x5 Cmax mit $p<0,05$ und für Cmin vs. x5 Cmax mit $p<0,05$).

Auch bei Aktivierung mit Kollagen und Thrombin receptor activating peptide 6 (TRAP-6) zeigte sich eine signifikante Reduktion der Thrombozytenaggregation ($p=0,0001$ für Kollagen und $p=0,0356$ für TRAP-6). Nach Korrektur für multiple Vergleiche zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen einzelnen Gruppen.

	ADP						Kollagen						TRAP-6					
	0'	Glucose	Cmin	Cmax	x2 Cmax	x5 Cmax	0'	Glucose	Cmin	Cmax	x2 Cmax	x5 Cmax	0'	Glucose	Cmin	Cmax	x2 Cmax	x5 Cmax
Mittelwert	726	727	714	632	657	586	798	741	776	720	742	631	1060	1062	1036	1066	988	953
Median	691	756	758	665	633	623	829	731	793	720	757	612	1079	1054	1042	1046	980	954
SD	147	143	165	160	181	154	137	107	147	145	158	163	111	109	131	173	131	184
SEM	46	45	52	51	57	49	43	34	46	46	50	51	35	34	41	55	41	58
95% CI min	621	624	596	517	528	476	700	665	671	619	629	514	981	984	942	942	895	822
95% CI max	831	829	832	747	787	696	896	817	881	827	856	747	1139	1140	1129	1190	1081	1085
Minimum	542	457	440	361	367	368	585	591	516	510	459	322	861	933	819	821	790	685
Maximum	944	917	918	794	899	812	977	927	987	955	1016	879	1196	1232	1214	1348	1204	1245

Tabelle 4: AUAC (*Area under the aggregation curve*) (in AU*min) als Endpunkt der Thrombozytenaggregation nach Inkubation mit Amphotericin B Lipid Complex (ABLC). Dargestellt ist die deskriptive Statistik für 10 Probanden nach Zugabe von Adenosindiphosphat (ADP), Kollagen und Thrombin receptor activating peptide 6 (TRAP-6).

p=0,0012 für ADP, p=0,0001 für Kollagen und p=0,0356 für TRAP (Friedman-ANOVA). Für ADP war p<0,01 für Null-Wert versus x5 Cmax und p<0,05 für Glucose versus x5 Cmax und Cmin versus x5 Cmax. Andere Vergleiche waren mit Dunn's post-test nicht signifikant.

SD (Standardabweichung), SEM (Standardfehler des Mittelwertes), 95% CI min (untere Grenze des 95% Konfidenzintervalls), 95% CI max (obere Grenze des 95% Konfidenzintervalls), 0' (Kontrollproben von Vollblut ohne Zugabe von Medikamenten), Glucose (Vollblut mit Zugabe von 5%iger Glucose), Cmin (minimale Konzentration), Cmax (maximale Konzentration), x2 Cmax (doppelte maximale Konzentration), x5 Cmax (fünffache maximale Konzentration)

Amphotericin B Lipid Complex

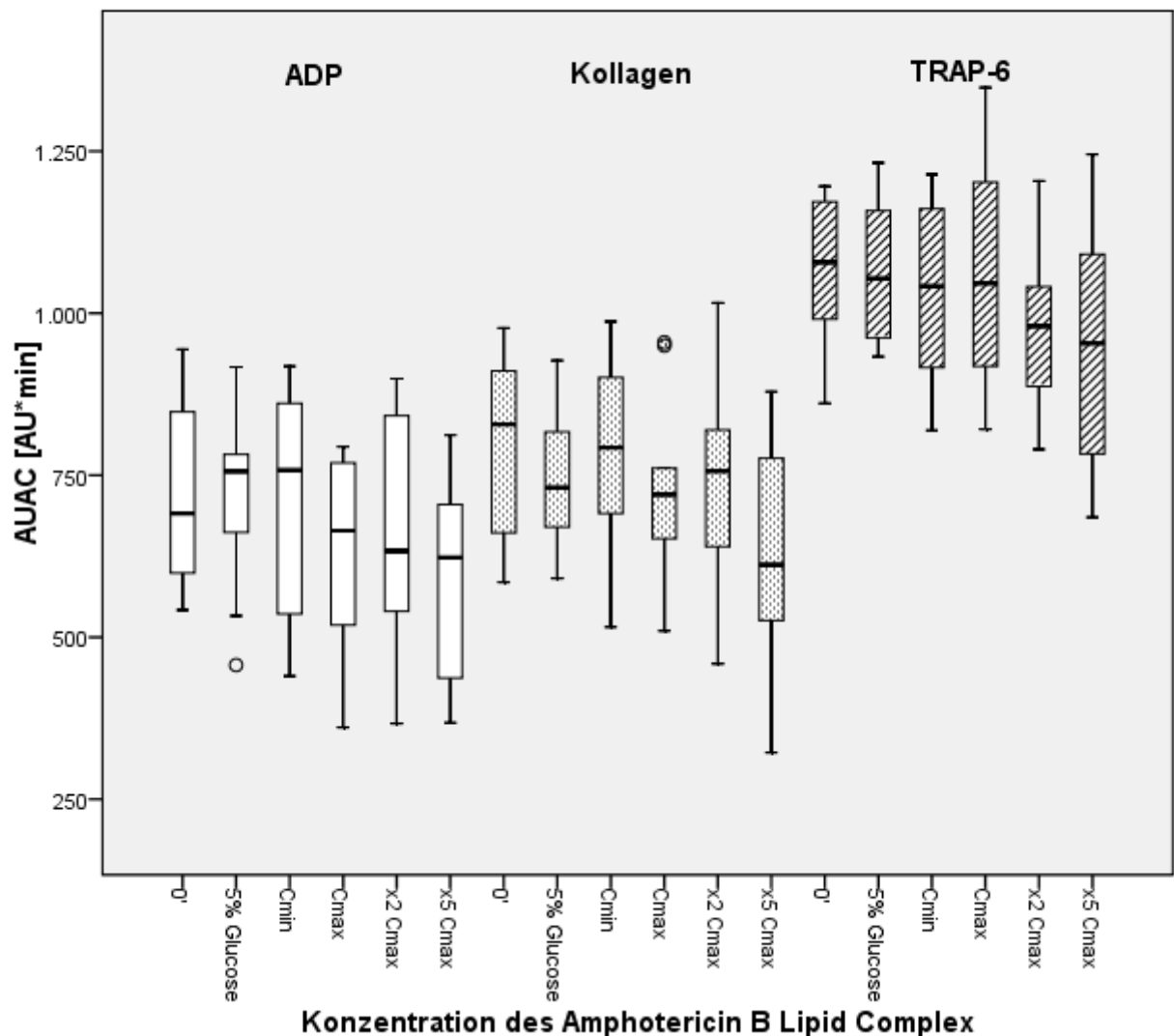


Abbildung 6: Darstellung der AUAC (Area under the aggregation curve) nach Inkubation mit Amphotericin B Lipid Complex (ABLC).

$p=0,0012$ für Adenosindiphosphat (ADP), $p=0,0001$ für Kollagen und $p=0,0356$ für Thrombin receptor activating peptide 6 (TRAP-6) (Friedman-ANOVA). Für ADP war $p<0,01$ für Null-Wert versus x5 Cmax und $p<0,05$ für Glucose versus x5 Cmax und Cmin versus x5 Cmax. Andere Vergleiche waren mit Dunn's post-test nicht signifikant.

0' (Kontrollproben von Vollblut ohne Zugabe von Medikamenten), 5% Glucose (Vollblut mit Zugabe von 5%iger Glucose), Cmin (minimale Konzentration), Cmax (maximale Konzentration), x2 Cmax (doppelte maximale Konzentration), x5 Cmax (fünffache maximale Konzentration).

3.1.3 Liposomales Amphotericin B (LAMB)

Tabelle 5 und Abbildung 7 zeigen den Effekt von liposomalem Amphotericin B (LAMB) auf die Thrombozytenaggregation.

Es wird deutlich, dass sich die AUAC-Werte (*Area under the aggregation curve*) bei den verschiedenen Konzentrationen dieses Antimykotikums bei Aktivierung mit Adenosindiphosphat (ADP) signifikant unterschieden ($p=0,0058$). Im Vergleich zum Referenzwert ohne Medikament war der AUAC-Wert der fünffachen Plasmakonzentration um 20 % statistisch signifikant reduziert (Glucose vs. x5 Cmax $p<0,05$).

Auch für Kollagen und Thrombin receptor activating peptide 6 (TRAP-6) war eine signifikante Reduktion der Thrombozytenaggregation bei steigenden Konzentrationen des Antimykotikums messbar ($p=0,0139$ für Kollagen und $p=0,0007$ für TRAP-6). Nach Korrektur für multiple Vergleiche zeigten sich jedoch keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen einzelnen Gruppen.

	ADP						Kollagen						TRAP-6					
	0'	Glucose	Cmin	Cmax	x2 Cmax	x5 Cmax	0'	Glucose	Cmin	Cmax	x2 Cmax	x5 Cmax	0'	Glucose	Cmin	Cmax	x2 Cmax	x5 Cmax
Mittelwert	726	727	617	627	619	581	798	741	629	668	716	650	1060	1062	884	869	874	831
Median	691	756	642	626	627	582	829	731	619	687	670	641	1079	1054	942	932	913	852
SD	147	143	216	204	131	152	137	107	204	133	209	203	111	109	242	196	243	205
SEM	46	45	68	64	42	48	43	34	64	42	66	64	35	34	77	62	77	65
95% CI min	621	624	462	481	525	472	700	665	484	573	566	504	981	984	711	729	700	684
95% CI max	831	829	771	772	713	690	896	817	775	764	865	795	1139	1140	1058	1010	1047	977
Minimum	542	457	283	309	397	331	585	591	315	370	454	361	861	933	532	598	573	546
Maximum	944	917	958	1038	835	887	977	927	1039	837	1157	1062	1196	1232	1245	1151	1303	1158

Tabelle 5: AUAC (*Area under the aggregation curve*) (in AU*min) als Endpunkt der Thrombozytenaggregation nach Inkubation mit liposomalem Amphotericin B (LAMB). Dargestellt ist die deskriptive Statistik für 10 Probanden nach Zugabe von Adenosindiphosphat (ADP), Kollagen und Thrombin receptor activating peptide 6 (TRAP-6).

p=0,0058 für ADP, p=0,0139 für Kollagen und p=0,0007 für TRAP (Friedman-ANOVA). Für ADP war p<0,05 für Glucose versus x5 Cmax. Andere Vergleiche waren mit Dunn's post-test nicht signifikant.

SD (Standardabweichung), SEM (Standardfehler des Mittelwertes), 95% CI min (untere Grenze des 95% Konfidenzintervalls), 95% CI max (obere Grenze des 95% Konfidenzintervalls), 0' (Kontrollproben von Vollblut ohne Zugabe von Medikamenten), Glucose (Vollblut mit Zugabe von 5%iger Glucose), Cmin (minimale Konzentration), Cmax (maximale Konzentration), x2 Cmax (doppelte maximale Konzentration), x5 Cmax (fünffache maximale Konzentration)

Liposomales Amphotericin B

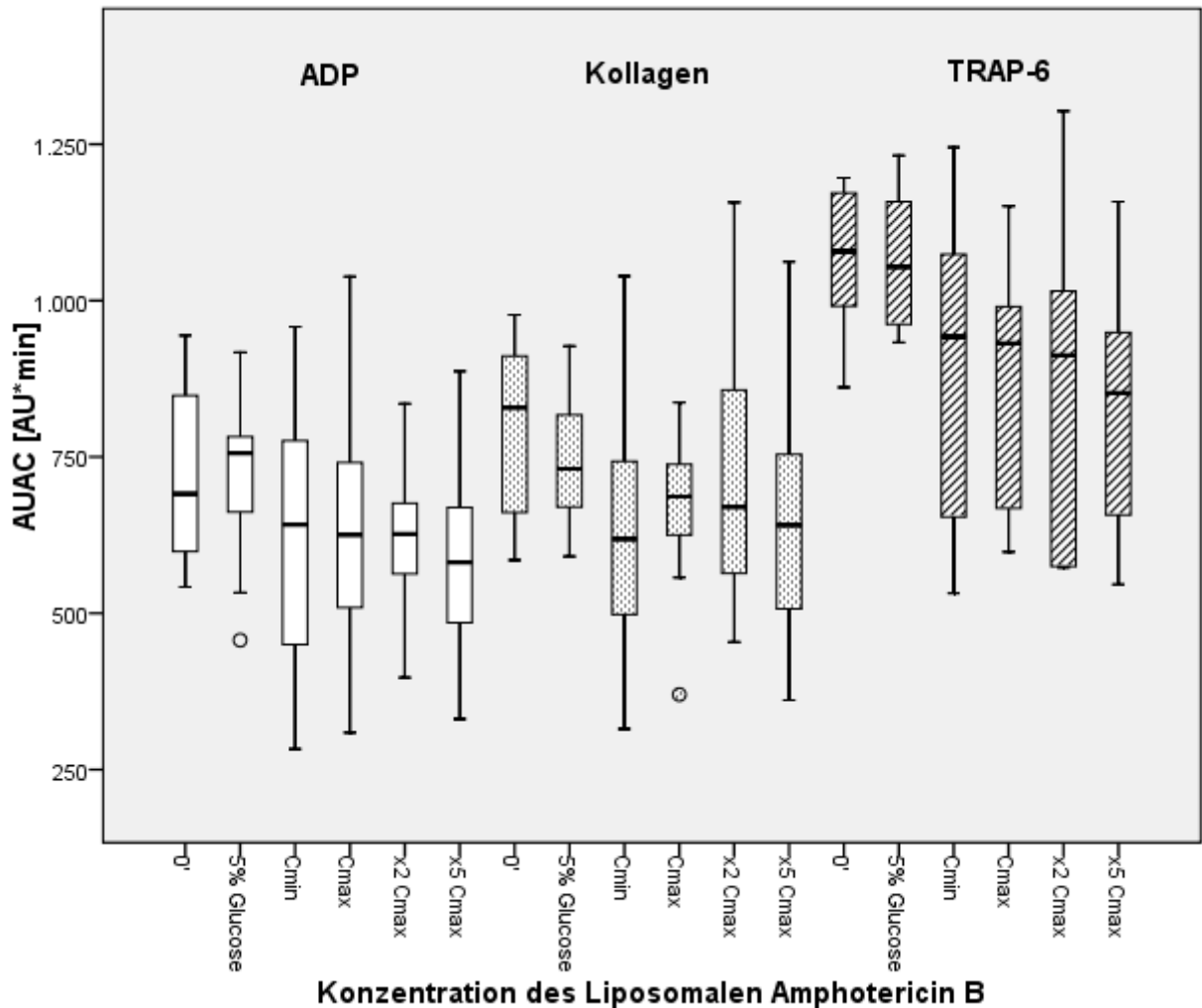


Abbildung 7: Darstellung der AUAC (*Area under the aggregation curve*) nach Inkubation mit liposomalem Amphotericin B (LAMB).

$p=0,0058$ für Adenosindiphosphat (ADP), $p=0,0139$ für Kollagen und $p=0,0007$ für Thrombin receptor activating peptide 6 (TRAP-6) (Friedman-ANOVA). Für ADP war $p<0,05$ für Glucose versus x5 Cmax. Andere Vergleiche waren mit Dunn's post-test nicht signifikant.

0' (Kontrollproben von Vollblut ohne Zugabe von Medikamenten), 5% Glucose (Vollblut mit Zugabe von 5%iger Glucose), Cmin (minimale Konzentration), Cmax (maximale Konzentration), x2 Cmax (doppelte maximale Konzentration), x5 Cmax (fünffache maximale Konzentration).

3.1.4 Amphotericin B Colloidal Dispersion (ABCD)

Tabelle 6 und Abbildung 8 zeigen den Effekt von Amphotericin B Colloidal Dispersion (ABCD) auf die Thrombozytenaggregation.

Für steigende Konzentrationen dieses Medikamentes und Aktivierung der Thrombozyten mit Adenosindiphosphat (ADP) wurde eine reduzierte Aggregation der Thrombozyten beobachtet ($p=0,0014$). Im Vergleich zum Referenzwert ohne Medikamentenzugabe war die AUAC (*Area under the aggregation curve*) der fünffachen Plasmakonzentration um 16,3% und im Vergleich zum Kontrollwert mit alleiniger Zugabe von Glucose um 20 % statistisch signifikant reduziert ($p<0,05$ für Null vs. x5 Cmax und $p<0,05$ für Glucose vs. x5 Cmax). Auch der Vergleich des AUAC-Wertes der Kontrolllösung mit Glucose mit der maximalen Plasmakonzentration war mit $p<0,05$ um 19,3 % statistisch signifikant vermindert.

Auch nach Aktivierung mit Kollagen und Thrombin receptor activating peptide 6 (TRAP-6) zeigte sich eine statistisch signifikante Reduktion der Thrombozytenaggregation ($p=0,0130$ für Kollagen und $p=0,0002$ für TRAP-6). Nach Korrektur für multiple Vergleiche zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen einzelnen Gruppen.

	ADP						Kollagen						TRAP-6					
	0'	Glucose	Cmin	Cmax	x2 Cmax	x5 Cmax	0'	Glucose	Cmin	Cmax	x2 Cmax	x5 Cmax	0'	Glucose	Cmin	Cmax	x2 Cmax	x5 Cmax
Mittelwert	721	747	643	598	644	603	889	837	777	797	788	772	1067	1065	971	986	847	848
Median	730	696	655	603	659	637	876	790	762	768	799	778	1080	1071	997	960	850	891
SD	103	136	132	171	142	130	144	211	160	200	157	161	92	99	128	196	175	161
SEM	32	43	42	54	45	41	46	67	50	63	50	51	29	31	41	62	55	51
95% CI min	647	650	549	476	543	510	785	685	662	654	676	657	1002	994	879	846	722	733
95% CI max	794	844	737	720	746	696	992	988	891	940	901	887	1133	1135	1062	1126	972	963
Minimum	504	602	423	390	386	384	703	565	512	507	538	534	912	948	712	697	597	589
Maximum	835	957	823	920	824	764	1130	1186	990	1039	1007	983	1226	1260	1098	1264	1134	1027

Tabelle 6: AUAC (*Area under the aggregation curve*) (in AU*min) als Endpunkt der Thrombozytenaggregation nach Inkubation mit Amphotericin B Colloidal Dispersion (ABCD). Dargestellt ist die deskriptive Statistik für 10 Probanden nach Zugabe von Adenosindiphosphat (ADP), Kollagen und Thrombin receptor activating peptide 6 (TRAP-6).

p=0,0014 für ADP, p=0,0130 für Kollagen und p=0,0002 für TRAP (Friedman-ANOVA). Für ADP war p<0,05 für Null-Wert versus x5 Cmax und für Glucose versus Cmax und für Glucose versus x5 Cmax. Andere Vergleiche waren mit Dunn's post-test nicht signifikant.

SD (Standardabweichung), SEM (Standardfehler des Mittelwertes), 95% CI min (untere Grenze des 95% Konfidenzintervalls), 95% CI max (obere Grenze des 95% Konfidenzintervalls), 0' (Kontrollproben von Vollblut ohne Zugabe von Medikamenten), Glucose (Vollblut mit Zugabe von 5%iger Glucose), Cmin (minimale Konzentration), Cmax (maximale Konzentration), x2 Cmax (doppelte maximale Konzentration), x5 Cmax (fünffache maximale Konzentration)

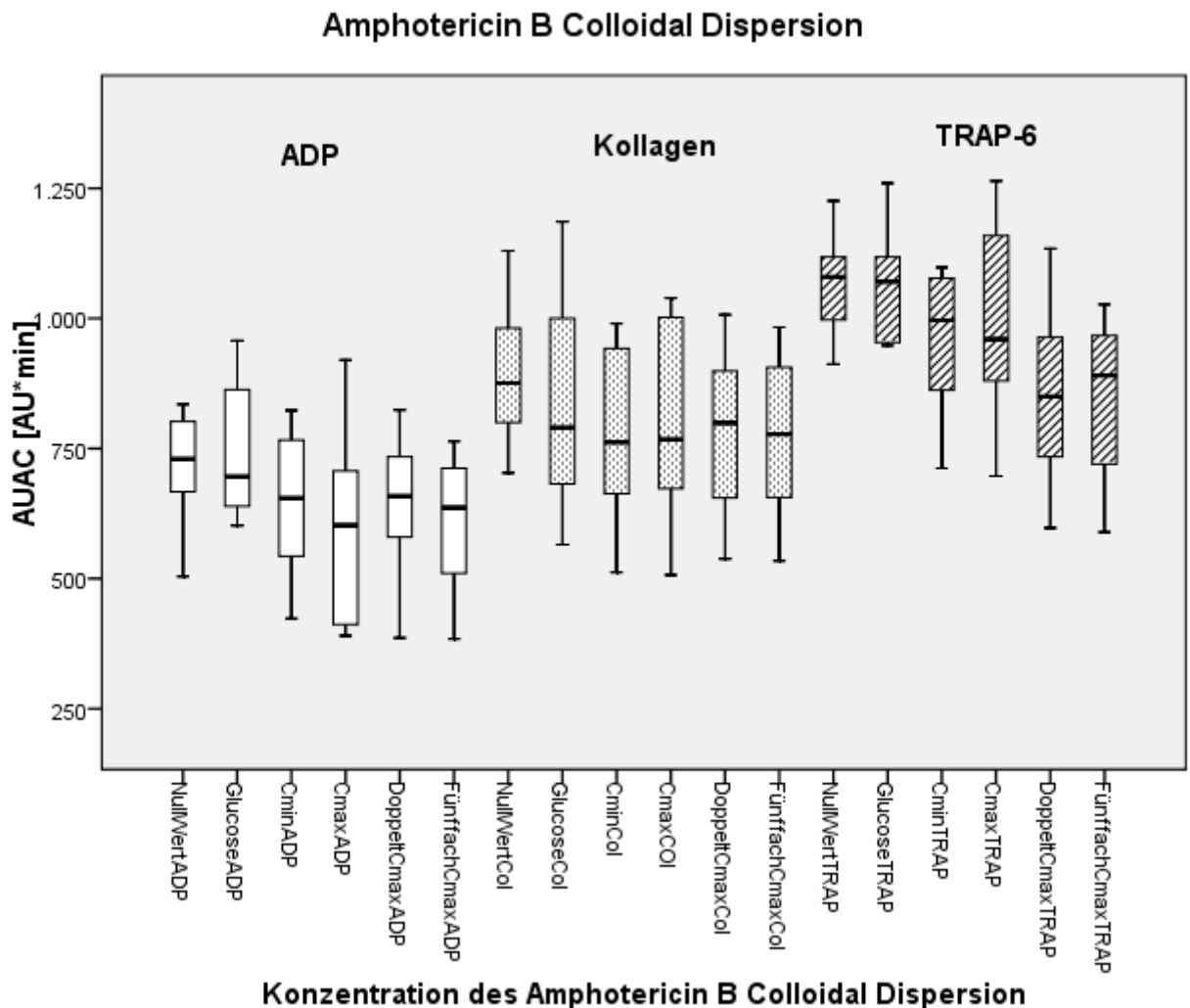


Abbildung 8: Darstellung der AUAC (Area under the aggregation curve) nach Inkubation mit Amphotericin B Colloidal Dispersion (ABCD).

$p=0,0014$ für Adenosindiphosphat (ADP), $p=0,0130$ für Kollagen und $p=0,0002$ für Thrombin receptor activating peptide 6 (TRAP-6) (Friedman-ANOVA). Für ADP war $p<0,05$ für Null-Wert versus $x5$ Cmax und für Glucose versus Cmax und für Glucose versus $x5$ Cmax. Andere Vergleiche waren mit Dunn's post-test nicht signifikant.

0' (Kontrollproben von Vollblut ohne Zugabe von Medikamenten), 5% Glucose (Vollblut mit Zugabe von 5%iger Glucose), Cmin (minimale Konzentration), Cmax (maximale Konzentration), $x2$ Cmax (doppelte maximale Konzentration), $x5$ Cmax (fünffache maximale Konzentration).

3.1.5 Liposomales Nystatin

Tabelle 7 und Abbildung 9 zeigen den Effekt von liposomalem Nystatin auf die Thrombozytenaggregation.

Für steigende Konzentrationen dieses Polyen-Antimykotikums und Aktivierung der Thrombozyten mit Adenosindiphosphat (ADP) wurde eine reduzierte Aggregation der Thrombozyten beobachtet ($p=0,0022$). Im Vergleich zum Referenzwert ohne Medikamentenzugabe war die AUAC (*Area under the aggregation curve*) bei Zugabe der fünffachen Plasmakonzentration um 14,9 % statistisch signifikant reduziert ($p<0,05$ für Null-Wert vs. $\times 5$ Cmax). Gegenüber dem Kontrollwert mit Glucose war die maximale Plasmakonzentration um 6,3 % statistisch signifikant reduziert (Glucose vs. Cmax mit $p<0,01$) und im Vergleich zur maximalen Plasmakonzentration war der AUAC-Wert der fünffachen Plasmakonzentration um 11,4 % statistisch signifikant reduziert (Cmax vs. $\times 5$ Cmax mit $p<0,05$).

Auch nach Aktivierung mit Kollagen und Thrombin receptor activating peptide 6 (TRAP-6) zeigte sich eine statistisch signifikante Reduktion der Thrombozytenaggregation ($p=0,0156$ für Kollagen und $p<0,0001$ für TRAP-6). Nach Korrektur für multiple Vergleiche zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen einzelnen Gruppen.

	ADP						Kollagen						TRAP-6					
	0'	Glucose	Cmin	Cmax	x2 Cmax	x5 Cmax	0'	Glucose	Cmin	Cmax	x2 Cmax	x5 Cmax	0'	Glucose	Cmin	Cmax	x2 Cmax	x5 Cmax
Mittelwert	721	747	693	693	660	614	889	837	796	773	798	776	1067	1065	1056	911	1006	935
Median	730	696	683	721	656	618	876	790	750	810	794	806	1080	1071	1044	926	1005	947
SD	103	136	172	162	161	143	144	211	211	161	163	172	92	99	126	144	93	120
SEM	32	43	54	51	51	45	46	67	67	51	52	54	29	31	40	46	29	38
95% CI min	647	650	570	577	545	511	785	685	645	657	682	654	1002	994	966	808	939	849
95% CI max	794	844	816	809	774	716	992	988	947	888	915	899	1133	1135	1146	1014	1072	1021
Minimum	504	602	401	457	449	405	703	565	505	492	542	467	912	948	890	603	861	756
Maximum	835	957	986	979	959	866	1130	1186	1220	1003	1025	971	1226	1260	1321	1072	1148	1107

Tabelle 7: AUAC (Area under the aggregation curve) (in AU*min) als Endpunkt der Thrombozytenaggregation nach Inkubation mit liposomalem Nyastatin. Dargestellt ist die deskriptive Statistik für 10 Probanden nach Zugabe von Adenosindiphosphat (ADP), Kollagen und Thrombin receptor activating peptide 6 (TRAP-6).

p=0,0022 für ADP, p=0,0156 für Kollagen und p<0,0001 für TRAP (Friedman-ANOVA). Für ADP war p<0,01 für Glucose versus Cmax und p<0,05 für Null-Wert versus x5 Cmax und Cmax versus x5 Cmax. Andere Vergleiche waren mit Dunn's post-test nicht signifikant.

SD (Standardabweichung), SEM (Standardfehler des Mittelwertes), 95% CI min (untere Grenze des 95% Konfidenzintervalls), 95% CI max (obere Grenze des 95% Konfidenzintervalls), 0' (Kontrollproben von Vollblut ohne Zugabe von Medikamenten), Glucose (Vollblut mit Zugabe von 5%iger Glucose), Cmin (minimale Konzentration), Cmax (maximale Konzentration), x2 Cmax (doppelte maximale Konzentration), x5 Cmax (fünffache maximale Konzentration)

Liposomales Nystatin

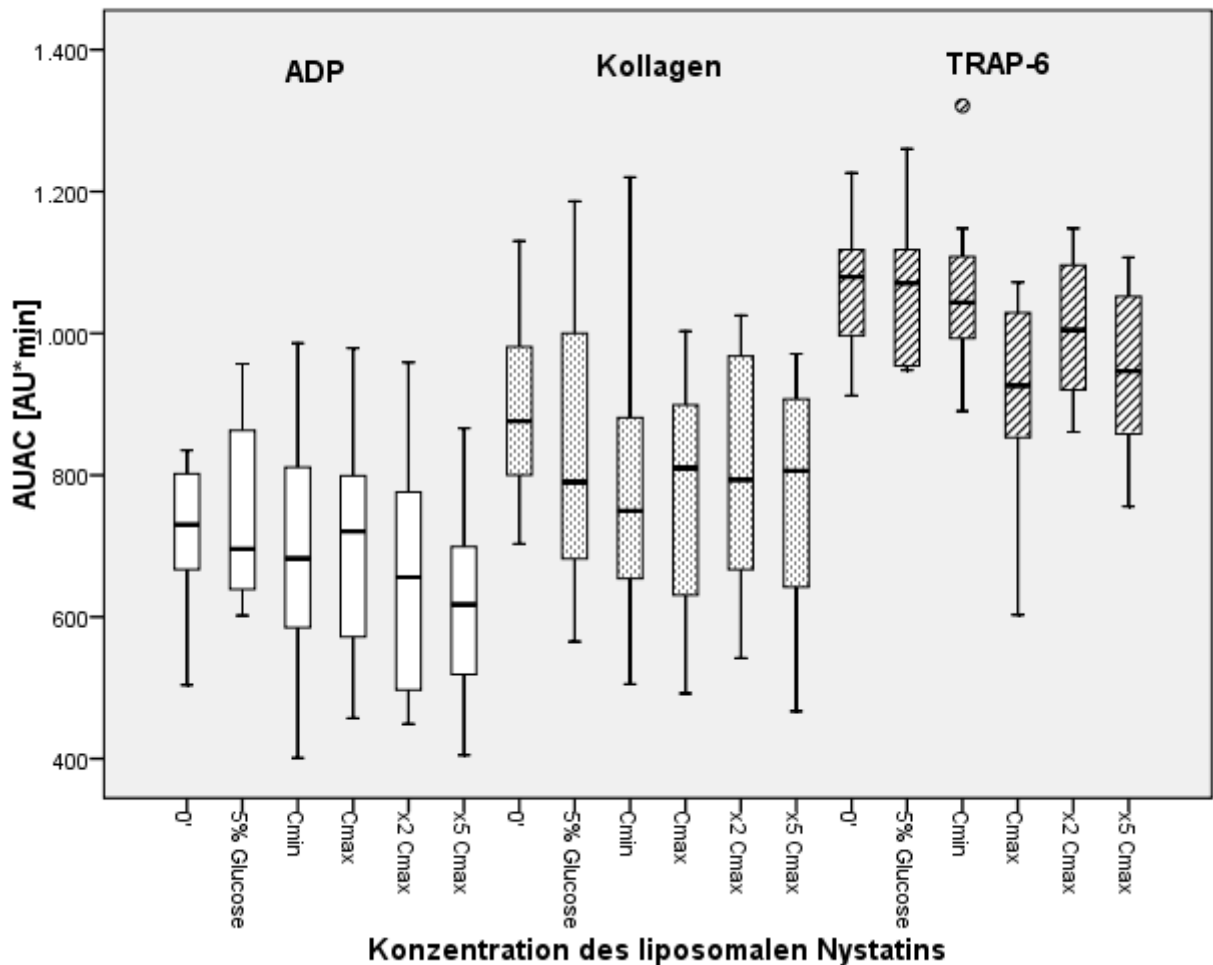


Abbildung 9: Darstellung der AUAC (*Area under the aggregation curve*) nach Inkubation mit liposomalem Nystatin.

$p=0,0022$ für Adenosindiphosphat (ADP), $p=0,0156$ für Kollagen und $p<0,0001$ für Thrombin receptor activating peptide 6 (TRAP-6) (Friedman-ANOVA). Für ADP war $p<0,01$ für Glucose versus Cmax und $p<0,05$ für Null-Wert versus x5 Cmax und Cmax versus x5 Cmax. Andere Vergleiche waren mit Dunn's post-test nicht signifikant.

0' (Kontrollproben von Vollblut ohne Zugabe von Medikamenten), 5% Glucose (Vollblut mit Zugabe von 5%iger Glucose), Cmin (minimale Konzentration), Cmax (maximale Konzentration), x2 Cmax (doppelte maximale Konzentration), x5 Cmax (fünffache maximale Konzentration).

3.1.6 Amphotericin B-Pulver

Tabelle 8 und Abbildung 10 zeigen den Effekt von in DMSO und 5%iger Glucose aufgelöstem Amphotericin B-Pulver auf die Thrombozytenfunktion bei Aktivierung der Thrombozytenaggregation mit Adenosindiphosphat (ADP). Es zeigte sich keine signifikante Veränderung der AUAC-Werte (*Area under the aggregation curve*) bei steigenden Konzentrationen des Antimykotikums ($p=0,1036$).

	ADP						
	0'	Blut+DMSO	Cplasma 0,25 µg/ml	Cplasma 1,5 µg/ml	Cplasma 3 µg/ml	Cplasma 10 µg/ml	Cplasma 100 µg/ml
Mittelwert	672	643	638	632	631	660	615
Median	669	655	673	625	637	654	631
SD	101	155	120	80	104	133	113
SEM	32	49	38	25	33	42	36
95% CI min	600	532	552	575	557	565	534
95% CI max	745	754	723	689	706	755	696
Minimum	513	396	453	497	461	477	412
Maximum	875	863	790	766	772	856	832

Tabelle 8: AUAC (*Area under the aggregation curve*) (in AU*min) als Endpunkt der Thrombozytenaggregation nach Inkubation mit in DMSO und Glucose aufgelöstem Amphotericin B-Pulver. Dargestellt ist die deskriptive Statistik für 10 Probanden nach Zugabe von Adenosindiphosphat (ADP).

$p=0,291$ (Friedman-ANOVA, n.s.).

SD (Standardabweichung), SEM (Standardfehler des Mittelwertes), 95% CI min (untere Grenze des 95% Konfidenzintervalls), 95% CI max (obere Grenze des 95% Konfidenzintervalls), 0' (Kontrollproben von Vollblut ohne Zugabe von Medikamenten), Blut+DMSO (Vollblut versetzt mit Dimethylsulfoxid), Cplasma (Plasmakonzentration)

Amphotericin B-Pulver, Aktivator: ADP

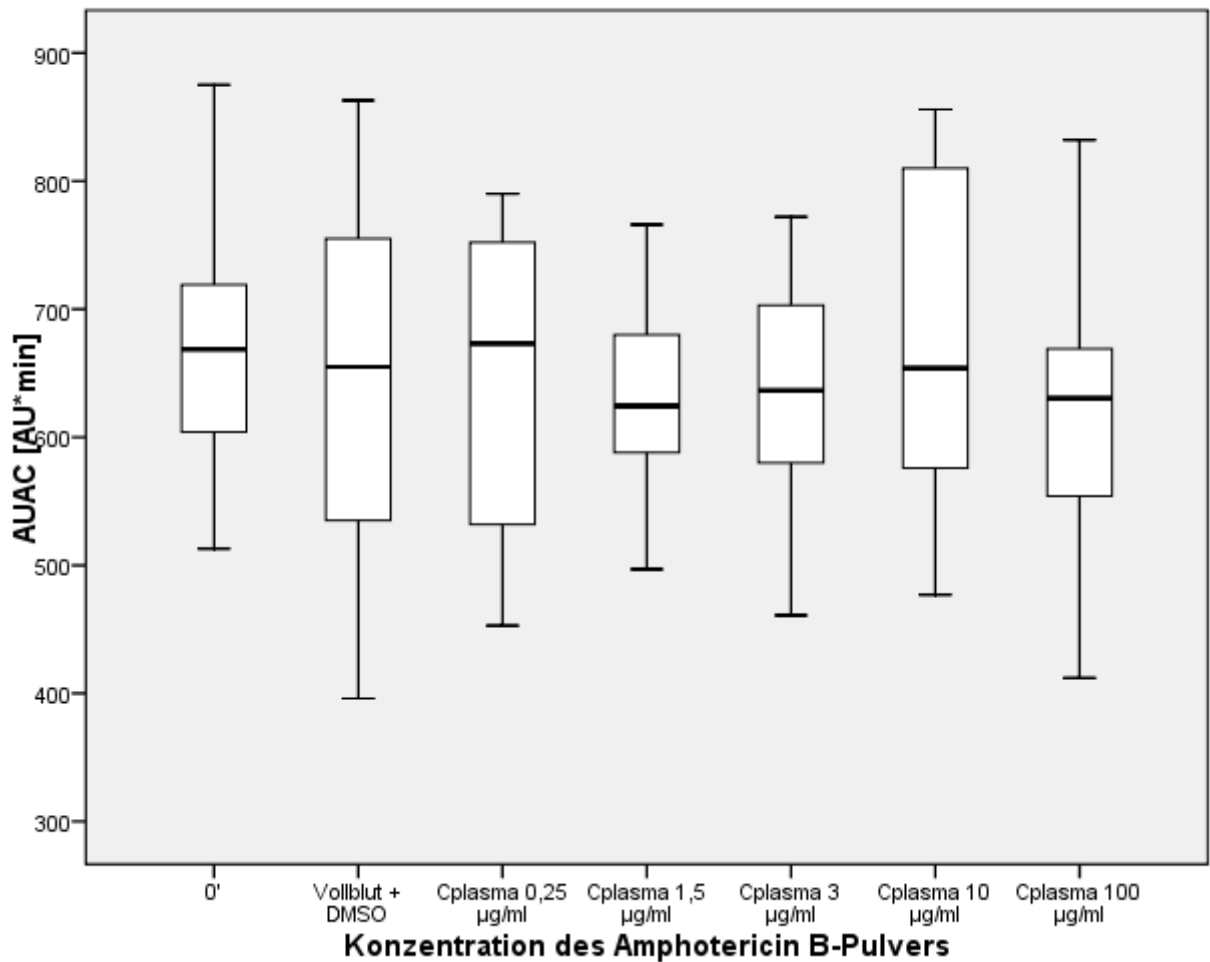


Abbildung 10: Darstellung der AUAC (*Area under the aggregation curve*) nach Inkubation mit in DMSO und Glucose aufgelöstem Amphotericin B-Pulver.

p=0,291 (Friedman-ANOVA, n.s.).

0' (Kontrollproben von Vollblut ohne Zugabe von Medikamenten), Vollblut + DMSO (Vollblut versetzt mit Dimethylsulfoxid), Cplasma (Plasmakonzentration)

Tabelle 9 und Abbildung 11 zeigen den Effekt des Amphotericin B-Pulvers auf die Thrombozytenfunktion bei Aktivierung der Thrombozytenaggregation mit Kollagen. Auch bei diesem Aktivator konnte keine signifikante Veränderung der AUAC-Werte (*Area under the aggregation curve*) bei steigenden Konzentrationen des Antimykotikums beobachtet werden ($p=0,267$).

	Kollagen						
	0'	Blut+DMSO	Cplasma 0,25 µg/ml	Cplasma 1,5 µg/ml	Cplasma 3 µg/ml	Cplasma 10 µg/ml	Cplasma 100 µg/ml
Mittelwert	862	774	845	835	855	854	883
Median	868	775	857	815	850	799	879
SD	181	111	170	131	157	138	163
SEM	57	35	54	42	50	44	52
95% CI min	733	694	724	741	743	755	766
95% CI max	991	853	967	929	967	952	999
Minimum	542	613	568	672	653	668	661
Maximum	1123	950	1109	1029	1151	1072	1164

Tabelle 9: AUAC (*Area under the aggregation curve*) (in AU*min) als Endpunkt der Thrombozytenaggregation nach Inkubation mit in DMSO und Glucose aufgelöstem Amphotericin B-Pulver. Dargestellt ist die deskriptive Statistik für 10 Probanden nach Zugabe von Kollagen.

$p=0,267$ (Friedman-ANOVA, n.s.).

SD (Standardabweichung), SEM (Standardfehler des Mittelwertes), 95% CI min (untere Grenze des 95% Konfidenzintervalls), 95% CI max (obere Grenze des 95% Konfidenzintervalls), 0' (Kontrollproben von Vollblut ohne Zugabe von Medikamenten), Blut+DMSO (Vollblut versetzt mit Dimethylsulfoxid), Cplasma (Plasmakonzentration)

Amphotericin B-Pulver, Aktivator: Kollagen

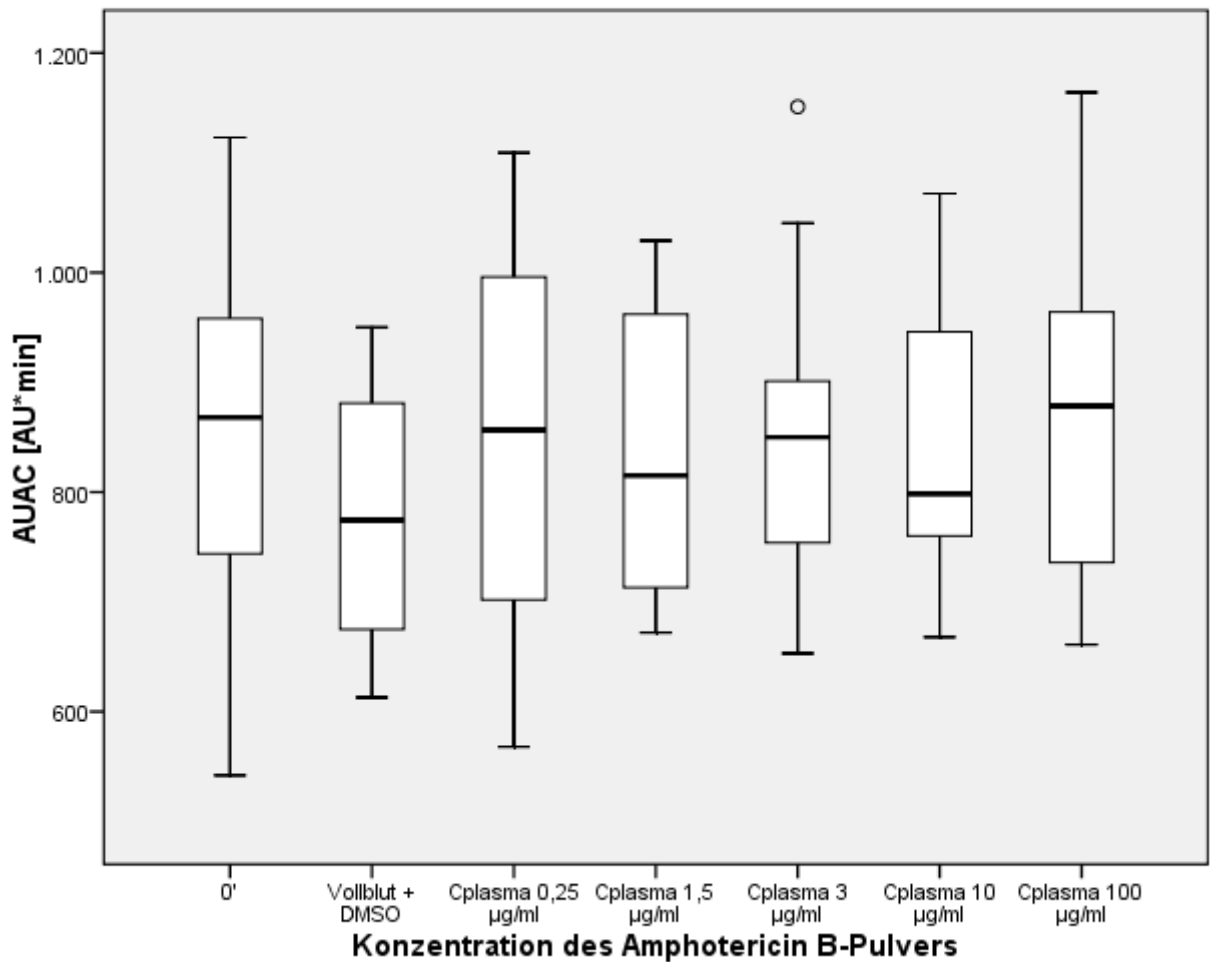


Abbildung 11: Darstellung der AUAC (*Area under the aggregation curve*) nach Inkubation mit in DMSO und Glucose aufgelöstem Amphotericin B-Pulver.

p=0,267 (Friedman-ANOVA, n.s.).

0' (Kontrollproben von Vollblut ohne Zugabe von Medikamenten), Vollblut + DMSO (Vollblut versetzt mit Dimethylsulfoxid), Cplasma (Plasmakonzentration)

Tabelle 10 und Abbildung 12 zeigen den Effekt des Amphotericin B-Pulvers auf die Thrombozytenfunktion bei Aktivierung der Thrombozytenaggregation mit Thrombin receptor activating peptide 6 (TRAP-6). Es zeigte sich keine signifikante Veränderung der AUAC-Werte (*Area under the aggregation curve*) bei steigenden Konzentrationen des Antimykotikums ($p=0,083$).

	TRAP-6						
	0'	Blut+DMSO	Cplasma 0,25 µg/ml	Cplasma 1,5 µg/ml	Cplasma 3 µg/ml	Cplasma 10 µg/ml	Cplasma 100 µg/ml
Mittelwert	1000	947	933	1014	918	1046	970
Median	964	935	891	969	917	1040	961
SD	171	213	127	153	112	168	147
SEM	54	67	40	48	35	53	47
95% CI min	877	795	841	904	838	925	864
95% CI max	1122	1099	1024	1123	998	1166	1075
Minimum	793	650	773	816	747	838	705
Maximum	1329	1396	1175	1339	1076	1364	1225

Tabelle 10: AUAC (*Area under the aggregation curve*) (in AU*min) als Endpunkt der Thrombozytenaggregation nach Inkubation mit in DMSO und Glucose aufgelöstem Amphotericin B-Pulver. Dargestellt ist die deskriptive Statistik für 10 Probanden nach Zugabe von Thrombin receptor activating peptide 6 (TRAP-6).

$p=0,083$ (Friedman-ANOVA, n.s.).

SD (Standardabweichung), SEM (Standardfehler des Mittelwertes), 95% CI min (untere Grenze des 95% Konfidenzintervalls), 95% CI max (obere Grenze des 95% Konfidenzintervalls), 0' (Kontrollproben von Vollblut ohne Zugabe von Medikamenten), Blut+DMSO (Vollblut versetzt mit Dimethylsulfoxid), Cplasma (Plasmakonzentration)

Amphotericin B-Pulver, Aktivator: TRAP-6

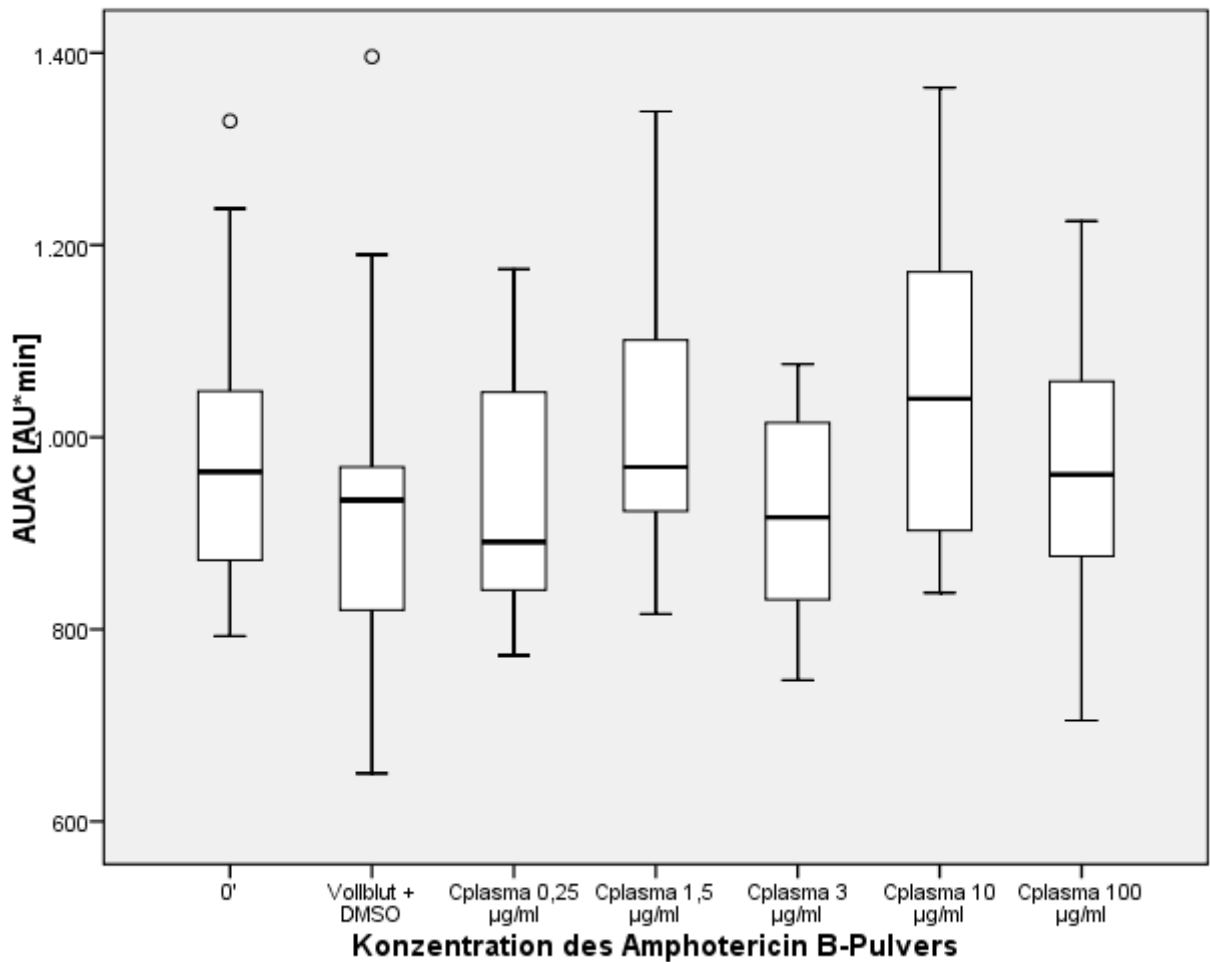


Abbildung 12: Darstellung der AUAC (*Area under the aggregation curve*) nach Inkubation mit in DMSO und Glucose aufgelöstem Amphotericin B-Pulver.

p=0,083 (Friedman-ANOVA, n.s.).

0' (Kontrollproben von Vollblut ohne Zugabe von Medikamenten), Vollblut + DMSO (Vollblut versetzt mit Dimethylsulfoxid), Cplasma (Plasmakonzentration)

3.2 Triazol-Antimykotika

3.2.1 Fluconazol

Tabelle 11 und Abbildung 13 zeigen den Effekt des Triazol-Antimykotikums Fluconazol auf die Thrombozytenaggregation.

Sowohl bei einer Aktivierung der Thrombozytenaggregation mit Adenosindiphosphat (ADP) als auch mit Thrombin receptor activating peptide 6 (TRAP-6) zeigte sich keine statistisch signifikante Veränderung der Thrombozytenaggregation ($p=0,2052$ für ADP und $p=0,6496$ für TRAP).

Lediglich bei Aktivierung mit Kollagen war eine signifikante Reduktion der Thrombozytenaggregation messbar ($p=0,0037$). Nach Korrektur für multiple Vergleiche zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen einzelnen Gruppen.

	ADP					Kollagen					TRAP-6				
	0'	Cmin	Cmax	x2 Cmax	x5 Cmax	0'	Cmin	Cmax	x2 Cmax	x5 Cmax	0'	Cmin	Cmax	x2 Cmax	x5 Cmax
Mittelwert	778	750	738	717	668	836	798	823	715	798	1050	1035	1061	1046	1067
Median	795	784	748	752	703	845	852	896	731	825	1050	992	1084	1044	1075
SD	179	146	219	239	215	114	134	188	169	194	166	135	173	146	160
SEM	57	46	69	76	68	36	42	59	54	61	52	43	55	46	50
95% CI min	650	646	582	546	514	754	703	689	594	659	931	938	937	941	953
95% CI max	906	854	894	888	822	917	894	958	836	937	1168	1132	1185	1150	1181
Minimum	510	421	396	248	199	659	561	490	353	469	738	867	682	761	694
Maximum	1063	908	1092	984	920	1027	933	1034	890	1163	1285	1301	1332	1292	1316

Tabelle 11: AUAC (Area under the aggregation curve) (in AU*min) als Endpunkt der Thrombozytenaggregation nach Inkubation mit Fluconazol. Dargestellt ist die deskriptive Statistik für 10 Probanden nach Zugabe von Adenosindiphosphat (ADP), Kollagen und Thrombin receptor activating peptide 6 (TRAP-6). Es wurde keine Versuchsreihe zur Prüfung eines Lösungsmittels durchgeführt, da Fluconazol mit 0,9%igem Natriumchlorid verdünnt wurde, welches ohnehin vor jeder Messung dem Blut zugefügt wurde.

$p=0,2052$ für ADP (n.s.), $p=0,0037$ für Kollagen (signifikant) und $p=0,6496$ für TRAP-6 (n.s.) (Friedman-ANOVA). Keine Vergleiche waren signifikant mit Dunn's post-test.

SD (Standardabweichung), SEM (Standardfehler des Mittelwertes), 95% CI min (untere Grenze des 95% Konfidenzintervalls), 95% CI max (obere Grenze des 95% Konfidenzintervalls), 0' (Kontrollproben von Vollblut ohne Zugabe von Medikamenten), Cmin (minimale Konzentration), Cmax (maximale Konzentration), x2 Cmax (doppelte maximale Konzentration), x5 Cmax (fünffache maximale Konzentration)

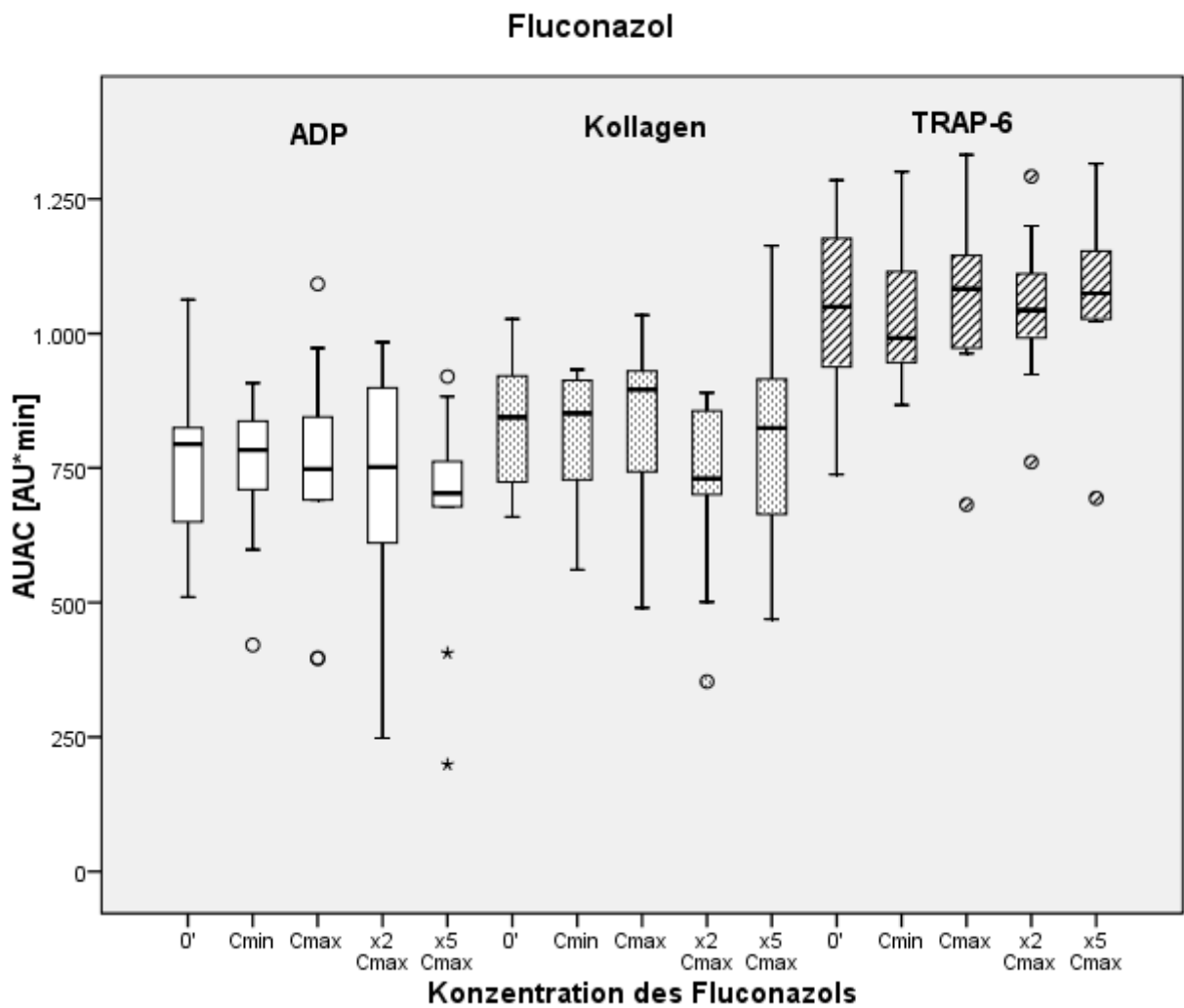


Abbildung 13: Darstellung der AUAC (*Area under the aggregation curve*) nach Inkubation mit Fluconazol.

$p=0,2052$ für ADP (n.s.), $p=0,0037$ für Kollagen (signifikant) und $p=0,6496$ für TRAP-6 (n.s.) (Friedman-ANOVA). Keine Vergleiche waren signifikant mit Dunn's post-test.

0' (Kontrollproben von Vollblut ohne Zugabe von Medikamenten), Cmin (minimale Konzentration), Cmax (maximale Konzentration), x2 Cmax (doppelte maximale Konzentration), x5 Cmax (fünffache maximale Konzentration).

3.2.2 Itraconazol

Tabelle 12 und Abbildung 14 zeigen den Effekt des Antimykotikums Itraconazol auf die AUAC (*Area under the aggregation curve*) als Parameter für die Thrombozytenaggregation.

Im Gegensatz zu einem nahezu signifikanten Signal für Adenosindiphosphat (ADP; $p=0,0527$) zeigten sich für Kollagen und Thrombin receptor activating peptide (TRAP) keine signifikante Veränderung der Thrombozytenaggregation bei verschiedenen Konzentrationen des Antimykotikums im Vergleich zu den Referenzwerten von Vollblut ($p=0,1468$ für Kollagen und $p=0,5379$ für TRAP-6).

	ADP					Kollagen					TRAP-6				
	0'	Cmin	Cmax	x2 Cmax	x5 Cmax	0'	Cmin	Cmax	x2 Cmax	x5 Cmax	0'	Cmin	Cmax	x2 Cmax	x5 Cmax
Mittelwert	775	692	719	677	677	882	823	833	872	775	1090	1082	1061	1085	1023
Median	784	766	725	727	719	930	834	849	889	798	1066	1069	1119	1093	1072
SD	169	183	172	154	200	171	143	167	149	235	195	200	216	104	182
SEM	53	58	54	49	63	54	45	53	47	74	62	63	68	33	58
95% CI min	654	561	596	567	534	759	720	713	766	606	950	939	907	1010	893
95% CI max	896	823	842	788	820	1004	925	952	979	943	1230	1225	1216	1159	1153
Minimum	518	367	429	337	287	515	478	565	603	334	738	669	670	871	634
Maximum	1017	951	1016	831	920	1083	970	1084	1045	1072	1400	1378	1334	1208	1212

Tabelle 12: AUAC (*Area under the aggregation curve*) (in AU*min) als Endpunkt der Thrombozytenaggregation nach Inkubation mit Itraconazol. Dargestellt ist die deskriptive Statistik für 10 Probanden nach Zugabe von Adenosindiphosphat (ADP), Kollagen und Thrombin receptor activating peptide 6 (TRAP-6). Es wurde keine Versuchsreihe zur Prüfung eines Lösungsmittels durchgeführt, da Itraconazol mit 0,9%igem Natriumchlorid verdünnt wurde, welches ohnehin vor jeder Messung dem Blut zugefügt wurde.

p=0,0527 für ADP, p=0,1468 für Kollagen, p=5379 für TRAP-6 (Friedman-ANOVA, n.s.).

SD (Standardabweichung), SEM (Standardfehler des Mittelwertes), 95% CI min (untere Grenze des 95% Konfidenzintervalls), 95% CI max (obere Grenze des 95% Konfidenzintervalls), 0' (Kontrollproben von Vollblut ohne Zugabe von Medikamenten), Cmin (minimale Konzentration), Cmax (maximale Konzentration), x2 Cmax (doppelte maximale Konzentration), x5 Cmax (fünffache maximale Konzentration)

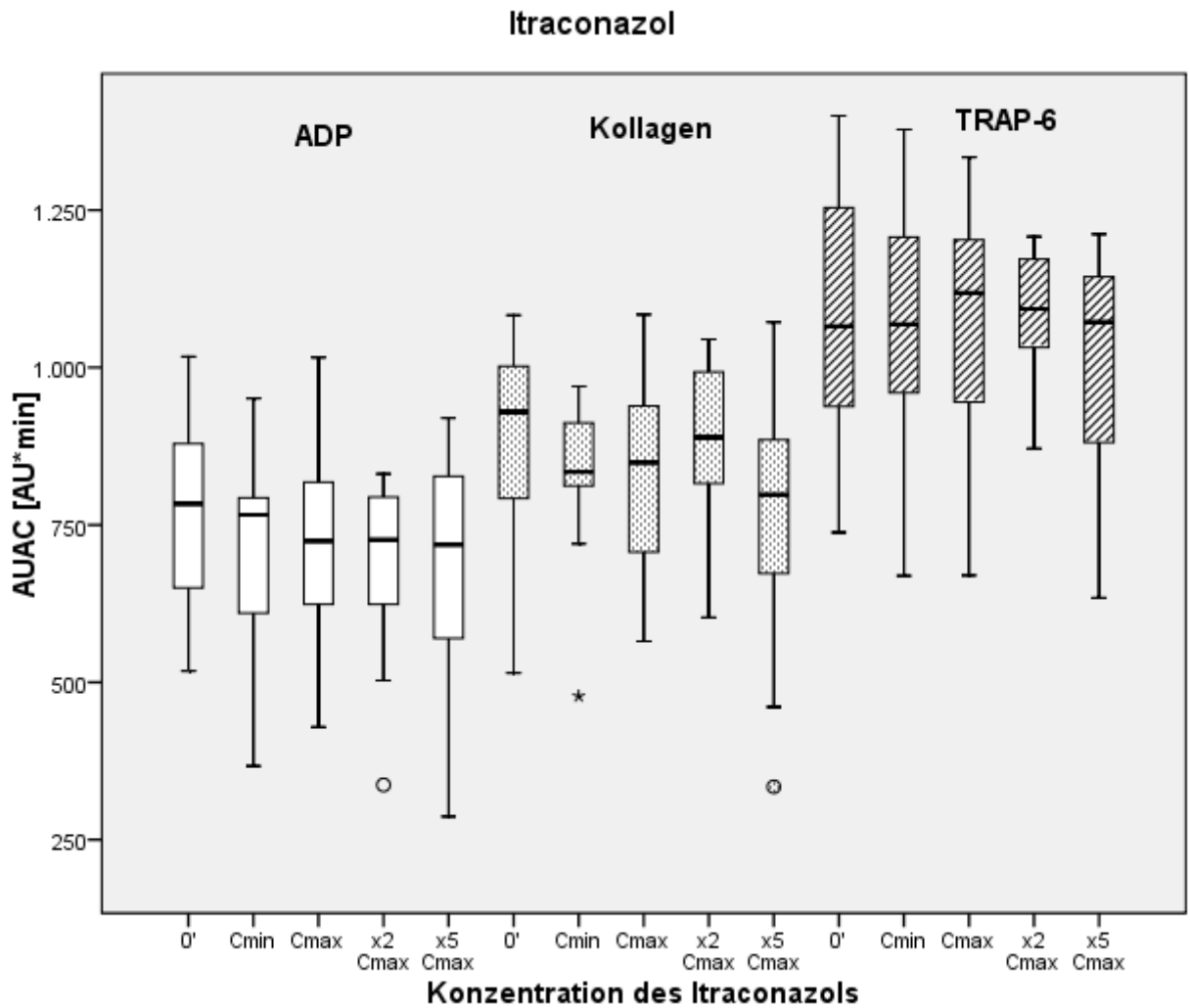


Abbildung 14: Darstellung der AUAC (*Area under the aggregation curve*) nach Inkubation mit Itraconazol

$p=0,0527$ für ADP, $p=0,1468$ für Kollagen, $p=5379$ für TRAP-6 (Friedman-ANOVA, n.s.).

0' (Kontrollproben von Vollblut ohne Zugabe von Medikamenten), Cmin (minimale Konzentration), Cmax (maximale Konzentration), x2 Cmax (doppelte maximale Konzentration), x5 Cmax (fünffache maximale Konzentration).

3.2.3 Voriconazol

Tabelle 13 und Abbildung 15 zeigen den Effekt des Triazol-Antimykotikums Voriconazol auf die Thrombozytenaggregation.

Lediglich bei Aktivierung der Thrombozytenaggregation mit Adenosindiphosphat (ADP) war eine signifikante Reduktion der Thrombozytenaggregation bei steigenden Konzentrationen des Antimykotikums messbar ($p=0,0447$). Nach Korrektur für multiple Vergleiche zeigten sich aber keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen einzelnen Gruppen.

Sowohl bei einer Aktivierung der Thrombozytenaggregation mit Kollagen als auch mit Thrombin receptor activating peptide 6 (TRAP-6) zeigte sich keine statistisch signifikante Veränderung der Thrombozytenaggregation ($p=0,2102$ für Kollagen und $p=0,0917$ für TRAP).

	ADP						Kollagen						TRAP-6					
	0'	Blut+Aqua	Cmin	Cmax	x2 Cmax	x5 Cmax	0'	Blut+Aqua	Cmin	Cmax	x2 Cmax	x5 Cmax	0'	Blut+Aqua	Cmin	Cmax	x2 Cmax	x5 Cmax
Mittelwert	779	672	690	698	720	680	859	816	857	797	836	806	1084	1011	971	1007	1073	1048
Median	799	741	723	730	760	720	892	807	901	830	836	826	1066	1018	1007	1035	1117	1080
SD	169	178	158	140	187	126	172	158	172	200	195	125	200	209	157	206	199	166
SEM	53	56	50	44	59	40	54	50	54	63	62	39	63	66	50	65	63	52
95% CI min	658	545	577	598	587	590	737	703	734	654	697	717	941	861	859	859	930	929
95% CI max	900	799	804	798	854	770	982	929	980	940	975	896	1227	1160	1083	1154	1215	1166
Minimum	518	415	376	453	362	416	515	590	543	446	477	577	738	644	684	535	730	751
Maximum	1017	859	843	846	982	816	1083	1050	1040	1053	1188	981	1400	1259	1141	1204	1298	1231

Tabelle 13: AUAC (*Area under the aggregation curve*) (in AU*min) als Endpunkt der Thrombozytenaggregation nach Inkubation mit Voriconazol. Dargestellt ist die deskriptive Statistik für 10 Probanden nach Zugabe von Adenosindiphosphat (ADP), Kollagen und Thrombin receptor activating peptide 6 (TRAP-6).

p=0,0447 für ADP (signifikant), p=0,2102 für Kollagen (n.s.) und p=0,0917 für TRAP-6 (n.s.) (Friedman-ANOVA). Keine Vergleiche waren signifikant mit Dunn's post-test.

SD (Standardabweichung), SEM (Standardfehler des Mittelwertes), 95% CI min (untere Grenze des 95% Konfidenzintervalls), 95% CI max (obere Grenze des 95% Konfidenzintervalls), 0' (Kontrollproben von Vollblut ohne Zugabe von Medikamenten), Blut+Aqua (Vollblut mit Zugabe von Aqua dest.), Cmin (minimale Konzentration), Cmax (maximale Konzentration), x2 Cmax (doppelte maximale Konzentration), x5 Cmax (fünffache maximale Konzentration)

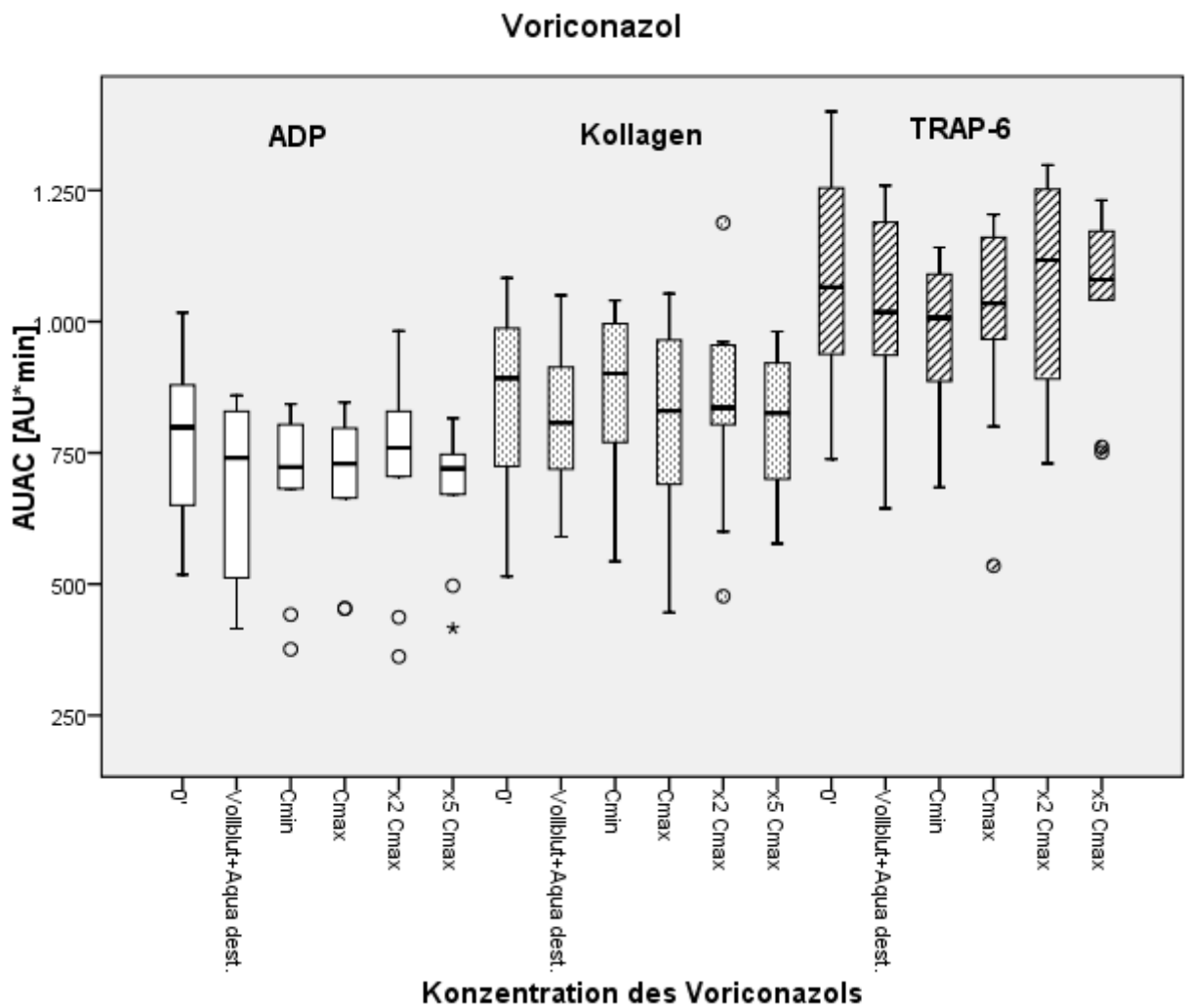


Abbildung 15: Darstellung der AUAC (*Area under the aggregation curve*) nach Inkubation mit Voriconazol.

$p=0,0447$ für ADP (signifikant), $p=0,2102$ für Kollagen (n.s.) und $p=0,0917$ für TRAP-6 (n.s.) (Friedman-ANOVA). Keine Vergleiche waren signifikant mit Dunn's post-test.

0' (Kontrollproben von Vollblut ohne Zugabe von Medikamenten), 5% Glucose (Vollblut mit Zugabe von 5%iger Glucose), Cmin (minimale Konzentration), Cmax (maximale Konzentration), x2 Cmax (doppelte maximale Konzentration), x5 Cmax (fünffache maximale Konzentration).

3.3 Flucytosin

Tabelle 14 und Abbildung 16 ist zu entnehmen, dass sich sowohl für Aktivierung der Thrombozytenaggregation mit Adenosindiphosphat (ADP), als auch für Kollagen und Thrombin receptor activating peptide (TRAP) keine statistisch signifikante Veränderung der Thrombozytenaggregation nach Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen des Antimykotikums Flucytosin zeigte ($p=0,2998$ für ADP, $p=0,0731$ für Kollagen, $p=0,3037$ für TRAP).

	ADP					Kollagen					TRAP-6				
	0'	Cmin	Cmax	x2 Cmax	x5 Cmax	0'	Cmin	Cmax	x2 Cmax	x5 Cmax	0'	Cmin	Cmax	x2 Cmax	x5 Cmax
Mittelwert	721	698	725	722	753	889	784	813	838	790	1067	1046	1010	1047	926
Median	730	742	723	723	783	876	751	873	803	765	1080	1029	954	1032	995
SD	103	155	181	132	179	144	260	267	204	198	92	133	152	165	245
SEM	32	49	57	42	57	46	82	84	65	63	29	42	48	52	78
95% CI min	647	587	595	628	625	785	598	623	692	648	1002	951	901	929	751
95% CI max	794	809	854	816	881	992	970	1004	984	931	1133	1141	1118	1165	1102
Minimum	504	420	439	552	454	703	219	215	545	500	912	826	840	743	331
Maximum	835	929	1022	914	1023	1130	1118	1109	1144	1084	1226	1328	1285	1276	1253

Tabelle 14: AUAC (Area under the aggregation curve) (in AU*min) als Endpunkt der Thrombozytenaggregation nach Inkubation mit Flucytosin. Dargestellt ist die deskriptive Statistik für 10 Probanden nach Zugabe von Adenosindiphosphat (ADP), Kollagen und Thrombin receptor activating peptide 6 (TRAP-6). Es wurde keine Versuchsreihe zur Prüfung eines Lösungsmittels durchgeführt, da Flucytosin mit 0,9%igem Natriumchlorid verdünnt wurde, welches ohnehin vor jeder Messung dem Blut zugefügt wurde.

p=0,2998 für ADP, p=0,0731 für Kollagen, p=3037 für TRAP-6 (Friedman-ANOVA, n.s.).

SD (Standardabweichung), SEM (Standardfehler des Mittelwertes), 95% CI min (untere Grenze des 95% Konfidenzintervalls), 95% CI max (obere Grenze des 95% Konfidenzintervalls), 0' (Kontrollproben von Vollblut ohne Zugabe von Medikamenten), Cmin (minimale Konzentration), Cmax (maximale Konzentration), x2 Cmax (doppelte maximale Konzentration), x5 Cmax (fünffache maximale Konzentration)

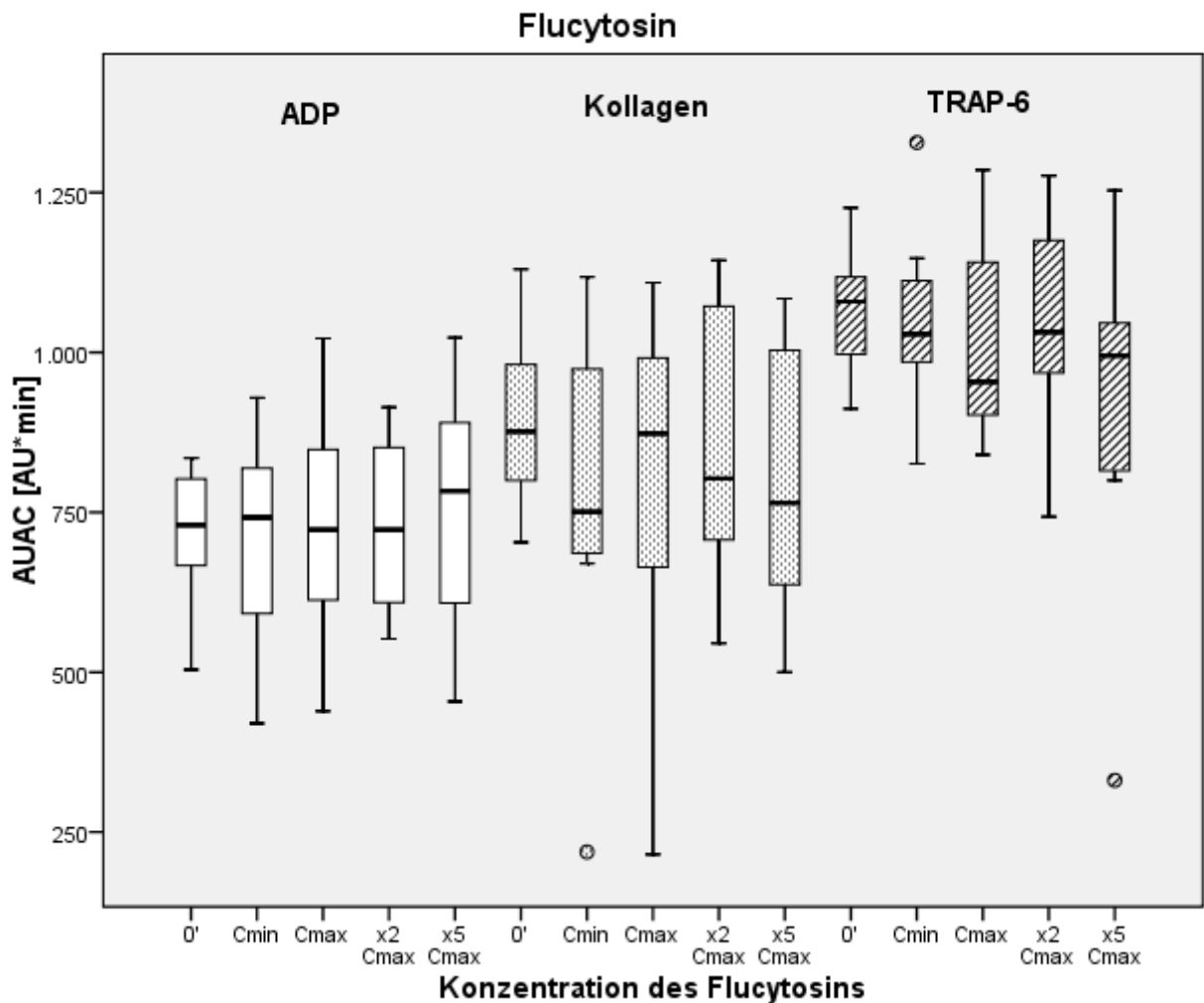


Abbildung 16: Darstellung der AUAC (*Area under the aggregation curve*) nach Inkubation mit Flucytosin. Dargestellt ist die deskriptive Statistik für 10 Probanden nach Zugabe von Adenosindiphosphat (ADP), Kollagen und Thrombin receptor activating peptide 6 (TRAP-6).

$p=0,2998$ für ADP, $p=0,0731$ für Kollagen, $p=3037$ für TRAP-6 (Friedman-ANOVA, n.s.).

0' (Kontrollproben von Vollblut ohne Zugabe von Medikamenten), Cmin (minimale Konzentration), Cmax (maximale Konzentration), x2 Cmax (doppelte maximale Konzentration), x5 Cmax (fünffache maximale Konzentration).

3.4 Echinocandin-Antimykotika

3.4.1 Caspofungin

Tabelle 15 und Abbildung 17 zeigen den Effekt des Echinocandins Caspofungin auf die Thrombozytenaggregation im Vollblut.

Sowohl für Adenosindiphosphat (ADP), als auch für Kollagen und Thrombin receptor activating peptide (TRAP) zeigte sich keine statistisch signifikante Veränderung der Thrombozytenaggregation bei verschiedenen Konzentrationen des Antimykotikums im Vergleich zu den Referenzwerten von Vollblut ($p=0,7818$ für ADP, $p=0,0701$ für Kollagen, $p=0,2114$ für TRAP-6).

	ADP					Kollagen					TRAP-6				
	0'	Cmin	Cmax	x2 Cmax	x5 Cmax	0'	Cmin	Cmax	x2 Cmax	x5 Cmax	0'	Cmin	Cmax	x2 Cmax	x5 Cmax
Mittelwert	836	828	884	813	801	940	844	928	906	906	1171	1098	1114	1179	1064
Median	933	857	879	831	826	962	831	973	953	921	1216	1117	1138	1208	1066
SD	221	183	246	231	214	165	148	138	188	170	160	133	178	261	168
SEM	70	58	78	73	68	52	47	44	59	54	50	42	56	83	53
95% CI min	677	697	708	648	648	822	738	829	772	784	1057	1003	986	993	944
95% CI max	994	959	1060	978	954	1058	949	1027	1041	1028	1286	1193	1241	1366	1184
Minimum	356	358	441	375	384	640	545	680	522	595	826	859	841	871	834
Maximum	1022	1005	1321	1126	1110	1230	1102	1150	1156	1114	1326	1251	1407	1660	1333

Tabelle 15: AUAC (*Area under the aggregation curve*) (in AU*min) als Endpunkt der Thrombozytenaggregation nach Inkubation mit Caspofungin. Dargestellt ist die deskriptive Statistik für 10 Probanden nach Zugabe von Adenosindiphosphat (ADP), Kollagen und Thrombin receptor activating peptide 6 (TRAP-6). Es wurde keine Versuchsreihe zur Prüfung eines Lösungsmittels durchgeführt, da Caspofungin mit 0,9%igem Natriumchlorid verdünnt wurde, welches ohnehin vor jeder Messung dem Blut zugefügt wurde.

p=0,7818 für ADP, p=0,0701 für Kollagen, p=0,2114 für TRAP-6 (Friedman-ANOVA, n.s.).

SD (Standardabweichung), SEM (Standardfehler des Mittelwertes), 95% CI min (untere Grenze des 95% Konfidenzintervalls), 95% CI max (obere Grenze des 95% Konfidenzintervalls), 0' (Kontrollproben von Vollblut ohne Zugabe von Medikamenten), Cmin (minimale Konzentration), Cmax (maximale Konzentration), x2 Cmax (doppelte maximale Konzentration), x5 Cmax (fünffache maximale Konzentration)

Caspofungin

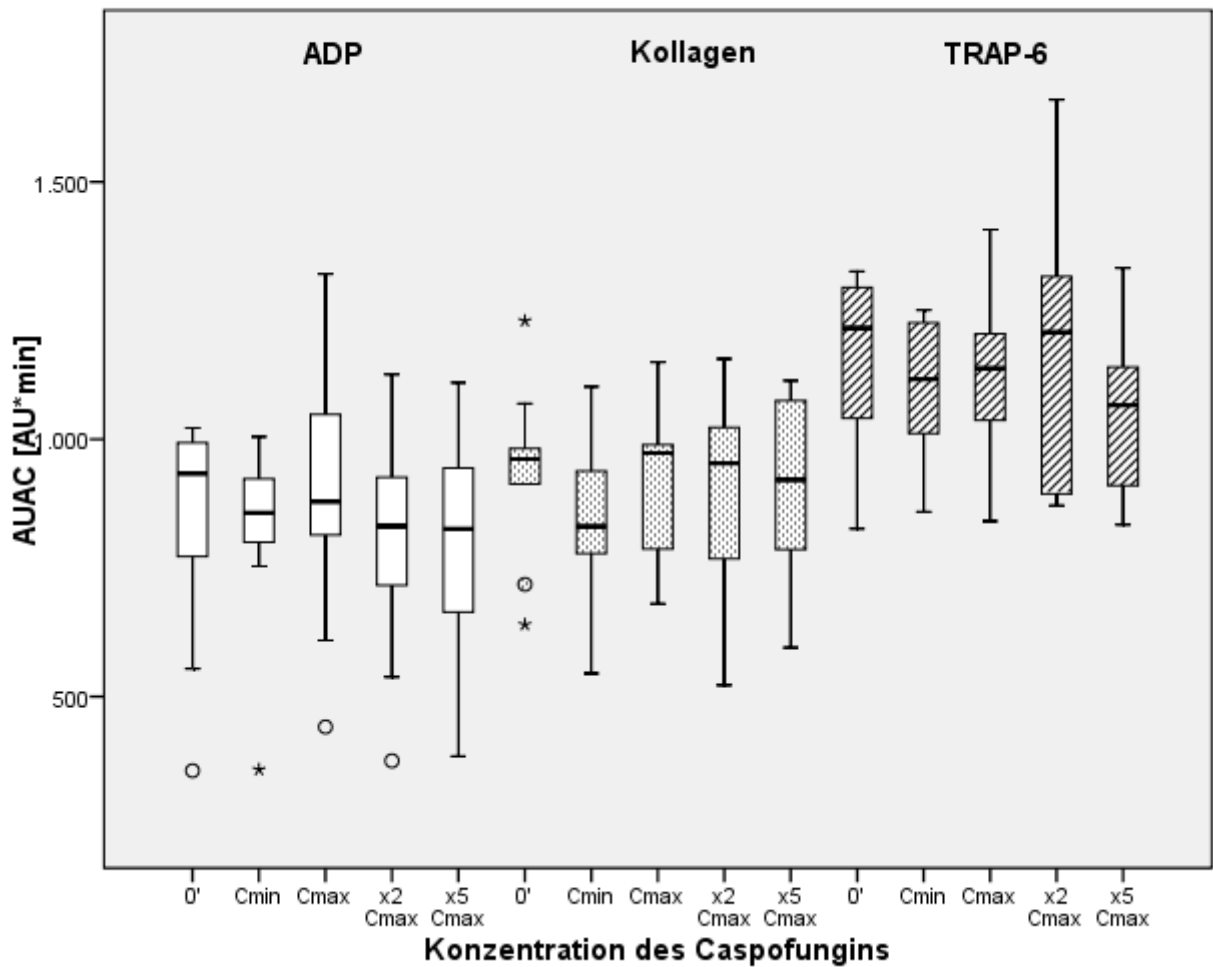


Abbildung 17: Darstellung der AUAC (*Area under the aggregation curve*) nach Inkubation mit Caspofungin. Dargestellt ist die deskriptive Statistik für 10 Probanden nach Zugabe von Adenosindiphosphat (ADP), Kollagen und Thrombin receptor activating peptide 6 (TRAP-6).

$p=0,7818$ für ADP, $p=0,0701$ für Kollagen, $p=0,2114$ für TRAP-6 (Friedman-ANOVA, n.s.).

0' (Kontrollproben von Vollblut ohne Zugabe von Medikamenten), Cmin (minimale Konzentration), Cmax (maximale Konzentration), x2 Cmax (doppelte maximale Konzentration), x5 Cmax (fünffache maximale Konzentration).

3.4.2 Anidulafungin

Tabelle 16 und Abbildung 18 zeigen den Effekt des Echinocandins Anidulafungin auf die Thrombozytenaggregation.

Sowohl bei einer Aktivierung der Thrombozytenaggregation mit Adenosindiphosphat (ADP), als auch mit Kollagen und Thrombin receptor activating peptide (TRAP) konnte keine statistisch signifikante Veränderung der Thrombozytenaggregation bei verschiedenen Konzentrationen des Antimykotikums im Vergleich zu den Referenzwerten von Vollblut beobachtet werden ($p=0,4281$ für ADP, $p=0,4060$ für Kollagen und $p=0,4281$ für TRAP).

	ADP					Kollagen					TRAP-6				
	0'	Cmin	Cmax	x2 Cmax	x5 Cmax	0'	Cmin	Cmax	x2 Cmax	x5 Cmax	0'	Cmin	Cmax	x2 Cmax	x5 Cmax
Mittelwert	836	767	775	806	779	940	873	862	875	808	1171	1148	1077	1115	1071
Median	933	788	810	833	794	962	908	870	923	825	1216	1092	1119	1076	1066
SD	221	148	213	174	210	165	153	122	192	207	160	251	164	205	189
SEM	70	47	67	55	66	52	48	38	61	66	50	79	52	65	60
95% CI min	677	661	622	681	629	822	764	775	738	660	1057	969	960	968	936
95% CI max	994	872	927	931	929	1058	982	949	1012	957	1286	1328	1195	1261	1206
Minimum	356	405	378	483	394	640	631	625	576	511	826	834	870	900	793
Maximum	1022	918	1022	1010	1159	1230	1066	1026	1181	1129	1326	1708	1350	1472	1417

Tabelle 16: AUAC (Area under the aggregation curve) (in AU*min) als Endpunkt der Thrombozytenaggregation nach Inkubation mit Anidulafungin. Dargestellt ist die deskriptive Statistik für 10 Probanden nach Zugabe von Adenosindiphosphat (ADP), Kollagen und Thrombin receptor activating peptide 6 (TRAP-6). Es wurde keine Versuchsreihe zur Prüfung eines Lösungsmittels durchgeführt, da Anidulafungin mit 0,9%igem Natriumchlorid verdünnt wurde, welches ohnehin vor jeder Messung dem Blut zugefügt wurde.

p=0,4281 für ADP, p=0,4060 für Kollagen, p=0,4281 für TRAP-6 (Friedman-ANOVA, n.s.).

SD (Standardabweichung), SEM (Standardfehler des Mittelwertes), 95% CI min (untere Grenze des 95% Konfidenzintervalls), 95% CI max (obere Grenze des 95% Konfidenzintervalls), 0' (Kontrollproben von Vollblut ohne Zugabe von Medikamenten), Cmin (minimale Konzentration), Cmax (maximale Konzentration), x2 Cmax (doppelte maximale Konzentration), x5 Cmax (fünffache maximale Konzentration)

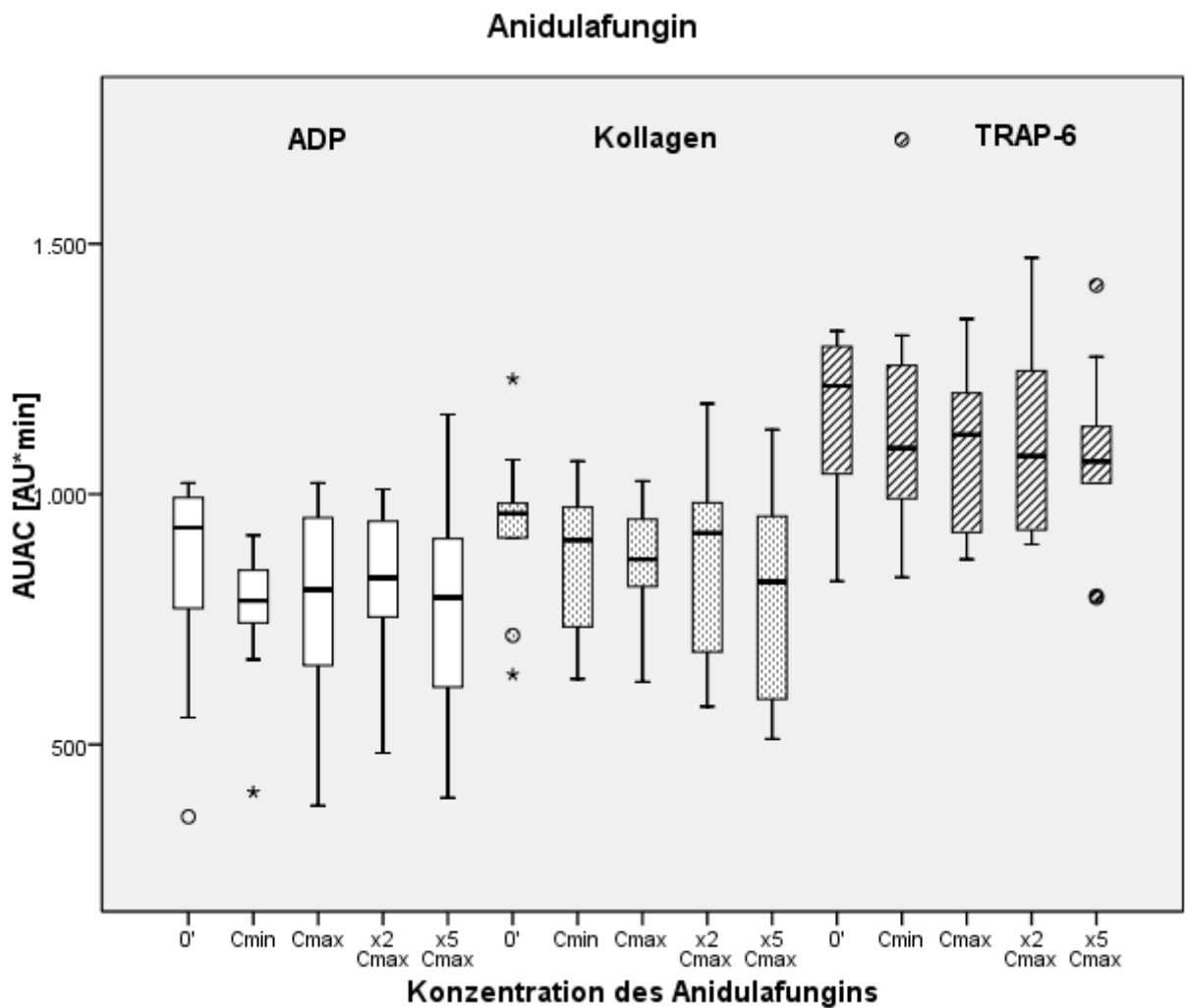


Abbildung 18: Darstellung der AUAC (*Area under the aggregation curve*) nach Inkubation mit Anidulafungin. Dargestellt ist die deskriptive Statistik für 10 Probanden nach Zugabe von Adenosindiphosphat (ADP), Kollagen und Thrombin receptor activating peptide 6 (TRAP-6).

$p=0,4281$ für ADP, $p=0,4060$ für Kollagen, $p=0,4281$ für TRAP-6 (Friedman-ANOVA, n.s.).

0' (Kontrollproben von Vollblut ohne Zugabe von Medikamenten), Cmin (minimale Konzentration), Cmax (maximale Konzentration), x2 Cmax (doppelte maximale Konzentration), x5 Cmax (fünffache maximale Konzentration).

3.5 Zusammenfassung der Ergebnisse der getesteten Antimykotika

	ADP	Kollagen	TRAP-6
Amphotericin B Deoxycholat	-	-	-
Amphotericin B Lipid Complex	+	+	+
Liposomales Amphotericin B	+	+	+
Amphotericin B Colloidal Dispersion	+	+	+
Amphotericin B in DMSO	-	-	-
Liposomales Nystatin	+	+	+
Fluconazol	-	+	-
Itraconazol	+	-	-
Voriconazol	+	-	-
Flucytosin	-	-	-
Caspofungin	-	-	-
Anidulafungin	-	-	-

Tabelle 17: Übersichtstabelle der Ergebnisse der getesteten Antimykotika

Dargestellt ist eine Zusammenfassung der Ergebnisse dieser Studie. Ein „+“ bedeutet, dass das jeweilige Medikament in den Tests mit dem jeweiligen Aktivator ADP, Kollagen oder TRAP-6 (Thrombin receptor activating peptide 6) einen signifikanten Effekt auf die Thrombozytenaggregation gezeigt hat. Ein „-“ bedeutet, dass die Zugabe des jeweiligen Medikamentes keine signifikante Änderung der AUAC-Werte (*Area under the aggregation curve*) bewirkt hat.

ADP (Adenosindiphosphat), TRAP-6 (Thrombin receptor activating peptide 6), DAMB (Amphotericin B Deoxycholat), ABLC (Amphotericin B Lipid Complex), LAMB (liposomales Amphotericin B), ABCD (Amphotericin B Colloidal Dispersion)

3.6 Auf Acetylsalicylsäure eingestellte Patienten

Für diese Studie wurden die Multiplate®-Testergebnisse von 15 mit Acetylsalicylsäure behandelten Patienten erfasst, um anhand einer „Positivkontrolle“ zu zeigen, wie sich Medikamentenwirkungen im gewählten Testsystem darstellen.

Tabelle 18 und Abbildung 19 zeigen Messwerte der *Area under the aggregation curve* (AUAC) von 15 Patienten, die täglich 100 mg Acetylsalicylsäure einnehmen. Den Daten ist zu entnehmen, dass die Thrombozytenaggregation nach Aktivierung der Thrombozyten mit Kollagen und mit Arachidonsäure deutlich reduziert ist, während die Aktivierungswege mittels Adenosindiphosphat und Thrombin receptor activating peptide 6 (TRAP-6) von Acetylsalicylsäure nicht beeinflusst werden.

Bei dem AspiASA-Test wird zu einer Vollblutprobe zunächst Acetylsalicylsäure in vitro hinzugegeben und anschließend die Thrombozytenaggregation mit Arachidonsäure aktiviert. Mithilfe dieses Tests kann die durch optimal dosierte Medikamenteneinnahme erreichbare Thrombozytenaggregationshemmung untersucht werden. Zeigen sich bei Patienten im AspiASA-Test deutlich geringere AUAC-Werte als im Aspi-Test deutet dies auf eine nicht optimal effektive Thrombozytenaggregationshemmung hin, z.B. durch zu geringe Dosierung oder unregelmäßige Einnahme von Acetylsalicylsäure.

	ADP	Kollagen	TRAP-6	Aspi	AspiASA
Mittelwert	633	245	994	125	79
Median	625	235	975	126	48
SD	213	108	167	59	72
SEM	59	30	43	15	19
95% CI min	504	180	901	92	40
95% CI max	762	310	1086	158	119
Minimum	255	77	785	13	7
Maximum	905	482	1336	224	274

Tabelle 18: Darstellung der Messwerte der AUAC (*Area under the aggregation curve*) (in AU*min) von 15 Patienten, die täglich 100 mg Acetylsalicylsäure einnehmen. Zeitraum der Messungen: 29.10.2007 – 03.04.2008. n=15. Das Alter der Patienten reichte von 7,11 bis 23,2 Jahren, Mittelwert 14,11 Jahre.

ADP (Adenosindiphosphat), TRAP-6 (Thrombin receptor activating peptide 6), Aspi (Arachidonsäure), AspiASA (Zugabe von Acetylsalicylsäure zu der Vollblutprobe und anschließend Aktivierung der Thrombozyten mit Arachidonsäure)

SD (Standardabweichung), SEM (Standardfehler des Mittelwertes), 95% CI min (untere Grenze des 95% Konfidenzintervalls), 95% CI max (obere Grenze des 95% Konfidenzintervalls)

Auf Acetylsalicylsäure eingestellte Patienten

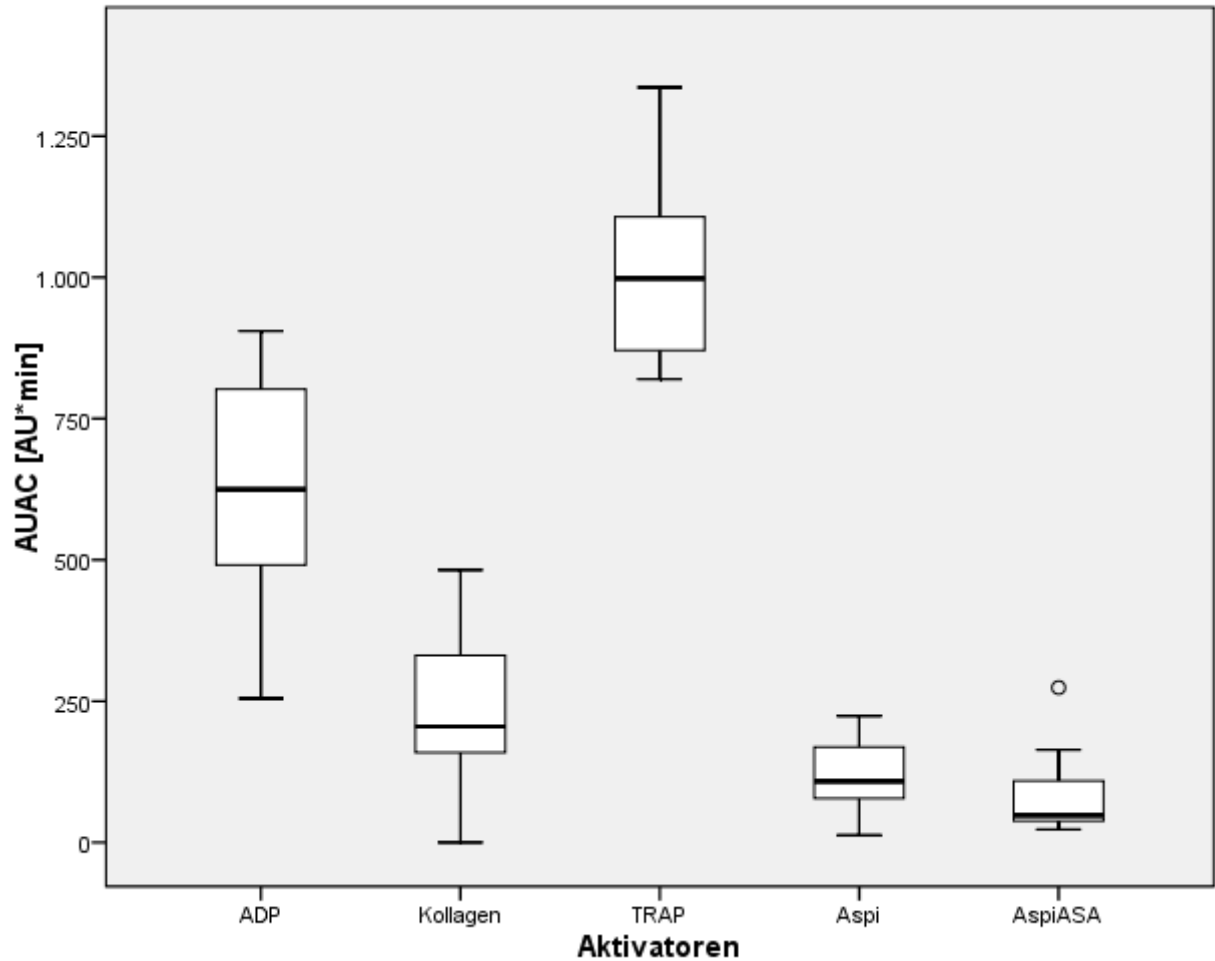


Abbildung 19: Darstellung der Messwerte der AUAC (*Area under the aggregation curve*) (in AU*min) von 15 Patienten, die täglich 100 mg Acetylsalicylsäure einnehmen. N=15.

ADP (Adenosindiphosphat), TRAP-6 (Thrombin receptor activating peptide 6), Aspi (Arachidonsäure), AspiASA (Zugabe von Acetylsalicylsäure zu der Vollblutprobe und anschließend Aktivierung der Thrombozyten mit Arachidonsäure)

3.7 Validierung

Es wurde eine Versuchsreihe zur Überprüfung der Präzision und Retest-Reliabilität der Multiplate®-Methode durchgeführt, um zu zeigen, inwieweit die gemessenen Daten bei Mehrfachmessungen an einem Tag und im Verlauf mehrerer Tage reproduzierbar sind. Dazu wurde einer Probandin an drei Tagen Blut abgenommen und es wurden jeweils für ADP, Kollagen und TRAP parallel an drei Messkanälen dreifach Messungen für Null-Werte und Werte nach Zugabe des GP IIb/IIIa-Rezeptorantagonisten Eptifibatid (Integrilin®) durchgeführt. Eptifibatid führt zu einer von ADP, Kollagen und TRAP unabhängigen Hemmung der Thrombozytenaggregation.

Die Tabellen 19-21 zeigen die Ergebnisse dieser Messreihen. Die ermittelten Werte für die Kontrollproben ohne Zugabe von Medikamenten lagen im Referenzbereich von 534-1220 AU*min für den Aktivator Adenosindiphosphat (ADP) und 459-1166 AU*min für Kollagen. Die Werte für Integrilin® lagen im erwünschten Zielbereich von 200-400 AU*min. Die Tests der Innersubjekteffekte vergleichen die drei Messwerte eines Tages untereinander. Sie ergaben für ADP und Kollagen jeweils nicht signifikante Ergebnisse. Auch die Tests der Zwischensubjekteffekte, welche die Messwerte der drei Tage miteinander vergleichen, ergaben für ADP und Kollagen keine signifikanten Ergebnisse.

Tabelle 21 zeigt die Ergebnisse nach Aktivierung mit TRAP. Es wird deutlich, dass die Null-Werte am ersten Tag etwas unterhalb des Referenzbereiches von 941-1563 AU*min lagen. Der Test der Innersubjekteffekte ergab mit $p=0,025$ und der Test der Zwischensubjekteffekte mit $p=0,006$ ein statistisch signifikantes Ergebnis. Für Integrilin® ergaben beide Tests kein statistisch signifikantes Ergebnis.

	ADP					
	0' an Tag 1	0' an Tag 2	0' an Tag 3	Integrilin® an Tag 1	Integrilin® an Tag 2	Integrilin® an Tag 3
Mittelwert	840	992	961	315	282	252
Median	848	990	980	335	297	240
SD	51	40	89	53	36	47
SEM	30	23	51	31	21	27
95% CI min	712	893	740	183	193	136
95% CI max	968	1091	1182	448	371	368
Minimum	785	953	864	255	241	213
Maximum	887	1033	1039	356	308	304

Tabelle 19: Darstellung der Ergebnisse der Validierung der Messmethode für den Aktivator ADP. Gemessen wurden jeweils Kontrollproben ohne Medikament und Proben mit Zugabe von Integrilin® zu einer Blutkonzentration von 0,25 µg/ml.

Der Test der Innersubjekteffekte ergab mit $p=0,132$ für die Kontrollproben ohne Medikament und mit $p=0,421$ für die Werte nach Zugabe von Integrilin® keine signifikanten Testergebnisse. Der Test der Zwischensubjekteffekte ergab mit $p=0,058$ für die Kontrollproben und mit $p=0,314$ für die Werte des Integrilins® ebenfalls keine statistisch signifikanten Ergebnisse.

0' (Kontrollproben von Vollblut ohne Zugabe von Medikamenten)

	Kollagen					
	0' an Tag 1	0' an Tag 2	0' an Tag 3	Integrilin® an Tag 1	Integrilin® an Tag 2	Integrilin® an Tag 3
Mittelwert	779	834	891	284	249	270
Median	801	838	939	281	250	270
SD	54	22	91	18	31	21
SEM	31	13	53	10	18	12
95% CI min	644	779	664	240	172	219
95% CI max	913	888	1118	328	326	321
Minimum	717	810	786	268	217	249
Maximum	818	853	949	303	279	290

Tabelle 20: Darstellung der Ergebnisse der Validierung der Messmethode für den Aktivator Kollagen. Gemessen wurden jeweils Kontrollproben ohne Medikament und Werte unter Zugabe von Integrilin® zu einer Blutkonzentration von 0,25 µg/ml.

Der Test der Innersubjekteffekte ergab mit $p=0,242$ für die Kontrollproben ohne Medikament und mit $p=0,274$ für die Werte nach Zugabe von Integrilin® keine signifikanten Testergebnisse. Der Test der

Zwischensubjekteffekte ergab mit $p=0,168$ für die Kontrollproben und mit $p=0,264$ für die Werte des Integrilins® ebenfalls keine statistisch signifikanten Ergebnisse.

0' (Kontrollproben von Vollblut ohne Zugabe von Medikamenten)

	TRAP-6					
	0' an Tag 1	0' an Tag 2	0' an Tag 3	Integrilin® an Tag 1	Integrilin® an Tag 2	Integrilin® an Tag 3
Mittelwert	909	1046	1143	373	299	391
Median	895	1047	1145	371	302	354
SD	33	5	90	9	52	69
SEM	19	3	52	5	30	40
95% CI min	827	1033	919	351	171	220
95% CI max	990	1058	1367	394	427	563
Minimum	885	1040	1052	365	246	349
Maximum	946	1050	1232	382	349	471

Tabelle 21: Darstellung der Ergebnisse der Validierung der Messmethode für den Aktivator TRAP-6. Gemessen wurden jeweils Kontrollproben ohne Medikament und Werte unter Zugabe von Integrilin® zu einer Blutkonzentration von $0,25 \mu\text{g/ml}$.

Der Test der Innersubjekteffekte ergab mit $p=0,025$ für die Kontrollproben ohne Medikament ein statistisch signifikantes Ergebnis und mit $p=0,063$ für die Werte nach Zugabe von Integrilin® kein signifikantes Testergebnis. Der Test der Zwischensubjekteffekte ergab ebenfalls mit $p=0,006$ für die Kontrollproben ein signifikantes Ergebnis, mit $p=0,134$ war das Ergebnis für die Werte des Integrilins® nicht statistisch signifikant.

0' (Kontrollproben von Vollblut ohne Zugabe von Medikamenten)

4. Diskussion

4.1 Pilzinfektionen

In den letzten drei Jahrzehnten hat das Auftreten invasiver opportunistischer Pilzinfektionen deutlich zugenommen (Fridkin and Jarvis 1996, Groll et al. 1996, Koch et al. 2004, Zupanić-Krmek and Nemet 2004), insbesondere bei Patienten mit hämatologischen Neoplasien (Abelson et al. 2005, Anaissie 1992, Bodey 1977, Funai et al. 1995, Pfaffenbach et al. 1994, Rosen et al. 2005, Saral 1991). Gründe für die Häufigkeitszunahme invasiver Pilzinfektionen sind die steigende Anzahl immunsupprimierter Patienten im Rahmen von Hochdosismethoden, Transplantationen, Neutropenie, Therapie mit Corticosteroiden, Antibiotikabehandlung, Malnutrition, HIV-Infektion sowie eine gestörte Hautbarriere bei Verbrennungen oder zentralen Venenkathetern (Bodey 1977, Chamilos et al. 2006, Fridkin and Jarvis 1996, López et al. 1998, Nucci and Colombo 2002, Zupanić-Krmek and Nemet 2004, Zupanić-Krmek et al. 2004). Wichtigster Risikofaktor für eine systemische Pilzinfektion ist eine prolongierte und schwere Neutropenie, (\geq sieben Tage mit einer absoluten Anzahl der neutrophilen Granulozyten unter $0,5 \times 10^9 / l$) (Nucci and Colombo 2002, O'Donnell et al. 1994, Pagano et al. 2001, Rosen et al. 2005, Samonis and Bafaloukos 1992, Zupanić-Krmek and Nemet 2004). Bei Patienten mit hämatologisch-onkologischen Erkrankungen sind auch graft-versus-host Reaktionen (GVHD) nach Knochenmarkstransplantationen mit einem erhöhten Risiko für invasive Pilzinfektionen verbunden (Castagnola et al. 2006, Chamilos et al. 2006, Meyers 1990, O'Donnell et al. 1994, Zupanić-Krmek and Nemet 2004).

Unter den Patienten mit hämatologisch-onkologischen Erkrankungen zeigen die Patienten mit akuten Leukämien die höchste Prävalenz von systemischen Pilzinfektionen, gefolgt von Patienten mit myelodysplastischem Syndrom, Non-Hodgkin Lymphomen, Hodgkin Lymphom und Plasmozytom (Groll et al. 1996, López et al. 1998, Pagano et al. 2006, Pfaffenbach et al. 1994, Rosen et al. 2005). Die große Bedeutung der systemischen Mykosen ergibt sich durch ihre hohe Mortalität. Nach Autopsiestudien sind bei über 70 % der Patienten mit invasiven Pilzinfektionen diese Mykosen eine unmittelbare Todesursache (Chamilos et al. 2006, Groll et al. 1996, Pfaffenbach et al. 1994).

Während die überwiegende Mehrzahl mikrobiologisch nachgewiesener opportunistischer Pilzinfektionen durch *Candida*- und *Aspergillus*-Arten ausgelöst sind (Anaissie 1992, Koch et al. 2004, López et al. 1998, Pagano et al. 2007, Pfaffenbach et al. 1994, Rosen et al. 2005, Tietz et al. 2001, Yeh et al. 2007), ist in den letzten Jahren ein Shift zu non-*albicans Candida* spp., non-*fumigatus Aspergillus* spp. und anderen, zuvor seltenen und häufig therapierefraktären Pilzregenern zu beobachten (Abelson et al. 2005, Fridkin and Jarvis 1996, Groll and Ritter 2005,

Martino and Subira 2002). Infektionen mit primär pathogenen Pilzen kommen vor allem in Nordamerika, Südamerika, Afrika und Asien vor. Zu diesen Mykosen gehören die Histoplasmose (Nordamerika, Afrika, Asien), Blastomykose (Nord- und Südamerika) und die Kokzidioidomykose (Südwesten von Nordamerika). In Europa werden diese Infektionen nur bei Rückkehrern aus den erwähnten Kontinenten diagnostiziert (Alexander et al. 1999).

4.1.1 *Candida* spp.

Candidainfektionen sind die häufigsten opportunistischen Pilzinfektionen. Sie entstehen endogen durch Invasion der Schleimhäute in Mundhöhle oder Darm (Nucci and Colombo 2002). Pathogenetisch und prognostisch sind lokale und disseminierte Candidainfektionen voneinander abzugrenzen. Die häufigste lokal begrenzte Infektion ist der Soor der Mundhöhle. Invasive Infektionen entstehen überwiegend als Autoinfektion bei bestehender Kolonisation. Eine durch Fungämie verursachte Sepsis ist dem klinischen Bild der bakteriellen Sepsis ähnlich. Neben der Ausbildung eines Sepsis-Syndroms kann die hämatogene Dissemination des Erregers in septischen Streuherden bzw. areaktiven Gewebnekrosen vor allem in Niere, Myokard, Leber, Milz, Lungen und ZNS mit entsprechenden Funktionsausfällen resultieren. Invasive Candidainfektionen haben bei Patienten mit neoplastischen Erkrankungen eine hohe Mortalität. Die Prognose einer Erkrankung verschlechtert sich durch eine Candidämie signifikant. Typische Komplikationen sind Endophthalmitis, Choreoretinitis, Hautläsionen, Osteomyelitis, Spondylodiszitis und Endokarditis. Die hepatolienale Candidiasis tritt vor allem bei Patienten mit akuten Leukämien auf (Alexander et al. 1999, Groll and Ritter 2005, Schwetz et al. 2007).

4.1.2 *Aspergillus* spp.

Aspergillen sind in der Natur weit verbreitet und werden nur bei gestörter Immunabwehr (langdauernde Neutropenie, hochdosierte Steroidbehandlungen) pathogen. Die Aspergillose ist eine klassische Inhalationsmykose. Erkrankungen der Lunge sowie der Nasennebenhöhlen stehen im Vordergrund, wobei es bei immunsupprimierten Patienten zu einer hämatogenen Aussaat in andere innere Organe mit hoher Letalität kommen kann. Die akute invasive pulmonale Aspergillose ist durch hämorrhagische Infarkte und ein Einwachsen der Erreger in die Pulmonalarterien gekennzeichnet. Mit einer Wahrscheinlichkeit von 30% kommt es zur hämatogenen Streuung und Metastasierung in das Gehirn, den Gastrointestinaltrakt oder andere Organe (Böcker et al. 2004). Beim Aspergillom handelt es sich um einen umschriebenen Pilzknoten, der in der Regel in einer vorgegebenen Höhle (z.B. einer tuberkulösen Kaverne) entsteht. Aspergillen werden selten im venösen Blut nachgewiesen, da sie den Kapillarfilter wegen ihrer Größe kaum passieren. Aspergillussporen werden normalerweise nach Inhalation

durch Alveolarmakrophagen eliminiert. Wichtigste Abwehrzellen sind aber die Granulozyten, die eine hämatogene Dissemination verhindern. Myelotoxische Therapien prädisponieren deshalb zur Lungenaspergillose mit hämatogener Aussaat (Alexander et al. 1999, Pfaffenbach et al. 1994).

4.1.3 Zygomyceten

Pilze aus der Familie der Zygomyceten (*Mucor*, *Absidia*, *Rhizopus*) kommen hauptsächlich vor bei immunsupprimierten Patienten, bei Patienten mit durch Diabetes mellitus verursachter Ketoazidose, bei Transplantationen von Organen, posttraumatischen Patienten und bei Patienten, die mit Deferoxamin wegen Eisenüberladung behandelt werden. Das klinische Bild charakterisieren thrombotische Gefäßverschlüsse und Gewebsnekrosen im Bereich des Gesichts, der Atemwege und des ZNS (Alexander et al. 1999, Gonzalez et al. 2002).

4.1.4 *Cryptococcus neoformans*

Die Kryptokokkose tritt vor allem bei HIV-Infektionen auf. *Cryptococcus neoformans* wird durch Inhalation aufgenommen, die hämatogene Dissemination geht meist von einer inapparent verlaufenden Lungeninfektion aus. Die wichtigste und häufigste Manifestation ist die Meningoenzephalitis (Alexander et al. 1999).

Mit Ausnahme der Katheter-assoziierten Candidämie sind invasive Pilzinfektionen schwierig zu diagnostizieren. *Candida* spp. und Kryptokokken lassen sich in Blutkulturmedien kultivieren. Aspergillen und Mucoraceae sind nur selten im venös entnommenen Blut nachzuweisen, da sie wegen ihrer Größe nur selten den Kapillarfilter passieren. Bei disseminierten Candidainfektionen sind die Blutkulturen nur intermittierend positiv, so dass die Diagnose aus metastatisch entstandenen Herden gesichert werden muss (Alexander et al. 1999).

4.2 Antimykotika

4.2.1 Polyen-Antimykotika

Polyen-Antimykotika werden aus Kulturen von Streptomyces-Arten isoliert und bestehen aus einem wasserunlöslichen makrozyklischen Laktoring mit einer hydrophoben und einer hydrophilen Seite. Durch diesen amphiphilen Charakter können sie mit den Sterinverbindungen der Zellmembran wechselwirken und so zu einer Porenbildung in der Membran führen. Diese Leckbildung führt zum Zelltod und erklärt die fungizide Wirkung auf ruhende und wachsende Pilze. Zu den Polyen-Antimykotika zählen Amphotericin B, Nystatin und Natamycin (Lüllmann

et al. 2006).

4.2.1.1 Amphotericin B und Amphotericin B Deoxycholat

Amphotericin B ist ein makrozyklisches Polyantibiotikum mit der Summenformel $C_{47}H_{73}NO_{17}$ und einem Molekulargewicht von 924,079 g/mol. Amphotericin B wird aus Kulturen von *Streptomyces nodosus* isoliert und wurde 1955 erstmalig von *Gold et al.* beschrieben. Als natürliches Fermentationsprodukt entsteht auch Amphotericin A. Obwohl beide Moleküle antifungale Wirkung aufweisen, hat sich nur Amphotericin B als Therapeutikum durchgesetzt.

Das Amphotericin B-Molekül hat eine stark hydrophobe Seite mit sieben konjugierten Doppelbindungen und eine hydrophilen Seite, einschließlich des glykosidisch gebundenen Aminozuckers Mykosamin. Der Laktonring enthält 38 Ringatome, eine Heptaenkette, zahlreiche Hydroxylgruppen und ein zyklisches 6-Ring-Ketal, das die Kohlenstoffatome C_{13} und C_{17} miteinander verbindet. Das amphotere Verhalten, das dem Arzneistoff seinen Namen gab, wird durch die Carboxylgruppe am Hauptring und die primäre Aminogruppe am Mykosamin bedingt (siehe Abbildung 20). Amphotericin B kann in saurem oder basischem Medium Salzverbindungen bilden, die zwar besser wasserlöslich als die Grundsubstanz sind, jedoch auch eine geringere antifungale Wirkung aufweisen (Plumb 1999).

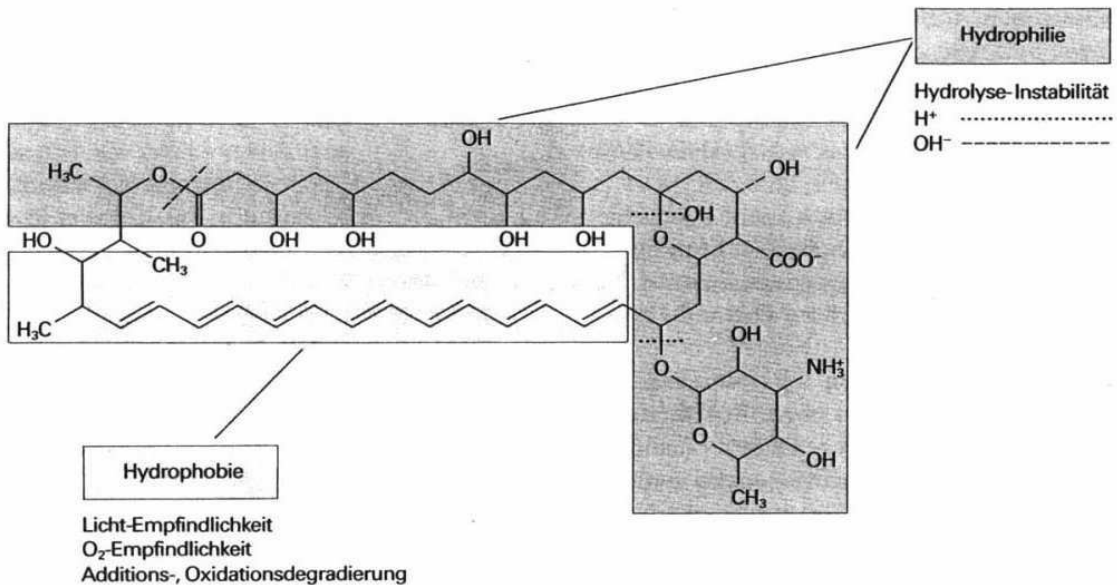


Abbildung 20: Struktur und physikochemische Eigenschaften von Amphotericin B. Amphotericin B ist ein amphiphiles Molekül, d.h. es hat sowohl hydrophile Anteile als auch eine hydrophobe Seitenkette (Forth 1996)

Aufgrund seiner hydrophoben Eigenschaften ist Amphotericin B bei pH 6-7 wasserunlöslich (Windholz 1983), im stark sauren bzw. alkalischen Bereich ($< \text{pH } 2$ und $> \text{pH } 11$) ist es sehr schwer löslich und instabil (Bennett 1995, Pyle 1981). Am ehesten kann Amphotericin B in polaren organischen Lösungsmitteln wie Dimethylsulfoxid (DMSO), Dimethylformamid oder Methanol gelöst werden.

Der Wirkungsmechanismus und auch die Nebenwirkungen von Amphotericin B und anderen Polyenen beruhen auf der strukturellen Ähnlichkeit der Substanz zu den Sterinen. Das Mukosterin Ergosterin befindet sich in der Zellmembran von Pilzen und das wichtigste Zoosterin Cholesterin bildet einen wichtigen Bestandteil der Membran menschlicher Zellen. Sowohl Amphotericin B als auch die Sterine besitzen ein planares, hydrophobes, durchkonjugiertes Doppelbindungssystem von ähnlicher Länge. So kommt es zu hydrophoben Wechselwirkungen zwischen Amphotericin B und den Sterinen. Doch die Affinität von Amphotericin B zu Cholesterin ist fast so hoch wie zu Ergosterin, wodurch die starken Nebenwirkungen, die bei einer systemischen Anwendung beobachtet werden, hervorgerufen werden.

Die Abbildung 21 zeigt die Funktion der Membransterine und stellt auch die Auswirkung von Amphotericin B auf die Membran dar. Im oberen Teil der Abbildung ist die Biomembran einer Zelle dargestellt. Die Lipiddoppelschicht besteht größtenteils aus amphiphilen Phospholipiden, deren hydrophile Köpfe nach außen und hydrophobe Schwänze nach innen zeigen. Verschiedene Arten von Membranproteinen, die in die Lipiddoppelschicht eingelagert sind, sind am Stoffaustausch und der Signalübertragung beteiligt. Nach dem Flüssig-Mosaik-Modell sind die Membranproteine zu dynamischen Ortsveränderungen innerhalb der Membran fähig.

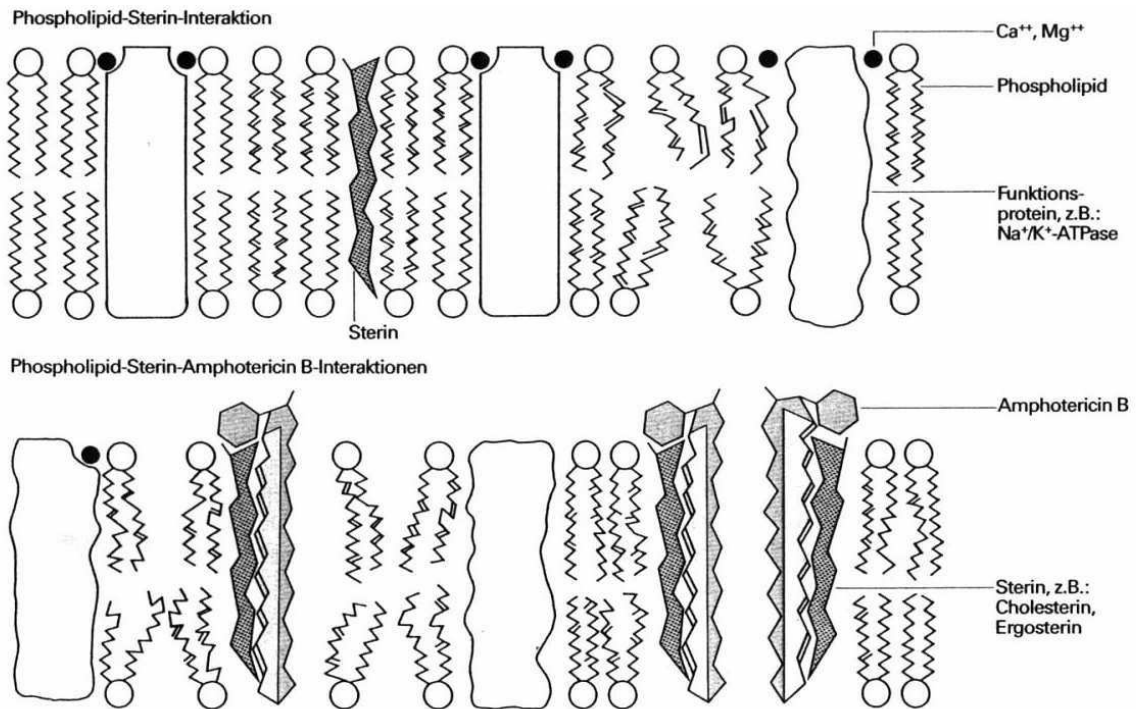


Abbildung 21: Darstellung des Aufbaus von biologischen Membranen und der Interaktion von Amphotericin B mit Sterinen. Der Wirkungsmechanismus von Amphotericin B beruht auf einer Komplexbildung mit Steroiden (insbesondere Ergosterol). Durch die Komplexbildung werden die Permeationseigenschaften der Membran verändert, was die osmotische Integrität der Zelle zerstört und insbesondere zu einem zellulären Verlust von Elektrolyten führt (Forth 1996)

Durch die Anlagerung von Amphotericin B an die Sterine wird die vorher enge Anordnung aufgelockert, wodurch sich die Permeationseigenschaften der Membran verändern. Amphotericin B-Moleküle bilden nicht-wässrige Poren, die zu einer Durchlässigkeit von monovalenten Kationen und somit zu einem Verlust von Elektrolyten führen (Cohen 1998). Wenige Minuten nach der Einwirkung von Amphotericin B kommt es zum Efflux von K⁺- und Mg²⁺-Ionen, später von Aminosäuren, kleinen Peptiden und Nukleinsäurederivaten (Groll et al. 1998). Dadurch kommt es zu einem gehemmten Wachstum der Zelle, die aber zunächst lebensfähig bleibt. Ab einer „kritischen“ Amphotericin B-Konzentration werden durch Interaktion der Sterine mit nicht-wässrigen Poren wässrige Poren gebildet. Diese sind für H⁺, OH⁻ und zweiwertige Kationen permeabel. Die durch die Permeabilitätsänderung eingeleiteten osmotischen Vorgänge führen bei Säugerzellen zu einer Lyse der Zellen. Aufgrund ihrer Zellwand führt dies bei Pilzen zwar nicht zum Schaden, bei ihnen kommt es jedoch durch die erhöhte H⁺/OH⁻-Permeabilität zum Anstieg des intrazellulären pHs, der eine Membranschädigung herbeiführt und somit für die Fungizidie verantwortlich ist (Bekersky 1999, Buttle 2005).

Aufgrund der geringen Löslichkeit wird im Handel erhältliches Amphotericin B mit dem Gallensalz Natriumdesoxycholat als Lösungsvermittler ergänzt. Der Komplex aus Amphotericin B und Natriumdesoxycholat bildet im Wasser Kolloide mit Partikeln, die einen Durchmesser von weniger als 0,4 µm aufweisen. Nach therapeutischer Applikation löst sich das Amphotericin B aus seiner Salzbindung und bindet sich zu 90 - 95 % an Cholesterin in Lipoproteinen.

Amphotericin B hat ein breites Wirkungsspektrum und kann auch per infusionem zur Therapie von Systemmykosen verwendet werden. Das Wirkungsspektrum von Amphotericin B umfasst *Aspergillus* spp, *Candida* spp, *Coccidioides*, *Cryptococcus*, *Histoplasma*, *Blastomyces*, *Trichosporum*, *Mucor* und *Fusarium*. Weniger aktiv ist Amphotericin B gegen *C. lusitaniae*, *Pseudallescheria boydii*, *Acremonium*, *Trichosporum beigelii*, *A. terreus* und *Malassezia furfur*. Die häufigsten infusionsassoziierten Nebenwirkungen sind Fieber, Schüttelfrost und Muskelschmerzen. Bei peripher venöser Applikation kann es zu Thrombophlebitiden kommen. Die klinisch wichtigste Nebenwirkung von Amphotericin B ist die Nephrotoxizität, die dosislimitierend wirkt. Nach i.v.-Gabe von Amphotericin B kommt es zur Abnahme der glomerulären Filtrationsrate. Der Wirkstoff interagiert mit den Lysosomen-Membranen in den Nierentubuli, so dass Tubuluskalzinosen entstehen können. Erste Anzeichen einer Nierenfunktionsstörung sind Kreatinin- und Harnstoffanstiege im Serum, Hypokaliämie, Proteinurie, Hämaturie, eine renal tubuläre Azidose und ein renaler Magnesiumverlust. Bei einer kumulativen Gesamtdosis von < 2 g Amphotericin B werden nur in Ausnahmefällen irreversible Nierenschädigungen beobachtet. Zwischen einer Gesamtdosis von 2 g und 4 g treten in bis zu 50 % Nierenfunktionsstörungen bei den Patienten auf, die aber zumeist reversibel sind. Ab einer Gesamtdosis von 5 g muss bei 80 % der Patienten mit mehr oder weniger irreversiblen Nierenschäden gerechnet werden. Seltene Nebenwirkungen von Amphotericin B sind eine normochrome, normozytäre Anämie, Muskel- und Gelenkschmerzen, Thrombozytopenie, allergische Reaktionen, Krämpfe, Sehstörungen, Schwindel, Paresen und periphere Neuritiden (Groll et al. 1998).

Um eine geringere Nierenschädigung zu erreichen sind mehrere Amphotericin-Zubereitungen in Form von neuartigen Lipidsuspensionen entwickelt worden. Mit der Entwicklung neuer antimykotischer Substanzen sind wenige Indikationen für den Einsatz von konventionellem Amphotericin B Deoxycholat übrig geblieben. Diese beinhalten die Candidämie sowie die akute disseminierte Candidiasis nierengesunder Patienten bzw. Früh- und Neugeborener und die Induktionstherapie der Kryptokokken-Meningoenzephalitis.

4.2.1.2 Amphotericin B Colloidal Dispersion (ABCD)

Amphotericin B in kolloidaler Dispersion stellt eine äquimolare Mischung von Amphotericin B und Cholesterylsulphat dar. ABCD hat eine scheibenartige Struktur und weist eine Zwei-Kompartiment-Pharmakokinetik auf. Nach der Infusion wird ABCD vom retikuloendothelialen System schnell aus dem Blut entfernt und anschließend erneut in die Zirkulation freigesetzt. Verglichen mit konventionellem Amphotericin B sind die Spitzenspiegel von ABCD niedriger (Groll et al. 1998).

4.2.1.3 Amphotericin B Lipid Complex (ABLC)

Amphotericin B Lipid Complex besteht aus einem Komplex von Amphotericin B mit zwei Phospholipiden in einem Arzneistoff-Lipid-Verhältnis von 1:1. Die zwei Phospholipide Dimyristolphosphatidylcholin (DMPC) und Dimyristolphosphatidylglycerol (DMPG) liegen in einem molaren Verhältnis von 7:3 vor. Die räumliche Konfiguration des stabilen Arzneistoff-Phospholipid-Komplexes ist bandförmig mit einer Größe von 1-10 µm (Bekersky et al. 1999, Buttle 2005, Groll et al. 1998).

4.2.1.4 Liposomales Amphotericin B (LAMB)

Liposomales Amphotericin B stellt das am besten untersuchte lipidbasierte Amphotericin B dar. Bei liposomalem Amphotericin B handelt es sich um kleine echte Liposomen, bestehend aus hydriertem Sojaphosphatidylcholin, Cholesterin und Distearylphosphatidylglycerin (DSPG) in einem molaren Verhältnis von 10:5:4 (Buttle 2005, Groll et al. 1998, Mehta 1997).

Faktor	Amphotericin B Deoxycholat	Amphotericin B Colloidal Dispersion	Amphotericin B Lipid Complex	Liposomales Amphotericin B
Partikel	Micelle	Lipidscheiben	Bänder	Liposomen; kleine unilamellare Liposomen
Größe (nm)	<25	100	500-5,000	90
Amphotericin B (mol%)	34	50	35-50	10
Carrier	Deoxycholat	Cholesterylsulphat	Dimyristoyl-phosphatidylcholin und Dimyristoyl-phosphatidylglycerol (molares Verhältnis 7:3)	Distearoyl-phosphatidylglycerol, Cholesterin und Sojaphosphatidylcholin (molares Verhältnis 4:5:10)
Maximale Serumkonzentration*	...	Niedriger	Niedriger	Höher
Infusions-assoziierte Toxizität	Hoch	Moderat	Moderat	Mild
Dosierung	1 mg/kg/d	3-4 mg/kg	5 mg/kg	3-5 mg/kg
Kosten/Tag*	\$33.76	\$413.33-\$480	\$693.32	\$942-\$1,318.80
* durchschnittlicher Preis im Großhandel für die angegebene Dosierung im Dezember 1997 (bezogen auf einen 70 kg schweren Patienten)				
Daten von <i>Graybill</i> (Graybill 1996)				

Tabelle 22: Zusammenstellung von Eigenschaften der verschiedenen Formulierungen des Amphotericin B (Patel 1998)

4.2.1.5 Nystatin

Nystatin ist ein Polyen-Antimykotikum, das aus *Streptomyces noursei* isoliert wird und das gegen viele Hefe- und Schimmelpilze wirksam ist. Es wird im Magen-Darm-Trakt nicht aufgenommen und dient zur Behandlung von Hefepilz-Infektionen der Haut und der Schleimhäute. Der Wirkstoff kommt zur Anwendung bei Pilzbefall im Mundbereich, dem Verdauungskanal, in der Scham- und Analregion und bei Windeldermatitis. Der Wirkungsmechanismus entspricht dem von Amphotericin B.

Eine multilamelläre liposomale Formulierung von Nystatin wurde in klinischen Prüfungen untersucht, aber nicht zur Zulassung eingereicht (Groll et al. 2003).

4.2.1.6 Natamycin

Das Makrolid-Polyen-Antimykotikum Natamycin wird aus *Streptomyces natalensis* isoliert. Es wird genau wie Nystatin im Darm nicht resorbiert und wird deshalb nur lokal bei Hefepilzinfektionen des Darmes, Mundsoor und Pilzinfektionen des Auges, der Augenlider und Tränenwege angewendet. Außerdem ist Natamycin als Konservierungsmittel E235 in der Lebensmittelindustrie für die Haltbarmachung von Käse- und Wurstwaren zugelassen.

4.2.2 Azol-Antimykotika

Unter dem Begriff Azol-Antimykotika werden Substanzen zusammengefasst, die entweder einen Imidazol- oder einen Triazol-Ring als aktive Gruppe enthalten. Die Azol-Antimykotika wirken fungistatisch und haben ein sehr breites antimykotisches Wirkspektrum. Sie hemmen die Synthese von Ergosterin, welches ein essenzieller Bestandteil der Plasmamembran der Pilzzellen ist. Die Azol-Antimykotika verhindern die Umwandlung von Lanosterin in Ergosterin, indem sie sich an das Häm-Eisen von Cytochrom P450 binden, welches für die Funktion der 14- α -Demethylase notwendig ist. Dieses Enzym veranlasst die Umwandlung von Lanosterin in Ergosterin (Groll and Ritter 2005, Lüllmann et al. 2006)

4.2.2.1 Imidazol-Derivate

Beispiele für Imidazol-Derivate sind Clotrimazol, Ketoconazol, Miconazol, Econazol, Oxiconazol, Isoconazol, Bifonazol, Cloconazol, Sertaconazol und Omoconazol. Sie werden hauptsächlich lokal angewandt. Ihre Indikationen sind Infektionen mit Dermatophyten und lokale Infektionen mit *Candida*- und *Cryptococcus*-Arten. Die Substanzen Ketoconazol und Miconazol sind lokal oder auch systemisch verwendbar. Aufgrund von schwerwiegenden Leberschädigungen dient Ketoconazol jedoch nur noch zur lokalen Therapie von Pilzinfektionen (Lüllmann et al. 2006, Groll and Ritter 2005) und Miconazol ist nicht mehr zur

systemischen Therapie zugelassen.

4.2.2.2 Triazol-Derivate

Die Triazol-Derivate Fluconazol, Itraconazol, Voriconazol und Posaconazol eignen sich auch zur systemischen Therapie. Da sie ausreichend enteral resorbiert werden, genügt häufig eine orale Zufuhr. Sie weisen ein breites Wirkspektrum auf und werden relativ gut vertragen.

Fluconazol ist gut wasserlöslich und kann damit auch intravenös zugeführt werden. Die Bioverfügbarkeit nach oraler Zufuhr liegt über 90%, es ist kaum eiweißgebunden und verteilt sich gleichmäßig über alle Kompartimente des Körpers, einschließlich des Liquor cerebrospinalis. Es inhibiert die Cytochrom P450-Isoenzyme CYP 3A4, CYP 2C9 und CYP 2C19 in der Leber. Im Gegensatz zu Ketoconazol und Itraconazol ist Fluconazol metabolisch stabil und wird zu über 90% unverändert renal eliminiert (Saag and Dismukes 1988). Fluconazol wirkt in therapeutischen Dosen in der Regel fungistatisch, kann aber, abhängig von der Dosis, bei manchen Organismen auch eine fungizide Wirkung vorweisen. Als Nebenwirkungen können gastrointestinale Symptome und Exantheme auftreten (Groll and Ritter 2005, Lüllmann et al. 2006).

Itraconazol ist lipophil und hat eine vergleichsweise limitierte orale Bioverfügbarkeit von ca. 60 % in Abhängigkeit von der Formulierung (Saag and Dismukes 1988; Groll et al. 1998). Es hat eine hohe Proteinbindung, reichert sich stark im Gewebe an (außer im Liquor cerebrospinalis) und unterliegt einem ausgeprägten hepatischen Metabolismus. Dabei entstehen eine Reihe von aktiven Metaboliten, von denen Hydroxy-Itraconazol die größte Bedeutung hat, weil seine antifungale Aktivität im Vergleich zu Itraconazol genauso hoch ist, und es zugleich eine 2-3 mal so hohe Plasmakonzentration hat (Poirier and Cheymol 1998). Aufgrund der potenten Inhibition der Cytochrom-P450-Oxygenasen in der Leber kann der Abbau von anderen Arzneimitteln gestört sein. Itraconazol wird bei System-, aber auch bei Lokalmykosen angewandt, die einer lokalen Therapie nicht ausreichend zugänglich sind. Gastrointestinale Störungen stehen bei den unerwünschten Wirkungen im Vordergrund (Groll and Ritter 2005, Lüllmann et al. 2006, Saag and Dismukes 1988).

Die neueren Triazole Voriconazol und Posaconazol wirken auch gegen Erreger, die refraktär gegenüber den anderen Triazolen, Amphotericin B oder Echinocandinen sind, wie *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Aspergillus terreus* und Fusarien. Besonders Voriconazol ist gut verträglich und ist in der Therapie der invasiven Aspergillose dem bisherigen Hauptpräparat Amphotericin B sowohl in der Wirksamkeit als auch in der Verträglichkeit überlegen. Voriconazol hat nach oraler Einnahme eine Bioverfügbarkeit von über 90 %, es hat eine hohe

Proteinbindung im Plasma von über 60 % und reichert sich stark im Gewebe an. Voriconazol wird in der Leber über N-Oxidation durch die Cytochrom P450-Isoenzyme CYP 2C19, CYP 2C9 und CYP 3A4 metabolisiert und in Form überwiegend inaktiver Metabolite zu ca. 80 % im Urin ausgeschieden (Jeu et al. 2003, Murayama et al. 2007, Theuretzbacher et al. 2006). Posaconazol ist ein Antimykotikum, das bei schweren, oder Itraconazol- bzw. Amphotericin B-resistenten Pilzinfektionen als second-line-Therapie, insbesondere bei immungeschwächten Patienten, angewendet werden kann und Indikationen in der antimykotischen Prophylaxe hat (Groll and Ritter 2005, Lüllmann et al. 2006).

4.2.3 Allylamine

Die Allylamine Naftifin und Terbinafin hemmen die Squalenepoxidase, welche einen der ersten Schritte in der Ergosterin-Biosynthese katalysiert. Sie wirken fungizid und besitzen ein breites Wirkspektrum. Sie können lokal und systemisch (Terbinafin) angewandt werden (Lüllmann et al. 2006).

4.2.4 Morpholine

Das fungizide Morpholin-Derivat Amorolfin hemmt die Ergosterin-Synthese auf Stufen, die dem Angriffspunkt der Azole nachgeordnet sind. Die Substanz wird vor allem bei Nagelpilz angewandt (Lüllmann et al. 2006).

4.2.5 Flucytosin

Flucytosin (5-Fluorcytosin) wirkt als Antimetabolit-Vorstufe fungistatisch auf Hefepilze. In diesen Pilzen ist das Enzym Cytosindeaminase vorhanden, welches das 5-Fluorcytosin zu 5-Fluoruracil desaminiert. Das Enzym Uridinmonophosphat(UMP)-Pyrophosphorylase wandelt 5-Fluoruracil in 5-Fluor-UMP um, das dann weiter zu 5-Fluor-Uridintriphosphat(UTP) phosphoryliert und in die RNA eingebaut wird. Dies bewirkt die Synthese fehlerhafter RNA, die das Wachstum hemmt. 5-Fluoruracil wird außerdem zu 5-Fluor-desoxyUMP umgewandelt, das die Thymidylat-Synthase und damit die DNA-Synthese und die Zellteilung inhibiert. Die Desaminierung von 5-Fluorcytosin zu 5-Fluoruracil erfolgt in den Zellen von Säugetieren nicht oder nur in geringem Maße.

Flucytosin ist gut wasserlöslich und wird problemlos aus dem Gastrointestinaltrakt resorbiert. Nach oraler Einnahme hat es eine Bioverfügbarkeit von 76–89%. Aufgrund der geringen Proteinbindung verteilt es sich gleichmäßig in allen Gewebe- und Körperflüssigkeiten einschließlich des Liquor cerebrospinalis. Flucytosin wird in der Leber nur minimal metabolisiert und vor allem renal ausgeschieden (Vermees et al. 2000). Aufgrund einer raschen

Resistenzbildung in vitro wird Flucytosin meist nicht als alleinige Substanz eingesetzt. Häufig wird es mit Amphotericin B kombiniert. Zu den häufigsten Nebenwirkungen zählen Störungen des Gastrointestinaltrakts, Leberfunktionsstörungen sowie eine Leukozytopenie und Thrombozytopenie. Im Tierversuch ist 5-Fluorcytosin teratogen (Groll and Ritter 2005, Groll et al. 1998, Lüllmann et al. 2006).

4.2.6 Echinocandin-Antimykotika

Die Echinocandin-Antimykotika Caspofungin, Anidulafungin und Micafungin wirken über eine Hemmung der Zellwandsynthese der Pilze. Es handelt sich um halbsynthetische zyklische Polypeptide. Diese interferieren mit dem für Pilze spezifischen Enzym 1,3- β -Glucan-Synthase, welche das β -(1,3)-Glucan synthetisiert. Dieses Glucosepolymer bildet Fibrillen, die von essenzieller Bedeutung für die Festigkeit der Pilzzellwand sind. β -Glucan kommt in der Säugetierzelle nicht vor. Es trägt zur osmotischen Stabilität bei und ist wichtig für Zellwachstum und Zellteilung.

Die Ausgangssubstanz der Echinocandine, das Pneumocandin, ein Naturprodukt, hat bereits eine gute Wirkung gegen *Candida*, wirkt aber nicht gegen *Aspergillus*. Durch gezielte chemische Modifikation der Seitenketten wurden die Wirkstoffe Caspofungin, Anidulafungin und Micafungin entwickelt, deren antimykotisches Wirkspektrum dadurch deutlich verstärkt wurde, so dass sie verstärkt auf *Candida*-Arten und auch auf Aspergillen wirken.

Die Echinocandin-Antimykotika haben eine sehr geringe orale Bioverfügbarkeit und sind deshalb nur als intravenöse Formulierungen erhältlich. Sie haben eine hohe Proteinbindung im Plasma von 84 – 99,8% und haben eine gute Gewebegängigkeit in Leber, Milz, Lunge, Niere, jedoch eine schlechte Penetranz in Gehirn, Liquor cerebrospinalis und Urin.

Caspofungin ist die erste verfügbare Substanz aus der neuen Klasse der Echinocandine und wurde in Europa im Juli 2001 zugelassen. Caspofungin wird in der Leber durch Peptid-Hydrolyse und N-Acetylierung in hauptsächlich inaktive Metabolite verstoffwechselt und zerfällt auch spontan in inaktive Produkte, welche protrahiert über einige Tage mit der Galle ausgeschieden werden (Denning 2003, Kauffman and Carver 2008). Die häufigsten unerwünschten Wirkungen, die unter Behandlung mit Caspofungin beobachtet werden, sind Fieber, Thrombophlebitis, Übelkeit, Erbrechen und Flush.

Anidulafungin wurde in Deutschland im September 2007 zugelassen. Die Substanz ist wie alle Echinocandine gut verträglich, weist keine relevanten Arzneimittelinteraktionen auf und erfordert keine Dosisanpassungen bei Nieren- oder Leberinsuffizienz. Anidulafungin wird nicht metabolisiert und zerfällt im Plasma langsam in inaktive Metabolite. Diese werden biliär ausgeschieden (Denning 2003, Kauffman and Carver 2008).

Micafungin wurde in Deutschland im Januar 2009 zugelassen (Denning 2003, Groll and Ritter 2005, Groll et al. 1998, Harrison 2005, Lüllmann et al. 2006) und hat eine ähnliche Pharmakologie und Indikationsgebiete wie Caspofungin und Anidulafungin.

4.3 Thrombozyten und deren Funktion

Die kernlosen Thrombozyten sind die kleinsten zellulären Elemente des Blutes. Sie erfüllen wichtige Aufgaben bei der Blutstillung, der Gefäßreparatur und der Entzündung (Morgenstern 1998). Die Thrombozyten entstehen durch Abschnürungen aus den Megakaryozyten des Knochenmarks unter Einfluss des in der Leber gebildeten Hormons Thrombopoetin. Die normale Thrombozytenzahl im Blut beträgt 150.000 – 450.000/ μ l (Harrison 2005). Die Thrombozyten zirkulieren durchschnittlich 7-10 Tage im Blut und haben in unstimuliertem Zustand eine diskoidale Ruheform mit einer mittleren Größe von 1 – 3,1 μ m (Morgenstern 1998). Ihr Abbau erfolgt im retikuloendothelialen System von Milz und Leber; ein Drittel der Thrombozyten wird in der Milz gespeichert und steht im Austausch mit dem zirkulierenden Anteil (Schroer 1993). Thrombozyten haben keinen Zellkern, dennoch befähigen ein Rest von mRNA und Mitochondrien der Megakaryozyten sie begrenzt zur Neusynthese von Proteinen (Gawaz 1999). Normalerweise haften Thrombozyten nicht an Endothelzellen, da sie keine Rezeptoren für die Glykokalix der Endothelzellmembran besitzen und da die Endothelzellen Faktoren in das Gefäßlumen abgeben, die einer Aktivierung der Thrombozyten entgegenwirken. So hemmen das von Endothelzellen gebildete Eicosanoid Prostacyclin und Stickstoffmonoxid (NO) direkt die Thrombozytenaktivierung, während Heparin die Bildung und Aktivierung von Thrombin hemmt und somit die Thrombozytenaggregation indirekt inhibiert (Bauer and Walzog 2005).

Die Hämostase umfasst Wechselwirkungen zwischen dem Gefäßendothel und den Thrombozyten sowie Gerinnungsfaktoren, die aus dem Blutplasma und aus verletztem Gewebe stammen. Die Thrombozyten sind diejenigen Blutzellen, die bei Gefäßverletzung innerhalb kürzester Zeit aggregieren und einen ersten Wundverschluss herbeiführen. Die Aktivierung des plasmatischen Gerinnungssystems führt dann zu einer Konsolidierung des Verschlusses durch das bei der Gerinnung entstehende Fibrin (Bauer and Walzog 2005).

Grundlegende Mechanismen der Plättchenaktivierung sind folgende zwei Stoffwechselwege: bei Aktivierung durch die meisten Agonisten wird Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) durch die Phospholipase C gespalten, wobei Inositol-1,4,5-triphosphat (IP₃) und Diazylglyzerid entstehen. Das IP₃ führt zu einer Freisetzung von Kalziumionen aus dem dichten tubulären System. Die erhöhte Konzentration an zytoplasmatischem Kalzium aktiviert verschiedene Enzyme. Diazylglyzerid aktiviert die Proteinkinase C, die ihrerseits zu einer Phosphorylierung von Proteinen an Serin- und Threoninresten führt. Diese ist von einer

Freisetzung granulärer Inhaltsstoffe und der Expression des Fibrinogenrezeptors GP IIb/IIIa begleitet. Eine erhöhte Kalziumionenkonzentration aktiviert zum anderen aber auch die Phospholipase A₂ und führt dadurch zur Freisetzung von Arachidonsäure aus Membranphospholipiden. Die Arachidonsäure wird durch die Zykllooxygenase in die zyklischen Endoperoxide Prostaglandin G₂ und H₂ umgewandelt. Aus dem Prostaglandin H₂ entsteht das proaggregatorische Thromboxan A₂ (Fitzgerald 1991, Harbrecht 1998).

Bei einer Gefäßverletzung werden subendotheliale Kollagenfasern freigelegt, an denen sich die Thrombozyten sofort anheften. Diese Adhäsion erfolgt bei hoher Schubspannung, wie sie z.B. im Bereich von Gefäßstenosen erreicht wird durch den von-Willebrand-Faktor (vWF) und bei niedrigeren Schubspannungen durch Kollagen und Fibrinogen (Harbrecht 1998). Der vWF bildet zusammen mit Fibronectin und Laminin eine molekulare Brücke zwischen den Kollagenfasern und dem Rezeptorkomplex Glykoprotein (GP) Ib/IX auf der Thrombozytenmembran. Die Interaktion von nichtstimulierten Plättchen mit oberflächengebundenem Fibrinogen erfolgt über das GP IIb/IIIa.

Unmittelbar nach der Anlagerung der Thrombozyten folgt ein Aktivierungsprozess, in dessen Verlauf es zur Sekretion verschiedener Stoffe, einer Formänderung und Aggregation der Thrombozyten kommt. Die Thrombozyten sezernieren verschiedene Inhaltsstoffe ihrer Granula und Lysosomen. α -Granula enthalten Gerinnungsfaktoren (wie Fibrinogen, Faktor V und Faktor VIII), Stoffe, die die Thrombozytenaggregation fördern (wie vWF, Fibronectin und Thrombospondin) und Wachstumsfaktoren (wie Transforming Growth Factor β (TGF- β), Platelet-derived Growth Factor (PDGF), Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) und basic Fibroblast Growth Factor (bFGF)) (Ware and Collier 1995). Durch spezielle Stoffwechselwege (s.o.) entstehen Thromboxan A₂, was stark vasokonstriktorisch wirkt, und Platelet Activating Factor (PAF), der die Thrombozytenaktivierung fördert und chemotaktisch und aktivierend auf Phagozyten wirkt. Die aktivierten Thrombozyten aggregieren, wobei es zur Umorganisation der Thrombozytenmembran und zur Kontraktion der Aktin-Myosinkomponenten des thrombozytären Zytoskeletts kommt. Dadurch gibt es einen Formwandel („shape change“) der Blutplättchen, bei dem sich die stimulierten Thrombozyten abrunden und Pseudopodien bilden (Echinosphärozyten), die es den Thrombozyten ermöglichen, in einen verzahnten Kontakt zu treten (Morgenstern 1998). Die Aktivierung der Thrombozyten führt zudem zur Expression des Rezeptorkomplexes GP IIb/IIIa auf der Thrombozytenmembran, an den Plasmafibrinogen und aus den aktivierten Blutplättchen freigesetztes Fibrinogen und Thrombospondin binden. Dadurch kommt es zur Bildung eines Thrombozytenaggregats, dem sogenannten weißen Thrombus, womit die primäre Hämostase abgeschlossen ist. Unter normalen Bedingungen dauert dieser Vorgang zwei bis vier Minuten (Blutungszeit). Eine Verlängerung der

Blutungszeit findet man bei Funktionsuntüchtigkeit der Thrombozyten (Thrombozytopathie), einer Verminderung ihrer Anzahl (Thrombozytopenie), bei einem vWF-Mangel (von-Willebrand-Jürgens-Syndrom) oder bei einer therapeutischen Verminderung der Aggregationsfähigkeit z.B. durch Cyclooxygenase-2-Hemmer oder Hemmstoffe des GP IIb/IIIa (Bauer and Walzog 2005).

4.4 Thrombozytenfunktionsdiagnostik

Zu Beginn einer Thrombozytenfunktionsdiagnostik, z.B. bei Verdacht auf eine hereditäre Blutungsneigung, ist die Bestimmung der Thrombozytenzahl im Blut [normal 150.000 – 450.000/ μ l (Harrison 2005)] sinnvoll.

4.4.1 Blutungszeit

Die Bestimmung der Blutungszeit kann als Screening-Test ersten Aufschluss über das Vorliegen einer signifikant erhöhten Blutungsneigung geben. Bei der Blutungszeit wird die Zeit bestimmt, bis eine Blutung zum Stillstand kommt. Dazu gibt es verschiedene Methoden. Bei der Blutungszeit nach Ivy wird eine Blutdruckmanschette am Oberarm des Patienten angebracht und auf 40 mmHg Druck eingestellt, damit die Druckverhältnisse im Gewebe standardisiert sind und dann ein kleiner Einschnitt an einer günstigen Stelle des Unterarms gesetzt. Ohne die Wunde zu berühren wird alle 30 Sekunden das ausfließende Blut mit einem sterilen Tupfer entfernt. Sobald auf dem Tupfer keine Rötung mehr nachweisbar ist, gilt die Blutungszeit als abgeschlossen. Die Referenzzeit liegt bei 4 bis 6 Minuten. Bei der Methode nach Duke wird ein Lanzettenstich am Rand des Ohrläppchens gesetzt und das Blut mit Zellstoff oder Papier alle 15 Sekunden entfernt. Die Referenzzeit liegt bei 3 bis 5 Minuten. Bei der Blutungszeit nach Marx wird ein Lanzettenstich in der Fingerbeere gesetzt und der Finger in ein wassergefülltes Kolbenglas (mit 37° C) eingetaucht. Anschließend wird die Zeit bis zum visuellen Blutungsstillstand gemessen. Die Referenzzeit liegt bis 2 Minuten.

Die Blutungszeit ist aufgrund ihrer großen Variabilität, geringer Reproduzierbarkeit und geringer Korrelation mit dem tatsächlichen, z.B. intraoperativen Blutungsrisiko kritisch zu sehen. Die Ergebnisse der Blutungszeit sind abhängig von der Thrombozytenzahl, der Funktion der Thrombozyten, der Fibrinogenkonzentration, einer adäquaten Funktion der Blutgefäße, Größe und Tiefe der Hautinzision, der Hauttemperatur und –beschaffenheit, der Technik des Untersuchers und der Kooperation des Patienten. In der Hand eines erfahrenen Untersuchers ist sie allerdings hilfreich zur orientierenden Erfassung relevanter Störungen der Hämostase (Michelson et al. 2006, Thomas 2005,).

4.4.2 In-vitro Blutungszeit

Der Plättchenfunktionanalyser PFA-100® simuliert in vitro eine kapilläre Blutstillung durch die Thrombozyten und beruht auf einer von *Kratzer* und *Born* 1985 beschriebenen Methode (Kratzer and Born 1985). Antikoaguliertes Blut fließt über eine Kapillare durch eine kleine Öffnung in einer Membran, die mit aktivierenden Substanzen beschichtet ist. Durch die Adhäsion und Aggregation der Thrombozyten kommt es zum Verschluss dieser Öffnung. Die Zeit bis zum Stillstand des Blutflusses wird als Verschlusszeit in Sekunden gemessen. Zur Verfügung stehen zwei Testkammern mit zwei unterschiedlichen Substanzmischungen: Kollagen / Epinephrin oder Kollagen / ADP, welche die Thrombozyten aktivieren. Die Methode ist standardisiert und ein einfach durchzuführendes Screeningverfahren, das sensitiv Störungen der primären Hämostase erfasst, jedoch keine Differenzierung zwischen Störungen durch Thrombozytenfunktionshemmer, von Willebrand'scher Erkrankung oder durch Thrombozytopathien erlaubt. Bei einem niedrigen Hämatokrit und einer geringen Thrombozytenzahl sind die Ergebnisse nur eingeschränkt zu bewerten (Michelson et al. 2006, Thomas 2005).

4.4.3 Thrombozytenaggregometrie

4.4.3.1 Methode nach Born

Die Thrombozytenaggregometrie nach *Born* (Born 1962) ist die weitverbreitetste Methode zur Funktionsbestimmung der Thrombozyten. Das Prinzip der Messung beruht auf der turbidimetrischen Bestimmung von Zellsuspensionen. Thrombozytenreiches Plasma (platelet rich plasma, PRP) wird im Aggregometer in einen definierten Strahlengang eingebracht und die Lichtstärke, die durch Absorption und Streuung verändert wird, nach Passage der Probe gemessen. Nach Zugabe von Agonisten (ADP, Kollagen, Epinephrin, Arachidonsäure und Ristocetin) entstehen Plättchenaggregate, die eine Aufklärung des PRP und damit eine höhere Lichtdurchlässigkeit (Transmission) und eine insgesamt geringere Ablenkung des Lichts bewirken. Die Transmissionszunahme innerhalb einer gegebenen Zeit, steht in direktem Verhältnis zur Thrombozytenaggregation. Je nach dem, welcher Agonist zur Aktivierung gewählt wurde, lassen die Ergebnisse Rückschlüsse auf die Funktionstüchtigkeit der Thrombozyten zu. Die Methode ist abhängig von der präanalytischen Gewinnung der Thrombozyten. Bei hohem Scherstress während der Blutentnahme, starken Temperaturschwankungen, insbesondere Abkühlung und längerer Lagerzeit des Blutes werden Artefakte gemessen. Bei erniedrigten Thrombozytenzahlen ist sie nicht mehr aussagekräftig

(Michelson et al. 2006, Thomas 2005).

4.4.3.2 Lumineszenz Methode

Die Methode der Lumiaggregometrie nach *Feinman et al.* (Feinman et al. 1977) beruht darauf, dass dichte Granula nach der Aktivierung der Thrombozyten ATP freisetzen. Die in vitro-Freisetzung von ATP kann erfasst werden, indem Luciferasereagenz zu einer Thrombozytensuspension gegeben wird, die in einer Küvette eines Aggregometers enthalten ist. Nachdem die Reaktion durch einen Aktivator (Thrombin oder Kollagen) gestartet wurde, reagiert das freigesetzte ATP mit der Luciferase und die Chemilumineszenz-Intensität wird von einem Photomultiplier erfasst und aufgezeichnet.

4.4.3.3 Impedanzmethode

Die Methode der Impedanzaggregometrie wurde durch *Cardinal* und *Flower* 1985 entwickelt (Cardinal and Flower 1980, Zwierzina and Kunz 1985) und erfasst die Thrombozytenaggregation im Vollblut. Sie beruht auf der Messung von Änderungen des elektrischen Widerstandes zwischen zwei Platinelektroden infolge der Anlagerung von Thrombozyten bei Stromfluss. In der Initialphase der Messung umscheidet eine dünne Schicht aus Thrombozyten die Elektroden. Erfolgt eine Aggregation, so lagern sich weitere Thrombozyten an die Elektroden an. Dadurch vermindert sich der Stromfluss zwischen den beiden Elektroden, was als Erhöhung des Widerstandes gemessen wird und als Maß für die Aggregation gilt.

4.4.4 Durchflusszytometrie

Bei der Durchflusszytometrie wird Vollblut oder thrombozytenreiches Plasma mit fluoreszenzmarkierten monoklonalen Antikörpern gegen Thrombozytenproteine inkubiert und die Signalstärke gemessen. Am häufigsten werden die Plättchenaktivierungsmarker CD62 (p-Selektin), CD63, CD40L und PAC-1 (first procaspase activating compound) bestimmt (Leytin et al. 2000). Die Methode ist gut geeignet zum Nachweis ausgeprägter quantitativer Mängel an Thrombozyten-Membranproteinen und einer Störung des Inhalts der dichten Granula (Michelson et al. 2000, Thomas 2005).

4.4.5 Thrombelastographie/-metrie

Bei der Thrombelastographie handelt es sich um ein Testsystem, das 1951 von *Hartert* entwickelt wurde (Hartert 1951). Die Thrombelastographie ist in erster Linie ein Globaltest der Gerinnung und erfasst die Interaktion der Thrombozyten und der plasmatischen Gerinnung

(prokoagulatorische Aktivität der Thrombozyten, Gerinnselretraktion), nicht jedoch die primäre Hämostase. Das Messprinzip besteht darin, dass in ein Gefäß, in welchem sich die Blutprobe befindet, ein Stempel eintaucht, welcher – von einer Feder angetrieben – alternierend um 4,75 Grad um die Längsachse rotiert. Kommt es nach einer entsprechenden Gerinnungsaktivierung zu einer Ausbildung von Fibrinfäden zwischen Gefäßwand und Stempel, so wird die Bewegung des Stempels entsprechend der Festigkeit der Gerinnselgefäden gehemmt. Die „Hemmung“ der Bewegung des Stempels wird über die Zeit als Kurve aufgezeichnet, wobei die Amplitude der Kurve der Festigkeit des Gerinnsels entspricht. Daher kann mit dieser Methode gut die Gerinnselqualität erfasst werden. Wegen zu geringer Sensitivität und Spezifität bezüglich der Thrombozytenfunktion besitzt die Thrombelastographie heute nur noch eine untergeordnete Bedeutung als Thrombozytenfunktionstest (Michelson et al. 2006, Thomas 2005). Eine Weiterentwicklung der Thrombelastographie ist das ROTEM®-System (Rotations-Thrombelastometrie), bei dem verschiedene Messkanäle für parallele Bestimmungen und fünf unterschiedliche Tests zur Verfügung stehen, um Blutungsursachen schnell zu identifizieren.

4.5 Impedanzaggregometrie mit dem Multiplate®-Instrument

Das in dieser Studie verwendete Multiplate®-Instrument beruht auf der Methode der Impedanzaggregometrie. Der größte Vorteil dieses Testverfahrens gegenüber anderen Tests der Thrombozytenfunktion besteht darin, dass die Impedanzaggregometrie im Vollblut stattfindet, während für die verbreitetste und als Goldstandard geltende Aggregometrie nach Born platelet rich plasma (PRP) notwendig ist. Abgesehen davon, dass die Zentrifugation von Blut zeitaufwendig ist, führt sie auch zu Traumatisierung, Strukturveränderungen und biochemischen Veränderungen der Thrombozyten (Born 1962, Salzman et al. 1976, Zwierzina an Kunz 1985). Zudem enthält PRP nicht alle Thrombozyten des Blutes. Je nach Methode der Zentrifugation können in PRP nur 61 % bis 90 % aller Thrombozyten einer Blutprobe angereichert werden (Hill et al. 1988, Persidsky and Ling 1982, Reiss and Katz 1976.), wobei hauptsächlich die größten, schwersten und am meisten reagierenden Blutplättchen verloren gehen (O'Brien 1971). Ein weiterer bedeutender Vorteil der Messung im Vollblut besteht darin, dass alle Blutbestandteile während der Aggregation zugegen sind. Viele Studien haben gezeigt, dass gerade Erythrozyten und Leukozyten wesentlich an der Funktion von Thrombozyten beteiligt sind, indem sie entweder direkt physikalisch an der Aggregation von Thrombozyten beteiligt sind oder indem sie bestimmte Mediatoren (wie z.B. ADP), die die Thrombozytenaggregation beeinflussen, zur Verfügung stellen oder abbauen (Bartlett 1977, Bouchard and Tracy 2001, Duke 1910, Dyszkiewicz-Korpanty et al. 2005, Gaarder and Jonsen 1961, Hellem 1960, Santos et al. 1991). Es wird also deutlich, wie wichtig die Analyse der Funktion der Blutplättchen im

Vollblut, also im physiologischen Milieu der Thrombozyten ist, während die isolierte Betrachtung der Thrombozyten in PRP physiologisch relevante Prozesse auslöst.

Die Thrombozytenanalyse im Multiplate®-System basiert zudem auf der Aggregation der Thrombozyten an Oberflächen und nicht in der Lösung wie bei der Aggregometrie nach Born. Im Körper aggregieren Thrombozyten in der Regel immer an Oberflächen (z.B. an Gefäßverletzungen, Plaques, Stents) und nur in absoluten Ausnahmefällen in der Lösung selber (z.B. während einer disseminierten intravasalen Gerinnung (DIG) oder Heparin-induzierten Thrombozytopenie (HIT) Typ II).

Im Vergleich zu Analysen der in vitro-Blutungszeit mit dem PFA-100®, welche ebenfalls in Vollblut stattfinden, besteht der Vorteil der Impedanzaggregometrie darin, dass sie viele verschiedene Thrombozytenaggregationshemmer wie Acetylsalicylsäure, Clopidogrel und GPIIb/IIIa-Inhibitoren sensitiv nachweisen kann und somit zur Therapieüberwachung geeignet ist, während das PFA-100® nur Acetylsalicylsäure und eingeschränkt Clopidogrel nachweisen kann. Außerdem ist die Sensitivität der Impedanzaggregometrie gegenüber kongenitalen und erworbenen Thrombozytopathien vergleichbar zu PFA-100®, wobei nur mit der Impedanzaggregometrie darüber hinaus auch eine weitere Differenzierung der Erkrankungen möglich ist durch die Aktivierung der Thrombozytenaggregation mit den verschiedenen Reagenzien (von Pape et al. 2007).

Ein Vorteil des Multiplate®-Instruments gegenüber anderen Impedanzaggregometern wie beispielsweise des Chrono-log® besteht darin, dass für das Multiplate®-Instrument nur Einweg-Messzellen zur Verfügung stehen, während bei dem Chrono-log®-System wiederverwendbare Testzellen eingesetzt werden. Die Testzellen müssen somit nach jeder Messung gewaschen werden, wodurch die Gefahr besteht, dass die Oberflächeneigenschaften der Elektroden verändert werden, so dass die Testergebnisse möglicherweise beeinflusst werden (Sibbing et al. 2008, Tóth et al. 2006).

4.6 Evaluation des Multiplate®-Instruments

Das Multiplate®-Instrument der Firma Dynabyte ist im Jahr 2004 auf den Markt gekommen. Zu seiner Anwendung im Vergleich zu anderen methodischen Ansätzen zur Testung der Thrombozytenfunktion liegen mehrere Studien vor.

In einer Studie haben *Tóth et al.* (Tóth et al. 2006) die Multiplate®-Methode mit einer Methode verglichen, bei der die Abnahme der Thrombozytenzahl nach induzierter Koagulation einer Blutprobe als Maß für die Thrombozytenaggregation gemessen wird. Die Arbeitsgruppe hat herausgefunden, dass die Multiplate®-Methode eine einfache, reproduzierbare und sensitive Methode für die Messung von spontaner und stimulierter Thrombozytenaggregation ist und im

Vergleich zur Messung der Thrombozytenzahl nach der Gerinnung einer Blutprobe sensitiver die Effekte von Acetylsalicylsäure auf die Thrombozytenfunktion abbildet.

Die Arbeitsgruppe von *Mengistu et al.* (Mengistu et al. 2008) hat in einer Studie das Multiplate®-Instrument mit der Thrombelastographie verglichen. Bei 54 Patienten wurde die Thrombozytenfunktion vor und nach Koronararterien-Bypass-Operationen mit beiden Methoden getestet und mit dem postoperativen Blutverlust und Transfusionsbedarf verglichen. Es zeigte sich, dass beide Verfahren eine beeinträchtigte Hämostase nachweisen konnten. Aber nur der präoperative ADP(Adenosindiphosphat)-Test des Multiplate®-Instruments korrelierte mit einem postoperativen Bedarf an Bluttransfusionen, so dass sich dieses System im Gegensatz zur Thrombelastographie für die Identifizierung von Patienten mit einem erhöhten Blutungsrisiko eignet.

In einer Studie von *Sibbing et al.* (Sibbing et al. 2008) wurde die Impedanzaggregometrie mithilfe des Multiplate®-Instruments mit der Lichttransmissions-Aggregometrie nach Born verglichen. Es wurde Blut von 60 Patienten vor und von 149 Patienten nach der Einnahme von 600 mg Clopidogrel untersucht. Es zeigte sich, dass das Multiplate®-Instrument geeignet ist, um Clopidogrel-Effekte nachzuweisen und dass die Werte mit den Ergebnissen der Methode nach Born korrelierten. Beide Methoden waren gleichermaßen geeignet, um Non-Responder auf Clopidogrel-Therapie zu erfassen.

Scharbert et al. (Scharbert et al. 2007) haben in ihrer Studie die drei Point-of-care Methoden der Thrombozytenfunktionsdiagnostik PFA-100®, Thrombelastometrie und das Multiplate®-Instruments im Hinblick auf die Fähigkeit zum Nachweis der Nicht-Opioid-Analgetika Diclofenac, Paracetamol und Parecoxib verglichen. Es zeigte sich, dass Paracetamol und Parecoxib keinen inhibitorischen Effekt auf die Thrombozytenfunktion haben. Die Sensitivität für den Nachweis einer durch Diclofenac verursachten Thrombozytenfunktionsstörung war für das PFA-100 85% und für das Multiplate®-Instrument sogar 94%.

In einer Studie konnten *von Pape et al.* (von Pape et al. 2007) zeigen, dass das Multiplate®-System im Vergleich zum PFA-100®-System ebenso geeignet ist, die Wirkung von Acetylsalicylsäure auf die Thrombozytenaggregation mithilfe des Kollagen- und ASPI-Tests (Zugabe von Arachidonsäure) nachzuweisen.

Im Jahr 2007 haben *Görlinger et al.* (Görlinger et al. 2007a, Görlinger et al. 2007b) einen Algorithmus zum Point-of-care-Gerinnungsmanagement bei kardiovaskulären Eingriffen entwickelt und publiziert. Die Autoren empfehlen den kombinierten Einsatz der Rotationsthrombelastometrie (ROTEM®) und der Impedanzaggregometrie mit dem Multiplate®-Instrument zur patientennahen Labordiagnostik bei kardiovaskulären Eingriffen.

4.7 Klinische Anwendung des Multiplate®-Instrumentes

Die relativ neue Multiplate®-Methode wurde bereits auf verschiedenen Forschungsgebieten für bestimmte Fragestellungen genutzt. Beispielsweise konnte die Arbeitsgruppe von *Rahe-Meyer et al.* (Rahe-Meyer et al. 2006) nachweisen, dass die Multiplate®-Analyse einen prädiktiven Wert bezüglich des Transfusionsbedarfs während und nach herzchirurgischen Eingriffen besitzt.

In einem Case-report beschreiben *Bergmann et al.* (Bergmann et al. 2007), wie die bedside Impedanzaggregometrie mit dem Multiplate®-Instrument dazu beigetragen hat, das optimale Zeitfenster für die Entfernung eines Epiduralkatheters mit dem geringsten Blutungsrisiko für eine Patientin zu bestimmen, die für eine Stent-Implantation nach akutem Myokardinfarkt eine doppelte gerinnungshemmende Therapie benötigte, dadurch jedoch ein erhöhtes Risiko für eine epidurale Blutung hatte.

In einigen Studien wurde die Wirkung von aggregationshemmenden Medikamenten auf die Thrombozytenfunktion untersucht. So wurde in einer Studie von *Müller-Schunk et al.* (Müller-Schunk et al. 2008) die Ansprechrate auf Clopidogrel in 50 gesunden Probanden und in 50 Patienten mit symptomatischen arteriosklerotischen Läsionen vor einer Stent-Implantation in hirnversorgende Arterien untersucht. Es zeigte sich, dass mit dem Multiplate®-Instrument eine signifikante Rate von Non-Respondern auf die Clopidogrel-Therapie erfasst werden konnte und dass das Risiko für thrombembolische Ereignisse bei den Patienten mit ungenügender Clopidogrel-induzierter Thrombozytenaggregationshemmung signifikant erhöht war.

Die Arbeitsgruppe von *Penz et al.* (Penz et al. 2007) untersuchte die Wirkung der neuen aggregationshemmenden Medikamente Glykoprotein Iba-Inhibitor mAB 6B4 und der speziellen ADP-Rezeptor-Antagonisten MRS2179 und AR-C69931MX auf die Thrombozytenfunktion, indem sie Blut über atherosklerotische Plaques fließen ließen. Sie fanden heraus, dass diese neuen aggregationshemmenden Substanzen alleine und in Kombination im Gegensatz zu Acetylsalicylsäure die Bildung eines Plättchenthrombus reduzieren konnten.

Eine Reihe von Studien untersuchte mithilfe des Multiplate®-Instrumentes die Wirkung verschiedener Medikamente und Substanzen auf die Aggregation von Blutplättchen. So prüften *Sibbing et al.* (Sibbing et al. 2008) in einer Studie den Einfluss von Bivalirudin und unfraktioniertem Heparin auf die Thrombozytenaggregation. Diese Medikamente wurden während einer perkutanen Koronarintervention 100 Patienten gegeben, die bereits vorher 600 mg Clopidogrel bekommen hatten. Die Arbeitsgruppe fand heraus, dass nur Bivalirudin und nicht unfraktioniertes Heparin eine zusätzliche Inhibition der Thrombozytenaggregation bewirkte.

Die Arbeitsgruppe von *Kirkeby et al.* (Kirkeby et al. 2008) untersuchte die Wirkung von

Erythropoetin (EPO) und dessen Derivate, wie das carbamylierte EPO (CEPO) auf die Thrombozytenfunktion in Ratten und Mäusen. Sie fanden heraus, dass EPO, welches als Hochdosis-Behandlung nach einem Schlaganfall für die Verbesserung der neurologischen Funktion eingesetzt wird, verschiedene Aspekte der Thrombozytenfunktion stört, während CEPO, welches keine erythropoetischen Eigenschaften besitzt, aber ebenfalls aufgrund von antiapoptischen Effekten neuroprotektiv wirkt, die Thrombozytenaggregation nicht beeinflusst.

Scharbert et al. (Scharbert, Gebhardt et al. 2007) haben in einer Studie die Wirkung von Knoblauch auf die Thrombozytenfunktion untersucht und herausgefunden, dass sowohl der einmalige als auch wiederholte Verzehr von Knoblauch keinen Effekt auf die Thrombozytenaggregation hat.

Eine weitere Arbeit von *Scharbert et al.* (Scharbert et al. 2006) untersuchte, welche Effekte die Temperatur während der Lagerung und des Tests auf die Thrombozytenfunktion hat. Sie fanden heraus, dass eine leichte Hypothermie von 34°C keine Auswirkung auf das Testergebnis hat, während eine deutliche Hypothermie von 22°C Defekte in der Adhäsion und Aktivierung von Thrombozyten bewirkt.

Boldt et al. (Boldt et al. 2007) haben in einer Studie an zehn gesunden Probanden gezeigt, dass konventionelle Hydroxyethylstärke (HAES) im Vergleich zu einer neuen, an das Plasma angepassten physiologisch ausgeglichenen HAES-Lösung mehr negative Effekte auf die Funktion der Blutplättchen hat.

In ihrer Studie konnten *Kalb et al.* (Kalb et al. 2005) mithilfe des Multiplate®-Instruments zeigen, dass Desmopressin die Thrombozytenaggregation stimuliert und dass das Multiplate®-Instrument geeignet ist, um die durch Diclofenac induzierte Inhibition der Thrombozytenfunktion zu erfassen.

4.8 Einordnung der Studie in den wissenschaftlichen Zusammenhang

Es gibt in der Literatur nur sehr wenige Studien über die Wirkung von Antimykotika auf die Thrombozytenfunktion. Einige wenige Studien haben die Wirkung der Antimykotika auf die Anzahl, die Morphologie und die molekulare Struktur der Thrombozyten untersucht.

Mehrfach wurde beschrieben, dass nach der Transfusion von Thrombozytenkonzentraten die gleichzeitige Infusion von Amphotericin B einen Anstieg der Thrombozytenzahl verhindert, während dieser Effekt bei Amphotericin B-Infusionen in einem zeitlichen Abstand von zwei Stunden nach der Thrombozytentransfusion nicht mehr messbar ist (Bishop et al. 1991, Hussein et al. 1998, Koren et al. 1988, Kulpa et al. 1981, McGrath et al. 1992, Pastakia et al. 1996, Pittrová et al. 1990, Slichter et al. 2005, Sloand et al. 1994).

Pastakia et al. (Pastakia et al. 1996) zeigten, dass auch nicht aktivierte Thrombozyten bei Zugabe von Amphotericin B P-Selektin exprimieren, was normalerweise nur in aktiviertem Zustand messbar ist. Außerdem war die Thrombozytenadhäsion an polymorphonukleären Leukozyten erhöht. *Sloand et al.* (Sloand et al. 1994) konnten zeigen, dass fünf Tage gelagerte Thrombozyten im Gegensatz zu frischen Thrombozyten bei Zugabe von Amphotericin B weniger Glykoprotein Ib auf der Oberfläche exprimieren und dass die durch Adenosindiphosphat, Kollagen und Epinephrin bewirkte Aggregation in den gelagerten Thrombozyten vermindert ist. *McGrath et al.* (McGrath et al. 1992) fanden, dass fünf Tage gelagerte Thrombozyten im Zusammenhang mit Amphotericin B so genannte „pits“ ausbildeten, während frische Thrombozyten dieses Phänomen trotz Amphotericin B nicht gezeigt haben.

Hänsch et al. (Hänsch et al. 1985) fanden heraus, dass das Polyen-Antibiotikum Nystatin, welches durch die Bildung einer Pore in der Pilzmembran wirkt, einen ähnlichen Effekt hat wie die Komplement-Komponenten C5b-9: die Freisetzung von Prostaglandin E und von Thromboxan A₂ wurde stimuliert, während die Aktivität der Lysolecithin-Acyltransferase inhibiert wurde.

Das Antimykotikum Flucytosin kann als unerwünschte Arzneimittelwirkungen eine Knochenmarkdepression und Hepatotoxizität hervorrufen. Eine Studie von *Vermes et al.* (Vermes et al. 2000) hat ergeben, dass hohe Dosen von Flucytosin so zu einer Thrombozytopenie führen können. *Driessen et al.* (Driessen et al. 1996) haben in einer Studie festgestellt, dass die Thrombozytenzahl bei Neugeborenen mit systemischer Pilzinfektion, die mit dem Triazol-Antimykotikum Fluconazol behandelt wurden, nach der Therapie angestiegen war. *Marmion et al.* (Marmion et al. 1976) und *Frye und Thompson* (Frye and Thompson 1993) haben beschrieben, dass Miconazol eine Anämie und Thrombozytose verursacht. Mehrere Studien haben gezeigt, dass Miconazol und andere Imidazol-Derivate die Produktion von Thromboxan A₂ in Thrombozyten selektiv inhibieren (Köfeler et al. 2000, Moncada et al. 1977, Nijkamp et al. 1977, Tai and Yuan 1978, Tolman and Fuller 1983). *Helmeste et al.* (Helmeste et al. 1998) konnten zeigen, dass Miconazol und andere Imidazol-Derivate das Cytochrom P450-System inhibieren und so die Serotonin-Wiederaufnahme in Thrombozyten hemmen. *Sargeant et al.* (Sargeant et al. 1994) haben herausgefunden, dass die Imidazol-Antimykotika die Protein-Tyrosin-Phosphorylierung inhibieren und eine Depolarisation der Plasmamembran von Thrombozyten bewirken.

All diese Studien geben Hinweise darauf, dass Antimykotika die Thrombozyten auf verschiedene Wege beeinflussen. Dennoch wurde aber in keiner der genannten Studien die Wirkung der Antimykotika konkret auf die Thrombozytenaggregation untersucht. Die einzigen

Arbeiten mit diesem Untersuchungsziel waren eine Studie von *Ishikawa et al.* (Ishikawa et al. 1986) und von *Steinhilber et al.* (Steinhilber et al. 1990).

Letztgenannte Arbeitsgruppe untersuchte die Beeinflussung des 5-Lipoxygenase-Stoffwechsels in menschlichen polymorphonukleären Leukozyten, des Eicosanoid-Metabolismus in Thrombozyten, der Thrombozyten-Aggregation und des Cyclooxygenase-Stoffwechsels durch die Azol-Antimykotika Itraconazol, Fluconazol, Miconazol und Ketokonazol. Die aggregationshemmende Wirkung der Antimykotika wurde nach der Aggregometer-Methode von Born (Born 1962) nachgewiesen. Die Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass Itraconazol ein potenter Inhibitor der Leukotrien-Freisetzung ist, während es keinen Einfluss auf die Cyclooxygenase und die Thrombozytenaggregation besitzt. Fluconazol war in allen Testsystemen unwirksam. Miconazol wurde als Inhibitor der Thromboxan-Synthase und der Thrombozytenaggregation identifiziert. Ketokonazol war in dieser Hinsicht weniger effektiv (Steinhilber et al. 1990).

Ishikawa et al. untersuchten den Effekt des Antimykotikums Miconazol auf die Thrombozytenaggregation mit der Aggregometer-Methode von *Feinman et al.* (Feinman et al. 1977). Diese Untersucher fanden, dass die Thrombozytenaggregation sowohl nach i.v.-Applikation von Miconazol in Kaninchen als auch nach in vitro-Gabe von Miconazol zu Thrombozyten von Kaninchen und Menschen signifikant reduziert war. Mit weiteren biochemischen Analysen konnten sie zeigen, dass Miconazol die Cyclooxygenase der Thrombozyten inhibiert, ohne auf die Freisetzung von Arachidonsäure aus Phospholipiden der Thrombozyten zu wirken. Zudem fand die Arbeitsgruppe, dass Miconazol kein selektiver Thromboxan-Synthase-Inhibitor ist und dass der inhibitorische Effekt auf die Cyclooxygenase der Thrombozyten im Vergleich zu Acetylsalicylsäure nicht so lange andauert (Ishikawa et al. 1986).

Insgesamt kann man sagen, dass die Fragestellung, welchen Effekt Antimykotika auf die Thrombozytenaggregation haben, bisher unzureichend erforscht ist. Die wenigen publizierten Studien haben nur die Azol-Antimykotika Itraconazol, Fluconazol, Miconazol und Ketokonazol untersucht; es gibt keine Untersuchungen über die Wirkung der Antimykotika anderer Wirkstoffgruppen auf die Thrombozytenfunktion.

4.9 Wirkung von antibakteriellen Substanzen auf die Thrombozytenaggregation

Im Vergleich zu den Antimykotika gibt es zahlreiche Studien über die Interaktion antibakterieller Substanzen mit der Thrombozytenaggregation. Beispielsweise untersuchten *Cazzola et al.* in mehreren Studien (Cazzola et al. 1991a, Cazzola et al. 1991b, Cazzola et al. 1993) die Wirkung von verschiedenen Cephalosporinen und Teicoplanin auf die Funktion der

Blutplättchen in vitro. Sie fanden heraus, dass sowohl die meisten Cephalosporine als auch das Glykopeptid-Antibiotikum Teicoplanin die Thrombozytenfunktion bei sehr hohen Konzentrationen hemmen, jedoch nicht in den Konzentrationen, die in vivo bei regulärer Einnahme der Medikamente erreicht werden. Die gleiche Arbeitsgruppe untersuchte auch die Wirkung des Fluorchinolons Pefloxacin und konnte zeigen, dass dieses Antibiotikum keinen Effekt auf die Thrombozytenaggregation hat (Cazzalo et al. 1995).

Eine Studie von *Agnelli et al.* (Agnelli et al. 1987) bestätigte, dass das Glykopeptid-Antibiotikum Teicoplanin zwar die Thrombozytenaggregation beeinflusst, jedoch erst bei sehr hohen Konzentrationen, die in der Klinik nicht erreicht werden. Zu einem vergleichbaren Ergebnis ist auch eine Arbeitsgruppe von *Rossi et al.* gekommen (Rossi et al. 1992). Dagegen fand die Arbeitsgruppe von *Porta und Ricchetti*, dass Teicoplanin auch in sehr hohen Konzentrationen die Aktivität der Thrombozytenaggregation nicht beeinflusst (Porta and Ricchetti 1986).

Kariyazono et al. (Kariyazono et al. 1997) untersuchten in einer Studie die Wirkung von sechs verschiedenen Antibiotika auf die Thrombozytenaggregation. In ihrer Studie fand sich, dass die Cephalosporine Flomoxef, Latamoxef, Cefotiam und Cefamandole die Thrombozytenaggregation sowohl nach Aktivierung mit Adenosindiphosphat (ADP) als auch mit Kollagen hemmen, während das Monobactam Aztreonam nur die Aggregation durch ADP und Cefmetazole die Thrombozytenaggregation gar nicht beeinflusst. Eine Studie von *Custer et al.* (Custer et al. 1979) fand dagegen heraus, dass Cefmandol bei einer vielfach höheren Konzentration als in der Klinik die Funktion der Blutplättchen beeinflusst.

In einer Studie von *Losasso et al.* (Losasso et al. 1995) fand die Arbeitsgruppe heraus, dass auch die Fluorchinolone Lomefloxacin und Sparfloxacin die Thrombozytenfunktion beeinträchtigen, aber nur in einer deutlich über der klinisch erreichbaren Konzentration.

Bang et al. (Bang et al. 1982) konnten in ihrer Studie zeigen, dass Moxalactam genauso wie 27 von 33 getesteten Betalactam-Antibiotika bei hohen Konzentrationen die Thrombozytenaggregation in vitro inhibiert. Auch *Fletcher et al.* (Fletcher et al. 1986) konnten in ihrer Studie zeigen, dass die Betalaktam-Antibiotika Nafcillin, Mezlocillin, Piperacillin, Azlocillin, Ticarcillin, Carbenicillin und Penicillin G in absteigender Potenz die Thrombozytenaggregation inhibieren.

In einer Studie fanden *Agnelli et al.* (Agnelli et al. 1987) heraus, dass das Monobaktam-Antibiotikum Aztreonam die Aggregation der Blutplättchen zwar in sehr hohen Konzentrationen inhibiert, jedoch nicht im therapeutischen Konzentrationsbereich. Auch *Tartaglione et al.* (Tartaglione et al. 1986) kamen zu dem Ergebnis, dass Aztreonam ebenso wie Cefotaxim, Moxalactam, Piperacillin und Carbenicillin die Thrombozytenaggregation bei

übermäßig hohen Plasmakonzentrationen inhibiert. Die Arbeitsgruppe von *Fedder et al.* (Fedder et al. 1983) fand ebenfalls heraus, dass Carbenicillin die Thrombozytenaggregation in hohen Konzentrationen hemmt, während ihre Daten keinen solchen Effekt für die Antibiotika Cefoxitin und Cefamandol zeigten.

Die Arbeitsgruppe von *Nubile et al.* (Nubile et al. 1985) untersuchte die Aminoglykoside Gentamicin, Spectinomycin und Dihydrostreptomycin und konnte für diese Antibiotika eine dosisabhängige Reduktion der Thrombozytenfunktion nachweisen, wobei Gentamicin das in dieser Hinsicht effektivste Aminoglykosid war.

Ziemen et al. (Ziemen et al. 1986) konnten in einer in vivo-Studie bei sieben Patienten zeigen, dass das Carbapenem-Antibiotikum Imipenem in der üblichen Kombination mit Cilastatin die durch Kollagen induzierte Thrombozytenaggregation inhibiert.

In einer in vivo-Studie bei Hunden konnten *Webb et al.* (Webb et al. 2006) zeigen, dass die Antibiotika Doxycyclin, Amoxicillin, Cephalexin und Enrofloxacin keinen Effekt auf die Thrombozytenfunktion haben. Ebenfalls an Hunden untersuchten *Wilkins et al.* (Wilkins et al. 1995) die Cephalosporine Cephalothin, Cefazolin und Cefmetazol. Sie fanden heraus, dass Cephalothin im Gegensatz zu Cefazolin die Aggregation der Blutplättchen bei hohen Konzentrationen hemmt. Dagegen kommt eine Studie von *Schermerhorn et al.* (Schermerhorn et al. 1994) bei gesunden Hunden zu dem Ergebnis, dass Cephalothin die Fähigkeit der Blutplättchen zu aggregieren nicht beeinflusst.

Zusammenfassend kann man sagen, dass es im Gegensatz zu den Antimykotika mehrere Studien über die Wirkung von antibakteriellen Antibiotika auf die Thrombozytenfunktion gibt und all diese Studien ein ähnliches Ziel hatten wie die vorliegende Studie zu Antimykotika. In keiner dieser Studien wurde bislang das Multiplate®-Instrument für die Untersuchung der Thrombozytenfunktion verwendet.

4.10 Diskussion der Studienergebnisse

4.10.1 Polyen-Antimykotika

4.10.1.1 Amphotericin B und Amphotericin-B-Lipidformulierungen

Im Gegensatz zu den anderen Antimykotika wirkt Amphotericin B nicht durch Eingreifen in spezielle Stoffwechselfvorgänge in Pilzzellen, sondern durch direkte Interaktion mit Sterinen der Pilzmembran. Wie oben ausführlich beschrieben wird Amphotericin B aufgrund seiner strukturellen Ähnlichkeit zu Ergosterin in die Zellmembran von Pilzzellen eingelagert und bildet nicht-wässrige Poren, so dass es zum Efflux von monovalenten Kationen,

Aminosäuren, kleinen Peptiden und Nukleinsäurederivaten kommt. Bei höheren Amphotericin B-Konzentrationen werden auch wässrige Poren gebildet, die für H^+ , OH^- und zweiwertige Kationen permeabel sind. Es kommt zum Anstieg des intrazellulären pHs, der eine Membranschädigung bewirkt und die Fungizidie verursacht.

Neben Ergosterin hat Amphotericin B auch Affinität zu Cholesterin, dem wesentlichen Sterin in der Zellmembran des Menschen, und diese Affinität ist Grundlage der meisten Nebenwirkungen, die bei einer systemischen Anwendung beobachtet werden. Wie oben bereits ausgeführt, steht die Zellmembran im Zentrum der Thrombozytenaggregation und ist für die Funktion der Blutplättchen unerlässlich. Die Zellmembran der Thrombozyten enthält wie alle anderen menschlichen Körperzellen auch Cholesterin und ein Eingreifen von Amphotericin B in die Integrität der Zellmembran von Thrombozyten könnte in einer herabgesetzten Thrombozytenaggregation resultieren. Mehr als bei allen anderen Antimykotika könnte man also bei Amphotericin B einen Effekt auf die Thrombozytenfunktion erwarten.

In der vorliegenden Arbeit untersuchten wir konventionelles Amphotericin B Deoxycholat und drei Amphotericin B-Lipidformulierungen.

Wie beschrieben, zeigte sich für das konventionelle Amphotericin B Deoxycholat sowohl für Aktivierung mit Adenosindiphosphat (ADP), als auch mit Kollagen und Thrombin receptor activating peptide 6 (TRAP-6) kein Signal für eine Veränderung der Thrombozytenaggregation bei Konzentrationen bis zu dem fünffachen der bei therapeutischer Anwendung beobachteten mittleren Plasma-Spitzenpiegel.

Für Amphotericin B Lipid Complex zeigte sich bei Aktivierung der Thrombozytenaggregation sowohl mit Adenosindiphosphat (ADP), als auch mit Kollagen und Thrombin receptor activating peptide 6 (TRAP-6) eine statistisch signifikante Reduktion der Thrombozytenaggregation ($p=0,0012$ für ADP, $p=0,0001$ für Kollagen und $p=0,0356$ für TRAP-6). Während sich mit Dunn's post-test für Kollagen und TRAP-6 keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen einzelnen Gruppen zeigten, war bei Aktivierung der Thrombozyten mit ADP der mittlere AUAC-Wert (*Area under the aggregation curve*) der fünffachen Plasmakonzentration im Vergleich zu den Kontrollproben ohne Zugabe von Medikamenten, zu der Kontrollmessung mit alleiniger Zugabe von Glucose und zur minimalen Plasmakonzentration um 18-19 % reduziert.

Auch für das liposomale Amphotericin B unterschieden sich die AUAC-Werte bei den verschiedenen Konzentrationen dieses Antimykotikums bei allen drei Aktivatoren der Thrombozytenaggregation signifikant ($p=0,0058$ für ADP, $p=0,0139$ für Kollagen und $p=0,0007$ für TRAP-6). Nach Aktivierung mit ADP war der AUAC-Wert der fünffachen

Plasmakonzentration war im Vergleich zum Referenzwert ohne Medikament um 20 % statistisch signifikant reduziert.

Für Amphotericin B Colloidal Dispersion zeigte sich bei allen drei Aktivatoren eine statistisch signifikante Reduktion der Thrombozytenaggregation ($p=0,0014$ für ADP, $p=0,0130$ für Kollagen und $p=0,0002$ für TRAP-6). Der AUAC-Wert der fünffachen Plasmakonzentration war im Vergleich zum Referenzwert ohne Medikamentenzugabe bei Aktivierung der Thrombozytenaggregation mit ADP um 16,3 % und im Vergleich zum Kontrollwert mit alleiniger Zugabe von Glucose um 20 % statistisch signifikant reduziert. Auch der Vergleich des AUAC-Wertes der Kontrolllösung mit Glucose mit der maximalen Plasmakonzentration war um 19,3% statistisch signifikant vermindert.

Aus diesen Ergebnissen wird deutlich, dass innerhalb des gemessenen Konzentrationsbereiches nur die Amphotericin B-Lipidformulierungen und nicht das konventionelle Amphotericin B Deoxycholat einen Einfluss auf die Thrombozytenaggregation haben. Das könnte darauf hinweisen, dass nicht das Antimykotikum an sich, sondern deren Lipidcarrier die Inhibition der Thrombozytenfunktion bewirken. Um diesen Sachverhalt weiter zu untersuchen, wurde Amphotericin B-Pulver in DMSO aufgelöst und dessen Wirkung auf die Thrombozytenaggregation im Multiplate®-Instrument in Konzentrationen von bis zu 100 µg/mL getestet. Es zeigte sich für alle drei Aktivatoren keine signifikante Veränderung der AUAC-Werte bei steigenden Konzentrationen des in DMSO und 5%iger Glucose aufgelösten Amphotericin B-Pulvers ($p=0,1036$ für ADP, $p=0,267$ für Kollagen und $p=0,083$ für TRAP-6).

Diese Ergebnisse stützen die Vermutung, dass nicht das Amphotericin B als Substanz, sondern die Lipide, in denen es gelöst wird, für die Hemmung der Thrombozytenaggregation ursächlich sind.

4.10.1.1.1 Einfluss von Lipiden auf Thrombozyten

Es gibt in der Literatur zahlreiche Arbeiten über den Einfluss von Lipidinfusionen, vorwiegend zur parenteralen Ernährung, auf die Thrombozytenfunktion. Ihre Ergebnisse sind nicht einheitlich.

Orth et al. (Orth et al. 1995) konnten zeigen, dass die Lipoproteine VLDL (very low density lipoprotein) und Chylomikronen in Konzentrationen, die mit denen nach einer fettreichen Mahlzeit vergleichbar sind, die Aggregation von Thrombozyten reduzieren. *Wang et al.* (Wang et al. 1995) fanden heraus, dass die Thrombozytenaggregation nach der Infusion einer 10%igen Lipidemulsion signifikant vermindert war. Auch *Aviram* und *Deckelbaum* (Aviram and Deckelbaum 1989) kamen zu dem Ergebnis, dass die beiden Hauptbestandteile der

intravenösen Fettemulsion Intralipid® die Thrombozytenaggregation inhibieren und dazu führen, dass die Thrombozyten weniger Cholesterin enthalten. Intralipid® enthält als Fettkomponente das Sojabohnenöl, das aus einer Mischung von Triglyceriden mit überwiegend mehrfach ungesättigten Fettsäuren besteht; Emulgatoren sind aus Eigelb isolierte Phospholipide. Die Fettpartikel entsprechen in Größe und biologischen Eigenschaften den natürlichen Chylomikronen. Die Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass sich nach Gabe von Intralipid® die Zusammensetzung der Zellmembran der Thrombozyten veränderte. Der Anteil von freiem Cholesterin in der Membran war um 20% reduziert, während der Anteil der Triglyceride um das 3,5 fache und der der Phospholipide um das Doppelte erhöht war. Zu den gleichen Ergebnissen führte auch die getrennte Gabe der beiden Komponenten von Intralipid®, Phospholipidliposomen und Triglycerid-Phospholipid-Partikeln. Die Arbeitsgruppe vermutete, dass die reduzierte Thrombozytenfunktion auf einer veränderten Lipidzusammensetzung der Zellmembran beruht. Dieser Mechanismus wäre auch für die eigenen Beobachtungen relevant, insbesondere für ABLC und LAMB, deren Lipidcarrier im wesentlichen aus Phospholipiden besteht.

Auch *Zhou* (Zhou 1997) und Mitarbeiter haben die Effekte von Intralipid® studiert und konnte zeigen, dass es nach der Inkubation von Ratten-Thrombozyten mit Intralipid® zu einer dosisabhängigen Inhibition der Thrombozytenaggregation sowohl nach Aktivierung mit ADP, als auch Kollagen und TRAP-6 gekommen ist. Diese Hemmung war verbunden mit einem Verlust von Cholesterin und einer Aufnahme von Intralipid®-Partikeln in die Thrombozytenmembran, welche mit radioaktiv markierten Intralipid®-Partikeln nachgewiesen werden konnte. *Campbell et al.* (Campbell et al. 1984) haben in einem Case-report ein sieben Jahre altes Mädchen beschrieben, dass nach der Gabe von Intralipid® eine massive Hämatemesis aufgrund einer Funktionsstörung der Thrombozyten entwickelte. Eine Arbeit von *Juliano et al.* (Juliano et al. 1983) hat ergeben, dass positiv geladene Liposomen die Aggregation der Blutplättchen nach Aktivierung mit ADP hemmen, während negativ geladene Vesikel eher deren Antwort auf Thrombin inhibieren. *Zakrevskii et al.* (Zakrevskii et al. 1993) haben beschrieben, dass die Thrombozytenaggregation in Gegenwart von Lecithin, Cholesterol und Phosphatidylserin reduziert war.

Die bisher genannten Studien zeigen, dass die Gegenwart verschiedener Lipide die Thrombozytenaggregation hemmen kann, was eine Erklärung für die Ergebnisse der eigenen Arbeit sein könnte. Es gibt jedoch auch eine Reihe von Arbeiten, die zu dem gegenteiligen Ergebnis kommt und die Theorie unterstützt, dass gerade Lipoproteine an dem

Zustandekommen von Thrombosen beteiligt sind. So haben *Surya* und *Akkerman* (Surya and Akkerman 1993) in einem Review verschiedene Arbeiten zu diesem Thema verglichen und sind zu dem Ergebnis gekommen, dass LDLs (low density lipoproteins) die Thrombozytenaggregation triggern und verstärken. *Aviram et al.* (Aviram and Brook 1983) fanden, dass VLDLs und LDLs die Thrombozytenaktivierung durch Thrombin verstärken, während HDLs (high density lipoproteins) diese vermindern. *Hassall et al.* (Hassall et al. 1983) haben gezeigt, dass die Blutplättchen in Gegenwart von LDL und Aktivierung mit ADP und Adrenalin vermehrt aggregieren. Entsprechend haben *Sinzinger et al.* (Sinzinger et al. 1996) beschrieben, dass eine Verminderung von LDL durch LDL-Apherese die durch ADP induzierte Plättchenaggregation reduziert. *Saladino et al.* (Saladino et al. 1993) haben festgestellt, dass die parenteralen Lipidinfusionen Lipofundin-S® und Liposyn® die Thrombozytenaggregation verstärken.

Bis auf eine Studie von *Porta et al.* (Porta et al. 1994), die ergeben hat, dass die beiden Lipidlösungen Intralipid® und Lipofundin® die Thrombozytenaggregation nicht beeinflussen, haben die bisher genannten Studien gezeigt, dass Lipide deutliche Effekte auf die Thrombozytenaggregation haben, wenngleich unterschiedliche Auswirkungen der Lipide beobachtet wurden.

Aufgrund welcher Mechanismen es zu diesen Resultaten kommen könnte, wurde in den folgenden Arbeiten untersucht. Drei Studien beschreiben, dass infundierte Lipide in die Membran der Thrombozyten eingebaut werden können. So haben *Simoens et al.* (Simoens et al. 2008) festgestellt, dass nach einer Infusion von mittel- und langkettigem Triacylglycerol aus Sojabohnen und Fischöl Eicosapentaensäure (C20:5n-3) in die Phospholipidmembran von Leukozyten und Thrombozyten eingebaut wurde. Auch *Ball et al.* (Ball 1992) konnten zeigen, dass sowohl nach Gabe von mittel- als auch langkettigen Fettsäuren vermehrt Linolein- und Arachidonsäure in die Plasmamembran der Thrombozyten eingebaut wurden, wobei dieser Effekt bei langkettigen Fettsäuren am deutlichsten war. Die Arbeitsgruppe von *McLeod et al.* (McLeod et al. 1982) hat festgestellt, dass nach Inkubation von Liposomen mit Thrombozyten Cholesterin und dessen Analoga mit kürzeren Seitenketten in die Membran der Blutplättchen eingebaut wurden. Weiterhin fanden sie heraus, dass die mit Cholesterin angereicherten Thrombozyten im Vergleich zu normalen Thrombozyten eine erhöhte Aggregation nach Aktivierung mit Kollagen zeigten, wobei dieser Effekt mit den Cholesterinanaloga noch ausgeprägter war, so dass die Thrombozyten spontan, ohne Zugabe eines Aktivators aggregierten. Diese Arbeit zeigt also, dass die Gabe von Lipiden durch deren Einbau in die Thrombozytenmembran direkte Effekte auf die Thrombozytenfunktion hat.

Eine weitere Beobachtung mehrerer Arbeiten ist, dass nach Infusion von Lipiden die

Thrombozytenzahl deutlich vermindert sein kann. So beschrieben *Goulet et al.* (Goulet et al. 1986), dass bei allen sieben in ihrer Studie beobachteten Patienten nach der Gabe von Intralipid® eine Thrombozytopenie auftrat und die Lebenszeit der Thrombozyten reduziert war. Auch *Loughrey et al.* (Loughrey et al. 1990) fanden heraus, dass nach der Infusion von Phosphatidylglycerol in Ratten eine Thrombozytopenie auftrat, die auf eine durch den Komplementfaktor C3b vermittelte Bildung von Mikroaggregaten aus Phosphatidylglycerol-Liposomen und Thrombozyten zurückzuführen ist. Auch *Reinish et al.* (Reinish et al. 1988) haben festgestellt, dass die Thrombozytenzahl nach Gabe von Lipidinfusionen reduziert war und dass diese Verminderung auf die Bildung von Aggregaten zwischen den Liposomen und den Thrombozyten zurückzuführen war. Die Arbeitsgruppe beschreibt, dass dieser Effekt besonders ausgeprägt war bei negativ geladenen multilamellaren Liposomen, die Phosphatidylglycerol enthielten. *Zbinden et al.* (Zbinden et al. 1989) haben ebenfalls beschrieben, dass es sowohl in vitro als auch in vivo in Meerschweinchen nach der Gabe von Lipiden mit negativ geladenen Liposomen zur Bildung von reversibeln Aggregaten zwischen Blutplättchen und Liposomen kam, während dieser Effekt bei neutralen oder positiv geladenen Oberflächen der Liposomen nicht beobachtet werden konnte. Da sowohl die Lipide von Amphotericin B Colloidal Dispersion, als auch von Amphotericin B Lipid Complex und liposomalem Amphotericin B negativ geladen sind, könnte dieser Mechanismus die in unserer Studie beobachtete reduzierte Thrombozytenaggregation erklären.

Juliano et al. (Juliano et al. 1983) haben in einer Arbeit die Wirkung von verschiedenen Liposomen auf die Aggregation sowohl von Thrombozyten in normalem Plasma als auch von gewaschenen Thrombozyten in einer Pufferlösung mit der Thrombozytenaggregometrie nach Born untersucht. Sie fanden, dass positiv geladene kleine unilamellare Liposomen (SUV = small unilamellar vesicle) die durch ADP ausgelöste Thrombozytenaggregation in Plasma effektiv inhibieren, während negativ geladene SUVs die Fähigkeit der Aggregation der Thrombozyten in der Pufferlösung und Aktivierung mit Thrombin inhibierten. Der Effekt der positiv geladenen Liposomen scheint indirekt zu sein, da er nur im Plasma und nicht in den gewaschenen Thrombozyten auftritt, während die negativ geladenen Liposomen scheinbar direkt mit den gewaschenen Thrombozyten interagieren. Aufgrund dieser Ergebnisse vermutet die Arbeitsgruppe, dass der Effekt der positiv geladenen Liposomen durch einen Faktor im Plasma vermittelt wird, vermutlich Fibrinogen, während die Wirkung der negativ geladenen Liposomen dadurch zustande kommt, dass die Liposomen an die Thrombozyten binden und dadurch wichtige Oberflächenbestandteile blockieren oder die Umorganisation der Membran behindern, die für den shape change der Blutplättchen und damit für die Aggregation bedeutend ist. Die Lipide aller drei Amphotericin B-Lipidformulierungen sind negativ geladen. Die einzige

Amphotericin B-Lipidformulierung mit SUVs ist Liposomales Amphotericin B, dessen SUVs aus hydriertem Sojaphosphatidylcholin, Cholesterin und Distearylphosphatidylglycerin (DSPG) bestehen. Phosphatidylcholin und Cholesterin sind ungeladen, während DSPG anionisch ist. Übertragen auf die Studie von Juliano et al. könnte also die bei liposomalem Amphotericin B und Aktivierung mit TRAP-6 gemessene reduzierte Thrombozytenaggregation durch eine direkte Interaktion der negativ geladenen SUVs mit der Thrombozytenmembran erklärt werden.

Zusammenfassend lässt sich bezüglich der Interaktion von Lipiden mit Thrombozyten sagen, dass es in der Literatur mehrere Arbeiten über den Effekt von Lipidinfusionen auf Thrombozyten gibt. Einige Studien konnten zeigen, dass es nach der Gabe von Lipidinfusionen wie beispielsweise Intralipid® zu einer reversiblen Bildung von Mikroaggregaten zwischen Liposomen und Thrombozyten kommt und dass die Thrombozyten durch eine veränderte Lipidzusammensetzung ihrer Zellmembran in ihrer Fähigkeit zur Aggregation gehemmt werden. Beide Effekte würden die in unserer Studie beobachtete reduzierte Thrombozytenaggregation nach Zugabe der Amphotericin-B-Lipidinfusionen erklären.

Die Beobachtung, dass die Thrombozytenaggregation in unseren Untersuchungen besonders stark bei Zugabe des Aktivators ADP reduziert war, entspricht den Ergebnissen der Studie von Aviram und Deckelbaum (Aviram and Deckelbaum 1989), In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Thrombozytenaggregation nach der Infusion von Intralipid® bei Kollagen um 40%, und bei ADP sogar um 45% reduziert war. Es wäre denkbar, dass die Lipidformulierungen wie oben beschrieben zu einer veränderten Lipidzusammensetzung der Zellmembran führen, so dass insbesondere die Aktivierung der Thrombozyten mit dem relativ schwachen Aktivator ADP über die spezifischen ADP-Rezeptoren vermindert ist, in geringerem Ausmaß auch die Aktivierung durch Kollagen und TRAP-6, die prinzipiell stärkere Aktivatoren der Thrombozytenaggregation sind.

Welche Mechanismen genau für das Zustandekommen der beobachteten Interaktion in supratherapeutischen Konzentrationen verantwortlich sind, geht über die Fragestellung der vorliegenden Arbeit hinaus. Oben beschriebene Studien können jedoch wichtige Anhaltspunkte geben und mögliche kausale Zusammenhänge aufzeigen.

4.10.1.2 Liposomales Nystatin

Liposomales Nystatin ist ein Polyen-Antimykotikum mit dem gleichen Wirkungsmechanismus wie Amphotericin B.

In unserer Arbeit zeigte sich, dass für steigende Konzentrationen dieses Polyen-Antimykotikums und Aktivierung der Thrombozyten mit ADP, Kollagen und TRAP eine

reduzierte Aggregation der Thrombozyten beobachtet werden konnte ($p=0,0022$ für ADP, $p=0,0156$ für Kollagen und $p<0,0001$ für TRAP-6). Im Vergleich zum Referenzwert ohne Medikamentenzugabe war die AUAC (*Area under the aggregation curve*) bei Zugabe der fünffachen Plasmakonzentration um 14,9 % statistisch signifikant reduziert. Gegenüber dem Kontrollwert mit Glucose war die maximale Plasmakonzentration um 6,3 % statistisch signifikant reduziert und im Vergleich zur maximalen Plasmakonzentration war der AUAC-Wert der fünffachen Plasmakonzentration um 11,4 % statistisch signifikant reduziert.

Nystatin enthält multilamellare Liposomen, die aus Dimyristolphosphatidylcholin (DMPC) und Dimyristolphosphatidylglycerol (DMPG) im Verhältnis 7:3 bestehen. Nystatin hat somit eine sehr ähnliche Zusammensetzung wie Amphotericin B Lipid Complex und die durch Nystatin beobachtete reduzierte Thrombozytenaggregation beruht vermutlich auf den gleichen Mechanismen wie oben für die Amphotericin B-Lipidformulierungen beschrieben.

4.10.2 Triazol-Antimykotika

4.10.2.1 Fluconazol

Der Wirkmechanismus der Azol-Antimykotika beruht auf einer Hemmung der Umwandlung von Lanosterin in Ergosterin über eine Bindung an das Häm-Eisen von Cytochrom P450, welches für die Funktion der 14- α -Demethylase notwendig ist. Dieses Enzym veranlasst die Umwandlung von Lanosterin in Ergosterin. Hier scheint eine mögliche Wirkung auf die Thrombozytenaggregation nicht so augenscheinlich wie bei den Polyen-Antimykotika.

Unsere Studie ergab für Fluconazol, dass sowohl für Aktivierung der Thrombozyten mit ADP als auch mit TRAP keine statistisch signifikante Veränderung der Thrombozytenaggregation bei verschiedenen Konzentrationen des Antimykotikums im Vergleich zu den Referenzwerten ohne Zugabe des Medikaments beobachtet werden konnte ($p=0,2052$ für ADP und $p=0,6496$ für TRAP). Lediglich bei Aktivierung mit Kollagen war eine signifikante Reduktion der Thrombozytenaggregation bei steigenden Konzentrationen des Antimykotikums messbar ($p=0,0037$). Nach Korrektur für multiple Vergleiche zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen einzelnen Gruppen.

Fluconazol inhibiert zwar in der Leber die Cytochrom P450-Isoenzyme CYP 3A4, CYP 2C9 und CYP 2C19, wird jedoch nicht metabolisiert und zu über 90 % unverändert renal eliminiert. Daher kann davon ausgegangen werden, dass eine in vitro-Zugabe von Fluconazol zu Blut, wie sie in dieser Studie erfolgt ist, weitgehend dessen Wirkung auf Blutbestandteile in vivo simuliert.

In unserer Studie wurde ein geringer inhibitorischer Effekt von Fluconazol auf die

Thrombozytenaggregation bei Aktivierung mit Kollagen beobachtet. Es scheint also durch das Fluconazol zu einer Beeinflussung speziell des Aktivierungsweges über Kollagen (siehe 4.3) zu kommen. Welcher Mechanismus für die Inhibition der Thrombozytenaggregation durch Fluconazol verantwortlich ist, liegt außerhalb der Fragestellung dieser Arbeit.

4.10.2.2 Itraconazol

Unsere Untersuchung ergab, dass sich für ADP eine nahezu signifikante, für Kollagen und TRAP aber keine signifikante Veränderung der Thrombozytenaggregation bei verschiedenen Konzentrationen des Antimykotikums Itraconazol zeigte (für ADP $p=0,0527$; für Kollagen $p=0,1468$, für TRAP $p=0,5379$).

Itraconazol unterliegt einem ausgeprägten hepatischen Metabolismus, bei dem eine Reihe von aktiven Metaboliten entstehen. Von diesen Metaboliten hat Hydroxy-Itraconazol die größte Bedeutung, weil seine antifungale Aktivität im Vergleich zu Itraconazol genauso hoch ist und es eine zwei- bis dreimal so hohe Plasmakonzentration hat (Poirier and Cheymol 1998).

In unserer in vitro-Studie wurden die Antimykotika in verschiedenen Konzentrationen zu den Blutproben von gesunden Probanden gegeben. So werden Aspekte wie die Resorption und Metabolisierung der Medikamente im menschlichen Körper nicht beachtet. Das bedeutet, dass im Rahmen dieser Studie nur die Aussage gemacht werden kann, dass der Wirkstoff Itraconazol an sich keine Veränderung der Thrombozytenaggregation macht. Demgegenüber kann keine Äußerung darüber gemacht werden, ob es nach Einnahme des Medikamentes im menschlichen Körper zu einer verminderten Thrombozytenfunktion durch einen Metaboliten des Itraconazols kommen kann.

4.10.2.3 Voriconazol

Für das Antimykotikum Voriconazol zeigte sich, dass nur für ADP eine signifikante Reduktion der Thrombozytenaggregation bei steigenden Konzentrationen des Antimykotikums messbar war ($p=0,0447$). Der Vergleich verschiedener Stichproben mit dem Dunn's post-Test war jeweils nicht signifikant. Sowohl für Aktivierung der Thrombozyten mit Kollagen als auch mit TRAP konnte keine statistisch signifikante Veränderung der Thrombozytenaggregation bei verschiedenen Konzentrationen des Antimykotikums beobachtet werden ($p=0,2102$ für Kollagen und $p=0,0917$ für TRAP).

Voriconazol wird in der Leber über N-Oxidation durch die Cytochrome P450 Isoenzyme CYP 2C19, CYP 2C9 und CYP 3A4 verstoffwechselt, wobei verschiedene Metabolite entstehen. Unsere Studie hat für den Wirkstoff Voriconazol gezeigt, dass bei Aktivierung mit ADP eine leichte Inhibition der Thrombozytenaggregation beobachtet werden

konnte. Es scheint also durch das Voriconazol zu einer Inhibition in dem Aktivierungsweg durch ADP (siehe 4.3) zu kommen. Welcher exakte Mechanismus für die Inhibition der Thrombozytenaggregation durch Voriconazol verantwortlich ist, geht über den Rahmen der vorliegenden Arbeit hinaus. Ebenso kann in dieser in vitro-Studie keine Aussage darüber gemacht werden, ob eventuell aktive Metabolite in vivo weitere Effekte auf die Thrombozytenfunktion haben.

4.10.3 Flucytosin

Flucytosin (5-Fluorcytosin) wirkt als Antimetabolit-Vorstufe nur auf Hefepilze fungistatisch, weil in diesen das Enzym Cytosindeaminase vorhanden ist, welches das 5-Fluorcytosin zu 5-Fluoruracil desaminiert. Eine mögliche Wirkung auf die Thrombozytenaggregation erscheint nicht offensichtlich, ist aber nicht auszuschließen.

Unsere Studienergebnisse haben gezeigt, dass sich sowohl für ADP als auch für Kollagen und TRAP keine statistisch signifikante Veränderung der Thrombozytenaggregation bei verschiedenen Konzentrationen des Antimykotikums Flucytosin ergab (für ADP $p=0,2998$, für Kollagen $p=0,0731$, für TRAP $p=0,3037$).

Flucytosin wird in der Leber nur ganz minimal metabolisiert und vorwiegend unverändert renal ausgeschieden. Daher kann davon ausgegangen werden, dass unsere in vitro-Studie die Situation in vivo gut simuliert.

4.10.4 Echinocandin-Antimykotika

4.10.4.1 Caspofungin

Die Echinocandin-Antimykotika interferieren mit dem für Pilze spezifischen Enzym 1,3- β -Glucan-Synthase und wirken über eine Hemmung der Zellwandsynthese des Pilzes. Auch hier scheint eine Wirkung auf die Thrombozytenaggregation nicht so augenscheinlich wie bei den Polyen-Antimykotika, wäre aber vorstellbar.

Unsere Studienergebnisse haben gezeigt, dass sich sowohl für ADP, als auch für Kollagen und TRAP keine statistisch signifikante Veränderung der Thrombozytenaggregation bei verschiedenen Konzentrationen des Antimykotikums Caspofungin zeigte (für ADP $p=0,7818$, für Kollagen $p=0,0701$, für TRAP $p=0,2114$).

Caspofungin wird in der Leber durch Peptid-Hydrolyse und N-Acetylierung in hauptsächlich inaktive Metabolite verstoffwechselt und zerfällt auch spontan in inaktive Produkte, welche protrahiert über einige Tage mit der Galle ausgeschieden werden (Denning 2003, Kauffman and Carver 2008). Wie oben für die Triazol-Antimykotika beschrieben, besteht

eine Einschränkung unserer in vitro-Studie darin, dass nur die Wirkung der Substanz Caspofungin auf die Thrombozytenfunktion erfasst wurde und nicht die Effekte von Metaboliten, die im menschlichen Körper entstehen. Obwohl durch Pharmakokinetik-Studien bekannt ist, dass solche Metabolite antimykotisch inaktiv sind, wäre prinzipiell denkbar, dass sie eine Wirkung auf die Thrombozytenfunktion haben; das Design der vorliegenden Arbeit erlaubt jedoch hierzu keine Aussage.

4.10.4.2 Anidulafungin

Unsere Studie ergab, dass sowohl für Aktivierung der Thrombozyten mit ADP als auch mit Kollagen und TRAP keine statistisch signifikante Veränderung der Thrombozytenaggregation bei verschiedenen Konzentrationen des Echinocandins Anidulafungin beobachtet werden konnte ($p=0,4281$ für ADP, $p=0,4060$ für Kollagen und $p=0,4281$ für TRAP).

Anidulafungin wird nicht in der Leber metabolisiert und zerfällt im Plasma zum Teil langsam in inaktive Metabolite. Diese werden biliär ausgeschieden (Denning 2003, Kauffman and Carver 2008). Somit gilt für Anidulafungin das gleiche wie für Caspofungin: unsere Studie ergibt zwar keinen Hinweis darauf, dass Anidulafungin an sich einen Effekt auf die Thrombozytenaggregation hat, es wäre aber theoretisch möglich, dass die antimykotisch inaktiven Metabolite eine Wirkung auf die Thrombozytenfunktion haben.

4.11 Grenzen der vorgelegten Arbeit

Um die Ergebnisse dieser Studie einordnen zu können, ist es wichtig, auch die Grenzen ihrer Aussagekraft aufzuzeigen. Es wurde Blut von jeweils zehn gesunden Probanden entnommen und in vitro mit den Antimykotika versetzt. Die geringe Anzahl von Probanden reduziert die statistische Power und kann nur einen orientierenden Überblick über die verschiedenen Antimykotika bzw. Signale für mögliche Effekte geben. Inwieweit die Wirkung der Medikamente auf die Thrombozytenfunktion klinisch relevant ist, müsste in einer größeren klinischen Studie geklärt werden. Eine wichtige Einschränkung der Ergebnisse dieser Studie ist, dass wichtige Aspekte wie die Resorption und Metabolisierung der Medikamente im menschlichen Körper nicht beachtet werden konnten. Mithilfe von Pharmakokinetik-Studien der verschiedenen Antimykotika haben wir die Plasmakonzentrationen, die im menschlichen Körper bei regulärer Gabe erreicht werden ermittelt und entsprechende Konzentrationen der Arzneimittel zu den Blutproben gegeben. Letztlich wurde dadurch die Pharmakokinetik nur der Muttersubstanz simuliert und Metabolite und ihre Wirkungen nicht untersucht. Wir haben uns dennoch für eine in vitro-Studie entschieden, weil es aufgrund relevanter Nebenwirkung nicht

vertretbar wäre, Antimykotika wie z.B. Amphotericin B gesunden Probanden zu verabreichen. Zudem haben wir uns in dieser Studie für gesunde Freiwillige und die in vitro-Zugabe der Antimykotika entschieden, weil so Blut ohne und mit Medikament untersucht werden kann. So ist gewährleistet, dass Abweichungen der Thrombozytenaggregation von den Werten ohne Medikament nur auf die Antimykotika zurückzuführen sind. Zudem konnte aufgrund der Voraussetzung einer 14-tägigen Medikamentenfreiheit eine Interaktion verschiedener Pharmaka ausgeschlossen werden. Im Gegensatz dazu haben Patienten, die aufgrund einer invasiven Pilzinfektion Antimykotika einnehmen, meist schwere Grunderkrankungen, aufgrund derer sie viele verschiedene Medikamente bekommen, so dass ein Effekt der Antimykotika auf die Thrombozytenfunktion nicht eindeutig auf diese Medikamente zurückgeführt werden könnte.

Nachdem wir einen Effekt der Amphotericin B-Lipidformulierungen auf die Thrombozytenfunktion nachweisen konnten, haben wir durch Testung des Amphotericin B-Pulvers versucht zu zeigen, ob das Medikament an sich oder dessen Lipidcarrier für die Inhibition der Thrombozytenaggregation verantwortlich ist. Dieser Frage kann man jedoch nur limitiert nachgehen, weil man für die eindeutige Klärung auch die Lipidformulierungen ohne Medikament testen müsste. Diese Lipidformulierungen sind aber als Reinsubstanz entweder nicht erhältlich oder ihre genaue patentgemäße Zusammensetzung ist nicht bekannt und somit nicht zu imitieren.

4.12 Relevanz der Studienergebnisse für die Klinik

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass es unter der in vitro-Zugabe der drei verschiedenen Amphotericin B-Lipidformulierungen und des liposomalen Nystatins zu Vollblut von gesunden Probanden zu einer signifikanten Reduktion der Thrombozytenfunktion gekommen ist. Für die Amphotericin B-Lipidformulierungen wurde beobachtet, dass sowohl bei Aktivierung mit Kollagen und TRAP, besonders jedoch bei ADP die AUAC (*Area under the aggregation curve*)-Werte der fünffachen Plasmakonzentration im Vergleich zum Referenzwert ohne Medikamentenzugabe und im Vergleich zum Kontrollwert mit alleiniger Zugabe von Glucose um 16 – 20 % statistisch signifikant reduziert waren. Für Amphotericin B Colloidal Dispersion war auch der AUAC-Wert der maximalen Plasmakonzentration im Vergleich zur Kontrolllösung um 19,3 % statistisch signifikant vermindert.

Um die Relevanz der in dieser Studie beobachteten Ergebnisse einschätzen zu können, müssen verschiedene Faktoren bedacht werden. Zunächst soll darauf aufmerksam gemacht werden, dass eine Reduktion der Thrombozytenaggregation um 16 – 20 % in einer Größenordnung liegt, die zumindest bei gesunden Menschen mit einer ausreichenden Anzahl an Thrombozyten zu keinen größeren Blutungskomplikationen führen sollte. Die Mittelwerte der

AUAC lagen für die Aktivierung mit ADP und Zugabe aller Polyen-Antimykotika auch bei der fünffachen Plasmakonzentration noch im Referenzbereich von 534 – 1220 AU*min. Das macht deutlich, dass die bei der fünffachen Plasmakonzentration der Antimykotika beobachtete reduzierte Thrombozytenfunktion zwar statistisch signifikant im Vergleich zum Referenzwert ohne Medikament ist, jedoch noch im unteren Bereich des Referenzbereiches liegt und somit deutlich über dem Bereich, in dem mit klinisch relevanten Blutungskomplikationen gerechnet werden müsste. Eine Arbeitsgruppe von Görlinger et al. (Görlinger et al. 2007) gibt die angestrebten Zielbereiche bei antithrombozytärer Therapie mit <500 AU*min und die Grenze, ab der eine Thrombozytentransfusion bei Patienten mit Blutungskomplikationen indiziert ist mit <300 AU*min, jeweils für Aktivierung mit ADP, an.

In Bioäquivalenzstudien, die zum Nachweis der Austauschbarkeit (Essential Similarity) zweier Medikamente, typischerweise eines Generikums und eines Originators durchgeführt werden, werden Präparate als bioäquivalent angesehen, wenn die 90%-Konfidenzintervalle pharmakokinetischer Parameter innerhalb von 80 – 125 % liegen, sich also um nicht mehr als 20 – 25 % relativer Bioverfügbarkeit vom Referenzpräparat unterscheiden (U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration 2010). Unter Essential Similarity ist die gleiche qualitative und quantitative Zusammensetzung, die gleiche Darreichungsform und die gleiche Bioverfügbarkeit innerhalb definierter Grenzen zu verstehen. Als wissenschaftlich anerkannte Grundannahme bei diesen Studien gilt, dass im Wesentlichen gleichartige Plasmaspiegelverläufe bzw. -konzentrationen am Wirkort eine im Wesentlichen gleichartige Wirksamkeit und Sicherheit gewährleisten. Das macht deutlich, dass die in unserer Studie beobachtete Reduktion der Thrombozytenaggregation um maximal 20 % in einem Bereich liegt, in dem in Bezug auf die Thrombozytenfunktion eine gleiche Wirksamkeit und Sicherheit der verschiedenen Konzentrationen eines Medikaments anzunehmen ist.

Ein zweiter wichtiger Aspekt unserer Studienergebnisse ist, dass die beobachtete signifikante Reduktion der Thrombozytenaggregation bei den Amphotericin B-Lipidformulierungen hauptsächlich bei dem Vergleich von Referenzwert ohne Medikamentenzugabe mit dem AUAC-Wert der fünffachen mittleren Plasma-Spitzenkonzentration aufgetreten ist. Nur für Amphotericin B Colloidal Dispersion war auch der Vergleich der AUAC-Werte der maximalen Plasmakonzentration im Vergleich zum Referenzwert ohne Zugabe des Medikamentes um 19,3 % reduziert. In Pharmakokinetik-Studien wird ein Medikament ein- oder mehrmals gesunden Probanden oder einem Patientenkollektiv gegeben und es werden in regelmäßigen Abständen verschiedene Parameter bestimmt, unter anderem die minimale und maximale Konzentration des Wirkstoffs im Plasma. In unserer Studie untersuchten wir die minimale und maximale, die doppelte und die fünffache

maximale Plasmakonzentration. Obwohl davon auszugehen ist, dass es interindividuelle Unterschiede in der Resorption, Plasmakonzentration und Wirkung einer Substanz gibt, ist es unwahrscheinlich, dass bei Gabe der empfohlenen Dosierung das Fünffache der durchschnittlichen Plasma-Spitzenkonzentration erreicht wird. Nur für Amphotericin B Colloidal Dispersion konnte auch schon bei der maximalen Plasmakonzentration eine signifikante Verminderung der Thrombozytenaggregation beobachtet werden. Ebenso wie viele andere der unter 4.10 beschriebenen Studien über die Wirkung von Antibiotika auf die Thrombozytenfunktion hat auch unsere Studie also ergeben, dass einige Polyen-Antimykotika die Thrombozytenaggregation zwar hemmen, jedoch nur bei einer vielfach höheren Konzentration als die maximale Konzentration, die in der Regel bei Patienten erreicht wird.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die in dieser Studie beobachtete Reduktion der Thrombozytenfunktion bei gesunden Menschen wahrscheinlich keinen relevanten Effekt hat und bei ihnen nicht mit klinisch relevanten Blutungskomplikationen gerechnet werden muss. Trotzdem ist diese Studie aufschlussreich, weil sie zeigt, dass die Amphotericin B-Lipidformulierungen und das liposomale Nystatin in ausreichend hoher Konzentration eine verminderte Thrombozytenfunktion bewirken, eine Beobachtung, die vielleicht bei Patienten mit einer Thrombozytopenie oder einer Thrombozytopathie von wesentlicher Bedeutung sein kann. Es wäre denkbar, dass bei Patienten mit einer durch eine maligne Erkrankung oder eine Chemo- oder Radiotherapie reduzierte Thrombozytenzahl eine geringe Minderung der Fähigkeit der Blutplättchen zur Aggregation bedeutende Blutungen auslösen könnte. Auch bei Patienten mit einer angeborenen Thrombozytopathie aufgrund einer erblichen Erkrankung wie dem Bernard-Soulier-Syndrom, der Thrombasthenie Glanzmann oder bei Patienten mit einer erworbenen Thrombozytopathie aufgrund einer chronischen Niereninsuffizienz, akuten und chronischen Lebererkrankungen, Paraproteinämien, bestimmten soliden Tumoren, disseminierter intravasaler Gerinnung, Amyloidose, antithrombozytären Antikörpern, erworbenem von-Willebrand-Syndrom, bei Myelodysplasien, akuten Leukämien, myeloproliferativen Erkrankungen oder aufgrund der Einnahme verschiedener aggregationshemmender Medikamente könnte sich eine weitere Reduktion der Thrombozytenfunktion negativ auswirken.

Es wäre auch denkbar, dass es bei Einnahme anderer Pharmaka in Kombination mit den Antimykotika zu einer Wirkungspotenzierung, also einer nicht linearen, sondern exponentiellen Verstärkung der Wirkung dieser Substanz bzw. der Wirkung der Antimykotika kommt. Das wäre zum Beispiel vorstellbar bei Acetylsalicylsäure. Die Wirkung der Acetylsalicylsäure beruht auf der irreversiblen Hemmung der Cyclooxygenasen COX-1 und COX-2, welche die Bildung von Prostaglandinen und Thromboxan A₂ katalysieren. Die Acetylsalicylsäure überträgt

dabei einen Acetylrest auf den Aminosäurerest Serin kurz vor dem katalytischen Zentrum, wodurch die Arachidonsäure als Substrat des Enzyms das aktive Zentrum nicht mehr erreichen kann. Die COX-1 wird durch Acetylsalicylsäure etwa 10 - 100 mal stärker gehemmt als die COX-2. Infolgedessen können die Thrombozyten nach Einnahme von Acetylsalicylsäure nicht mehr durch Kollagen, welches eine Freisetzung von Arachidonsäure in den Thrombozyten bewirkt, aktiviert werden, wohl aber noch durch ADP oder TRAP. Würde ein Patient nun gleichzeitig ein Amphotericin B-Lipidpräparat bekommen, wodurch vor allem der Aktivierungsweg des ADP gehemmt ist, wäre es vorstellbar, dass diese zusätzliche Hemmung der Thrombozytenfunktion Folgen in Form von Blutungsereignissen nach sich ziehen könnte.

Ferner wäre eine Wirkungsverstärkung sowohl der Acetylsalicylsäure als auch der Triazol-Antimykotika denkbar, weil Acetylsalicylsäure in der Leber mit einigen Cytochromen interagiert, die ebenfalls für den Abbau der Triazol-Antimykotika zuständig sind. So interagiert Acetylsalicylsäure mit den Cytochromen CYP2C8 und CYP2C9, Voriconazol mit CYP 2C8, 2C9 und 2C19, Fluconazol mit CYP 2C8, 2C9, 2C19, 1A2, 2A4/5/6 und 2D6 und Itraconazol interagiert mit CYP 2C9 und 3A4/5/6. Es wäre denkbar, dass aufgrund einer Interaktion von Acetylsalicylsäure mit den Cytochromen der Leber der Abbau der Triazol-Antimykotika deutlich verzögert oder auch beschleunigt wird, was wiederum zu einer Wirkung der Antimykotika auf die Thrombozyten führen könnte.

Letztlich wäre vorstellbar, dass die Thrombozytenfunktion aufgrund der Wirkung einer Vielzahl von Pharmaka in Kombination mit den Antimykotika, besonders den Lipidformulierungen des Amphotericin B besonders stark inhibiert wird. Grund dafür ist, dass die Plättchen eine große Anzahl von verschiedenen Adhäsionsrezeptoren besitzen, so dass die Störung bzw. das Fehlen eines einzelnen Rezeptors einen geringen, kaum oder nicht zu erkennenden Defekt hervorrufen mag, während dieser erst in Kombination mit einem weiteren Mangel oder Defekt zu einer klinisch relevanten Blutungsstörung führt.

Zusammengefasst haben die in unserer Studie ermittelten Ergebnisse wahrscheinlich keinen direkten, klinisch relevanten Effekt auf die Behandlung von Menschen ohne eine Schädigung der Thrombozyten. Dennoch ist diese Studie wichtig, weil sie zeigt, dass die Amphotericin B-Lipidformulierungen und das liposomale Nystatin in ausreichend hoher Konzentration eine verminderte Thrombozytenfunktion bewirken. Dies könnte bei Patienten mit einer Thrombozytopenie oder einer Thrombozytopathie von Bedeutung sein. Die Daten geben Anlass zu weiteren Studien zu diesem Thema und weitere in vivo-Untersuchungen wären sinnvoll. Zumindest für die Triazol-Antimykotika und die Echinocandine, die ein wesentlich geringeres Nebenwirkungsspektrum haben als die Polyen-Antimykotika, wäre zu überlegen, ob eine in

vivo-Studie bei medikamentenfreien gesunden Probanden im steady state vertretbar ist, um weitere Daten zur Wirkung dieser Medikamente auf die Thrombozytenfunktion zu erwerben.

4.13 Zusammenfassung

Patienten mit Krebserkrankungen und invasiven Pilzinfektionen haben ein hohes Risiko für schwere Blutungen sowohl aufgrund der durch die maligne Erkrankung, intensive Chemotherapien, Knochenmark- oder Stammzelltransplantationen häufig auftretenden Thrombozytopenie als auch aufgrund der Neigung einiger Pilze zur Angioinvasion. Dennoch ist über eine mögliche Interaktion von Antimykotika mit der Thrombozytenaggregation und nachfolgend erhöhtem Blutungsrisiko wenig bekannt.

In unserer Studie wurde die Fragestellung untersucht, welchen Effekt elf verschiedene Antimykotika aus verschiedenen Substanzklassen auf die Thrombozytenfunktion haben. Dazu wurde Vollblut von zehn medikamentenfreien gesunden Freiwilligen in vitro mit den kommerziell erhältlichen i.v.-Zubereitungen der Antimykotika Amphotericin B Deoxycholat (Standarddosierung: 0.6mg/kg/d), Amphotericin B Colloidal Dispersion (4 mg/kg/d), Amphotericin B Lipid Complex (5 mg/kg/d), liposomalem Amphotericin B (5 mg/kg/d), liposomalem Nystatin (4 mg/kg/d), Fluconazol (400 mg/d), Itraconazol (200 mg/d), Voriconazol (8 mg/kg/d), Flucytosin (100 mg/kg/d), Anidulafungin (100 mg/d) und Caspofungin (50 mg/d) versetzt und die minimale (C_{min}), die maximale (C_{max}), die Doppelte der maximalen ($\times 2 C_{max}$) und die Fünffache der maximalen Plasmakonzentration ($\times 5 C_{max}$) nach Gabe der o.g. Standarddosierungen im steady state simuliert. Die Thrombozytenaggregation wurde mit dem Multiplate®-Impedanzaggregometer (Dynabyte, München) nach Aktivierung der Blutplättchen mit ADP, Kollagen oder TRAP-6 (Thrombin receptor activating protein) untersucht. Blutproben ohne Zugabe von Medikamenten dienten als Kontrolle. Endpunkt der Messung der Thrombozytenaggregation war die Fläche unter der Aggregation-vs-Zeit Kurve (AUAC, *area under the aggregation curve*). Unterschiede zwischen versetzten und nativen Proben wurden mit Hilfe gepaarter, nicht-parametrischer statistischer Tests analysiert.

Die Ergebnisse unserer Studie zeigen, dass Amphotericin B Colloidal Dispersion, Amphotericin B Lipid Complex, liposomales Amphotericin B und liposomales Nystatin im Vergleich zu der Kontrollgruppe ohne Medikamente die AUAC als Parameter der Thrombozytenaggregation signifikant und konzentrationsabhängig reduzierten mit einer maximalen Reduktion der AUAC von 15 bis 20 % bei $\times 5 C_{max}$ ($p < 0.05$ to < 0.001). Im Gegensatz dazu führten Amphotericin B Deoxycholat und in Dimethylsulfoxid (DMSO) aufgelöstes Amphotericin B-Pulver zu keinem messbaren Effekt. Fluconazol, Itraconazol und Voriconazol zeigten eine konzentrationsunabhängige Inhibition der Thrombozytenaggregation

nach Aktivierung der Blutplättchen mit Kollagen (Fluconazol; $p < 0.005$) und ADP (Voriconazol; $p < 0.05$, Itraconazol; $p = 0,0527$). Flucytosin, Anidulafungin und Caspofungin führten zu keiner nachweisbaren Hemmung der Thrombozytenaggregation.

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass nicht der Wirkstoff Amphotericin B an sich, sondern die Lipid-Carrier der Lipidformulierungen Amphotericin B Colloidal Dispersion, Amphotericin B Lipid Complex, liposomales Amphotericin B und liposomales Nystatin mit der Thrombozytenfunktion interagieren.

In der Literatur gibt es mehrere Arbeiten über den Effekt von Lipidinfusionen auf Thrombozyten, in denen gezeigt werden konnte, dass es nach der Gabe von Lipidinfusionen sowohl zu einer reversiblen Bildung von Mikroaggregaten zwischen Liposomen und Thrombozyten kommt, als auch, dass die Thrombozyten durch eine veränderte Lipidzusammensetzung ihrer Zellmembran in ihrer Fähigkeit zur Aggregation gehemmt werden. Beide Effekte würden die in unserer Studie beobachtete reduzierte Thrombozytenaggregation nach Zugabe der Amphotericin-B-Lipidinfusionen erklären.

Die durch die Zugabe der Lipidformulierungen des Amphotericin B beobachtete Thrombozytenfunktionshemmung wurde bei einer vielfach höheren der normalerweise bei Patienten erreichten Plasma-Spitzenkonzentration nachgewiesen und lag in einer Größenordnung, die zumindest bei gesunden Menschen mit einer ausreichenden Anzahl an Thrombozyten nicht zu größeren Blutungskomplikationen führen sollte. Dennoch könnte auch eine nur geringe Minderung der Thrombozytenfunktion bei Patienten mit einer Thrombozytopenie, einer angeborenen oder erworbenen Thrombozytopathie, bei Patienten, die weitere Medikamente einnehmen oder bei Patienten, die Thrombozytenkonzentrate erhalten haben von wesentlicher Bedeutung sein.

5. Literaturverzeichnis

Abelson JA, Moore T, Bruckner D, Deville J, Nielsen K (2005) Frequency of fungemia in hospitalized pediatric inpatients over 11 years at a tertiary care institution. *Pediatrics* 116(1): 61-7

Adedoyin A, Swenson CE, Bolcsak LE, Hellmann A, Radowska D, Horwith G, Janoff AS, Branch RA. (2000) A pharmacokinetic study of amphotericin B lipid complex injection (Abelcet) in patients with definite or probable systemic fungal infections. *Antimicrob Agents Chemother* 44(10): 2900-2

Agnelli G, Guerciolini R, Grasselli S, Menichetti F, Pauluzzi S, Nenci GG, Del Favero A (1987) Effects of the monobactam antibiotic aztreonam on platelet function and blood coagulation. *Chemotherapy* 33(1): 9-14

Agnelli G, Longetti M, Guerciolini R, Menichetti F, Grasselli S, Boldrini F, Bucaneve G, Nenci GG, Del Favero A (1987) Effects of the new glycopeptide antibiotic teicoplanin on platelet function and blood coagulation. *Antimicrob Agents Chemother* 31(10): 1609-12

Albelda SM, Talbot GH, Gerson SL, Miller WT, Cassileth PA (1985) Pulmonary cavitation and massive hemoptysis in invasive pulmonary aspergillosis. Influence of bone marrow recovery in patients with acute leukemia. *Am Rev Respir Dis* 131(1): 115-20

Alexander K, Daniel WG, Diener HC, Freund M, Köhler H, Matern S, Maurer HH, Michel BA, Nowak D, Risler T, Schaffner A, Scherbaum WA, Sybrecht GW, Wolfram G, Zeitz M, Flasnoecker M (1999) Thieme's Innere Medizin – TIM, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, S 1815-1817

Amantea MA, Bowden RA, Forrest A, Working PK, Newman MS, Mamelok RD (1999) The population pharmacokinetics of amphotericin B colloidal dispersion in patients receiving bone marrow transplants. *Chemotherapy* 45 Suppl 1: 48-53

Anaissie E (1992) Opportunistic mycoses in the immunocompromised host: experience at a cancer center and review. *Clin Infect Dis* 14 Suppl 1: 43-53

- Aviram M, Brook JG (1983) Characterization of the effect of plasma lipoproteins on platelet function in vitro. *Haemostasis* 73: 344-350
- Aviram M, Deckelbaum RJ (1989) Intralipid infusion into humans reduces in vitro platelet aggregation and alters platelet lipid composition. *Metabolism* 38: 343-347
- Avvisati G, Tirindelli MC, Annibali O (2003) Thrombocytopenia and hemorrhagic risk in cancer patients. *Crit Rev Oncol Hematol* 15; Suppl 43:13-6
- Ball MJ (1992) Parenteral nutrition using MCT/LCT or LCT: Effect on the fatty acid composition of plasma triglycerides and platelet phospholipids. *Clin Nutr* 11(4):216-22
- Bang NU, Tessler SS, Heidenreich RO, Marks CA, Mattler LE (1982) Effects of moxalactam on blood coagulation and platelet function. *Rev Infect Dis Suppl* 4: 546-54
- Bartlett GR (1977) Metabolism by man of intravenously administered adenine. *Transfusion* 17: 367-73
- Bauer C, Walzog B (2005) Blut: Ein flüssiges Organsystem. In: Klinker R, Pape H-C, Silbernagl S (Hrsg) *Physiologie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 5. Auflage, S 223-254
- Bekersky I, Boswell GW, Hiles R, Fielding RM, Buell D, Walsh TJ (1999) Safety and toxicokinetics of intravenous liposomal amphotericin B (AmBisome) in beagle dogs. *Pharm Res* 16: 1694-701
- Bekersky I, Fielding RM, Dressler DE, Lee JW, Buell DN, Walsh TJ (2002) Pharmacokinetics, excretion, and mass balance of liposomal amphotericin B (AmBisome) and amphotericin B deoxycholate in humans. *Antimicrob Agents Chemother* 46(3): 828-33
- Belt RJ, Leite C, Haas CD, Stephens RL (1978) Incidence of hemorrhagic complications in patients with cancer. *JAMA* 16;239(24): 2571-4
- Bennett JE (1995) Antimicrobial Agents: Antifungal Agents. In: Hardmann JG, Limbird LE (Hrsg) *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*. McGraw-Hill, New York, S 1175-1190

Bergmann L, Kienbaum P, Görlinger K, Peters J (2007) Uneventful removal of an epidural catheter guided by impedance aggregometry in a patient with recent coronary stenting and treated with clopidogrel and acetylsalicylic acid. *Reg Anesth Pain Med* 32(4): 354-7

Bishop JF, Matthews JP, McGrath K, Yuen K, Wolf MM, Szer J (1991) Factors influencing 20-hour increments after platelet transfusion. *Transfusion* 31(5): 392-6

Bodey GP (1977) Fungal infections in the cancer patient. *S Afr Med J* 10;52(25): 1009-15

Böcker W, Denk H, Heitz PhU (2004) *Pathologie*, Urban und Fischer, München Jena, S 1160

Boldt J, Wolf M, Mengistu A (2007) A new plasma-adapted hydroxyethylstarch preparation: in vitro coagulation studies using thrombelastography and whole blood aggregometry. *Anesth Analg* 104(2): 425-30

Boogaerts MA, Maertens J, Van Der Geest R, Bosly A, Michaux JM, Van Hoof A, Cleeren M, Wostenborghs R, De Beule K (2001) Pharmacokinetics and safety of a 7-day administration of intravenous itraconazole followed by a 14-day administration of itraconazole oral solution in patients with hematologic malignancy. *Antimicrob Agents Chemother* 45(3): 981-5

Born GV (1962) Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature* 9;194: 927-9

Bouchard BA, Tracy PB (2001) Platelets, leukocytes, and coagulation. *Curr Opin Hematol.* 8(5): 263-9

Buttle I (2005) Dissertation mit dem Titel: O/W-Emulsionen für die intravenöse Applikation von Arzneistoffen. Freie Universität Berlin, Fachbereich: Biologie, Chemie, Pharmazie, Gutachter Univ. Prof. Dr. R. H. Müller und Univ. Prof. Dr. O. Kayser, http://www.diss.fu-berlin.de/diss/receive/FUDISS_thesis_000000001665

Caillot D, Casasnovas O, Bernard A, Couaillier JF, Durand C, Cuisenier B, Solary E, Piard F, Petrella T, Bonnin A, Couillault G, Dumas M, Guy H (1997) Improved management of invasive pulmonary aspergillosis in neutropenic patients using early thoracic computed tomographic scan and surgery. *J Clin Oncol* 15(1): 139-47

Caillot D, Durand C, Casasnovas O, Couaillier JF, Bernard A, Buisson M, Solary E, Brachet A, Cuisenier B, Bonnin A, et al. (1995) Invasive pulmonary aspergillosis in neutropenic patients. Analysis of a series of 36 cases: contribution of thoracic scanners and itraconazole. *Ann Med Interne (Paris)* 146(2): 84-90

Callow CR, Swindell R, Randall W, Chopra R (2002) The frequency of bleeding complications in patients with haematological malignancy following the introduction of a stringent prophylactic platelet transfusion policy. *Br J Haematol* 118(2): 677-82

Campbell AN, Freedman MH, Pencharz PB, Zlotkin SH (1984) Bleeding disorder from the "fat overload" syndrome. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 8(4): 447-9

Cardinal DC, Flower RJ (1980) The electronic aggregometer: A novel device for assessing platelet behaviour in blood. *J. Pharmacol. Meth.* 3: 135-158

Castagnola E, Cesaro S, Giacchino M, Livadiotti S, Tucci F, Zanazzo G, Caselli D, Caviglia I, Parodi S, Rondelli R, Cornelli PE, Mura R, Santoro N, Russo G, De Santis R, Buffardi S, Viscoli C, Haupt R, Rossi MR (2006) Fungal infections in children with cancer: a prospective, multicenter surveillance study. *Pediatr Infect Dis J* 25(7): 634-9

Cazzola M, Matera MG, Santangelo G, Lampa E, Angrisani M, Loffreda A, Rossi F (1993) Effects of some cephalosporins and teicoplanin on platelet aggregation. *Int J Clin Pharmacol Res* 13(2): 69-73

Cazzola M, Santangelo G, Angrisani M, Vinciguerra A, Contaldi C, Rossi F (1995) Evaluation of the effects of pefloxacin on platelet aggregation in vitro and ex vivo in patients suffering from chronic bronchitis. *J Chemother* 7(1): 38-41

Cazzola M, Santangelo G, Martucci P, Caputi M (1991a) An in vitro study of the possible interaction between human platelets and cephalosporins. *Int J Clin Pharmacol Res* 11(1): 7-10

Cazzola M, Santangelo G, Paizis G, Matera C, Rossi F (1991b) Effects of cefonicid on platelet aggregation. *Drugs Exp Clin Res* 17(2): 105-8

Chamilos G, Luna M, Lewis RE, Bodey GP, Chemaly R, Tarrand JJ, Safdar A, Raad II, Kontoyiannis DP (2006) Invasive fungal infections in patients with hematologic malignancies in a tertiary care cancer center: an autopsy study over a 15-year period (1989-2003). *Haematologica* 91(7): 986-9

Cohen BE (1998) Amphotericin B toxicity and lethality: a tale of two channels. *Int J Pharm* 162: 95-106

Cossum PA, Wyse J, Simmons V, Wallace TL, Rios A (1996) Pharmacokinetics of NYOTRAN™ (liposomal nystatin) in human patients. In *Program and Abstracts of the Thirty-Sixth Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, New Orleans, LA*. Abstract A88. p. 17. American Society for Microbiology, Washington, DC.

Custer GM, Briggs BR, Smith RE (1979) Effect of cefamandole nafate on blood coagulation and platelet function. *Antimicrob Agents Chemother* 16(6): 869-72

De Groot PG, Sixma JJ (1998) Glykoproteinrezeptoren der Thrombozytenmembran: Biochemie, Molekularbiologie und Physiologie. In: *Hämostaseologie*. Müller-Berghaus G, Pötzsch B (Hrsg) *Hämostaseologie – Molekulare und zelluläre Mechanismen, Pathophysiologie und Klinik*. Springer, Berlin Heidelberg New York, S 15-26

Denning DW (2003) Echinocandin antifungal drugs. *Lancet* 362(9390): 1142-51

Dowell JA, Schranz J, Baruch A, Foster G (2005) Safety and pharmacokinetics of coadministered voriconazole and anidulafungin. *J Clin Pharmacol* 45(12): 1373-82

Driessen M, Ellis JB, Cooper PA, Wainer S, Muwazi F, Hahn D, Gous H, De Villiers FP (1996) Fluconazole vs. amphotericin B for the treatment of neonatal fungal septicemia: a prospective randomized trial. *Pediatr Infect Dis J* 15(12): 1107-12

Duke WW (1910) The relation of blood platelets to hemorrhagic disease: Description of a method for determining the bleeding time and coagulation time and report of three cases of hemorrhagic disease relieved by transfusion. *JAMA* 55: 1185

Dyszkiewicz-Korpanty AM, Frenkel EP, Sarode R (2005) Approach to the assessment of

platelet function: comparison between optical-based platelet-rich plasma and impedance-based whole blood platelet aggregation methods. *Clin Appl Thromb Hemost* 11(1): 25-35

Fedder IL, Holme S, Vlasses PH, Ferguson RK, Murphy S (1983) Effect of intravenous carbenicillin, cefoxitin and cefamandole on ADP-induced platelet aggregation and shape change. *Thromb Res* 15;32(2): 215-22

Feinman RD, Lubowsky J, Charo I, Zabinski MP (1977) The lumi-aggregometer: a new instrument for simultaneous measurement of secretion and aggregation by platelets. *J Lab Clin Med* 90(1): 125-9

Fitzgerald GA (1991) Mechanism of platelet activation: Thromboxane A2 as an amplifying signal for other agonists. *The American J of Cardiology* 68(3): 11B-15B

Fletcher C, Pearson C, Choi SC, Duma RJ, Evans HJ, Qureshi GD (1986) In vitro comparison of antiplatelet effects of beta-lactam penicillins. *J Lab Clin Med* 108(3): 217-23

Forth, W, Henschler D, Rummel W, Starke K (1996) *Allgemeine and spezielle Pharmakologie and Toxikologie*, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg-Berlin-Oxford, 7. Auflage

Fridkin SK, Jarvis WR (1996) Epidemiology of nosocomial fungal infections. *Clin Microbiol* 9(4): 499-511

Frye JL, Thompson DF (1993) Drug-induced thrombocytosis. *J Clin Pharm Ther* 18(1): 45-8

Funai N, Shimamoto Y, Tokunaga O, Sugihara W, Yamaguchi M (1995) Ten-year survey of incidence of infection as a cause of death in hematologic malignancies: study of 90 autopsied cases. *Acta Haematol* 93(1): 25-30

Gaarder A, Jonsen J (1961) Adenosine diphosphate in red cells as a factor in adhesiveness of human platelets. *Nature*: 192

Gawaz M (1999) Thrombozyten und primäre Hämostase. In: *Das Blutplättchen: Physiologie, Pathophysiologie, Membranrezeptoren, antithrombozytäre Therapie bei koronarer*

Herzerkrankung. Georg Thieme Verlag, Stuttgart New York, S 4-29

Görlinger K, Jambor C, Hanke A, Adamzik M, Hartmann M, Rahe-Meyer N (2007a) Thrombelastometry and impedance aggregometry based algorithm for coagulation management in cardiac surgery. *Intensive Care Med.* 33:Suppl 2: 196

Görlinger K, Jambor C, Hanke A, Dirkmann D, Adamzik M, Hartmann M, Rahe-Meyer N (2007b) Perioperative coagulation management and control for platelet transfusion by point-of-care platelet function analysis. *Transfus Med Hemother* 34: 396-411

Gonzalez CE, Rinaldi MG, Sugar AM (2002) Zygomycosis. *Infect Dis Clin North Am* 16(4): 895-914

Gorelik O, Cohen N, Shpirer I, Almozino-Sarafian D, Alon I, Koopfer M, Yona R, Modai D (2000) Fatal haemoptysis induced by invasive pulmonary aspergillosis in patients with acute leukaemia during bone marrow and clinical remission: report of two cases and review of the literature. *J Infect* 41(3): 277-82

Goulet O, Girot R, Maier-Redelsberger M, Bougle D, Virelizier JL, Ricour C (1986) Hematologic disorders following prolonged use of intravenous fat emulsions in children. *JPEN* 10: 284-288

Graybill JR (1996) The future of antifungal therapy. *Clin Infect Dis* 22(Suppl 2): 166-S178

Groll AH, Gea-Banacloche JC, Glasmacher A, Just-Nuebling G, Maschmeyer G, Walsh TJ (2003) Clinical pharmacology of antifungal compounds. *Infect Dis Clin North Am.* 17(1):159-91

Groll AH, Piscitelli SC, Walsh TJ (1998) Clinical pharmacology of systemic antifungal agents: a comprehensive review of agents in clinical use, current investigational compounds, and putative targets for antifungal drug development. *Adv Pharmacol.* 44:343-500.

Groll AH, Ritter J (2005) Diagnosis and management of fungal infections and pneumocystis pneumonia in pediatric cancer patients. *Klin Padiatr.* 217 Suppl 1: 37-66

Groll AH, Shah PM, Mentzel C, Schneider M, Just-Nuebling G, Huebner K (1996) Trends in

the postmortem epidemiology of invasive fungal infections at a university hospital. *J Infect* 33 (1): 23-32

Gummow B, Swa G, Du Preez J (1994) A bioequivalence and pharmacokinetic evaluation of two commercial diminazene aceturate formulations administered intramuscularly to cattle. *Onderstepoort J Vet Res* 61: 317-326

Hänsch GM, Gemsa D, Resch K (1985) Induction of prostanoid synthesis in human platelets by the late complement components C5b-9 and channel forming antibiotic nystatin: inhibition of the reacylation of liberated arachidonic acid. *J Immunol.* 135(2): 1320-4

Harbrecht U (1998) Die Thrombozytenaggregation: Physiologie und Biochemie. In: Müller-Berghaus G, Pötzsch B (Hrsg). *Hämostaseologie – Molekulare und zelluläre Mechanismen, Pathophysiologie und Klinik.* Springer, Berlin Heidelberg New York, S 27-35

Harrison (2005) *Harrisons Innere Medizin.* Dietel M, Suttorp N, Zeitz M (Hrsg) ABW Wissenschaftsverlag, McGraw-Hill, 16. Aufl.

Hartert H (1951) Die Thrombelastographie. Eine Methode zur physikalischen Analyse des Blutgerinnungsvorganges. *Z Ges Exp Med* 117: 189-203

Hassall DG, Owen JS, Bruckdorfer KR (1983) The aggregation of isolated human platelets in the presence of lipoproteins and prostacyclin. *Biochem J* 216: 43-49

Heddle NM, Cook RJ, Sigouin C, Slichter SJ, Murphy M, Rebullia P; BEST Collaborative (Biomedical Excellence for Safer Transfusion) (2006) A descriptive analysis of international transfusion practice and bleeding outcomes in patients with acute leukemia. *Transfusion.* 46(6): 903-11

Hellem AJ (1960) The adhesiveness of human blood platelets in vitro. The influence of red cells on the platelet adhesiveness. *Stand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl.* 5(1): 63-82

Helmeste DM, Tang SW, Vu R (1998) Inhibition of platelet serotonin uptake by cytochrome P450 inhibitors miconazole and econazole. *Life Sci.* 62(24): 2203-8

Hill RJ, Stenberg PE, Sullam PM, Levin J (1988) Use of arabinogalactan to obtain washed murine platelets free of contaminating plasma proteins and appropriate for studies of function, morphology, and thrombopoiesis. *J Lab Clin Med.* 111(1): 73-83

Horger M, Hebart H, Einsele H, Lengerke C, Claussen CD, Vonthein R, Pfannenbergl C (2005) Initial CT manifestations of invasive pulmonary aspergillosis in 45 non-HIV immunocompromised patients: association with patient outcome? *Eur J Radiol.* 55(3): 437-44

<http://www.multiplate.net/>

<http://www.transfusionsmedizin.uk-erlangen.de>

Hussein MA, Fletcher R, Long TJ, Zuccaro K, Bolwell BJ, Hoeltge A (1998) Transfusing platelets 2 h after the completion of amphotericin-B decreases its detrimental effect on transfused platelet recovery and survival. *Transfus Med.* 8(1): 43-7

Ishikawa S, Manabe S, Wada O (1986) Miconazole inhibition of platelet aggregation by inhibiting cyclooxygenase. *Biochem Pharmacol.* 1;35(11): 1787-92

Jeu L, Piacenti FJ, Lyakhovetskiy AG, Fung HB (2003) Voriconazole. *Clin Ther.* 25(5): 1321-81

Juliano RL, Hsu MJ, Peterson D, Regen SL, Singh A (1983) Interactions of conventional or photopolymerized liposomes with platelets in vitro. *Exp Cell Res.* 146(2): 422-7

Kalb M, Scharbert G, Kress HG, Marschalek C, Kozek S (2005) Monitoring of the Reversing Effect of Desmopressin on Cyclooxygenase-I-Induced Platelet Inhibition. *Anesthesiology* 103: A394

Kami M, Sawada Y, Mori S, Hirate J, Kojima N, Kanda Y, Moriya A, Yuji K, Saito T, Chiba S, Hirai H (2001) Serum levels of fluconazole in patients after cytotoxic chemotherapy for hematological malignancy. *Am J Hematol.* 66(2): 85-91

Kariyazono H, Nakamura K, Shinkawa T, Moriyama Y, Toyohira H, Taira A, Yamada K (1997) Inhibitory effects of antibiotics on platelet aggregation in vitro. *Hum Exp Toxicol.*

16(11): 662-6

Kauffman CA, Carver PL (2008) Update on echinocandin antifungals. *Semin Respir Crit Care Med.* 29(2): 211-9

Kirkeby A, Torup L, Bochsén L, Kjalke M, Abel K, Theilgaard-Monch K, Johansson PI, Bjørn SE, Gerwien J, Leist M (2008) High-dose erythropoietin alters platelet reactivity and bleeding time in rodents in contrast to the neuroprotective variant carbamyl-erythropoietin (CEPO). *Thromb Haemost.* 99(4): 720-8

Koch S, Höhne FM, Tietz HJ (2004) Incidence of systemic mycoses in autopsy material. *Mycoses.* 47(1-2): 40-6

Köfeler HC, Fauler G, Windischhofer W, Leis HJ (2000) Effect of cytochrome P-450 inhibitors econazole, bifonazole and clotrimazole on prostanoid formation. *Br J Pharmacol.* 130(6): 1241-6.

Koren G, Lau A, Klein J, Golas C, Bologna-Campeanu M, Soldin S, MacLeod SM, Prober C (1988) Pharmacokinetics and adverse effects of amphotericin B in infants and children. *J Pediatr.* 113(3): 559-63

Kratzer MA, Born GV (1985) Simulation of primary haemostasis in vitro. *Haemostasis.* 15(6): 357-62

Kulpa J, Zaroulis CG, Good RA, Kutti J (1981) Altered platelet function and circulation induced by amphotericin B in leukemic patients after platelet transfusion. *Transfusion.* 21(1): 74-6

Leytin V, Mody M, Semple J, Garvey B, Freedman J (2000) Flow cytometric parameters for characterizing platelet activation by measuring P-Selectin (CD62) expression: theoretical consideration and evaluation in thrombin-treated platelet populations. *Biochem Biomed Res Commun* 269: 85-90

López F, Jarque I, Martín G, Sanz GF, Palau J, Martínez J, de la Rubia J, Larrea L, Arnao M, Solves P, Cervera J, Martínez ML, Pemán J, Gobernado M, Sanz MA (1998) Invasive fungal

infections in patients with blood disorders. *Med Clin (Barc)*. 110(11): 401-5

Losasso C, Loffreda A, Angrisani M, Contaldi C, Cazzola M, Rossi F (1995) Effects of lomefloxacin and sparfloxacin on human platelet aggregation. *J Chemother*. 7(5): 420-3

Loughrey HC, Bally MB, Reinish LW, Cullis PR (1990) The binding of phosphatidylglycerol liposomes to rat platelets is mediated by complement. *Thromb Haemost* 64: 172-176

Lüllmann H, Mohr K, Hein L (2006) Pilinfektionen. In: Lüllmann H (Hrsg) *Pharmakologie und Toxikologie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 16. Aufl. S 474-480

Marmion LC, Desser KB, Lilly RB, Stevens DA (1976) Reversible thrombocytosis and anemia due to miconazole therapy. *Antimicrob Agents Chemother*. 10(3): 447-9

Martino R, Subira M (2002) Invasive fungal infections in hematology: new trends. *Ann Hematol* 81(5): 233-43

Maryadele J, O'Neil et al (2006) *The Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals*. Merck & Co., Inc., Whitehouse Station, NJ, USA, 14. Auflage

Maschmeyer G, Link H, Hiddemann W, Meyer P, Helmerking M, Eisenmann E, Schmitt J, Adam D (1994) Pulmonary infiltrations in febrile patients with neutropenia. Risk factors and outcome under empirical antimicrobial therapy in a randomized multicenter study. *Cancer* 73 (9): 2296-304

McGrath K, Bertram JF, Houghton S, Boothman J, Manderson JA, Minchinton R (1992) Amphotericin B-induced injury in stored human platelets. *Transfusion*. 32(1): 46-50

McLeod AJ, Suckling KE, Walton PL, Johnson M (1982) Effects of in vitro incorporation of cholesterol and cholesterol analogues into rat platelets. *Biochim Biophys Acta*. 14;688(2): 581-5

Mehta J (1997) Do variations in molecular structure affect the clinical efficacy and safety of lipid-based amphotericin B preparations? *Leukemia Research* 21: 183-188

Mengistu AM, Wolf MW, Boldt J, Röhm KD, Lang J, Piper SN (2008) Evaluation of a new

platelet function analyzer in cardiac surgery: a comparison of modified thromboelastography and whole-blood aggregometry. *J Cardiothorac Vasc Anesth.* 22(1): 40-6

Meyers JD (1990) Fungal infections in bone marrow transplant patients. *Semin Oncol* 17(3) Suppl 6: 10-3

Michelson AD, Barnard MR, Krueger L, Frelinger AL, Furman MI (2000) Evaluation of platelet function by flow cytometry. *Methods* 21: 259-270

Michelson AD, Frelinger AL 3rd, Furman MI (2006) Current options in platelet function testing. *Am J Cardiol.* 20;98(10A): 4N-10N

Moncada S, Bunting S, Mullane K, Thorogood P, Vane JR, Raz A, Needleman P (1977) Imidazole: a selective inhibitor of thromboxane synthetase. *Prostaglandins.* 13(4): 611-8

Morgenstern E (1998) Morphologie der Thrombozyten. In: Müller-Berghaus G, Pötzsch B (Hrsg.). *Hämostaseologie – Molekulare und zelluläre Mechanismen, Pathophysiologie und Klinik.* Springer, Berlin Heidelberg New York, S 3-14

Müller-Schunk S, Linn J, Peters N, Spannagl M, Deisenberg M, Brückmann H, Mayer TE (2008) Monitoring of Clopidogrel-Related Platelet Inhibition: Correlation of Nonresponse with Clinical Outcome in Supra-aortic Stenting. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2008 Jan 25

Murayama N, Imai N, Nakane T, Shimizu M, Yamazaki H (2007) Roles of CYP3A4 and CYP2C19 in methyl hydroxylated and N-oxidized metabolite formation from voriconazole, a new anti-fungal agent, in human liver microsomes. *Biochem Pharmacol.* 15;73(12): 2020-6

Nevo S, Enger C, Hartley E, Borinsky ME, Swan V, Fuller AK, Braine HG, Kickler TS, George JN, Vogelsang GB (2001) Acute bleeding and thrombocytopenia after bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 27(1): 65-72

Nijkamp FP, Moncada S, White HL, Vane JR (1977) Diversion of prostaglandin endoperoxide metabolism by selective inhibition of thromboxane A₂ biosynthesis in lung, spleen or platelets. *Eur J Pharmacol.* 15;44(2): 179-86

Nubile G, Saccone A, Di Gregorio M, Rossi M, Tresca E (1985) Action of aminoglycosides on platelet aggregation in vitro. *Boll Soc Ital Biol Sper.* 30;61(3): 357-63

Nucci M, Colombo AL (2002) Risk factors for breakthrough candidemia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 21(3): 209-11

O'Brien JR (1971) Factors influencing the optical platelet aggregation test. *Acta Med Scand* 525: 43-4

O'Donnell MR, Schmidt GM, Tegtmeier BR, Faucett C, Fahey JL, Ito J, Nademanee A, Niland J, Parker P, Smith EP and et al. (1994) Prediction of systemic fungal infection in allogeneic marrow recipients: impact of amphotericin prophylaxis in high-risk patients. *J Clin Oncol* 12(4): 827-34

Orth M, Luley C, Wieland H (1995) Effects of VLDL, chylomicrons and chylomicron remnants on platelet aggregability. *Thromb Res* 79: 297-305

Pagano L, Caira M, Candoni A, Offidani M, Fianchi L, Martino B, Pastore D, Picardi M, Bonini A, Chierichini A, Fanci R, Caramatti C, Invernizzi R, Mattei D, Mitra ME, Melillo L, Aversa F, Van Lint MT, Falcucci P, Valentini CG, Girmenia C, Nosari A (2006) The epidemiology of fungal infections in patients with hematologic malignancies: the SEIFEM-2004 study. *Haematologica.* 91(8): 1068-75

Pagano L, Caira M, Nosari A, Van Lint MT, Candoni A, Offidani M, Aloisi T, Irrera G, Bonini A, Picardi M, Caramatti C, Invernizzi R, Mattei D, Melillo L, de Waure C, Reddiconto G, Fianchi L, Valentini CG, Girmenia C, Leone G, Aversa F (2007) Fungal infections in recipients of hematopoietic stem cell transplants: results of the SEIFEM B-2004 study--Sorveglianza Epidemiologica Infezioni Fungine Nelle Emopatie Maligne. *Clin Infect Dis.* 1;45(9): 1161-70

Pagano L, Girmenia C, Mele L, Ricci P, Tosti ME, Nosari A, Buelli M, Picardi M, Allione B, Corvatta L, D'Antonio D, Montillo M, Melillo L, Chierichini A, Cenacchi A, Tonso A, Cudillo L, Candoni A, Savignano C, Bonini A, Martino P, Del Favero A (2001) Infections caused by filamentous fungi in patients with hematologic malignancies. A report of 391 cases by GIMEMA Infection Program. *Haematologica* 86(8): 862-70

Pagano L, Ricci P, Nosari A, Tonso A, Buelli M, Montillo M, Cudillo L, Cenacchi A, Savignana C, Melillo L (1995) Fatal haemoptysis in pulmonary filamentous mycosis: an underevaluated cause of death in patients with acute leukaemia in haematological complete remission. A retrospective study and review of the literature. *Gimema Infection Program (Gruppo Italiano Malattie Ematologiche dell'Adulto) Br J Haematol.* 89(3): 500-5

Pastakia KB, Brownson NE, Terle DA, Poindexter BJ (1996) Amphotericin B induced abnormalities in human platelets. *Clin Mol Pathol.* 49(5): M301-M307

Patel R (1998) Antifungal agents. Part I. Amphotericin B preparations and flucytosine. *Mayo Clin Proc.* 73(12): 1205-25

Penz SM, Reininger AJ, Toth O, Deckmyn H, Brandl R, Siess W (2007) Glycoprotein Iba inhibition and ADP receptor antagonists, but not aspirin reduce platelet thrombus formation in flowing blood exposed to atherosclerotic plaques; *Thromb Haemost* 97: 435-443

Persidsky MD, Ling NS (1982) Separation of platelet-rich plasma by modified centrifugal elutriation. *J Clin Apher* 1: 18-24

Pfaffenbach B, Donhuijsen K, Pahnke J, Bug R, Adamek RJ, Wegener M, Ricken D (1994) Systemic fungal infections in hematologic neoplasms. An autopsy study of 1,053 patients. *Med Klin* 89(6): 299-304

Pittrová H, Koza V, Cepelák V, Bufková D (1990) The effect of HLA alloimmunization and other factors on the effectiveness of thrombocyte concentrates. *Cas Lek Cesk.* 15;129(24): 751-3

Plumb DC (1999) *Veterinary Drug Handbook.* PharmaVet Publishing, White Bear Lake (USA)

Poirier JM, Cheymol G (1998) Optimisation of itraconazole therapy using target drug concentrations. *Clin Pharmacokinet.* 35(6): 461-73

Porta I, Planas M, Padró JB, Picó M, Valls M, Schwartz S (1994) Effect of two lipid emulsions on platelet function. *Infusionsther Transfusionsmed.* 21(5): 316-21

Porta M, Ricchetti I (1986) A study of the possible interactions between human platelets and the antibiotic MDL-507 (teicoplanin). *Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol.* 24(12): 661-4

Purkins L, Wood N, Ghahramani P, Greenhalgh K, Allen MJ, Kleinermans D (2002) Pharmacokinetics and safety of voriconazole following intravenous- to oral-dose escalation regimens. *Antimicrob Agents Chemother.* 46(8): 2546-53

Pyle RL (1981) Clinical pharmacology of amphotericin B. *J Am Vet Med Assoc* 179: 83-4

Rahe-Meyer N, Gilde I, Calatzis A (2006) Multiple electrode aggregometry is a predictive marker for transfusion requirements during open heart surgery; P352; 50th annual meeting of the Society of Thrombosis and Haemostasis Research 15.-18. Feb. 2006; Basel

Reinish LW, Bally MB, Loughrey HC, Cullis PR (1988) Interactions of liposomes and platelets. *Thromb Haemost.* 22;60(3): 518-23

Reiss RF, Katz AJ (1976) Optimizing recovery of platelets in platelet rich plasma by the simplex strategy. *Transfusion* 16: 370-4

Robert Koch-Institut (2008) Krebs in Deutschland 2003 – 2004. Häufigkeiten und Trends. 6. überarbeitete Auflage. Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V. (Hrsg). Berlin

Rosen GP, Nielsen K, Glenn S, Abelson J, Deville J, Moore TB (2005) Invasive fungal infections in pediatric oncology patients: 11-year experience at a single institution. *J Pediatr Hematol Oncol* 27(3): 135-40

Rossi F, Santangelo G, Loffreda A, Angrisani M, Matera C, Cazzola M (1992) Effects of teicoplanin on human platelet aggregation in vitro and ex vivo. *J Chemother.* 4(3): 159-62

Saag MS, Dismukes WE (1988) Azole antifungal agents: emphasis on new triazoles. *Antimicrob Agents Chemother.* 32(1): 1-8

Saladino CF, Kosacolsky-Singer C, Fox R, Nethala V, Feffer SE, Jonas EA (1993) The effect of parenteral lipid emulsion-induced hyperlipidemia on prostaglandin E1 modulation of platelet

function. *Artery*. 20(6): 303-13

Salzman EW, Lindon JN, Rodvien R (1976) Cyclic AMP in human blood platelets: relation to platelet prostaglandin synthesis induced by centrifugation or surface contact.

J Cyclic Nucleotide Res. 2(1): 25-37

Samonis G, Bafaloukos D (1992) Fungal infections in cancer patients: an escalating problem.

In Vivo. 6(2): 183-93

Santos MT, Valles J, Marcus AJ, Safier LB, Broekman MJ, Islam N, Ullman HL, Eiroa AM, Aznar J (1991) Enhancement of platelet reactivity and modulation of eicosanoid production by intact erythrocytes. A new approach to platelet activation and recruitment. *J Clin Invest*. 87(2): 571-80

Saral R (1991) Candida and Aspergillus infections in immunocompromised patients: an overview. *Rev Infect Dis* 13(3): 487-92

Sargeant P, Farndale RW, Sage SO (1994) The imidazole antimycotics econazole and miconazole reduce agonist-evoked protein-tyrosine phosphorylation and evoke membrane depolarisation in human platelets: cautions for their use in studying Ca²⁺ signalling pathways. *Cell Calcium*. 16(5): 413-8

Scharbert G, Gebhardt K, Sow Z, Duris M, Deusch E, Kozek-Langenecker S (2007) Point-of-care platelet function tests: detection of platelet inhibition induced by nonopioid analgesic drugs. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 18(8): 775-80

Scharbert G, Kalb M, Duris M, Marschalek C, Kozek-Langenecker SA (2007) Garlic at dietary doses does not impair platelet function; *Anesth Analg*. 105(5): 1214-8

Scharbert G, Kalb M, Marschalek C, Kozek-Langenecker SA (2006) The Effects of Test Temperature and Storage Temperature on Platelet Aggregation: A Whole Blood In Vitro Study; *Anesth Analg* 102: 1280-4

Schermerhorn T, Barr SC, Stoffregen DA, Koren-Roth Y, Erb HN (1994) Whole-blood platelet aggregation, buccal mucosa bleeding time, and serum cephalothin concentration in dogs

receiving a presurgical antibiotic protocol. *Am J Vet Res.* 55(11): 1602-7

Schroer K (1993) *Thrombozyten Physis: Spezial*, Urban & Vogel, München S 1-19

Schwetz I, Domej W, Krause R (2007) Invasive candidiasis in the critically ill, patient non-neutropenic. *Wien Med Wochenschr.* 157(19-20): 490-2

Sibbing D, Braun S, Jawansky S, Vogt W, Mehilli J, Schömig A, Kastrati A, von Beckerath N. (2008) Assessment of ADP-induced platelet aggregation with light transmission aggregometry and multiple electrode platelet aggregometry before and after clopidogrel treatment. *Thromb Haemost* 99(1): 121-6

Sibbing D, Busch G, Braun S, Jawansky S, Schömig A, Kastrati A, Ott I, von Beckerath N. (2008) Impact of bivalirudin or unfractionated heparin on platelet aggregation in patients pretreated with 600 mg clopidogrel undergoing elective percutaneous coronary intervention. *Eur Heart J.* 29(12): 1504-9

Simoens CM, Deckelbaum RJ, Massaut JJ, Carpentier YA (2008) Inclusion of 10% fish oil in mixed medium-chain triacylglycerol-long-chain triacylglycerol emulsions increases plasma triacylglycerol clearance and induces rapid eicosapentaenoic acid (20:5n-3) incorporation into blood cell phospholipids. *Am J Clin Nutr.* 88(2): 282-8

Sinzinger H, Pirich C, Bednar J, O'Grady J (1996) Ex-vivo and in-vivo platelet function in patients with severe hypercholesterolemia undergoing LDL-apheresis. *Thrombosis Research* 15; 82(4): 291-301

Slichter SJ (2004) Relationship between platelet count and bleeding risk in thrombocytopenic patients. *Transfus Med Rev.* 18(3): 153-67

Slichter SJ, Davis K, Enright H, Braine H, Gernsheimer T, Kao KJ, Kickler T, Lee E, McFarland J, McCullough J, Rodey G, Schiffer CA, Woodson R (2005) Factors affecting posttransfusion platelet increments, platelet refractoriness, and platelet transfusion intervals in thrombocytopenic patients. *Blood.* 15;105(10): 4106-14

Sloand EM, Kumar P, Yu M, Klein HG (1994) Effect of amphotericin B and fluconazole on

platelet membrane glycoproteins. *Transfusion*. 34(5): 415-20

Stanworth SJ, Dyer C, Casbard A, Murphy MF (2006) Feasibility and usefulness of self-assessment of bleeding in patients with haematological malignancies, and the association between platelet count and bleeding. *Vox Sang*. 91(1): 63-9

Steinhilber D, Jaschonek K, Knospe J, Morof O, Roth HJ (1990) Effects of novel antifungal azole derivatives on the 5-lipoxygenase and cyclooxygenase pathway. *Arzneimittelforschung*. 40(11): 1260-3

Stone JA, Holland SD, Wickersham PJ, Sterrett A, Schwartz M, Bonfiglio C, Hesney M, Winchell GA, Deutsch PJ, Greenberg H, Hunt TL, Waldman SA (2002) Single- and multiple-dose pharmacokinetics of caspofungin in healthy men. *Antimicrob Agents Chemother*. 46(3): 739-45

Surya II, Akkerman JW (1993) The influence of lipoproteins on blood platelets. *Am Heart J*. 125(1): 272-5

Tai HH, Yuan B (1978) On the inhibitory potency of imidazole and its derivatives on thromboxane synthetase. *Biochem Biophys Res Commun*. 13;80(1): 236-42

Tartaglione TA, Duma RJ, Qureshi GD (1986) In vitro and in vivo studies of the effect of aztreonam on platelet function and coagulation in normal volunteers. *Antimicrob Agents Chemother*. 30(1): 73-7

Theuretzbacher U, Ihle F, Derendorf H (2006) Pharmacokinetic/pharmacodynamic profile of voriconazole. *Clin Pharmacokinet*. 45(7): 649-63

Thomas L (2005) Labor und Diagnose, Indikation und Bewertung von Laborbefunden für die medizinische Diagnostik, TH-Books-Verlags-Gesellschaft, Frankfurt/Main, 6. Aufl., S 907-925

Tietz HJ, Martin H, Koch S (2001) Incidence of endomycoses in autopsy material. *Mycoses* 44(11-12): 450-4

Tolman EL, Fuller BL (1983) Inhibition of thromboxane synthesis in guinea pig lung and

human platelets by clotrimazole and other imidazole antifungals. *Biochem Pharmacol.* 15;32(22): 3488-90

Tóth O, Calatzis A, Penz S, Losonczy H, Siess W (2006) Multiple electrode aggregometry: A new device to measure platelet aggregation in whole blood; *Thromb Haemost* 96: 781-8

U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration (2010) Approved Drug Products with Therapeutic Equivalence Evaluations. 30th edition 2010. www.fda.gov/cder/orange/obannual.pdf.

Vermes A, Guchelaar HJ, Dankert J (2000) Flucytosine: a review of its pharmacology, clinical indications, pharmacokinetics, toxicity and drug interactions. *J Antimicrob Chemother.* 46(2): 171-9

Vermes A, Math t RA, van der Sijs IH, Dankert J, Guchelaar HJ (2000) Population pharmacokinetics of flucytosine: comparison and validation of three models using STS, NPEM, and NONMEM. *Ther Drug Monit.* 22(6): 676-87

Vermes A, van Der Sijs H, Guchelaar HJ (2000) Flucytosine: correlation between toxicity and pharmacokinetic parameters. *Chemotherapy.* 46(2): 86-94

von Pape KW, Dzijan-Horn M, Bohner J, Spannagl M, Weisser H, Calatzis A (2007) Vollblutaggregometrie zur Kontrolle der Wirksamkeit von Acetylsalicylsäure bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit. *Hamostaseologie.* 27(3): 155-60; quiz 161-2

Walsh TJ, Yeldandi V, McEvoy M, Gonzalez C, Chanock S, Freifeld A, Seibel NI, Whitcomb PO, Jarosinski P, Boswell G, Bekersky I, Alak A, Buell D, Barret J, Wilson W (1998) Safety, tolerance, and pharmacokinetics of a small unilamellar liposomal formulation of amphotericin B (AmBisome) in neutropenic patients. *Antimicrob Agents Chemother.* 42(9): 2391-8

Wang WQ, Ning X, Gustafson A (1995) Lipid changes in plasma and blood cells following intravenous 10% fat infusion in man. *Pharmacology and Toxicology* 77: 377-381

Ware JA, Coller BS (1995) Platelet morphology, biochemistry and function. In: Beutler E, Lichtman MA, Coller BS, Kipps TJ (Hrsg) *Williams Hematology.* McGraw-Hill, Inc. Health

Professions Division, 5. Aufl, S 1161-1201

Webb JA, Allen DG, Abrams-Ogg AC, Gentry PA (2006) Effects of doxycycline, amoxicillin, cephalexin, and enrofloxacin on hemostasis in healthy dogs. *Am J Vet Res.* 67(4): 569-76

Webert K, Cook RJ, Sigouin CS, Rebulla P, Heddle NM (2006) The risk of bleeding in thrombocytopenic patients with acute myeloid leukemia. *Haematologica.* 91(11): 1530-7

Wilkens B, Sullivan P, McDonald TP, Krahwinkel DJ (1995) Effects of cephalothin, cefazolin, and cefmetazole on the hemostatic mechanism in normal dogs: implications for the surgical patient. *Vet Surg.* 24(1): 25-31

Windholz M, Budavari S, Blumetti R, Otterbein E (1983) Amphotericin B. In: *The Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals.* Merck & Co., Inc., Whitehouse Station, NJ, USA, 14. Auflage. S 2194

Yeh TC, Liu HC, Wang LY, Chen SH, Liang DC (2007) Invasive fungal infection in children undergoing chemotherapy for cancer. *Ann Trop Paediatr.* 27(2): 141-7

Zakrevskii VI, Kubatiev AA, Galaev IuV (1993) The effect of liposome phospholipids in collagen-induced platelet aggregation. *Vopr Med Khim.* 39(5): 21-3

Zbinden G, Wunderli-Allenspach H, Grimm L (1989) Assessment of thrombogenic potential of liposomes. *Toxicology.* 54(3): 273-80

Zhou-L (1997) Intralipid rapidly attenuates the agonist-induced activation of rat platelets in vitro. *Thrombosis Research* 85: 53-62

Ziemen M, Shah PM, Henkel-Bussmann M, Breddin HK (1986) Hemostatic parameters influenced by imipenem/cilastatin *Infection.* 14 Suppl 2: 138-42

Zini JM (2003) Acute thrombotic and hemorrhagic complications in cancer. *Rev Prat.* 15;53(19): 2153-9

Zupanić-Krmek D, Nemet D (2004) Systemic fungal infections in immunocompromised

patients. *Acta Med Croatica*. 58(4): 251-61

Zupanić-Krmek D, Nemet D, Mrić M, Bogdanić V, Labar B, Jandrić M, Kalenić S (2004) Risk factors for invasive fungal infections during intensive chemotherapy of acute leukemia--retrospective study. *Acta Med Croatica*. 58(4): 275-84

Zwierzina WD, Kunz F (1985) A method of testing platelet aggregation in native whole blood. *Thromb Res*. 1;38(1): 91-100

6. Abkürzungsverzeichnis

ABCD	Amphotericin B colloidal dispersion
ABLCL	Amphotericin B lipid complex
ADP	Adenosindiphosphat
ASS	Acetylsalicylsäure
AU	aggregation units
AUC	area under the curve
CD	cluster of differentiation
C _{min}	minimale Konzentration
C _{max}	maximale Konzentration
COX	Cyclooxygenase
DAMB	Amphotericin B deoxycholate
DMPC	Dimyristolphosphatidylcholin
DMPG	Dimyristolphosphatidylglycerol
DMSO	Dimethylsulfoxid
EPO	Erythropoetin
GP	Glykoprotein
HAES	Hydroxyethylstärke
HDL	high density lipoprotein
IP ₃	Inositoltriphosphat
LAMB	Liposomales Amphotericin B
LDL	low density lipoprotein
NaCl	Natriumchlorid
PGE ₁	Prostaglandin E ₁
PRP	platelet rich plasma
SD	Standardabweichung
SEM	standard error of the mean, Standardfehler des Mittelwerts
SUV	small unilamellar vesicle, kleine unilamellare Liposomen
TRAP	Thrombin receptor activating peptide
VLDL	very low density lipoprotein
vWF	von-Willebrand-Faktor
95 %-CI	95%-Konfidenzintervall

7. Lebenslauf

