

Aus dem Universitären Herzzentrum Hamburg GmbH
Klinik und Poliklinik für Kardiologie/Angiologie
des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. med. T. Meinertz

**Clopidogrel verbessert die Endothel-Funktion und
die Bioverfügbarkeit von NO durch anti-oxidative und
anti-inflammatorische Effekte bei Patienten
mit koronarer Herzerkrankung**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg

Vorgelegt von
Manuela Karstens
aus Hamburg

Hamburg 2007

Meinen Eltern in Liebe und Dankbarkeit gewidmet

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Heitzer T, Rudolph V, Schwedthelm E, Karstens M, Sydow K, Ortak M, Tschentscher P, Meinertz T, Böger R, Baldus S (2006)

Clopidogrel improves systemic Endothelial Nitric Oxide bioavailability in Patients with coronary artery disease-Evidence for Antioxidant and Antiinflammatory Effects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 26:1648-1652

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
I. Einleitung	5
1.1. Die funktionelle Bedeutung des Endothels	7
1.2. Endothel-Dysfunktion und mögliche Pathomechanismen	9
1.3. Interaktionen von Thrombozyten und endothelialer Vasomotorik	12
1.4. Marker für Inflammation und oxidativen Stress	15
1.4.1. sCD-40-Ligand	15
1.4.2. RANTES (<i>regulated upon activation normal t-cell expressed and secreted</i>)	17
1.4.3. High-sensitive C-reaktives Protein	19
1.4.4. 8-iso-Prostaglandin-F2 α als ein <i>in vivo</i> Marker für oxidativen Stress	19
1.5. Ziele der Untersuchungen und Fragestellung	21
II. Material und Methoden	23
2.1. Patientenkollektiv	23
2.2. Studienprotokoll	24
2.3. Untersuchungsmethodik der Endothel-Funktionsprüfung	25
2.3.1. Ablauf der Unterarmflussmessung	26
2.3.2. Vasoaktive Testsubstanzen	27
2.4. Labortests der Blut- und Urinproben	29
2.4.1. Testprinzip des hs-CRP (<i>Tina-quant</i> ®): C-reaktives Protein hoch sensitiv (Roche/ Hitachi)	29
2.4.2. Human soluble CD-40-ligand immunoassay (<i>Quantikine</i> ®)	30
2.4.3. Human RANTES immunoassay (<i>Quantikine</i> ®)	30
2.4.4. Plasma NOx-Konzentrationen	30
2.4.5. Spektrometrische Quantifizierung des 8-iso-prostaglandins-F2 α und seines Metaboliten 2,3-dinor-5,6-dihydro-8-iso-prostaglandin-F2 α in menschlichem Urin	30
2.5. Statistische Analyse	31

III. Ergebnisse	33
3.1. Patientenkollektiv	33
3.1.1. <i>Klinische Daten der untersuchten Patienten</i>	34
3.2. Beeinflussung der Endothel-Funktion	35
3.2.1 <i>Beeinflussung bei Patienten mit Acetylsalicylsäure und Clopidogrel</i>	35
3.2.2. <i>Ergebnisse der Gruppe mit ASS und Placebo</i>	37
3.3. Effekte auf die biochemischen Parameter	39
3.3.1. <i>Wirkungen auf das hs-CRP</i>	39
3.3.2. <i>Auswirkungen auf sCD-40-Liganden</i>	40
3.3.3. <i>Effekte auf RANTES</i>	41
3.3.4. <i>Auswirkungen auf die NOx-Konzentration</i>	42
3.3.5. <i>Isoprostane im Urin</i>	42
IV. Diskussion	44
4.1. NO-abhängige Vasodilatation, Vasokonstriktion und Thrombozyten	44
4.2. Thrombozyten und Inflammation	48
4.3. Aktivierte Thrombozyten und oxidativer Stress	53
4.4. Schlussfolgerungen der Untersuchung	57
4.5. Ausblick	58
V. Zusammenfassung	60
VI. Literaturverzeichnis	63
Curriculum vitae Manuela Karstens	75
Danksagung	

I. Einleitung

Die koronare Herzerkrankung gehört in der Bundesrepublik Deutschland trotz verbesserter Aufklärung der Bevölkerung und einer permanenten Entwicklung neuer Medikamente immer noch zu den Erkrankungen mit der höchsten Mortalitätsrate (Statistisches Bundesamt, Wiesbaden, 2005).

In ihrer Pathogenese steht die Endothel-Läsion zu Beginn der Erkrankung, die sich in einer fortschreitenden atherosklerotischen Verengung der Koronarien weiterentwickelt. Bei defektem Endothel kommt es im Rahmen einer inflammatorischen Reaktion durch Einlagerung von oxidiertem LDL-Cholesterin, Schaumbildung und Expression von Adhäsionsmolekülen zur Plaquebildung. Bei der Ruptur eines solchen Plaques kommt es zur Thrombozyten-Aktivierung mit Bildung wandständiger Thromben und dem klinischen Bild eines akuten Koronarsyndroms (Fuster, 1992). Es mehren sich die Hinweise, dass Thrombozyten-Aktivierung und Thrombozyten-Aggregation nicht nur Initiatoren des akuten Koronarsyndroms sind, sondern auch eine wesentliche Rolle im Entzündungsgeschehen und der Entstehung von Endothel-Läsionen einnehmen. Durch die Thrombozyten-Aktivierung werden die Endothelzellen stimuliert und zur Expression von Entzündungsfaktoren angeregt (Henn, 1998). Es scheinen also Interaktionen zwischen aktivierten Thrombozyten und Endothelzellen eine wichtige Rolle bei der Entstehung atherosklerotischer Prozesse zu spielen. Thrombozyten-Expression gekoppelt mit inflammatorischen Mediatoren induziert die endotheliale Aktivierung und Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen, sodass sich ein akutes lokales Entzündungsgeschehen entwickelt (Malat, 2002). Interessanterweise konnte kürzlich gezeigt werden, dass dieses

lokalisierte Entzündungsgeschehen eine verschlechterte endothel-abhängige Vasodilatation in der menschlichen mikrovaskulären Zirkulation bedingt (Hingorani, 2000). Zudem setzen aktivierte Thrombozyten reaktive Sauerstoffspezies frei, von denen bekannt ist, dass sie die endothel-abhängige NO-Verfügbarkeit vermindern.

Die pharmakologische Inhibition der GP-IIb/IIIa-Rezeptoraktivierung zeigte nicht nur die Hemmung der Plättchen-Aggregation, sondern auch die Limitierung des entzündlichen Geschehens während des akuten Koronarsyndroms. Zudem zeigten kürzlich veröffentlichte Daten einen positiven Effekt von GP-IIb/IIIa-Inhibition auf die endotheliale Funktion und die NO-Verfügbarkeit (Heitzer, 2003). Clopidogrel ist ein Thienopyridin, das durch die Blockierung der ADP-Rezeptoren an Thrombozyten aggregationshemmend wirkt und positive Effekte bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom aufweist (Metha, 2001). Zudem zeigte Clopidogrel anti-inflammatorische Effekte (Hermann, 2001; Molero 2005). Die Auswirkungen des Clopidogrels auf die endotheliale Funktion sind bisher noch nicht untersucht worden. Aus dieser Motivation heraus führten wir die vorliegende Untersuchung durch. Primäres Ziel der Studie war der Effekt von Clopidogrel zusätzlich zu Acetylsalicylsäure auf die endotheliale vasodilatatorische Funktion und NO-Bioverfügbarkeit bei Patienten mit symptomatischer koronarer Herzerkrankung zu untersuchen. Das sekundäre Studienziel war, mögliche Mechanismen zu evaluieren, wie sich die zusätzliche Gabe von Clopidogrel auf Inflammationsparameter sowie oxidativen Stress auswirkt.

1.1. Die funktionelle Bedeutung des Endothels

Das Endothel ist eine einschichtige Verbindung aus ungefähr 10^3 Endothelzellen, die die Blutgefäße des menschlichen Körpers ähnlich einer Innenhaut auskleiden. Die Zellen dieser Gefäßinnenauskleidung wiegen insgesamt ein bis zwei Kilogramm und entsprechen in etwa einer Fläche von 6000 m^2 . Die Endothelzellen bilden eine funktionsreiche Schranke zwischen dem Blutgefäß und dem fließenden Blutstrom. Zusammenfassend wird das Endothel als ein äußerst komplexes Organ des menschlichen Körpers mit lebenswichtigen Funktionen betrachtet: Es reguliert den Gefäßtonus durch Bildung von NO (Stickstoffmonoxid), das entweder durch mechanische Scherkräfte (Steigerung der Wandschubspannung), Hypoxie, pulsatile Dehnung oder durch chemische Stimulation, z.B. Acetylcholin, verstärkt gebildet wird. NO ist so ein kleines Molekül, sodass es leicht durch Membranen diffundieren kann, intrazellulär aktiviert es die Guanylcyclase, woraufhin es zu einem Anstieg des Guanosinmonophosphates (3,5 cGMP) kommt. GMP bewirkt eine Phosphorylierung der Proteinkinasen, welche Myosinleichtkettenkinasen phosphorylieren, so dass diese eine verminderte Affinität zum Calcium-Calmodulin-Komplex haben und damit inaktiv bleiben. Die Folge ist eine Verminderung der intrazellulären zytoplasmatischen Ca^{2+} -Konzentration mit einer daraus resultierenden Gefäßentspannung und Vasodilatation. Das NO wird durch die NO-Synthase, einem wichtigen Enzym des Endothels, synthetisiert. Über diese Reaktionskaskade lässt sich die Fähigkeit des Endothels zur NO-Bildung testen, die für Endothel-Funktionstests (z.B. in der Unterarm-Plethysmographie) ausgenutzt werden kann.

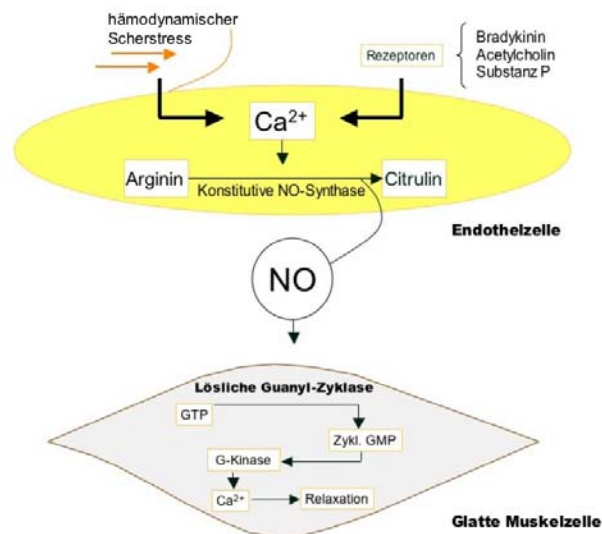


Abbildung 1:

Sie stellt das endotheliale L-Arginin/NO-System dar. Durch Blutflussänderungen ausgelöste Schubspannung oder Rezeptor-Agonisten (Bradykinin, Acetylcholin, Substanz P u. a.) stimulieren die endotheliale NO-Synthase, die aus L-Arginin NO bildet und freisetzt. NO diffundiert zum glatten Gefäßmuskel und aktiviert dort die lösliche Guanylcyclase, die durch cGMP-Bildung und darauf folgender Erniedrigung der Calciumkonzentration zur Relaxation führt (aus Drexler, 2000).

Die NO-Synthase kann auch gehemmt werden. Dies erfolgt z.B. durch methylierte L-Arginin-Analoga wie N-Monomethyl-Arginin (L-NMMA) und führt zu Vasokonstriktion. Bei Infusion der Aminosäure kommt es zu einer 30%igen Reduktion des Ruheblutflusses (Vallance, 1989), gemessen mit der Unterarm-Plethysmographie. Da es keine eigene Konstriktoraktivität auf die glatte Gefäßmuskulatur hat, resultiert seine Wirkung vollkommen aus der endothel-abhängigen Hemmung und Freisetzung von NO (Vita, 1990). Eine weitere Funktion der Endothelzellen ist es, durch Freisetzung von NO die Adhäsion von Leukozyten über bestimmte Oberflächenmoleküle zu unterbinden. So kommt es bei einer verminderten Bioverfügbarkeit von NO zu einer verstärkten Leukozyten-Adhäsionsneigung und einer vermehrten Atherogenese. Auch die Thrombozyten-Adhäsion und -Aggregation wird entscheidend durch einen Mangel an NO, welches die

Thrombozyten selbst bilden, verstärkt und führt zu einem proinflammatorischen und pro-thrombotischen Phänotyp des Endothels. Zudem hat NO einen potentiell antiatherosklerotischen Effekt. Es konnte gezeigt werden, dass NO die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen hemmt. NO wird durch die eNOs gebildet, diffundiert zur glatten Gefäßmuskulatur und führt zur Dilatation der glatten Gefäßmuskulatur über die lösliche Guanylcyclase und die Bildung von cGMP. Diese entzündliche Reaktion wird als Beginn einer atherosklerotischen Läsion mit der Folge einer generalisierten Atherosklerose des Gefäßes betrachtet. Zudem bilden die Endothelzellen Substanzen wie Plasminogen und Plasminogen-Aktivatoren (t-PA), die die Adhäsion, Aktivierung und Aggregation von Thrombozyten hemmen; die physiologischen Hemmstoffe der Blutgerinnung sind NO und Prostacyclin. Andererseits bilden sie auch die Plasminogen-Aktivator-Inhibitoren (PAI-1), deren verstärkte Freisetzung zu Blutgerinnseln führt.

1.2. Endothel-Dysfunktion und mögliche Pathomechanismen

Die Endothel-Dysfunktion wird im klinischen Kontext und der wissenschaftlichen Literatur als verminderte Bioverfügbarkeit von NO definiert. Um diese Funktionseinschränkung gezielt messen und untersuchen zu können, wurde die Endothel-Dysfunktion als eine reduzierte Bioverfügbarkeit von Vasodilatoren, insbesondere dem NO charakterisiert, wohingegen die vom Endothel abhängigen vasokonstriktorisch wirkenden Substanzen zunehmen (Lerman, 1992). Diese Beziehung der eingeschränkten endothel-abhängigen Vasodilatation beschreibt die funktionelle Störung der Endothel-Dysfunktion und wird als Indikator für die generelle Schädigung des Endothels interpretiert, jedoch nicht gleichgesetzt. Diese klinische Untersuchung der Endothel-(Dys)funktion wurde 1986 erstmals am Patienten untersucht, indem

man Acetylcholin in die KoronargefäÙe infundierte (Ludmer, 1986). Bei gesunden Probanden erfolgte die Vasodilatation anders als bei Probanden mit atherosklerotischen Koronarien. Hier kam es zu einer Vasokonstriktion wie bereits in früheren Untersuchungen gezeigt werden konnte (Furchgott, 1986). Furchgott und Zawadski hatten 1980 NO erstmals als EDRF ("endothelium-derived-relaxing-factor") beschrieben, seine gefäÙabhängige Vasodilatationsfähigkeit erkannt und nach Entfernung der Endothelzellschicht der thorakalen Aorta von Kaninchen eine Vasokonstriktion beobachtet. Ebenso fanden sie eine erhöhte NO-Konzentration bei Stress der BlutgefäÙe durch Scherkräfte und Stimulation durch Acetylcholin, Serotonin und ATP.

Die bedeutenden kardiovaskulären Risikofaktoren wie Hypercholesterinämie, arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus, das Zigarettenrauchen sowie eine positive Familienanamnese führen zu einer Endothel-Dysfunktion. Diese Faktoren führen zu einer vermehrten Bildung reaktiver Sauerstoffradikale. Es kommt zu einer verminderten Verfügbarkeit des Tetrahydrobiopterins, einem Co-Faktor der NO-Synthase. Ein Mangel an Tetrahydrobiopterin oder dem Substrat L-Arginin führt zur Entkopplung der NO-Synthase, das Enzym produziert vermehrt Sauerstoffradikale anstelle von NO. Auch oxidiertes LDL führt durch freie Radikale zu einer vermehrten Produktion von freien Sauerstoffradikalen und fördert dadurch die Entstehung der Endothel-Dysfunktion. Diese Endothel-Dysfunktion stellt keine Begleitreaktion dar, sondern ist wesentlich an der Entwicklung und Progression der Atherosklerose beteiligt (Drexler, 2003). Bei einer Reaktion mit NO reduzieren die reaktiven Sauerstoffradikale die vaskuläre NO-Verfügbarkeit und fördern somit Schäden an den Endothelzellen (Tomasian, 2000). Hoher und häufiger oxidativer Stress wird als der

schwerwiegendste Faktor in der Pathogenese der Endothel-Dysfunktion angesehen (Cai, 2000; Tomasian, 2000).

Einige Untersuchungen ergeben Hinweise, dass die Schädigung des Endothels mit der Anzahl der kumulierenden Risikofaktoren positiv korreliert (Vita, 1990; Celermajer, 1994). Ferner scheint das schädigende Potential der einzelnen Risikofaktoren unterschiedlich gewichtet zu sein und auch genetische Faktoren jedes Individuums sollen entscheidenden Einfluss auf die Ausprägung einer Endothel-Dysfunktion haben. Interessanterweise führte eine sechsmonatige Statin-Therapie zu einer signifikanten Verbesserung der Endothel-Funktion der koronaren Widerstandsgefäße (Egashira, 1994). Statine führen neben einer Hemmung der HMG-CoA-Reduktase zu einer Aktivierung von G-Proteinen, was zu einer gesteigerten Expression (Laufs, 1998) und Aktivierung der endothelialen NO-Synthase führt (Kureishi, 2000). Zudem weisen sie antioxidative Effekte auf, die die Aktivierung der vaskulären NADPH-Oxidase hemmen, die eine wichtige Sauerstoffradikalquelle darstellt (Wassmann, 2000). Zusammengefasst werden diese positiven Wirkungen auf die endotheliale Funktion als pleiotrope Effekte beschrieben. ACE-Hemmer verbessern die endothel-abhängige Vasodilatation der Koronarien mit koronarer Herzerkrankung durch einen Anstieg des endogenen Bradykinins und einer Reduktion der Angiotensin-II vermittelten Bildung von Sauerstoffradikalen (Griendling, 1994). Zudem steigert körperliche Aktivität die endothel-abhängige Vasomotion bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung. Problematisch ist jedoch das innerhalb weniger Wochen sichtbare Nachlassen dieses positiven Effektes nach Beendigung des regelmäßigen Trainings (Hambrecht, 2000).

Entscheidend ist, dass es einen signifikanten Zusammenhang zwischen der endothelialen Dysfunktion und bevorstehenden kardiovaskulären Ereignissen gibt. Es wurde gezeigt, dass

Patienten eine höhere Inzidenz kardiovaskulärer Ereignisse aufwiesen, die eine schlechtere endothel-abhängige-Vasodilatation der koronaren Gefäße in der Endothel-Funktionsprüfung gezeigt hatten (Suwaidi, 2000). Eine andere Untersuchung ergab, dass Patienten mit schlechter endothel-abhängiger wie -unabhängiger Gefäßfunktion häufiger ein kardiovaskuläres Ereignis erlitten als Patienten mit guter Endothel-Funktion (Schächinger, 2000). Diese beiden Untersuchungen lieferten einen entscheidenden Beweis dafür, dass die endotheliale Funktion einen prognostischen Wert für zukünftige kardiovaskuläre Ereignisse darstellt (Suwaidi, 2000; Schächinger, 2000).

Wie vielfach nachgewiesen, sind die Risikofaktoren für die koronare Herzerkrankung mit Störungen der peripheren Widerstandsgefäße am Unterarm ebenfalls verbunden. So konnte kürzlich die prognostische Bedeutung der Einschränkung der Acetylcholin-induzierten Vasodilatation am Unterarm im Hinblick auf das Auftreten klinischer Ereignisse bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit (Heitzer, 2001) und arterieller Hypertonie (Perticone, 2001) gezeigt werden.

1.3. Interaktionen von Thrombozyten und endothelialer Vasomotorik

Die Endothel-Dysfunktion ist das erste klinisch fassbare Korrelat für ein Frühstadium der Atherosklerose und bezeichnet im engeren Sinne Störungen, die auf eine verminderte NO-Verfügbarkeit oder NO-Aktivität zurückzuführen sind und mit einer verminderten endothel-abhängigen Vasodilatation einhergehen. Die gestörte endothel-abhängige Vasodilatation wird als ein Indikator für eine funktionelle Endothel-Schädigung interpretiert, jedoch nicht mit ihr gleichgesetzt. Es konnte durch eine Vielzahl experimenteller Untersuchungen gezeigt werden, dass ein intaktes Endothel eine wichtige Rolle beim Schutz vor Thrombenbildung, Atherosklerose

und Vasokonstriktion spielt (Badimon, 1992). Bei Patienten mit Atherosklerose konnte gezeigt werden, dass die verminderte Vasodilatation nach Acetylcholin-Gabe zum größten Teil durch eine verminderte NO-Verfügbarkeit bedingt ist (Quyyumi, 1997). In atherosklerotischen Koronararterien ist sowohl die basale als auch die stimulierte Freisetzung von NO vermindert (Chester, 1990). Das bedeutet aber auch, dass die hemmende Wirkung von NO auf die Thrombozyten-Aggregation bei diesen Patienten reduziert ist. Endothel-Dysfunktion und verminderte NO-Bioverfügbarkeit, wie sie bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit vorkommen, prädisponieren offenbar zu gestörten Wechselwirkungen zwischen Endothelzellen und Thrombozyten sowie ungestörter Thrombozyten-Aktivierung und damit einhergehender Vasokonstriktion. Dies demonstrierten die Arbeitsgruppen von Cohen und Houston bereits vor zwanzig Jahren. Dabei ist von Bedeutung, dass diese Vasokonstriktion durch Thrombozyten prinzipiell nur an geschädigtem oder vollständig entferntem Endothel möglich ist, während das intakte Endothel die Gefäße vor Vasokonstriktion schützt. Wichtig sind in diesem Zusammenhang vasoaktive Substanzen wie Thromboxan-A₂ und Serotonin, die von den Thrombozyten selbst freigesetzt werden (Cohen, 1983; Houston, 1986). So konnte experimentell gezeigt werden, dass Thrombozyten-Aggregate isolierte Ringe von Kaninchenkoronarien ohne Endothel kontrahierten und gleichzeitig Serotonin sowie Thromboxan-A₂ freisetzen. Daraus wurde gefolgert, dass Serotonin und Thromboxan-A₂ durch Thrombozyten-Aggregation die vaskulären Muskelzellen der Koronarien direkt aktivieren (Houston, 1986). Aufgrund dieser Ergebnisse erscheint es möglich durch eine wirksame Thrombozyten-Hemmung diese vasokonstriktorisches Effekte zu vermindern.

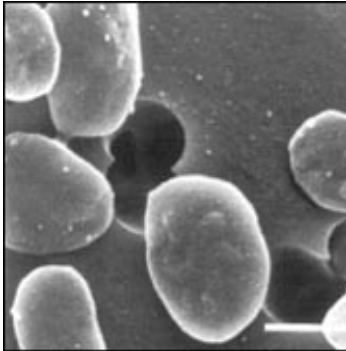


Abbildung 2:
Ruhende Thrombozyten

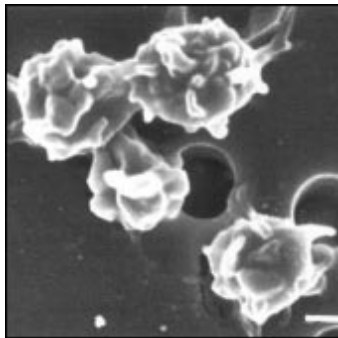


Abbildung 2:
Aktivierte Thrombozyten

Durch GP-IIb/IIIa-Rezeptorblockade wird die Endstrecke der Thrombozyten-Aggregation gehemmt. Durch diesen Mechanismus wird sowohl eine Steigerung des epikardialen als auch des mikrovaskulären Flusses erzielt (Neumann, 1998). Vermutlich wird durch den vorliegenden Mechanismus eine Thrombusbildung und die daraus resultierende Gefäßverengung verhindert. Dennoch können aktivierte Thrombozyten auch ohne Thrombus eine mikrovaskuläre Vasokonstriktion verursachen, indem sie die genannten Substanzen ausschütten.

Durch eine suffiziente Thrombozyten-Aggregationshemmung könnte dem also entgegengewirkt werden. Dieses könnte sich wiederum positiv auf die Perfusion auswirken. Dieser Effekt konnte bereits bei GP IIb/IIIa-Rezeptorantagonisten in vivo gezeigt werden (Heitzer, 2003). Bei Patienten nach Implantation eines Stents wurde eine verbesserte koronare Perfusion und endotheliale Vasodilatation beschrieben (Aymong, 2002). Tierexperimentell wurde dieser Effekt ebenfalls bei Clopidogrel gezeigt (Yao, 1993). Bisher wurde jedoch noch nicht untersucht, ob eine Thrombozyten-Aggregationshemmung durch ADP-Rezeptorblockade mit Clopidogrel bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung diese Wirkung auch ohne Koronarintervention hervorruft. Gesteigerte Thrombozyten-Aktivierung führt nicht nur zu Vasokonstriktion, sondern auch zu Entzündungsprozessen, die eine entscheidende Rolle in der Pathogenese thrombotischer Koronarereignisse spielen. Zum einen sind hier heterotype

Interaktionen zu nennen, die in Form von Aggregaten zwischen Thrombozyten und Leukozyten atherosklerotische Läsionen verursachen (Huo, 2003). Zum anderen kann das Oberflächenmolekül CD-40-Ligand, das auf aktivierten Thrombozyten vermehrt exprimiert wird, auf den Endothelzellen inflammatorische Prozesse induzieren (Henn, 1998). Außerdem führen die heterotypen Interaktionen von Thrombozyten und Leukozyten zu einer verstärkten Aktivierung von Leukozyten, die wiederum Sauerstoffradikale freisetzen und dadurch das Endothel schädigen können. Ferner wird durch Thrombozyten die Produktion von diversen inflammatorisch wirkenden Chemokinen und Zytokinen aus Endothelzellen und Leukozyten gefördert. So könnten durch eine wirksame Thrombozyten-Hemmung auch Entzündungsreaktionen vermindert werden.

1.4. Marker für Inflammation und oxidativen Stress

1.4.1. sCD 40-Ligand

Plättchen-Adhäsion und -Aggregation an der Ruptur eines Atheroskleroseplaques ist der entscheidende Vorgang bei der Bildung eines Blutgefäßthrombus und letztendlich der Entstehung eines akuten Koronarsyndroms. Blutplättchen sollen dieses inflammatorische Geschehen durch Freisetzung von Entzündungsfaktoren in das Blutplasma triggern. Zu diesen Mediatoren gehören Zytokine, ICAMS, aber auch das lösliche (s)CD-40. Ursprünglich war das CD-40-Ligand-System beobachtet worden bei der T-Zell-abhängigen B-Zell-Differenzierung. Aus neueren Untersuchungen weiß man, dass es eine wichtige Rolle in der zellulären Immunität und Entzündungsreaktion, vor allem in der Pathophysiologie der Atherosklerose, einnimmt. CD-40-Ligand, ein transmembranöses Strukturprotein, ist Mitglied der Tumor-Nekrose- α -Familie. CD-40-L ist an der Oberfläche von B-Zellen,

T-Zellen, Monozyten, dendritischen Zellen, Mastzellen, Eosinophilen, Basophilen, aktivierten Thrombozyten und Endothelzellen vorhanden und kann eine Signalkaskade aktivieren. Lösliches CD-40 wird aus Granula der Thrombozyten während eines akuten Geschehens in das Blutplasma freigesetzt und CD-40-L an der Oberfläche der Thrombozyten exprimiert.

Dem CD-40-L gilt aktuell eine große Aufmerksamkeit in seiner Rolle als plättchenabhängiger Ligand im Entzündungsgeschehen zwischen den Thrombozyten und anderen Zellen im vaskulären Geschehen. Seine Aufgaben *in vitro* reichen von immunologischen Antworten über Plättchen-Aktivierung bis zur Thrombusformation (Aukrust, 2004). Der CD-40-L kann einen Thrombus stabilisieren. Hohe Plasmaspiegel des löslichen Fragmentes des CD-40-Liganden (CD 154) sind assoziiert mit kardiovaskulären Risikofaktoren. Die Interaktion des Liganden mit dem CD-40-Rezeptor wird mit der Pathogenese von atherothrombotischen Komplikationen bei der koronaren Herzerkrankung in Verbindung gebracht (Lim 2004). Physiologisch fehlen CD-40-Liganden an der Oberfläche von ruhenden Blutplättchen. Wenn diese jedoch *in vitro* aktiviert werden, so werden die Liganden innerhalb von Sekunden an deren Oberfläche aus intrazellulären Ressourcen exprimiert (Henn, 1998), *in vivo* findet innerhalb kürzester Zeit eine Thrombusbildung statt. Die aktivierten Blutplättchen setzen gleichzeitig innerhalb von Minuten bis Stunden lösliches CD-40 ins Blutplasma frei. Die Liganden interagieren mit den CD-40-Rezeptoren der Endothelzellen und führen zu einer inflammatorischen Reaktion. Die Expression dieser Moleküle an Endothelzellen stimuliert die Ausprägung von Adhäsionsmolekülen, inflammatorischen Zytokinen (Interleukin-6 insbesondere) (Dechanet, 1997) und dem prokoagulatorischen Tissue-Faktor (Slupsky, 1997). Physikalische Scherkräfte und diese

Entzündungsfaktoren führen zu Plaquerupturen in den arteriellen Gefäßwänden. Die Folge sind klinische Ereignisse wie instabile Angina pectoris und Herzinfarkt. Das Fortschreiten der entzündlichen Gefäßerkrankung kann mit Entzündungsparametern im Blut kontrolliert werden. Ein besonders früher und sensitiver Parameter ist für diesen Zweck das lösliche CD-40. Der CD-40-Ligand kann als früher Indikator für aktive Entzündungsprozesse an den Gefäßwänden und Plättchen-Aktivierung beim akuten Koronarsyndrom gelten, aber auch direkte Prothrombin-Aktivität anzeigen, die ein Indikator für frühe Atherosklerose, Plaqueruptur und Thrombosen ist. Garlichs et al. zeigten erhöhte sCD-40-Konzentrationen nicht nur bei Patienten mit ACS, sondern auch bei akutem Myokardinfarkt und stabiler Angina pectoris, wobei die Serumkonzentrationen bei instabiler Angina pectoris signifikant höher waren als bei stabiler Angina pectoris und die Patienten mit akutem Myokardinfarkt die höchsten Serumwerte aufwiesen (Garlichs, 2001). Diese Studienergebnisse weisen auf eine zukünftige Indikation des CD-40 hin, nämlich als nützlichen Marker für ein bevorstehendes Risiko oder Ereignis einer kardiovaskulären Erkrankung bei Patienten mit instabiler Angina pectoris. Für Statine, Glitazone, Glykoprotein-IIb/IIIa-Rezeptoren (Abciximab) und Clopidogrel konnte gezeigt werden, dass sie effektiv die CD-40-L-Konzentration sowohl in vivo wie auch in vitro reduzieren (Vishnewetsky, 2004).

1.4.2. RANTES (*regulated upon activation normal t-cell expressed and secreted*)

RANTES (CCL 5) ist ein Mitglied der C-C-Subfamilie der β -Chemokine. Chemokine sind kleine Proteine, die die Chemotaxis verschiedener Zellreihen mit Hilfe von bestimmten Rezeptoren induzieren (Clemetson, 2005). Es wird in α -Granula der Blutplättchen gespeichert und bei deren Aktivierung ins Blut

freigesetzt. So kann ihre Funktion als Marker der Plättchen-Aktivierung betrachtet werden. Es steuert das Zirkulieren und den Adhäsionsprozess verschiedener Zellarten, wie Monozyten, Lymphozyten, Killerzellen, Mastzellen und Blutplättchen, wenn sie an einer beschädigten Endothel-Fläche hängen bleiben. Kürzlich wurde herausgefunden, dass RANTES eine Schlüsselrolle in der Progression der Atherosklerose, Makrophagen-Akkumulation und Intima-Proliferation einnimmt (Prescot, 2002). Eine weitere Funktion ist die Adhäsion und Transmigration von Monozyten und T-Zellen (Schall, 1990). Eine primäre Rolle spielt es bei entzündlichen Immunprozessen wie z.B. chronisch entzündlichen Darmerkrankungen oder allergischen Reaktionen der Haut. Es tritt aber auch bei inflammatorischen Geschehnissen der Blutgefäße auf, denn aktivierte Thrombozyten exprimieren Oberflächenrezeptoren wie etwa CD-40 und setzen entzündliche Chemokine in die Umgebung frei, z.B. RANTES. Dieser reizt T-Gedächtniszellen, Monozyten, Eosinophile und Basophile. Thrombozyten interagieren mit entzündeten Endothelzellen und sezernieren RANTES aus intrazellulären Granula an die Endothel-Oberfläche. Dieser Pathway stellt ein Signal an die Monozyten dar, sodass diese sich an die geschädigte Zellschicht anlagern. Die Änderung der Oberflächenbeschaffenheit der Endothelzellen wird durch IL-1- β bewirkt, so dass RANTES den Monozyten präsentiert werden kann. Der Pathomechanismus ist jedoch bis heute noch nicht vollständig geklärt (Weyrich, 2002). Welt et al. zeigten, dass der GP-IIb/IIIa-Rezeptorantagonist Eptifibatide die Konzentrationen von RANTES und CD-40 signifikant im EDTA-Blut und Plasma nach PTCA senkt (Welt, 2004). Welchen Effekt Clopidogrel hat, wurde bisher noch nicht geklärt.

1.4.3. High-sensitive C-reaktives Protein

High-sensitive C-reaktives-Protein ist ein akutes Phasen-Protein. So wurde kürzlich gezeigt, dass Patienten mit akutem Koronarsyndrom und instabiler sowie stabiler Angina pectoris signifikant höhere hs-CRP-Spiegel im Plasma haben als die entsprechenden Kontrollen, die glattwandige Koronarien aufwiesen (Nijm, 2005). Nijm et al. untersuchten in der gleichen Studie weitere Entzündungsindikatoren, wie etwa die Zytokine Interleukin 1 und Interleukin 6, die ebenfalls positiv mit dem Geschehen in den Herzkranzgefäßen korrelierten. Vermutlich handelt es sich um eine wichtige Interaktion zwischen Thrombozyten und Neutrophilen und einem pro-inflammatorischen Geschehen bei stabiler und instabiler Angina pectoris. Weiterhin konnten sie zeigen, dass es aufgrund dieser Interaktionen zu einer Aggregation der Zellkomplexe kommt. Aufgrund dieser Untersuchungsergebnisse vermuten die Autoren einen engen Zusammenhang zwischen Inflammationsgeschehen und Thrombosen. Weitere Befunde zeigten einen direkten Zusammenhang zwischen dem CRP im Serum der Gefäßfunktion der koronaren epikardialen sowie arteriolären Blutgefäße. So zeigte sich, dass durch den systemischen Entzündungseffekt die Vasomotorik und somit die endotheliale Funktion geschädigt wird (Schindler, 2004).

1.4.4. 8-iso-Prostaglandin-F2 α als ein in vivo Marker für oxidativen Stress

8-iso-Prostaglandin-F2 α werden von Zellmembranen gebildet, durch die Einwirkung von freien Sauerstoffradikalen freigesetzt, anschließend zirkulieren sie im Blut und werden schließlich durch den Urin ausgeschieden. Sie sind Isoprostane und werden durch freie Radikale aus oxidiertem LDL gebildet, wobei sie chemisch stabile Substanzen sind.

Isoprostane zirkulieren als Ester der LDL bei Patienten mit Hypercholesterinämie (Lawson, 1999), wobei bei Patienten mit Hypercholesterinämie das LDL-Cholesterin der am höchsten positiv korrelierende Parameter für oxidativen Stress ist. Isoprostane sind freie, durch Radikale katalysierte Produkte aus Arachidonsäuren der Lipidperoxidation in vivo und können in menschlichem Urin mit der Gas-Chromatography-Tandem-Mass-Spectrometry-Methode gemessen werden. Zusammenfassend ist die 8-iso-Prostaglandin-F2 α -Ausscheidung im Urin ein unabhängiger und sensitiver Risikomarker für die koronare Herzerkrankung, die äquivalent mit Hypertonus, Diabetes mellitus, Hypercholesterinämie und erhöhten hs-CRP Werten im Blutplasma ist (Schwedhelm, 2004). Die Urinexkretion des Isoprostans 8-iso-prostaglandin-F2 α wird somit für einen sensitiven Marker für oxidativen Stress gehalten, der auf die Blutgefäße in vivo einwirkt (Caterina, 2002). Diese Lipidperoxidation wird durch freie Sauerstoffradikale der Zellmembranen und LDL-Partikel katalysiert. Diese Zellbestandteile, vor allem aber das 8-iso-Prostaglandin-F2 α initiieren eine periphere Vasokonstriktion und eine gesteigerte Plättchen-Aktivität (Lawson, 1999). Eine erhöhte Ausscheidung von 8-iso-prostaglandin-F2 α im Urin ist in einigen klinischen Studien mit kardiovaskulären Risikofaktoren wie Diabetes mellitus (Davi, 1999), Rauchen (Reilly, 1999) und Hypercholesterinämie (Reilly, 1998) beobachtet worden. Diese Resultate unterstreichen die Wichtigkeit der Exkretion des 8-iso-Prostaglandin-F2 α als noninvasiven, quantitativen Parameter für die Bestimmung des oxidativen Stresses in vivo.

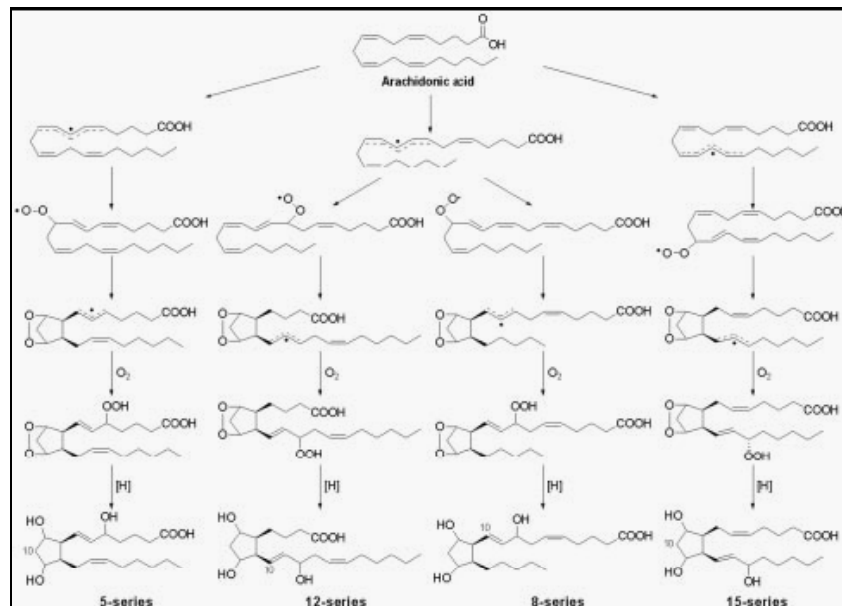


Abbildung 3: 8-iso-Prostaglandin-F₂α

1.5. Ziele der Untersuchungen und Fragestellung

Die Aktivierung von Thrombozyten spielt für die arterielle Thrombusbildung und somit für Akutereignisse bei atherosklerotischer Gefäßerkrankung eine zentrale Bedeutung (Gawaz, 1999). Bei neu auftretender Angina pectoris und akutem Koronarsyndrom sind Thrombozyten zum einen am Prozess des instabilen Plaques des Leitungsgefäßes (Henn, 1998) als auch an peripherer Mikroembolisation und Vasokonstriktion mit dadurch bedingter Mikrozirkulationsstörung beteiligt. Durch die Hemmung der Thrombozyten-Aggregation mit Acetylsalicylsäure und Clopidogrel kann diese Anlagerung von Thrombozyten verhindert werden. Das vorrangige Ziel einer effektiven antithrombotischen Therapie bei akutem Koronarsyndrom ist es, die intravasale Thrombusbildung und damit den Gefäßverschluss zu verhindern oder zumindest zu limitieren. Daneben könnte eine gezielte antithrombotische Therapie die plättchenabhängige Vasokonstriktion und Embolisation und damit Störung der peripheren Zirkulation verbessern und die systemische

Entzündungsreaktion beeinflussen. Trotz Acetylsalicylsäure kommt es zu weiteren atherothrombotischen Ereignissen. Auf der Suche nach einer additiven Therapie stieß man auf Clopidogrel, welches symbiotische Effekte auf die Thrombozyten-Aggregation aufweist. Zudem ist bekannt, dass Clopidogrel systemisch antiinflammatorische (Molero, 2005; Quinn, 2004) Effekte aufweist. Bisher ist nicht bekannt, ob die Aggregationshemmung mit Clopidogrel auch einen positiven Effekt auf die Endothel-Funktion der Mikrozirkulation besitzt oder eine Thrombozyten-Endothel-Interaktion positiv beeinflusst.

Zur Untersuchung dieser Frage wurde die endothel-vermittelte und nicht-endothel-vermittelte Gefäßfunktion am Unterarm - wie schon in vorausgegangenen Studien - mit Hilfe der Venenverschluss-Plethysmographie gemessen. Diese erlaubt die Messung des Blutflusses und des arteriolen Strömungswiderstandes in einem vom Gesamtorganismus funktionell isolierten Gefäßbett mit der Möglichkeit selektiver Applikation diverser vasoaktiver Testsubstanzen und Pharmaka. Dabei kann das Verhalten der Unterarmarteriolen als repräsentativ für das gesamte arteriolen Gefäßbett angesehen werden. Primärer Endpunkt der gegenwärtigen Studie war es festzustellen, ob bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung durch eine Kombinationsbehandlung von Clopidogrel zusätzlich zu Acetylsalicylsäure die endothel-vermittelte Vasodilatation und NO-Bioverfügbarkeit verbessert werden kann. Sekundärer Endpunkt der gegenwärtigen Studie war es, durch die Messung von Blut -und Urin-Parametern in vivo die zusätzliche Wirkung von Clopidogrel zu Acetylsalicylsäure auf Inflammation und oxidativen Stress zu untersuchen.

II. Material und Methoden

2.1. Patientenkollektiv

In die prospektive Studie wurden Patienten eingeschlossen, die in der Kardiologischen Abteilung des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf mit einer symptomatischen koronaren Herzerkrankung vorstellig wurden. Die Einschlusskriterien waren eine dokumentierte, stabile Angina pectoris sowie eine tägliche Therapie mit 100 mg Acetylsalicylsäure. Die koronare Herzerkrankung wurde definiert durch einen Myokardinfarkt in der Anamnese, angiographisch nachgewiesener mindestens 50%iger Stenose oder bereits durchgeführter kardialer Re-Vaskularisierung. Die Ausschlusskriterien waren instabile Angina pectoris, Herzinsuffizienz ab Stadium III nach NYHA, schwerer arterieller Hypertonus, Myokardinfarkt vor weniger als acht Wochen, bekannter Unverträglichkeit oder Kontraindikationen gegen eine der vasoaktiven Substanzen, Defekte der Blutgerinnung, signifikante endokrine, hepatische, nephrologische oder inflammatorische Erkrankungen, Morbus Raynaud, Alkoholismus, Alter unter dreißig oder über fünfundsiebzig Jahren, Fehlen der Geschäftsfähigkeit oder Schwangerschaft und ferner Teilnahme an einer anderen Studie. Vasoaktive Medikationen inklusive Calcium-Kanalblocker, Betablocker, ACE-Inhibitoren und lang wirksame Nitrate wurden länger als vierundzwanzig Stunden vor Beginn der vasoaktiven Messungen pausiert. Keiner der Patienten erhielt Thienopyridine oder Glykoprotein-IIb/IIIa-Rezeptorantagonisten vor Studieneinschluss. Die Studie wurde von der Ethik-Kommission der Hamburger Ärztekammer geprüft und genehmigt. Alle Teilnehmer in der Studie gaben Ihre schriftliche Einverständniserklärung.

2.2. Studienprotokoll

Die Studie war eine randomisierte, placebo-kontrollierte, parallel geführte Studie in der die Patienten in einer 3:1 Randomisierung entweder doppelte Thrombozyten-Aggregationshemmung mit ASS und Clopidogrel oder eine Thrombozyten-Aggregationshemmung mit ASS und Placebo verordnet bekamen. Clopidogrel wurde mit einer Aufsättigungsdosis von 300mg gestartet und einer Erhaltungsdosis von 75mg/die fortgesetzt. Andere Medikamente der Patienten, inklusive Aspirin® wurden unverändert weiter genommen. Kardiovaskuläre Medikamente wie Calcium-Kanalblocker, ACE-Hemmer und AT1-Antagonisten waren nur erlaubt, wenn sie bereits seit mindestens zwei Monaten unverändert eingenommen wurden. Während der Studie wurde die Dosierung nicht geändert. Auch die Therapie mit einem Statin wurde nicht neu begonnen oder während der Studie verändert. Die vaskuläre Endothel-Funktionsprüfung wurde zum Zeitpunkt der Randomisierung sowie nach einem fünfwöchigen Follow Up durchgeführt.

2.3. Untersuchungsmethodik der Endothel-Funktionsprüfung

Die Untersuchungen wurden, wie in vorhergehenden Studien beschrieben, am Unterarm mit Hilfe der Venenverschluss-Plethysmographie durchgeführt, welche eine Messung des Blutflusses und des arteriolen Strömungswiderstandes in einem regionalen Gefäßbett erlaubt. (Heitzer, 2001) Unter Lokalanästhesie wurde am liegenden Patienten unter sterilen Bedingungen ein Polyäthylen-Katheter von 0,9mm Durchmesser in die A. brachialis des nichtdominanten Armes eingeführt. Der Arm wurde etwas über Vorhofniveau gelagert und ein Quecksilber-Dehnungsstreifen (Hokanson Inc., Bellevue, Washington, USA) um den größten Umfang des Unterarms gelegt. Der Dehnungsmessstreifen wurde über eine für diesen Zweck konstruierte Wheatstone'sche Brücke und den entsprechenden Brückenverstärker an ein digitales Datenaufzeichnungssystem (Mac Lab. R, AD Instruments Ltd., Hastings, UK) angeschlossen. Zur Flussmessung wurde zunächst die Handdurchblutung durch Aufblasen einer Blutdruckmanschette am Handgelenk auf einen suprasystolischen Druck vorübergehend unterbunden. Dann wurde eine Manschette am Oberarm durch ein spezielles Kompressorsystem (Hokanson Inc., Bellevue WA, USA) für fünf Sekunden auf 40mmHg aufgeblasen und wieder abgelassen. Die durch den venösen Einstrom resultierende Zunahme des Unterarmumfangs während der Okklusionsphase wird durch den Dehnungsmessstreifen erfasst. Über eine Wheatstone'sche Brücke wird die Widerstandsänderung registriert und in eine Signalspannung umgewandelt. So wird direkt die Durchblutung des Unterarmes in ml/100 ml/Min. Unterarmgewebe/Min. wiedergegeben. Der Mittelwert aus zehn Messzyklen ergibt einen Messpunkt.

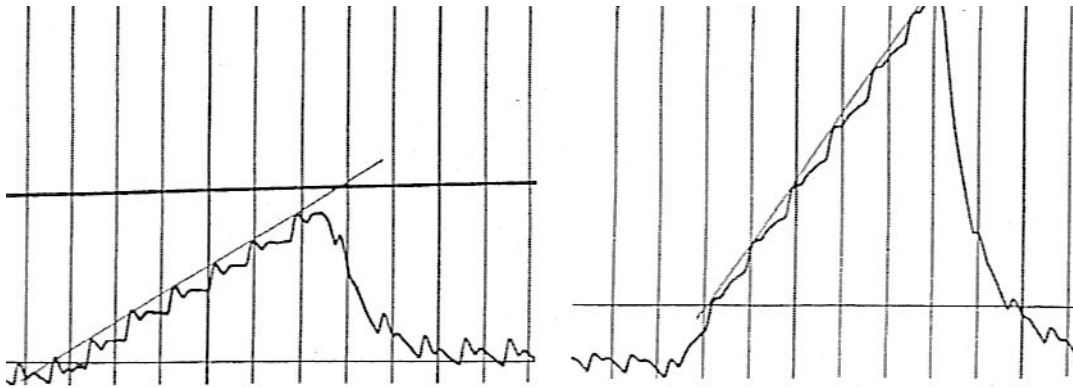


Abbildung 4:

Beispiel einer Unterarmflussmessung. Links basaler Blutfluss unter Kochsalzlösung 0,9% (3,04ml/min/100ml). Rechts stimulierter Fluss unter Nitroprussid-Natrium 10 µg/min (15,2 ml/min/100 ml).

2.3.1. Ablauf der Unterarmflussmessung

Alkohol, Nikotin und Tabletteneinnahme wurden zwölf Stunden vor der Untersuchung untersagt. Ca. dreißig Minuten nach Platzieren des arteriellen Katheters (Größe 20 G) in die A. brachialis im Untersuchungsraum erfolgte die Messung unter Ausgangsbedingungen. Dazu wurde über die arterielle Kanüle mittels Infusionspumpen (Braun Melsungen) physiologische Kochsalzlösung mit einem Fluss von 1,66 ml/Min. infundiert. Danach erfolgte die Flussmessung unter Infusion der vasoaktiven Testsubstanzen bei konstanter Flussrate von 1,66 ml/Min. Die Reihenfolge der Infusion von Acetylcholin und Nitroprussid-Natrium erfolgte randomisiert. Alle zehn Minuten wurde die Dosis gesteigert, die Flussmessung erfolgte jeweils von der vierten bis siebten Minute jeder Dosisstufe. Nach der Maximaldosis der jeweiligen Substanz wurde eine Auswaschphase mit NaCl bis zum Erreichen des Ruheflusses eingehalten. Nach fünf Wochen erfolgte eine Kontrolluntersuchung der endothel-abhängigen sowie endothel-unabhängigen Gefäßfunktion, der Ablauf erfolgte wie bei der ersten Gefäßfunktionsprüfung. Blutabnahmen und Urinentnahmen zu den Zeitpunkten der Gefäßfunktionsprüfung

sollten zusätzliche Informationen über inflammatorische Parameter sowie oxidativen Stress ergeben.



Abbildung 5:

Foto einer Unterarmflussmessung. Am gelagerten Unterarm des liegenden Patienten befindet sich die Blutdruckmanschette, die automatisch aufgepumpt wird, distal davon liegt der arterielle Katheter mit einem Infusionsschlauch. Am Unterarm im Bereich des größten Umfangs ist der mit Quecksilber gefüllte Silikonschlauch zu sehen. Am Handgelenk befindet sich die Kinderblutdruckmanschette zur Unterbrechung der Handzirkulation.

2.3.2. Vasoaktive Testsubstanzen

Die Dosierung der Testsubstanzen entsprach den anderen Publikationen früherer Arbeiten und den von anderen Arbeitsgruppen verwendeten etablierten Dosis-Wirkungs-Bereichen (Fitschlerer, 2000; Heitzer, 2001; Heitzer, 2003). Folgende Substanzen wurden infundiert:

Acetylcholin (ACH/Farmigea S.P.A.) als endothel-abhängiger Vasodilatator. Nach Stimulation von Acetylcholin-Rezeptoren am Endothel kommt es u.a. zur Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO). NO diffundiert zur glatten Gefäßmuskelzelle und bewirkt über eine direkte Stimulation der Guanylcyclase eine Verminderung der intrazellulären Calcium-Konzentration und darüber eine Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur mit

konsekutiver Vasodilatation. Die dadurch erreichte Vasodilatation gibt also Aufschluss über die Fähigkeit des Endothels zur NO-Freisetzung. Dosisstufen: 7,5+15+30 µg/Min.

Nitroprussid-Natrium (NPN/Schwarz-Pharma), als ein NO-Donor, welcher unabhängig vom Endothel durch direkte Stimulation der Guanylcyclase der glatten Gefäßmuskulatur eine Vasodilatation bewirkt. Dosierung: 1,3 und 10 µg/Min.

Mono-Methyl-L-Arginin (L-NMMA/Calbiochem), als ein direkter Inhibitor der NO-Synthase. Damit lässt sich der NO-vermittelte Anteil des Blutflusses indirekt bestimmen. Dosisstufe: 16 µmol/Min. Diese Dosis bewirkt eine komplette NO-Inhibierung.

Die Substanzen wurden durch Anmischung mit NaCl kurz vor der Infusion frisch zubereitet. Zeitgleich mit einer vaskulären Endothel-Funktionsmessung wurden den Patienten Blut- und Urinproben entnommen.

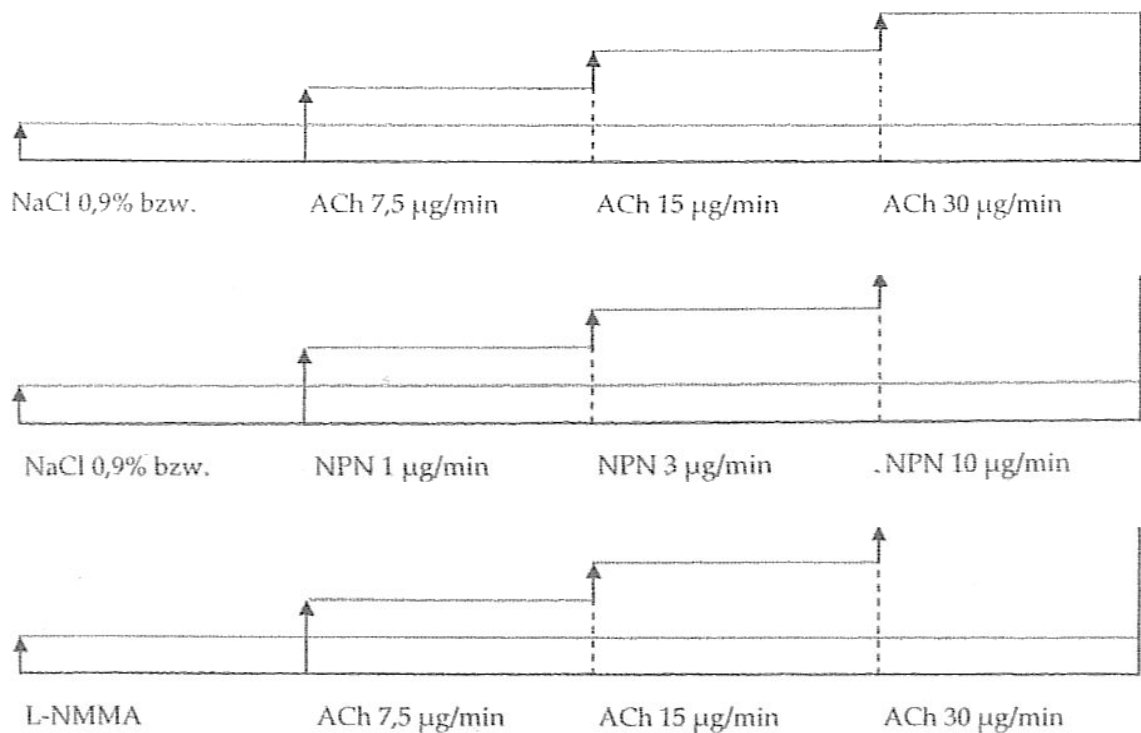


Abbildung 6:

Schemata der Infusionsregime: endothelabhängige Vasodilatation, endothelunabhängige Vasodilatation und Hemmung der NO-induzierten Blutflusssteigerung: L-NMMA 16 µmol/min plus Acetylcholin (ACH) 7,5-15-30 µg/min

2.4. Labortests der Blut- und Urinproben

Bei allen Patienten erfolgte die Blut- und Urinentnahme zum Zeitpunkt der Randomisierung und fünf Wochen später. Blut wurde nach einer venösen Punktion entsprechend dem klinisch-chemischen Parameter in EDTA- oder Citratplasma-Standardprobenentnahmeröhrchen abgenommen, auf Eis kühl gelegt und sofort bei 4°C mit 4000 Umdrehungen für vierzehn Minuten zentrifugiert, der Überstand in 1,8 ml Kryotubes pipettiert und anschließend bei -20° Celsius eingefroren, bis die Proben endgültig vermessen wurden. Aus EDTA-Plasma wurden CD-40-Liganden (CD 154), aus Citratplasma das hochsensible CRP (hs-CRP) sowie die RANTES mit kommerziellen sandwich-enzym-linked-immuno-sorbent-assays (sandwich-ELISA) bestimmt. Mittelstrahlurin wurde durch Spontanmiktion gewonnen und in Polypropylenbechern, die 1mm 5-hydroxy-tempo- und Ethylendiamintetraaceticssäure (EDTA) enthielten, gesammelt. Der Becherinhalt wurde in 5 ml Röhrchen pipettiert und zunächst bei -20°C und später bei -80°C bis zur endgültigen Metaboliten-Bestimmung asserviert. In den Urinproben wurden 8-iso-Prostaglandin-F2 α und deren Metaboliten, das 2,3-dinor-5,6-dihydro-8-iso-prostaglandin-F2 α gemessen.

2.4.1. Testprinzip des hs-CRP (Tina-quant®): C-reaktives Protein hoch sensitiv (Roche/ Hitachi)

Es handelt sich um einen immunologischen Trübungstest zur quantitativen in vitro Bestimmung von CRP in Humanplasma mit einem klinisch-chemischen Analyseautomaten. Der Labortest basiert auf dem Prinzip des immunologischen Agglutinationstestes mit Reaktionsverstärkung durch Latex (ELISA). Der Messbereich befindet sich zwischen 0,1-20 mg/l. Die Einheit ist in mg/l angegeben.

2.4.2. Human soluble CD-40-ligand immunoassay (Quantikine®)

Es wurde eine quantitative Bestimmung der löslichen CD-40-Liganden-Konzentration im EDTA-Blut durchgeführt. Der Test basierte auf einer gewöhnlichen kommerziellen quantitativen Sandwich-Enzyme-Immunoassay-Technik. Die Einheit ist ng/ml. Der Messbereich befindet sich zwischen 0,05-7 ng/ml.

2.4.3. Human RANTES immunoassay (Quantikine®)

Die humanen RANTES wurden aus Plasmaproben gemessen, wie bei den CD-40-Liganden handelt es sich um einen herkömmlichen ELISA. Die Einheit ist pg/ml. Der Messbereich befindet sich zwischen 0-7500 pg/ml.

2.4.4. Plasma NO_x-Konzentrationen

Die Plasmakonzentrationen des NO_x wurden mit kolometrischen assaykit gemessen, die die totale Nitrit/Nitratkonzentration in zwei Schritten gemessen haben (Cayman Chemical, USA). Der Messbereich befindet sich zwischen 10-50 mg/l.

2.4.5. Spektrometrische Quantifizierung des 8-iso-prostaglandins F_{2α} und seines Metaboliten 2,3-dinor-5,6-dihydro-8-iso-prostaglandin F_{2α} in menschlichem Urin

Um die Quantifizierung des Isoprostans und seines Metaboliten durchführen zu können, wurde zunächst die high-performance-liquid-chromatography und danach die Dünnschicht-Chromatographie angewendet. Aufgrund der Kombination der beiden Methoden wird die Bestimmung am zuverlässigsten aus dem menschlichen Urin erlaubt (Tandem-Methode).

Biologische Proben: Urin wird aus einer Spontanmiktion von gesunden Erwachsenen gewonnen und in Polypropylenbechern gesammelt und sofort mit 1mM 5-hydroxy-tempo (HTMP) und Ethylenediaminetetrasäure versetzt. Der gesammelte Urin wird in

5 ml-Gefäße pipettiert und bei -20°C tief gefroren. Der Kreatinin-Wert wird spektrophotometrisch mit einer automatischen Messmaschine bestimmt (Beckmann, Galway, Ireland). Die Einheit der Isoprostane ist in pg/mg Kreatinin beschrieben, der Messbereich befindet sich zwischen 100-900 pg/mg.

2.5. Statistische Analyse

Der primäre Endpunkt der Studie war der Effekt von Clopidogrel verglichen mit Placebo auf die endotheliale Funktion, gemessen in der Antwort auf die Infusion von Acetylcholin über den intraarteriellen Katheter mit und ohne L-NMMA-Inhibition. Basierend auf vorherigen Studien kalkulierten wir die Probandenzahl mit einer Power von 90% und einem Signifikanzniveau von 0,05. Veränderungen der Exkretion von 8-Isoprostan-F2 war der sekundäre Endpunkt der Studie. Alle erhobenen Daten wurden mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test auf Normalverteilung überprüft. Normal verteilte Daten wurden als Mittelwerte \pm SEM dargestellt und mit dem ungepaarten oder gepaarten t-Test statistisch analysiert. Nicht normal verteilte Daten, dargestellt als Median mit Interquartilsabständen, wurden zunächst mit dem Wilcoxon's-Rank-Test für gepaarte Proben und später mit dem Mann-Whitney-U-Test für ungepaarte Proben analysiert. Alle Laborparameter wurden so statistisch untersucht. Unterarmflussmessungen, die durch Ach, SNP oder L-NMMA stimuliert wurden, wurden als Mittelwerte dargestellt. Um die Unterschiede des gesamten Dosis-Antwort-Verhältnisses bei Ach, SNP und L-NMMA unter ASS und Placebo sowie ASS und Clopidogrel zu vergleichen, wurde der ANOVA für wiederholte Messungen gewählt. Danach wurde eine Korrektur nach Bonferroni für wiederholte Messungen durchgeführt. Wir berechneten in einer statistischen Analyse die Fläche unter der Kurve (AUC) der Unterarmblutflusskurven auf Acetylcholin, L-NMMA und SNP.

Anschließend analysierten wir diese Blutflusskurven durch einen T-Test für verbundene sowie unverbundene Stichproben. Normalverteilte Daten wurden in Mittelwerten dargestellt. Basierend auf vorherigen Studien kalkulierten wir die Studienkollektivgröße mit einer Power von 90% und einem Signifikanzlevel von $p < 0,05$, sodass wir Delta mit 0,9 festsetzen. Die erhobenen Daten der Unterarmflussmessungen unterliegen einer Normalverteilung. Der Wert von $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant festgesetzt. Für die statistische Analyse sowie die dargestellten Abbildungen wurde die Software SPSS Version 13.0 (SPSS, Inc., Chicago, Illinois) benutzt. Unterschiede der verschiedenen Parameter wurden im Vergleich von ASS und Placebo mit Kombinationstherapie ASS und Clopidogrel auf statistische Signifikanz überprüft. Dazu nahmen wir den Wilcoxon-Test für gepaarte und den Mann-Whitney-U-Test für ungepaarte Stichproben. Ebenfalls getestet wurde die statistische Strukturgleichheit der Behandlungsgruppen. Der Wert von $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant festgesetzt.

III. Ergebnisse

3.1. *Patientenkollektiv*

In die prospektive Studie wurden 113 Patienten eingeschlossen, die im Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf zur weiteren Evaluierung und Behandlung einer bereits bekannten koronaren Herz-erkrankung vorstellig wurden. Durch 3:1 Randomisierung ergaben sich zwei Gruppen von Patienten. Alle Patienten standen unter einer Dauertherapie mit Acetylsalicylsäure 100mg. Neun Probanden mussten aus der Studie ausgeschlossen werden, da sie im fünfwöchigen Follow Up eine Beschwerdepogredienz erlitten und einer weiteren Abklärung und anschließender Ballondilatation mit Stent-Implantation unterzogen werden mussten. Ein Patient entzog nach der Untersuchung sein Einverständnis bezüglich der Untersuchung, sodass er aus der Studie ausgeschlossen werden musste. 103 Patienten haben wir in unsere abschließenden Auswertungen einbeziehen können und die Ergebnisse im Folgenden dargestellt. Es gab keine signifikanten Unterschiede in den Ausgangsvoraussetzungen beider Gruppen (Tabelle 1). Die Vormedikation beider Gruppen war vergleichbar und wurde abgesehen von der Thrombozyten-Aggregationshemmung während der Studiendauer nicht verändert. 77 Patienten mit symptomatischer Angina pectoris, die eine Aufsättigungsdosis von 300mg Clopidogrel erhielten und anschließend fünf Wochen mit Clopidogrel 75mg zusätzlich zu ASS 100mg therapiert wurden. 26 Patienten mit symptomatischer Angina pectoris, die zum Zeitpunkt der Randomisierung der Kontrollgruppe zugeteilt wurden und für die folgenden fünf Wochen mit Placebo therapiert wurden. Diese Patienten nahmen unverändert ihr ASS 100mg weiter ein und bekamen kein Clopidogrel.

3.1.1. Klinische Daten der untersuchten Patienten

Alter, LDL, HDL und BMI weisen ein $p > 0,05$ auf und unterliegen somit einer Normalverteilung, die nominalen Daten (Hypertonus, Nikotinabusus, Diabetes, ASS-Therapie, HMG-CoA-Reductasehemmer und MVD) sind signifikant $< 0,05$ im Kolmogorov-Smirnov-Test und unterliegen somit keiner Normalverteilung.

	p	ASS + Clopidogrel (n=77)	p	ASS + Placebo (n=26)
Alter	1,0	64 ± 4	1,0	65 ± 3
BMI (kg/m²)	0,579	25.8 ± 0.5	0,592	26.1 ± 6
Hypertonus	0,872	34 (44)	0,871	12 (46)
Raucher n (%)	0,933	29 (38)	0,932	8 (31)
Diabetes mellitus n (%)	0,918	18 (23)	0,917	6 (23)
Cholesterin (mg/dl)		188 ± 7		189 ± 8
LDL (mg/dl)	0,679	110.7 ± 4	0,69	112.1 ± 6
HDL (mg/dl)	0,127	53 ± 2	0,101	55.4 ± 2
TG (mg/dl)	0,871	163.3 ± 9	0,883	165 ± 9
Betablocker n (%)	0,421	56 (73)	0,437	20 (77)
ACE-Hemmer/ AT1-Blocker	0,874	46 (60)	0,873	16 (62)
Ca-Antagonist n (%)	0,709	16 (21)	0,697	6 (23)
Aspirin n (%)	1,0	77 (100)	1,0	26 (100)
HMG-CoA-Reductase-Hemmer n (%)	0,855	57 (74)	0,933	20 (77)
Multivessel disease n (%)	0,539	36 (47)	0,539	10 (39)

Tabelle 7:

Die Daten sind als Mittelwerte ± Standardabweichung dargestellt oder n (%). BMI beschreibt den Body-Maß-Index; ACE-Hemmer meint Angiotensin-Converting-Enzym-Inhibitoren und AT-1-Blocker die Angiotensin-1-Rezeptor-Antagonisten.

Statistische Relevanz wurde mit dem t-Test für normal verteilte Variablen und mit dem Mann-Whitney-U-Test für nicht normal verteilte Variablen errechnet.

3.2. Beeinflussung der Endothel-Funktion

3.2.1 Beeinflussung bei Patienten mit Acetylsalicylsäure und Clopidogrel

Der primäre Endpunkt der Studie war der Effekt von Clopidogrel verglichen mit Placebo auf die endotheliale Funktion, gemessen in der Acetylcholin-Reaktion mit sowie ohne L-NMMA-Inhibition der NO-Synthase.

Zu Beginn der Untersuchungen zeigten sich vergleichbare Unterarmblutflüsse, nämlich 3 ml/100ml/Min., in beiden Untersuchungsgruppen.

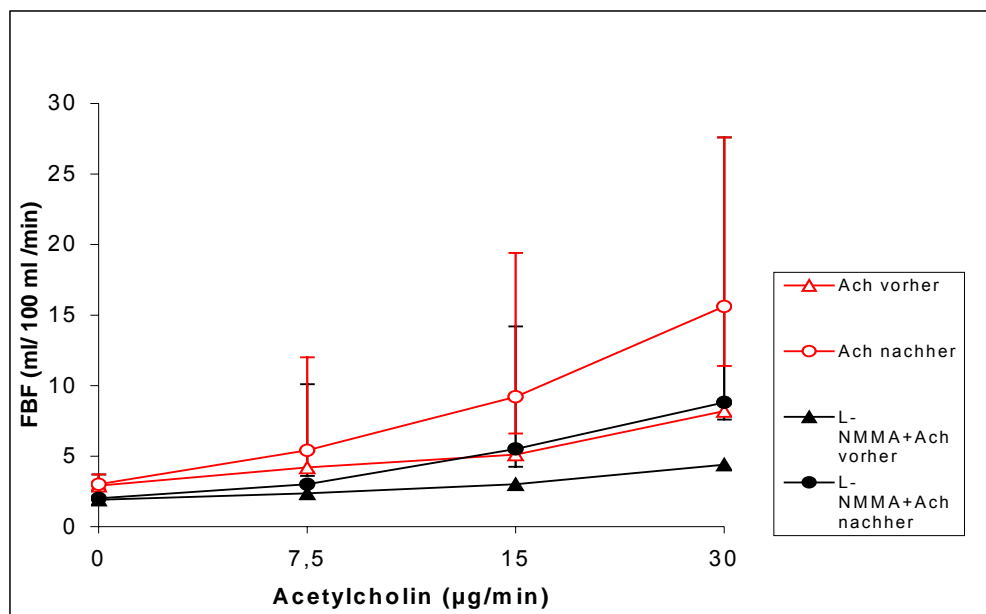


Abbildung 8:

Die Abbildung zeigt Patienten mit Angina pectoris unter der Kombinationstherapie ASS mit Clopidogrel und dem erzielten Effekt auf die endothel-abhängige Vasodilatation mit Acetylcholin in der Unterarmflussmessung, sowie die Stimulation des Endothels durch Mono-Methyl-L-Arginin (L-NMMA) und Acetylcholin.

In Abbildung 8 ist die endothel-abhängige Blutflusssteigerung nach fünfwöchiger Therapie mit ASS und Clopidogrel dargestellt. Die schwarz ausgefüllte Graphierung der Abbildung zeigt die Reaktion des Unterarmblutflusses auf Acetylcholin und L-NMMA.

Der ACH-stimulierte Blutfluss ist nur bei der Patientengruppe signifikant angestiegen, die mit ASS und Clopidogrel behandelt worden war (Abb. 8). Bei der anderen Patientengruppe, die mit ASS und Placebo für fünf Wochen behandelt worden war, ist keine signifikante Blutflusssteigerung nach Infundierung gefäßwirksamer Substanzen zu erkennen.

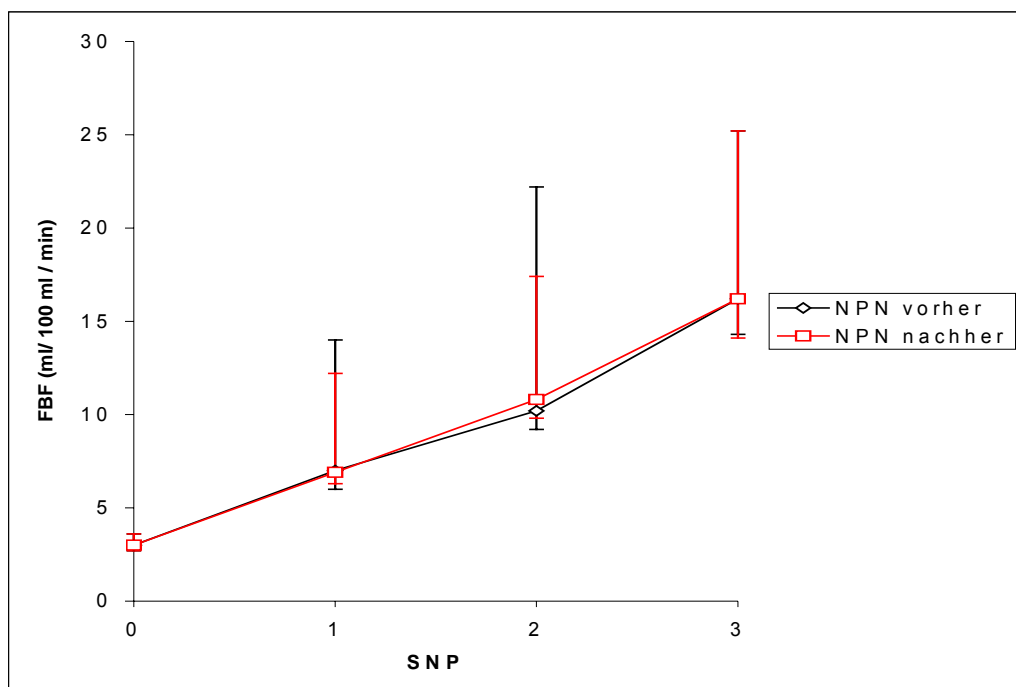


Abbildung 9:

Es stellt sich der endothel-unabhängige Unterarmblutfluss auf Nitroprussid-Natrium bei Patienten, gezeigt sind Mittelwerte, dar. Es zeigten sich keine signifikanten Veränderungen der Blutflüsse nach der fünfwöchigen Therapie in den Gruppen mit ASS und Clopidogrel nach fünfwöchiger Behandlung.

3.2.2. Ergebnisse der Gruppe mit ASS und Placebo

Es wurden die Resultate der Baseline mit den Ergebnissen aus dem Follow Up nach fünf Wochen Therapie mit ASS und Placebo im ANOVA für wiederholte Messungen miteinander verglichen. Es zeigte sich keine signifikante Verbesserung des Unterarmblutflusses unter einer Therapie mit ASS und Placebo in ansteigenden Dosisstufen des Acetylcholins.

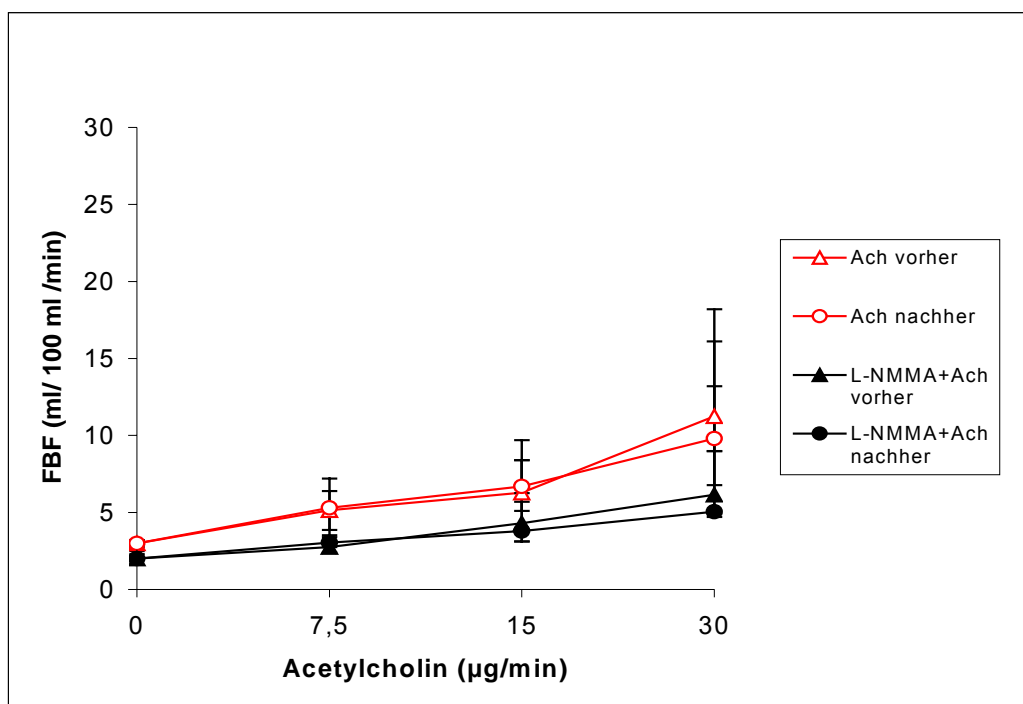


Abbildung 10:

Es stellt sich die Wirkung der Kombinationstherapie von ASS und Placebo auf die Funktion der Unterarmarteriolen nach Stimulation mit der endothel-abhängigen Gefäßfunktionsprüfung mit Acetylcholin dar. Es ist keine signifikante Verbesserung des Blutflusses in der A. brachialis durch Dosissteigerung des Acetylcholins nachweisbar, eine signifikante Verbesserung der Endothel-Funktion zu Beginn der Therapie (Baseline) sowie nach fünfwöchiger Einnahme von ASS und Placebo (Treatment) ist nicht nachzuweisen. Im unteren Teil der Abbildung ist der endothel-abhängige Blutfluss nach fünfwöchiger Therapie mit ASS und Placebo dargestellt, gezeichnet sind Mittelwerte, die Stimulation des Endothels als direkte Gefäßreaktion auf den NO-Inhibitor L-NMMA in Kombination mit Acetylcholin von Patienten unter Therapie mit ASS und Placebo. Es zeigten sich keine Veränderungen des Blutflusses vor und nach der Behandlung mit ASS und Placebo. In der statistischen Analyse der Area under the curve zeigte sich ebenfalls keine signifikante Verbesserung (AUC 77 ± 18 vs. 84 ± 16).

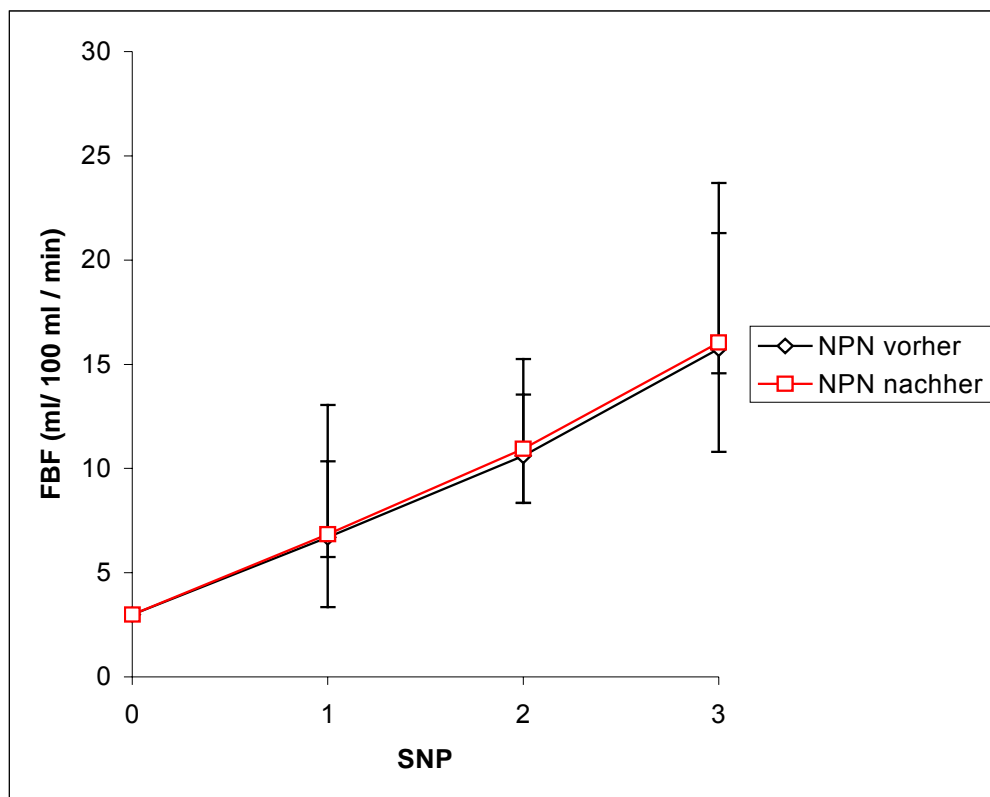


Abbildung 11:

Endothel-unabhängige Stimulation durch Nitroprussid-Natrium, dem NO-Synthase unabhängigen Gefäßdilator vor und nach fünfwöchiger Therapie mit ASS und Placebo. Es ist keine Verbesserung des Unterarmblutflusses nach der fünfwöchigen Therapie mit ASS und Placebo erkennbar. Die Darstellung erfolgte mit Mittelwerten.

Sekundäre Endpunkte der Studie waren Veränderungen der Blutparameter hs-CRP, CD-40-Liganden, RANTES sowie die Ausscheidung von 8-Iso-Prostaglandin-F2 α :

3.3. Effekte auf die biochemischen Parameter

3.3.1. Wirkungen auf das hs-CRP

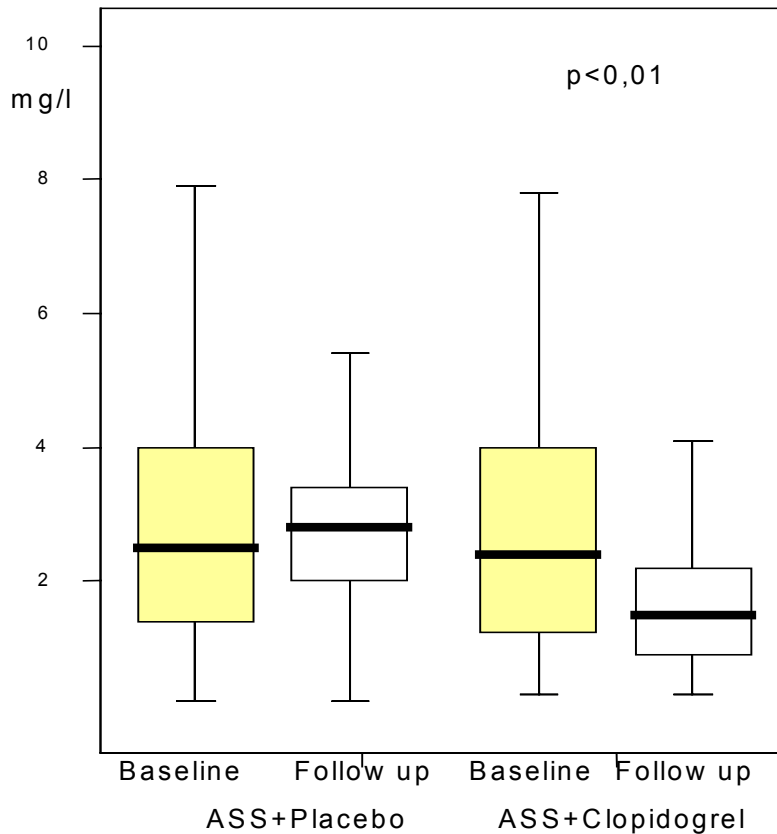


Abbildung 12:

Veränderungen der Konzentration des hs-CRP im Plasma bei Patienten mit ASS und Placebo vs. Patienten mit ASS und Clopidogrel, es handelt sich um Median, Interquartilsabstände, und Extremwerte; $p < 0,01$.

Nach einem fünfwöchigen Behandlungsintervall war das hs-CRP signifikant reduziert bei Patienten unter Kombinationstherapie mit ASS und Clopidogrel ($p < 0,01$), in der Vergleichstherapie zeigte sich keine signifikante Verbesserung ($p = 0,57$). Es wurde der Wilcoxon-Test für gepaarte Stichproben durchgeführt. Auch im Vergleich der Gruppen zwischen ASS und Placebo und ASS und Clopidogrel vorher ($p = 0,827$) bzw. ASS und ASS und Clopidogrel nachher ($p = 0,004$) zeigten sich keine signifikanten Unterschiede.

3.3.2. Auswirkungen auf sCD-40-Liganden

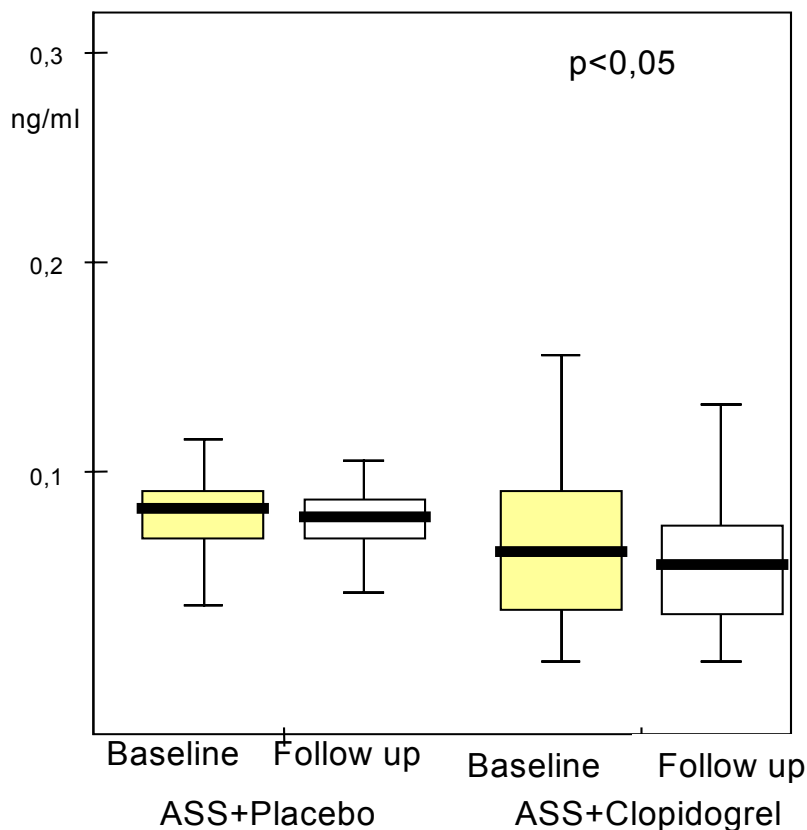


Abbildung 13:

Es stellen sich Veränderungen der Plasmaspiegel für sCD-40-L bei Patienten mit ASS/Plavix vs. Patienten mit ASS und Clopidogrel Vergleichs-(n=26) bzw. Kombinationstherapie (n=76) auf die CD-40-Ligandenkonzentration im EDTA-Blut (ng/ml) dar. Gegeben sind Median, Interquartilsabstände und Extremwerte.

Nach der fünfwöchigen Kombinationstherapie mit ASS und Clopidogrel fiel die sCD-40L-Konzentration signifikant ab ($p < 0,05$), die Behandlung mit ASS und Placebo bewirkte keine signifikanten Veränderungen der Blutkonzentration ($p = 0,374$). Eine vergleichende Statistik im Mann-Whitney-U-Test mit den Anfangs- und Endgruppen ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Kollektiven zu Beginn der Studie ($p < 0,05$) und zu

Studienabschluss zwischen beiden Patientengruppen untereinander ($p < 0,05$).

3.3.3. Effekte auf RANTES

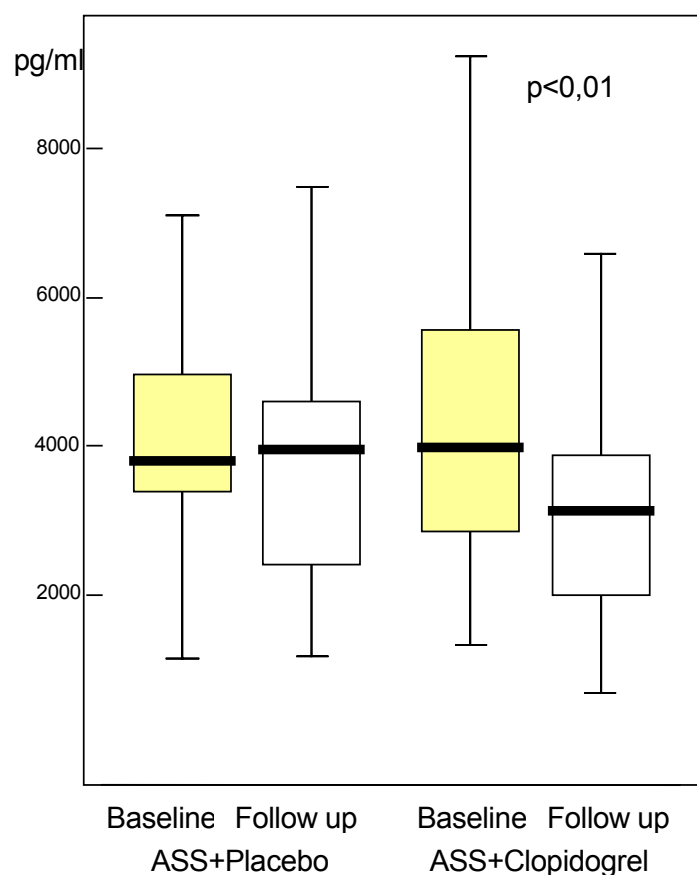


Abbildung 14:

Veränderungen der Plasmakonzentrationen von RANTES bei Patienten mit ASS und Plavix vs. Patienten mit ASS und Clopidogrel. Gegeben sind Mediane mit Interquartilsabständen, Ausreißer und Extremwerte.

Nach der fünfwöchigen Standardtherapie mit ASS und Placebo zeigte sich keine signifikante Veränderung der RANTES-Konzentration im Blut des Kontrollkollektivs ($p=0,667$). In der Kombinationstherapie hingegen beobachteten wir eine signifikante Verminderung des Parameters im Plasma ($p < 0,01$).

3.3.4. Auswirkungen auf die NOx-Konzentration

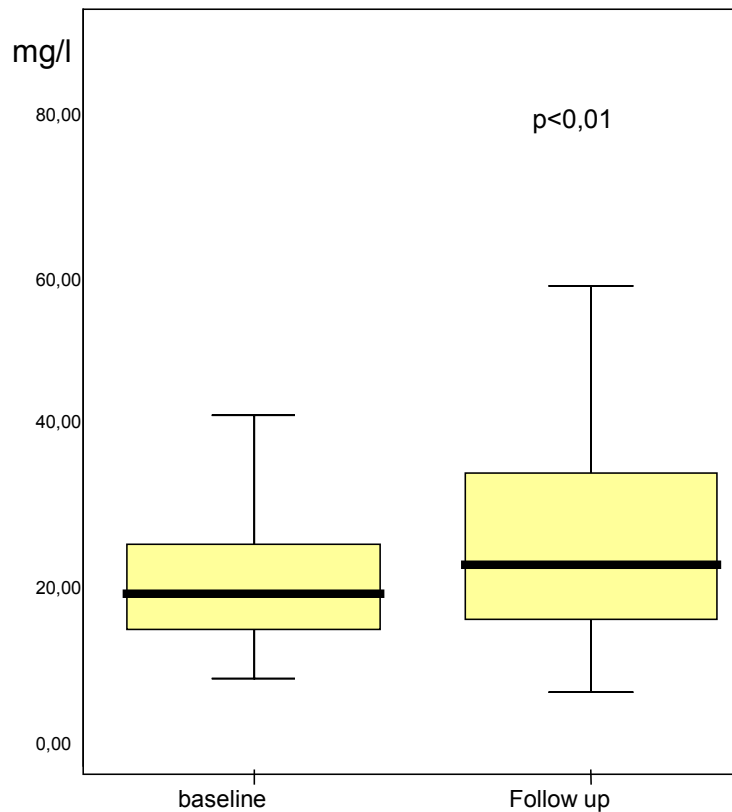


Abbildung 16:

Es stellt sich die NOx-Konzentration der Patienten dar, die mit ASS sowie Clopidogrel behandelt worden waren. Die NOx-Verfügbarkeit ist signifikant verbessert.

3.3.5. Isoprostane im Urin

Die Eingangsgruppen beider Patientenkollektive zeigten keine signifikant gleiche Exkretion des Isoprostans ($p=0,924$), wohingegen gegen Ende der Studie die Exkretion des Isoprostans im Urin der beiden Patientenkollektive nicht mehr signifikant unterschiedlich war ($p < 0,001$).

Ergebnisse

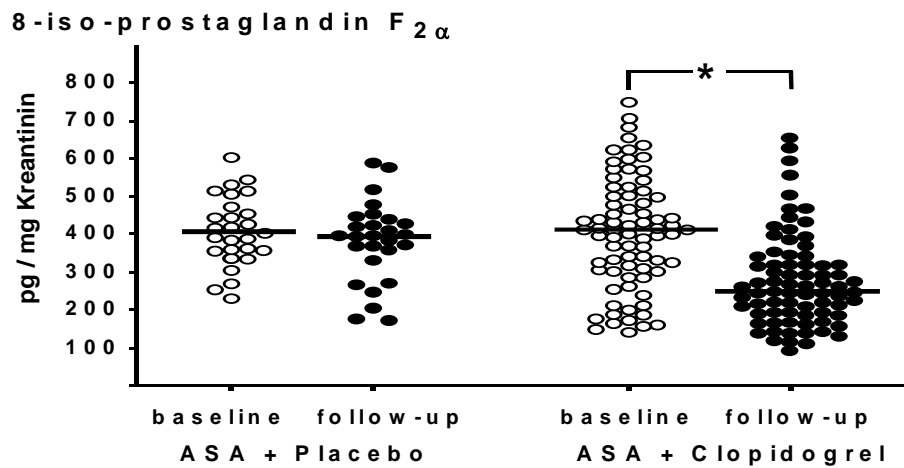
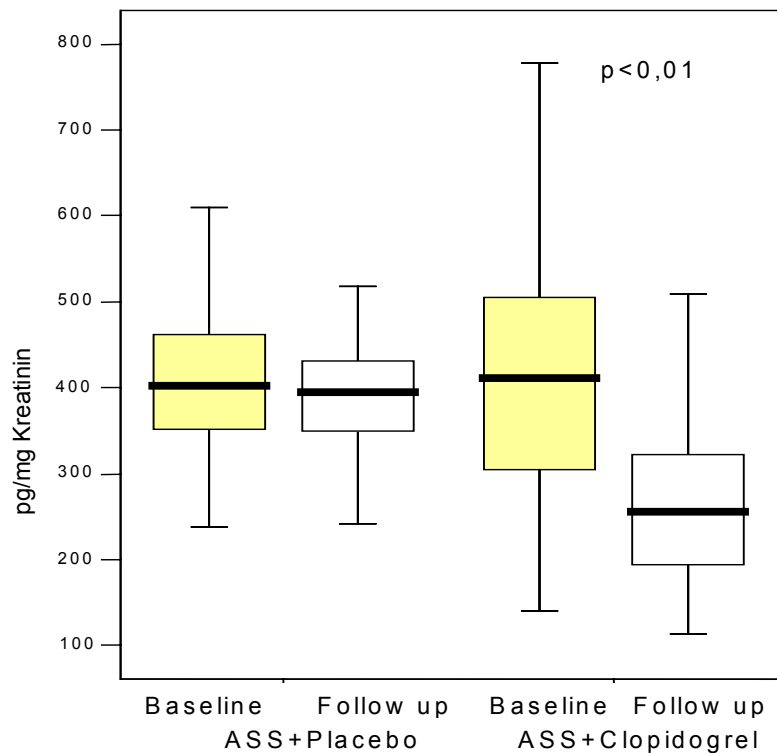


Abbildung 17+18:

Diese Abbildungen erläutern die Ausscheidung des Isoprostans 8-Iso-Prostaglandin- $F_{2\alpha}$ (pmol/mmol Kreatinin) im Urin beider Patientengruppen. Gegeben sind Median, Interquartilsabstände und Extremwerte.

IV. Diskussion

4.1. Endothelabhängige Vasodilatation, und Interaktion mit Thrombozyten

Die vorliegende Untersuchung zeigt, dass eine ADP-Rezeptorblockade der Thrombozyten durch Clopidogrel positive Effekte auf die systemische NO-Bioverfügbarkeit bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit bewirkt. Diese Befunde unterstützen das Konzept, dass abnorme Thrombozyten-Endothel-Interaktionen entscheidend zur endothelialen Dysfunktion beitragen. Es mehren sich die Hinweise, dass Thrombozyten-Aktivierung und- Aggregation nicht nur Initiatoren des akuten Koronarsyndroms sind, sondern auch eine wesentliche Rolle im Entzündungsgeschehen und Endothel-Läsionen einnehmen. Thrombozyten-Expression gekoppelt mit inflammatorischen Mediatoren induziert die endotheliale Aktivierung und Sekretion von Zytokinen, sodass sich ein akutes lokales Entzündungsgeschehen entwickelt (Malat, 2002). Interessanterweise konnte kürzlich gezeigt werden, dass dieses lokalisierte Entzündungsgeschehen eine verschlechterte endothelabhängige Vasodilatation in der menschlichen mikrovaskulären Zirkulation bedingt (Hingorani, 2000). In atherosklerotischen Koronarien sind sowohl die basale als auch die stimulierte Freisetzung von NO vermindert (Chester, 1990). Das bedeutet aber auch, dass die hemmende Wirkung von NO auf die Thrombozyten-Aggregation bei diesen Patienten reduziert ist. Endothel-Dysfunktion und verminderte NO-Bioverfügbarkeit, wie sie bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit vorkommen, prädisponieren offenbar zu ungünstigen Wechselwirkungen zwischen Endothelzellen und Thrombozyten sowie mit gestörter Thrombozyten-Aktivierung und gesteigerter Vasokonstriktion. Die endotheliale Dysfunktion ist durch eine verminderte Bioverfügbarkeit von NO charakterisiert und beschreibt das erste

messbare Korrelat für das Frühstadium einer Atherosklerose. Die pharmakologische Hemmung der GP-IIb/IIIa-Rezeptorenaktivierung der Thrombozyten inhibiert nicht nur die Thrombozyten-Aggregation, sondern reduziert auch das inflammatorische Geschehen während eines akuten Koronarsyndroms (Lincoff, 2001). Zudem zeigten kürzlich veröffentlichte Ergebnisse einen positiven Effekt durch die GP-IIb/IIIa-Rezeptorenhemmung auf die endotheliale Funktion und NO-Bioverfügbarkeit (Heitzer, 2003; Warnholtz, 2005). Dieser Sachverhalt lässt sich durch zahlreiche Interaktionen zwischen den Endothelzellen und den Thrombozyten erklären. So wird beispielsweise das NO von den Thrombozyten, aber auch den Endothelzellen selbst gebildet. Ferner werden Thrombozyten durch Substanzen gehemmt, die von den Endothelzellen produziert und in das fließende Blut sezerniert werden. Zu diesen gehören die vasodilatatorisch wirkenden Substanzen Prostacyclin sowie NO. ADP und ATP, aus aktivierten Thrombozyten freigesetzt, führen zur arteriellen Vasodilatation. Thromboxan-A₂, Serotonin (Cohen, 1995) oder freie Sauerstoffradikale (Houston, 1986) werden ebenso von Thrombozyten gebildet, führen aber bei gestörter Endothel-Funktion oder Entfernung des Endothels (Furchgott, 1980) zu einer Vasokonstriktion. Außerdem gibt es einige Faktoren im fließenden Blut, die sich auf die Thrombozyten-Aggregation direkt wie auch indirekt auswirken. Zu diesen gehören beispielsweise vWF, tissue-type-Plasminogen-Activator (t-PA), Plasminogen-Activator-Inhibitor (PAI-1) u.a. (Gawaz, 2004). Dem ist zu entnehmen, dass es bei der vollen Funktionsfähigkeit des Endothels auf eine ausgeglichene Funktionsweise der genannten Mediatoren ankommt. Existiert ein Ungleichgewicht dieser vasokonstriktiv und vasodilatatorisch wirkenden Substanzen, so bildet sich eine Störung des Systems aus, die vasokonstriktorisch

wirkende Komponente kann überwiegen und es kommt zu einer endothelialen Dysfunktion.

Clopidogrel ist ein Thienopyridin, das durch die Hemmung des Adenosin-Diphosphatrezeptors wirkt, und das sich bereits durch positive Effekte bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom ausgezeichnet hat (Mehta, 2001). Kürzlich konnte in experimentellen Studien gezeigt werden, dass Clopidogrel auch anti-inflammatorische Effekte aufweist (Hermann, 2001; Molero, 2005). Ob durch den Einsatz von ADP-Rezeptorantagonisten die Endothel-Funktion auch unabhängig von Thrombusbildung und Koronarinterventionen verbessert werden kann und welche Mechanismen diesem zugrunde liegen, ist bis zum jetzigen Zeitpunkt noch ungeklärt.

Mit den vorliegenden Ergebnissen können wir zeigen, dass die Acetylcholin-induzierte endothel-abhängige Vasodilatation peripherer Widerstandsgefäße bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung durch die Gabe von ADP-Rezeptorantagonisten signifikant gesteigert werden kann. Da durch Acetylcholin-Infusion außer NO auch andere Vasodilatoren wie Prostacyclin und EDHF aus dem Endothel freigesetzt werden, wurde zusätzlich der Effekt einer selektiven NOS-Inhibierung mit L-NMMA untersucht. Damit lässt sich prüfen, welcher Anteil an der gesamten Acetylcholin-induzierten Blutflusszunahme durch NO vermittelt wird. Nach der Kombinationsbehandlung mit Acetylsalicylsäure und Clopidogrel kam es während der Infusion von L-NMMA zu einer deutlich stärkeren Hemmung der Acetylcholin-stimulierten Vasodilatation. Somit ist der beobachtete positive Effekt auf die endothel-abhängige Vasodilatation zum großen Teil auf eine gesteigerte NO-Bioverfügbarkeit zurückzuführen. Kürzlich konnten wir zeigen, dass die akute Blockade von GP-IIb/IIIa-Rezeptoren die endotheliale Funktion und Bioverfügbarkeit von NO bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung verbessert (Heitzer, 2003). Diese

Ergebnisse demonstrierten die wichtige Rolle von abnormalen Thrombozyten-Endothel-Interaktionen und ließen vermuten, dass die ADP-Rezeptor-blockade durch Clopidogrel ähnliche positive Effekte auf die endotheliale Funktion aufweisen könnte. Vergleichbar mit vorhergehenden Studien wurden Patienten mit symptomatischer koronarer Herzerkrankung in die Untersuchung einbezogen. Im Vergleich zur Ausgangsuntersuchung zeigten sich eine signifikant verbesserte endothel-abhängige Vasodilatation auf Acetylcholin sowie eine reduzierte Vasodilatation auf den NO-Synthase-Inhibitor L-NMMA, welches sich durch eine systemisch reduzierte Bioverfügbarkeit von NO erklären lässt (Heitzer, 2003; Heitzer, 2001; Fichtlerer, 2000). Beim Follow Up nach fünf Wochen zeigte sich in der Acetylcholin-induzierten endothel-abhängigen Vasodilatation und der durch den NO-Synthasehemmer L-NMMA induzierten Reduktion des Unterarmblutflusses eine signifikante Verbesserung nach der zusätzlichen Behandlung mit Clopidogrel. Keine Verbesserung des endothel-abhängigen Blutflusses oder der NO-Inhibition durch L-NMMA zeigte sich hingegen bei den Patienten, die mit Acetylsalicylsäure-Monotherapie behandelt worden waren. Da in der endothel-unabhängigen Vasodilatation durch Nitroprussid-Natrium keine Veränderung gezeigt werden konnte, lassen die gezeigten Befunde vermuten, dass die ADP-Rezeptor-blockade an Thrombozyten vor abnormalen Thrombozyten-Endothel-Interaktionen schützt und nicht nur eine unspezifische Interaktion der Thrombozyten mit der Blutgefäßwand vorliegt. So findet sich eine Bestätigung unserer Ergebnisse in einer kürzlich veröffentlichten Untersuchung von Warnholtz et al. (Warnholtz, 2007). Diese Arbeitsgruppe zeigte, dass eine Verbesserung der Endothelfunktion schon nach der Einmalgabe der loading dose von 300 bzw. 600 mg Clopidogrel festzustellen ist.

4.2. Thrombozyten und Inflammation

Physiologisch sind Thrombozyten 0,5-1 µm kleine kernlose Blutplättchen, die frei im Blut zirkulieren und deren primäre Funktion die Regulation zwischen Thrombosen und der Hämostase ist. Während der Aktivierung der Thrombozyten kommt es zur Expression des Oberflächenmoleküls CD-40-Ligand (CD-40-L), das sonst im Inneren verborgen bleibt. Es handelt sich um ein transmembranes Protein, welches strukturell mit dem Zytokin Tumor-Nekrose-Faktor-α verwandt ist und ursprünglich auf CD-4 positiven T-Zellen identifiziert wurde. Außerdem besitzt es eine proinflammatorische Komponente. In dem es an den CD-40-Rezeptor an Endothelzellen bindet und die Expression bereits genannter Chemokine, Zytokine und Adhäsionsmoleküle hervorruft, fördert es die Progredienz von kardiovaskulären Erkrankungen (Henn, 1998). Ferner regen CD-40-Liganden die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies in den Endothelzellen an. Aufgrund dieses oxidativen Stresses wird endotheliales NO vermindert von der NO-Synthase gebildet und es kommt zur endothelialen Dysfunktion. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass diese kleinen zellkernlosen Zellen einen entscheidenden Pathomechanismus zwischen Thrombosen einerseits und Entzündungsgeschehen andererseits darstellen. So zeigen einige neue Untersuchungen die Verbindung zwischen einer Aktivierung des Endothels und der Progression der endothelialen Dysfunktion. So setzen die Thrombozyten aus ihrem Inneren nach Ihrer Aktivierung Chemokine und Zytokine als Zeichen ihrer proinflammatorischen Aktivität in Ihre Umgebung frei und beginnen somit einen inflammatorischen Prozess zwischen aktivierten Thrombozyten und der entzündlichen Antwort der Endothelzellen (Henn,1998; Huo, 2003; Lindemann, 2001; Aukrust, 1999; Nannizi-Allaimo, 2003). Einer der wichtigsten inflammatorischen Thrombozyten-Mediatoren ist der CD-40-Ligand. Erhöhte CD-40-Ligand-Konzentrationen

wurden bei Patienten mit symptomatischer koronarer Herzerkrankung gemessen (Aukrust, 1999). Vorangehende Studien zeigten, dass die Blockade von GP-IIb/IIIa-Rezeptoren die Freisetzung von CD-40-Liganden hemmt (Nannizi-Alaiamo, 2003; Furman, 2004). Auf einem ähnlichen pathophysiologischen Mechanismus inhibiert Clopidogrel die ADP-abhängige Expression des CD-40-Liganden an der Oberfläche der aktivierten Thrombozyten durch die Blockade des P2Y₁₂-ADP-Rezeptors (Hermann, 2001; Quinn, 2004). In den vorliegenden Befunden zeigte sich, wie in anderen Untersuchungen auch, eine signifikante Reduktion der Plasmakonzentrationen des sCD-40-Liganden nach der zusätzlichen Therapie mit Clopidogrel (Molero, 2005; Xiao, 2004).

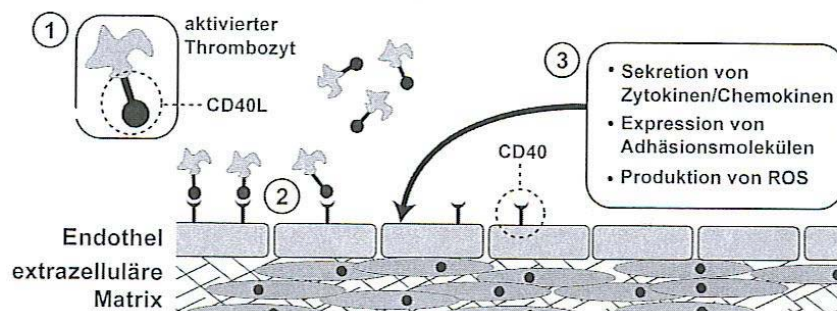


Abbildung 19:

Modell der CD40 L-induzierten proinflammatorischen und proatherogenen Wirkungen auf das Endothel. 1. Die Aktivierung der Thrombozyten führt zur Expression des Oberflächenmoleküls CD-40-L. 2. Durch Interaktion zwischen thrombozytärem CD-40-L und endotheliale CD40 kommt es 3. zur Expression von Zytokinen, Chemokinen und Adhäsionsmolekülen, die inflammatorisch wirken und so die Entstehung atherosklerotischer Prozesse fördern (Henn, 1998). CD-40-L stimuliert außerdem das Endothel zur Bildung von ROS, die wesentlich zur Endothel-Dysfunktion beitragen (Urbich, 2002).

Zudem exprimieren und sezernieren die aktivierten Thrombozyten das proinflammatorisch wirkende Chemokin RANTES, das als Signal für einen vermehrten Einstrom von Monozyten an entzündetem und aktiviertem Endothel fungiert (von

Hundelshausen, 2001; von Hundelshausen, 2005; Molero, 2005). RANTES ist ein Mitglied der C-C-Subfamilie der β -Chemokine. Sie sind kleine Proteine, die die Chemotaxis verschiedener Zellreihen mit Hilfe von bestimmten Rezeptoren induzieren (Clemetson, 2005). Es wird in den Granula der Thrombozyten gespeichert und bei deren Aktivierung ins Blut freigesetzt. So kann ihre Funktion als Marker der Thrombozyten-Aktivierung betrachtet werden. Es steuert das Zirkulieren und den Adhäsionsprozess verschiedener Zellarten, wie Monozyten, Lymphozyten, Killerzellen, Mastzellen und Blutplättchen, wenn sie an einer beschädigten Endothel-Fläche hängen bleiben. Kürzlich wurde herausgefunden, dass RANTES eine Schlüsselrolle in der Progression der Atherosklerose, Makrophagen-Akkumulation und Intima-Proliferation einnimmt (Prescott, 2002). Es tritt bei inflammatorischen Geschehnissen der Blutgefäße auf, denn aktivierte Thrombozyten exprimieren Oberflächenrezeptoren wie CD-40-L und setzen entzündliche Chemokine in ihre Umgebung frei, zum Beispiel RANTES. Thrombozyten interagieren mit entzündeten Endothelzellen und sezernieren RANTES aus intrazellulären Granula an die Endothel-Oberfläche. Dieser Pathway stellt ein Signal an die Monozyten dar, sodass diese sich an die geschädigte Zellschicht anlagern. Die Änderung der Oberflächenbeschaffenheit der Endothelzellen wird durch IL-1 bewirkt, so dass RANTES den Monozyten präsentiert werden kann. Kürzlich wurde gezeigt, dass der GP-IIb/IIIa-Rezeptorantagonist Eptifibatide die EDTA- und Plasmablutspiegel von RANTES, aber auch CD-40-L signifikant nach PTCA senkte (Welt, 2004). Diese Befunde legen nahe, dass eine suffiziente Hemmung der Thrombozyten-Aktivierung eine inflammatorische Komponente der Thrombozyten-Endothel-Interaktion und daraus resultierend der endothelialen Dysfunktion verbessert. Die Plasmaspiegel von RANTES waren signifikant reduziert bei

unseren Patienten, die mit Clopidogrel zusätzlich zur Acetylsalicylsäure behandelt worden waren. Da RANTES eine wichtige Rolle als thrombozyten-abhängiges Signal für die Monozyten-Aktivierung zu spielen scheint, könnte dieser Befund eine der biochemischen Verbindungen zu dem beobachteten inhibitorischen Effekt von Clopidogrel auf die Thrombozyten-Leukozyten-Interaktionen und zirkulierenden Thrombozyten-Leukozyten-Aggregaten spielen (Xiao, 2004).

In der vorliegenden Untersuchung zeigte sich zudem, dass die Behandlung mit Clopidogrel die hs-CRP-Spiegel im Blut senkte. Hs-CRP ist ein äußerst sensitiver Marker, der ein systemisches Inflammationsgeschehen anzeigt und als prognostischer Indikator für die koronare Herzerkrankung fungiert (Libby, 1999). Es ist ein Akute-Phasen-Protein. So wurde kürzlich gezeigt, dass Patienten mit akutem Koronarsyndrom und instabiler sowie stabiler Angina pectoris signifikant höhere hs-CRP-Spiegel im Plasma haben als die entsprechenden Kontrollen, die glattwandige Koronarien aufwiesen (Nijm, 2005). Nijm et al. untersuchten in der gleichen Studie weitere Entzündungsindikatoren, wie etwa die Zytokine Interleukin 1 und Interleukin 6, die ebenfalls positiv mit dem Geschehen in den Herzkranzgefäßen korrelierten. Vermutlich handelt es sich um eine wichtige Interaktion zwischen Thrombozyten und Neutrophilen und einem proinflammatorischen Geschehen bei stabiler und instabiler Angina pectoris. Weiterhin konnten sie zeigen, dass es aufgrund dieser Interaktionen zu einer Aggregation der Zellkomplexe zwischen Thrombozyten und Leukozyten kommt. Aufgrund dieser Untersuchungsergebnisse vermuten die Autoren einen engen Zusammenhang zwischen Inflammationsgeschehen und Thrombosen. Weitere Befunde wiesen einen direkten Zusammenhang zwischen dem CRP im Serum der Gefäßfunktion der koronaren epikardialen sowie arteriolären Blutgefäße auf. So zeigte sich zudem, dass durch den

systemischen Entzündungseffekt die Vasomotorik und somit die endotheliale Funktion geschädigt wird (Schindler, 2004). Zudem zeigten kürzlich veröffentlichte Ergebnisse einen wichtigen Zusammenhang zwischen einem pro- und antiinflammatorischen Ungleichgewicht (hs-CRP und IL-10-Serum-spiegel) bei generalisierter verschlechterter endothelialer Funktion und NO-Bioverfügbarkeit bei der koronaren Herzkrankheit (Fitchlerer, 2000; Fitchlerer, 2004). Unsere Untersuchungsbefunde zeigten wie in den vorangehenden Studien eine signifikante Verbesserung der endothelialen Funktion bei reduzierten hs-CRP-Serum-spiegeln. Somit ergibt sich zusammenfassend, dass vermutlich eine gesteigerte thrombozytäre Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) im Rahmen einer inflammatorischen Aktivierung der Thrombozyten zusammen mit einer verminderten NO-Bioverfügbarkeit zu einer abnormen Thrombozyten-Endothel-Interaktion bei Patienten mit symptomatischer koronarer Herzkrankheit führen. Zusätzlich kommt es zu einer Hemmung der endothelialen NO-Aktivität, die die Endothel-Dysfunktion verstärkt. Durch die mögliche Hemmung der ADP-Rezeptor-assoziierten Thrombozyten-Aggregation könnte man so die thrombozytäre ROS-Freisetzung vermindern und gleichzeitig durch diesen Pathomechanismus die endotheliale NO-Verfügbarkeit erhöhen, indem die NO produzierende NO-Synthase vor einer Enzymhemmung durch reaktive Sauerstoffradikale geschützt wird. Dieses Konzept ist bereits in einer früheren Untersuchung bei der Hemmung der GP-IIb/IIIa-Rezeptoren gezeigt worden. Hier konnte durch die GP-IIb/IIIa-Rezeptorblockade auf der einen Seite die thrombozytäre Ausschüttung von ROS vermindert und andererseits die thrombozytäre Freisetzung von NO gesteigert werden (Chakrabatti, 2004).

4.3. Aktivierte Thrombozyten und oxidativer Stress

Um den Status des oxidativen Stresses in vivo zu bestimmen, hat sich die Untersuchung von F₂-Isoprostan- α im Urin etabliert (Schwedhelm, 2004; Morrow, 2005). 8-iso-Prostaglandin-F₂ α werden von Zellmembranen gebildet, durch die Einwirkung von freien Sauerstoffradikalen freigesetzt, anschließend zirkulieren sie im Blut und schließlich durch den Urin ausgeschieden. Sie sind Isoprostane und werden durch freie Radikale aus oxidiertem LDL gebildet, wobei sie chemisch stabile Substanzen sind. Isoprostane zirkulieren als Ester der LDL bei Patienten mit Hypercholesterinämie (Lawson, 1999), wobei bei Patienten mit Hypercholesterinämie das LDL-Cholesterin der am höchsten positiv korrelierende Parameter für oxidativen Stress ist. Isoprostane sind freie, durch Radikale katalysierte Produkte aus Arachidonsäuren der Lipidperoxidation in vivo und können noninvasiv in menschlichem Urin mit der Gas-Chromatographie gemessen werden.

Zusammenfassend ist die 8-iso-Prostaglandin-F₂ α -Ausscheidung im Urin ein unabhängiger und sensitiver Risikomarker für die koronare Herzerkrankung, die mit Hypertonus, Diabetes mellitus, Hypercholesterinämie und erhöhten hs-CRP-Werten im Blutplasma assoziiert ist (Schwedhelm, 2004). Die Urinexkretion des Isoprostans 8-iso-prostaglandin-F₂ α ist ein Marker für oxidativen Stress, der auf die Blutgefäße in vivo einwirkt (Caterina, 2002). Die Lipidperoxidation wird durch freie Sauerstoffradikale der Zellmembranen und LDL-Partikel katalysiert. Die Zellbestandteile, vor allem aber das 8-iso-Prostaglandin-F₂ α , initiieren eine periphere Vasokonstriktion und eine gesteigerte Plättchenaktivität (Lawson, 1999). Eine erhöhte Ausscheidung von 8-iso-prostaglandin-F₂ α im Urin ist in einigen klinischen Studien mit kardiovaskulären Risikofaktoren wie Diabetes mellitus (Davi, 1999), Rauchen (Reilly, 1999) und Hypercholesterinämie (Reilly,

1998) beobachtet worden. Diese Resultate unterstreichen die Wichtigkeit der Exkretion des 8-iso-Prostaglandin-F₂ α als noninvasiven, quantitativen Parameter für die Bestimmung des oxidativen Stresses in vivo.

In der vorliegenden Untersuchung beobachteten wir eine signifikante Reduktion der F₂-Isoprostan- α -Ausscheidung im Urin bei den Patienten, die mit Clopidogrel behandelt worden sind. Keine signifikante Veränderung zeigte sich hingegen bei den Patienten, die mit Acetylsalicylsäure-Monotherapie behandelt worden waren. Diese selektive Verbesserung in einer relativ kleinen Population ist bemerkenswert und zeigt, dass die Reduzierung des oxidativen Stresses in vivo ein wichtiger Mechanismus sein könnte, durch den Clopidogrel seine positiven Effekte auf die NO-Bioverfügbarkeit bewirken könnte.

Plättchen-Adhäsion und -Aggregation an der Ruptur eines Atheroskleroseplaques sind entscheidende Vorgänge bei der Bildung eines Blutgefäßthrombus und somit der Entstehung eines akuten Koronarsyndroms. Thrombozyten sollen dieses inflammatorische Geschehen durch Freisetzung von Entzündungsfaktoren in das Blutplasma triggern. Zu diesen Mediatoren gehören Zytokine, ICAMs, aber auch das lösliche sCD-40. Ursprünglich war das CD-40-Ligand-System beobachtet worden bei der T-Zellabhängigen B-Zell-Differenzierung. Aus neueren Untersuchungen weiß man, dass es eine wichtige Rolle in der zellulären Immunität und Entzündungsreaktion, vor allem in der Pathophysiologie der Atherosklerose, einnimmt. CD-40-Ligand, ein transmembranäres Strukturprotein, ist Mitglied der Tumor-Nekrose- α -Familie. CD-40-L ist physiologischerweise an der Oberfläche von B-Zellen, T-Zellen, Monozyten, dendritischen Zellen, Mastzellen, Eosinophilen, Basophilen, aktivierten Thrombozyten und Endothelzellen vorhanden und kann eine Signalkaskade aktivieren. Lösliches CD-40 wird aus den Granula

der Thrombozyten während eines akuten Geschehens in das Blutplasma freigesetzt und CD-40-L an der Oberfläche der Thrombozyten exprimiert.

Dem CD-40-L gilt eine große Aufmerksamkeit in seiner Rolle als plättchenabhängiger Ligand im Entzündungsgeschehen zwischen den Thrombozyten und anderen Zellen im vaskulären Geschehen. Seine Aufgaben *in vitro* reichen von immunologischen Antworten über Plättchenaktivierung bis zur Thrombusformation (Aukrust, 2004). Der CD-40-L kann einen Thrombus stabilisieren. Hohe Plasmaspiegel des löslichen Fragmentes des CD-40-L (CD-154) sind assoziiert mit kardiovaskulären Risikofaktoren. Die Interaktion des Liganden mit dem CD-40-Rezeptor wird mit der Pathogenese von atherothrombotischen Komplikationen bei der koronaren Herzerkrankung in Verbindung gebracht (Lim 2004). Physiologisch fehlen CD-40-Liganden an der Oberfläche von ruhenden Blutplättchen. Wenn diese jedoch *in vitro* aktiviert werden, so werden die Liganden innerhalb von Sekunden an deren Oberfläche aus intrazellulären Ressourcen exprimiert (Henn, 1998), *in vivo* findet innerhalb kürzester Zeit eine Thrombusbildung statt. Die aktivierten Blutplättchen setzen gleichzeitig innerhalb von Minuten bis Stunden lösliches CD-40 ins Blutplasma frei. Die Liganden interagieren mit den CD-40-Rezeptoren der Endothelzellen und führen zu einer thrombinflammatorischen Reaktion. Die Expression dieser Moleküle an Endothelzellen stimuliert die Ausprägung von Adhäsionsmolekülen, inflammatorischen Zytokinen (Interleukin-6 insbesondere) (Dechanet, 1997) und dem prokoagulatorischen tissue-factor (Slupsky, 1997).

Physikalische Scherkräfte und diese Entzündungsfaktoren führen zu Plaquerupturen in den arteriellen Gefäßwänden. Die Folge sind klinische Ereignisse wie instabile Angina pectoris und Herzinfarkt. Das Fortschreiten der entzündlichen Gefäßerkrankung kann mit Entzündungsparametern im Blut kontrolliert werden. Ein besonders

früher und sensitiver Parameter ist für diesen Zweck das lösliche CD-40. Der CD-40-Ligand kann als früher Indikator für aktive Entzündungsprozesse an den Gefäßwänden und Plättchenaktivierung beim akuten Koronarsyndrom gelten, aber auch direkte Prothrombinaktivität anzeigen, die ein Indikator für frühe Atherosklerose, Plaqueruptur und Thrombosen ist. Garlichs et al. zeigten erhöhte sCD-40-Konzentrationen nicht nur bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom, sondern auch bei akutem Myokardinfarkt und stabiler Angina pectoris, wobei die Serumkonzentrationen bei instabiler Angina pectoris signifikant höher waren als bei stabiler Angina pectoris und die Patienten mit akutem Myokardinfarkt die höchsten Serumwerte aufwiesen (Garlichs, 2001).

Zudem ist bekannt, dass Thrombozyten selbst in ihrem Inneren große Ressourcen an reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) beherbergen. Werden diese reaktiven Sauerstoffspezies während eines akut inflammatorischen Geschehens in Assoziation mit einer erhöhten Reaktivität von Entzündungszellen wie Leukozyten von den Thrombozyten freigesetzt, so resultiert eine systemisch reduzierte vaskuläre NO-Verfügbarkeit mit der Folge einer verschlechterten endothelialen Funktion. Kürzlich wurde berichtet, dass CD-40-Liganden die endotheliale NO-Bioverfügbarkeit durch erhöhte Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies vermindern und so letztendlich zu einer verschlechterten endothelialen Funktion führen (Urbich, 2002). Interessanterweise zeigte eine Behandlung mit Clopidogrel einen inhibitorischen Effekt auf die Freisetzung sowie die Interaktionen des CD-40-L (Hermann, 2001; Molero, 2005; Quinn, 2004; Xiao, 2004).

Dies könnte einen weiteren wichtigen Mechanismus aufzeigen, der die positiven Effekte des Clopidogrels auf die endotheliale Bioverfügbarkeit erklären könnte. Unterstützt wird dieses Konzept durch kürzlich vorgestellte Ergebnisse, die zeigten, dass die GP-

IIb/IIIa- Rezeptorblockade zum einen die Freisetzung von Superoxiden durch Thrombozyten verminderte, zum anderen aber auch die NO-Produktion der Blutplättchen steigerte (Chakrabarti, 2004). Ob Clopidogrel über ähnliche intrinsische Aktivitätspotentiale verfügt, bleibt in weiteren Untersuchungen zu klären. Unsere Befunde zeigten zudem, dass die NOx-Plasmaspiegel nach einer chronischen Therapie mit Clopidogrel anstiegen. Diese Ergebnisse bekräftigen das Vorhandensein von oxidativem Stress sowie einer generalisierten verbesserten endothelialen NO-Bioverfügbarkeit durch eine ADP-Rezeptorblockade.

4.4. Schlussfolgerungen der Untersuchung

Die vorliegende Untersuchung zeigt, dass eine ADP-Rezeptorblockade der Thrombozyten durch Clopidogrel positive Effekte auf die systemische NO-Bioverfügbarkeit bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit bewirkt. Diese Befunde unterstützen das Konzept, dass abnorme Thrombozyten-Endothel-Interaktionen entscheidend zur endothelialen Dysfunktion beitragen. Somit lässt sich aufgrund der genannten möglichen pathophysiologischen Mechanismen zusammenfassen, dass eine konsequente Therapie mit Clopidogrel bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung die systemische endotheliale Funktion und Bioverfügbarkeit von NO verbessert, den oxidativen Stress vermindert und die entzündliche Reaktion reduziert. Die vorliegenden Befunde untermauern das Konzept, dass die ADP-Rezeptorblockade neben ihrem thrombozytenaggregations-hemmenden Effekt mehrere wichtige intrinsische Aktivitäten aufweist, die dem akut vulnerablen Patienten mit systemischer inflammatorischer Aktivität, erhöhtem oxidativen Stress sowie endothelialer Dysfunktion therapeutisch nutzen könnte. Dieses könnte klinisch bei Patienten mit symptomatischer koronarer Herzerkrankung bedeuten, dass Clopidogrel die Inzidenz

vaskulärer Ereignisse nicht nur durch das Verhindern von akuten Thrombosen reduziert, sondern auch indem es seine positiven vaskulären protektiven Effekte zur Geltung bringen kann.

4.5. Ausblick

Die Endothel-Dysfunktion bei Patienten mit symptomatischer koronarer Herzerkrankung wurde sowohl in peripheren als auch in koronaren Widerstandsgefäßen nachgewiesen (Drexler, 1997). In den vorliegenden Untersuchungsergebnissen konnten wir zeigen, dass durch die Behandlung mit dem ADP-Rezeptorantagonisten Clopidogrel eine signifikante Verbesserung der Endothel-Funktion peripherer Widerstandsgefäße erreicht wird. Daraus ist zu folgern, dass Clopidogrel prinzipiell über die genannten vasoprotektiven Mechanismen die Endothel-Funktion verbessern kann.

Interessant wäre in diesem Zusammenhang eine Untersuchung mit der Verbindung zwischen der Endothel-Funktion als prognostischem Faktor bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit und Clopidogrel als unabhängigem Parameter für ein besseres Outcome bei Patienten mit symptomatischer koronarer Herzkrankheit.

Aufgrund der vorliegenden Untersuchungsbefunde vermuten wir eine enge Beziehung zwischen Thrombozyten-Aktivierung und Freisetzung von Mediatoren in das fließende Blut und darauf basierend der Entwicklung eines neuen Verständnisses der klinischen Manifestation der endothelialen Dysfunktion.

Durch eine Therapie mit ADP-Rezeptorantagonisten kann also nicht nur die Bildung von Thromben nach Implantation von Stents verhindert werden, sondern auch eine antiinflammatorische sowie antioxidative Wirkung zur Verbesserung der endothelialen Funktion bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit ausgenutzt werden.

Zum tieferen Verständnis der Interaktionen zwischen Endothelzellen und Thrombozyten sind allerdings noch

weiterführende experimentelle Untersuchungen notwendig, die noch mehr Licht in das komplexe Zusammenspiel der Thrombozyten-Aktivierung während eines akuten Koronarsyndroms und einer systemischen Schädigung der endothelialen Funktion aufzeigten.

V. Zusammenfassung

Die Thrombozyten-Stimulation und -Aktivierung steht nachweislich im Zusammenhang mit der Bildung von thrombotischen Komplikationen bei Patienten mit symptomatischer koronarer Herzkrankheit nach PTCA. Dabei ist nicht nur die Bildung von Thromben von außerordentlicher Wichtigkeit, sondern die Auslösung eines lokalen Entzündungsgeschehens an der verletzten Blutgefäßwand entscheidend. Durch Therapie mit ADP-Rezeptorantagonisten wird nicht nur der epikardiale Fluss, sondern auch die mikrovaskuläre Perfusion verbessert, was offensichtlich auf ein Ungleichgewicht zwischen aktivierten Thrombozyten und den Endothelzellen zurückzuführen ist. Die vorliegenden Untersuchungsergebnisse zeigen bei Patienten mit symptomatischer koronarer Herzerkrankung, dass die Blockade der ADP-Rezeptoren durch Clopidogrel zu einer verbesserten endothelialen Bioverfügbarkeit von NO führt und Mediatoren für oxidativen Stress sowie Entzündungsgeschehen reduziert wurden. Daraus resultierend halten wir neben der Hemmung der Thrombozyten-Aggregation die vasoprotektiven Effekte der Substanz für möglich.

Untersucht wurden insgesamt 103 Patienten mit symptomatischer koronarer Herzerkrankung unter chronischer Therapie mit 100 mg Acetylsalicylsäure, bei denen die endothel-abhängige und endothel-unabhängige Vasodilatation mittels Unterarm-Plethysmographie gemessen wurde. Zeitgleich wurden Blut- und Urinproben entnommen. Die Patienten wurden entweder zu einer Therapie mit Clopidogrel oder Placebo zusätzlich zur Acetylsalicylsäure randomisiert. Die Unterarm-Plethysmographie wurde nach fünf Wochen wiederholt und zeigte eine signifikante Verbesserung der endothel-abhängigen Vasodilatation auf Acetylcholin und den NO-Synthase-hemmer L-NMMA in der Studienpopulation, die zusätzlich mit Clopidogrel behandelt worden war. Im Gegensatz

dazu zeigte sich keine signifikante Veränderung in der Studiengruppe, die Placebo erhalten hatte. In keiner der beiden Gruppen zeigte sich eine Veränderung der endothel-unabhängigen Vasodilatation auf Nitroprussid-Natrium. Die Urinexkretion von 8-iso-Prostaglandin-F₂α und die Blutspiegel von hs-CRP, sCD-40-L und RANTES waren reduziert nach zusätzlicher Behandlung mit Clopidogrel, nicht jedoch in der Patientengruppe, die mit Placebo behandelt worden war.

Aus diesen Ergebnissen lässt sich entnehmen, dass der positive Effekt von Clopidogrel auf die endotheliale Funktion offenbar mit einer erhöhten Bioverfügbarkeit von NO zusammenhängt. Möglicherweise ist dieser positive Einfluss auf die Hemmung einer gestörten Interaktion zwischen aktivierten Thrombozyten und dem Endothel ausschlaggebend.

Durch die Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies sezernieren aktivierte Thrombozyten selbst Superoxidanionen, die sich als oxidativer Stress äußern, in das fließende Blut. Dieses trägt entscheidend zur Endothel-Dysfunktion und verminderter Aktivität bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung bei und kann durch die Gabe von ADP-Rezeptorantagonisten gehemmt werden. Auch die Expression der thrombozytären proinflammatorisch wirkenden CD-40-L, des hs-CRP und des RANTES kann durch Clopidogrel signifikant vermindert werden. Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass die 8-iso-prostaglandin-F₂α-Ausscheidung im Urin signifikant vermindert war, was ein Indikator für oxidativen Stress der Blutgefäße ist. Weiterhin zeigte sich eine vermehrte Bereitstellung von NO_x im Blut, sodass möglicherweise von einer zusätzlichen Freisetzung von thrombozytärem NO auszugehen ist, was die Endothel-Funktion entscheidend verbessert.

Zusammenfassend zeigte sich daher bei Patienten mit symptomatischer koronarer Herzerkrankung eine verbesserte systemische endotheliale Funktion und NO-Bioverfügbarkeit,

oxidativer Stress und die inflammatorischen Mediatoren im Blut waren hingegen reduziert.

Diese Untersuchungen unterstreichen die Bedeutung von aktivierten Thrombozyten nicht nur als Marker, sondern als wichtiger Mediator im Spiel der Thrombozyten-Endothel-Interaktion und daraus resultierend der endothelialen Dysfunktion.

VI. Literaturverzeichnis

Aukrust P, Muller F, Ueland T, Berget T, Aaser E, Brunsvig A, Solum NO, forfang K, Froland SS, Gullestad L (1999) Enhanced levels of soluble and membrane-bound CD 40 ligand in patients with unstable angina: possible reflection of T-Lymphocyte and platelet involvement in the pathogenesis of acute coronary syndroms. *Circulation* 100:614-620

Andrews RK, Lopez JA, Berndt MC (1997) Molecular mechanism of platelet adhesion and activation. *Int J Biochem Cell Biol* 29:91-105

Aymong ED, Curtis MJ, Yousseff M, Graham MM, Shewchuk L, Leschuk W, Anderson TJ (2002) Abciximab attenuates coronary microvascular endothelial dysfunction after coronary stenting. *Circulation* 105:2981-2985

Badimon L, Badimon JJ, Penny W, Webster MW, Chesebro JH, Fuster V (1992) Endothelium and atherosclerosis. *J Hypertens suppl* 10:43-50

Bonetti PO, Lerman LO, Lerman A (2003) Endothelial dysfunction: A marker of Atherosclerotic Risk. *Atheroscler Thromb Vasc Biol* 23:168-175

Cai H, Harrison DG (2000) Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases. The role of oxidant stress. *Circ Res* 87:840-844

CAPRIE steering comitee (1996) A randomised, blindet, trial of clopidogrel versus Aspirin in patients at risk of ischaemic events. *The Lancet* 106:1329-1339

Celermajer DS, Sorensen KE, Bull C, Robinson J, Deanfield JE (1994) Endothelium-dependent dilatation in the systemic arteries of asymptomatic subjects relates to coronary risk factors and their interaction. *J Am Coll Cardiol* 24:1468-1474

Chakrabarti S, Clutton P, Varghese S, Cox D, Mascelli MA, Freedman JE (2004) Glykoprotein lib/IIIa inhibition enhances platelet nitric oxide release. *Thromb Res* 113:225-233

Cohen RA, Shepher JT, Vanhoutte PM (1983) Inhibitory role of the endothelium in the response of isolated coronary arteries to platelets. *Science* 221:273-274

Cohen RA (1995) The role of nitric oxide and other endothelium-derived vasoactive substances in vascular disease. *Prog Cardiovasc Dis* 38:105-128

Davi G, Ciabattoni G, Consoli A (1999) In vivo formation of 8-iso-prostaglandin F2 and platelet activation in diabetes mellitus: effects of improved metabolic control and vitamin E supplementation. *Circulation* 99:224-229

Dechanet J, Grosset C, Taupin JL. (1997) CD40ligand stimulates proinflammatory cytokine production by human endothelial cells. *J Immunol* 159:5640-5647

Drexler H, Zeiher AM, Meinzer K, Just H (1991) Correction of endothelial dysfunction in coronary microcirculation of hypercholesterolemic patients by L-arginine. *Lancet* 338:1546-1550

Drexler H (1997) Endothelial dysfunction: clinical implications. *Prog Cardiovasc Dis* 39:287-324

Drexler H, Landmesser U (2003) Endothelfunktion und kardiovaskuläre Erkrankungen. Science, II. Auflage

Egashira K, Kirooka Y, Kai H, Sugimachi M, Suzuki S, Inou T, Takeshita A (1994) Reduction in serum cholesterol with pravastatin improves endothelium-dependent coronary vasomotion in patients with hypercholesterolemia. *Circulation* 89:2519-2524

Fichtlscherer S, Rosenberger G, Walter DH, Breuer S, Dimmeler S, Zeiher A (2000) Elevated C-reactive protein levels and impaired endothelial vasoreactivity in patients with coronary artery disease. *Circulation* 102: 1000-1006

Fichtlscherer S, Breuer S, Heeschen C, Dimmeler S, Zeiher AM (2004) Interleukin-10 serum levels and systemic endothelial vasoreactivity in patients with coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 44:44-49

Furchgott RF, Zawadzki JV (1980) The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288:373-376

Furman MI, Krueger LA, Linden MD, Barnard MR, Frelinger AI, Michelson AD (2004) Release of soluble CD40L from platelets is regulated by glykoprotein lib/IIIa and actin polymerization. *J Am Coll Cardiol* 43:2319-2325

Furman MI, Krueger LA, Linden MD, Fox LD, Ball SP, Barnard MR, Frelinger AL, Michelson AD (2005) GP lib/IIIa antagonists reduce

thromboinflammatory processes in patients with acute coronary syndroms undergoing percutaneous coronary intervention. *Thromb Haemos* 3:312-320

Fuster V, Badimon L, Badimon JJ, Chesebro JH (1992) The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndroms. *N Engl J Med* 326:242-250.

Gachet C, Hechler B, Leon C, Vial C, Leray C, Ohlmann P, Cazenave P (1997) Activation of ADP-receptors and platelet function. *Thromb and Haemos* 78:271-275

Garlichs CD, Eskafi S, Raaz D, Schmidt A, Ludwig J, Hermann M (2001) Patients with acute coronary syndroms express enhanced CD40 ligand/CD 154 on platelets. *Heart* 86:649-655

Gawaz M, Loftus JC, Bajit ML, Frojmovic MM, Plow EF, Ginsberg MH (1991) Ligand bridging mediates integrin alpha IIb beta 3 (platelet GP IIb/IIIa) dependent homotypic and heterotypic cell-cell interactions. *J Clin Invest* 8:1128-1134

Gawaz M. (2001) Blood platelets. Thieme, S. 99-104

Griendling KK, Minieri CA, Ollerenshaw JD, Alexander RW (1994) Angiotensin stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 74:1141-1148

Gurbel PA, Cummings CC, Bell CR (2003) Onset and extend of platelet inhibition by clopidogrel loading patients undergoing elective coronary stenting:the Plavix Reduction of New Thrombus Occurrence Trial. *Am Heart Journal* 145:239-247

Hambrecht R, Wolf A, Gielen S, Linke A, Hofer J, Erbs S, Schoene N, Schuler G (2000) Effect on exercise on coronary endothelial function in patients with coronary artery disease. *N Engl J Med* 342:454-460

Henn V, Slupsky JR, Grafe M, Anagnostopoulos I, Forster R, Müller-Berghaus G, Kroczeck RA (1998) CD 40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature* 391:591-594

Heitzer T, Ollmann I, Köke K, Meinertz T, Münzel T (2003) Platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor blockade improves vascular nitric oxide bioavailability in patients with coronary artery disease. *Circulation* 108:536-541

Heitzer T, Schlinzig T, Krohn K, Meinertz T, Münzel T (2001) Endothelial dysfunction, oxidative stress, and risk of cardiovascular events in patients with coronary artery disease. *Circulation* 104:2673-78

Hermann A, Rauch BH, Braun M, Schror K, Weber AA (2001) Platelet CD40ligand (CD40L): subcellular localisation, regulation of expression, and inhibition of Clopidogrel. *Platelets* 12:74-82

Hingorani AD, Cross J, Kharbanda RK, Mullen MJ, Bhagat K, Taylor M, Donald AE, Palacios M, Griffin GE, Deanfield JE, Mac Allister RJ, Vallance P (2000) Acute systemic inflammation impairs endothelium dependent dilatation in humans. *Circulation* 102:994-997

Houston DS, Shepherd JT, Vanhoutte PM (1986) Aggregating human platelets cause direct contraction and endothelium-

dependent relaxation of isolated canine coronary arteries. Role of serotonin, thromboxane A₂, and adenine nucleotides. *J Clin Invest* 78: 539-544

Hollopeter G, Janzen HM, Vincent D, Li G, England L (2001) Identification of the platelet ADP receptor targeted by antithrombotic drugs. *Nature* 409:202-207

Hundelshausen P von, Weber KS, Huo Y, Proudfoot AE, Nelson PJ, Ley K, Weber C (2001) RANTES deposition by platelets triggers monocyte arrest on inflamed and atherosclerotic endothelium. *Circulation* 103:1772-1777

Hundelshausen P von, Koenen RR, Sack M, Mause MF, Adriaens W, Proudfoot AE, Hackeng TM, Weber C (2005) Heterophilic interactions of platelet factor 4 and RANTES promote monocyte arrest on endothelium. *Blood* 105:924-930

Huo Y, Schober A, Forlow SB, Smith DF, Hyman MC, Jung S, Littmann DR, Weber C, Ley K (2003) Circulating activated platelets exacerbate atherosclerosis in mice deficient apolipoprotein E. *Nat Med* 9:61-67

Krötz F, Sohn H-Y, Pohl U (1998) Reactive oxygen species: players in the platelet game. *Atheroscler Thromb Vasc Biol* 24:1988-1996

Kunichika H, Ben-Yehuda O, Lafitte S, Kunichika N, Peters B, De Maria AN (2004) Effects of glykoprotein IIb/IIIa inhibition on microvascular flow after coronary reperfusion. *J Am Coll Cardiol* 43:276-283

Kunapuli SP, Daniel JL (1998). P2 receptor subtypes in the cardiovascular system. *Biochem J* 336:513-523

Kureishi Y, Luo Z, Shiojima I, Bialik A, Fulton D, Lefer DJ, Sessa WC, Walsh K (2000) The HMG-CoA-reductase inhibitor simvastatin activates the protein kinase Akt and promotes Angiogenesis in normocholesteremic animals. *Nature* 6:1004-1010

Laufs U, Fata VL, Plutzky J, Liao JK (1998) Upregulation of endothelial nitric oxide synthase by HMG-CoA reductase inhibitors. *Circulation* 97:1129-1135

Lawson JA, Rokach J, Fitzgerald GA (1999) Isoprostanes formation, analysis, and use as indices of lipid peroxidation in vivo. *J Biol Chem* 274:24441-24444

Lerman A, Burnett JC jr.(1992) Intact and altered endothelium in regulation of vasomotion. *Circulation* 86:312-319

Leung WH, Lau CP, Wong Ck (1993) Beneficial effect of cholesterol-lowering therapy on coronary endothelium-dependent relaxation hypercholesteremic patients. *Lancet* 341:1469-1475

Libby P, Ridker PM (1999) Novel inflammatory markers of coronary risk: theory versus practice. *Circulation* 100:1148-1150

Lim HS, Blann AD, Lip (2004) Soluble P-Selectin, Interleukin-6 and tissue factor in Diabetes mellitus. *Circulation* 109:2524-2528

Lincoff AM, Kereiakes DJ, Mascelli MA, Deckelbaum LI, Barnathan ES, Patel KK, Frederick B, Nkanda MT, Topol EJ (2001) Abciximab suppresses the rise in levels of circulating inflammatory markers

after percutaneous coronary revascularization. *Circulation* 104:163-167

Lindemann S, Tolley ND, Dixon DA, Mc Intyre TM, Prescott SM, Zimmermann GA, Weyrich AS (2001) Activated platelets mediate inflammatory signaling by regulated interleukin 1 synthesis. *J Cell Biol.* 154: 485-490

Loscalzo J (2000) What we know and don't know about L-arginine and NO. *Circulation* 101:2126-2129

Loscalzo J. (2001) Nitric oxide insufficiency, platelet activation, and arterial thrombosis. *Circ Res.* 88:756-762

Ludmer PL, Selwyn AP, Shook TL, Wayne RR, Mudge GH, Wayne AR, Ganz P (1986) Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med* 315:1046-1051

Malat Z, Henry P, Fressonet R, Alouani S, Scoazec A, Beaufile P, Chvatko Y, Tedgui A (2002) Increased plasma concentrations of interleukin-18 in acute coronary syndroms. *Heart* 88:467-469

Metha SR, Yusuf S, Peters RJ, Bertrand ME, Lewis BS, Natarajan MK, Malmberg K, Rupprecht H, Zao F, Chrolavicius S, Copland I, Fox KA (2001) Clopidogrel in unstable angina to prevent recurrent event trial (CURE) Investigators. Effects of pretreatment with Clopidogrel and aspirin followed by long-term therapy in patients undergoing percutaneous coronary interventions: the PCI-CURE Study. *Circulation* 358:527-533

Molero L, Lopez-Farre A, Mateos-Caceres PJ, Fernandez-Sanches R, Maestro ML, Silva J, Rodriguez E, Macaya C (2005) Effect of clopidogrel on the expression of inflammatory markers in rabbit ischemic coronary artery. *J Pharmacol* 146:419-424

Morrow JD (2005) Quantification of isoprostanes as indices of oxidant stress and the risk of atherosclerosis in humans. *Artheroscler Thromb Vasc Biol* 25: 279-286

Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA (1991) Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev* 43:109-143

Nannizzi-Alaimo L, Alves VL, Phillips DR (2003) Inhibitory effects of glycoprotein lib/IIIa antagonists and aspirin on the release of soluble CD 40 ligand during platelet stimulation. *Circulation* 107: 1123-1128

Neumann FJ, Blasini R, Schmitt C, Alt E, Dirschinger J, Gawaz M, Kastrati A, Schöming A (1998) Effect of glykoprotein lib/IIIa receptor blockade on recovery of coronary flow and left ventricular function after the placement of coronary artery stents in acute myocardial infarction. *Circulation* 98:2695-2701

Perticone F, Ceravolo R, Pujia A, Ventura G, Iacopino S, Scozzafava A, Ferraro A, Chello M, Mastroberto P, Verdecchia P, Schillaci G (2001) Prognostic significance of endothelial dysfunction in hypertensive Patients. *Circulation* 104:2673-2678

Puri RN, Colman RW (1998) Purinergic receptors in human blood platelets:chemical modification and clonininvestigations. *J Protein Chem* 17: 429-451

Prescott SM, Mc Intyre TM, Zimmermann GA, Stafforini DM (2002) Sol Sherry lecture in thrombosis: molecular events in acute inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22:727-733

Quinn MJ, Bhatt DL, Zidar F, Vivekananthan D, Chew DP, Ellis SG, Plow E, Topol EJ (2004) Effect of clopidogrel pretreatment on inflammatory marker expression in patients undergoing percutaneous coronary intervention. *Am J Cardiol* 93:679-684

Quinn M, Fitzgerald DM.(1999) Ticlopidine and Clopidogrel. *Circulation* 100:1667-1672

Reilly M, Delanty N, Lawson JA (1996) Modulation of oxidant stress in vivo in chronic cigarette smokers. *Circulation* 94:19-25

Reilly M, Practico D, Delanty N (1998) Increased formation of distinct F2 isoprostanes in hypercholesterolemia. *Circulation* 98:2822-2828

Schächinger V, Britten MB, Zeiher AM (2000) Prognostic impact of coronary vasodilator dysfunction on ad-verse long-term outcome of coronary heart disease. *Circulation* 101:1899-1906

Schwedhelm E, Bartling A, Lenzen H, Tsikas D, Maas R, Brümmer J, Gutzki F-M, Berger J, Frölich JC, Böger RH (2004) Urinary 8-iso-prostaglandin F2 as a risk marker in patients with coronary heart disease: a matched case-control-study. *Circulation* 109:843-848

Suwaidi JA, Hamasaki JS, Higano ST (2000) Long term follow up of patients with mild coronary artery disease and endothelial dysfunction. *Circulation* 101:948-954

The CURE investigators. Effect of clopidogrel in addition to aspirin in patients with Acute coronary syndroms without ST-segment elevation (2001) *N Engl J Med* 345:494-592

Tomasian D, Keany JF jr., Vita JA (2000) Antioxidants and bioactivity of endothelium-derived nitric oxide. *Cardiovasc Res* 47:426-435

Urbich C, Dernbach E, Aicher A, Zeiher AM, Dimmeler S (2002) CD40 ligand inhibits endothelial cell migration by increasing production of endothelial reactive oxygen species. *Circulation* 106:981-986

Vita JA, Treasure CB, Nabel EG, Mc Lenachan JM, Fish RD, Yeung AC, Vekshtein VI, Selwyn AP, Ganz P (1990) Coronary vasomotor response to acetylcholine relates to risk factors for coronary artery disease. *Circulation* 81:491-497

Vishnevetsky D, Kiyani VA, Gahndi PJ (2004) CD 40:A novel target in the fight against Cardiovascular disease. *Ann Pharmacother* 38:1500-1508

Daiber A, Mulsch A, Hink U, Mollnau H, Warnholtz A, Oelze M, Munzel T (2005). *Am J Cardiol* 96:25i-36i

Warnholtz A, Ostad MA, Velich N, Trautmann C, Schinzel R, Walter U, Münzel T (2007) A single dose of clopidogrel dose dependent improvement of endothelial dysfunction in patients with stable coronary artery disease: Results of a double-blind, randomized study. *Atherosclerosis*

Wassmann S, Laufs U, Baumer AT, Muller K, Konkol C, Sauer H, Bohm M, Nickenig G (2001) Inhibition of geranylgeranylation reduces Angiotensin II-mediated free radical production in vascular smooth muscle cells: involvement of Angiotensin AT1 receptor expression and Rac 1 GTPase. *Mol Pharmacol* 59:646-654

Welt FGP, Rogers SD, Hang X, Ehlers R, Chen Z, Nannizi-Alaimo L, Phillips DR, Simon DI (2004) GP IIb/IIIa inhibition with eptifibatid lowers levels of soluble CD 40 L and RANTES after percutaneous coronary Intervention. *Catheter Cardiovasc Intervention* 61:185-189

Weyrich AS, Prescott SM, Zimmermann GA (2002) Platelets, Endothelial cells, Inflammatory Chemokines and Restenosis. Complex Signaling in the vascular play book. *Circulation* 106: 1433-1435

Xiao Z, Theroux P. Clopidogrel inhibits platelet-leukocyte interactions and thrombin receptor agonist peptide-induced platelet activation in patients with an acute coronary syndrom. *J Am Coll Cardiol* 43:1982-1988

Yang LH, Fareed J (1997) Vasomodulatory action of Clopidogrel and Ticlopidine. *Thromb Res* 86:479-491

Curriculum vitae Manuela Karstens



Geboren am	07. Januar 1980 in Hamburg.
1986 – 1990	Grundschule Celle Garßen.
1990 – 1999	Gymnasium Ernestinum Celle mit Abschluss Abitur.
03/2000	Beginn des Medizinstudiums an der Universität Hamburg.
08/2000	Krankenpflegepraktikum am Krankenhaus Winsen/Luhe/ Unfallchirurgie.
08/2001	Krankenpflegepraktikum im Allgemeinen Krankenhaus Celle/Gynäkologie und Geburtshilfe.
03/2002	Ärztliche Vorprüfung.
08/2002	Famulatur am Städtischen Klinikum Lüneburg/Innere Med.
01/2003	Beginn der Promotionsarbeit in der Kardiologischen Abteilung des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf.
03/2003	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung.
08/2003	Famulatur am Albertinen Krankenhaus Hamburg/Gynäkologie und Geburtshilfe.
09/2003	Famulatur am Universitätsklinikum Hamburg/Kardiologie.
08/2004	Famulatur an der Technischen Universität München in der Herzchirurgie des Deutschen Herzzentrums.
03/2005	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung.
04/2005	Praktisches Jahr, erstes Tertial, an der Mount Sinai School of Medicine, New York (USA), Kardiologie.
06/2005	Praktisches Jahr im Universitätsklinikum Hamburg/Onkologie.
08/2005	Zweites Tertial am Triemli Spital in Zürich (CH)/Chirurgie.
12/2005	Drittes Tertial am Albertinen Krankenhaus Hamburg/ Gynäkologie und Geburtshilfe.
04/2006	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung.
05/2006	Assistenzärztin am Universitären Herzzentrum Hamburg in der Kardiologie.

Hamburg, im Februar 2007

Danksagung

Für die freundliche Unterstützung im Rahmen dieser Dissertation danke ich allen Beteiligten, insbesondere:

Meinen Eltern für Ihre kontinuierliche psychische und physische Unterstützung.

Herrn PD Dr. med. Thomas Heitzer für die Überlassung des interessanten Themas, die intensive Anleitung zur wissenschaftlichen Arbeit sowie die engagierte Betreuung.

Herrn Professor Dr. med. Thomas Meinertz für die Schaffung der Rahmenbedingungen zur Durchführung der vorliegenden Arbeit in seiner Abteilung.

Herrn Professor Dr. med. Rainer Böger für die wissenschaftliche Unterstützung im pharmakologischen Labor seiner Abteilung.

Herrn Dr. med. Volker Rudolf für die wissenschaftliche Betreuung und die Unterstützung bei der statistischen Auswertung der Messergebnisse.

Frau Dr. med. Michelle Ortak für die Unterstützung bei den venenplethysmographischen Untersuchungen sowie das Patientenscreening.

Herrn Dr. med. Edzard Schwedhelm für die Hilfe bei der praktischen Untersuchung der Urinproben.

Herrn Dr. Peter Tschentscher für die Hilfe bei den Untersuchungen der Proben in der klinischen Chemie.

Herrn PD Dr. med. Stefan Baldus und Frau Sabine Gerth für die Hilfe bei der experimentellen Laborarbeit.

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Aussage (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht an einen Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.