Aus der Klinik für Kardiologie und Pulmologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Die Bedeutung der ADP-Rezeptorhemmung durch Clopidogrel für die Plättchendegranulation und -aggregation bei Patienten mit Koronarer Herzkrankheit

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité –
Universitätsmedizin Berlin

von
Caroline Stellbaum
aus Berlin

Gutachter: **1. Prof. Dr. med. U. Rauch-Kröhnert**

2. Prof. Dr. med. S. Felix

3. Prof. Dr. med. H. Völler

Datum der Promotion: 30.11.2012

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	5
Anteilserklärung	18
Lebenslauf	19
Publikationsliste	20
Selbstständigkeitserklärung	22
Danksagung	23

Zusammenfassung:

Clopidogrel, ein irreversibler P2Y12 Rezeptorantagonist der Thrombozyten, hemmt die ADP-induzierte Plättchenaktivierung und damit letztendlich die Plättchenaggregation. Nach einer Thrombozytenaktivierung sekrieren die Plättchen Tissue factor (TF) und CD40L. P-Selektin (CD62P) lässt sich auf der Oberfläche aktivierter Plättchen nachweisen. Bei Patienten mit einem Akuten Koronarsyndrom (ACS) sind als Zeichen der erhöhten Plättchenfunktion erhöhte TF-Konzentrationen im Blut festgestellt worden[1,2]. Zur Bestimmung der Plättchenreaktivität stehen verschiedene Messmethoden zur Verfügung. Große interindividuelle Unterschiede im Ansprechen auf Clopidogrel wurden in der Literatur beschrieben, wobei die Inzidenz von sogenannten Clopidogrel „Low-respondern“ zwischen 5% und 25 % in Abhängigkeit vom Messverfahren schwankt[3,4]. Zur Bestimmung der Plättchenaggregation unter einer Therapie mit Clopidogrel bei Patienten mit einer Koronaren Herzkrankheit (KHK) wurden die Impedanzaggregometrie sowie die Bestimmung des Status der VASP-Phosphorylierung und die Messung des Oberflächenmarkers P-Selektin in dieser Arbeit benutzt. Neben Thrombozytenaggregationshemmern werden zur Therapie der KHK auch HMG-CoA Reduktasehemmer eingesetzt. Statine besitzen neben ihren den Fettstoffwechsel beeinflussenden Eigenschaften auch antithrombozytäre, antikoagulatorische und profibrinolytische Wirkungen[5-8]. In dieser Arbeit wurden 1) drei verschiedene Methoden zur Erfassung der Plättchenaggregation miteinander verglichen sowie der Einfluss einer Clopidogreldosis von 150 mg/Tag bei sogenannten Clopidogrel „Low-respondern“ auf die Reduzierung der Plättchenreaktivität untersucht; 2) der Einfluss von Clopidogrel auf die Höhe der zirkulierenden TF - Konzentration im Blut bei Patienten mit stabiler KHK, ST- Hebungs-Infarkt und bei gesunden Kontrollen untersucht. Besteht eine Beziehung zwischen der TF-Konzentration und der Thrombozytenreaktivität, gemessen an der sCD40L-Konzentration im Plasma? 3) analysiert, inwiefern die unter Clopidogreltherapie gehemmte Plättchen-degranulation und thrombozytäre Zytokinausschüttung durch eine Statintherapie mit 40 mg Atorvastatin im Vergleich zu einer Kombinationstherapie aus 10 mg Atorvastatin und 10 mg Ezetimibe weiter reduziert wird. Signifikante Korrelationen bestehen zwischen dem Status der VASP-Phosphorylierung und der Impedanzaggregometrie. Eine Clopidogreldosis von 150 mg/Tag führte nur bei sechs von zehn Patienten zu einer Reduktion der Plättchenaggregation. Ferner reduzierte die Therapie mit Clopidogrel die TF- Konzentration im Blut von Patienten mit stabiler KHK. Die Hemmung der Plättchendegranulation führte über eine verminderte Ausschüttung von TF aus den α-Granula zu einer Reduzierung der Plättchen vermittelten TF-Expression in Endothelzellen und Monozyten. Bei Patienten mit einem akuten Ereignis war diese Reduktion der TF-Konzentration unter Therapie mit Clopidogrel nicht zu beobachten. Bei vergleichbarer Reduzierung der LDL-Cholesterin Spiegel führte eine Monotherapie mit 40 mg Atorvastatin zu einer signifikanten Abnahme der Plättchenaggregation.

Abstract:

Clopidogrel, an irreversible P2Y12 receptor antagonist, inhibits the ADP-induced platelet activation and finally the platelet aggregation. Activated platelets express Tissue factor (TF) and CD40L. Also P-selectin (CD62P) is exposed upon activation on platelet surface. Increased concentration of TF in blood were found in patients with an acute coronary syndrome[1,2].

Different tests are availabel for quantifying platelet function. In literature a large inter-individual variability in reply to clopidogrel is described. The incidence of so-called low-responder fluctuates from 5% to 25% depending on the diagnostic tests[3,4].

For measuring platelet aggregation beneath clopidogrel therapy we used the impedance aggregometry, the assessment of the state of VASP-phosphorylation and the flow cytometrical detection of P-selectin (CD62-P).

In addition HMG-CoA reductase inhibitors (statins) were used for therapy in patients with coronary artery disease. Statins have also a lot of pleiotropic effects[5-8.]

In this study 1) three different methods of measuring platelet aggregation were compared to each other. Furthermore, we examined whether doubling the clopidogrel dose to 150 mg/d in so-called clopidogrel low-responder would lead to a reduction in platelet aggregation. 2) We investigated the effect of clopidogrel on circulating TF in the blood of patients with stable CAD, ST-elevation myocardial infarction and healthy controls. Is there a relationship between plasma TF and the platelet degranulation marker sCD40L? 3) We analyzed if combined treatment with ezetimibe plus low-dose atorvastatin had different effects on platelet function and plasma chemokine levels than highe-dose therapy with atorvastatin alone.

There were significant correlations between the state of VASP-phosphorylation and the impedance aggregometry. Doubling the clopidogrel dose to 150 mg/d was effective to reduce the agonist-induced platelet aggregation in only 6 of 10 patients.

Moreover, clopidogrel reduced the TF concentration in the blood of patients with stable CAD. Lowering platelet degranulation may lead to a decrease in platelet release of TF and thereby to a reduction in platelet-mediated TF expression in endothelium cells and monocyte.

No reduction in TF concentration in blood was found in patient with an acute coronary syndrome.

A therapy with 40 mg/d atorvastatin but not with 10 mg/d ezetimibe plus 10 mg/d atorvastatin reduced significantly the platelet aggregation despite a similar decrease of LDL-cholesterol.

Einleitung und Zielsetzung

Clopidogrel, ein Thienopyridin-Derivat, gehört zur Standardtherapie der Koronaren Herzkrankheit. Über eine irreversible Bindung an den ADP-Rezeptor P2Y12 der Thrombozyten blockiert Clopidogrel die ADP-induzierte Senkung des cAMP-Spiegels. Die Vernetzung der Plättchen über den Glykoprotein IIb/IIIa Rezeptor wird inhibiert und so letztendlich die Plättchenaggregation[9]. Verschiedene Studien zeigten eine große interindividuelle Variabilität im Ansprechen auf Clopidogrel, wobei die Inzidenz von sogenannten Clopidogrel „Low-respondern" mit einem erhöhten kardiovaskulärem Risiko[10] abhängig vom benutzten Meßverfahren zwischen 5% und 25% variierte[3,4]. Zur Bestimmung der Thrombozytenaktivierung stehen unter anderem die durchflusszytometrische Messung von CD62P auf der Plättchenoberfläche [11-14], die Bestimmung der VASP-Phosphorylierung[15,16] und die Impedanzaggregometrie zur Verfügung. Die α-Granula der Thrombozyten enthalten unter anderem TF, CD62P und CD40-Ligand (CD40L)[17]. Nach einer Plättchenaktivierung kommt es zur Exposition von TF, CD62P und CD40L aus den Granula an die Plättchenoberfläche. CD40L wird als lösliche Form (sCD40L) ins Blut abgegeben. TF ist der Initiator der intravaskulären Gerinnung[1]. Als Zeichen einer erhöhten Thrombozytenreaktivität und einer Aktivierung des Gerinnungssystems wurden bei Patienten mit einem Akuten Koronarsyndrom im Blut erhöhte TF-Konzentrationen nachgewiesen[2,18] sowie P-Selektin, als ein Marker der Plättchenaktivierung, vermehrt auf der Thrombozytenoberfläche[19]. Neben Clopidogrel gehören auch HMG-CoA-Reduktasehemmer zur Standardtherapie einer Koronaren Herzkrankheit. Statine tragen zu einer Reduzierung des LDL-Cholesterin (LDL-C) -Spiegels im Blut bei und verringern über antithrombozytäre, antikoagulatorische und profibrinolytische Wirkungen die erhöhte Blutthrombogenität bei Patienten mit atherosklerotischen Erkrankungen[5-8].

Ziel der Promotion war es, 1) drei verschiedene Methoden zur Erfassung der Plättchenaggregation unter einer Clopidogreltherapie miteinander zu vergleichen und zu prüfen, ob eine Erhöhung der Clopidogreldosis auf 150 mg/Tag bei sogenannten Clopidogrel „Low-respondern" eine Reduzierung der Plättchenreaktivität bewirkt, 2) zu untersuchen, in wieweit Clopidogrel die Höhe der zirkulierenden TF - Konzentration im Blut von Patienten mit stabiler Koronarer Herzkrankheit, ST- Hebungs-Infarkt (STEMI) und gesunden Kontrollen beeinflusst und ob eine Beziehung zwischen der TF-Konzentration und der Thrombozytenreaktivität, gemessen an der sCD40L-Konzentration im Plasma, besteht und 3) zu analysieren, inwiefern die unter Clopidogreltherapie gehemmte Plättchendegranulation und thrombozytäre Zytokinausschüttung durch eine Statintherapie mit 40 mg Atorvastatin im Vergleich zu einer Kombinationstherapie, bestehend aus 10 mg Atorvastatin und 10 mg Ezetimibe, weiter beeinflusst wird.

Methoden

Um drei verschiedene Methoden zur Bestimmung der Thrombozytenaktivität miteinander zu korrelieren wurden 100 Patienten mit einer Koronaren Herzerkrankung (31 mit einem Akuten Koronarsyndrom, 69 mit einer stabilen KHK) sowie 18 gesunde Probanden ohne Medikation als Kontrollen untersucht. Die Patienten erhielten eine Clopidogrel „loading dose“ (LD) von 600 mg während oder unmittelbar vor der Herzkatheteruntersuchung gefolgt von Clopidogrel 75 mg/Tag plus ASS 100 mg/Tag. Patienten, welche bereits eine tägliche Dosis von 75 mg Clopidogrel zu sich nahmen, erhielten eine LD von 300 mg Clopidogrel während oder unmittelbar vor der Herzkatheteruntersuchung.

Bei allen 100 Patienten wurde innerhalb von 24 Stunden nach Gabe der LD die ADP-, ADP Hs- und TRAP-induzierte Plättchenaggregation mit Hilfe der Impedanzaggregometrie (Multiplate® Analyser) gemessen sowie zusätzlich in einer Untergruppe von 34 Patienten die Plättchenfunktion mittels der durchflusszytometrischen Messung der VASP-Phosphorylierung und der P-Selektin-Oberflächendichte bestimmt. In der Kontrollgruppe erfolgte die Analyse der Plättchenaggregation mit allen drei Messmethoden.

Zusätzlich wurden zehn weitere Patienten mit einer KHK und rezidivierenden thrombotischen Ereignissen oder rezidivierenden Angina pectoris – Beschwerden, bei welchen die ADP-induzierte Plättchenaggregation trotz Clopidogreleinnahme oberhalb der 75. Perzentile lag, gemessen mit der Impedanzaggregometrie, untersucht . Bei diesen sog. Clopidogrel „Low-respondern“ wurde mit Hilfe der Impedanzaggregometrie geprüft, in wieweit eine Erhöhung der täglichen Clopidogreldosis auf 150 mg/Tag zu einer Reduzierung der Plättchenreaktivität führt.

Für die gesamte statistische Auswertung wurden SPSS Statistical Software Version 11.0.1/12.0 und GraphPad Prism 4 verwendet. Ein p-Wert von $< 0,05$ im zweiseitigen Test wurde als signifikant angesehen. In der oben beschriebenen Untersuchung wurden mit Hilfe des Kolmogoroff Smirnow Tests die Daten auf Normalverteilung überprüft. Die Daten wurden als Median, 25. und 75. Perzentile angegeben. Nicht normalverteilte Daten wurden mit Hilfe des Mann Whitney Tests verglichen. Für die Korrelationen wurde für parametrische Daten die Pearson Korrelation und für nicht parametrische Daten der Spearman's rank Korrelationskoefizient verwendet.

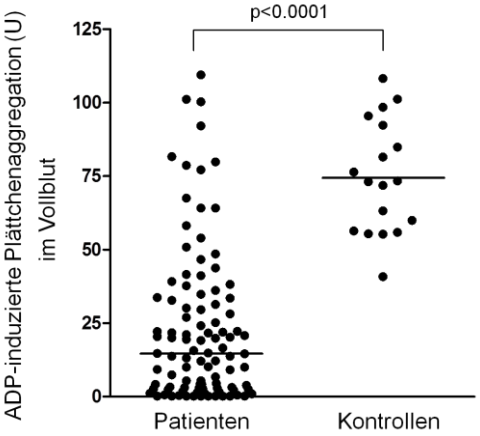
In einer zweiten Untersuchung wurden die TF-Konzentrationen sowie die sCD40L Konzentrationen im Blut vor und während einer Clopidogreltherapie bei Patienten mit stabiler KHK (n=43), mit STEMI (n=20) und bei gesunden männlichen Kontrollen (n=30) quantifiziert. Die Blutentnahmen erfolgten vor der Clopidogrelgabe und 96 Stunden nach Gabe von 300 mg Clopidogrel. Anschließend wurde die Erhaltungsdosis von Clopidogrel 75

mg/Tag verabreicht. Zehn der Patienten mit stabiler KHK erhielten nur ASS und dienten als Kontrollen.
Zur Quantifizierung der TF-Konzentration benutzten wir einen ELISA der Firma American Diagnostics. Die sCD40L- ELISA Messungen wurden mit einem Kit der Firma Bender MedSystems durchgeführt. Desweiteren wurden die Entzündungsparameter CRP und die Leukozytenzahl bei Aufnahme ins Krankenhaus gemessen.
Diese Daten wurden mittels Chi Square Test und Fisher exact Test untersucht. Unterschiede zwischen den Gruppen/Zeitpunkten wurden mit Hilfe des t-Tests für gepaarte und nicht gepaarte Proben analysiert. Multi- und univariate Analysen wurden genutzt, um Einflüsse von statistisch signifikant unterschiedlichen Patientenparametern auf die Messergebnisse zu untersuchen. Die Daten wurden als Mittelwert ± SEM/SD dargestellt.

In einer weiteren Untersuchung wurde die Therapie mit 40 mg Atorvastatin pro Tag mit einer Therapie mit 10 mg Atorvastatin plus 10 mg Ezetimibe bei n=51 Patienten mit stabiler KHK und laufender Clopidogreleinnahme verglichen. Hierfür wurde die Plättchenstimulation und -aggregation sowie die Zytokinausschüttung und die Konzentration von LDL- Cholesterin im Blut bestimmt. Alle Patienten wiesen LDL-Cholesterinwerte > 2,5 mmol/l auf und waren bereits mit ASS und Clopidogrel sowie mit Atorvastatin (10 mg oder 20 mg/Tag) vorbehandelt. Die Patienten wurden randomisiert einer Kombinationstherapie, bestehend aus 10 mg Atorvastatin und 10 mg Ezetimibe (n= 26), oder einer alleinigen Statintherapie (40 mg Atorvastatin, n=25) zugeteilt. Blutentnahmen erfolgten vor und vier Wochen nach Einschluss in die Studie. Die Plättchendegranulation wurde an Hand von durchflusszytometrischen Messungen der Oberflächenmarker CD62P und CD63 nach Stimulation mit ADP (20 µmol/l) und TRAP (10 µmol/l) bestimmt. Mit dem Plättchen Aggregations Profiler (PAP4, Biodata Corp., Pennsylvania, USA) wurde die Plättchenaggregation nach Stimulation mit ADP (20 µmol/l) und TRAP (10 µmol/l) gemessen. Die Plasmakonzentration von RANTES wurde mit einem ELISA der Firma Bender MedSystems bestimmt.
Mit Hilfe des t-Tests wurden die Expression der Oberflächenmarker der Plättchen, die Plättchenaggregation, der Plasma-Chemokinspiegel und die LDL-C Konzentration analysiert.

Ergebnisse und Diskussion

Clopidogrel führte zu einer signifikanten Reduktion der Plättchenaggregation gemessen mit der Impedanzaggregometrie und der durchflusszytometrischen Bestimmung des Status der VASP-Phosphorylierung (Abbildung 1 und Abbildung 2).
Clopidogrel reduzierte die ADP-induzierte Plättchendegranulation und verringerte damit die Freisetzung von TF aus den α-Granula.



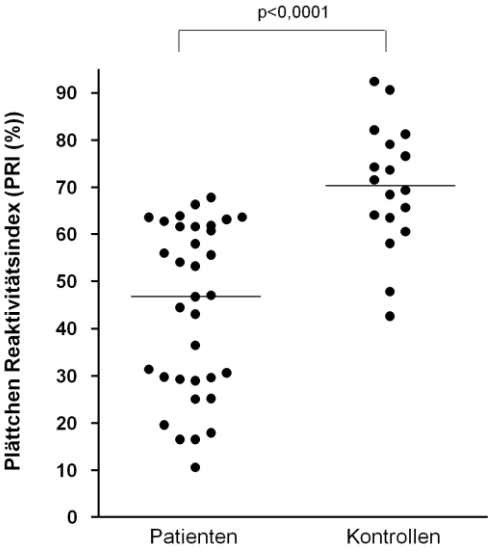


Abbildung 1: Plättchenaggregation nach Stimulation mit ADP gemessen mit der Impedanzaggregometrie bei n=100 Patienten und n=18 Kontrollen

Abbildung 2: Plättchenaggregation gemessen mit der durchflusszytometrischen Bestimmung des Status der VASP-Phosphorylierung bei n=34 Patienten und n=18 Kontrollen

Patienten mit einem Akutem Koronarsyndrom zeigten eine stärkere ADP-induzierte Plättchenreaktivität als Patienten mit einer stabilen KHK (Abbildung 3a/b). Zudem wurde bei Patienten mit einem akuten Myokardinfarkt 96 Stunden nach Beginn der Clopidogreltherapie keine signifikante Reduktion der TF- und sCD40L-Konzentrationen im Plasma nachgewiesen. Bei Patienten mit einer stabilen KHK führte eine Clopidogreltherapie jedoch zu einer signifikanten Reduktion der TF-Konzentration im Plasma (Abbildung 4)

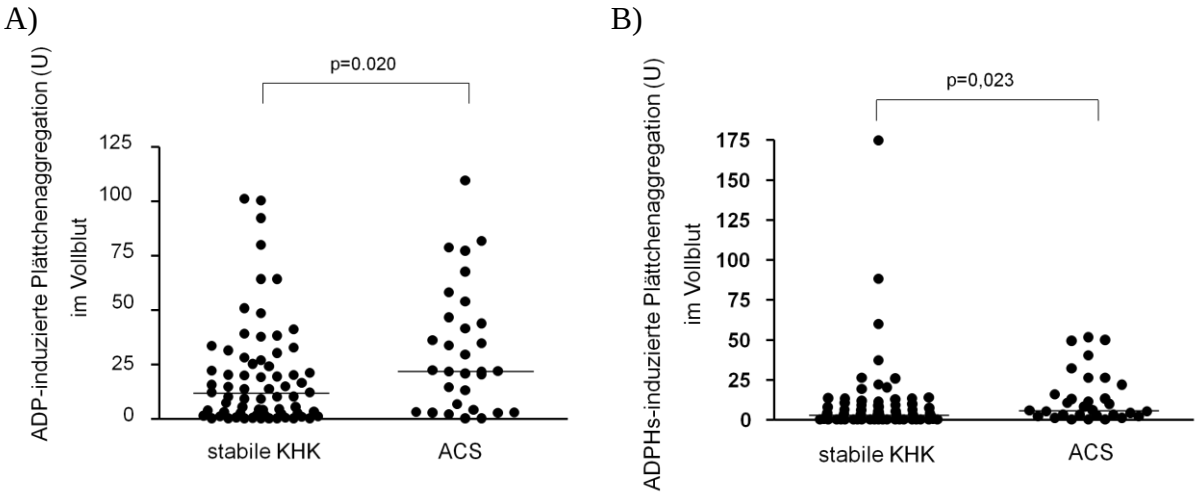


Abbildung 3A und 3B: Plättchenaggregation nach Stimulation mit ADP (a) und ADPHs (b) gemessen mit der Impedanzaggregometrie bei Patienten mit einer stabilen KHK (n=69) und einem ACS (n=31).

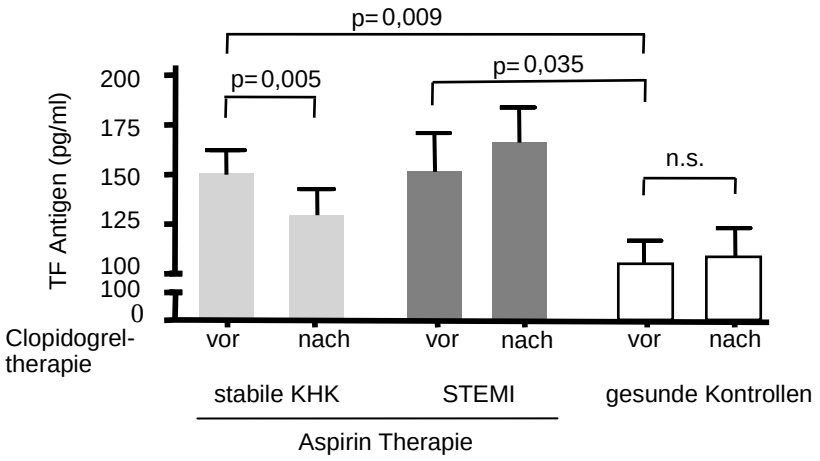


Abbildung 4:
Einfluß von Clopidogrel auf die TF-Konzentration im Blut von Patienten mit stabiler KHK, STEMI und gesunden Kontrollen.

Bei Patienten mit einem Myokardinfarkt sind erhöhte Konzentrationen inflammatorisch wirkender Zytokine sowie erhöhte Entzündungswerte, gemessen am CRP-Wert, nachzuweisen. Inflammatorisch wirkende Zytokine induzieren die TF-Expression in Endothelzellen und Monozyten[20]. Vermutlich trägt bei Patienten mit einem Myokardinfarkt die Entzündungsreaktion maßgeblich zu einer vermehrten TF-Synthese bei. Clopidogrel führte bei diesen Patienten nicht zu einer signifikanten Reduktion der TF-Konzentrationen im Blut.

Erhöhte TF Konzentrationen waren bei Patienten mit stabiler Koronarer Herzkrankheit mit einem steigenden Risiko für zukünftige thrombotische Ereignisse assoziiert[21]. Wir und andere[22] zeigten, daß Clopidogrel die Konzentration von sCD40L im Plasma signifikant absenkte. Ferner wurde durch eine Clopidogreltherapie der sCD40L Spiegel im Blut gesenkt und damit die Freisetzung von proinflammatorisch wirkenden Zytokinen gehemmt. Dies beeinflusst möglicherweise auch die TF Konzentration im Blut von Patienten mit stabiler KHK. Eine Korrelation zwischen der TF- und sCD40L-Konzentration ließ sich nur in der Kontrollgruppe und in einer kombinierten Gruppe, bestehend aus Kontrollen und Patienten mit stabiler KHK, beobachten, nicht jedoch in der Infarktgruppe.

Zum Vergleich der drei oben genannten Meßmethoden zur Erfassung der Plättchenaktivität unter einer Clopidogreltherapie wurden Korrelationsanalysen durchgeführt. Es ergab sich eine signifikante Korrelation zwischen dem Status der VASP-Phosphorylierung und der Impedanzaggregometrie (Abbildung 5), so dass wir die nachfolgenden Analysen mit der Impedanzaggregometrie durchführten.

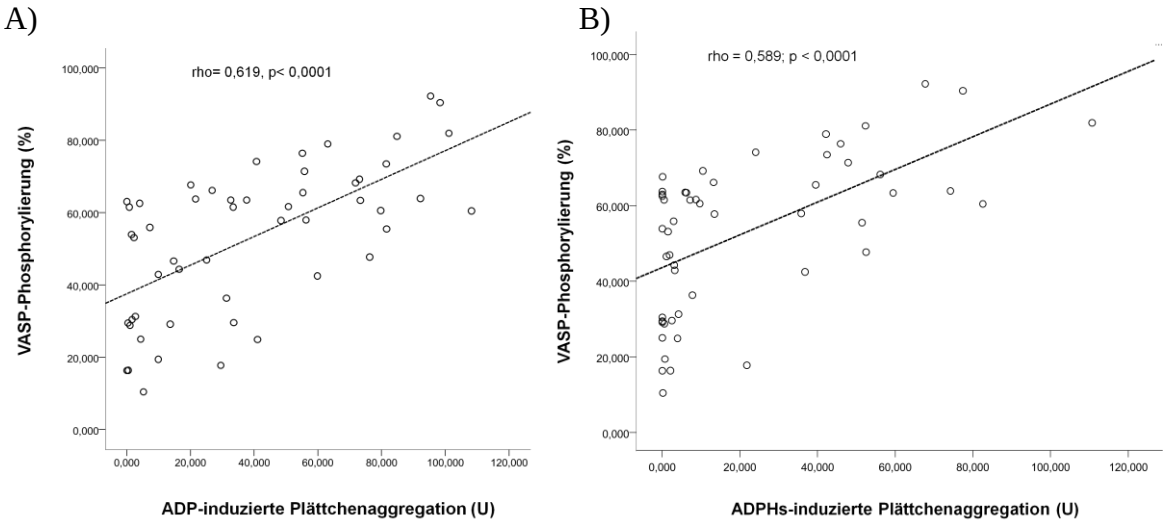


Abbildung 5a/b: Korrelation zwischen der ADP-induzierten (a) und ADPHs-induzierten (b) Plättchenaggregation gemessen mit der Impedanzaggregometrie und der durchflusszytometrisch quantifizierten VASP-Phosphorylierung bei Patienten mit einer KHK und Kontrollen (n=52).

Die Bestimmung der VASP-Phosphorylierung ist ein sehr spezifischer Test für die über den P2Y12-Rezeptor vermittelten Signalwege[23-25]. Hingegen stellt die Impedanzaggregometrie eine einfache und schnelle Messmethode dar, welche auf Vollblut zurückgreift[26.27]. Einer der Vorteile des Multiplate® Tests ist ein Software gesteuerter Pipettierablauf mit der Möglichkeit, fünf Messungen parallel durchzuführen. Velik-Salchner et al. beschrieben die Impedanzaggregometrie als eine mit der klassischen Transmissionsaggregometrie vergleichbare Methode, die der Erfassung der Wirksamkeit von Clopidogrel bei kardiologischen Patienten dient[28].

Im Vergleich zur Analyse der VASP-Phosphorylierung, bei der die Plättchenaggregation in einer flüssigen Phase stattfindet, aggregieren die Thrombozyten bei der Impedanzaggregometrie an den Sensordrähten. Dieser Vorgang entspricht den Verhältnissen in vivo, wo die Plättchen an der verletzten Gefäßwand oder an atheromatöse Plaques adhärieren[29].

Keine Korrelationen zwischen der Messung der ADP-induzierten Plättchenaggregation und der Impedanzaggregometrie sowie der durchflusszytometrischen Analyse von P-Selektin an der Plättchenoberfläche wurden in dieser Studie beobachtet.

Patienten mit einer erhöhten Plättchenreaktivität trotz Clopidogreltherapie besitzen ein erhöhtes Risiko, künftig an kardiovaskulären Ereignissen zu erkranken[30,31]. Buonamici et al. beschrieben ein nahezu vierfach erhöhtes Risiko für Stentthrombosen bei Patienten mit einer erhöhten Agonist-induzierten Plättchenreaktivität unter der Therapie mit Clopidogrel[32].

In einer weiteren Untersuchung schlossen wir zehn Patienten mit einer KHK und einer erhöhten Plättchenreaktivität trotz Clopidogreltherapie, sog. Clopidogrel „Low-responder“,

ein. Diese Patienten zeigten rezidivierende kardiovaskuläre Ereignisse oder rezidivierende Angina pectoris Beschwerden trotz der täglichen Einnahme von 75 mg Clopidogrel.
Entsprechend der Empfehlungen der kardiologischen Fachgesellschaften von 2006 erhielten diese zehn Patienten die doppelte Clopidogreldosis (150 mg/Tag). Bei nur sechs von zehn Patienten wurde hierdurch die ADP-induzierte Plättchenaggregation unter die 75. Perzentile abgesenkt.

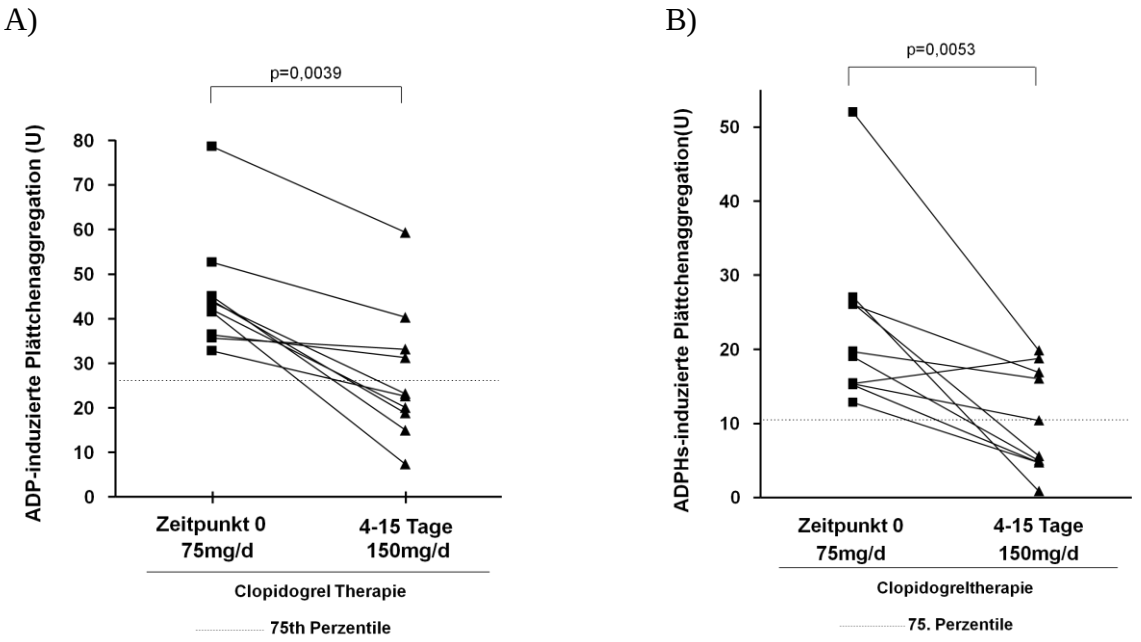


Abbildung 6a/b: ADP- induzierte (a) und ADPHs-induzierte (b) Plättchenaggregation gemessen anhand der Impedanzaggregometrie bei sog. Clopidogrel „Low-respondern“ (n=10) zum Zeitpunkt 0 unter einer Clopidogreldosis von 75 mg/Tag und 4-15 Tagen nach Gabe von 150 mg Clopidogrel pro Tag.

Die GRAVITAS Studie[31] zeigte, dass eine Verdopplung der Clopidogreldosis nicht das Risiko für zukünftige kardiovaskuläre Ereignisse verringern konnte. Im ADAPT-DES-Trial wurde dargestellt, dass das Ausmaß der Plättcheninhibition ein Prädiktor für Stentthrombosen bei Patienten nach Drug-eluting-Stentimplantation war. Das verringerte Ansprechen auf Clopidogrel war mit dem Auftreten von Stentthrombosen innerhalb von 30 Tagen bei Patienten mit Akutem Koronarsyndrom assoziiert. Die Wirksamkeit der antiaggregatorischen Medikation scheint damit das Auftreten von Stentthrombosen bei Patienten mit einem ACS, nicht aber bei Patienten mit stabiler KHK prognostizieren zu können. Die kürzlich veröffentlichten Studien ADPAT-DES und TRIGGER-PCI befürworten die routinemäßige Anwendung von Plättchenfunktionstests nicht. Dennoch ist gerade bei Patienten mit einer stabilen KHK und rezidivierenden thrombotischen Ereignissen die Überprüfung der Plättchenreaktivität z.B. mittels der Impedanzaggregometrie unter einer antithrombozytären

Therapie von Interesse, da neuere potentere Thrombozytenhemmer wie Ticagrelor und Prasugrel verfügbar sind.
Zu einer Therapie der koronaren Herzerkrankung gehören standardmäßig Statine. Es zeigte sich eine signifikante Abnahme der Plättchendegranulation unter 40 mg Atorvastatin im Vergleich zu einer Therapie mit 10 mg Atorvastatin plus 10 mg Ezetimibe. Sowohl nach ADP- als auch nach TRAP-Stimulation wurde eine reduzierte Plätchendegranulation vier Wochen nach Behandlungsbeginn beobachtet. Parallel zur reduzierten Plättchendegranulation kam es unter einer Therapie mit 40 mg Atorvastatin auch zu einer signifikanten Abnahme der RANTES-Konzentration im Plasma. Bei Patienten, welche die Kombinationstherapie erhielten, war dies nicht zu beobachten.
Blutplättchen von Patienten mit einer Hyperlipoproteinämie reagieren empfindlicher auf aggregatorische Stimulantien als solche von Patienten mit normalen Cholesterinwerten. Neben der LDL-Cholesterin senkenden Wirkung beeinflussen Statine den Cholesterolgehalt der Plättchenmembran. Damit wird die Fließeigenschaft der Membran geändert und somit die Plättchenfunktion beeinflusst[8]. Des Weiteren reduzieren Statine die monozytäre TF-Expression und mindern damit die TF- vermittelte Thrombinentstehung[33].

Zusammenfassend zeigen unsere Untersuchungen, dass die Plättchenaggregation beurteilt mit verschiedenen Messmethoden bei Patienten mit einer Koronaren Herzkrankheit im Vergleich zu gesunden Probanden erhöht ist. Hierbei zeigen Patienten mit einem Akuten Koronarsyndrom eine höhere agonist-induzierte Plättchenreaktivität als Patienten mit einer stabilen KHK. Clopidogrel reduziert die TF- und die sCD40L-Konzentrationen im Blut. Eine hochdosierte Statintherapie führt ebenfalls zu einer Reduktion der Plättchenaggregation im Vergleich zu einer Therapie mit 10 mg Atorvastatin plus 10 mg Ezetimibe pro Tag.
Patienten mit einer erhöhten Plättchenaktivität trotz der Clopidogreltherapie, sogenannte „Low-responder“, weisen ein erhöhtes Risiko für zukünftige kardiovaskuläre Ereignisse auf. Die Impedanzaggregometrie stellt eine einfach durchzuführende und schnelle Methode dar, diese Patienten zu selektieren. Eine Dosiserhöhung von Clopidogrel ist nicht effektiv genug, um die erhöhte Plättchenaggregation dieser Patienten ausreichend zu reduzieren. Der Einfluss der neuen potenteren Substanzen Prasugrel und Ticagrelor auf die Sekretion von Chemokinen wurde bisher nur wenig untersucht. Studien zum Einsatz von Prasugrel und Ticagrelor bei sogenannten Clopidogrel „Low-respondern“ sind von zukünftigem Interesse.

Literatur

1. Rauch U, NemersonY. Tissue factor, the blood, and the arterial wall. Trends Cardiovasc Med 2000;10(4):139-43
2. Rauch U, Bondermann D, Bohrmann B, et al. Transfer of tissue factor from leukocytes to platelets is mediated by CD15 and tissue factor. Blood 20006(1):170-5
3. Vila PM, Zafar MU, Badimon JJ. Platelet reactivity and nonresponse to dual antiplatelet therapy: a review. Platelets 2009; 20:531-8.
4. Armero A, Camoin Jau L, Omar Ait Mokhtar O, et al. Intra-individual variability in clopidogrel responsiveness in coronary artery disease patients under long term therapy. Platelets 2010; 21:503-7.
5. Werner N, Nickenig G, Laufs U. Pleiotropic effects of HMG-CoA reductase inhibitors. Basic Res Cardiol 2002;97:105–16.
6. Rauch U, Osende JI, Chesebro JH, et al. Statins and cardiovascular diseases: the multiple effects of lipid-lowering therapy by statins. *Atherosclerosis*. 2000; 153:181-9.
7. Splichal JE, Stamm JA, Ornstein DL. The statins: multifunctional antithrombotic and antineoplastic drugs. *Semin Thromb Hemost*. 2003; 29(3): 259-74.
8. Bonetti PO, Lerman LO, Napoli C, Lerman A. Statin effects beyond lipid lowering-are they clinically relevant? Eur Heart J 2003;24:225-48
9. Jarvis B, Simpson K. Clopidogrel: a review of its use in the prevention of atherothrombosis. *Drugs*. 2000; 60(2):347-77.
10. Geisler T, Langer H, Wydymus M, et al. Low response to clopidogrel is associated with cardiovascular outcome after coronary stent implantation. Eur Heart J 2006; 27(20):2420-5.
11. Geiger J, Teichmann L, Grossmann R, et al. Monitoring of Clopidogrel Action: Comparison of Methods. Clin Chem. 2005;51(6):957-65.
12. Rauch U, Ziegler D, Piolot R, et al. Platelet activation in diabetic cardiovascular autonomic neuropathy. Diabet Med. 1999; 16(10):848-52.
13. Stellbaum C, Willich T, Boltzen U, et al. Clopidogrel-mediated reduction of circulating tissue factor in patients with stable coronary artery disease. Eur J Haematol 2007;78:347–52.
14. Weikert U, Kühl U, Schultheiss HP, Rauch U. Platelet activation is increased in patients with cardiomyopathy: myocardial inflammation and platelet reactivity.

Platelets 2002;13:487–91.

15. Siller-Matula JM, Christ G, Lang IM, Delle-Karth G, Huber K, Jilma B. Multiple electrode aggregometry predicts stent thrombosis better than the vasodilator stimulated phosphoprotein phosphorylation assay. J Thromb Haemost 2010; 8:351–9.

16. Geiger J, Brich J, Honig-Liedl P, et al. Specific impairment of human platelet P2Y(AC) ADP receptor- mediated signaling by the antiplatelet drug clopidogrel. Arterioscler Thromb Vasc Biol 1999; 19: 2007–11.

17. Gawaz, Meinrad. Das Blutplättchen. Thieme Verlag 1999
18. Scholz T, Temmler U, Krause S, Heptinstall S, Losche W. Transfer of tissue factor from platelets to monocytes: role of platelet-derived microvesicles and CD62P. Thromb Haemost 2002;88(6):1033-8
19. Piorkowski M, Weikert U, Schwimmbeck PL, Martus P, Schultheiss HP, Rauch U. ADP induced platelet degranulation in healthy individuals is reduced by clopidogrel after pre-treatment with atorvastatin. Thromb. Haemost. 2004;92(3):614-20
20. Szotowski B, Antoniak S, Poller W, Schultheiss HP, Rauch U. Procoagulant soluble tissue factor is released from endothelial cells in response to inflammatory cytokines. Circ Res 2005;96:1233–9.
21. Rauch U, Osende JI, Fuster V, Badimon JJ, Fayad Z, Chesebro JH. Thrombus formation on atherosclerotic plaques: pathogenesis and clinical consequences. Ann Intern Med 2001;134:224–38.
22. Hermann A, Rauch BH, Braun M, Schror K, Weber AA. Platelet CD40 ligand (CD40L)-subcellular localization, regulation of expression, and inhibition by clopidogrel. Platelets 2001;12:74–82.
23. Mueller T, Dieplinger B, Poelz W, Calatzis A, Haltmayer M. Utility of whole blood impedance aggregometry fort the assessment of clopidogrel action using the novel Multiplate analyzer-comparison with two flow cytometric methods. Thromb Res 2007;121:249–58.
24. Michelson AD. Methods for the measurement of platelet function. Am J Cardiol 2009;103(3 Suppl):20A–6A.
25. Barragan P, Bouvier JL, Roquebert PO, et al. Resistance to thienopyridines: clinical detection of coronary stent thrombosis by Monitoring of vasodilator-stimulated phosphoprotein phosphorylation. Catheter Cardiovasc Interv 2003;59(3):295–302.
26. Sibbing D, Braun S, Morath T, et al. mPlatelet reactivity after clopidogrel treatment assessed with point-of-care analysis and early drugeluting stent thrombosis. J Am Coll Cardiol 2009;53:849–56.

27. von Beckerath N, Sibbing D, Jawansky S, et al. Assessment of platelet response to clopidogrel with multiple electrode aggregometry, the VerifyNow P2Y12 analyzer and platelet vasodilator-stimulated phosphoprotein flow cytometry. Blood Coagulation and Fibrinolysis 2010;21:46–52.
28. Velik-Salchner C, Maier S, Innerhofer P, et al. Point-of-care whole blood impedance aggregometry versus classical light transmission aggregometry for detecting aspirin and clopidogrel: the results of a pilot study. Anesth Analg 2008;107(6):1798–806.
29. Calatzis A, Loreth R, Spannagl M. Multiplate® platelet function analysisapplication and interpretation. Multiplate® compendium.
30. Matetzky S, Shenkman B, Guetta V, et al. Clopidogrel resistance is associated with increased risk of recurrent atherothrombotic events in patients with acute myocardial infarction. Circulation 2004;109(25):3171–5.
31. Price MJ, Berger PB, Angiolillo DJ, et al. Evaluation of individualized clopidogrel therapy after drug-eluting stent implantation in patients with high residual platelet reactivity: design a rationale of the GRAVITAS trial. Am Heart J 2009;157:818–24.
32. Buonamici P, Marcucci R, Migliorini A, et al. Impact of platelet reactivity after clopidogrel administration on drug-eluting stent thrombosis. J Am Coll Cardiol 2007;49:2312–7.
33. Ferro D, Basili S, Alessandri C, Cara D, Violi F. Inhibition of tissue-factor-mediated thrombin generation by simvastatin. Atherosclerosis 2000,149:111-116

Erklärung über den Anteil an den Publikationen

Der Promovend hatte folgenden Anteil an den eingereichten Publikationen:

Publikation 1:

Stellbaum C., MD; Ayral Y., MD; Morguet A., MD; Schultheiss H.-P., MD and Rauch U.*, MD. Doubling the clopidogrel dose in patients with reduced responsiveness to the standard dose is associated with a limited effectiveness as evaluated by impedance aggregometry. Cardiovasc Revasc 2012 May-Jun;13(3):159-66. Epub 2012 Apr 14

(insgesamt Beteiligung: 70 %)

Beitrag im Einzelnen: Durchflußzytometrie (VASP-Phosphorylierung; P-Selektin), Impedanzaggregometrie, Patientenscreening

Publikation 2:

Stellbaum C, Willich T, Boltzen U, Ayral Y, Szotowski B, Piorkowski M, Schultheiss HP, Rauch U. Clopidogrel-mediated reduction of circulating tissue factor in patients with stable coronary artery disease. European Journal of Haematology, 2007;78:347-352.

(insgesamt Beteiligung: 45 %)

Beitrag im Einzelnen: ELISA-Messungen zur Quantifizierung der TF- und sCD40L-Plasmakonzentrationen, Patientenscreening

Publikation 3:

Piorkowski M, Fischer S, **Stellbaum C**, Jaster M, Martus P, Morguet AJ, Schultheiss HP, Rauch U.

Treatment with ezetimibe plus low-dose atorvastatin compared to higher-dose atorvastatin alone: is sufficient cholesterol-lowering enough to inhibit platelets? Journal of the American College of Cardiology, 2007;49:1035-42.

(insgesamt Beteiligung: 10 %)

Beitrag im Einzelnen: ELISA-Messungen zur Quantifizierung der RANTES-Plasmakonzentrationen

Berlin, den 21.05.2012

Unterschrift und Stempel der betreuenden Hochschullehrerin und Unterschrift des Doktoranden

L E B E N S L A U F

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Publikationsliste

1. C. Stellbaum, MD; Y. Ayral, MD; A. Morguet, MD; H-P. Schultheiss, MD and U. Rauch, MD. Doubling the clopidogrel dose in patients with reduced responsiveness to the standard dose is associated with a limited effectiveness as evaluated by impedance aggregometry. Cardiovasc Revasc 2012 May-Jun;13(3):159-66. Epub 2012 Apr 14

2. C. Stellbaum, T. Willich, U. Boltzen, Y. Ayral, B. Szotowski, M. Piorkowski, H.P. Schultheiss, U. Rauch. Clopidogrel-mediated reduction of circulating tissue factor in patients with stable coronary artery disease. Eur J Haematol 2007;78:347-352

3. M. Piorkowski, S. Fischer, C. Stellbaum, M. Jaster, P. Martus, A.J. Morguet, H.P. Schultheiss, U. Rauch. Treatment with Ezetimibe plus low-dose atorvastatin compared to higher-dose atorvastatin alone: is sufficient cholesterol-lowering enough to inhibit platelets? J Am Coll Cardiol 2007;49:1035-42

4. Y. Ayral, U. Rauch, P. Goldin-Lang, C. Stellbaum, C. Deiner, P.L. Schwimmbeck, H.P. Schultheiss, K. Pels. Prolonged application of clopidogrel reduces inflammation after percutaneous coronary intervention in the porcine model. Cardiovasc Revasc Med. 2007 Jul-Sep;8(3):183-8

5. M. Jaster, D. Horstkotte, T. Willich, C. Stellbaum, W. Knie, S. Spenker, M. Pauschinger H.P. Schultheiss, U. Rauch. The amount of fibrinogen-positive platelets predicts the occurence of in-stent restenosis. Atherosclerosis. 2008 Mar;197(1):190-6. Epub 2007 May 7

6. S. Antoniak, U. Bolzen, A. Eisenreich, C. Stellbaum, W. Poller, H.P. Schultheiss, U. Rauch. Regulation of cardiomyocyte full-lenght tissue factor expression an microparticle release under inflammatory conditions in vitro. J Thromb Haemost. 2009 May; 7(5):871-8. Epub 2009 Feb 18.

Abstracts:

1. U. Rauch, T. Willich, C. Stellbaum, M. Hofferberth, M. Piorkowski, W. Poller. Clopidogrel does not only reduce platelet degranulation and soluble CD40 ligand but also tissue factor in blood of patients with coronary artery disease. Eur Heart J 26, Suppl 1, P2967 (2006)

2. T. Willich, C. Stellbaum, M. Hofferberth, M. Piorkowski, U. Rauch. Clopidogrel reduziert die thrombozytäre Sekretion von sCD40 Ligand und senkt den Plasmaspiegel von sCD40 Ligand und Tissue Faktor. Clin Res Cardiol 95, Suppl 5, KN582 (2006).

3. C. Stellbaum, C. Schütte, F. Bleis, U. Boltzen, Y. Ayral, H-P. Schultheiss, U. Rauch. In search of a reliable and fast method for assessing platelet function inhibition under clopidogrel treatment (74. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie in Mannheim 2008)

4. C. Stellbaum, C. Schütte, F. Bleis, H-P. Schultheiss, U. Rauch. Detection of clopidogrel low-responder by measurement of platelet aggregation with impedance aggregometry. (74. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie in Mannheim 2008)

5. S. Antoniak, U. Bolzen, A. Eisenreich, C. Stellbaum, W. Poller, H.-P. Schultheiss, U. Rauch-Kröhnert. Regulation of cardiomyocyte TF expression an cardiomyocyte-endothelium interaction under inflammatory conditions. (74. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie in Mannheim 2008)

6. C. Schütte, C.Stellbaum, F.Bleis, Y, Ayral, A.J.Morguet, H.-P. Schultheiss, U. Rauch-Kröhnert. Reduzierte Wirksamkeit von Clopidogrel bei Patienten mit Typ-2 Diabetes mellitus. (74. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie in Mannheim 2008)

Erklärung

„Ich, Caroline Stellbaum, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Die Bedeutung der ADP-Rezeptorhemmung durch Clopidogrel für die Plättchendegranulation und -aggregation bei Patienten mit Koronarer Herzkrankheit“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Berlin, den 21.05.2012 Caroline Stellbaum

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich denen danken, die es mir ermöglicht haben, diese Arbeit zu schreiben.

Mein besonderer Dank gilt meiner Doktormutter Frau Professor Dr. med. U. Rauch – Kröhnert für das Überlassen des Dissertationsthemas und für die Unterstützung und Gesprächsbereitschaft sowie für die Ratschläge, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.
Ein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. med. H.-P. Schultheiss, dem Leiter und Direktor der Medizinischen Klinik II für Kardiologie und Pulmologie, dafür, dass ich in seiner Klinik meine Dissertation durchführen konnte.
Desweitern möchte ich mich bei allen jetzigen und ehemaligen Mitarbeitern des Forschungslabors für Thrombose und Hämostase, insbesondere bei Franziska Bleis, Alice Weithäuser und Yunus Ayral bedanken sowie bei Dr. Ulrike Bolzen, die mir zu jeder Zeit bei Fragen und Problemen mit Rat und Tat zur Seite standen und mich bei meiner Arbeit konstruktiv unterstützt haben.
Außerdem danke ich den Ärzten und Schwestern der kardiologischen Stationen des CBF, die mir bei meiner Suche nach geeigneten Patienten geholfen haben.

Ein ganz großer Dank gilt meiner lieben Familie für ihre Unterstützung auf dem nicht immer einfachen Weg zur Promotion.

Berlin, den 21.05.2012