

4 ERGEBNISSE

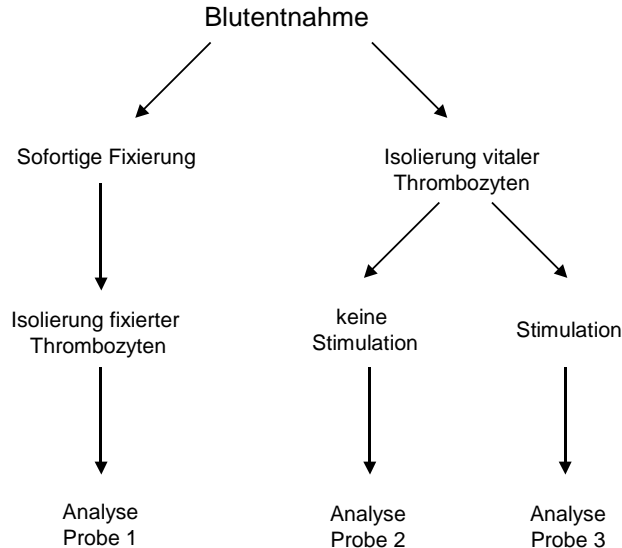
4.1 Etablierung der Thrombozytenstimulation

Das Protokoll zur In-vitro-Thrombozytenstimulation, das für diese Arbeit etabliert wurde, orientierte sich an Methoden, die zum Nachweis eines Clopidogreleffektes auf die Thrombozyten in der Literatur vorhanden sind.[88]

Die Stimulation sollte zu genau definierten Bedingungen stattfinden. Störende Einflüsse durch Blutbestandteile oder eine artifizielle Aktivierung während der Thrombozytenpräparation waren zu vermeiden. Um zu kontrollieren, inwiefern die Präparation der Thrombozyten zu einer Aktivierung führte, wurde während der Etablierungsphase bei jedem Experiment eine Probe Vollblut sofort mit Paraformaldehyd (0,5%) fixiert und nach einem bereits etablierten Protokoll die Thrombozyten durchflusszytometrisch analysiert (Probe 1).[89;90] Die Probe 2 wurde bis auf die Stimulation gleich behandelt wie die letzte Probe 3, die zunächst nur mit geringen ADP-Konzentrationen stimuliert wurde (Abb. 9).

Abb. 9: Etablierung der Methode.

Die Vollblutprobe (Probe 1) wurde zusätzlich analysiert um eine mögliche artifizielle Stimulierung während der Isolation der vitalen Thrombozyten auszuschließen.



Um optimale Bedingungen zu etablieren, wurden auf diese Weise verschiedene Citrat-Konzentrationen, Zentrifugationsgeschwindigkeiten und Calcium-Konzentrationen ausprobiert. Die Konzentration des Citrates wurde zwischen einer schonenden Isolation der Thrombozyten und genügend freien Calcium-Ionen während der Stimulation abgewogen.

Die Zentrifugationsdauer und -geschwindigkeiten sollten eine hohe Thrombozytenausbeute

erbringen, aber gleichzeitig eine schonende Isolation der Plättchen ermöglichen. In weiteren Experimenten stellte sich heraus, dass die Aufbereitung der Thrombozyten in einem Puffer frei von Calcium eine artifizielle Aktivierung während der Präparation weitestgehend verhindert. So wurde letztendlich das Calcium als auch Magnesium erst kurz vor der Stimulation hinzugefügt.

Tab. 4: Vergleich von sofort fixierten und unstimulierten Thrombozyten

Marker	Vollblut (Probe 1)	Unstimuliert (Probe 2)	p (n=8)
P-Selectin (AU)	6,73 ± 2,75	7,87 ± 2,32	0,19
Thrombospondin (AU)	7,52 ± 2,43	8,13 ± 2,63	0,63

Nach Fertigstellung des Protokolls (siehe Kapitel 3.2.5) wurden diese Immunfluoreszenzen gemessen (Tab. 4). Sie zeigten, dass durch die Isolation der vitalen Plättchen (Probe 2) keine Steigerung des Aktivierungslevels gegenüber physiologischen Bedingungen im Blut (Probe 1) auftraten. Dementsprechend wurden in der Studie die unstimulierten Proben (Probe 2) als Aktivierungswert im Blut der Probanden mitgeführt.

Tab. 5: Dosisfindungsstudie

Konzentration	P-Selectin (AU)	TSP (AU)
<i>Unstimuliert</i>	8,75 ± 1,68	8,94 ± 0,83
<i>ADP</i>		
5 µM	17,14 ± 4,68	17,80 ± 5,04
10 µM	20,48 ± 6,25	19,10 ± 1,91
20 µM	23,21 ± 4,22	21,71 ± 5,98
<i>TRAP</i>		
1 µM	9,92 ± 4,37	9,86 ± 6,36
4 µM	14,08 ± 4,60	12,42 ± 2,87
10 µM	41,25 ± 11,03	30,04 ± 8,50

In einer Dosisfindungsstudie wurde mit verschiedenen Konzentrationen der stimulierenden Reagenzien und anhand der Expression von P-Selectin und Thrombospondin das Ausmaß der Aktivierbarkeit (siehe Kapitel 3.2.2) ausgetestet (Tab. 5). Auf Grund dieser Daten wurde entschieden, die Stimulation mit 20 µM ADP und 10 µM TRAP durchzuführen, da hier die

stärkste Veränderung der Expression zu beobachten war. Dies geschah unter Abwägung der zu erwartenden Reduktion der Oberflächenmarker unter der Therapie mit Clopidogrel und der Größe der Studienpopulation.

4.2 Die Studienpopulation

Die Gruppen der Probanden zeigten abgesehen von der Studienmedikation keine Unterschiede hinsichtlich Alter, Geschlecht, kardiovaskulärer Risikofaktoren und Tabletteneinnahme. (Tab.6)

Tab.6 Klinischen Charakteristika der Studienpopulation

	Gruppe A (n=17)	Gruppe B (n=17)	Gruppe C (n=15)
Alter (Jahre)	25,9 ± 2,6	26,1 ± 2,5	61,9 ± 9,1
Geschlecht (m/w)	17/0	17/0	13/2
<i>KHK Risikofaktoren (n)</i>			
Arterielle Hypertonie	0	0	15
Hypercholesterolämie	0	0	13
Diabetes mellitus	0	0	3
Nikotin Abusus	4	6	9
Positive Familienanamnese	7	7	7
<i>Zusätzliche Medikation (n)</i>			
Aspirin	0	0	15
Beta-Blocker	0	0	15
ACE-Inhibitor	0	0	13
Atorvastatin	0	17	15
Nitrate	0	0	4
Diuretika	0	0	5

Die Patienten mit stabiler KHK wiesen ein typisches Risikoprofil und eine entsprechende Medikation auf. Außerdem wurden die Patienten mit 10 mg (n = 4), 20 mg (n = 7) oder 40 mg (n = 4) Atorvastatin behandelt.

4.3 Die In-vitro-Thrombozytenstimulation

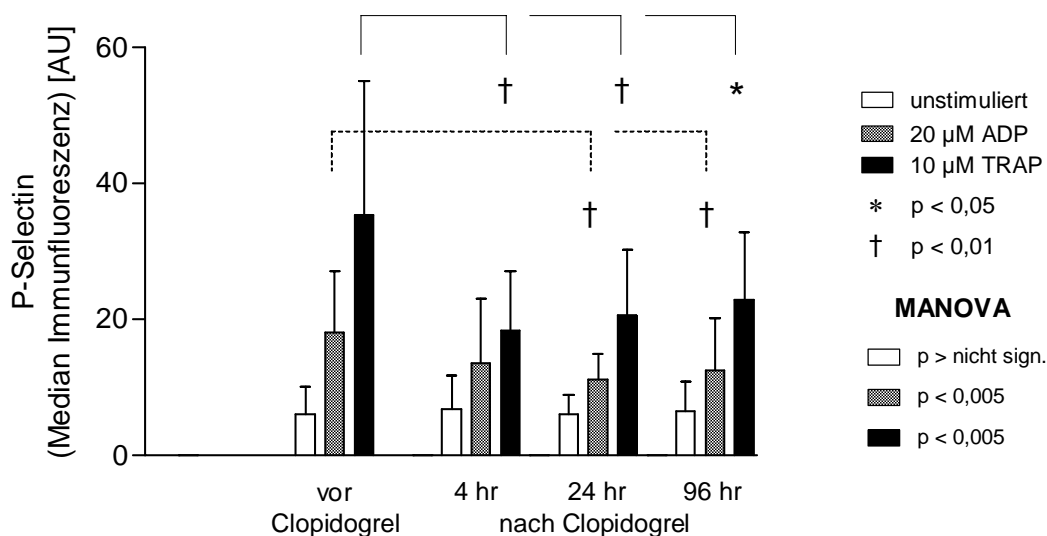
Die therapiebedingten Veränderungen der Thrombozytendegranulation nach In-vitro-Stimulation wurden anhand der durchflusszytometrisch bestimmten aktivierungsabhängigen Marker in jeder Gruppe dargestellt. Wie in Kapitel 3.2.3 ausgeführt, wurden Marker der α -Granula (P-Selectin und Thrombospondin) und dann der lysosomalen Granula (CD 63) vor und nach Stimulation untersucht. Die Dichte dieser Marker auf der Thrombozytenoberfläche wurde anhand der Mediane der gemessenen Immunfluoreszenzintensität dargestellt. Die Höhe der Immunfluoreszenz ist direkt proportional zur Dichte des markierten Oberflächenproteins (siehe Kapitel 3.2.5.4). Die Dichte wiederum ist proportional zum Ausmaß der Degranulation. Die Prozent-Werte hingegen geben nur an, wie viele Thrombozyten nach Stimulation diesen Marker auf der Oberfläche aufweisen. Da der Anteil der als positiv klassifizierten Thrombozyten nicht so sensitiv wie die Immunfluoreszenzen ist, wurden die Prozentwerte und die statistische Auswertung im Anhang in tabellarischer Form wiedergegeben.

4.3.1 Reduktion thrombozytärer P-Selectin (CD 62P) Dichte durch Clopidogrel

4.3.1.1 Probanden ohne Atorvastatin: Gruppe A

Die Dichte des P-Selectins auf der Oberfläche der unstimulierten Thrombozyten wurde durch Clopidogrel nicht reduziert.

Abb. 10: Probanden ohne Atorvastatin: P-Selectin-Dichte auf der Thrombozytenoberfläche vor und nach Stimulation



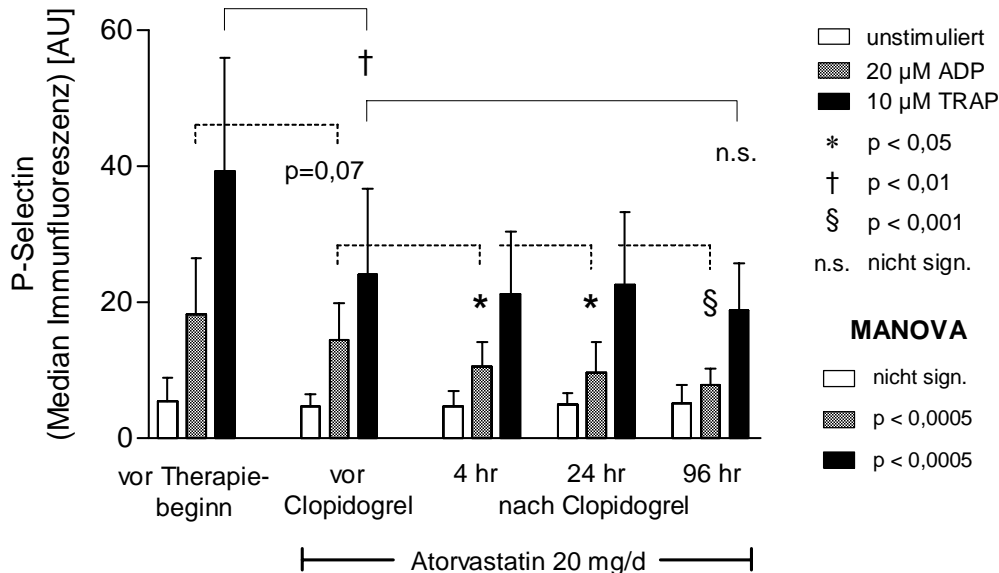
Die ADP-induzierte P-Selectin-Expression war 24 Stunden nach der Ersteinnahme des Clopidogrels gehemmt. Die Oberflächendichte von P-Selectin nach Stimulation mit TRAP war bereits 4 Stunden nach der Clopidogrel-Sättigungsdosis erniedrigt. Somit reduzierte der ADP-Rezeptor-Antagonist auch die Thrombozytendegranulation nach Stimulation mit TRAP (Abb.10).

Die Therapie mit Clopidogrel hemmte bei den Probanden ohne Atorvastatintherapie die Thrombozytenreaktivität nach 4 bzw. 24 Stunden. Diese Inhibition blieb bis zum Ende der Studie erhalten.

4.3.1.2 Probanden mit Atorvastatin-Vorbehandlung: Gruppe B

Die dreitägige Vorbehandlung mit Atorvastatin führte zu einer signifikant geringeren P-Selectin-Expression nach TRAP-Stimulation. Auch nach ADP-Stimulation nahm die P-Selectin-Dichte durch die Atorvastatingabe tendenziell ab (Abb. 11).

Abb. 11: Probanden mit Atorvastatin: P-Selectin-Dichte auf der Thrombozytenoberfläche vor und nach Stimulation



Die zusätzliche Gabe von Clopidogrel reduziert die ADP-induzierte P-Selectin-Dichte auf der Thrombozytenoberfläche bereits nach 4 Stunden. Unter der Erhaltungsdosis von Clopidogrel blieben bei gleichzeitiger Atorvastatingabe die Thrombozyten nach ADP Stimulation bis zum Beobachtungsende inhibiert. Die TRAP-induzierte P-Selectin Expression verringerte sich durch die zusätzliche Clopidogreltherapie nicht weiter.

Die Vorbehandlung mit Atorvastatin für drei Tage führte also zu einer Reduktion der Thrombozytenreaktivität. Die zusätzliche Clopidogrelgabe ergab eine weitergehende Hemmung der Thrombozyten nach ADP-Stimulation, nicht jedoch nach TRAP-Stimulation.

4.3.1.3 Vergleich der Mono- und der Kombinationstherapie

Bei dem Vergleich beider Probandengruppen vor Beginn der medikamentösen Therapie waren keine Unterschiede in der Expression des P-Selectins auf den Thrombozyten zu finden (Tab. 7).

Tab. 7: Vergleich der Immunfluoreszenzen in den Probandengruppen vor Therapie

Vor Therapiebeginn: Median der Immunfluoreszenz in AU			
P-Selectin	Gruppe A (ohne Atorvastatin)	Gruppe B (mit Atorvastatin)	p
0 μ M	6,1 \pm 4,3	5,5 \pm 3,4	0,67
20 μ M ADP	18,0 \pm 9,1	18,9 \pm 8,0	0,94
10 μ M TRAP	35,3 \pm 19,4	39,3 \pm 16,7	0,53

96 Stunden nach Beginn der Clopidogreltherapie zeigte sich in der zusätzlich mit Atorvastatin behandelten Gruppe B eine geringere ADP-induzierte Expression von P-Selectin auf den Thrombozyten als in der Gruppe mit der Clopidogrelmonotherapie. In der Gruppe B wiesen die Plättchen vor Stimulation ebenfalls eine tendenziell niedrigere P-Selectin-Dichte auf (Tab. 8).

Tab. 8: Vergleich der Immunfluoreszenzen in den Probandengruppen zum Therapieende

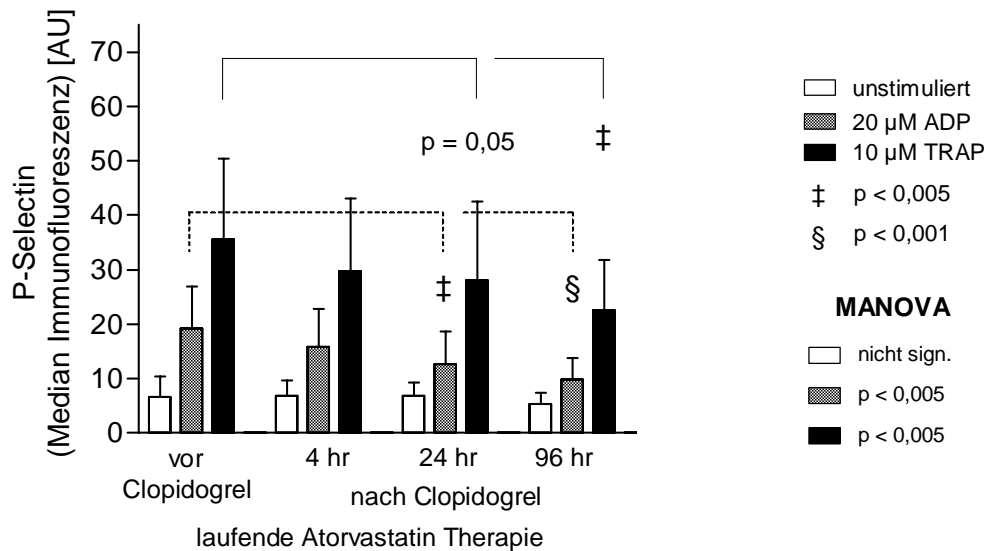
96 Stunden nach der Clopidogrelgabe: Median der Immunfluoreszenz in AU			
P-Selectin	Gruppe A (ohne Atorvastatin)	Gruppe B (mit Atorvastatin)	p
0 μ M	6,4 \pm 4,7	5,1 \pm 2,7	0,09
20 μ M ADP	12,4 \pm 8,1	7,8 \pm 2,4	0,03
10 μ M TRAP	22,8 \pm 8,5	18,8 \pm 6,9	0,18

Die Kombinationstherapie aus Atorvastatin und Clopidogrel bewirkte also eine stärkere Inhibition der ADP-induzierten Degranulation als die Therapie nur mit Clopidogrel.

4.3.1.4 KHK-Patienten mit Atorvastatintherapie: Gruppe C

Clopidogrel reduzierte bei den KHK-Patienten mit begleitender Atorvastatintherapie ebenfalls die Agonist-induzierte Thrombozytenreaktivität.

Abb. 12: KHK-Patienten: P-Selectin-Dichte auf der Thrombozytenoberfläche vor und nach Stimulation



Die ADP-induzierte Expression von P-Selectin auf der Thrombozytenoberfläche war 24 Stunden nach Beginn der Clopidogreltherapie reduziert. Eine Hemmung der TRAP-induzierten Degranulation war nach 96 Stunden messbar (Abb. 12).

Zusammenfassend ist hervorzuheben, dass sich trotz der begleitenden Atorvastatintherapie durch die Gabe von Clopidogrel ein Thrombozyten inhibierender Effekt nach ADP- und TRAP-Stimulation zeigte.

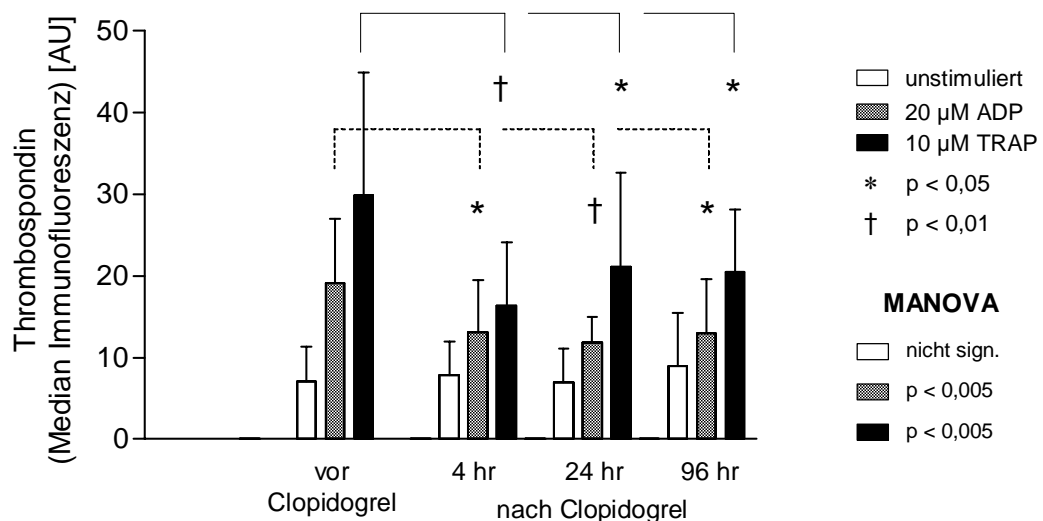
4.3.2 Reduktion thrombozytärer Thrombospondin (TSP) Dichte durch Clopidogrel

4.3.2.1 Probanden ohne Atorvastatin: Gruppe A

Thrombospondin gelangt ähnlich wie das P-Selectin durch Degranulation aus den α -Granula an die Thrombozytenoberfläche. Clopidogrel reduzierte die Agonist-induzierte Thrombospondin Expression bereits 4 Stunden nach Gabe der Sättigungsdosis. Diese Hemmung war bis zum Ende der Beobachtung nachweisbar.

Auf den unstimulierten Thrombozyten zeigte sich keine Veränderung der Thrombospondin-Dichte während der Clopidogreltherapie.

Abb. 13: Probanden ohne Atorvastatin: Thrombospondin-Dichte auf der Thrombozytenoberfläche vor und nach Stimulation

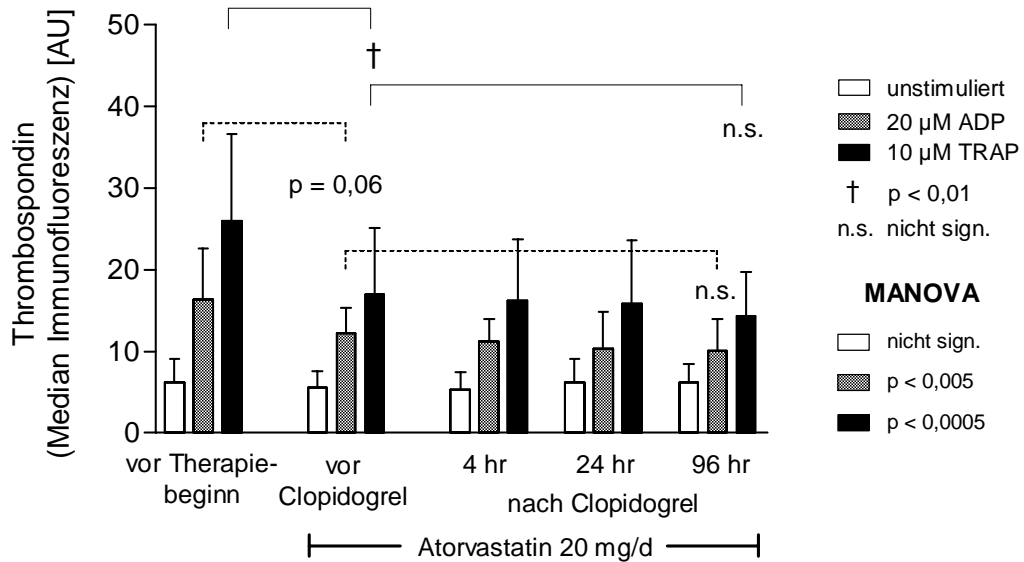


4.3.2.2 Probanden mit Atorvastatin-Vorbehandlung: Gruppe B

Atorvastatin reduzierte die TRAP-induzierte Thrombospondin Expression. Dies war auch tendenziell nach Stimulation mit ADP zu beobachten. Die zusätzliche Therapie mit Clopidogrel ergab jedoch keine weitere Hemmung der ADP- und TRAP-induzierten Thrombozytenaktivierbarkeit. Atorvastatin reduzierte also nicht nur die Expression von P-Selectin, sondern auch von Thrombospondin nach Stimulation mit den Thrombozytenagonisten (Abb. 14).

Weder Atorvastatin noch Clopidogrel veränderten die Dichte des Thrombospondins auf unstimulierten Thrombozyten.

Abb. 14: Probanden mit Atorvastatin: Thrombospondin-Dichte auf der Thrombozytenoberfläche vor und nach Stimulation



4.3.2.3 Vergleich der Mono- und der Kombinationstherapie

Vor Beginn der medikamentösen Therapie war kein Unterschied der Expression des Thrombospondins zwischen den beiden Probandengruppen auf den Thrombozyten festzustellen (Tab. 9).

Tab. 9: Vergleich der Immunfluoreszenzen in den Probandengruppen vor Therapie

Vor Therapiebeginn: Median der Immunfluoreszenz in AU			
Thrombospondin	Gruppe A (ohne Atorvastatin)	Gruppe B (mit Atorvastatin)	p
0 µM	7,0 ± 4,4	6,2 ± 2,9	0,54
20 µM ADP	19,1 ± 7,9	16,4 ± 6,2	0,27
10 µM TRAP	29,9 ± 15,0	26,0 ± 10,6	0,39

Nach Behandlung mit Atorvastatin und Clopidogrel war die TRAP-induzierte Expression von Thrombospondin deutlich niedriger als nach der alleinigen Clopidogreltherapie (Tab. 10). Nach Stimulation mit ADP zeigte sich in der Gruppe mit der Kombinationstherapie nur eine tendenziell geringere Thrombospondin-Dichte auf der Thrombozytenoberfläche (Tab. 10).

Tab. 10: Vergleich der Immunfluoreszenzen in den Probandengruppen zum Therapieende

96 Stunden nach der Clopidogrelerstgabe: Median der Immunfluoreszenz in AU			
Thrombospondin	Gruppe A (ohne Atorvastatin)	Gruppe B (mit Atorvastatin)	p
0 μM	8,9 \pm 6,5	6,2 \pm 2,2	0,11
20 μM ADP	13,0 \pm 6,6	10,1 \pm 3,8	0,14
10 μM TRAP	20,4 \pm 7,6	14,4 \pm 5,4	0,01

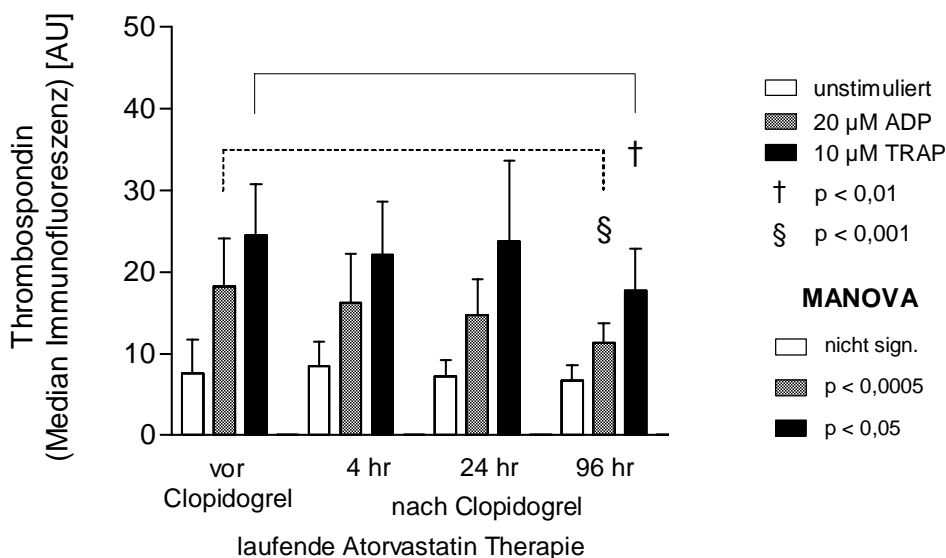
Die Kombinationstherapie aus Atorvastatin und Clopidogrel führte also zu einer stärkeren Inhibition der Degranulation als die Therapie mit Clopidogrel allein.

4.3.2.4 KHK-Patienten mit Atorvastatintherapie: Gruppe C

Clopidogrel reduzierte bei den KHK-Patienten mit begleitender Atorvastatintherapie die Agonist-induzierte Thrombospondinexpression.

Es zeigte sich, dass die ADP- und TRAP-induzierte Thrombospondinexpression erst 96 Stunden nach Beginn der Clopidogrelgabe reduziert war (Abb. 15).

Abb. 15: Gruppe C: KHK-Patienten: Thrombospondin-Dichte auf der Thrombozytenoberfläche vor und nach Stimulation



Damit war auch hier ein Plättchen hemmender Effekt des Clopidogrels trotz gleichzeitiger Einnahme von Atorvastatin zu beobachten.

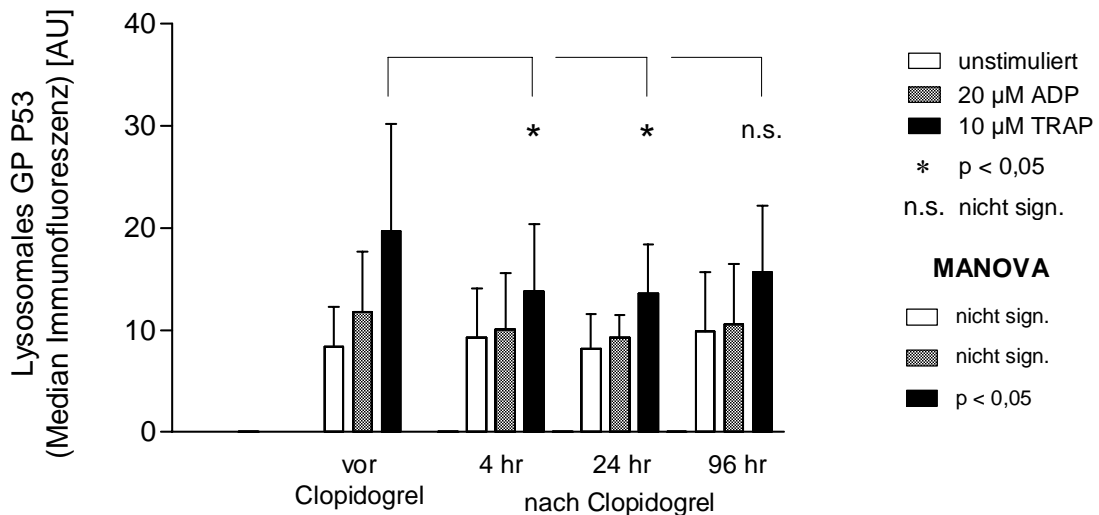
4.3.3 Veränderungen in der thrombozytären Expression von Lysosomalen GP 53

4.3.3.1 Probanden ohne Atorvastatin: Gruppe A

Das lysosomale GP 53 (CD 63) ist ein Oberflächenprotein, das nach Degranulation der lysosomalen Granula auf der Thrombozytenoberfläche nachweisbar ist. Die Freisetzung dieser Granula erfolgt erst nach sehr starker Stimulation. Daher ist eine Zunahme der CD 63-Dichte ein Ausdruck einer sehr starken thrombozytären Aktivierung.

Wie in Abbildung 16 zu erkennen ist, hat die Clopidogreltherapie keinen Einfluss auf die CD 63-Expression unstimulierter Thrombozyten. Auch nach Stimulation mit ADP ergaben sich im zeitlichen Verlauf keine signifikanten Veränderungen der CD 63-Expression.

Abb. 16: Probanden ohne Atorvastatin: Lysosomales GP 53 (CD63) auf der Thrombozytenoberfläche vor und nach Stimulation



Die TRAP-induzierte CD 63-Expression war 4 und 24 Stunden nach Beginn der Clopidogrelgabe reduziert (Abb. 16). Zum Beobachtungsende ist die Reduktion nicht mehr signifikant. Die Clopidogreltherapie reduzierte also bei den gesunden Probanden ohne Atorvastatin nur die TRAP-induzierte Expression von CD 63.

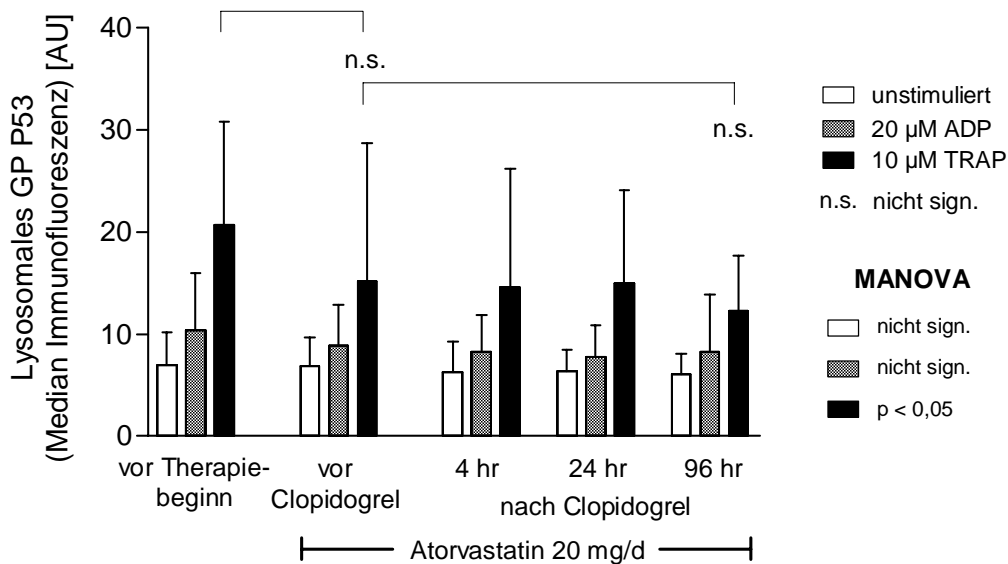
4.3.3.2 Probanden mit Atorvastatin-Vorbehandlung: Gruppe B

Weder die Vorbehandlung mit Atorvastatin noch die zusätzlich Clopidogreltherapie reduzierte die CD 63-Expression der unstimulierten und der ADP-stimulierten Thrombozyten.

Die statistische Analyse der CD 63-Immunfluoreszenz nach TRAP-Stimulation ergab eine Reduktion über den gesamten Zeitverlauf (MANOVA p < 0,05). Die paarweisen Vergleiche zeigten keine Reduktion der TRAP-induzierten CD 63-Expression vor und nach

Atorvastatingabe sowie vor und nach der zusätzlichen Clopidogrelgabe (Abb. 17). Die Signifikanz im MANOVA zeigt jedoch an, dass die Kombinationsgabe von Atorvastatin und Clopidogrel die TRAP-induzierte CD 63-Dichte auf der Thrombozytenoberfläche reduzierten.

Abb. 17: Probanden mit Atorvastatin: Lysosomales GP 53 (CD 63) auf der Thrombozytenoberfläche vor und nach Stimulation



4.3.3.3 Vergleich der Mono- und der Kombinationstherapie

Vor dem Beginn der medikamentösen Therapie unterschieden sich die Dichten des lysosomalen GP 53 (CD 63) auf den unstimulierten und den stimulierten Thrombozyten in den beiden Probandengruppen nicht (Tab. 11).

Tab. 11: Vergleich der Immunfluoreszenzen in den Probandengruppen vor Therapie

Vor Therapiebeginn: Median der Immunfluoreszenz in AU			
CD 63	Gruppe A (ohne Atorvastatin)	Gruppe B (mit Atorvastatin)	p
0 µM	8,3 ± 4,0	7,0 ± 3,2	0,28
20 µM ADP	11,8 ± 6,0	10,4 ± 5,6	0,51
10 µM TRAP	19,7 ± 10,4	20,7 ± 10,1	0,79

96 Stunden nach Beginn der Clopidogreltherapie zeigte sich in der mit Atorvastatin vorbehandelten Gruppe B vor Stimulation eine geringere Expression von CD 63 auf den

Thrombozyten. Zu diesem Zeitpunkt wiesen die ADP- und TRAP-induzierten CD 63-Dichten auf den Thrombozyten in beiden Gruppen keine Unterschiede auf (Tab. 12).

Tab. 12: Vergleich der Immunfluoreszenzen in den Probandengruppen zum Therapieende

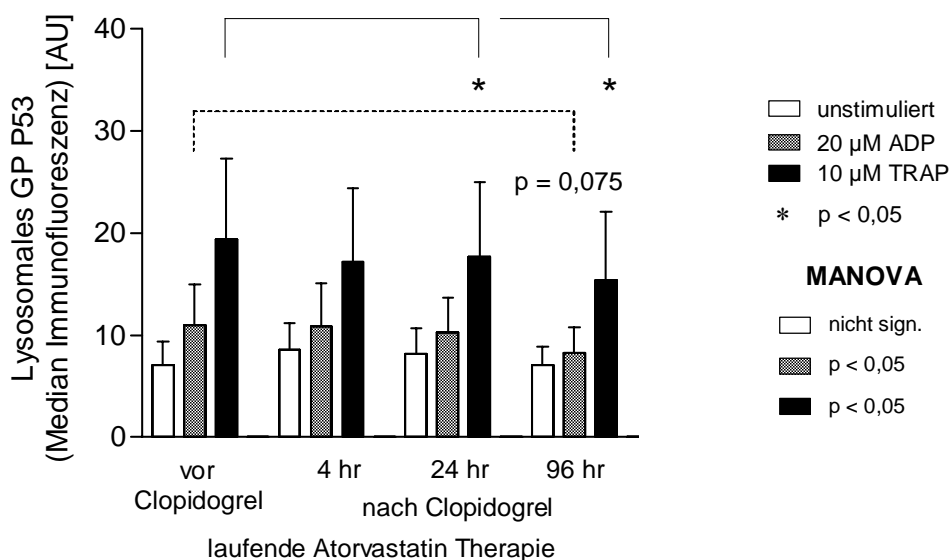
96 Stunden nach der Clopidogrelstgabe: Median der Immunfluoreszenz in AU			
CD 63	Gruppe A (ohne Atorvastatin)	Gruppe B (mit Atorvastatin)	p
0 μM	9,9 \pm 5,8	6,1 \pm 2,0	0,02
20 μM ADP	10,6 \pm 6,0	8,3 \pm 5,5	0,27
10 μM TRAP	15,7 \pm 6,5	12,3 \pm 5,3	0,11

Beim Vergleich der Gruppen zeigte sich kein stärkerer Hemmeffekt der Kombinationstherapie aus Atorvastatin und Clopidogrel. Der Vergleich deckte aber auch keine Unterschiede auf, die auf einen Wirkverlust des Clopidogrels durch die gleichzeitige Atorvastatintherapie hinweisen.

4.3.3.4 KHK-Patienten mit Atorvastatintherapie: Gruppe C

24 und 96 Stunden nach Beginn der Clopidogreltherapie war die TRAP-induzierte CD 63-Expression reduziert. Die ADP-induzierte CD 63-Dichte auf den Thrombozyten war tendenziell 96 Stunden nach Beginn des Clopidogreltherapie erniedrigt (Abb. 18).

Abb. 18: Gruppe C: KHK-Patienten: Lysosomales GP 53 (CD 63) auf der Thrombozytenoberfläche vor und nach Stimulation



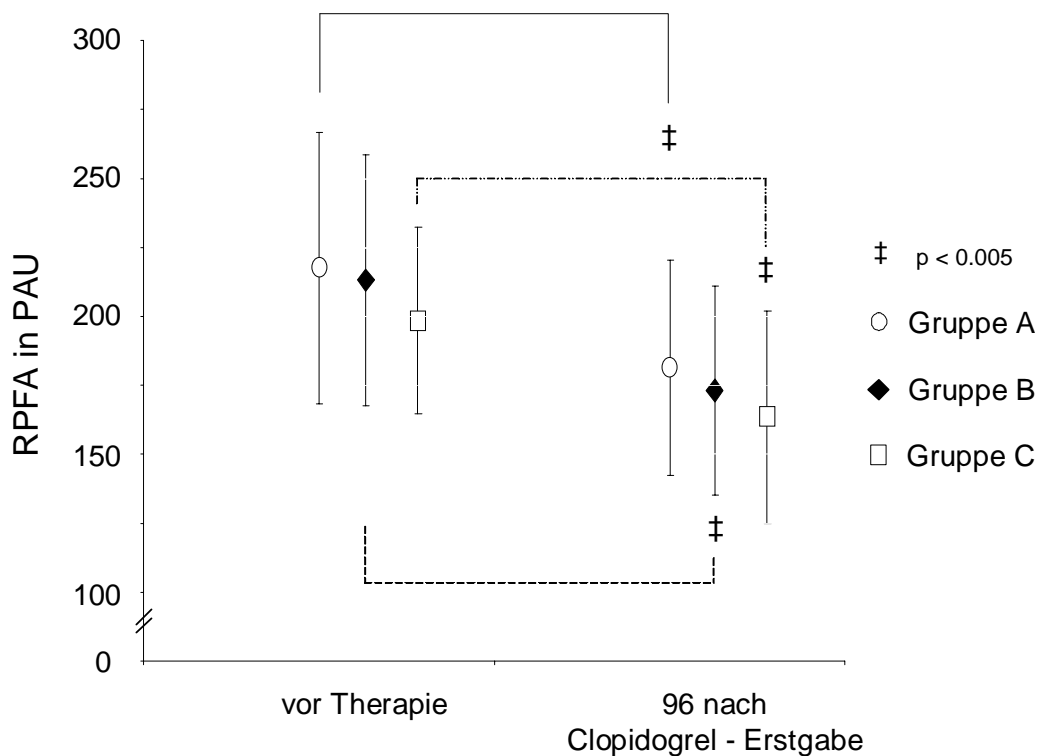
Clopidogrel reduzierte bei den KHK-Patienten mit Atorvastatintherapie die Dichte von CD 63 auf der Thrombozytenoberfläche sowohl nach TRAP und tendenziell auch nach ADP Stimulation.

4.4 Die Thrombozytenagglutination im Vollblut

Der RPFA™-Test prüft die Aggregationsfähigkeit der Thrombozyten in mit Citrat antikoaguliertem Vollblut. Nach Stimulation mit iso-TRAP agglutinieren die Thrombozyten an Fibrinogen-bedeckten Polystyren-Kügelchen. Mit diesem Test lässt sich die Effektivität einer antithrombozytären Therapie mit einem GP IIb/IIIa Antagonisten überwachen.

Da Clopidogrel die Aktivierung dieses Rezeptors auf den Thrombozyten blockiert, müsste eine Clopidogreltherapie mit diesem Assay messbar sein. Neben der Degranulation kann somit der antiaggregatorische Effekt von Clopidogrel untersucht werden.

Abb. 19: Probanden ohne Atorvastatin: Gruppe A; Probanden mit Atorvastatin: Gruppe B; KHK-Patienten mit Atorvastatin: Gruppe C: Vollblutagglutination im RPFA™



Clopidogrel reduzierte die Aggregationsfähigkeit der Thrombozyten sowohl in der Probandengruppe ohne Atorvastatin als auch in der Gruppe mit der Kombinationstherapie. Auch bei den KHK-Patienten nahm bei begleitender Atorvastatingabe die Aggregationsfähigkeit der

Thrombozyten unter Clopidogrel ab (Abb. 19).

Ein Vergleich der Daten aus dem Agglutinationsassay zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen der Clopidogrelmonotherapie und der Kombination aus Atorvastatin und Clopidogrel (Tab. 13).

Tab. 13: Vergleich der RPFA-Werte in den Probandengruppen vor und nach Therapie

RPFA [™] in PAU	Vor Therapie	Nach Clopidogreltherapie
Gruppe A (ohne Atorvastatin)	218 ± 49	181 ± 39
Gruppe B (mit Atorvastatin)	215 ± 46	174 ± 38
p (Gr.A vs Gr.B)	0,88	0,64

Clopidogrel reduzierte die Aggregationsfähigkeit der Thrombozyten sowohl bei den Probanden mit und ohne Atorvastatintherapie als auch bei den mit Atorvastatin behandelten KHK-Patienten. Damit sind auch hier keine Hinweise auf eine mögliche Interaktion zwischen dem Statin und dem Thrombozyteninhibitor erkennbar, die auf einen Wirkverlust von Clopidogrel hindeuten würden.