Aus der Klinik für Kardiologie und Pulmologie Medizinische Klinik II

der medizinischen Fakultät Charite – Universitätsmedizin Berlin

Dissertation

Die Wirkung von antithrombotischen Substanzen auf die Plättchenfunktion und auf die systemische Entzündungsreaktion bei Patienten mit PAVK

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät

Charite – Universitätsmedizin Berlin

von

Alexander Meyer

aus Bad Oeynhausen / Deutschland

Datum der Promotion: 08.12.2017

Inhaltsverzeichnis

1a. Abstract (deutsch) **1**

1b. Abstract (englisch) **2**

2. Einleitung und Zielsetzung **3**

3. Methodik **4**

4. Ergebnisse **6**

5. Diskussion **10**

6. Literaturverzeichnis **13**

7. Eidesstattliche Versicherung / Anteilserklärung **16**

8. Druckexemplare der ausgewählten Publikationen **18**

a. *Alexander Meyer, Alice Weithaeuser, Daniel Steffens, Peter Bobbert, Adel Hassanein, Yunus Ayral, Heinz-Peter Schultheiss, Ursula Rauch. Inhibition of platelet function with clopidogrel is associated with a reduction of inflammation in patients with peripheral artery disease. Cardiovasc Revasc Med. 2016 Apr-May;17(3):169-75. doi: 10.1016/j.carrev. 2016.01.010.* *18*

b. *Wojciech Pepke, Andreas Eisenreich, Markus Jaster, Ronny Malz, Yunus Ayral, Alexander Meyer; Heinz-Peter Schultheiss, Ursula Rauch. Bivalirudin inhibits peri-procedual platelet function and tissue factor expression of human smooth muscle cells. Cardiovascular Therapeutics, 2011 Dec 29. doi: 10.1111/j.1755-5922.2011.00305.x.* *27*

c. *Peter Bobbert, Ulf Weikert, Caroline Schmidt-Lucke, Carsten Skurk, Alexander Meyer, Daniel Steffens, Heinz Peter Schultheiss, Ursula Rauch. Platelet activation and thrombus formation relates to the presence of myocardial inflammation in patients with cardiomyopathy. J Cardiol. 2014 May;63(5):379-84. doi: 10.1016/j.jjcc.2013.09.014. Epub 2013 Nov 11.* *36*

9. Lebenslauf **43**

10. Publikationsliste **45**

11. Danksagung **46**

1a. Abstract (deutsch)

Die Plättchenreagibilität ist bei Patienten mit peripherer arterieller Verschlusskrankheit (PAVK) erhöht. RANTES (Regulated on Activation, Normal T Expressed and Secreted) und sCD40L sind zwei in den alpha-Granula der Thrombozyten gespeicherte Chemokine, die die Entzündungsreaktionen und die Plättchenreagibilität fördern. Clopidogrel hemmt den ADP-Rezeptor der Thrombozyten und reduziert dadurch ihre Reaktionsfähigkeit. Ob eine Behandlung mit Clopidogrel bei Patienten mit PAVK mit einer Hemmung der systemischen Inflammation einhergeht, wurde bislang nicht ausreichend erforscht.

Ziel der ersten Studie war es daher, die Wirkung von Clopidogrel auf die Reaktionfähigkeit der Thrombozyten und somit ihrer Aggregation bei Patienten mit PAVK zu erfassen. Ferner wurde die hemmende Wirkung von Clopidogrel auf die Ausschüttung verschiedener Zytokine und somit auf die systemische Inflammation untersucht. Da die Plättchenreagibilität auch bei Patienten mit Koronarer Herzkrankheit (KHK) und Kardiomyopathie gesteigt ist, untersuchten wir in einer weiteren Studie den Effekt von Bivalirudin auf die Adenosindiphosphat (ADP) induzierte Expression von P-Selektin (CD 62P) und CD-63. Eine dritte Studie behandelt den Zusammenhang zwischen myokardialer Inflammation und Thrombozytenaktivierung bei Patienten mit nicht ischämischer Kardiomyopathie.

Clopidogrel reduzierte die Agonist-induzierte Plättchenreaktivität bei Patienten mit PAVK in Kombinationstherapie mit ASS über einen Zeitraum von 4 Wochen gegenüber einer Monotherapie mit ASS. Es zeigte sich eine signifikante Reduktion der durch ADP und „Thrombin Receptor Activating Peptide“ (TRAP) induzierten Expression von CD62P (P-Selektin) und CD63 nach 7 und 28 tägiger Behandlung. Auch die Freisetzung von RANTES aus den Plättchen war nach einer Behandlung mit Clopidogrel signifikant herabgesetzt. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass Clopidogrel einen hemmenden Effekt auf die Plättchenaggregration und systemische Entzündung ausübt.

In der zweiten Untersuchung wurde gezeigt, dass Bivalirudin die ADP induzierte Expression von P-Selektin und Thrombospondin bei KHK-Patienten während der Koronarintervention signifikant herabsetzt. Zudem ergab sich bei Patienten mit Kardiomyopathie ein positiver Zusammenhang zwischen der Plättchenaktivierung und myokardialen Entzündungsreaktion.

1b. Abstract (englisch)

Platelet reactivity is increased in patients with peripheral artery disease (PAD). RANTES (Regulated on Activation, Normal T Expressed and Secreted) and sCD40L are chemokines, which are stored in alpha-granules of platelets and contribute to inflammation and platelet reactivity. Clopidogrel inhibits the ADP receptor of platelets and thus reduces platelet reactivity. Whether a treatment with clopidogrel is associated with an inhibition of systemic inflammation in patients with PAD has not been thoroughly explored.

Aim of the first study was to conceive the effect of clopidogrel on platelet reactivity and therefore on their aggregation in patients with PAD. Futhermore the inhibitory effect of clopidogrel on the release of chemokines and thus on systemic inflammation was explored.

In a second study we analized the effect of bivalirudin on ADP-induced p-selectin- (cd62p) and cd63 expression in patients with coronry artery disease (CAD) and cardiomypathy, because platelet reactivity is increased in these patients, too.

A third study examined the association between myocardial inflammation and platelet reactivity in patients with non ischemic cardiomyopathy.

Clopidogrel treatment for 28 days combined with aspirin (ASS) reduced the agonist-induced platelet reactivity in patients with PAD compared to ASS alone. We found a significantly reduction of ADP- and Thrombin Receptor Activating Peptide (TRAP) induced cd62p- and cd63 expression after 7 and 28 days treatment. Also the RANTES release of platelets was reduced significantly after clopidogrel treatment. These results explain the inhibitory effect of clopidogrel on platelet reactivity and systemic inflammation.

The second study showed, that bivalirudin significantly reduced ADP induced p-selectin- and thrombospondin (TSP) expression in CAD patients during PCI. Moreover we found a postive correlation between platelet reactivity and myocardial inflammation.

2. Einleitung und Zielsetzung

Die periphere arterielle Verschlusskrankheit (PAVK) geht mit einer gesteigerten Reaktivität der Plättchen einher, die zu arteriellen Thrombosen beiträgt (1,2). Clopidogrel, ein irreversibler Antagonist des Adenosindiphosphat-Rezeptors vom Typ P2Y12, ist ein effektiver Inhibitor der Thrombozytenreaktivität, wie schon in vielen Studien zuvor gezeigt wurde (3, 8 -10). Die CAPRIE Studie (clopidogrel versus aspirin in patients at risk of ischemic events) beschrieb ein höheren Effekt von Clopidogrel das kombinierte Risiko von ischämischem Hirninfarkt, Myokardinfarkt oder Tod durch Gefäßerkrankung bei Patienten mit peripherer arterieller Verschlusskrankheit zu reduzieren als ASS (3). Die derzeitige Richtlinie der European Society of Cardiology (ESC) (4) empfiehlt eine duale Thrombozytenfunktionshemmung mit Aspirin (ASS) und Clopidogrel als Langzeitbehandlung bisher nur bei Patienten einzusetzen, die eine periphere Prothesen-Bypassoperation erhielten (5). In den Fällen nach peripherer PTA (perkutaner transluminaler Angioplastie) mit Stentimplantation konnte eine duale Thrombozytenfunktionshemmung bisher keine signifikant verlängerten Offenheitsraten erzielen (6). Die Thrombozytenaktivierung führt zu einer Exposition von P-Selektin (CD62p), CD63 und Thrombospondin auf der Oberfläche von aktivierten Thrombozyten (7). Diese Moleküle sind verantwortlich für die Adhäsion der Thrombozyten, die an Erosionen schließlich zu Plaques führen. Im Plasma von Patienten mit koronarer Herzkrankheit (KHK) wurden erhöhte Werte von P-Selektin gemessen, welche in Interaktionen wischen Thrombozyten und Leukozyten, sowie Entzündungszellen und Endothelzellen involviert sind (2, 8-12).

SCD40L ist ein membranständiges Protein, das in den alpha-Zellen von Thrombozyten gespeichert ist. Bei der Aktivierung des Thrombozyten wird es auf der Oberfläche exprimiert. Verschiedene Studien zeigten, dass erhöhte Werte von sCD40L mit einem ebenfalls erhöhten Risiko für thrombembolische Ereignisse einhergehen (13). RANTES (Regulated on Activation, Normal T Expressed and Secreted) ist ein chemotaktisches Zytokin, welches eine aktive Rolle bei der Rekrutierung von Leukozyten in der Gefäßwand spielt (14). Dennoch ist nur wenig über die Wirkung von Clopidogrel auf die systemische Entzündung bei Patienten mit peripherer arterieller Verschlusskrankheit bekannt.

Das erste Ziel dieser Arbeit war es, die Wirkung von Clopidogrel in Kombination mit ASS auf die Agonist-induzierte Plättchenreaktivität im Vergleich zur Monotherapie mit

ASS zu untersuchen. Desweiteren wurde die Wirkung von Clopidogrel auf die Freisetzung inflammatorisch wirkender Zytokine wie RANTES und sCD40L untersucht.
In einer zweiten Untersuchung wurde die Wirkung von Bivalirudin auf die Agonist-induzierte Plättchenreaktivität im Vergleich zu unfraktioniertem Heparin (UFH) bei Patienten mit koronarer Herzkrankeit (KHK) während einer Koronarintervention erforscht.
Ein weiteres Ziel war es, die Plättchenreaktivität bei Patienten mit Kardiomyopathie zu bewerten und mit Markern für die endotheliale Reaktivität und myokardiale Inflammation zu korrelieren.

3. Methodik

Die Methoden der ex vivo Thrombozytenstimulation, die in dieser Studie angewendet wurden, sind von uns bereits vorher etabliert und berichtet worden (13, 15 -18). Vierzig Patienten mit peripherer arterieller Verschlusskrankheit (pAVK) sind in die Studie eingeschlossen und in zwei Gruppen randomisiert worden. In der Gruppe A (n=20) wurden die Patienten für 4 Wochen mit Aspirin (100 mg/d) und einem zusätzlichen Placebo und die Patienten der Gruppe B (n=20) mit Clopidogrel (75 mg/d) zusätzlich zu Aspirin (100 mg/d) behandelt. Die Placebotabletten bestanden aus Zellulose und besaßen das gleiche Aussehen wie die Clopidogreltabletten. Nach Entnahme der Blutproben an den Tagen 0, 7 und 28 wurde jeweils die Thrombozytenaktivierung durch Messung der Proteinkonzentrationen von CD63, CD62p und TSP im Plasma nach Stimulation mit TRAP, ADP und Kollagen bestimmt. Der Entzündungsverlauf der Thrombozyten wurde über die Ausschüttung der Proteine RANTES und sCD40L von stimulierten Thrombozyten mittels ELSA bestimmt. Als Einschlußkriterien für die Patienten galten eine periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK) mit einem Knöchel-Arm-Index von < 0,9, eine mehr als 4 Wochen andauernde Behandlung mit ASS und ein Mindestalter von 18 Jahren. Ausschlusskriterien waren eine Clopidogreltherapie über eine Dauer von 4 Wochen vor Studienbeginn, orale Antikoagulation, eine Tumorerkrankung, Magenulcera, zerebrale Operationen oder intrakranielle Hämatome, Leberzirrhose mit einem Transaminaseanstieg, Thrombozytopenie < 100.000 / µl, dialysepflichtige Niereninsuffizienz, operative Eingriffe, einschließlich zahnärztliche, in den vorhergegangenen 4 und den folgenden 6 Wochen, oder eine grippale Infektion.

Venöses Blut wurde in Röhrchen mit „Acid Citrate Dextrode“ (ACD/1:7,Sigma) gesammelt und zentrifugiert. Plättchenreiches Plasma wurde isoliert und die gewonnenen Plättchen dann nochmals in ACD (1:7) gelöst und erneut zentrifugiert. Das Pellet wurde dann in HEPES Tyrode Lösung (HEPES 5 mM, NaCl 134 mM, KCl 2,9 mM, NaHCO3 12 mM, Na2HPO4 0,36 mM, Glucose 5 mM, Bovine Serum Albumine 0,5 mg/ml) resuspendiert. Die Konzentration der Plättchensuspension wurde auf 150000 Zellen/µl eingestellt und es erfolgte eine Zugabe von Magnesium (MgCl2 200 mM) und Calcium (CaCl2 750 mM). Nun startete die Stimulation mit ADP (20 µM, Sigma), Kollagen (20µM und TRAP (10 µM, Calbiochem) über eine Dauer von 15 Minuten. Eine Probe wurde unstimuliert belassen und diente als Kontrolle. Nach der Fixierung in 2% Paraformaldehyd (PFA) wurden die Plättchen gewaschen und anhand von monoklonalen Antikörpern, die gegen P-Selektin (CD 62p), CD 63, CD 41 und Thrombospondin (TSP) (Coulter Immunotech) gerichtet waren, markiert. Anschließend wurden die oben genannten Antigene mit einem Fluorescin Isothiocyanat (F(ab)2-FITC) (Sigma)-gekoppelten Antikörper für eine halbe Stunde inkubiert. Schließlich wurde die Dichte der markierten Oberflächenproteine anhand eines Durchflusszytometers quantifiziert (FACScan, Becton Dickinson).

In einer zweiten Versuchsreihe erfolgte die Quantifizierung der sCD40L und der RANTES Sekretion der Thrombozyten mittels ELISA. Hierfür wurde die sCD40L und die RANTES Freisetzung vor Beginn der Studie und 7 Tage nach Gabe von Clopidogrel (n=20) oder Placebo (n=20) gemessen. Venöses Blut wurde in Röhrchen mit „Acid Citrate Dextrode“ (ACD/1:7,Sigma) gesammelt zentrifugiert. Die gewonnenen Plättchen dann nochmals in ACD (1:7) gelöst und zentrifugiert. Die Plättchen wurden in HEPES Puffer auf eine Konzentration von 170000 Zellen/µl eingestellt. Nach Zugabe von Calcium zu einer Konzentration von 500 mM folgte die Stimulation mit ADP (20 µM, Sigma), Kollagen (20µM) oder TRAP (10 µM, Calbiochem) über eine Dauer von 20 Minuten. Eine Kontrollprobe blieb unstimuliert. Die Stimulation wurde mit Heparin (200µl) gestoppt und 5 Minuten bei 4000 rpm zentrifugiert. Die Überstände wurden bei minus 80°C eingefroren. Für die Messungen verwendeten wir ein humanes sCD40L und RANTES ELISA Kit gemäß den Herstelleranweisungen. Hierfür wurden 100µl des Coating-Antikörpers auf die MaxiSorp Plates gegeben, bei 4 Grad Celsius inkubiert und mit 200µl Pufferlösung gewaschen. Anschließend wurde 2h blockiert und danach erneut gewaschen. Die Proben wurden in 100µl Probenlösung, 100µl Probes und 200µl HRP Konjugat gelöst. 150µl Probenlösung wurden auf die beschichteten Platten pipettiert

und für 2 Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 Grad Celsius inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen und Hinzufügen von 100µl TMB (Tetramethylbenzidin) Substrat folgte eine Inkubation für 30 Minuten im Dunkeln. Nach Zugabe einer Stopplösung (Schwefelsäure) wurden die Proben mit einen Spectrophotometer bei 620nm gemessen. Für die RANTES Messungen verwendeten wir das R&D Systems # DRN00B KIT. 100µl der Assay-Probe wurde in den Wells vorgelegt, 100µl der Lösung, die Nullkontrolle und Standards wurden hinzugefügt und für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Waschen mit der Pufferlösung, wurden 200µl der Konjugatlösung zu dem Wells hinzugefügt und erneut bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgt wiederum ein Waschen mit der Pufferlösung und eine Inkubation mit 200µl der Substratlösung. Nach Stoppen des Ablaufes mit H2SO4 (2N) folgt eine Messung mit dem Spectrophotometer bei 450 nm.

In der zweiten Studie wurden 58 Patienten mit KHK, die bereits vor Studienbeginn mit Aspirin (100 mg/d) und Clopidogrel (75 mg/d) behandelt wurden, einer Koronarintervention unterzogen, in der ein Koronarstent implantiert wurde. Während der Intervention erhielt die erste Gruppe (n=28) Bivalirudin (erst einen Bolus gefolgt von einer Infusion für die Dauer der Intervention), die zweite Gruppe unfraktioniertes Heparin. Blutproben wurden unmittelbar vor der Medikamentengabe und unmittelbar nach Stentimplantation gewonnen. Abschließend erfolgten die Thrombozytenstimulationstests inclusive der durchflußzytometrischen Analysen.

In der dritten Studie wurden 30 Patienten mit vermuteter nicht-ischämischer Kardiomyopathie eingeschlossen. Alle erhielten im Rahmen einer Katheteruntersuchung eine Entnahme von Myokardbiopsien. HLA-1, HLA-DR und ICAM-1 wurden als Marker für eine interstitielle und endotheliale Aktivierung immunhistochemisch analysiert, während CD3+ Zellen, CD45+-Zellen und aktivierte Makrophagen als Marker für die myokardiale Inflammation quantifiziert wurden. Weiterhin wurden venöse Blutproben zur Quantifikation der Thrombozytenaktierung im zirkulierenden Blut der Patienten abgenommen.

4. Ergebnisse

Eine Behandlung mit Clopidogrel verglichen Placebo über den Zeitraum von 7 und 28 Tage reduzierte signifikant die ADP induzierte Expression von CD62p auf der Oberfläche von Thrombozyten bei Patienten mit peripherer arterieller

Verschlusskrankheit. Der gleiche Effekt zeigte sich nach 28 tägiger Behandlung bei der TRAP induzierten Thrombozytenreaktivität (Abbildung 1).

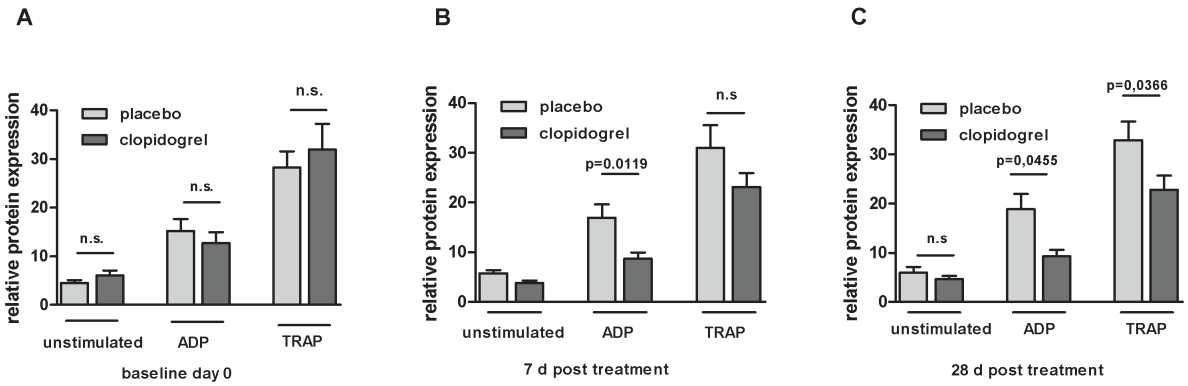

Abbildung 1

Wirkung von Clopidogrel auf die Plättchenexpression von CD62p nach Stimulation mit ADP mit einer signifikanten Reduktion der CD62p-Expression an den Tagen 7 und 28 bei Patienten die Clopidogrel erhielten verglichen mit Patienten die Placebo einnahmen ((Mann Whitney test; 8.69 ± 1.2 vs. 16.91 ± 2.7 day 7 (p= 0.019) and 9.31 ± 1.28 vs. 18.85 ± 3.12 at day 28 (p= 0.0455), auch TRAP bei TRAP stimulierter Plättxhenreaktivität: Mann Whitney test; 22.77 ± 2.92 vs. 32.88 ± 3.76 (p=0.0366)). Abbgebildet sind unstimuliert (A), ADP stimuliert (B), und TRAP stimulierte Proben (C). Die Daten sind als Mittelwert±SEM dargestellt. n.s.= nicht signifikant.. n=40.

Nach 7 tägiger Clopidogrel Behandlung war die Expression von CD63 im Vergleich zur Monotherapie mit ASS signifikant verringert. Im Vergleich zur ASS-Monotherapie konnten TRAP stimuliert in der Clopidogrelgruppe keine signifikanten Veränderungen gemessen werden. Des Weiteren zeigte sich nach 28 tägiger Clopidogrel Behandlung eine signifikant niedrigere ADP- und TRAP induzierte Thrombozytenreaktivität bei Behandlung mit Clopidogrel im Vergleich zu ASS (Abbildung 2).

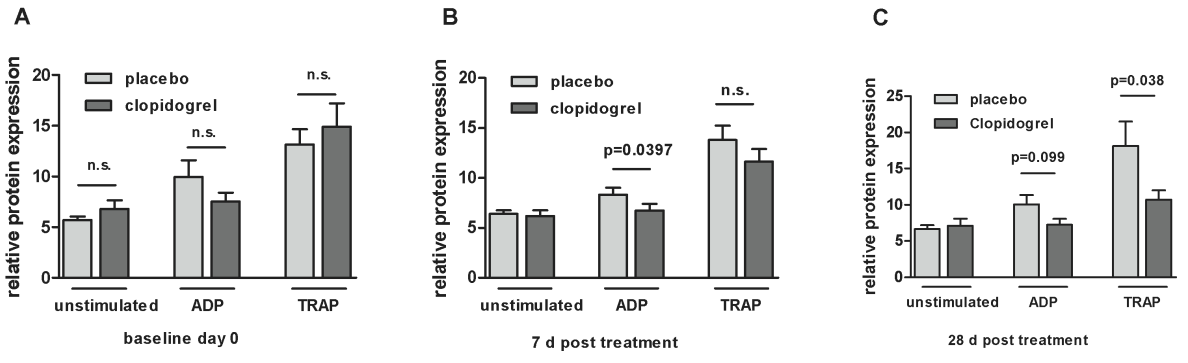

Abbildung 2

Wirkung von Clopidogrel auf die Plättchenexpression von CD63 bei Patienten mit PAVK mit signifikant niedrigeren Werten für ADP stimuliertes CD63 in der Clopidogrel-Gruppe am Tag 7 verglichen mit der Placebo-Gruppe. (6.73 ± 0.76 vs. 8.33 ± 0.68 (p=0.0397)). An Tag 28 zeigten die ADP und TRAP stimulierten Proben signifikant niedrigere Werte der CD63 Freisetzung verglichen mit der Placebo-Gruppe. (7.24 ± 0.81 vs. 10.08 ± 1.26 (p=0.09) and 10.73 ± 1.27 vs. 18.14 ± 3.35 (p= 0.03)). Abbgebildet sind unstimuliert (A), ADP stimuliert (B), und TRAP stimulierte Proben (C). Die Daten sind als Mittelwert±SEM dargestellt. n.s.= nicht signifikant.. n=40.

Bei der Agonist-induzierten Thrombospondinfreisetzung aus Thrombozyten waren keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen vorhanden (Abbildung 3).

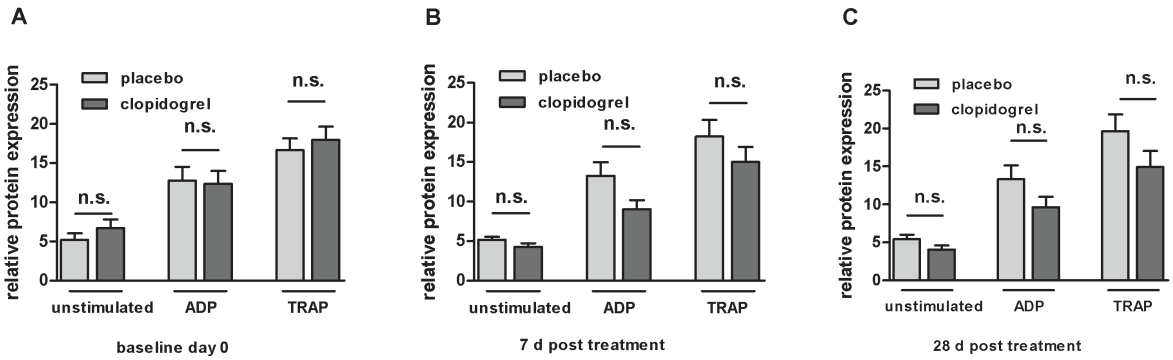

Abbildung 3

Wirkung von Clopidogrel auf die Plättchenexpression von Thrombospondin (TSP). In der Clopidogrelgruppe zeigten sich am Tag 7 sowohl ADP- wie auch TRAP-stimuliert niedrigere Werte als in der Placebo-Gruppe. (Mann Whitney 9.05 ± 1.25 vs. 13.25 ± 1.72 (p= 0.08) and 15.01 ± 1.89 vs. 18.22 ± 2.12 (p=0.35)). An Tag 28 wurden in beiden Gruppen niedrigere Werte ohne signifikanten Unterschied gemessen. (ADP 9.63 ± 1.37 vs. 13.32 ± 1.80 (p= 0.13) and 14.94 ± 2.1 vs. 19.65 ± 2.21 (p= 0.12)). Abbgebildet sind unstimuliert (A), ADP stimuliert (B), und TRAP stimulierte Proben (C). Die Daten sind als Mittelwert±SEM dargestellt. n.s.= nicht signifikant.. n=40.

Die RANTES Plasma Konzentration war sowohl nach 7 tägiger als auch nach 28 tägiger Behandlung mit Clopidogrel im Vergleich zur Placebogruppe signifikant geringer. (Abbildung 4).

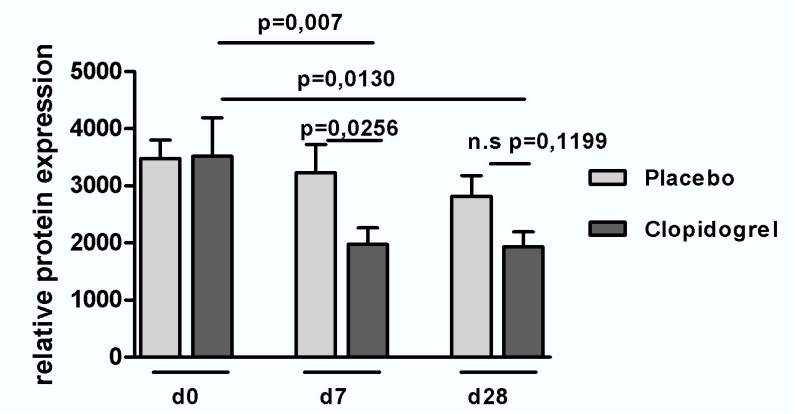

Abbildung 4

Positiver Effekt von Clopidogrel auf die RANTES-Freisetzung mit einer signifikanten Reduktion von RANTES in der Clopidogrel-Gruppe verglichen mit mit der Placebo-Gruppe (1,950 ± 297 vs. 3,235 ± 494 (p= 0,025)) und mit der Clopidogrel-Gruppe an Tag 0 (1,978 ± 283 vs. 3,517 ± 671 (p=0.007)). Auch an Tag 28 zeigte sich eine signifikante Reduktion der RANTES-Freisetzung in der Clopidogrel-Gruppe verglichen mit Tag 0(1915 ± 276 vs. 3485 ± 706 (p=0,013)). Abbgebildet sind Clopidogrel-Proben an den Tagen 0, 7 und 28 verglichen mit Placebo-Proben an den Tagen 0,7 und 28. Die Daten sind als Mittelwert±SEM dargestellt. n.s.= nicht signifikant.. n=40.

Patienten mit PAVK wiesen signifikant niedrigere CRP-Spiegel nach der Behandlung mit Clopidogrel und ASS als unter Behandlung mit ASS alleine auf (Abbildung 5).

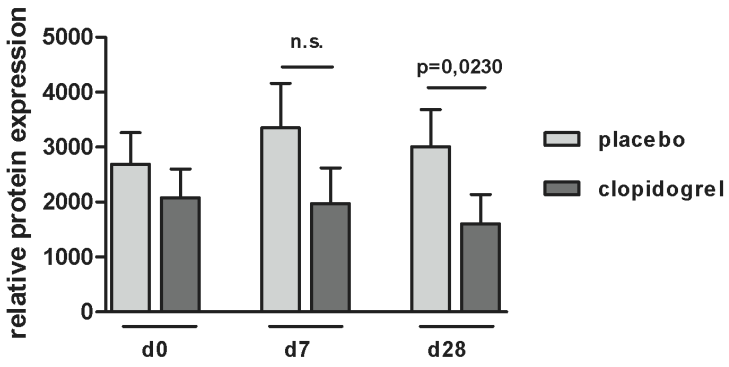

Abbildung 5

Wirkung von Clopidogrel auf die Freisetzung von CRP bei Patienten mit PAVK. Verglichen mit den Werten in der Placebogruppe, zeigten sich an allen Tagen niedrigere Werte mit einer Signifikanz an Tag 28. (placebo 3,008 ± 676 and clopidogrel 1,608 ± 529 (p=0.023)). Abbgebildet sind Clopidogrel-Proben an den Tagen 0, 7 und 28 verglichen mit Placebo-Proben an den Tagen 0,7 und 28. Die Daten sind als Mittelwert±SEM dargestellt. n.s.= nicht signifikant.. n=40.

In unserer zweiten Studie zeigte sich, dass Bivalirudin die Agonist-induzierte Plättchenreaktivität während der Koronarintervention signifikant reduzierte. Im Vergleich zu unfraktioniertem Heparin (UFH) fiel die durch ADP und TRAP induzierte Expression von Thrombospondin signifikant ab, wenn Bivalirudin während der Intervention gegeben wurde (Wilcoxon; für ADP: 7,9 ± 0,7 AU pre- vs. 6,2 ± 0,4 AU post PCI ($p < 0.01$); für TRAP: 15,3 ± 1,1 AU pre- vs. 11,8 ± 0,8 AU post PCI ($p < 0,01$)). Auch die Expressionen von unstimuliertem und stimuliertem P-Selektin sowie stimuliertem CD 63 auf der Thrombozytenoberfläche war bei Bivalirudin behandelten Patienten im Vergleich zu Heparin behandelten signifikant geringer (P-Selektin, unstimuliert; 4,0 ± 0,2AU vs. 3,2 ± 0,2 AU ($p < 0,05$); ADP: 10,7 ± 1,2 AU vs. 7,2 ± 0,6 AU ($p = < 0,05$), CD63: Mann-Whitney; ADP: 7,2 ± 0,4 AU zu 6,2 ± 0,2 AU ($p < 0,05$)).

Die Ergebnisse der Kardiomyopathie-Studie ergaben, dass die P-Selektin- (8,46 ±3,67 AU) und die Thrombospondin-Expression (26,56 ± 23,21 AU) signifikant mit der Menge an CD3+ T-Zellen im Myokard (P-Selektin $r = 0,573$, $p < 0,05$; Thrombospondin: $r = 0,488$, $p < 0,05$) und der endothelialen/interstitiellen Aktivierung (P-Selektin: $r= 0,521$, $p = 0,05$; Thrombospondin: $r = 0,39$, $p < 0,05$) korrelieren. Somit ergibt sich eine unmittelbare Beziehung zwischen myokardialem Entzündungsgrad und einer gesteigerten Plättchenaktivierung im zirkulierenden Blut.

5. Diskussion

Die erste Studie zeigte, dass Clopidogrel in Kombination mit ASS im Vergleich zur Monotherapie mit ASS signifikant die Agonisten-induzierte Thrombozytenreaktivität bei Patienten mit PAVK hemmt. Die Langzeitbehandlung über 28 Tage führte zu einer signifikanten Verringerung der CD63- und CD62P Expression auf der Oberfläche der Thrombozyten bei Patienten mit PAVK. Eine erhöhte Expression von P-Selektin auf Plättchen ist mit einem erhöhten Risiko einer Koronararterienerkrankung assoziiert (2, 8). Bereits an Tag 7 zeigte sich eine signifikante Hemmung der Expression von CD62P bei Patienten mit PAVK, die Clopidogrel erhalten haben. Dabei blieb die Expression von Tag 7 bis Tag 28 konstant niedrig. Auch die Expression von CD63 war nach der Langzeitbehandlung mit Clopidogrel verglichen mit der ASS-Monotherapie signifikant niedriger. Zudem konnte, wie auch bereits in anderen Studien bei Patienten mit KHK, eine positive Wirkung auf die Ausschüttung von RANTES und den CRP-Spiegel gezeigt werden (19). Bezugnehmend auf die CRP Konzentration wurden, verglichen mit der Placebogruppe, signifikant niedrigere Spiegel am Tag 28, jedoch noch nicht an den Tagen 0 und 7 beobachtet. Außerdem bewirkte Clopidogrel bereits ab Tag 7 eine signifikante Hemmung der RANTES Freisetzung bei Patienten mit PAVK verglichen mit der Placebogruppe.

Verschiedene Studien, die die klinische Bedeutung einer erhöhten Thrombozytenreaktivität trotz Clopidogrel-Therapie vor allem bei Patienten mit KHK erforschten, wurden bereits veröffentlicht. Im Gegensatz dazu wurden Patienten mit PAVK dahingehend noch nicht ausreichend untersucht. Comorbiditäten wie Bluthochdruck, Diabetes Mellitus, Patientenincompliance oder Unterdosierung könnten zu einer unzureichenden intestinalen Absorption und metabolischen Aktivierung des Medikaments führen und so den mangelnden Effekt der Thrombozytenaggregations-hemmenden Therapie erklären (20). Das geringe Ansprechen auf Clopidogrel ist mit einem erhöhten Risiko für rezidivierende kardiovaskuläre Ereignisse assoziiert (21, 22). Stellbaum et al. (23) zeigten, dass eine Verdoppelung der Clopidogreldosis bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung mit einem verringertem Ansprechen auf die Standarddosis in ihrer Effektivität gehemmt war. In der Studie wurden Patienten mit einem geringerem Ansprechverhalten auf Clopidogrel mit einer Dosis von 150 mg/d anstatt der Standarddosis von 75 mg/d Clopidogrel behandelt.

Die lokale Adhäsion der Thrombozyten an der Gefäßwand und die darauf folgende Thrombozytenaktivierung führt zu einer Ausschüttung multipler Zytokine und Blutgerinnung aktivierender Faktoren. Bis heute ist der Effekt von Clopidogrel auf die Ausschüttung von Chemokinen zwar bei Patienten mit KHK und akutem Koronarsyndrom gut erforscht, bei Patienten mit PAVK jedoch noch unzureichend. Als ein chemotaktisches Zytokin spielt RANTES eine aktive Rolle bei der Rekrutierung von Leukozyten in die Gefäßwand (14). In dieser Studie verringerte Clopidogrel bei pAVK Patienten die RANTES Freisetzung signifikant im Vergleich zur Monotherapie mit Aspirin. Clopidogrel ist bekannt dafür, die sCD40L Freisetzung zu hemmen (24). SCD40L induziert die Produktion und Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen aus Gefäßzellen. Stellbaum et al. (13) zeigten diesen Effekt auch bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit. Demgegenüber fanden wir in dieser Studie keinen signifikanten Abfall der sCD40L Konzentration im Plasma. Die sCD40L Werte bei PAVK Patienten, die Clopidogrel erhielten, waren am Tag 28 zwar niedriger als die der Placebo Gruppe, aber nicht signifikant niedriger im Vergleich zu den Tagen 0 und 7. Wir vermuten daher, dass der Effekt von Clopidogrel auf die sCD40L Spiegel bei PAVK Patienten nicht potent genug ist. Möglicherweise ist das Ausmaß der Arteriosklerose der PAVK Patienten im Vergleich zu den Patienten mit KHK höher. Prasugrel, ein potenterer Plättchenhemmer als Clopidogrel, weist hingegen eine größere inhibitorische Wirkung auf die thrombozytäre sCD40L Freisetzung als Clopidogrel bei Patienten mit KHK auf (29).

Clopidogrel reduziert die CRP Spiegel bei Patienten mit KHK (25). In dieser Studie konnten wir nun zeigen, dass Clopidogrel im Vergleich zur ASS Monotherapie die CRP Spiegel signifikant bei Patienten mit PAVK senkt. Ayral et al. berichteten, dass eine verlängerte periproceduale Clopidogrelbehandlung den CRP-Spiegel und die Tissue Faktor -Expression nach PCI reduzieren (22, 26). Erhöhte TF Expression können thrombotische Ereignisse begünstigen (27). Eine Behandlung von PAVK-Patienten mit den antithrombotischen Substanzen Clopidogrel, ASS und Cliostazol reduziert die TF Blutspiegel-Konzentration.

Zusammengefasst senkt eine 28 tägige Clopidogrelbehandlung bei Patienten mit PAVK die Freisetzung von P-Selektin und CD63. Zusätzlich senkt Clopidogrel signifikant RANTES- und CRP-Spiegel im Blut.

Die Daten der zweiten Studie ergaben, dass Bivalirudin als direkter ein Thrombinhemmer signifikant die periproceduale Thrombozytenreaktivität senkt. Eine

Therapie mit unfraktioniertem Heparin (UFH) ist mit einer erhöhten Plättchenreaktivität nach einer PCI assoziiert. Darüberhinaus zeigte sich in der dritten Studie ein direkter Zusammenhang zwischen myokardialer Inflammation mit erhöhter CD3+-Zell Infiltration im Myokard und der systemischen Plättchenaktivierung. Diese Daten weisen auf ein erhöhtes thrombembolisches Risiko bei Patienten mit Kardiomyopathie und einem erhöhten myokardialen Entzündungsgrad hin.

Schlussfolgernd lässt sich feststellen, dass Clopidogrel eine hemmenden Effekt auf die systemische Entzündung und auf die Thrombozytenaggregation besitzt. Dieser Effekt trifft sowohl auf Patienten mit PAVK zu, als auch auf solche, die an einer Kardiomyopathie leiden. Bei beiden Patientengruppen sind eine erhöhte systemische oder lokale Inflammation mit einer gesteigerten Plättchenreaktivität assoziiert. Durch eine gezielte postinterventionelle Behandlung mit Clopidogrel, wie sie auch in den ESC-Richtlinien festgehalten wird, könnte so folglich das Risiko eines thrombembolischen Ereignisses beeinflusst werden.

6. Literaturverzeichnis

1 Rauch U, Osende JI, Fuster V, Badimon JJ, Fayad Z, and Chesbro JH. Thrombus formation on atherosclerotic plaques: Pathogenesis and clinical consequences. Ann Intern Med. 2001 Feb 6;134(3):224-38.

2 Jagroop A, Militiadis I, Matsagas I, Geroulakos G, Mikhailidis D. The effect of clopidogrel, aspirin and both antiplatlet drugs on platelet function in patients with PAD. Platelets 2004;15(2):117–25.

3 CAPRIE steering committee. A randomized, blinded, trial of clopidogrel versus aspirin in patients at risk of ischaemic events (CAPRIE). Lancet 1996;348:1329.

4 ESC Guidelines on the diagnosis and treatment of peripheral artery diseases Document covering atherosclerotic disease of extracranial carotid and vertebral, mesenteric, renal, upper and lower extremity arteries. The Task Force on the Diagnosis and Treat- ment of Peripheral Artery Diseases of the European Society of Cardiology (ESC) Endorsed by: the European Stroke Organisation (ESO). Eur Heart J 32, 2011, 2851-906.

5 Belch JJ, Dormandy J, CASPAR Writing Committee, Biasi BM, Cairols M, Diehm C, et al. Results of the randomized, placebo-controlled clopidogrel and acetylsalicylic acid in bypass surgery for peripheral arterial disease (CASPAR) trial. J Vasc Surg 2010;52: 825–33 [833 e821–822].

6 Dagher NN, Modrall JG. Pharmacotherapy before and after revascularization: anticoagulation, antiplatelet agents, and statins. Semin Vasc Surg 2007;20:10–4.

7 Chesbro JH, Rauch U, Fuster V, Badimon JJ. Pathogenesis of thrombosis in coronary artery disease. Haemostasis 1997;27(Suppl. 1):12–8.

8 Blann AD, Nadar SK, Lip GYH. The adhesion molecule P-selectin and cardiovascular disease. Eur Heart J 2003;24:2166–79.

9 Ridker PM, Buring JE, Rifai N. Soluble P-selectin and the risk of future cardiovascular events. Circulation 2001;103:491–5.

10 Malik I, Danesh J, Whincup P, Bhatia V, Papacosta O, Walker M, et al. Soluble adhe- sion molecules and prediction of coronary heart disease: a prospective study and meta-analysis. Lancet 2001;358:971–5.

11 Tsiara S, Elisaf M, Jagroop IA, Mikhailidis DP. Platelets as predictors of vascular risk: Is there a practical index of platelet activity. Clin Appl Thromb Hemost 2003;9:177–90.

12 Shebuski RJ, Kilgore KS. Role of inflammatory mediators in thrombogenesis. J Pharmacol Exp Ther 2002;300:729–35.

13 Stellbaum C, Willich T, Boltzen U, Ayral Y, Szotowski B, Piorkowski M. Clopidogrel mediated reduction of circulating tissue factor in patients with CAD. Eur J Haematol 2007;78:347–52.

14 Gear AR, Camerini D. Platelets chemokines and chemokine receptors: linking haemostasis, inflammation and host defense. Microcirculation 2003;10:335–50.

15 Weikert U, Kühl U, Schultheiss HP, Rauch U. Increased platelet activation in patients with cardiomyopathy: myocardial inflammation and platelet reactivity. Platelets 2002;13:487–92.

16 Rauch U, Ziegler D, Piolot R, Schwippert B, Benthake H, Schultheiss HP, et al. Platelet ac- tivation in diabetic cardieovascular autonomic neuropathy. Diabet Med 1999;16:848–52.

17 Jaster M, Fuster V, Rosenthal P, Pauschinger M, Tran-Quan V, Janssen D, et al. Catheter based intracoronary brachytherapie leads to increased platelet activation. Heart 2004;90:160–4.

18 Piorkowski M, Weikert U, Schwimmbeck PL, Martus P, Schultheiss HP, Rauch U. Clopidogrel and atorvastatin for combinined platelet inhibition. Thromb Haemost 2004 [unter 2 Revision].

19 Hermann A, Rauch BH, Braun M, Schror K, Weber AA. Platelet CD 40 ligand (CD 40 L)-subcellular localization, regulation of expression, and ihibition by clopidogrel. Platelets 2001;12:74–82.

20 Farady N, Goldschmidt–Clermont PJ, Bray PF. Gender differences in platelet GPIIb/ IIIa activation. Thromb Haemost 1997;77:748- 154.

21 Piorkowski M, Fischer S, Stellbaum C, Jaster M, Martus P, Morguet AJ, et al. Treatment with ezetimibe plus lowdose atorvastatin compared with higher dose atorvastatin alone is sufficient cholesterol-lowering enough to inhibite platelets? J Am Coll Cardiol 2007;49:1035–42.

22 Ayral Y, Rauch U, Golding-Lang P, Eisenreich A, Pepke W, Deiner C, et al. Prolonged clopidogrel application reduces tissue factor expression after percutaneous coronary intervention in the porcine model. Cardiovasc Revasc Med 2011;12:47–55.

23 Stellbaum C, Ayral Y, Morguet A, Schultheiss HP, Rauch U. 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 Med 2012;13:159–66.

24 Kang K, Bae SJ, Kim WM, Lee DH, Cho U, Lee MH, et al. Molecular characteristics of the inhibition of human neutrophil elastase by nonsteroidal anti-inflammatory drugs. Exp Mol Med 2000;32:146–54.

25 Deepak L, Bhatt, MD, Eric J. Topol, MD, CHARISMA Executive Committee. Received: December 7, 2003; Accepted: March 29, 2004.

26 Ayral Y, Rauch U, Goldin-Lang P, Stellbaum C, Deiner C, Schwimmbeck PL, et al. Prolonged application of clopidogrel reduces inflammation after percutaneous coronary intervention in the porcine model. Cardiovasc Revasc Med 2007; 8(3):183–8.

27 Rauch U, Nemerson Y. Ciculation tissue factor and thrombosis. Curr Opin Hematol 2000;7(5):273–7.

28 Serebruany VL. Platelet inhibition with prasugrel (CS – 747) compared with clopidogrel in patients undergoing coronary stenting: the subset from the JUMBO study. Postgrad Med J 2006;82:404–10.

7. Eidesstattliche Versicherung / Anteilserklärung

„Ich, Alexander Meyer, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Die Wirkung von antithrombotischen Substanzen auf die Plättchenfunktion und auf die systemische Entzündung bei Patienten mit PAVK“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -*www.icmje.org*) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet. Meine Anteile an den ausgewählten Publikationen entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet. Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

_____

Datum Unterschrift

Anteilserklärung an den erfolgten Publikationen

Herr Alexander Meyer hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1: Alexander Meyer, Alice Weithaeuser, Daniel Steffens, Peter Bobbert, Adel Hassanein, Yunus Ayral, Heinz-Peter Schultheiss, Ursula Rauch. Inhibition of platelet function with clopidogrel is associated with a reduction of inflammation in patients with peripheral artery disease. Cardiovasc Revasc Med. 2016 Apr-May;17(3):169-75. doi: 10.1016/j.carrev.2016.01.010. [Epub ahead of print]

Anteilsnahme: 50%, Beitrag im Einzelnen: Zytometrische Messung der Plättchenaktivität, ELISA, Auswertungen.

Publikation 2: Wojciech Pepke, Andreas Eisenreich, Markus Jaster, Ronny Malz, Yunus Ayral, **Alexander Meyer**; Heinz-Peter Schultheiss, Ursula Rauch. Bivalirudin inhibits peri-procedual platelet function and tissue factor expression of human smooth muscle cells. Cardiovascular Therapeutics, 2011 Dec 29. doi: 10.1111/j.1755-5922.2011.00305.x. Anteilsnahme: 20%. Beitrag im Einzelnen: Zytometrische Messung der Plättchenaktivität.

Publikation 3: Peter Bobbert, Ulf Weikert, Caroline Schmidt-Lucke, Carsten Skurk, **Alexander Meyer**, Daniel Steffens, Heinz Peter Schultheiss, Ursula Rauch. Platelet activation and thrombus formation relates to the presence of myocardial inflammation in patients with cardiomyopathy. J Cardiol. 2014 May;63(5):379-84. doi: 10.1016/j.jjcc.2013.09.014. Epub 2013 Nov 11. Anteilsnahme: 10 %. Beitrag im Einzelnen: Zytometrische Messung der Plättchenaktivität.

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers/der betreuenden Hochschullehrerin

_____

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

_____

8. Druckexemplare der ausgewählten Publikationen

a. Alexander Meyer, Alice Weithaeuser, Daniel Steffens, Peter Bobbert, Adel Hassanein, Yunus Ayral, Heinz-Peter Schultheiss, Ursula Rauch. *Inhibition of platelet function with clopidogrel is associated with a reduction of inflammation in patients with peripheral artery disease.* Cardiovasc Revasc Med. 2016 Apr-May;17(3):169-75. doi: 10.1016/j.carrev. 2016.01.010.

http://dx.doi.org/10.1016/j.carrev.2016.01.010

8. Druckexemplare der ausgewählten Publikationen

b. Wojciech Pepke, Andreas Eisenreich, Markus Jaster, Ronny Malz, Yunus Ayral, Alexander Meyer; Heinz-Peter Schultheiss, Ursula Rauch. Bivalirudin inhibits peri-procedual platelet function and tissue factor expression of human smooth muscle cells. Cardiovascular Therapeutics, 2011 Dec 29. doi: 10.1111/j.1755-5922.2011.00305.x.

http://dx.doi.org/10.1111/j.1755-5922.2011.00305.x

8. Druckexemplare der ausgewählten Publikationen

c. Peter Bobbert, Ulf Weikert, Caroline Schmidt-Lucke, Carsten Skurk, Alexander Meyer, Daniel Steffens, Heinz Peter Schultheiss, Ursula Rauch. Platelet activation and thrombus formation relates to the presence of myocardial inflammation in patients with cardiomyopathy. J Cardiol. 2014 May;63(5):379-84. doi: 10.1016/j.jjcc.2013.09.014. Epub 2013 Nov 11.

http://dx.doi.org/10.1016/j.jjcc.2013.09.014

9. Lebenslauf

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

10. Publikationsliste

Originalarbeiten:

1. Inhibition of platelet function with clopidogrel is associated with a reduction of inflammation in patients with peripheral artery disease.
   Meyer A, Weithaeuser A, Steffens D, Bobbert P, Hassanein A, Ayral Y, Schultheiss HP, Rauch U. Cardiovasc Revasc Med. 2016 Apr-May;17(3):169-75. doi: 10.1016/j.carrev.2016.01.010. [Epub ahead of print]

2. Bivalirudin inhibits periprocedual platelet function and tissue factor expression of human smooth muscle cells. Pepke W, Eisenreich A, Jaster M, Malz R, Ayral Y, **Meyer A**, Schultheiss HP, Rauch U. Cardiovascular Therapeutics, 2011 Dec 29. doi: 10.1111/j.1755-5922.2011.00305.x.

3. Platelet activation and thrombus formation relates to the presence of myocardial inflammation in patients with cardiomyopathy. Bobbert P, Weikert U, Schmidt-Lucke C, Skurk C, **Meyer A**, Steffens D, Schultheiss HP, Rauch U. J Cardiol. 2014 May;63(5):379-84. doi: 10.1016/j.jjcc.2013.09.014. Epub 2013 Nov 11.

11. Danksagung

Ich danke Frau Prof. Dr. med. Ursula Rauch-Kröhnert für die Bereitstellung des Dissertationsthemas, ihre permanente fachliche Unterstützung, Motivation und Hilfe zu jeder Zeit, die mich besonders in schwierigen Phasen stets aufbaute, neuen Schub und Ideen verlieh. Jede Phase dieser Arbeit wurde von ihr intensiv, professionell und warmherzig begleitet.
Für die unermüdliche und intensive Einarbeitung in die Thrombozytenstimulations- und ELISA - Techniken möchte ich mich ganz herzlich bei Franziska Bleis bedanken. Mit ihrem Engagement hat sie mir auch bis spät in den Abend tatkräftig zur Seite gestanden und mir geholfen, mich rasch zurechtzufinden.
Auch bedanke ich mich bei Alice Weithäuser, die mir zu jeder Zeit eine hilfreiche Ansprechpartnerin war, egal ob im Labor bei der Datenauswertung oder bei der Verfassung der Publikation.
Ulrike Boltzen und Silvio Antoniak gilt ebenfalls mein Dank. Sie bereicherten meine Laborarbeit mit vielen Ideen aber auch mit einer Menge Spaß und Witz.

Für ihre ununterbrochene Geduld, Zuwendung und Liebe auch in schwierigen Zeiten der Dissertation und des Studiums bedanke ich mich bei meiner Frau Melanie. Sie hat mir immer wieder Mut und Zuversicht gegeben.