

# INHALTSVERZEICHNIS

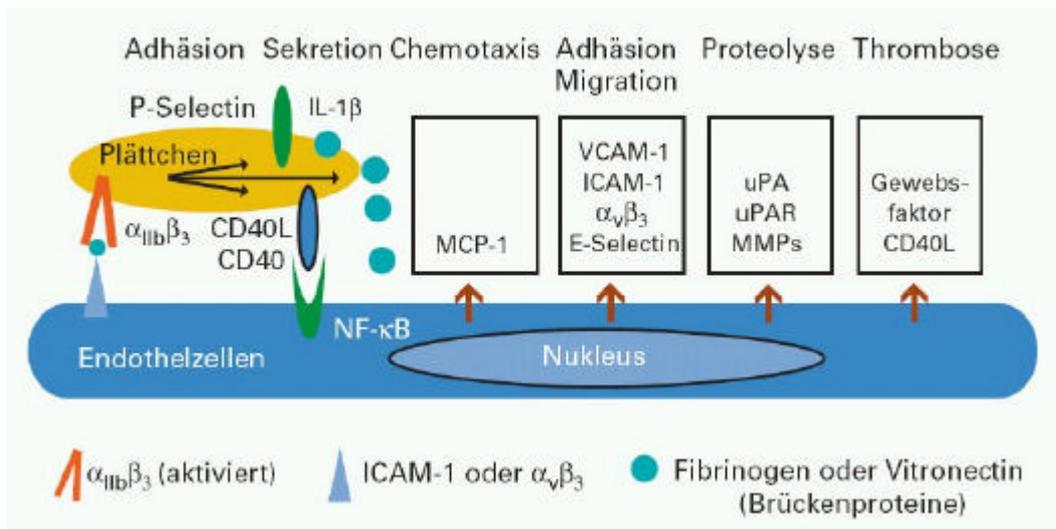
<b>1. EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Thrombozyten und Atherosklerose .....</b>	<b>1</b>
1.1.1. Thrombozyten und Koronare Herzerkrankung .....	3
1.1.2. Thrombozytenfunktion bei cerebrovaskulärer Ischämie (TIA, Stroke) .....	5
1.1.3. Thrombozytenfunktion und Diabetes mellitus.....	6
<b>1.2. Antithrombozytäre Therapie.....</b>	<b>8</b>
1.2.1. Aspirin .....	9
1.2.2. Aspirinresistenz .....	10
1.2.3. Ursachen der Aspirinresistenz.....	10
1.2.4. Bestimmung der Aspirinresistenz.....	11
1.2.5. Klinische Bedeutung der Aspirinresistenz.....	11
1.2.6. Thienopyridine: Ticlopidin und Clopidogrel.....	12
1.2.6.1. Ticlopidin .....	14
1.2.6.2. Clopidogrel.....	14
1.2.6.3. Clopidogrelresistenz .....	14
1.2.7. Ursachen der Clopidogrelresistenz.....	15
1.2.8. Bestimmung der Clopidogrelresistenz.....	15
1.2.9. Klinische Bedeutung der Clopidogrelresistenz .....	16
1.2.10. Fibrinogenrezeptorantagonisten.....	16
<b>2. ZIELSETZUNG.....</b>	<b>18</b>
<b>3. METHODEN ZUR UNTERSUCHUNG DER THROMBOZYTENFUNKTION ....</b>	<b>19</b>
<b>3.1. Bestimmung der in-vitro Blutungszeit (PFA 100).....</b>	<b>19</b>
<b>3.2. Aggregometrie .....</b>	<b>20</b>
<b>3.3. Durchflußzytometrie .....</b>	<b>21</b>
<b>3.4. Zwei-Farbenvollblutmethode zur Einzelzellanalyse der Plättchen .....</b>	<b>22</b>
<b>3.5. Analyse von Plättchen-Leukozyten-Aggregaten .....</b>	<b>24</b>

<b>4.</b>	<b>DARSTELLUNG DER EIGENEN ARBEITEN.....</b>	<b>26</b>
4.1.	Thrombozytenfunktion und Thrombozyten-Leukozyteninteraktion bei Patienten mit Sepsis und Multiorganversagen .....	26
4.2.	Thrombozytenfunktion bei Patienten mit Transplantatvaskulopathie.....	28
4.3.	Thrombozytenfunktion und Thrombozyten-Leukozyten-Interaktion bei akuter cerebraler Ischämie .....	31
4.4.	Thrombozytenfunktion und Progression der Atherosklerose bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2.....	34
4.5.	Antithrombozytäre Therapie und Aspirinresistenz bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2.....	36
<b>5.</b>	<b>RELEVANTE ORIGINALARBEITEN GEORDNET NACH THEMENGEBIET ..</b>	<b>38</b>
5.1.	Thrombozytenfunktion bei Sepsis und Multiorganversagen.....	38
5.2.	Thrombozytenfunktion bei Transplantatvaskulopathie.....	40
5.3.	Thrombozytenfunktion und Thrombozyten-Leukozyteninteraktion bei Patienten mit akuter cerebrovaskulärer Ischämie.....	42
5.4.	Thrombozytenfunktion und Progression der Atherosklerose bei Patienten mit Typ 2 Diabetes mellitus.....	45
5.5.	Aspirinresistenz bei Patienten mit Typ 2 Diabetes mellitus .....	46
<b>6.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG UND DISKUSSION .....</b>	<b>47</b>
<b>7.</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>49</b>
<b>8.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>51</b>
<b>9.</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>61</b>
<b>10.</b>	<b>EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG .....</b>	<b>62</b>

# 1. Einleitung

## 1.1. Thrombozyten und Atherosklerose

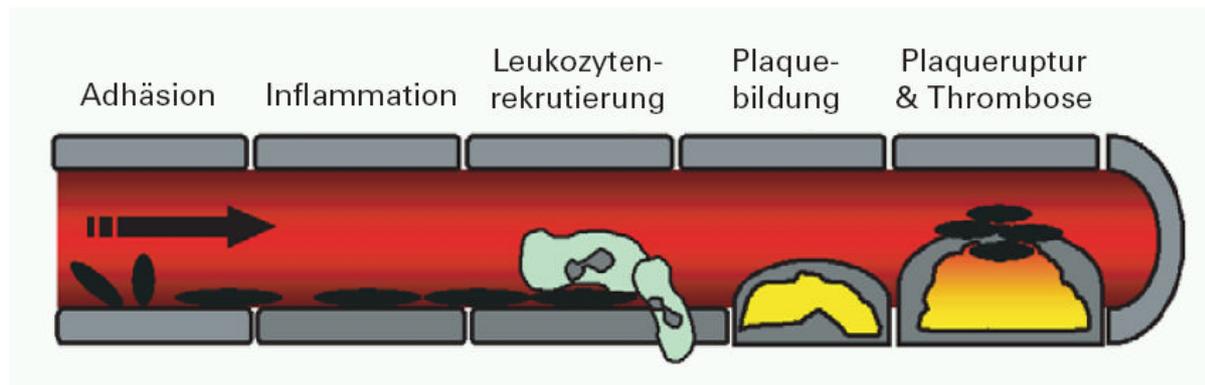
Unter Atherosklerose versteht man die variable Kombination von Intimaveränderungen der Arterien, bestehend aus herdförmigen Ansammlungen von Lipiden, komplexen Kohlenhydraten, Blut und Blutbestandteilen, Bindegewebe und Kalziumablagerungen verbunden mit Veränderungen der Arterienmedia. Das derzeit diskutierte Modell sieht die Atherogenese als zelluläre, entzündliche-proliferative Reaktion der Gefäßwand auf chronische Reizung, beziehungsweise Verletzung. Pathophysiologisch ist der zentrale Auslösemechanismus dieser Intimaveränderungen die Monozytenchemotaxis, die Adhäsion an die Gefäßwand, die Transmigration, Makrophagendifferenzierung, Phagozytose von oxidierten LDL-Partikeln und Bildung von Schaumzellen („foam cells“) <sup>1-3</sup>. Der Auslösemechanismus, der zur Monozyteneinwanderung in die Gefäßwand führt, ist nicht endgültig geklärt. Zahlreiche Studien belegen, daß Thrombozyten und insbesondere aktivierte Thrombozyten aufgrund ihrer Fähigkeit zur Exkretion zahlreicher biologisch aktiver Substanzen in der Lage sind, einen fördernden Effekt auf die Atherogenese auszuüben <sup>4</sup>. Die  $\alpha$ -Granula der Blutplättchen enthalten eine Vielzahl von mitogenen Wachstumsfaktoren wie z.B. „platelet-derived growth factor“ (PDGF) und „transforming growth factor“ (TGF). Diese Wachstumsfaktoren bewirken eine Einwanderung und Proliferation von glatten Muskelzellen und eine Intima-Proliferation der Blutgefäße an Stellen mit erhöhter Aktivität der Thrombozyten <sup>1</sup>. Darüberhinaus können die koronaren Risikofaktoren über eine Beeinflussung der Thrombozytenfunktion zur Atherogenese beitragen. Hypercholesterinämie, arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus sind assoziiert mit einer erhöhten basalen Plättchenaktivierung. Experimentelle Untersuchungen konnten zeigen, dass aktivierte Thrombozyten die adhäsiven und chemotaktischen Eigenschaften von Endothelzellen durch Freisetzung von zytokinähnlichen Substanzen wie Interleukin-1 oder CD40-Ligand <sup>5</sup> entscheidend verändern können (siehe Abbildung1)



**Abbildung 1:**

Die  $\alpha_{IIb}\beta_3$  vermittelte Plättchenadhäsion führt zur Oberflächenexpression von P-Selectin (CD62P) und zur Freisetzung von CD40L und IL-1 $\beta$ . Die freigesetzten Substanzen stimulieren Endothelzellen und induzieren ein entzündliches Milieu, welches die proatherogenen Veränderungen fördert <sup>6</sup>.

Diese Substanzen können im Endothel und auch in glatten Muskelzellen wiederum die Sekretion von MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1) und die Oberflächenexpression von ICAM-1 (interzelluläres Adhäsionsmolekül-1) induzieren <sup>4</sup>. ICAM-1 als auch MCP-1 stellen einen wesentlichen chemotaktischen Faktor für die Monozyten dar. Entscheidend für die Bildung von MCP-1 und ICAM-1 ist der Transkriptionsfaktor Nuklear-Faktor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B). Sowohl NF- $\kappa$ B als auch MCP-1 und ICAM-1 werden in sehr hohen Konzentrationen in atherosklerotischen Läsionen gefunden <sup>7</sup>. Aktivierte Thrombozyten aktivieren das NF- $\kappa$ B-System und induzieren die Transkription NF- $\kappa$ B regulierender Genprodukte. Zudem können aktivierte Thrombozyten über einen PDGF-abhängigen Mechanismus die Migration glatter Muskelzellen stimulieren. Aufgrund all dieser geschilderten Vorgänge können Thrombozyten eine zentrale Rolle bei der Entstehung atherosklerotischer Veränderungen im Bereich der Gefäßwand spielen und auch die Frühphase der Atherogenese, nämlich die Monozyteneinwanderung begünstigen. In Abbildung 2 ist das hypothetische Modell der Atherogenese und die Triggerung durch Thrombozyten zusammengefasst.



**Abbildung 2**

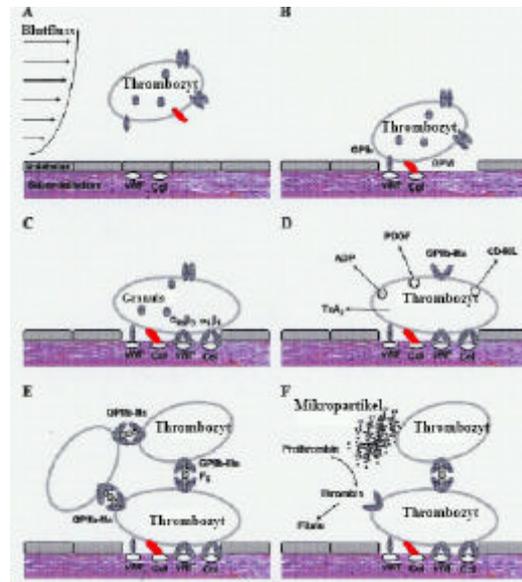
Hypothetisches Modell der Atherogenese getriggert durch Thrombozyten. Aktivierte Plättchen rollen entlang dem Endothelmonolayer vermittelt durch GPIIb/3-P-Selectin oder PSGL-1/P-Selectin. Anschließend adhären die Plättchen über  $\beta_3$  Integrine am Gefäßendothel und setzen proinflammatorische Verbindungen wie CD40L oder IL-1 $\beta$  frei und induzieren einen proatherogenen Phänotyp des Endothels. (Chemotaxis, MCP-1, Adhäsion, ICAM-1). Im weiteren Verlauf rekrutieren die adhären Plättchen Leukozyten und fördern die Leukozyten-Transmigration durch die Gefäßendothelschicht sowie die Bildung von Schaumzellen. Auf diese Weise triggern Plättchen die atherosklerotische Plaquebildung bevor es überhaupt zu einem thrombotischen Gefäßverschluss kommt <sup>6</sup>.

### 1.1.1. Thrombozyten und Koronare Herzerkrankung

Die häufigste klinische Manifestation der Atherosklerose stellt die koronare Herzerkrankung dar, die sich zur Haupttodesursache in der westlichen Welt mit steigender Tendenz entwickelt hat. Die Pathophysiologie der koronaren Herzkrankheit beruht im wesentlichen auf der Entstehung und dem Remodelling atherosklerotischer Plaques. Thrombozyten und insbesondere aktivierte Thrombozyten spielen eine fundamentale Rolle sowohl bei der Atheroskleroseentstehung als auch bei der Entwicklung ischämischer Komplikationen. So liegt dem akuten Koronarsyndrom eine akute atherosklerotische Plaqueruptur mit nachfolgender Thrombozytenaggregation und Thrombusbildung zugrunde <sup>8</sup>.

Im wesentlichen werden drei Mechanismen diskutiert, die zu einer solchen Plaqueruptur führen können. Bei Diskontinuität des Endothels z.B. durch oberflächliche Erosionen (Abbildung 3B) kommt es zur Freilegung von subendothelialen Strukturen wie Kollagen und von Willebrand-Faktor (VWF) <sup>9</sup>. Mittels der membranösen Adhäsionsrezeptoren GP Ib und GP VI (Abbildung 3B) kommt es zu einem initialen Kontakt der Thrombozyten mit dem Subendothel. Dieser Kontakt mit dem Subendothel führt zu einer Aktivierung des Fibrinogen- (GPIIb/IIIa) und Kollagenrezeptors ( $\alpha_2\beta_1$ ), was schließlich zu einer festen Adhäsion der Thrombozyten führt (Abbildung 3C). Im weiteren Verlauf degranulieren die

Thrombozyten (Abbildung 3D) und rekrutieren weitere Thrombozyten an die bereits adhärenen Thrombozyten und leiten damit den Vorgang der Plättchenaggregation ein (Abbildung 3E). Die Bildung von Mikropartikel (Abbildung 3F) im Bereich der Thrombozytenaggregate katalysiert die Entstehung von Thrombin und damit Fibrin, das den wachsenden Thrombus stabilisiert.



**Abbildung 3:** <sup>8</sup>

Thrombozytenabhängige Thrombusformation. **A:** Unter physiologischen Bedingungen adhären die Thrombozyten nicht an intaktes Endothel. **B:** Diskontinuität der Endothelzellen führt zur Freilegung subendothelialer Matrixproteine wie Kollagen und von-Willebrand-Faktor (VWF). Mittels der membranösen Adhäsionsrezeptoren GPIb und GPIIb/IIIa gehen die Thrombozyten einen initialen Kontakt mit dem Subendothel ein. **C:** Kontakt führt zur Aktivierung des Fibrinogenrezeptor ( $\alpha_{IIb}\beta_3$ ) und Kollagenrezeptors ( $\alpha_2\beta_1$ ). **D:** Degranulation der Blutplättchen und Rekrutierung weiterer Thrombozyten an die bereits adhärenen Thrombozyten. **E:** Mikroaggregatbildung über Fibrinogenbrücken zwischen den GPIIb-IIIa-Rezeptoren. **F:** Formation von Mikropartikel im Bereich der Thrombozytenaggregate katalysiert die Entstehung von Thrombin und damit Fibrin, das den wachsenden Thrombus stabilisiert.

Auch durch die Ruptur von Mikrogefäßen, die in atherosklerotische Läsionen einsprossen und zu kleinen Hämorrhagien mit einer in-situ Thrombose führen, ist eine Möglichkeit der plötzlichen Plaqueprogression vorstellbar. Die dritte Möglichkeit ist das Aufbrechen der fibrösen Kappe des Plaques, die vor allem aus migrierten glatten Muskelzellen und extrazellulärer Matrix besteht. Hier spielen inflammatorische Stimuli und Matrixmetalloproteinasen eine entscheidende Rolle. Die Thrombozytenanlagerung an den vulnerablen rupturierten Plaque kann bis zu einem vollständigen Gefäßverschluß und damit zu einem akuten Myokardinfarkt führen. Andererseits können die gebildeten

Thrombozytenaggregate im weiteren Verlauf in die Peripherie embolisieren und dabei zu einer Beeinträchtigung der myokardialen Mikrozirkulation führen<sup>10</sup>. Neben der mechanischen Obstruktion und Mikroembolisierung spielen auch die Freisetzung vasokonstriktiver Substanzen durch die Plättchen wie z.B. Serotonin, Thromboxan, freie Radikale eine wichtige Rolle. Neben ihrer Bedeutung für die Thrombusbildung wirken die aktivierten Blutplättchen auch inflammatorisch indem sie Zytokine wie Interleukin-8 oder Interleukin-6 produzieren. Zudem adhären aktivierte Blutplättchen auch an zirkulierende Leukozyten und bewirken deren Aktivierung. Solche Thrombozyten-Leukozytenaggregate konnten auch bei Patienten mit instabiler Angina pectoris und Myokardinfarkt nachgewiesen werden<sup>11, 12</sup>.

#### 1.1.2. Thrombozytenfunktion bei cerebrovaskulärer Ischämie (TIA, Stroke)

Der Schlaganfall stellt die dritthäufigste Todesursache<sup>13</sup> in den industrialisierten Ländern dar und ist eine der häufigsten Ursachen für körperliche Langzeitbehinderung. Ca 80 % der Schlaganfälle sind ischämischer Natur und entstehen entweder auf dem Boden eines atherothrombotischen oder kardioembolischen cerebralen Gefäßverschlusses.<sup>14</sup> Obwohl in beiden Fällen (atherothrombotisch und kardioembolisch), die Ursache der cerebralen Ischämie eine unkontrollierte Thrombusbildung darstellt, ist der Mechanismus, der zur Bildung des Thrombus führt, unterschiedlich<sup>15</sup>. Der atherothrombotische Schlaganfall ist pathophysiologisch eher vergleichbar mit der koronaren Thrombose. Hier triggern aktivierte Plättchen die Thrombusbildung am Ort der Läsion, meist in Bereichen mit hohen Scherkräften wie Aortenbogen oder Stenosen von extrakraniellen gehirnversorgenden Arterien. Im Gegensatz dazu liegt dem Stroke kardio-embolischer Genese wie z.B. bei Vorhofflimmern, ein anderer Mechanismus zugrunde. Hier entsteht der Thrombus in Bereichen mit niedrigen Scherkräften und erniedrigter Blutflussgeschwindigkeit vorwiegend durch verstärkte Tissue-Faktoraktivität und Thrombinbildung des Endothels mit erst nachfolgender Plättchenaktivierung. Aus diesem Grunde steht im Falle des atherothrombotischen Strokes die antithrombozytäre Therapie im Vordergrund und im Falle des kardioembolischen Schlaganfalles die Antikoagulation.

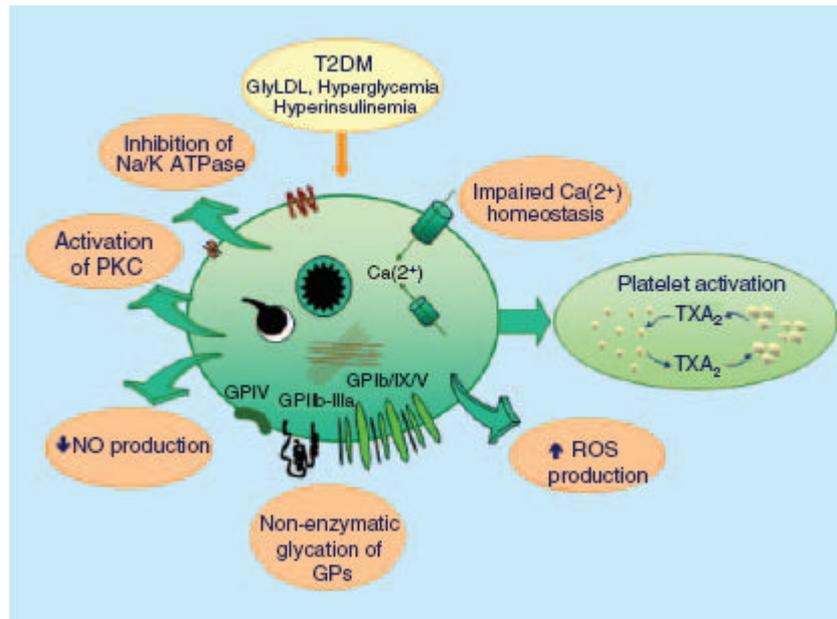
Ein potentieller Zusammenhang zwischen Plättchenaktivierung und cerebraler Ischämie wurde erstmals in den 60er Jahren vermutet und durch spätere Untersuchungen bestätigt<sup>16-18</sup>. So konnten bei Patienten mit Schlaganfall erhöhte Plasmaspiegel von Plättchenfaktor 4 sowie  $\beta$ -Thromboglobulin nachgewiesen werden. Im Vergleich zu gesunden Probanden wiesen

Thrombozyten von Patienten mit ischämischem Schlaganfall eine erhöhte durch Scherkräfte induzierbare Aggregabilität auf <sup>19</sup>. Innerhalb von 6 Wochen kam es zu einer spontanen Normalisierung der in der Akutphase verstärkten Plättchenaggregabilität <sup>20</sup>. Neuere Studien, die vorwiegend durchflußzytometrische Methoden verwendeten, zeigten eine vermehrte Expression von P-Selectin (CD62P) und CD63 auf zirkulierenden Thrombozyten von Patienten mit akutem Schlaganfall <sup>21</sup>. Gleichzeitig war der Anteil von Plättchen mit „shape change“ in der Phasenkontrastmikroskopie erhöht. Die Einnahme von Aspirin oder Marcumar hatte keinen Einfluß auf die Expression dieser thrombozytären Oberflächenantigene, sodaß trotz Aspirin oder Marcumar aktivierte Thrombozyten vorliegen können. Zeller <sup>22</sup>, der die Expression von CD62P, CD63 und Thrombospondin bei Patienten mit akuter cerebraler Ischämie (Stroke und TIA) untersuchte, fand bei Patienten mit Atherosklerose der gehirnversorgenden Gefäße eine ausgeprägtere Plättchenaktivierung als bei Patienten mit kardioembolischen Insulten. Während die CD62P-Expression sich im Median bei den erwähnten Studien nach 2 Wochen normalisierte, blieb die CD63 Expression über den untersuchten Zeitraum von 3 Monaten erhalten <sup>23</sup>. Allerdings konnte bisher keine Beziehung zwischen einer weiter bestehenden Plättchenaktivierung und dem Risiko für einen erneuten ischämischen Insult nachgewiesen werden.

### 1.1.3. Thrombozytenfunktion und Diabetes mellitus

Die Koronare Herzerkrankung und die damit verbundenen Komplikationen wie stumme Ischämien und Myokardinfarkt sind die häufigsten Todesursachen bei Diabetikern <sup>24</sup>. Auch hier spielen Thrombozyten eine fundamentale Rolle bei der Genese dieser besonders akzelerierten Atherosklerose und deren ischämischen Komplikationen.

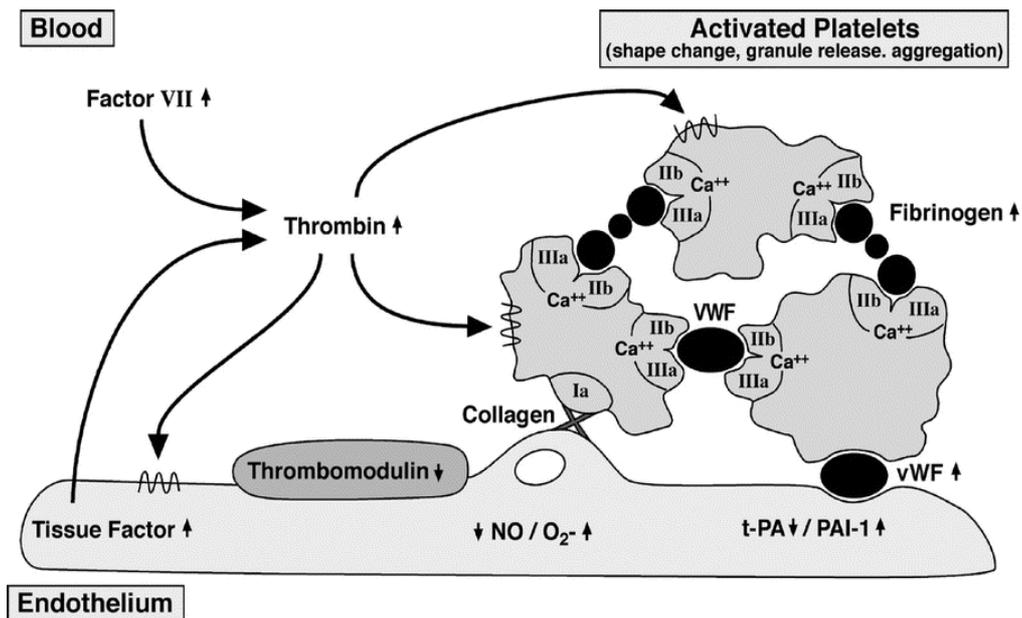
So sind die Thrombozyten von Diabetikern größer und weisen eine gesteigerte Aggregabilität und Adhäsivität auf <sup>25, 26</sup>. Ferner ist die Expression von thrombozytären aktivierungsunabhängigen als auch aktivierungsabhängigen Membranglycoproteinen wie GPIb (Bindungsstelle für von Willebrand Faktor), GPIIbIIIa (Fibrinogenrezeptor), P-Selectin, CD63 und GMP140 gesteigert. Zudem weisen Plättchen von Diabetikern (siehe Abbildung 4) eine veränderte Ca<sup>2+</sup> /Mg<sup>2+</sup> Homöostase auf, der Arachidonsäuremetabolismus ist verändert, die Thromboxan (TXA<sub>2</sub>) Synthese gesteigert, die Prostacyclin und NO-Produktion vermindert <sup>27, 28</sup>.



**Abbildung 4**

Auswirkungen der diabetischen Stoffwechsellaage auf die Thrombozytenfunktion: Veränderung der Calciumhomöostase, Inhibition der Natrium/Kalium-Adenosintriphosphatase (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase) Aktivität, Aktivierung der Proteinkinase C (PKC), verminderte Produktion von Stickstoffmonoxid (NO), gesteigerte Bildung von Sauerstoffradikalen (ROS) und nicht enzymatische Glycosylierung der Membranglycoproteine <sup>28</sup>.

Neben der gesteigerten Plättchenaktivierung liegt beim Diabetiker auch eine gesteigerte plasmatische Gerinnung vor<sup>29</sup>. Sowohl das endogene als auch exogene Gerinnungssystem sind betroffen und die prokoagulatorischen Faktoren sind erhöht. Auf der anderen Seite wird dieses Gleichgewicht noch zusätzlich durch die Erhöhung von PAI-1 und der gleichzeitigen Verminderung der Fibrinolyse gestört. Somit ist der Diabetes mellitus mit einem hoch prothrombotischen Zustand verbunden (siehe Abbildung 5). Dieser hoch prothrombotische Zustand mit den aktivierten Blutplättchen und der gesteigerten plasmatischen Gerinnung wird durch die endotheliale Dysfunktion beim Diabetiker <sup>30</sup> weiter aggraviert.



**Abbildung 5:**

Diabetes mellitus ein hochprothrombotischer Zustand mit aktivierten Plättchen, gesteigerter plasmatischer Gerinnung und Aufhebung der antithrombotischen Eigenschaften des Gefäßendothels <sup>29</sup>.

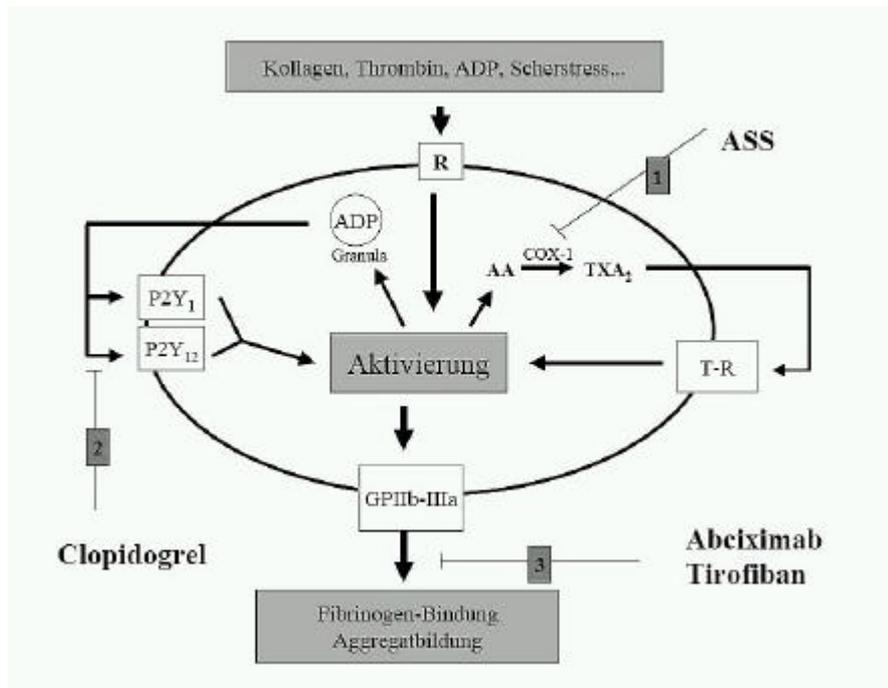
Die chronische Hyperglykämie führt zur Bildung von Protein-Glykosylierungsprodukten (sogenannte Amadoriprodukte oder early glycosylation products) aus welchen durch irreversible Vernetzung die AGE-Produkte (advanced glycosylation endproducts) und Superoxidanionen (Sauerstoffradikale) entstehen. Letztere vermindern die Synthese und Freisetzung von Prostaglandin (PGI<sub>2</sub>) und von Stickoxid (NO) am Gefäßendothel und in glatten Muskelzellen. Dies vermindert die Vasorelaxation, verstärkt die Thrombozytenadhäsion und Aggregation und führt zur Aufhebung der antithrombotischen Eigenschaften des Gefäßwand. Insgesamt liegt somit beim Diabetiker ein hoch prothrombotischer Zustand vor mit aktivierten Plättchen, einer gesteigerten plasmatischen Gerinnung bei gleichzeitiger Aufhebung der antithrombotischen Eigenschaften der Gefäßwand (Abbildung 5).

## 1.2. Antithrombozytäre Therapie

Da die Thrombozyten eine bedeutende Rolle bei der Atherosklerose und deren ischämischen Komplikationen (akutes koronares Syndrom, Schlaganfall) spielen, sind in den letzten Jahren eine Vielzahl von Medikamenten zur effektiveren Plättchenhemmung entwickelt worden.

### 1.2.1. Aspirin

Acetylsalicylsäure (Aspirin) gilt als Standard in der Therapie und Prophylaxe atherothrombotischer Krankheitsbilder<sup>31</sup>. Der Wirkmechanismus des Aspirins (Abbildung 6) beruht auf der selektiven und irreversiblen Hemmung der Cyclooxygenase (COX), die in 2 Isoformen (COX-1 und COX-2) existiert. Aspirin hemmt COX-1 irreversibel durch Acetylierung eines Serinrestes in Position 530 und verhindert damit die Konversion der Arachidonsäure in das instabile Endoperoxid  $PGH_2$ , welches dann in Thromboxan  $TXA_2$  umgewandelt wird. Letzteres wirkt vasokonstriktiv und fördert die Plättchenaggregation. Bereits nach einmaliger Einnahme von ASS kommt es zur Verlängerung der Blutungszeit, zur Hemmung der durch Kollagen oder Arachidonsäure induzierten Plättchenaggregation und zur verminderten Freisetzung mit Hemmung der zweiten Aggregationsphase nach ADP- oder Adrenalinstimulation.<sup>32</sup>



**Abbildung 6:**

Wirkorte von Antithrombotika

1 Aspirin hemmt selektiv die COX-1, dass die Arachidonsäure (AA) in das instabile Endoperoxid  $PGH_2$  umwandelt, wodurch die Thromboxanbildung ( $TXA_2$ ) verhindert wird.

2 Thienopyridine blockieren den P2Y<sub>12</sub>-ADP-Rezeptor und hemmen ADP-induzierte Aktivierungsmechanismen. Beide Substanzklassen wirken damit intrathrombozytär auf die Signaltransduktion.

3 Wirkort der GPIIb-IIIa Blocker ist extrathrombozytär, wirken direkt am Fibrinogenrezeptor und hemmen so die Endstrecke der Plättchenaggregation. R: spezifische Rezeptoren für chemische Agonisten.

AA : Arachidonsäure. Modifiziert nach Schrör<sup>33</sup>.

### 1.2.2. Aspirinresistenz

Die Effektivität von Aspirin sowohl in der primären als auch sekundären Prävention der kardiovaskulären thrombotischen Erkrankung ist gut dokumentiert<sup>34</sup>. Dennoch erleidet ein bedeutender Anteil der Patienten trotz scheinbar adäquater Aspirintherapie atherothrombotische Ereignisse was zu dem Begriff der „Aspirinresistenz“ (AR) geführt hat. Die Inzidenz der AR variiert je nach angewandter Testmethode und untersuchter Studienpopulation zwischen 5 und 50%<sup>31,35</sup>. Wong et al<sup>36</sup> schlagen folgende Einteilung für das Phänomen der Aspirinresistenz (AR) vor: 1. AR als das Unvermögen gegen ischämische Ereignisse zu schützen. 2. AR als fehlende Inhibition der Thromboxan-A2 Produktion und /oder seiner Metaboliten und 3. AR als das Versagen die Thrombozytenaggregation zu hemmen.

### 1.2.3. Ursachen der Aspirinresistenz

Die genauen Ursachen der Aspirinresistenz sind nicht eindeutig geklärt, und die zugrunde liegenden Mechanismen scheinen multifaktoriell zu sein. Die wohl einfachste Ursache betrifft die fehlende Compliance. Aufgrund der Resultate von Cotter ist die Non-Compliance sogar möglicherweise der Hauptgrund für die Aspirinresistenz<sup>37</sup>. Andere Autoren argumentieren, die Aspirinresistenz sei ein Dosierungsproblem, das man durch eine stufenweise Erhöhung der Aspirindosis durchbrechen kann<sup>38</sup>. Eine andere mögliche Ursache für die Aspirinresistenz scheint die Existenz alternativer Stoffwechselwege für die Thromboxansynthese zu sein. Aspirin hemmt vorwiegend COX-1 und nicht COX-2. Bei verschiedenen krankhaften Zuständen (Entzündung) kommt es aber zu einer vermehrten Expression von COX-2, welche ebenfalls zu einer Synthese von Prostaglandin H2 und Produktion von TXA2 führen kann trotz Inhibition der COX-1 durch Aspirin. Ein erhöhter Thrombozytenumsatz wird auch für die Aspirinresistenz verantwortlich gemacht. Nur 10-20 % nicht „aspirinisierte“ Thrombozyten muß im Gesamtpool vorhanden sein, um eine normale Thrombozytenfunktion und – aggregation zu gewährleisten. Verschiedene genetische Polymorphismen sind für das Auftreten einer Aspirinresistenz verantwortlich gemacht worden<sup>39</sup>. Neben TXA2 sind auch andere Mediatoren wie z.B. Kollagen, ADP, Katecholamine und Thrombin in der Lage eine Plättchenaggregation zu induzieren, was zum Teil gewisse Formen der Aspirinresistenz erklären könnte<sup>40</sup>.

#### 1.2.4. Bestimmung der Aspirinresistenz

Ein Konsensus hinsichtlich der besten Methode existiert nicht. Die gebräuchlichen in-vitro Tests unterscheiden sich in Methoden, die die Supprimierung der Thromboxansynthese durch ASS überprüfen und solche die verschiedene Phasen der Thrombozytenfunktion messen. Vom biochemisch-pharmakologischen Standpunkt wird die Aspirinwirkung anhand der Inhibition der Thromboxan A<sub>2</sub> Bildung im Serum oder Urin bestimmt.

Andererseits kann man den Anti-Aggregationseffekt von Aspirin durch die Messung der Plättchenaggregation überprüfen. Das PFA-100- Gerät von Dade, Behring <sup>41</sup> das auch im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurde, misst die primäre hämostatische Funktion in vitro. Im Gegensatz zur optischen Thrombozytenaggregation verwendet es Vollblut und simuliert die „high-shear stress“ Bedingungen wie sie in stenotischen Arterien vorkommen. Beide Methoden, Plättchenaggregometrie als auch in-vitro Blutungszeitbestimmung werden exakt im Rahmen der Darstellung der eigenen Arbeiten im Methodenteil erklärt.

#### 1.2.5. Klinische Bedeutung der Aspirinresistenz

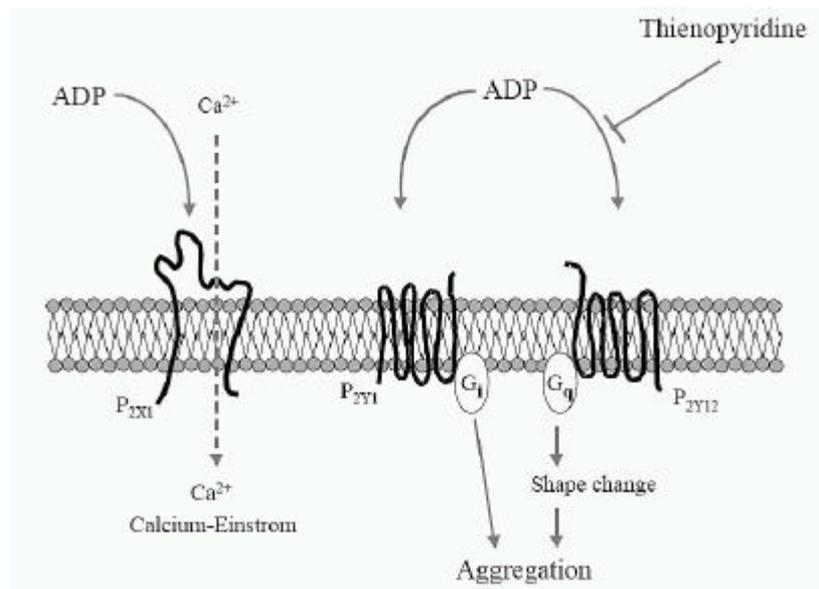
Das Ausmaß und die klinische Bedeutung der Aspirinresistenz sind bislang nicht endgültig geklärt. Es gibt aber einige klinische Studien zur AR, die zeigen, dass es sich hier nicht nur um ein Laborphänomen handelt. Schon 1993 beobachtete Grottemeyer <sup>42</sup> 180 Patienten über 2 Jahre, die wegen eines zurückliegenden Hirninfarktes mit ASS (Dosierung von 1500 mg/d) behandelt wurden. Etwa 33% diese Patienten wurden schon damals unter dieser hohen ASS-Dosierung als Non-Reponder eingestuft. Die Häufigkeit kardiovaskulärer Ereignisse war bei diesen Non-Responder mit 40% fast 10mal höher als bei den ASS-Respondern.

Gum et al <sup>43</sup> hat die AR prospektiv an 326 Patienten mit einer stabilen KHK mittels optischer Thrombozytenaggregation und PFA-Messung untersucht. 5.5 % der Patienten hatten eine AR und nach 2 Jahren war diese AR mit einem erhöhten Risiko von Tod, Myokardinfarkt und Schlaganfall assoziiert. In einer Subanalyse der Heart Outcomes Prevention Evaluation Study (HOPE) <sup>44</sup> konnte Eikelboom et al <sup>45</sup> zeigen, dass der kombinierte Endpunkt aus Myokardinfarkt, Schlaganfall und kardiovaskulärem Tod bei 976 ASS-behandelten Patienten bzw altersangepassten Kontrollen parallel zur in Quartilen unterteilten Ausscheidung von 11-Dehydro-thromboxan B<sub>2</sub> (11-DH-TXB<sub>2</sub>) zunahm. Chen <sup>46</sup> untersuchte die Effekte einer AR auf das Vorkommen von Myokardnekrosen nach nicht notfallmäßiger PCI bei 151 Aspirin behandelten Patienten. Das Ansprechen auf ASS wurde hier mit dem VerifyNow RPFA Test

(Accumetrics, San Diego, CA) <sup>47</sup> untersucht und 19.2 % der Patienten zeigten kein Ansprechen auf ASS. Aspirin-resistente Patienten wiesen eine signifikant höhere Inzidenz an Myokardnekrosen (erhöhte Troponinwerte) verglichen mit Aspirin-sensitiven Patienten auf (51.7% versus 24.6%, p-Wert=0.006). Eine erst kürzlich von Marcucci <sup>48</sup> publizierte Studie zeigte, dass Patienten mit einer Aspirinresistenz nach Behandlung eines Myokardinfarktes mit Akut-PCI und Stentimplantation (bare metal stent) ein höheres Risiko für erneute kardiovaskuläre Ereignisse nach einem Jahr haben (39.1% vs 23.2%, p<0.05). In einer multivariaten logistischen Regressionsanalyse erwies sich die Aspirinresistenz sogar als ein signifikanter und unabhängiger Prädiktor für das Auftreten eines erneuten kardiovaskulären Ereignisses innerhalb eines Jahres (Hazard Ratio 2.9 bei einem 95% Konfidenzintervall von 1.1 bis 0.2, p <0.05).

#### 1.2.6. Thienopyridine: Ticlopidin und Clopidogrel

Beide Substanzen gehören zu den Thienopyridinen, sind sich in ihrer Struktur sehr ähnlich, unterscheiden sich aber deutlich in ihrem Nebenwirkungsprofil als auch in ihren pharmakologischen Eigenschaften. Beide stellen sogenannte „prodrugs“ dar, d.h. sie wirken nicht in-vitro und werden erst durch hepatische Metabolisierung in ihre aktiven Metabolite umgewandelt, die dann die charakteristische antithrombozytäre Wirksamkeit entfalten. Im Gegensatz zu Aspirin hemmen die Metabolite der Thienopyridine nicht die Cyclooxygenase, sondern interferieren mit der ADP-induzierten Thrombozytenaggregation. Somit haben sie keinen Einfluß auf die Thromboxanbildung. (siehe Abbildung 6,7).



**Abbildung 7:**

Wirkmechanismus der Thienopyridine. ADP führt durch Bindung an den P2X1 –Rezeptor mittels Calciumeinstrom direkt und über die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren P2Y1 und P2Y12 mittels Freisetzung von intrazellulärem Calcium indirekt zu einer Erhöhung der intrazellulären Konzentration an Calciumionen und damit zur Formveränderung und Aggregation des Thrombozyten. Die ADP –Wirkung am P2Y12 wird durch Thienopyridine blockiert. Gi, Gq: Unterschiedliche Klassen, der in der Zellmembran verankerten plättchenaktivierenden G –Proteine (nach <sup>Gawaz 2001</sup>)

Sie blockieren spezifische ADP-Rezeptoren (P2Y12) , welche über inhibitorische G-Proteine die Adenylatzyklase regulieren und bewirken so eine Hemmung der ADP-induzierten Senkung des thrombozytären c-AMP-Spiegels und damit letztendlich Hemmung der Plättchenaggregation (Abbildung 7). Die Thienopyridine und hier initial das Ticlopidin erlangten ihre besondere klinische Bedeutung vor allem durch die Erkenntnis, daß die akute Stentthrombose nicht ein Problem der plasmatischen, sondern der thrombozytären Gerinnung ist. Unter der früher üblichen bis ca 1998 durchgeführten Begleittherapie von Aspirin und Marcumar nach koronarer Stentimplantation traten in bis zu 13% Stentthrombosen auf <sup>(Bertand ME 1996)</sup>. Leon et al konnten erstmals in der STARS-Studie die signifikante Überlegenheit einer Kombinationstherapie von ASS und Ticlopidin gegenüber einer Kombinationstherapie von ASS und Marcumar hinsichtlich des Auftretens einer Stentthrombose (0.5% [ ASS+Marcumar ] vs 2.7% [ ASS+Ticlopidin ] p=0.001) bei gleichzeitig geringerem Blutungsrisiko zeigen <sup>49</sup>. Diese Ergebnis wurde in der Folge von mehreren anderen Studien

<sup>50-52</sup> bestätigt. Seitdem hat sich die duale antithrombozytäre Therapie nach koronarer Stentimplantation im klinischen Alltag durchgesetzt.

#### 1.2.6.1. Ticlopidin

Bei gesunden Probanden wird nach Einnahme von 500 mg Ticlopidin die ADP-induzierte Thrombozytenaggregation messbar gehemmt. Die maximale antithrombozytäre Wirkung wird erst nach 4-7 Tagen erzielt. Die Inhibierung der ADP-induzierten Plättchenaggregation und die Zeit bis zum Wirkungsmaximum ist direkt abhängig von der Gesamtdosis. Höhere Dosierungen als 500 mg Ticlopidin erhöhen die Inzidenz der Nebenwirkungen. Die häufigste Nebenwirkungen sind Durchfälle, die bei ca 20% der behandelten Patienten auftreten. Die schwerwiegendste Nebenwirkung des Ticlopidin sind Neutropenien in etwa 2.5 % der Fälle. Diese treten üblicherweise während der ersten 3 Behandlungsmonate auf. Aus diesem Grunde werden zu Beginn der Behandlung engmaschige Blutbildkontrollen empfohlen. Sehr selten, aber potentiell lebensbedrohlich, kommt es unter Ticlopidin einer thrombotisch-thrombozytopenischen Purpura (TTP).

#### 1.2.6.2. Clopidogrel

Clopidogrel <sup>53</sup> hemmt ähnlich wie Ticlopidin hochselektiv die ADP induzierte Thrombozytenaggregation. Angriffspunkt ist der P2Y<sub>12</sub> Rezeptor (Abbildung 6,7) . Im Vergleich zu Ticlopidin wird aber die antithrombozytäre Wirkung sehr viel schneller erzielt. Eine einmalige Loading-Dose von 600 mg Clopidogrel bewirkt schon nach 2 Stunden eine deutliche Hemmung der ADP-induzierten Aggregation. Das Nebenwirkungsprofil ist deutlich günstiger, unter Clopidogrel wurden keine schwerwiegenden Neutropenien beobachtet, sodaß keine Blutbildkontrollen erforderlich sind. Auch Durchfälle sind weit weniger häufig als bei Ticlopidin. Über das Auftreten einer TTP nach Clopidogrelgabe existieren nur vereinzelte Fallberichte und der Zusammenhang wird kontrovers diskutiert <sup>54, 55</sup>. Aufgrund des günstigeren Nebenwirkungsprofil hat Clopidogrel das Ticlopidin nahezu vollständig vom Markt verdrängt.

#### 1.2.6.3. Clopidogrelresistenz

Über das Phänomen der Clopidogrelresistenz ist bisher weniger publiziert als über die Aspirin-Resistenz. Man nimmt an, dass der Anteil der Clopidogrelresistenz mit 5 bis 44% <sup>56</sup>

in einer ähnlichen Größenordnung liegt wie die Aspirinresistenz. Auch hier unterscheidet man zwischen einem Laborphänomen, dem Ausbleiben einer adäquaten Hemmung der ADP-induzierten Plättchenaggregation, und dem Unvermögen rezidivierende arterielle Gefäßverschlüsse zu verhindern.

#### 1.2.7. Ursachen der Clopidogrelresistenz

Die Ursachen einer Clopidogrelresistenz sind wie bei der Aspirinresistenz als multifaktoriell anzusehen. Einerseits wird diskutiert, ob eine Erhaltungsdosis mit 75 mg Clopidogrel zu niedrig ist, da circa 85% der zugeführten Clopidogrelmenge durch Esterasen zum inaktiven Carboxylderivat hydrolysiert wird<sup>57</sup>. Eine unterschiedliche Aktivität des Cytochrom-P450-Isoenzym 3A4 (CYP3A4), das für die Bildung des aktiven Clopidogrel-metaboliten wichtig ist, wird auch als ursächlich für die Clopidogrelresistenz angesehen. Eine Wechselwirkung mit anderen Medikamenten (Statine wie Atorvastatin), die ebenfalls von diesem Enzymsystem abgebaut werden, könnte ebenfalls eine Clopidogrelresistenz verursachen<sup>58</sup>. Auch genetische Ursachen wie Mutationen am ADP-P2Y<sub>12</sub>-Rezeptor<sup>59</sup> oder an dem Cytochrom CYP 3A4 werden diskutiert.<sup>60</sup> Auch eine gesteigerte Plättchenaktivierung wie sie beim Diabetiker vorliegt, stellt eine mögliche Ursache für ein ungenügendes Ansprechen einer Clopidogreltherapie dar.

#### 1.2.8. Bestimmung der Clopidogrelresistenz

Eine standardisierte Labormethode zur Bestimmung der Clopidogrelresistenz gibt es bislang noch nicht. Da Clopidogrel spezifisch einen der beiden ADP-Rezeptoren blockiert, wird derzeit am häufigsten die ADP-stimulierte Plättchenaggregation zur Beurteilung der Effektivität einer Clopidogreltherapie verwendet und als Goldstandard angesehen<sup>61</sup>. Inzwischen ist auch ein „Point of Care Test“ zur Überprüfung der Clopidogreltherapie entwickelt worden, der als zuverlässig anzusehen ist und gut mit den Ergebnissen der ADP-stimulierten Plättchenaggregation korreliert.<sup>56, 62</sup> Der spezifischste Test zur Bestimmung der Clopidogrelresistenz ist die flowzytometrische VASP- (Vasodilator-stimulierendes Phosphoprotein) Methode, die direkt die Hemmung des P2Y<sub>12</sub> Rezeptors nachweist<sup>63</sup>.

### 1.2.9. Klinische Bedeutung der Clopidogrelresistenz

Es existieren bisher nur wenige Studien, die einen Zusammenhang zwischen Nichtansprechen auf eine Clopidogreltherapie und dem Auftreten von atherothrombotischen Ereignissen nachweisen konnten. Die meisten dieser Studien sind retrospektiv durchgeführt worden.

Matetzky et al <sup>64</sup> konnten prospektiv zeigen, dass Patienten, die die geringste Aggregationshemmung unter einer Clopidogreltherapie aufweisen, in 40% der Fälle ein erneutes kardiovaskuläres Ereignis erlitten <sup>64</sup>. Cuisset fand ebenfalls eine Assoziation zwischen dem Auftreten von vaskulären Ereignissen und dem Nachweis einer Clopidogrelresistenz <sup>65</sup>. In einer Untersuchung von Barragan <sup>66</sup>, der die spezifische flowzytometrische VASP-Methode zur Überprüfung der Effektivität einer Clopidogreltherapie verwendete, wiesen Patienten mit akuter Stentthrombose häufiger eine Clopidogrelresistenz auf. Geisler konnte in einer prospektiven Studie an 379 Patienten mit Stentimplantation zeigen, dass 5.8 % der Patienten Clopidogrel Non-Responder waren <sup>67</sup>. In dieser Gruppe traten auch in einem Beobachtungszeitraum von 3 Monaten vermehrt kardiovaskuläre Ereignisse auf ( 27.3% versus 6.75, p=0.005).

Es existieren noch eine Reihe anderer Studien zur klinischen Bedeutung der Clopidogrelresistenz, die aber alle retrospektiv durchgeführt wurden und deswegen hier im einzelnen nicht aufgeführt werden sollen.

### 1.2.10. Fibrinogenrezeptorantagonisten

Derzeit stehen in der klinischen Routine nur drei i.v. anwendbare Fibrinogenrezeptorantagonisten (Abciximab, Eptifibatide und Tirofoban) zur Verfügung. Auf diese soll im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht im Detail eingegangen werden. Fibrinogenrezeptorantagonisten hemmen die Plättchenaggregation unabhängig von der Art der Zellaktivierung direkt durch Blockierung des Fibrinogenrezeptors (Abbildung 6). Obwohl das Wirkprinzip bei den derzeit verfügbaren Fibrinogenrezeptorantagonisten identisch ist, bestehen hinsichtlich struktureller Eigenschaften, Bindungsspezifität, Pharmakokinetik und Pharmakodynamik erhebliche Unterschiede. Der erste Fibrinogenrezeptorantagonist (Abciximab) wurde von Coller et al <sup>68</sup> entwickelt. Er stellt einen monoklonalen Mausantikörper dar, an dem das Fc-Fragment entfernt wurde und die verbleibenden Fab fragmente mit konstanten Regionen humanen Immunglobulins zusammengebracht wurden. Auf diese Weise ist ein humanisiertes chimerisches Fab-Fragment entstanden, das nur noch

die variable Region des ursprünglichen Mausantikörpers besitzt <sup>68</sup>. Dieser hochaffine Antikörper Abciximab bindet innerhalb von Minuten an zirkulierende Thrombozyten mit einer GPIIb-IIIa- Rezeptorblockade von > 80% (Plasmahalbwertszeit ca 26 Minuten) <sup>69</sup>. Zwölf Stunden nach Gabe besteht immer noch eine ca 70% Rezeptorblockade. Abciximab blockiert auch den Vitronectinrezeptor, der eine zentrale Rolle bei der Migration und Proliferation glatter Muskelzellen und bei der Neointimabildung nach Gefäßwandverletzung spielt <sup>70</sup>.

Die anderen beiden Fibrinogenrezeptorantagonisten (Eptifibatide und Tirofiban) sind kleinere Moleküle (500-800 Da). Eptifibatide ist ein cyclisches Peptid, das die RGD sequenz (Aminosäuresequenz Arginin-Glyzin-Asparagin) enthält, Tirofiban ist ein nicht peptidisches Moleküle, das die geometrischen, stereotaktischen und Oberflächeneigenschaften der RGD sequenz imitiert und dadurch in der Lage ist selektiv den Fibrinogenrezeptor zu blockieren. Sowohl Eptifibatide als auch Tirofiban hemmen den Fibrinogenrezeptor kompetitiv mit kurzer Plasmahalbwertszeit und Wirkdauer, sodaß sie als Dauerinfusion appliziert werden müssen, um eine kontinuierliche Hemmung der Thrombozytenaggregation zu erzielen <sup>69</sup>. Die Therapie mit GPIIb-IIIa Antagonisten wurde in großen Studien unter Einschluß von über 20 000 Patienten evaluiert und ist im allgemeinen gut verträglich und sicher. Die Hauptnebenwirkung sind unerwünschte Blutungen, insbesondere bei gleichzeitiger Kombination mit anderen Antithrombotika, wie es bei akuten Koronarinterventionen der Fall ist. Eine weitere wichtige Nebenwirkung sind schwerwiegende Thrombozytopenien bei abciximab, die sich vorwiegend akut innerhalb der ersten 24 Stunden entwickeln <sup>71</sup>. Die Therapie der Wahl bei solchen schweren Thrombozytopenien besteht im Absetzen von abciximab und der Infusion von Plättchenkonzentraten, die meist zu einer raschen Normalisierung der Thrombozytenzahl führt <sup>72</sup>.

## **2. Zielsetzung**

Ziel meiner Arbeiten war die Untersuchung der Thrombozytenfunktion bei unterschiedlichen kardiovaskulären Erkrankungen wie Sepsis, Transplantatvaskulopathie, akute cerebrovaskuläre Ischämie und Diabetes mellitus. Besonderes Interesse galt dem Zusammenhang zwischen Progression von Atherosklerose und der Thrombozytenfunktion. Die Progression der Atherosklerose sollte anhand klinischer Daten und Surrogatmarker wie Zunahme der Intima-Media-Dicke der Carotiden oder Plaquedickenzunahme an den oben erwähnten Patientenkollektiven evaluiert werden und mit dem Ausmaß der Plättchenaktivierung verglichen werden.

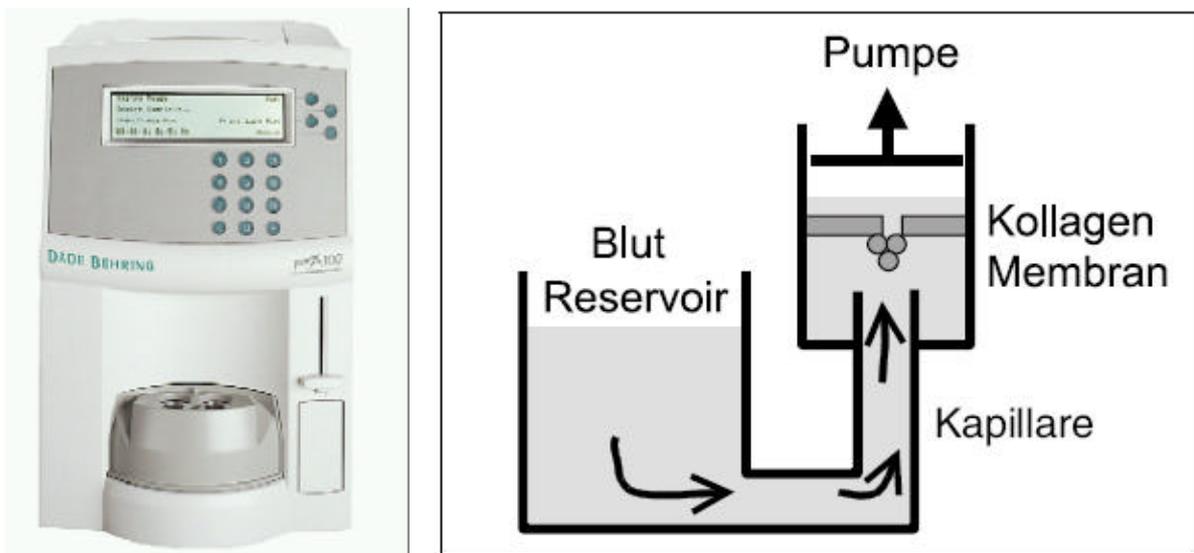
### 3. Methoden zur Untersuchung der Thrombozytenfunktion

Zur Funktionsdiagnostik der Thrombozyten wurden eine Vielzahl von Methoden entwickelt. Hier sollen nur die im Rahmen der Arbeiten verwendeten Methoden vorgestellt werden.

Zu den basalen Untersuchungen der Thrombozytenfunktion gehören die Bestimmung der Thrombozytenzahl, die Beurteilung eines gefärbten Blutausstriches und die Evaluierung der in-vivo Blutungszeit. Letzterer Test umfaßt sowohl die Thrombozyten- als auch die Gefäßwandfunktion.

#### 3.1. Bestimmung der in-vitro Blutungszeit (PFA 100)

Das PFA-100 System (Abbildung 8) ist ein spezifisches Verfahren zur Erfassung der Thrombozytenfunktion <sup>41</sup>.



**Abbildung 8**

Messprinzip des Plättchenfunktionsanalyser PFA-100 von Dade. Zitratblut wird durch ein kleines Loch in eine Kollagenmembran gesogen. Die Thrombozyten haften dem Kollagen an und es bildet sich mit der Zeit ein Plättchenthrombus. Durch den sich bildenden Plättchenthrombus wird diese Öffnung immer mehr verschlossen und der Blutfluß kommt zum Erliegen. Die CT (Closure Time=Verschlusszeit) ist ein Maß für die Thrombozytenfunktion und ist z.B. bei ASS-Einnahme verlängert. (Mammen 1998)

Die Messzelle dieses Gerätes simuliert das verletzte Blutgefäß und besteht aus einem Probenreservoir und einer Kapillare, an deren Ende sich eine biologisch aktive Membran mit einer zentralen Öffnung befindet. Durch die Kapillare wird das Zitratblut unter konstantem Vakuum aus dem Probenreservoir zur Membran gesaugt. Die Kapillare ahmt dabei die Durchflussbedingungen in einem Blutgefäß nach. Die Membran ist mit Kollagen und ADP

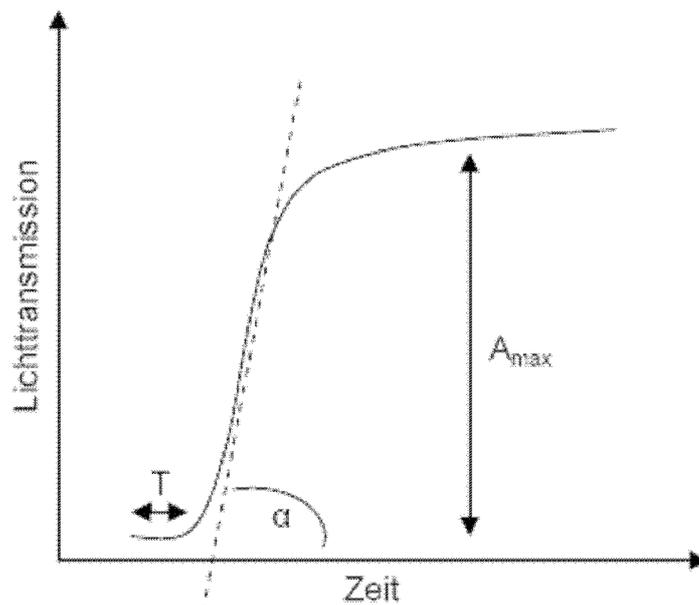
bzw Kollagen und Epinephrin beschichtet. Aufgrund der Stimulation mit diesen biologischen Wirkstoffen und der hohen Scherkräfte lagern sich die Thrombozyten am Rand der Membranöffnung an und aggregieren auf der Kollagenoberfläche. Der so entstehende Plättchenthrombus verengt die Membranöffnung immer mehr, bis er sie vollständig verschließt und es zum Sistieren des Blutflusses kommt. Das Gerät überwacht den Durchfluß des Blutes kontinuierlich. Sobald dieser zum Stillstand kommt, ist der Test beendet. Das Testergebnis wird als Verschlusszeit (Closure time), die Zeit vom ersten Membrankontakt der Probe bis zum vollständigen Membranverschluß angegeben. Neben dieser Meßgröße, welche die in-vitro Blutungszeit darstellt, kann das Gesamtvolumen des Blutes, das während der Messung durch die Kapillare fließt, optional ausgedruckt werden. Dieses System erfasst somit die Thrombozytenfunktion unter hohen Shear-Stress-Bedingungen (Schubspannung) und hat eine hohe Sensitivität für ASS<sup>73</sup> und das von Willebrand-Syndrom<sup>74</sup>. Für valide Ergebnisse sind ein Hämatokrit von mindestens 35% und eine Thrombozytenzahl von mindestens 100.000/µl erforderlich. Für jedes Labor müssen anhand eines Normalkollektivs (gesunde Blutspender) Referenzwerte ermittelt werden.

### **3.2. Aggregometrie**

Die Bestimmung der Thrombozytenfunktion mittels Aggregometrie erfolgt gemäß der Methode nach Born<sup>75</sup>. Das Verfahren beruht auf der Eigenschaft, dass die optische Dichte einer Partikelsuspension abhängig von der Partikelzahl ist und nicht von der Größe. Hierbei wird plättchenreiches Plasma (PRP) in silikonisierte Glasküvetten gegeben und unter Verwendung eines Magnetrühres konstant durchmischt. Nach Zugabe eines Plättchenagonisten wie z.B. ADP in die mit PRP gefüllte Küvette kommt es nun zu zunehmender Aggregatbildung und damit zur Abnahme der Trübung und zur Zunahme der Lichttransmission. Der Grad der Trübungsänderung ist ein Maß für die Aggregation und wird als Funktion der Zeit mittels Schreiber in Form einer Aggregationskurve aufgezeichnet (Abbildung 9). Als Referenzküvette dient plättchenarmes Plasma (PPP), welches den 100%-Wert der Lichttransmission darstellt. PRP vor Zugabe des Agonisten bezeichnet den Nullwert. Die Aggregationskurve (Abbildung 9) durchläuft nach Stimulation mit dem Agonisten wie z.B. ADP eine charakteristische Kurve. Zunächst kommt es zum „Shape change“ der Plättchen, welches man anhand der Abnahme der Lichttransmission erkennen kann, im weiteren Verlauf steigt die Aggregationskurve wieder an (primäre noch reversible Aggregationskurve, Zunahme der Lichttransmission), die entweder im weiteren Verlauf

wieder rückläufig ist (Deaggregation) oder nach Erreichen eines Plateaus in die zweite Phase der Aggregation übergeht (sekundäre irreversible Aggregation).

Eine weitere Methode zur Bestimmung der Aggregation ist die Vollblutaggregometrie <sup>76</sup>, die auf der Messung der elektrischen Impedanz beruht. Nach Zusatz der Agonisten bildet sich auf einer Platinelektrode ein Monolayer von Plättchen aus, der mit einer Erhöhung des Widerstandes einhergeht. Die Veränderung des Widerstandes dient als Prinzip der Impedanzmessung. Die Ergebnisse sind denen der optischen Messung vergleichbar. Der Vorteil ist die Durchführung im Vollblut, es entfällt ein Zentrifugationsschritt und die Blutplättchen befinden sich in einer physiologischeren Umgebung.



**Abbildung 9**

Typischer Verlauf der Lichttransmission nach Zugabe eines Agonisten, hier z.B. Kollagen, monophasischer Verlauf.  $A_{max}$  ist die maximale Zunahme der Lichttransmission, die Steilheit des Kurvenanstiegs pro Zeiteinheit stellt die Aggregationsrate dar.  $T$  repräsentiert die Zeit von der Zugabe des Agonisten bis zum Beginn der Änderung der Lichttransmission.

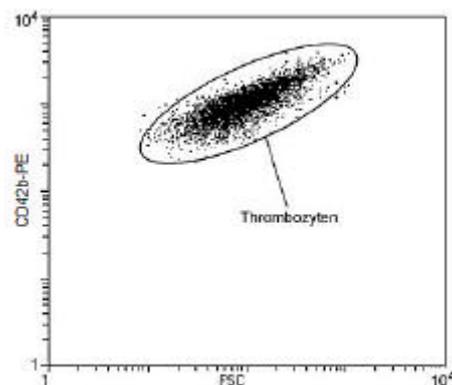
### 3.3. Durchflußzytometrie

Die durchflußzytometrische Analyse beruht auf einer gleichzeitigen Messung von Fluoreszenzintensität und Streulichtsignalen einer Zelle <sup>77, 78</sup>. Sie stellt eine zuverlässige Methode zur Beschreibung des in vivo Funktionszustandes der Thrombozyten dar. Die Entwicklung plättchenspezifischer, monoklonaler Antikörper, die die ruhende, aktivierte und ligandenbesetzte Form des GPIIb-IIIa-Rezeptors unterscheiden können, erlauben genaue Aussagen über Oberflächenexpression und Funktionszustand der thrombozytären

Membranrezeptoren zum Zeitpunkt der Blutentnahme. Darüber hinaus ermöglicht die hohe Sensitivität der durchflußzytometrischen Analyse die Unterscheidung zwischen aktivierten und nicht aktivierten thrombozytären Subpopulationen.

### 3.4. Zwei-Farbenvollblutmethode zur Einzelzellanalyse der Plättchen

Diese „Zwei-Farbenvollblutmethode“, die erstmals von Shattil und Mitarbeitern 1987 vorgestellt wurde <sup>79</sup>, ist derzeit die Methode der Wahl zur durchflußzytometrischen Charakterisierung der Plättchen. Hierbei werden zwei verschiedene Antikörper verwendet, ein plättchenspezifischer Antikörper (z.B. Phycoerythrin-konjugiert (PE)-antiCD42B) zur Identifizierung der Thrombozyten und ein weiterer fluorochrom markierter (z.B. FITC-konjugiert antiCD62P) aktivierungsabhängiger Antikörper zur Beschreibung des Funktionszustandes der thrombozytären Membranrezeptoren. Alle Antikörper werden im vielfachen Überschuß eingesetzt und liegen in gesättigter Konzentration vor. Bei der durchflußzytometrischen Analyse wird die Thrombozytenpopulation anhand der räumlichen Streulichtverteilung (Vorwärtsstreulicht und Seitwärtsstreulicht) und der PE-anti-CD42b-Immunfluoreszenz identifiziert und der Registrierbereich des Zytometers darauf konstant eingestellt. Abbildung 10 zeigt eine solche Thrombozytenpopulation in einer Zweiparameterdarstellung, der sogenannten „Dot-Plot“-Darstellung. Hier ist z.B. auf der Abszisse das Vorwärtsstreulicht (Forward side scatter FSC) und auf der Ordinate die CD42-PE-Immunfluoreszenz aufgetragen.

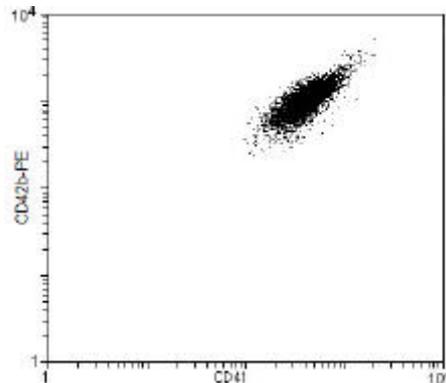


**Abbildung 10:**

Dot-Plot Darstellung einer Thrombozytenpopulation mit einer deutlich positiven CD42 Immunfluoreszenz. CD42b weist das für Thrombozyten spezifische Glykoprotein Ib-V-IX nach.

Um die Thrombozytenpopulation auf die Exposition von Membranglycoproteinen und die Degranulation von Granulainhaltsstoffen zu untersuchen bedient man sich einer weiteren

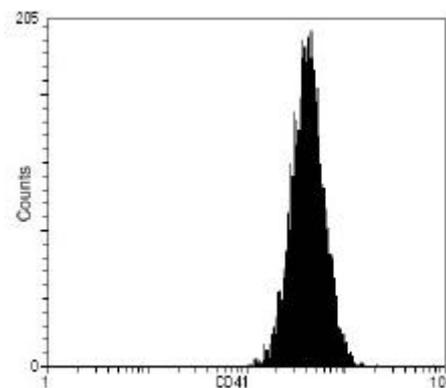
Zweiparameterdarstellung in der zwei verschiedene Fluoreszenzen gegeneinander aufgetragen sind (siehe Abbildung 11). In dieser Abbildung sieht man z.B. die Thrombozytenpopulation, die CD41 exprimiert.



**Abbildung 11:**

Dot-Plot Darstellung einer Thrombozytenpopulation mit Nachweis der Expression von CD41. Der Antikörper CD41 erkennt die  $\alpha$ IIb-Kette des thrombozytären Glykoproteins IIb-IIIa (Fibrinogenrezeptor)

Zur quantitativen Darstellung der Fluoreszenzintensität dient das sogenannte Histogramm, eine Einparameterdarstellung. Hierbei wird die logarithmische gemessene Intensität der FITC-Fluoreszenzereignisse in einer Verteilungskurve dargestellt und der Mittelwert (mittlere Immunfluoreszenz MIF) berechnet (Abbildung 12).



**Abbildung 12:**

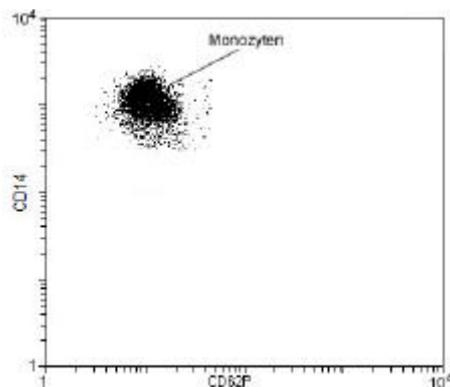
Histogramm zur CD41 Expression. Auf der x-Achse ist die Immunfluoreszenz logarithmisch und auf der y-Achse die Ereignishäufigkeit aufgetragen. Dies ermöglicht eine quantitative Bestimmung der Antikörperexpression

Die mittlere Immunfluoreszenz dient zur Beschreibung der Oberflächenexpression der auf der Thrombozytenmembran vorkommenden Rezeptoren bzw deren Funktionsszustand und ermöglicht eine Differenzierung zwischen Ruhezustand und Aktivierung der Blutplättchen.

Die Immunfluoreszenzintensität der Antikörper, die an aktivierungsabhängige Rezeptoren auf der Thrombozytenoberfläche (z.B. P-Selectin) binden, werden in Prozent nach Abzug der unspezifischen Fluoreszenz angegeben.

### 3.5. Analyse von Plättchen-Leukozyten-Aggregaten

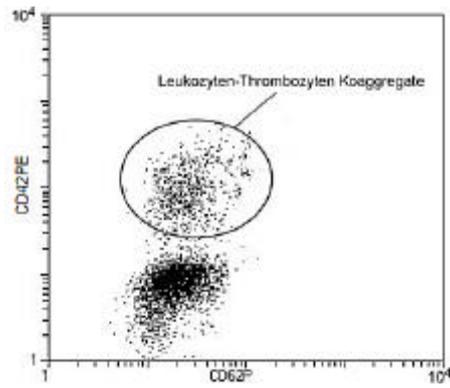
Die durchflußzytometrische Bestimmung der Thrombozytenaktivierung in der Einzelzell-Analyse kann das Ausmaß der gesamten Aktivierung der Thrombozyten unterschätzen, da ein erheblicher Teil der aktivierten Thrombozyten an zirkulierende Leukozyten oder Endothelzellen adhärirt und dadurch der Einzelzell-Analyse entgeht. Aus diesem Grunde ist es sinnvoll auch die Plättchen-Leukozyten Aggregate zu messen. Auch hier wird das Vollblut mit fluorochromkonjugierten Antikörpern gefärbt und die Leukozyten nach Erythrozytenlyse anhand des Vorwärtsstreulichtes und einer leukozytenspezifischen Immunfluoreszenz (z.B. PC5-CD14-Immunfluoreszenz, siehe Abbildung 13 ) identifiziert.



**Abbildung 13**

Dot-Plot Darstellung einer Monozytenpopulation. Diese kann gut anhand der positiven Expression von CD14 erkannt werden.

Bei den hier vorgestellten eigenen Arbeiten wurde eine Dreifachfärbung durchgeführt, um die Interaktion von Thrombozyten-Monozyten und Thrombozyten-Leukozyten und deren Expression von Aktivierungsmarkern zu erfassen. Der erste Antikörper CD52b-PE dient wie bei der Zweifachfärbung der Identifikation von Thrombozyten, der zweite Antikörper CD14-PC5 oder CD11b-Cy-Chrome zur Erkennung spezifischer Epitope auf Monozyten oder Leukozyten und der dritte Antikörper CD62P bzw CD62L zur Charakterisierung des Aktivierungsgrades.



**Abbildung 14**

Dot-Plot Darstellung von Leukozyten und deren Expression von CD42 und CD62P. Anhand des CD42 Antikörpers können Leukozyten-Thrombozyten Koagregate nachgewiesen werden. Die dritte Fluoreszenz erlaubt die Bestimmung der Expression von Aktivierungsmarkern wie z.B. CD62P.

## 4. Darstellung der eigenen Arbeiten

### 4.1. Thrombozytenfunktion und Thrombozyten-Leukozyteninteraktion bei Patienten mit Sepsis und Multiorganversagen

Gawaz M, Dickfeld T, Bogner C, Fateh-Moghadam S, Neumann FJ. Platelet function in septic multiple organ dysfunction syndrome. *Intensive Care Med.* 1997;23:379-85.

Gawaz M, Fateh-Moghadam S, Pilz G, Gurland HJ, Werdan K. Platelet activation and interaction with leucocytes in patients with sepsis or multiple organ failure. *Eur J Clin Invest.* 1995;25:843-51.

Gawaz M, Fateh-Moghadam S, Pilz G, Gurland HJ, Werdan K. Severity of multiple organ failure (MOF) but not of sepsis correlates with irreversible platelet degranulation. *Infection.* 1995;23:16-23.

Salat C, Boekstegers P, Holler E, Werdan K, Reinhardt B, Fateh-Moghadam S, Pihusch R, Kaul M, Beinert T, Hiller E. Hemostatic parameters in sepsis patients treated with anti-TNF alpha-monoclonal antibodies. *Shock.* 1996;6:233-7.

Die Sepsis steht mittlerweile an dritter Stelle der durch Infektionen verursachten Todesfälle. Der septische Schock ist die Haupttodesursache auf nicht-kardiologischen Intensivstationen<sup>80</sup>. Auch heute noch schwankt die Letalität des septischen Schocks mit Multiorganversagen (MOV) zwischen 30 und 80%, abhängig von der Schädigung der Organsysteme<sup>81</sup>.

In den letzten Jahren wurden die Zusammenhänge zwischen Infektion, Inflammation und Gerinnung immer besser herausgearbeitet, und es konnte gezeigt werden, dass die systemische Inflammation der Sepsis zu einer Gerinnungsaktivierung führt<sup>82</sup>. Dies geschieht über multiple Wege. Eine Möglichkeit ist die Aktivierung der Gerinnungskaskade über den extrinsischen Weg mit Hauptbeteiligung des Gewebefaktors („tissue factor“). Endresultat dieser Aktivierung ist die Bildung des Thrombins, welches aus dem löslichen Fibrinogen das solide Fibrin bildet<sup>83</sup>. Das Ausmaß der Fibrinbildung bestimmt den Schweregrad der Folgen der disseminierten intravasalen Gerinnung mit oder ohne MOV. Gleichzeitig kommt es zu einer Downregulation gerinnungsinhibierender Prozesse und einer Blockade der Fibrinogenolyse. Aber es ist auch vorstellbar, daß aktivierte Plättchen direkt an der Entstehung der inflammations-assoziierten Gerinnungsaktivierung mitwirken<sup>84</sup>. Deswegen haben wir bei Patienten mit Sepsis und MOV mit unterschiedlichem Ausprägungsgrad die Thrombozytenfunktion untersucht. Der Schweregrade des MOV und der Sepsis wurde anhand intensivmedizinischer Scoresysteme, APACHE II<sup>85</sup> und Elebutescor<sup>86, 87</sup> beurteilt.

Die Diagnose einer Sepsis wurde anhand definierter Sepsiskriterien gestellt <sup>88</sup>. Die Thrombozytenfunktion wurde anhand durchflußzytometrischer Bestimmung membranständiger Glykoproteine ( GPIIbIIIa, GPIb, Thrombospondin, GMP-140 und GP 53) untersucht. Hierbei zeigte sich, dass weder Sepsis noch MOV die Oberflächenexpression von GPIIb-IIIa oder GPIb beeinflussen. Dies spricht für eine normale Rezeptordichte der nicht aktivierten Form des Fibrinogenrezeptors (GPIIb-IIIa) und auch des von Willebrandrezeptors (GPIb). Die Aktivierung des Fibrinogenrezeptors war jedoch bei der Sepsis signifikant erhöht und korrelierte mit dem Schweregrad der Erkrankung. Eine signifikant gesteigerte Degranulation der Thrombozyten konnte bei der Sepsis ohne MOV nicht beobachtet werden, jedoch bei der Sepsis mit MOV. Hier waren die Degranulationsmarker wie Thrombospondin, GMP-140, GP53 deutlich erhöht und korrelierten mit dem Schweregrad der Erkrankung. Somit zirkulieren Thrombozyten bei Patienten mit Sepsis in einem aktivierten (Aktivierung des Fibrinogenrezeptors) jedoch noch reversiblen Aggregationszustand, der mit einem erhöhten Risiko für Mikrothrombosen einhergeht. Im weiteren Verlauf der Erkrankung kommt es dann zur Freisetzung thrombozytärer Granulaglykoproteine, die eine entscheidende pathophysiologische Rolle in der Entwicklung von Mikrozirkulationsstörungen und des MOV spielen können.

Auch anhand von in- vitro Experimenten konnten wir eine gesteigerte Plättchenaktivierung bei septischen Patienten belegen. Thrombozyten von gesunden Spendern, die mit Plasma von septischen Patienten mit oder ohne MOV inkubiert wurden, erwiesen sich hinsichtlich einer Stimulation mit Plättchenagonisten wie ADP hyperaggregabel und adherierten auch verstärkt an Endothelzellenkulturen (HUVEC) .

In anderen Arbeiten konnten wir zeigen, dass es während der Sepsis neben der Plättchenaktivierung auch zu einer gesteigerten Plättchen-Leukozytenadhäsion mit der Ausbildung von Plättchen-Leukozytenaggregaten kommt. Beim Auftreten des MOV nehmen diese Aggregate wieder ab. Möglicherweise ist dieses Phänomen auf vermehrte Sequestration der Plättchen-Leukozytenaggregate in der Mikrozirkulation zurückzuführen und trägt entscheidend zur Entwicklung des MOV bei. Diese Abnahme der Plättchen-Leukozytenaggregate erwies sich sogar als unabhängiger Prädiktor für ungünstiges Outcome. Patienten, die auf der Intensivstation verstarben, zeigten eine signifikant niedrigere Expression von CD41 auf Neutrophilen als solche, die überlebten.

#### 4.2. Thrombozytenfunktion bei Patienten mit Transplantatvaskulopathie

*Fateh-Moghadam S, Bocksch W, Ruf A, Dickfeld T, Scharl M, Pogatsa-Murray G, Hetzer R, Fleck E, Gawaz M. Changes in surface expression of platelet membrane glycoproteins and progression of heart transplant vasculopathy. Circulation. 2000;102:890-7.*

*Fateh-Moghadam S, Bocksch W, Wessely R, Jager G, Hetzer R, Gawaz M. Cytomegalovirus infection status predicts progression of heart-transplant vasculopathy. Transplantation. 2003;76:1470-4.*

*Wessely R, Gawaz M, Fateh-Moghadam S, Bocksch W, Jäger G, Hetzer R. Cytomegalovirus and progressing heart transplant vasculopathy: enough evidence that needs to be translated in appropriate screening and treatment regimens. Transplantation 2004;78:632*

Das Langzeitüberleben von Patienten nach Herztransplantation (HTX) wird im wesentlichen durch die sogenannte Transplantatvaskulopathie (TVP) limitiert<sup>89, 90</sup>. Die TVP stellt eine besonders aggressive Form der koronaren Herzerkrankung dar. Sie ist durch eine diffuse konzentrische und sehr schnell fortschreitende Intimaverdickung sowohl der epikardialen Koronararterien als auch der intramyokardialen Gefäße charakterisiert<sup>90, 91</sup>. Sogar die Koronarvenen und das aortale Segment des Spenderherzens können betroffen sein. Es finden sich sehr selten Verkalkungen, die Lamina elastica externa ist meist intakt, und gewöhnlicherweise sind Entzündungszeichen gegenwärtig.

Die exakte Pathogenese der TVP ist noch nicht geklärt. Man geht von einer multifaktoriellen Genese aus<sup>89, 91, 92</sup>, die sowohl immunologische als auch nicht immunologische Mechanismen einschließt. Das auslösende Ereignis für die Entwicklung der TVP ist die Endothelverletzung<sup>89</sup>. Diese kann durch immunvermittelte Gefäßverletzung (z.B. Graft-versus Host Reaktion), durch Reperfusionischämien, durch eine Cytomegalievirusinfektion oder durch metabolische Risikofaktoren<sup>93</sup> verursacht werden. Die Verletzung des intakten Endothels führt zur Freilegung von subendothelialen Strukturen, die eine Kaskade von immunologischen Prozessen in Gang setzen, wie Freisetzung von Zytokinen, Immunmediatoren, Komplementaktivierung und die Adhäsion von Leukozyten.. All diese Veränderungen produzieren eine chronische Entzündung und führen langfristig zur Thrombose, Proliferation von glatten Muskelzellen und zu einer Vaskonstriktion des Gefäßes. Man kann sich gut vorstellen, dass bei diesem Prozess auch aktivierte Plättchen eine wichtige Rolle spielen, insbesondere im Rahmen der Freilegung subendothelialer

Strukturen („denuding endothel injury“) <sup>94</sup>. Aus diesem Grunde haben wir prospektiv an 78 Patienten nach Herztransplantation (Transplantatalter:  $48.8 \pm 4.5$  Monate) die Thrombozytenfunktion untersucht. Da die konventionelle Koronarangiographie als Luminographie die konzentrischen und diffusen Veränderungen der TVP meist unterschätzt, haben wir bei allen Patienten den Ausprägungsgrad der TVP sowohl mittels quantitativer Koronarangiographie als auch mittels quantitativem intravaskulärem Ultraschall (IVUS) bestimmt. Es wurde eine quantitative und qualitative Plaqueanalyse an der Stelle des minimalsten Lumendurchmessers (MLD) im Hauptstamm und für jedes LAD segment durchgeführt. Die Koronarläsionen der Patienten wurden anhand definierter IVUS-Kriterien <sup>95</sup> in 2 Gruppen eingeteilt, nämlich in solche mit diffusen, konzentrischen und solche mit fokalen, exzentrischen Veränderungen. Zusätzlich wurde an einer definierten Stelle zu Beginn der Studie und nach einem Jahr die maximale Plaquedicke (MPT) gemessen. Eine Progression der Erkrankung wurde als eine Zunahme der MPT um  $> 0.3$  mm definiert. Gleichzeitig wurden bei allen Patienten beim Einschluß in die Studie die Expression von aktivierungsunabhängigen und aktivierungsabhängigen thrombozytären Oberflächenmarkern (GPIIb-IIIa [CD41], P-Selectin, GPIb [Cd42b] und LIBS-1 [Ligand-induced binding site, ein aktivierter Fibrinogenrezeptor]) durchflußzytometrisch gemessen. Patienten mit einer diffusen TVP zeigten eine deutlich erhöhte Expression von aktivierungsabhängigen Oberflächenmarkern wie LIBS-1 und eine gesteigerte Degranulation von P-Selectin im Vergleich zu Herztransplantierten mit fokaler TVP. Die Progression der TVP war mit einer gesteigerten Plättchenaktivierung (vermehrte LIBS-1 Expression) assoziiert. In einer multivariaten logistischen Regressionsanalyse erwies sich die gesteigerte LIBS-1 Expression sogar als ein unabhängiger Prädiktor sowohl für das Auftreten als auch für die Progression der Transplantatvaskulopathie. Diese Ergebnisse machen deutlich, dass bei der Genese der Transplantvaskulopathie aktivierte Thrombozyten eine wichtige Rolle spielen. Pathophysiologisch könnten aktivierte Plättchen schon sehr früh in diesen Prozess involviert sein, nämlich mit der Endothelverletzung. Hierbei kommt es zur Freilegung subendothelialer Matrix und adhäsiven Glykoproteine (GP) wie den von Willebrand Faktor (vWF) und Kollagen <sup>96</sup>. Auf diese Weise werden die antithrombotischen Eigenschaften des Gefäßendothels aufgehoben und die Plättchen können adherieren. Im weiteren Verlauf der Plättchenaktivierung kommt es zur Degranulation und in diesem Rahmen auch zur Freisetzung von entzündlichen Mediatoren wie Plättchenfaktor 4 (PF4) und proliferative Wachstumsfaktoren (z.B. platelet-derived growth factor PDGF). Via MCP-1 (monocyte

chemoattractant Protein-1) können aktivierte Plättchen auch Monozyten und Lymphozyten anlocken. Durch all diese Vorgänge wird die Poliferation von glatten Muskelzellen angeregt. Ob eine antithrombozytäre Therapie die Entstehung oder Progression einer TVP verhindern kann, ist bislang nicht hinreichend geklärt. Eine Monotherapie mit Aspirin hat sich bisher als ineffektiv erwiesen <sup>97</sup>, was auch verständlich ist, da Plättchen auf multiple Wege aktiviert werden können und eine einzige Substanz wie ASS nicht gleichzeitig Aktivierung und Degranulation der Plättchen verhindern kann, insbesondere in Gegenwart starker Plättchenagonisten. Eine duale antithrombozytäre Therapie wie z.B. ASS und Thienopyridine könnte eventuell einer Monotherapie überlegen sein. Zukünftige prospektive Therapiestudien müssen zeigen ob eine solche duale Kombinationstherapie die Lanzeitprognose der TVP günstig beeinflussen kann.

Obwohl einige Arbeiten <sup>98-100</sup> Atherogenese als einen entzündlichen Prozess ansehen, der durch eine Infektion mit Chlamydia pneumoniae oder humanem Cytomegalievirus (HCMV) ausgelöst wird und auch einige kleinere Studien <sup>101, 102</sup> über einen Zusammenhang zwischen HCMV-Infektion und TVP berichten, fehlt bislang eine Studie, die wirklich den Zusammenhang zwischen Progression der TVP und dem HCMV-status untersucht hat. Aus diesem Grunde machten wir dies zum Gegenstand einer weiteren Untersuchung an Patienten nach Herztransplantation. Wir haben dazu 103 Patienten nach Herztransplantation mit quantitativer Koronarangiographie und quantitativem IVUS zu Beginn der Studie und nach einem Jahr untersucht und bei allen Patienten den HCMV-Serostatus und die PCR bestimmt. Wir fanden, dass Patienten nach Herztransplantation mit einem positiven HCMV-Status (IgG+ und IgM+) im IVUS deutlich fort geschrittenere, kalzifizierte Läsionen aufwiesen und die maximale Plaquedicke signifikant größer war. Ferner konnten wir zeigen, dass ein positiver HCMV-Status (IgG+/IgM+) mit einem erhöhten Risiko für eine Progression der TVP einhergeht. Bei gleichzeitigem Vorliegen einer positiven PCR erhöht sich dieses Risiko noch.

Insgesamt zeigen unsere Ergebnisse, dass HCMV-Infektionen eine wichtige Rolle in der Pathogenese der TVP spielen. Herztransplantierte sollten demnach hinsichtlich einer HCMV-Infektion sorgfältig untersucht werden und bei einem positiven HCMV-Serostatus anti-viral behandelt werden. Ob solch eine anti-virale HCMV Therapie eine Progression der TVP oder sogar eine Entwicklung dieser verhindern kann, müssen zukünftige Studien noch zeigen.

### **4.3. Thrombozytenfunktion und Thrombozyten-Leukozyten-Interaktion bei akuter cerebraler Ischämie**

*Garlichs CD, Kozina S, Fateh-Moghadam S, Handschu R, Tomandl B, Stumpf C, Eskafi S, Raaz D, Schmeisser A, Yilmaz A, Ludwig J, Neundorfer B, Daniel WG. Upregulation of CD40-CD40 ligand (CD154) in patients with acute cerebral ischemia. Stroke. 2003;34:1412-8.*

*Htun P\*, Fateh-Moghadam S\*, Tomandl B, Handschu R, Klinger K, Stellos K, Garlichs C, Daniel W, Gawaz M. Course of platelet activation and platelet-leukocyte interaction in cerebrovascular ischemia. Stroke. 2006;37:2283-7. (\* equally contributed)*

*Fateh-Moghadam S, Htun P, Tomandl B, Sander D; Stellos K, Geisler T, Langer H, Walton K, Handschu R, Garlichs C, Daniel WG, Gawaz M. Hyperresponsiveness of platelets in ischemic stroke. Thromb Haemost 2007;97:*

Auch bei der akuten cerebrovaskulären Ischämie spielen aktivierte Plättchen eine bedeutende Rolle. Wir untersuchten bei Patienten mit akuter cerebrovaskulärer Ischämie (TIA und Schlaganfall) die Thrombozytenfunktion innerhalb von 24 Stunden nach Beginn des Ereignisses und nach 3 Monaten. Ferner wurden die Patienten 5 Jahre hinsichtlich eines Strokerezidivs nachbeobachtet. Die Thrombozytenfunktion wurde sowohl anhand thrombozytärer Oberflächenmarker wie LIBS-1, PAC-1, CD63 und P-Selectin als auch anhand der ADP-vermittelten Plättchenaggregation bestimmt. Das Ausmaß des Schlaganfalls wurde anhand des in der Cranialen Computertomographie (CCT) berechneten Infarkt volumens charakterisiert und andererseits durch den „National Institute of Health scale“ (NIH-scale) Score<sup>103, 104</sup>. Patienten mit akuter cerebrovaskulärer Ischämie wiesen eine gesteigerte Plättchenaktivierung (erhöhte Expression der Oberflächenmarker wie LIBS-1, PAC-1, CD63 und P-Selectin) und eine gesteigerte Plättchenaggregation im Vergleich zu einer Kontrollgruppe auf. Patienten mit Stroke zeigten im Vergleich zu Patienten mit TIA eine gesteigerte ADP-vermittelte Plättchenaggregation in der akuten Phase aber keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich der Expression der thrombozytären Aktivierungsmarker weder in der akuten Phase noch nach 3 Monaten. Zwischen der Größe des Infarkt volumens und dem Ausmaß der Thrombozytenaktivierung fand sich keine Korrelation. Nach 3 Monaten normalisierten sich die thrombozytären Aktivierungsmarker, sodaß sie sich nicht mehr von der Kontrollgruppe unterschieden. Allerdings bei einigen

Patienten persistierte die Plättchenaktivierung (erhöhte PAC-1 Expression) nach 3 Monaten. Wir konnten zeigen, dass diese erhöhte PAC-1 Expression mit einem erhöhten Risiko für einen Rezidivstroke einherging. Eine multivariate logistische Analyse ergab, dass eine erhöhte Expression von PAC-1 nach 3 Monaten sogar einen unabhängigen Prädiktor für einen Rezidivstroke darstellt.

Die akute cerebrovaskuläre Ischämie ist aber nach unseren Ergebnissen nicht nur mit einer gesteigerten Plättchenaktivierung assoziiert, sondern auch mit einer gesteigerten Plättchen-Leukozyteninteraktion. Dazu bestimmten wir neben den thrombozytären Oberflächenmarkern auch Marker, die sowohl repräsentativ sind für die Leukozytenaktivierung (L-Selectin) als auch für die Plättchen-Leukozytenwechselwirkung (Messung einer Leukozytenpopulation, die sowohl CD11b [Leukozytenmarker,  $\alpha$ -M-Kette von MAC-1] als auch CD42b[GPIIb, spezifisch für Plättchen ] exprimiert. Patienten mit akutem Stroke und TIA wiesen neben einer gesteigerten Expression von P-Selectin auch eine gesteigerte Expression von Thrombozyten-Leukozytenaggregaten auf. Zudem war das L-Selectin als Ausdruck einer verstärkten Leukozytenaktivierung im Vergleich zu einer Kontrollgruppe signifikant vermindert als Folge des Shedding-Prozesses (L-Selectin wird nach Aktivierung der Leukozyten sehr rasch enzymatisch von der Leukozytenoberfläche abgespalten). Im Gegensatz zu TIA Patienten normalisierte sich das L-Selectin bei Schlaganfall-Patienten nicht nach 3 Monaten, was auf eine persistierende Inflammation bei diesen Patienten hinweisen könnte. Inwieweit diese persistierende Leukozytenaktivierung nur einen Ausdruck von Reparaturmechanismen nach abgelaufenem Schlaganfall darstellt oder Hinweis für ein erhöhtes Risikos für einen Rezidivstroke ist, müssen weitere Studien klären.

Eine antithrombozytäre Monotherapie zur sekundären Prävention eines Schlaganfalls mit ASS oder Clopidogrel ist derzeit eine anerkannte Therapie nach stattgehabtem Schlaganfall. Ob eine duale antithrombozytäre Therapie mit ASS und Clopidogrel einer Monotherapie mit ASS oder Clopidogrel zur sekundären Prävention eines Schlaganfalles überlegen ist <sup>105, 106</sup>, wird derzeit noch kontrovers diskutiert. Die Pluto-Studie <sup>107</sup> zeigte, daß Patienten nach Schlaganfall oder TIA unter einer dualen Therapie von Clopidogrel und Aspirin eine effektivere Plättcheninhibierung und eine geringere Expression von PECAM-1 (platelet/endothelial cell adhesion molecule 1) und PAC-1 aufweisen. Ob sich diese Effekte auch in einer Reduktion von klinischen Ereignissen niederschlägt, ist bislang noch nicht endgültig geklärt. Zwei große Studien wie MATCH <sup>105</sup> und CHARISMA <sup>106</sup> haben eine duale Therapie mit ASS und Clopidogrel mit einer ASS-Monotherapie verglichen. Die MATCH-

Studie schloss Hochrisikopatienten mit Zustand nach TIA oder Schlaganfall ein, die CHARISMA-Studie Patienten mit niedrigem bis mittlerem Risiko. Beide Studien fanden bisher in der Patientengruppe mit einer dualen antithrombozytären Therapie keine signifikante Reduktion kardiovaskulärer Ereignisse, sondern nur vermehrte Blutungskomplikationen, die statistisch sogar signifikant waren. Eine Subgruppenanalyse der MATCH-Studie ergab jedoch bei Patienten mit einem atherothrombotischen Schlaganfall eine signifikante Reduktion rezidivierender kardiovaskulärer Ereignisse. Möglicherweise ist der mangelnde nachgewiesene klinische Effekt dieser beiden Studien auf den Einschluß nicht ganz geeigneter Patienten zurückzuführen. In der Matchstudie war der Anteil der Patienten mit „stroke and small vessel disease“ zwischen 52 und 53% in beiden Gruppen, eine Patientengruppe die aus pathophysiologischen Überlegungen eher nicht von einer dualen antithrombozytären Therapie profitieren kann. Ferner war der Anteil der eingeschlossenen Diabetiker mit 68% in beiden Behandlungsgruppen sehr hoch. Möglicherweise ist der mangelnde Effekt der dualen antithrombozytären Therapie auf das häufigere Auftreten einer Clopidogrelresistenz bei Diabetikern zurückzuführen. Angiolilo<sup>108</sup> konnte zeigen, daß Plättchen von Diabetikern weniger auf eine Clopidogreltherapie ansprechen als Plättchen von Nichtdiabetikern. Bei Charisma betrug der Anteil der Diabetiker nur zwischen 42.3 und 41.7 %, hier wurde aber nicht zwischen einer Primär- und Sekundärprävention unterschieden. Bei der Primärprävention herrscht aber ein anderes Gleichgewicht zwischen den einzelnen Risikofaktoren. Das Gerinnungssystem ist eventuell noch nicht so gestört, das Ausmaß der Plättchenaktivierung sehr viel geringer und die Inflammation ist noch nicht so aggraviert wie bei Patienten mit stattgehabtem Schlaganfall. Somit kann man Therapiekonzepte, die in der Sekundärprävention erfolgreich sind, nicht unbedingt auf die Primärprävention übertragen.

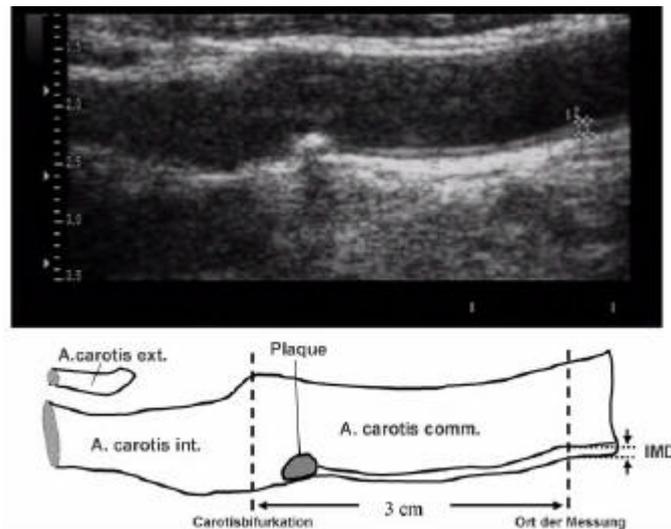
Es bleibt somit noch zu klären, ob möglicherweise Patienten in der chronischen Phase nach Schlaganfall, die noch eine persistierende Plättchenaktivierung und Leukozytenaktivierung aufweisen, eventuell doch von einer dualen anti-thrombozytären Therapie profitieren könnten.

#### **4.4. Thrombozytenfunktion und Progression der Atherosklerose bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2**

*Fateh-Moghadam S, Li Z, Ersel S, Reuter T, Htun P, Plöckinger U, Bocksch W, Dietz R, Gawaz M. Platelet degranulation is associated with progression of intima-media thickness of the common carotid artery in patients with diabetes mellitus type 2. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2005;25:1299-1303.*

Wie schon in der Einleitung erwähnt, haben Thrombozyten von Diabetikern ein größeres mittleres Plättchenvolumen, zeigen ein gesteigertes Aggregations- und Adhäsionsverhalten, und exprimieren verstärkt aktivierungsunabhängige und aktivierungsabhängige Membranglykoproteine<sup>25, 26</sup>. Im Tiermodell der Maus konnte bereits gezeigt werden, dass durch eine verstärkte Adhäsion von Plättchen an der Karotisgefäßwand atherosklerotische Prozesse in Gang gesetzt werden können<sup>109</sup>. Eine klinische Studie, die prospektiv die systemische Plättchenaktivierung und die Progression der Atherosklerose an Diabetiker untersucht hat, fehlte jedoch bislang. Wir untersuchten prospektiv an 105 Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2, die sich an unserer Diabetestagesklinik zur Optimierung ihrer diabetischen Stoffwechsellage vorstellten, die Zunahme der Intima-Media-Dicke der Carotis communis (Surrogatmarker für die Progression der Atherosklerose) innerhalb eines Jahres. Dabei wurde zu Studienbeginn und nach einem Jahr an einer definierten Stelle der Carotis communis beidseits die Intima-Media-Dicke gemessen und daraus die Differenz bestimmt. Für die Messung der Intima-Media-Dicke wurde ein Ultraschallgerät benutzt, das mit einem hochauflösenden 8-Mhz linear 2D Scanner ausgestattet war (System Five, GE-Vingmed, Solingen, Deutschland). Zunächst wurde die Arteria carotis communis aufgesucht und dann die Intima-Media-Dicke an einem bestimmten Punkt 30 mm proximal der Carotisbifurkation (siehe Abbildung 11) gemessen, sofern dort keine kalzifizierten Plaques vorhanden waren. Bei Nachweis von kalzifizierten Plaques an dieser Stelle, wurde die Messung der Intima-Media-Dicke 25 mm proximal der Carotisbifurkation durchgeführt. Anschließend wurde aus drei Messwerten der Mittelwert gebildet und die Bildaufnahmen digital gespeichert. Dem Untersucher, der die Ultraschallmessungen der Intima-Media-Dicke durchführte, waren die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Messungen der Thrombozytenfunktion nicht bekannt. Die folgende Abbildung 15 soll die Messung der Intima-Media-Dicke

veranschaulichen. Eine Differenz  $> 0$  mm innerhalb eines Jahres wurde als eine Progression der Atherosklerose definiert



**Abbildung 15 :**

Ultraschallbild und schematische Darstellung zur Messung der Intima-Media-Dicke der A. Carotis Communis (ACC). Im Ultraschallbild erkennt man einen kalzifizierten Plaque (echoreiche Struktur mit Schallschatten) proximal der Carotisbifurkation. Intima und Media zusammen lassen sich als echodichte Struktur gut vom Gefäßlumen und den darunter liegenden Gewebeschichten abgrenzen.

Die Thrombozytenfunktion der untersuchten Patienten wurde anhand der Expression von thrombozytären aktivierungsabhängigen Oberflächenantigenen (CD62P, CD63 und CD40L) durchflußzytometrisch bestimmt. Von 105 Patienten wiesen 58 (55.2%) eine Zunahme der Intima-Media-Dicke auf und 47 (44.8%) Patienten keine Zunahme. Die demographischen Charakteristika unterschieden sich nicht signifikant zwischen den beiden Gruppen. Auch eine begleitende medikamentöse Therapie wie Aspirin, Betablocker, ACE-Inhibitoren und Statine war gleich verteilt zwischen beiden Gruppen. Wir fanden eine signifikante Korrelation zwischen der Zunahme der Intima-Media-Dicke und der Degranulation von aktivierungsabhängigen Plättchenmarkern wie CD63 und CD40L. Patienten mit einer Progression der Intima-Media-Dicke wiesen zudem eine signifikant höhere Expression von CD63 im Vergleich zu Patienten ohne Progression auf. Mit Hilfe einer multivariaten logistischen Regressionsanalyse, in der wir die klassischen Risikofaktoren wie Hypercholesterinämie, arterielle Hypertonie, Nikotinabusus, positive Familienanamnese, Gewicht, und als weitere Parameter Alter, HbA1c, mittlere Intima-Media-Dicke zu Studienbeginn, die Thrombozytenmarker CD40L, CD62P und CD63 einschlossen, konnten wir zeigen, dass allein die erhöhte Expression von CD63 einen unabhängigen Prädiktor für

die Progression der Intima-Media-Dicke darstellt. Das Neue an unserer klinischen Studie war, dass wir die Zunahme der Intima-Media-Dicke bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 prospektiv gemessen haben und diese dann mit der Plättchenaktivierung korreliert haben. Aufgrund unserer Ergebnisse ergibt sich die Frage ob mit einer effizienten antithrombozytären Therapie eine Progression der Atherosklerose bei Diabetikern verhindert werden kann. In der Tat gibt es schon einige wenige klinische Studien, die dies zeigen konnten. Ranke<sup>110</sup> fand einen dosisabhängigen Effekt von Aspirin auf das Plaquewachstum in der Carotis communis. Eine Dosierung von 900 mg ASS täglich erwies sich hierbei effizienter als eine Dosis von 50mg. Kodama et al<sup>111</sup> zeigte, dass Diabetiker ohne antithrombozytäre Therapie nach 3 Jahren eine deutlich größere Progression der Intima-Media-Dicke aufwiesen als solche die eine antithrombozytäre Therapie mit ASS oder Ticlopidin hatten. Letztendlich fehlen bislang immer noch prospektive Therapiestudien, die einen positiven Effekt einer dualen antithrombozytären Therapie auf die Progression der Atherosklerose belegen können.

#### **4.5. Antithrombozytäre Therapie und Aspirinresistenz bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2**

*Fateh-Moghadam S, Plöckinger U, Cabeza N, Htun P, Reuter T, Ersel S, Gawaz M, Dietz R, Bocksch W. Prevalence of aspirin resistance in patients with type 2 diabetes . Acta Diabetol 2005;42:99-103.*

Eine effektive Aspirintherapie zur Primär- und Sekundärprävention ist beim Diabetiker besonders wichtig, da dieser aufgrund seines ausgeprägten prothrombotischen Zustandes (Plättchenaktivierung, Aktivierung der plasmatischen Gerinnung, Verminderung der Fibrinolyse und Aufhebung der antithrombotischen Eigenschaften des Gefäßendothels) besonders durch kardiovaskuläre Ereignisse gefährdet ist. Deshalb haben wir uns für die Häufigkeit der Aspirinresistenz beim Typ 2 Diabetiker interessiert. Es wurden 172 Patienten mit Typ 2 Diabetes, die sich an unserer Diabetestagesklinik zur Optimierung ihres Blutzuckers vorstellten, in unsere Studie eingeschlossen. Die demographischen Daten der Patienten wurden sorgfältig dokumentiert. Eingeschlossen wurden Patienten mit Typ 2 Diabetikeres mellitus und ausgeprägtem Risikoprofil wie arterielle Hypertonie, Hypercholesterinämie, Adipositas. Alle Patienten waren unter einer täglichen Aspirintherapie von 100 mg. Der Aspirineffekt wurde anhand der Plättchenhämostasekapazität mit dem

Plättchenfunktionsanalyzer (PFA-100) von Dade (siehe Abschnitt 3.1.) bestimmt. Aspirin verlängert gewöhnlich die in-vitro Blutungs- oder Verschlusszeiten. Als Aspirin resistent wurden solche Patienten bezeichnet, die trotz einer chronischen regelmäßigen Einnahme von 100 mg Aspirin normale in-vitro Blutungszeiten aufwiesen. Die normale in-vitro Blutungszeiten (Referenzwerte wurden an normalen gesunden Blutspendern ermittelt) betragen zwischen 82 und 165 sec. Patienten mit in-vitro Blutungszeiten > 300 ms wurden als Aspirin-Responder definiert, Patienten zwischen diesen Werten (166 - 300 sec) als Semi-Responder. Von unseren 172 Patienten mit Typ 2 Diabetes mellitus waren 37 (21.5%) Patienten nach dieser Definition Non-Responder und 29 (16.9%) Semi-Responder. Somit zeigten nur 61.6% aller Patienten ein adäquates Ansprechen auf Aspirin. Obwohl einige Studien von einem Zusammenhang zwischen Aspirinresistenz und Rauchen, Hochdruck, Hypercholesterinämie oder Alter berichteten<sup>35, 43, 112</sup>, konnte bislang keine Studie einen klinischen Prädiktor für die Entwicklung einer Aspirinresistenz finden. In unserer eigenen Studie waren die Aspirin Non-Responder signifikant jünger als die Aspirin-Responder. Eine daraufhin durchgeführte multivariate logistische Regressionsanalyse ergab Alter als einen unabhängigen Prädiktor für Aspirinresistenz beim Typ 2 Diabetiker. Eine mögliche Erklärung für das häufigere Auftreten der Aspirinresistenz bei jüngeren Diabetikern in unserer Studie könnte der gesteigerte Plättchenumsatz im jüngeren Alter sein.

Weiterführende Studien müssen klären ob die Aspirinresistenz bei Diabetikern mit einem erhöhten Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse einhergeht. Unklar ist auch ob diese Patienten nur einer Aspirindosiserhöhung bedürfen oder ob die Umstellung auf eine duale antithrombozytäre Therapie erforderlich ist. Bedenkt man, dass in Deutschland ca 6 Millionen Diabetiker leben und diese ab dem 40 Lebensjahr und Vorliegen eines weiteren kardiovaskulären Risikofaktors 100 mg Aspirin zur Primärprävention nehmen sollten<sup>113</sup>, ist eine Aspirinresistenz von 21.5% sowohl von gesundheitspolitischer als auch wirtschaftlich Bedeutung.

## **5. Relevante Originalarbeiten geordnet nach Themengebiet**

### **5.1. Thrombozytenfunktion bei Sepsis und Multiorganversagen**

Gawaz M, Dickfeld T, Bogner C, Fateh-Moghadam S, Neumann FJ.

Platelet function in septic multiple organ dysfunction syndrome.

Intensive Care Med. 1997 Apr;23(4):379-85.

PMID: 9142575

Gawaz M, Fateh-Moghadam S, Pilz G, Gurland HJ, Werdan K.

Severity of multiple organ failure (MOF) but not of sepsis correlates with irreversible platelet degranulation.

Infection. 1995 Jan-Feb;23(1):16-23.

PMID: 7744487

Gawaz M, Fateh-Moghadam S, Pilz G, Gurland HJ, Werdan K.  
Platelet activation and interaction with leucocytes in patients with sepsis or multiple organ failure.  
Eur J Clin Invest. 1995 Nov;25(11):843-51.  
PMID: 8582450

Salat C, Boekstegers P, Holler E, Werdan K, Reinhardt B, Fateh-Moghadam S, Pihusch R, Kaul M, Beinert T, Hiller E.  
Hemostatic parameters in sepsis patients treated with anti-TNF alpha-monoclonal antibodies.  
Shock. 1996 Oct;6(4):233-7.  
PMID: 8902937

## **5.2. Thrombozytenfunktion bei Transplantatvaskulopathie**

Fateh-Moghadam S, Bocksch W, Ruf A, Dickfeld T, Scharf M, Pogátsa-Murray G, Hetzer R, Fleck E, Gawaz M.

Changes in surface expression of platelet membrane glycoproteins and progression of heart transplant vasculopathy.

Circulation. 2000 Aug 22;102(8):890-7.

PMID: 10952958

Fateh-Moghadam S, Bocksch W, Wessely R, Jäger G, Hetzer R, Gawaz M.  
Cytomegalovirus infection status predicts progression of heart-transplant  
vasculopathy.

Transplantation. 2003 Nov 27;76(10):1470-4.

PMID: 14657688

### **5.3. Thrombozytenfunktion und Thrombozyten-Leukozyteninteraktion bei Patienten mit akuter cerebrovaskulärer Ischämie**

Garlichs CD, Kozina S, Fateh-Moghadam S, Handschu R, Tomandl B, Stumpf C, Eskafi S, Raaz D, Schmeisser A, Yilmaz A, Ludwig J, Neundörfer B, Daniel WG. Upregulation of CD40-CD40 ligand (CD154) in patients with acute cerebral ischemia. Stroke. 2003 Jun;34(6):1412-8. Epub 2003 May 22. Erratum in: Stroke. 2003 Jul;34(7):1820. PMID: 12764232

Htun P, Fateh-Moghadam S, Tomandl B, Handschu R, Klinger K, Stellos K, Garlichs C, Daniel W, Gawaz M.

Course of platelet activation and platelet-leukocyte interaction in cerebrovascular ischemia.

Stroke. 2006 Sep;37(9):2283-7. Epub 2006 Aug 3.

PMID: 16888273

Fateh-Moghadam S, Htun P, Tomandl B, Sander D, Stellos K, Geisler T, Langer H,  
Walton K, Handschu R, Garlichs C, Daniel WG, Gawaz M.  
Hyperresponsiveness of platelets in ischemic stroke.  
Thromb Haemost. 2007 Jun;97(6):974-8.  
PMID: 17549300

#### **5.4. Thrombozytenfunktion und Progression der Atherosklerose bei Patienten mit Typ 2 Diabetes mellitus.**

Fateh-Moghadam S, Li Z, Ersel S, Reuter T, Htun P, Plöckinger U, Bocksch W, Dietz R, Gawaz M.

Platelet degranulation is associated with progression of intima-media thickness of the common carotid artery in patients with diabetes mellitus type 2.

Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2005 Jun;25(6):1299-303. Epub 2005 Apr 7.

PMID: 15817881

## **5.5. Aspirinresistenz bei Patienten mit Typ 2 Diabetes mellitus**

Fateh-Moghadam S, Plöckinger U, Cabeza N, Htun P, Reuter T, Ersel S, Gawaz M, Dietz R, Bocksch W.

Prevalence of aspirin resistance in patients with type 2 diabetes.

Acta Diabetol. 2005 Jun;42(2):99-103.

PMID: 15944844

## 6. Zusammenfassung und Diskussion

In den hier vorgelegten Arbeiten konnte gezeigt werden, dass Thrombozyten und insbesondere aktivierte Thrombozyten eine große Rolle bei unterschiedlichen kardiovaskulären Erkrankungen wie Sepsis, Transplantatvaskulopathie, akuter cerebrovaskulärer Ischämie und bei der akzelerierten Atherosklerose des Diabetikers spielen.

So zirkulieren Thrombozyten bei Patienten mit Sepsis in einem aktivierten jedoch reversiblen Aggregationszustand, der mit einem erhöhten Risiko für Mikrothrombosen einhergeht. Im weiteren Verlauf des septischen Krankheitsbildes kommt es zur Freisetzung thrombozytärer Granulaglykoproteine (Degranulation), die eine wichtige Rolle bei der Entwicklung von Mikrozirkulationsstörungen und Multiorganversagen (MOV) spielen können. Bei der Sepsis kommt es jedoch nicht nur zu einer gesteigerten Plättchenaktivierung, sondern auch zu einer vermehrten Ausbildung von Plättchen-Leukozytenaggregaten, die sobald das MOV auftritt, wieder abnehmen. Diese Abnahme der Plättchen-Leukozytenaggregate erwies sich sogar als unabhängiger Prädiktor für ungünstiges Outcome dieser Patienten.

Auch bei der Entwicklung der Transplantatvaskulopathie (TVP) nach Herztransplantation spielen aktivierte Thrombozyten eine wichtige Rolle. Patienten mit einer diffusen TVP wiesen eine deutlich erhöhte Expression von aktivierungsabhängigen Oberflächenmarkern wie LIBS-1 und Degranulationsmarkern (P-Selectin) im Vergleich zu Patienten mit fokaler TVP auf. Wir konnten aber nicht nur eine Assoziation der TVP mit einer gesteigerten Plättchenaktivierung zeigen, sondern dass diese gesteigerte Plättchenaktivierung (vermehrte LIBS- Expression) mit einer Progression der Erkrankung einhergeht. Dazu haben wir gleichzeitig mittels IVUS die Zunahme der Plaquedicke an einer definierten Stelle in der Koronararterie zu Beginn der Studie und nach einem Jahr gemessen. In einer multivariaten logistischen Regressionsanalyse erwies sich die gesteigerte LIBS-1-Expression als ein unabhängiger Prädiktor für das Auftreten einer Progression der Transplantatvaskulopathie.

Bei Patienten mit akuter cerebrovaskulärer Ischämie (TIA und Stroke) konnten wir ebenfalls eine gesteigerte Plättchenaktivierung (Expression von Oberflächenmarkern wie LIBS-1, PAC-1, CD63, P-Selectin) und eine vermehrte Plättchenaggregation im Vergleich zu einer Kontrollgruppe nachweisen. Nach 3 Monaten normalisierten sich die thrombozytären Oberflächenmarker, sodaß sie sich von der Kontrollgruppe nicht mehr unterschieden. Bei einigen Patienten persistierte aber die Plättchenaktivierung (erhöhte PAC-1 Expression) nach 3 Monaten. Diese erhöhte PAC-1 Expression ging mit einem erhöhten Risiko für einen Rezidivstroke einher. Neben dieser gesteigerten Plättchenaktivierung fanden wir auch eine

gesteigerte Leukozytenaktivierung (verminderte L-Selectinexpression) bei Patienten mit akutem Stroke und TIA, wobei sich hinsichtlich dem Ausmaß der Leukozytenaktivierung in der Akutphase kein signifikanter Unterschied zwischen Stroke und TIA Patienten zeigte. Jedoch nach 3 Monaten wiesen die Patienten mit Stroke im Gegensatz zu den TIA-Patienten immer noch keine Normalisierung des L-Selectins auf. Zukünftige Studien müssen klären ob diese persistierende Leukozytenaktivierung nach Schlaganfall Ausdruck von weiterbestehenden Reparaturmechanismen ist oder ob diese mit einem erhöhten Risiko für einen erneuten Schlaganfall verbunden ist.

Auch bei Diabetikern liegt eine systemische Plättchenaktivierung vor, die mit einer besonders akzelerierten Atherosklerose einhergeht. Wir konnten bei Typ 2 Diabetikern in einer prospektiven Studie zeigen, dass bei diesen Patienten nicht nur eine gesteigerte Plättchenaktivierung vorliegt, sondern dass diese mit der Progression der Atherosklerose assoziiert ist. Surrogatmarker für die Progression der Atherosklerose war hierbei die Zunahme der Intima-Media-Dicke an der Carotis communis innerhalb eines Jahres. In einer multivariaten logistischen Regressionsanalyse erwies sich eine erhöhte Expression von CD63 als unabhängiger Prädiktor für die Progression der Intima-Media-Dicke innerhalb eines Jahres. Aufgrund der gesteigerten Plättchenaktivierung und der damit verbundenen sehr aggressiven Atherosklerose bei Diabetikern ist eine effektive antithrombozytäre Therapie beim Diabetiker besonders wichtig. Dem steht aber das Problem der Aspirinresistenz gegenüber. Wir konnten anhand eigener Untersuchungen zeigen, dass ca 21.5% der Typ 2 Diabetiker eine Aspirinresistenz aufweisen. Weiterführende Studien müssen klären ob diese Aspirinresistenz bei Diabetiker auch mit einem erhöhtem Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse einhergeht und wie diese Aspirinresistenz im klinischen Alltag zu berücksichtigen ist.

## 7. Abkürzungsverzeichnis:

AA	Arachidonsäure
ACC	Arteria carotis communis
ACE	Arteria carotis externa
ADP	Adenosindiphosphat
AGE	advanced glycosylation endproducts
AMP	Adenosinmonophosphat
APACHE-Score	Acute Physiology And Chronic Health Evaluation
AR	Aspirinresistenz
ATP	Adenosintriphosphat
DM-2	Diabetes mellitus Typ 2
CCT	Craniale Computertomographie
CMV	Cytomegalievirus
COX	Zycloxygenase
c-AMP	Cyclo-Adenosinmonophosphat
CT	Closure Time = Verschlußzeit
CYP3A4	Cytochrom P4503A4
11-DH-TXB	11-Dehydro-thromboxan B <sub>2</sub>
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FSC	Forward scatter, Vorwärtsstreulicht
GP	Glykoprotein
GPIIb-IIIa	Glykoprotein IIb-IIIa
GPIb	Glykoprotein Ib
HCMV	Humanes Cytomegalievirus
HTX	Herztransplantation
HUVEC	Human umbilical vein endothelial cells
ICAM-1	Interzelluläres Adhäsionsmolekül –1
IMD	Intima-Mediadicke
IVUS	Intravaskulärer Ultraschall
KHK	Koronare Herzerkrankung
LAD	left anterior descending (linke Herzkranzarterie)
LIBS-1	ligand induced binding site-1 (Liganden-induzierte Bindungsstelle)

MCP-1	monocyte chemoattractant protein-1
MIF	Mittlere Immunfluoreszenz
MLD	minimalster Lumendurchmesser
MOV	Multiorganversagen
MPT	maximal plaque thickness (=maximale Plaquedicke) im Intravaskulärem Ultraschall
NF-κB	Transkriptionsfaktor Nuklear-Faktor --κB
NIH-scale Score	National institute of health scale
NO	Stickstoffmonoxid
PAI-1	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1-Protein
PCI	Perkutane Intervention
PC5	phycoerythrin-cyanin 5
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDGF	platelet-derived growth factor
PF4	Plättchenfaktor 4
PE	Phycoerythrin
PFA	Platelet function analyzer
PGI2	Prostaglandin
PKC	Proteinkinase C
PAP	Plättchenarmes Plasma
PRP	plättchenreiches Plasma
RGD	Aminosäuresequenz: Arginin-Glycin-Asparaginsäure
PSGL-1	P-Selectin-Glykoprotein-Ligand-1
RPFA	Rapid platelet function analyzer
SSC	Side scatter, Seitwärtsstreulicht
TIA	Transitorisch ischämische Attacke
TGF	Transforming growth factor
TVP	Transplantatvaskulopathie
TXA <sub>2</sub>	Thromboxan
VASP	Vasodilator-stimulierendes Phosphoprotein
VCAM-1	Vascular cell adhesionmolecule-1
vWF	von Willebrand-Faktor

## 8. Literaturverzeichnis

1. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature*. 1993;362(6423):801-809.
2. Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *The New England journal of medicine*. 1999;340(2):115-126.
3. Ross R. Atherosclerosis is an inflammatory disease. *American heart journal*. 1999;138(5 Pt 2):S419-420.
4. Gawaz M, Neumann FJ, Dickfeld T, Koch W, Laugwitz KL, Adelsberger H, Langenbrink K, Page S, Neumeier D, Schomig A, Brand K. Activated platelets induce monocyte chemotactic protein-1 secretion and surface expression of intercellular adhesion molecule-1 on endothelial cells. *Circulation*. 1998;98(12):1164-1171.
5. Henn V, Slupsky JR, Grafe M, Anagnostopoulos I, Forster R, Muller-Berghaus G, Kroczek RA. CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature*. 1998;391(6667):591-594.
6. Siegel-Axel D, Langer H, Lindemann S, Gawaz M. [Role of platelets in atherosclerosis and inflammation]. *Med Klin (Munich)*. 2006;101(6):467-475.
7. Brand K, Page S, Rogler G, Bartsch A, Brandl R, Knuechel R, Page M, Kaltschmidt C, Baeuerle PA, Neumeier D. Activated transcription factor nuclear factor-kappa B is present in the atherosclerotic lesion. *J Clin Invest*. 1996;97(7):1715-1722.
8. Gawaz M. Thrombozyten und primäre Hämostase. In: M G, ed. *Das Blutplättchen*. Stuttgart  
New York: Georg Thieme; 1999:4-24.
9. Libby P, Aikawa M. Stabilization of atherosclerotic plaques: new mechanisms and clinical targets. *Nat Med*. 2002;8(11):1257-1262.
10. Skyschally A, Schulz R, Gres P, Konietzka I, Martin C, Haude M, Erbel R, Heusch G. Coronary microembolization does not induce acute preconditioning against infarction in pigs-the role of adenosine. *Cardiovasc Res*. 2004;63(2):313-322.
11. Ott I, Neumann FJ, Gawaz M, Schmitt M, Schomig A. Increased neutrophil-platelet adhesion in patients with unstable angina. *Circulation*. 1996;94(6):1239-1246.
12. Neumann FJ, Ott I, Gawaz M, Puchner G, Schomig A. Neutrophil and platelet activation at balloon-injured coronary artery plaque in patients undergoing angioplasty. *J Am Coll Cardiol*. 1996;27(4):819-824.

13. Murray CJ, Lopez AD. Global mortality, disability, and the contribution of risk factors: Global Burden of Disease Study. *Lancet*. 1997;349(9063):1436-1442.
14. Warlow CP. Epidemiology of stroke. *Lancet*. 1998;352 Suppl 3:SIII1-4.
15. Gawaz M. Antiplatelet therapy and stroke. In: M G, ed. *Blood Platelets*. Stuttgart New York: Georg Thieme; 2001:153-155.
16. Denny-Brown D. Recurrent cerebrovascular episodes. *Arch Neurol*. 1960;2:194-210.
17. Russell RW. Observations on the retinal blood-vessels in monocular blindness. *Lancet*. 1961;2:1422-1428.
18. Hollenhorst RW. Vascular status of patients who have cholesterol emboli in the retina. *Am J Ophthalmol*. 1966;61(5 Pt 2):1159-1165.
19. Konstantopoulos K, Grotta JC, Sills C, Wu KK, Hellums JD. Shear-induced platelet aggregation in normal subjects and stroke patients. *Thromb Haemost*. 1995;74(5):1329-1334.
20. Dougherty JH, Jr., Levy DE, Weksler BB. Platelet activation in acute cerebral ischaemia. Serial measurements of platelet function in cerebrovascular disease. *Lancet*. 1977;1(8016):821-824.
21. Grau AJ, Ruf A, Vogt A, Lichy C, Bugge F, Patscheke H, Hacke W. Increased fraction of circulating activated platelets in acute and previous cerebrovascular ischemia. *Thromb Haemost*. 1998;80(2):298-301.
22. Zeller JA, Tschöepe D, Kessler C. Circulating platelets show increased activation in patients with acute cerebral ischemia. *Thromb Haemost*. 1999;81(3):373-377.
23. Marquardt L, Ruf A, Mansmann U, Winter R, Schuler M, Bugge F, Mayer H, Grau AJ. Course of platelet activation markers after ischemic stroke. *Stroke*. 2002;33(11):2570-2574.
24. Nathan DM. Long-term complications of diabetes mellitus. *The New England journal of medicine*. 1993;328(23):1676-1685.
25. Tschöepe D, Roesen P, Schwippert B, Gries FA. Platelets in diabetes: the role in the hemostatic regulation in atherosclerosis. *Semin Thromb Hemost*. 1993;19(2):122-128.
26. Tschöepe D, Rauch U, Schwippert B. Platelet-leukocyte-cross-talk in diabetes mellitus. *Horm Metab Res*. 1997;29(12):631-635.
27. Colwell JA, Nesto RW. The platelet in diabetes: focus on prevention of ischemic events. *Diabetes care*. 2003;26(7):2181-2188.
28. Ferroni P, Basili S, Falco A, Davi G. Platelet activation in type 2 diabetes mellitus. *J Thromb Haemost*. 2004;2(8):1282-1291.

29. Creager MA, Luscher TF, Cosentino F, Beckman JA. Diabetes and vascular disease: pathophysiology, clinical consequences, and medical therapy: Part I. *Circulation*. 2003;108(12):1527-1532.
30. Luscher TF, Creager MA, Beckman JA, Cosentino F. Diabetes and vascular disease: pathophysiology, clinical consequences, and medical therapy: Part II. *Circulation*. 2003;108(13):1655-1661.
31. Patrono C. Aspirin resistance: definition, mechanisms and clinical read-outs. *J Thromb Haemost*. 2003;1(8):1710-1713.
32. Motz W. [Optimal dosage of acetylsalicylic acid in therapy of coronary heart disease]. *Internist (Berl)*. 1994;35(12):1165-1170.
33. Schrör K. Antithrombotische Pharmaka. In: Verlag DS, ed. *Antithrombotische Pharmaka*. Frechen: Dr. Schrör Verlag; 2002:6.
34. Collaborative meta-analysis of randomised trials of antiplatelet therapy for prevention of death, myocardial infarction, and stroke in high risk patients. *Bmj*. 2002;324(7329):71-86.
35. Gum PA, Kottke-Marchant K, Poggio ED, Gurm H, Welsh PA, Brooks L, Sapp SK, Topol EJ. Profile and prevalence of aspirin resistance in patients with cardiovascular disease. *Am J Cardiol*. 2001;88(3):230-235.
36. Wong S, Appleberg M, Ward CM, Lewis DR. Aspirin resistance in cardiovascular disease: a review. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2004;27(5):456-465.
37. Cotter G, Shemesh E, Zehavi M, Dinur I, Rudnick A, Milo O, Vered Z, Krakover R, Kaluski E, Kornberg A. Lack of aspirin effect: aspirin resistance or resistance to taking aspirin? *American heart journal*. 2004;147(2):293-300.
38. Macchi L, Christiaens L, Brabant S, Sorel N, Ragot S, Allal J, Mauco G, Brizard A. Resistance in vitro to low-dose aspirin is associated with platelet PIA1 (GP IIIa) polymorphism but not with C807T(GP Ia/IIa) and C-5T Kozak (GP Ibalpha) polymorphisms. *J Am Coll Cardiol*. 2003;42(6):1115-1119.
39. Jefferson BK, Foster JH, McCarthy JJ, Ginsburg G, Parker A, Kottke-Marchant K, Topol EJ. Aspirin resistance and a single gene. *Am J Cardiol*. 2005;95(6):805-808.
40. Macchi L, Christiaens L, Brabant S, Sorel N, Allal J, Mauco G, Brizard A. Resistance to aspirin in vitro is associated with increased platelet sensitivity to adenosine diphosphate. *Thromb Res*. 2002;107(1-2):45-49.

41. Mammen EF, Comp PC, Gosselin R, Greenberg C, Hoots WK, Kessler CM, Larkin EC, Liles D, Nugent DJ. PFA-100 system: a new method for assessment of platelet dysfunction. *Semin Thromb Hemost.* 1998;24(2):195-202.
42. Grottemeyer KH, Scharafinski HW, Husstedt IW. Two-year follow-up of aspirin responder and aspirin non responder. A pilot-study including 180 post-stroke patients. *Thromb Res.* 1993;71(5):397-403.
43. Gum PA, Kottke-Marchant K, Welsh PA, White J, Topol EJ. A prospective, blinded determination of the natural history of aspirin resistance among stable patients with cardiovascular disease. *J Am Coll Cardiol.* 2003;41(6):961-965.
44. Yusuf S, Sleight P, Pogue J, Bosch J, Davies R, Dagenais G. Effects of an angiotensin-converting-enzyme inhibitor, ramipril, on cardiovascular events in high-risk patients. The Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators. *The New England journal of medicine.* 2000;342(3):145-153.
45. Eikelboom JW, Hirsh J, Weitz JI, Johnston M, Yi Q, Yusuf S. Aspirin-resistant thromboxane biosynthesis and the risk of myocardial infarction, stroke, or cardiovascular death in patients at high risk for cardiovascular events. *Circulation.* 2002;105(14):1650-1655.
46. Chen WH, Lee PY, Ng W, Tse HF, Lau CP. Aspirin resistance is associated with a high incidence of myonecrosis after non-urgent percutaneous coronary intervention despite clopidogrel pretreatment. *J Am Coll Cardiol.* 2004;43(6):1122-1126.
47. Steinhubl SR, Kereiakes DJ. Ultrarapid platelet function analyzer. In: Michelson AD, ed. *Platelets.* New York: Academic Press / Elsevier Science; 2002:317-324.
48. Marcucci R, Panizza R, Antonucci E, Gori AM, Fedi S, Giglioli C, Valente S, Prisco D, Abbate R, Gensini GF. Usefulness of aspirin resistance after percutaneous coronary intervention for acute myocardial infarction in predicting one-year major adverse coronary events. *Am J Cardiol.* 2006;98(9):1156-1159.
49. Leon MB, Baim DS, Popma JJ, Gordon PC, Cutlip DE, Ho KK, Giambartolomei A, Diver DJ, Lasorda DM, Williams DO, Pocock SJ, Kuntz RE. A clinical trial comparing three antithrombotic-drug regimens after coronary-artery stenting. Stent Anticoagulation Restenosis Study Investigators. *The New England journal of medicine.* 1998;339(23):1665-1671.
50. Schomig A, Neumann FJ, Kastrati A, Schuhlen H, Blasini R, Hadamitzky M, Walter H, Zitzmann-Roth EM, Richardt G, Alt E, Schmitt C, Ulm K. A randomized

- comparison of antiplatelet and anticoagulant therapy after the placement of coronary-artery stents. *The New England journal of medicine*. 1996;334(17):1084-1089.
51. Urban P, Macaya C, Rupprecht HJ, Kiemeneij F, Emanuelsson H, Fontanelli A, Pieper M, Wesseling T, Sagnard L. Randomized evaluation of anticoagulation versus antiplatelet therapy after coronary stent implantation in high-risk patients: the multicenter aspirin and ticlopidine trial after intracoronary stenting (MATTIS). *Circulation*. 1998;98(20):2126-2132.
  52. Bertrand ME, Legrand V, Boland J, Fleck E, Bonnier J, Emmanuelson H, Vrolix M, Missault L, Chierchia S, Casaccia M, Niccoli L, Oto A, White C, Webb-Peploe M, Van Belle E, McFadden EP. Randomized multicenter comparison of conventional anticoagulation versus antiplatelet therapy in unplanned and elective coronary stenting. The full anticoagulation versus aspirin and ticlopidine (fantastic) study. *Circulation*. 1998;98(16):1597-1603.
  53. Plosker GL, Lyseng-Williamson KA. Clopidogrel: a review of its use in the prevention of thrombosis. *Drugs*. 2007;67(4):613-646.
  54. Bennett CL, Connors JM, Carwile JM, Moake JL, Bell WR, Tarantolo SR, McCarthy LJ, Sarode R, Hatfield AJ, Feldman MD, Davidson CJ, Tsai HM. Thrombotic thrombocytopenic purpura associated with clopidogrel. *The New England journal of medicine*. 2000;342(24):1773-1777.
  55. Hankey GJ. Clopidogrel and thrombotic thrombocytopenic purpura. *Lancet*. 2000;356(9226):269-270.
  56. Gurbel PA, Bliden KP, Samara W, Yoho JA, Hayes K, Fissaha MZ, Tantry US. Clopidogrel effect on platelet reactivity in patients with stent thrombosis: results of the CREST Study. *J Am Coll Cardiol*. 2005;46(10):1827-1832.
  57. Reist M, Roy-de Vos M, Montseny JP, Mayer JM, Carrupt PA, Berger Y, Testa B. Very slow chiral inversion of clopidogrel in rats: a pharmacokinetic and mechanistic investigation. *Drug Metab Dispos*. 2000;28(12):1405-1410.
  58. Lau WC, Gurbel PA. Antiplatelet drug resistance and drug-drug interactions: Role of cytochrome P450 3A4. *Pharm Res*. 2006;23(12):2691-2708.
  59. Fontana P, Dupont A, Gandrille S, Bachelot-Loza C, Reny JL, Aiach M, Gaussem P. Adenosine diphosphate-induced platelet aggregation is associated with P2Y12 gene sequence variations in healthy subjects. *Circulation*. 2003;108(8):989-995.

60. Lau WC, Gurbel PA, Watkins PB, Neer CJ, Hopp AS, Carville DG, Guyer KE, Tait AR, Bates ER. Contribution of hepatic cytochrome P450 3A4 metabolic activity to the phenomenon of clopidogrel resistance. *Circulation*. 2004;109(2):166-171.
61. Wang TH, Bhatt DL, Topol EJ. Aspirin and clopidogrel resistance: an emerging clinical entity. *Eur Heart J*. 2006;27(6):647-654.
62. von Beckerath N, Pogatsa-Murray G, Wieczorek A, Sibbing D, Schomig A, Kastrati A. Correlation of a new point-of-care test with conventional optical aggregometry for the assessment of clopidogrel responsiveness. *Thromb Haemost*. 2006;95(5):910-911.
63. Aleil B, Ravanat C, Cazenave JP, Rochoux G, Heitz A, Gachet C. Flow cytometric analysis of intraplatelet VASP phosphorylation for the detection of clopidogrel resistance in patients with ischemic cardiovascular diseases. *J Thromb Haemost*. 2005;3(1):85-92.
64. Matetzky S, Shenkman B, Guetta V, Shechter M, Bienart R, Goldenberg I, Novikov I, Pres H, Savion N, Varon D, Hod H. Clopidogrel resistance is associated with increased risk of recurrent atherothrombotic events in patients with acute myocardial infarction. *Circulation*. 2004;109(25):3171-3175.
65. Cuisset T, Frere C, Quilici J, Barbou F, Morange PE, Hovasse T, Bonnet JL, Alessi MC. High post-treatment platelet reactivity identified low-responders to dual antiplatelet therapy at increased risk of recurrent cardiovascular events after stenting for acute coronary syndrome. *J Thromb Haemost*. 2006;4(3):542-549.
66. Barragan P, Bouvier JL, Roquebert PO, Macaluso G, Commeau P, Comet B, Lafont A, Camoin L, Walter U, Eigenthaler M. Resistance to thienopyridines: clinical detection of coronary stent thrombosis by monitoring of vasodilator-stimulated phosphoprotein phosphorylation. *Catheter Cardiovasc Interv*. 2003;59(3):295-302.
67. Geisler T, Langer H, Wydymus M, Gohring K, Zurn C, Bigalke B, Stellos K, May AE, Gawaz M. Low response to clopidogrel is associated with cardiovascular outcome after coronary stent implantation. *Eur Heart J*. 2006;27(20):2420-2425.
68. Coller BS, Anderson K, Weisman HF. New antiplatelet agents: platelet GPIIb/IIIa antagonists. *Thromb Haemost*. 1995;74(1):302-308.
69. Kleiman NS, Lincoff AM, Ohman EM, Harrington RA. Glycoprotein IIb/IIIa inhibitors in acute coronary syndromes: pathophysiologic foundation and clinical findings. *American heart journal*. 1998;136(4 Pt 2 Su):S32-42.
70. Kleiman NS. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of glycoprotein IIb-IIIa inhibitors. *American heart journal*. 1999;138(4 Pt 2):263-275.

71. Tcheng JE. Clinical challenges of platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor inhibitor therapy: bleeding, reversal, thrombocytopenia, and retreatment. *American heart journal*. 2000;139(2 Pt 2):S38-45.
72. Jubelirer SJ, Koenig BA, Bates MC. Acute profound thrombocytopenia following C7E3 Fab (Abciximab) therapy: case reports, review of the literature and implications for therapy. *Am J Hematol*. 1999;61(3):205-208.
73. Homoncik M, Jilma B, Hergovich N, Stohlawetz P, Panzer S, Speiser W. Monitoring of aspirin (ASA) pharmacodynamics with the platelet function analyzer PFA-100. *Thromb Haemost*. 2000;83(2):316-321.
74. Fressinaud E, Veyradier A, Truchaud F, Martin I, Boyer-Neumann C, Trossaert M, Meyer D. Screening for von Willebrand disease with a new analyzer using high shear stress: a study of 60 cases. *Blood*. 1998;91(4):1325-1331.
75. Born GV. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature*. 1962;194:927-929.
76. Haubelt H, Simon M, Anders C, Hellstern P. [Platelet function tests for monitoring of acetylsalicylic acid: clinical significance in antiplatelet treatment]. *Hamostaseologie*. 2004;24(3):196-202.
77. Leytin V, Shapiro H, Novikov I, Radnay J. Flow cytometric analysis of the platelet surface area and surface density of glycoprotein IIb-IIIa of unactivated human platelets of various sizes. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996;226(1):94-100.
78. Michelson AD. Flow cytometry: a clinical test of platelet function. *Blood*. 1996;87(12):4925-4936.
79. Shattil SJ, Cunningham M, Hoxie JA. Detection of activated platelets in whole blood using activation-dependent monoclonal antibodies and flow cytometry. *Blood*. 1987;70(1):307-315.
80. Bone RC, Grodzin CJ, Balk RA. Sepsis: a new hypothesis for pathogenesis of the disease process. *Chest*. 1997;112(1):235-243.
81. Baue AE, Durham R, Faist E. Systemic inflammatory response syndrome (SIRS), multiple organ dysfunction syndrome (MODS), multiple organ failure (MOF): are we winning the battle? *Shock*. 1998;10(2):79-89.
82. Sablotzki A, Muhling J, Czeslick E. [Sepsis and multiple organ failure - update of current therapeutic concepts]. *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther*. 2005;40(9):511-520.

83. Osterud B, Bjorklid E. The tissue factor pathway in disseminated intravascular coagulation. *Semin Thromb Hemost.* 2001;27(6):605-617.
84. Vanschoonbeek K, Feijge MA, Van Kampen RJ, Kenis H, Hemker HC, Giesen PL, Heemskerk JW. Initiating and potentiating role of platelets in tissue factor-induced thrombin generation in the presence of plasma: subject-dependent variation in thrombogram characteristics. *J Thromb Haemost.* 2004;2(3):476-484.
85. Knaus WA, Draper EA, Wagner DP, Zimmerman JE. APACHE II: a severity of disease classification system. *Crit Care Med.* 1985;13(10):818-829.
86. Elebute EA, Stoner HB. The grading of sepsis. *Br J Surg.* 1983;70(1):29-31.
87. Grundmann R, Kipping N, Wesoly C. Der Sepsisscore von Elebute und Stoner zur Definition der postoperativen Sepsis auf der Intensivstation. *Intensivmedizin.* 1988;25:268-273.
88. Pilz G, Gurniak T, Bujdoso O, Werdan K. A basic program for calculation of APACHE II and Elebute scores and sepsis evaluation in intensive care medicine. *Comput Biol Med.* 1991;21(3):143-159.
89. Weis M, von Scheidt W. Cardiac allograft vasculopathy: a review. *Circulation.* 1997;96(6):2069-2077.
90. Billingham ME. Histopathology of graft coronary disease. *J Heart Lung Transplant.* 1992;11(3 Pt 2):S38-44.
91. Ramzy D, Rao V, Brahm J, Miriuka S, Delgado D, Ross HJ. Cardiac allograft vasculopathy: a review. *Can J Surg.* 2005;48(4):319-327.
92. Kass M, Haddad H. Cardiac allograft vasculopathy: pathology, prevention and treatment. *Curr Opin Cardiol.* 2006;21(2):132-137.
93. Valantine H. Cardiac allograft vasculopathy after heart transplantation: risk factors and management. *J Heart Lung Transplant.* 2004;23(5 Suppl):S187-193.
94. Benza RL, Tallaj J. Cardiac allograft vasculopathy (chronic rejection). In: Kirklin JK, McFiffin DC, eds. *Heart Transplantation.* Philadelphia: Churchill Livingstone; 2004:615-665.
95. Tuzcu EM, De Franco AC, Hobbs R, Rincon G, Bott-Silverman C, McCarthy P, Stewart R, Nissen SE. Prevalence and distribution of transplant coronary artery disease: insights from intravascular ultrasound imaging. *J Heart Lung Transplant.* 1995;14(6 Pt 2):S202-207.
96. Ruggeri ZM. New insights into the mechanisms of platelet adhesion and aggregation. *Semin Hematol.* 1994;31(3):229-239.

97. de Lorgeril M, Dureau G, Boissonnat P, Ovize M, Monnez C, Monjaud I, Salen P, Renaud S. Increased platelet aggregation after heart transplantation: influence of aspirin. *J Heart Lung Transplant.* 1991;10(4):600-603.
98. Schartl M, Bocksch W, Fateh-Moghadam S. Effects of lipid-lowering therapy on coronary artery remodeling. *Coron Artery Dis.* 2004;15(1):45-51.
99. Muhlestein JB, Horne BD, Carlquist JF, Madsen TE, Bair TL, Pearson RR, Anderson JL. Cytomegalovirus seropositivity and C-reactive protein have independent and combined predictive value for mortality in patients with angiographically demonstrated coronary artery disease. *Circulation.* 2000;102(16):1917-1923.
100. Danesh J, Collins R, Peto R. Chronic infections and coronary heart disease: is there a link? *Lancet.* 1997;350(9075):430-436.
101. Grattan MT, Moreno-Cabral CE, Starnes VA, Oyer PE, Stinson EB, Shumway NE. Cytomegalovirus infection is associated with cardiac allograft rejection and atherosclerosis. *Jama.* 1989;261(24):3561-3566.
102. Hosenpud JD. Coronary artery disease after heart transplantation and its relation to cytomegalovirus. *American heart journal.* 1999;138(5 Pt 2):S469-472.
103. Muir KW, Weir CJ, Murray GD, Povey C, Lees KR. Comparison of neurological scales and scoring systems for acute stroke prognosis. *Stroke.* 1996;27(10):1817-1820.
104. Brott T, Adams HP, Jr., Olinger CP, Marler JR, Barsan WG, Biller J, Spilker J, Holleran R, Eberle R, Hertzberg V, et al. Measurements of acute cerebral infarction: a clinical examination scale. *Stroke.* 1989;20(7):864-870.
105. Diener HC, Bogousslavsky J, Brass LM, Cimminiello C, Csiba L, Kaste M, Leys D, Matias-Guiu J, Rupprecht HJ. Aspirin and clopidogrel compared with clopidogrel alone after recent ischaemic stroke or transient ischaemic attack in high-risk patients (MATCH): randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet.* 2004;364(9431):331-337.
106. Bhatt DL, Fox KA, Hacke W, Berger PB, Black HR, Boden WE, Cacoub P, Cohen EA, Creager MA, Easton JD, Flather MD, Haffner SM, Hamm CW, Hankey GJ, Johnston SC, Mak KH, Mas JL, Montalescot G, Pearson TA, Steg PG, Steinhubl SR, Weber MA, Brennan DM, Fabry-Ribaudo L, Booth J, Topol EJ. Clopidogrel and aspirin versus aspirin alone for the prevention of atherothrombotic events. *The New England journal of medicine.* 2006;354(16):1706-1717.

107. Serebruany VL, Malinin AI, Ziai W, Pokov AN, Bhatt DL, Alberts MJ, Hanley DF. Effects of clopidogrel and aspirin in combination versus aspirin alone on platelet activation and major receptor expression in patients after recent ischemic stroke: for the Plavix Use for Treatment of Stroke (PLUTO-Stroke) trial. *Stroke*. 2005;36(10):2289-2292.
108. Angiolillo DJ, Fernandez-Ortiz A, Bernardo E, Ramirez C, Sabate M, Jimenez-Quevedo P, Hernandez R, Moreno R, Escaned J, Alfonso F, Banuelos C, Costa MA, Bass TA, Macaya C. Platelet function profiles in patients with type 2 diabetes and coronary artery disease on combined aspirin and clopidogrel treatment. *Diabetes*. 2005;54(8):2430-2435.
109. Massberg S, Brand K, Gruner S, Page S, Muller E, Muller I, Bergmeier W, Richter T, Lorenz M, Konrad I, Nieswandt B, Gawaz M. A critical role of platelet adhesion in the initiation of atherosclerotic lesion formation. *J Exp Med*. 2002;196(7):887-896.
110. Ranke C, Hecker H, Creutzig A, Alexander K. Dose-dependent effect of aspirin on carotid atherosclerosis. *Circulation*. 1993;87(6):1873-1879.
111. Kodama M, Yamasaki Y, Sakamoto K, Yoshioka R, Matsuhisa M, Kajimoto Y, Kosugi K, Ueda N, Hori M. Antiplatelet drugs attenuate progression of carotid intima-media thickness in subjects with type 2 diabetes. *Thromb Res*. 2000;97(4):239-245.
112. Sacco M, Pellegrini F, Roncaglioni MC, Avanzini F, Tognoni G, Nicolucci A. Primary prevention of cardiovascular events with low-dose aspirin and vitamin E in type 2 diabetic patients: results of the Primary Prevention Project (PPP) trial. *Diabetes care*. 2003;26(12):3264-3272.
113. Colwell JA. Aspirin therapy in diabetes. *Diabetes care*. 2004;27 Suppl 1:S72-73.

## **9. Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. med. Rainer Dietz für seine wohlwollende und großzügige Unterstützung sowohl meiner wissenschaftlichen als auch klinischen Tätigkeit.

Herrn Professor Dr. med. Meinrad Gawaz, Tübingen, der mich für das faszinierende Gebiet der Thrombozytenphysiologie begeisterte, bin ich zu großem Dank verpflichtet. Durch die enge jahrelange wissenschaftliche Zusammenarbeit und fruchtvollen Diskussionen der Ergebnisse entstand ein großer Teil der vorliegenden Arbeit.

Herrn PD. Dr. med. Wolfgang Bocksch, der an vielen Fragestellungen im Laufe der Zeit maßgeblich und unersetzbaren Anteil hatte, möchte ich an dieser Stelle auch ganz besonders danken für die stetige hilfreiche Unterstützung und Zusammenarbeit sowohl in wissenschaftlicher als auch klinischer Hinsicht.

Herrn PD Dr. med. Bernd Tomandl, Bremen-Mitte und Herrn Dr. med. Patrik Htun, möchte ich herzlich danken für die fruchtbare wissenschaftliche Zusammenarbeit auf dem Gebiet des Schlaganfalls und der Unterstützung bei der vorliegenden Arbeit.

Bedanken möchte ich mich bei Frau PD Dr. Ursula Plöckinger und ihren Mitarbeitern, insbesondere Herrn Dr. med. Thomas Reuter aus der Stoffwechselambulanz für die fruchtbare klinische und wissenschaftliche Zusammenarbeit auf dem Gebiet der Thrombozytenfunktion bei Diabetikern.

Mein Dank gilt allen Kollegen und Doktoranden der Klinik, die mich während meiner klinischen und wissenschaftlichen Tätigkeit unterstützt haben.

Danken möchte ich auch meiner Familie und Freunden für die mentale Unterstützung bei der Fertigstellung der Arbeit.

## **10.Eidesstattliche Versicherung**

gemäß Habilitationsordnung der Charité

Hiermit erkläre ich, daß keine staatsanwaltschaftlichen Ermittlungsverfahren gegen mich anhängig sind, weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde, die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfaßt, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen wurden, sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlerinnen oder Wissenschaftlern und technischen Hilfskräften und die Literatur vollständig angegeben sind und mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

Berlin , den 30.05.2007

Dr. med. Suzanne Fateh-Moghadam

