

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Aus dem Universitären Herzzentrum Hamburg
Klinik und Poliklinik für Kardiologie

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. med. T. Meinertz

Über die vasoaktiven Eigenschaften von Clopidogrel im Vergleich zu Acetylsalicylsäure bei Patienten mit ischämischer Kardiomyopathie

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von:

Michael Klusmeier
aus Herford

Hamburg 2009

Angenommen vom Fachbereich Medizin

der Universität Hamburg am: 1.4.2010

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs

Medizin der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. S. Baldus

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in: PD Dr. K. Sydow

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in: Prof. Dr. R. Böger

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung	2
1.1 Chronische Herzinsuffizienz	2
1.2 Koronare Herzkrankheit	5
1.3 Endotheliale Dysfunktion	7
1.4 Thrombozytenaggregationshemmung	9
1.4.1 ASS	9
1.4.2 Clopidogrel	10
1.5 Marker für Inflammation und oxidativen Stress	12
1.5.1 Myeloperoxidase (MPO)	12
1.5.2 RANTES	13
1.5.3 Hochsensitives C-reaktives Protein (hsCRP)	13
1.5.4 Interleukin 6	14
1.5.5 BNP (Brain-natriuretic-peptide)	14
1.5.6 Elastase	15
1.6 Ziele der Studie	16
II. Material und Methode	17
2.1 Auswahl der Patienten	17
2.2 Studienprotokoll	18
2.3. Endothelfunktionsmessung	19
2.4. Probengewinnung	21
2.5 Sandwich-ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)	21
2.6. Statistische Auswertung	22
III. Ergebnisse	23
3.1. Patientencharakteristika	23
3.2. Flussabhängige Dilatation	24
3.3. Effekte auf die biochemischen Parameter	25
3.3.1. Beeinflussung des hs-CRP	25
3.3.2 Beeinflussung von RANTES	26
3.3.3. Beeinflussung des MPO-Plasmaspiegels	27
3.3.4. Wirkungen auf Elastase	28
3.3.5. Wirkungen auf Interleukin 6	29
3.3.6. Wirkungen auf BNP	30
IV. Diskussion	31
V. Zusammenfassung	35
VI. Literaturverzeichnis	36
VII. Danksagung	41
VIII. Lebenslauf	42
IX. Eidesstattliche Erklärung	43

I. Einleitung

1.1 Chronische Herzinsuffizienz

Die chronische Herzinsuffizienz ist eine der häufigsten Erkrankungen der westlichen Industrieländer. Die Prognose ist auch nach der Einführung der Therapie mit Betablocker- und ACE-Hemmer immer noch schlecht und mit der Prognose maligner Erkrankungen vergleichbar (Owan, Hodge *et al.*, 2006).

Die häufigste Ursache der chronischen Herzinsuffizienz ist die koronare Herzkrankheit (50-60%). Gefolgt von der hypertensiven Herzkrankheit (9-20%). Mit einzubeziehen ist die Koinzidenz von arterieller Hypertonie und koronarer Herzkrankheit. Ca. 40% der Patienten mit KHK leiden an Bluthochdruck. Seltener Ursachen sind Herzvitien, Myokarditiden, Endokarditiden und toxische Kardiomyopathien (Felker, Thompson *et al.*, 2000; McMurray e Stewart, 2000) .

Das Verständnis der Pathophysiologie hat sich in der letzten Zeit deutlich erweitert, wobei zunächst von einem rein myokardialen Problem ausgegangen wurde. Heute wissen wir, dass es sich um eine komplexe Multisystemerkrankung handelt mit Einbezug des neurokrinen, muskuloskeletalen, renalen und immunologischen Systems.

Als Folge der eingeschränkten myokardialen Kontraktilität kommt es zur verminderten Organperfusion mit konsekutiver Aktivierung des sympathoadrenergen- und des Angiotensin-Aldosteron-Systems.

Angiotensin II, ein Oktapeptid ist das Endglied des RAAS mit mehreren Wirkungen. Über die Stimulation des Angiotensin II (AT II)-Rezeptors kommt es zur Vasokonstriktion. Das Durstgefühl und der Appetit auf salzige Speisen werden im Gehirn gesteigert. Angiotensin II bewirkt über eine vermehrte Ausschüttung von Aldosteron in der Nebennierenrinde eine vermehrte Wasserrückresorption in der Niere. Darüber hinaus hemmt Aldosteron den Nervus Vagus und stimuliert den Sympathikus.

Somit führt das aktivierte RAAS zu einer vermehrten Vasokonstriktion, und damit zur peripheren Widerstandserhöhung und bei gesteigerter Natrium- und Flüssigkeitsretention zur Erhöhung des Plasmavolumens. Die resultierende chronische Nachlasterhöhung induziert die Entwicklung chronischer struktureller Umbauprozesse im Myokard mit vermehrtem Einbau von Kollagen und Fibroblasten. Dieser myokardiale Umbauprozess bewirkt einen zunehmenden myokardialen Elastizitätsverlust über eine Relaxationsstörung bis zur Restriktion bzw. konsekutiver Progredienz der diastolischen Herzinsuffizienz (Modena, Aveta *et al.*, 2001).

Die chronische Aktivierung des sympathoadrenergen Systems unterhält ebenfalls den

Progress der Erkrankung (Lympopoulos, Rengo *et al.*, 2007).

Patienten, die an einer Herzinsuffizienz erkrankt sind, haben einen 2- bis 3-fach erhöhten Noradrenalin Spiegel, begleitend mit Erhöhung anderer Katecholamine wie Dopamin und Adrenalin (Cohn, Levine *et al.*, 1984). Die daraus resultierende Übersteuerung der Chronotropie und Inotropie führt zu erhöhtem Energieverbrauch, „Down“-Regulation der Beta-1-Rezeptoren am Herzen, Verkürzung der Diastolendauer, sowie Kontraktitätsminderung (negative Frequenz-Kraft-Beziehung) und Arrhythmie neigung. Die adrenerge Überstimulation führt in letzter Konsequenz durch die beschriebenen Effekte zur Apoptose der Herzmuskelzellen.

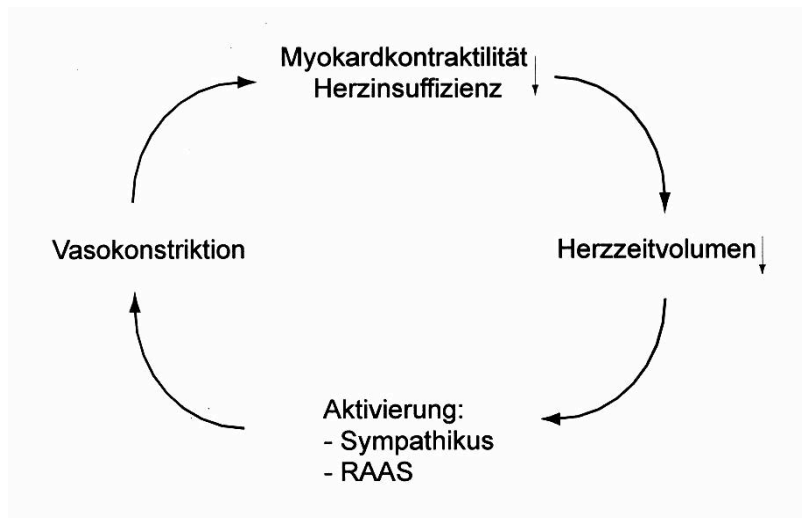


Abb. 1 Circulus vitiosus der Herzinsuffizienz mit Aktivierung des sympathoadrenergen- und RAA-Systems.

In Folge der abnehmenden Herzleistung werden das sympathoadrenerge- und RAA-System aktiviert um eine ausreichende Organperfusion zu erhalten. Die Folge davon ist ein erhöhtes Plasmavolumen durch vermehrte Wasserrückresorption und eine Erhöhung der Nachlast durch die periphere Vasokonstriktion. Myokardiale Hypertrophie und Fibrose sind die Folge.

Medikamentös kann der Progression dieses pathophysiologischen Prozesses mit der selektiven Betablockade im Sinne einer Myokardprotektion entgegen gewirkt werden.

Neuere Erkenntnisse weisen daraufhin, dass die Herzinsuffizienz mit einer chronischen Inflammation, respektive mit einem Anstieg verschiedener Zytokine wie TNF alpha und Interleukin 6 einhergeht. Eine erhöhte Mastzellendichte konnte sowohl bei Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie, als auch mit ischämischer Kardiomyopathie nachgewiesen werden mit der Folge einer vermehrten Produktion bzw. erhöhten Aktivität inflammatorischer Mediatoren (Patella, Marino *et al.*, 1998).

Es konnte gezeigt werden, dass Zytokine wie Interleukin 6 und Tumornekrosefaktor alpha (TNF α) mit dem Schweregrad der Herzinsuffizienz zunehmen (Torre-Amione, Kapadia *et al.*, 1996).

Die Bedeutung und die genauen Ursprungsorte der Synthese der proinflammatorischen Mediatoren im Zusammenhang mit der Herzinsuffizienz sind noch nicht eindeutig geklärt.

TNF alpha kann von kardialen Myozyten produziert werden. Der Trigger dafür ist die

Druckbelastung des Ventrikels (Torre-Amione, Kapadia et al., 1996). Daraus könnte abgeleitet werden, dass die erhöhte Zytokinkonzentration bei Herzinsuffizienz überwiegend myokardialen Ursprungs ist. Allerdings konnte bei einer vergleichenden Untersuchung von Koronarsinusblut und arteriellem Blut kein signifikanter Zytokinkonzentrationsunterschied nachgewiesen werden (Munger, Johnson et al., 1996). Ein weiterer Produktionsort für Zytokine sind Leukozyten, denen wahrscheinlich ein bedeutsamer zweiter Anteil an der Zytokinerhöhung im Plasma zuzuordnen ist.

Auch die klinische Relevanz im Hinblick auf die Prognose dieser Patienten korrelierte mit der Höhe der TNF alpha Plasmaspiegel (Rauchhaus, Doehner et al., 2000).

Die Zytokinaktivierung scheint bei milder Herzinsuffizienz der neurohumoralen Reaktion voraus zu gehen (Benedict, Weiner et al., 1993).

Die vermehrte Freisetzung proinflammatorischer Zytokine bei der Herzinsuffizienz steht vermutlich im direkten Zusammenhang mit der RAAS-Aktivierung. Es konnte gezeigt werden, dass Angiotensin die Zytokinausschüttung aktiviert und diese bei ACE-Hemmertherapie signifikant reduziert wird (Brasier, Jamaluddin et al., 2000).

In jüngster Zeit sind Untersuchungen mit immunmodulatorischer Therapie bei Herzinsuffizienz unternommen worden - u. a. eine große Multicenterstudie mit dem Turmornekrosefaktor-Alpha-Antagonisten Etanercept (Anker e Coats, 2002). Diese zeigten keine Einflüsse auf die klinischen Endpunkte Tod oder Hospitalisierung durch kardiale Dekompensation. In der Attach-Studie kam es zur Übersterblichkeit unter einer immunmodulatorischen Therapie (Chung, Packer et al., 2003).

Zusammenfassend ist zu formulieren, dass die Herzinsuffizienz mit großer Sicherheit im Zusammenhang mit inflammatorischen Prozessen steht. Die daraus entstehenden möglichen Therapieoptionen müssen zunächst noch weiter evaluiert werden.

1.2 Koronare Herzkrankheit

Die koronare Herzkrankheit gehört auch nach verbessertem Therapieregime immer noch zu den Erkrankungen mit der höchsten Mortalitätsrate und gilt als wichtige Ursache für die Entwicklung einer Herzinsuffizienz (statistisches Bundesamt 2007).

Eine Schlüsselrolle in der Entwicklung der Atherosklerose und der damit einhergehenden KHK spielt die Entzündungsreaktion (Ross, 1999).

Am Anfang dieser Erkrankung kommt es zu Mikroverletzungen des Endothels, zumeist bedingt durch die kardiovaskulären Risikofaktoren. Die 4 wichtigsten Risikofaktoren sind der arterielle Hypertonus, das Rauchen, die Hyperlipoproteinämie und der Diabetes mellitus.

In der Vergangenheit konnte gezeigt werden, dass es bei Vorliegen dieser Risikofaktoren zur vermehrten Produktion von Superoxidradikalen aus der geschädigten Gefäßwand kommt, wodurch das gebildete NO oxidiert und inaktiviert wird (Kojda e Harrison, 1999). Darüber hinaus kommt es im Zusammenhang mit diesen Risikofaktoren zur verminderten Produktion vasodilatierender und antiinflammatorischer Mediatoren wie Prostacyclin und Stickstoffmonoxid (NO) (Böger et al. 1997).

Die Folge davon ist, dass drei bedeutsame Reaktionsabläufe entstehen:

1. Gesteigerte endotheliale Leukozytenadhäsion und -migration
2. Zunahme der Thrombozytenadhäsion und -aggregation
3. Anreicherung von Low Density Lipoproteins (LDL) in der Intima.

Leukozytenadhäsion und -migration

Das gesteigerte Angebot an Superoxidanionen mit konsekutiver mangelnder NO-Bioverfügbarkeit wird unter dem Oberbegriff „oxidativer Streß“ geführt. Es resultiert eine vermehrte Expression von Adhäsionsmolekülen auf Leukozyten wie z.B. E- und P-Selektin, sowie eine vermehrte Bildung von Integrinen und Selektinen auf dem Endothel. Zu Anfang „rollen“ die Leukozyten über das Endothel, um bei Kontraktion der Endothelzelle in die Arterienwand zu migrieren (Leukozytentransmigration). Durch die Ausschüttung von Zytokinen wird die Entzündungskaskade weiter aufrecht erhalten (Springer, 1995).

Thrombozytenadhäsion und -aggregation

Thrombozyten lagern sich an die Gefäßinnenwand an, wodurch ein komplexer

thrombozytärer Aktivierungsvorgang in Gang gesetzt wird. Die Anheftung erfolgt mit Hilfe eines von Endothelzellen sezernierten Proteins, dem von Willebrand-Faktor (vWF), der eine Brücke zwischen Kollagenfasern der geschädigten Gefäßwand und dem Thrombozyten bildet. Unmittelbar nach dieser Bindung kommt es zur Aktivierung des Thrombozyten mit Ausschüttung von Thromboxan, ADP und Serotonin, die eine Aktivierung und Rekrutierung anderer Thrombozyten hervorrufen.

Der aktivierte Thrombozyt ändert seine Form, indem er Pseudopodien ausbildet und somit mit anderen aktivierten Thrombozyten ein Aggregat bildet.

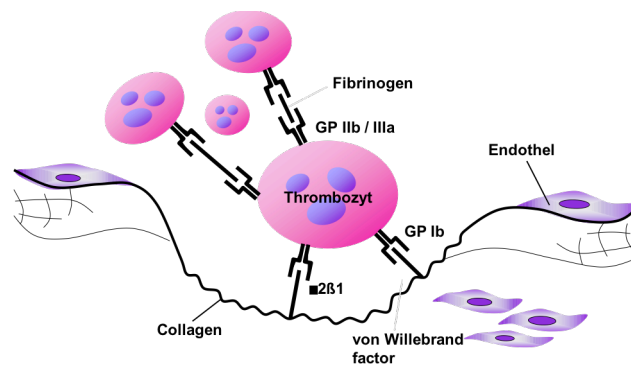


Abb. 2 Thrombozytenadhäsion –aggregation

Nach Verletzung des Endothels mit Freilegung subendothelialer Strukturen kommt es zur Adhäsion von Thrombozyten. Thrombozyten besitzen einen membrangebundenen Rezeptor (GPIb), der über den sogenannten von-Willebrand-Faktor an das Endothel bindet. Es kommt zur Formänderung des Thrombozyten und Ausschüttung von Mediatoren (Thromboxan, ADP, Serotonin, Fibrinogen), die ihrerseits weitere Thrombozyten anlocken. Durch den GPIIb/IIIa-Rezeptor kommt es über Fibrinogenbrücken zur Bindung anderer Thrombozyten mit konsekutiver Aggregation.

Der Thrombozyt interferiert nicht nur mit weiteren Thrombozyten, sondern durch Ausschüttung von Wachstumsfaktoren (PDGF, TGF- β , EGF, bFGF), proinflammatorischen Faktoren (IL-1 β , CD40-Ligand, β -Thromboglobulin), Koagulationsfaktoren (Faktor V, Faktor XI, PAI-1, Plasminogen, Protein S) und hydrolytischen Enzymen mit dem Endothel und der weißen Zellreihe, die entscheidend an der Entstehung und Progression atherosklerotischer Plaques beteiligt sind (Ruggeri, 2002; Gawaz, Langer *et al.*, 2005).

Anreicherung von LDL in der Gefäßwand

Es kommt nach Schädigung des Endothels zur Anreicherung von Low-Density-Lipoprotein (LDL) im Endothel. Dieses wird oxidiert und von Makrophagen phagozytiert. Die daraus resultierenden Schaumzellen, welche sich in der Intima zu Lipidflecken „fatty streaks“ formieren, sind wesentlicher Bestandteil der atherosklerotischen Plaques (Boisvert, Santiago *et al.*, 1998).

Die Makrophagen produzieren ihrerseits wiederum Zytokine (TNF alpha, IL 6, IL 1), die die Einwanderung und Proliferation von Gefäßmuskelzellen fördern. Zudem kommt es durch die Schaumzellenbildung zur Schädigung des Endothels und damit zur Aktivierung von Thrombozyten.

Aus dem Genannten wird ersichtlich, dass die Atherosklerose als eine komplexe chronische Entzündung verstanden werden kann (Libby, Ridker et al., 2002).

Gemeinsame Endstrecke der vorgenannten Reaktionswege ist die zunehmende Reduktion der Stickstoffmonoxidbioverfügbarkeit durch direkte oder indirekte Oxidation.

Ein Circulus vitiosus beginnt, indem die weitere Verminderung der NO-Bioverfügbarkeit erneut die genannten Kaskaden in ihrer Prozessaktivität unterhält.

1.3 Endotheliale Dysfunktion

Vereinfacht kann die endotheliale Dysfunktion durch eine verminderte vasodilatatorische Kapazität in Folge einer verminderten Bioverfügbarkeit von Stickstoffmonoxid (NO) verstanden werden (Celermajer, 1997). Der Gefäßtonus wird entscheidend durch die Bildung von Stickstoffmonoxid (NO) reguliert (Forslund, Nilsson *et al.*, 2000). Stickstoffmonoxid aktiviert intrazellulär die Guanylylcyclase, woraufhin es zu einem Anstieg von Guanosin-Monophosphat (GMP) kommt. Guanosin-Monophosphat bewirkt eine Phosphorylierung der Proteinkinasen, die ihrerseits wiederum Myosinleichtkettenkinasen phosphorylieren, so dass diese eine verminderte Affinität zum Calcium-Calmodulin-Komplex entwickeln und damit inaktiv bleiben. Die daraus resultierende Verminderung der Calciumkonzentration löst die Vasodilatation aus.

Die Vasodilatation ist quantitativ mit der Endothelfunktionsmessung bestimmbar. (genaue Methodik weiter unten erklärt)

Stickstoffmonoxid wird aus der Aminosäure L-Arginin gebildet mit Hilfe der endothelialen NO-Synthetase (eNOS) (Li e Forstermann, 2000). Eine luminale NO-Freisetzung inhibiert die Thrombozytenaggregation und Monozytenadhäsion (Szmítko, Wang *et al.*, 2003), während die abluminale Freisetzung von NO, durch oben beschriebenen Prozess zur Relaxation glatter Gefäßmuskelzellen führt. Diese Freisetzung kann durch Scherkräfte oder verschiedene Pharmaka hervorgerufen werden.

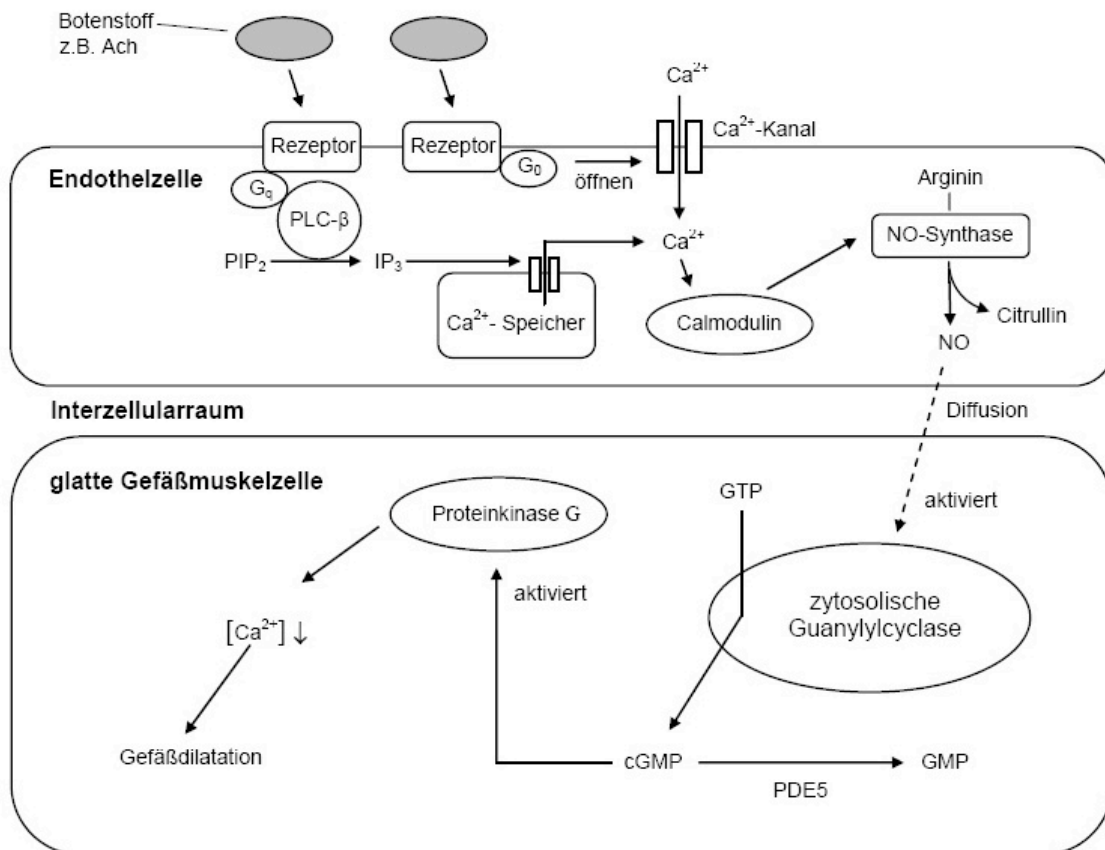


Abb. 3 Stickstoffmonoxid vermittelte Vasodilatation

Stickstoffmonoxid wird bei der Umwandlung von L-Arginin zu Citrullin freigesetzt. Ein Vorgang der von der endothelialen NO-Synthase katalysiert wird. Dieses Enzym kann aber nur in Anwesenheit von Calcium, welches sich mit Calmodulin verbindet, aktiviert werden. Nach Freisetzung diffundiert NO in die Gefäßmuskulatur und stimuliert dort eine lösliche Guanylylcyclase, mit der Folge eines intrazellulären cGMP-Anstiegs, der wiederum eine Aktivierung der cGMP abhängigen Proteinkinase induziert, damit eine verminderte Ca-Empfindlichkeit bewirkt und so zur Relaxation der Gefäßmuskulatur bzw. Dilatation des Gefäßes führt.

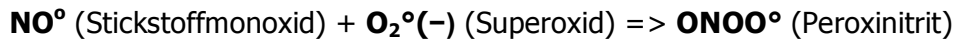
Stickstoffmonoxid reguliert nicht nur den Gefäßtonus, sondern hat ausgeprägte antiinflammatorische und antiaggregatorische Effekte.

Die antiinflammatorischen Effekte resultieren aus der Hemmung der Expression von Oberflächen-Adhäsions-Molekülen wie CD 11/18, P-Selectin, VCAM-1 und ICAM-1. Hierdurch wird die Adhäsion von Monozyten an das Endothel und die Migration durch die Gefäßwand gemindert (Kubes, Suzuki *et al.*, 1991; Davenpeck, Gauthier *et al.*, 1994).

Durch eine luminale Sekretion von Stickstoffmonoxid kommt es zur direkten Hemmung von Thrombozyten (Radomski, Palmer *et al.*, 1987).

Kardiovaskuläre Risikofaktoren wie Rauchen, Diabetes mellitus, Hypertonus und Hypercholesterinämie gehen mit einer endothelialen Dysfunktion einher (Zeiher, Drexler *et al.*, 1991; Celermajer, 1997; Yudkin, Stehouwer *et al.*, 1999). Durch die genannten Risikofaktoren kommt es zur vermehrten Produktion von reaktiven Sauerstoffradikalen, vor

allem Superoxid, das seinerseits NO oxidiert. Die hiermit einhergehende NO-Konsumption führt nicht nur zur verminderten NO-Bioverfügbarkeit, sondern zur Generierung toxischer Oxidantien wie Peroxinitrit.



Resultierend ist die Bildung von Molekülen, die auch strukturell die Gefäßwand alterieren.

Zudem konnte man zeigen, dass die endotheliale Dysfunktion ein eigenständiger Risikomarker für erneute kardiale Ereignisse bei Patienten mit manifester KHK und Herzinsuffizienz ist (Suwaidi, Hamasaki *et al.*, 2000; Heitzer, Baldus *et al.*, 2005).

1.4 Thrombozytenaggregationshemmung

1.4.1 ASS

Acetylsalicylsäure wirkt durch irreversible Hemmung der Cyclooxygenase-1 (COX-1) schon in geringen Dosen (50–100 mg) thrombozytenaggregationshemmend (Pedersen e Fitzgerald, 1984).

Mit steigender Dosis und zusätzlicher Hemmung der Cyclooxygenase-2 (COX-2) auch analgetisch, antipyretisch und antiinflammatorisch.

Die Wirkung der Acetylsalicylsäure beruht auf der Hemmung der Synthese von verschiedenen Prostaglandinen wie z.B. Thromboxan A2 (TxA2) und Prostacyclin (Prostaglandin I2, PGI2) (Marnett e Kalgutkar, 1999).

Entscheidend in dieser Untersuchung ist sicherlich die Hemmung der Thromboxansynthese und die damit einhergehende irreversible Hemmung der Thrombozytenaggregation.

Die Hemmung des endothelial gebildeten Prostacyclin mit seiner thrombogenen Eigenschaft ist bei ausgeprägtem First-Pass-Metabolismus in der geringen Dosis von 100 mg zu vernachlässigen.

1.4.2 Clopidogrel

Clopidogrel, ein Mitglied der Gruppe der Thienopyridine, ist mittlerweile zu einem wichtigen Therapeutikum für Patienten mit koronarer Herzkrankheit geworden (CAPRIE Steering Committee, 1996; Yusuf, Zhao et al., 2001).

Clopidogrel verhindert die Aggregation von Thrombozyten, indem es den ADP-Rezeptor P2Y₁₂ (Hollopeter, Jantzen *et al.*, 2001) nicht-kompetitiv und irreversibel blockiert (Savi, Pereillo *et al.*, 2000).

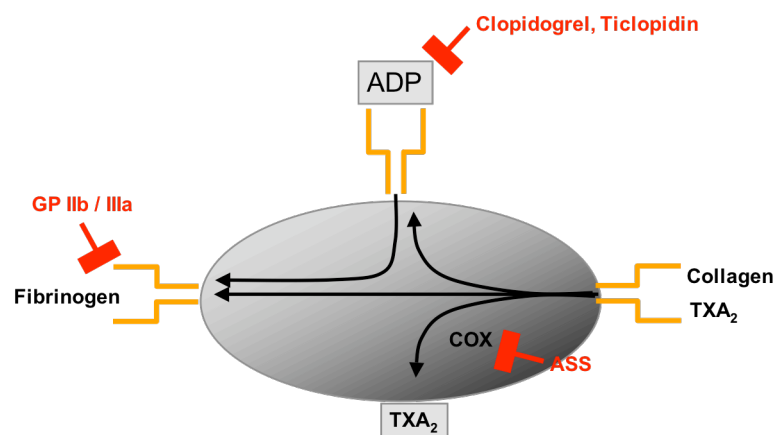


Abb. 4 Medikamentöse Thrombozytenaggregationshemmung

Acetylsalicylsäure schaltet die COX I vermittelte Thromboxansynthese aus und hemmt somit die Thrombozytenaggregation irreversibel. ADP-Rezeptorantagonisten wie z.B. Clopidogrel binden kovalent an (P2Y₁₂)-Rezeptor. Dadurch wird die durch ADP ausgelöste Thrombozytenaggregation gehemmt. Die gemeinsame Endstrecke von ASS und Clopidogrel mündet in der Freilegung des GPIIbIIIa-Rezeptors mit konsekutiver Bindung an andere Thrombozyten über Fibrinogen. Dieser kann durch GPIIbIIIa-Antagonisten wie z.B. Abciximab gehemmt werden.

Der Rezeptor P2Y₁₂ wird ausschließlich im Gehirn, auf Megakaryozyten und auf Thrombozyten exprimiert (Hollopeter, Jantzen *et al.*, 2001) und beeinflusst die Thrombozytenadhäsion und deren Aktivierung, sowie Thrombuswachstum und dessen Stabilität.

Die Aktivierung des Rezeptors erfolgt über die Bindung von ADP, welches von verletzten Blutgefäßen, Erythrozyten und aktivierten Thrombozyten freigesetzt wird (Hollopeter, Jantzen et al., 2001).

Bei Clopidogrel handelt es sich um ein sogenanntes „ Prodrug“. Dieses wird durch Oxidation und anschließender Hydrolyse in der Leber durch die Cytochrom-P450-Isoenzyme 2B6 und 3A4 in seinen aktiven Metaboliten transformiert (Savi, Pereillo et al., 2000). Der Metabolit bindet an den P2Y₁₂ Rezeptor, inaktiviert ihn und verhindert somit irreversibel die Thrombozytenaktivierung.

Durch die irreversible Bindung von Clopidogrel an den Rezeptor werden nach Absetzen des

Medikamentes ca. 5-7 Tage benötigt, um die Thrombozytenfunktion durch Plättchenneubildung wieder herzustellen (Savi, Labouret et al., 2001).

Gegenwärtige verfügbare Daten zeigen, dass nicht alle Patienten die gleiche Ansprechrate auf eine konventionelle Clopidogreltherapie haben, und damit für vermehrte atherothrombotische Ereignisse gefährdet sind (Aleil, Ravanat et al., 2005).

Diese so genannte „Clopidogrel-Resistenz“ ist in ihrer Ursache bislang noch nicht endgültig geklärt. Die Cytochrom-P450-Isoenzyme und individuelle genetische Polymorphismen, zur Aktivierung von Clopidogrel in seinen aktiven Metaboliten, spielen in diesem Zusammenhang eine entscheidende Rolle.

In jüngster Zeit konnten alternative ADP-Rezeptorantagonisten entwickelt werden, die durch eine andere Metabolisierung (Prasugrel) oder durch einen direkt aktiven Metaboliten (Ticagrelor) diese Clopidogrel-Resistenz umgehen und möglicherweise überlegen sind (Schömig, 2009).

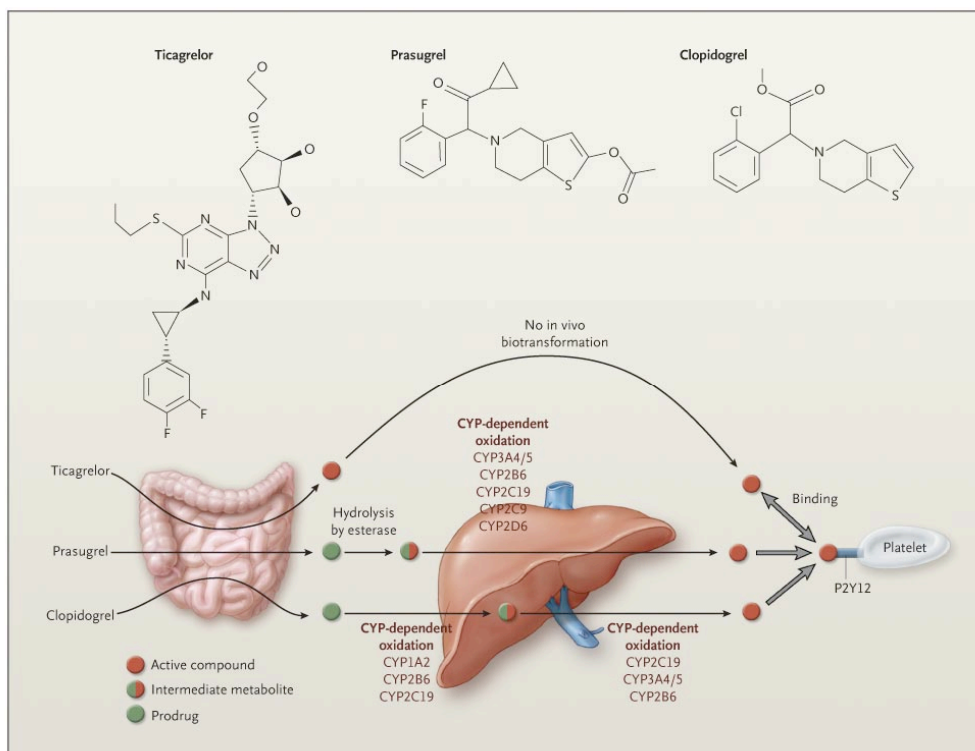


Abb.5 Biotransformation von Clopidogrel, Prasugrel und Ticagrelor (Schömig, 2009)

Ticagrelor muss nicht wie Clopidogrel erst in einen aktiven Metaboliten transformiert werden. Es bindet direkt an den P2Y12-Rezeptor und kann seine Wirkung unmittelbar entfalten. Prasugrel und Clopidogrel hingegen sind "Prodrugs" und müssen nach intestinaler Resorption in Abhängigkeit von den in der Leber befindlichen Isoenzymen P-450 in ihre aktive Form überführt werden.

1.5 Marker für Inflammation und oxidativen Stress

1.5.1 Myeloperoxidase (MPO)

Myeloperoxidase (MPO), ein in neutrophilen Granulozyten, Monozyten und Makrophagen exprimiertes Protein dient, so glaubte man bislang, ausschließlich der innate Immunabwehr, indem es in Gegenwart von H_2O_2 bakterizide Spezies wie HOCl generiert.

Untersuchungen in jüngster Vergangenheit zeigen, dass MPO allerdings wichtige Funktionen in der Pathogenese der chronisch vaskulären Inflammation zugeschrieben werden können.

Es konnte gezeigt werden, dass hohe MPO Serumspiegel mit einem erhöhten Risiko für Myokardinfarkt und Tod einhergehen (Baldus, Heeschen et al., 2003; Brennan e Hazen, 2003). Durch erhöhte Granulozytenaktivierung kommt es zur vermehrten lokalen Ausschüttung von MPO, die ihrerseits zunächst an die endotheliale Oberfläche bindet.

Nach der Bindung an die Endothelzelle folgt anschließend eine endotheliale Transzytose und Akkumulation im subendothelialen Raum (Baldus, Heeschen et al., 2003; Mollnau, Schulz et al., 2003). Diese strategisch günstige Position befähigt die MPO zur Oxidation von endothelial generiertem NO auf dem Weg zu dessen Wirkort der Tunica media. Der von der MPO induzierte Oxidationsprozess findet nicht direkt, sondern über niedermolekulare Radikalzwischenprodukte wie Ascorbyl- oder Tyrosylradikale statt, die wiederum eine Akzentuierung der Oxidation von NO in vivo im subendothelialen Raum der Gefäße hervorrufen.

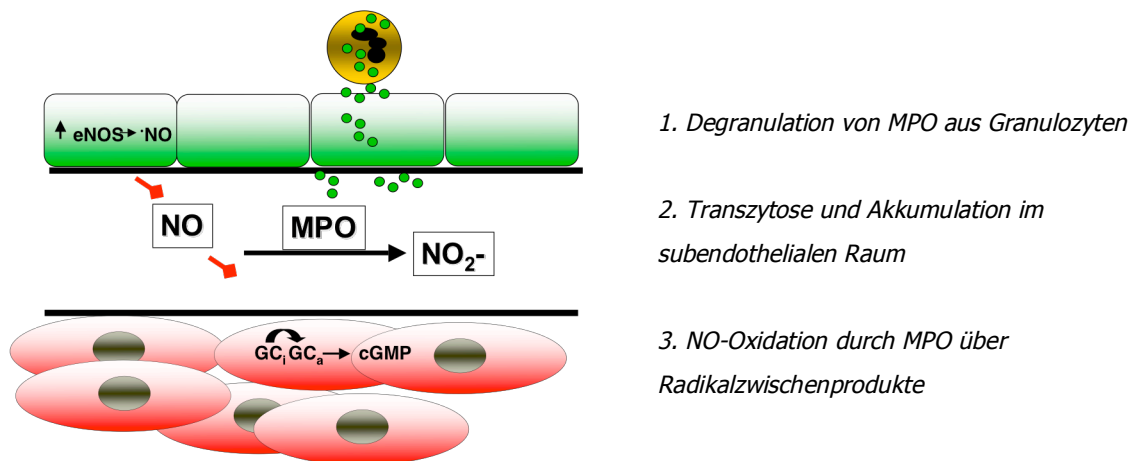


Abb. 6 Oxidation von Stickstoffmonoxid durch Myeloperoxidase

Folge ist eine verminderte Bioverfügbarkeit des endothelial generierten Signalmoleküls Stickstoffmonoxid (NO) (Eiserich/Baldus et al. Science 2002).

Die daraus resultierende Reduktion der NO- Bioverfügbarkeit verstärkt die endotheliale Dysfunktion, da potente antiinflammatorische Eigenschaften von Stickstoffmonoxid entfallen.

1.5.2 RANTES (regulated upon activation normal t-cell expressed and secreted)

RANTES ist ein Chemokin der C-C-Subfamilie. Es wird in den Granula von Thrombozyten gespeichert und bei Thrombozytenaktivierung freigesetzt. RANTES nimmt nach Exkretion Einfluss auf die Aktivierung von Zellen der weißen Reihe (Lymphozyten, Killerzellen, Mastzellen) und Thrombozyten (Von Hundelshausen, Weber et al., 2001; Molero, Lopez-Farre et al., 2005; Von Hundelshausen, Koenen et al., 2005). Der genaue Interaktionsmechanismus dieser beiden Zellreihen ist noch nicht gut verstanden (Weyrich, Prescott et al., 2002). Entscheidend ist aber, dass die Progression der Atherosklerose und der Schweregrad einer dilatativen Kardiomyopathie mit der RANTES-Plasmaspiegelkonzentration korreliert (Weyrich, Prescott et al., 2002; Sigusch, Lehmann et al., 2006).

Welt et al. konnten 2004 zeigen, dass Eptifibatid, ein GP-IIb/IIIa- Rezeptorantagonist, die Plasmakonzentration von RANTES signifikant senkt (Welt, Rogers *et al.*, 2004). Heitzer et al. konnten 2006 ebenfalls diesen Effekt unter der dualen Thrombozytenaggregationshemmung mit ASS und Clopidogrel nachweisen (Heitzer, Rudolph *et al.*, 2006).

Die Beeinflussung der RANTES-Spiegel in der Monotherapie mit Clopidogrel im Vergleich zu ASS wurde bei Patienten mit eingeschränkter linksventrikulärer Funktion bisher noch nicht untersucht.

1.5.3 Hochsensitives C-reaktives Protein (hsCRP)

Das C-reaktive Protein wird vorwiegend von der Leber synthetisiert und gehört zu den Akute-Phase-Proteinen, deren Sekretion durch Zytokine stimuliert wird (Gabay e Kushner, 1999).

So kommt es bei Gewebeläsionen, Nekrosen und bei bakteriellen Infektionen zum Anstieg dieses Proteins (Pepys, 1981). Das C-reaktive Protein aktiviert das Komplementsystem und bindet an phagozytierenden Zellen.

Erhöhte Konzentrationen von hochsensitivem CRP wurden mit inflammatorischen Prozessen im Rahmen der Atherosklerose in Zusammenhang gebracht (Ridker, 2007).

In der Physicians Health Study konnte in einem Niedrigrisikokollektiv eine lineare Korrelation von CRP-Spiegel und Inzidenz für Myokardinfarkt gezeigt werden (Ridker, 1997).

Nicht nur für die KHK ist CRP als ein Marker beschrieben worden. Kaneko et al. wiesen bei Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie, die einen erhöhten CRP-Spiegel hatten, eine erhöhte Mortalität nach (Kaneko, Kanda *et al.*, 1999).

1.5.4 Interleukin 6

Interleukin 6 ist ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von ca. 26 kD, das nicht nur von immunkompetenten Zellen, wie Makrophagen oder Lymphozyten, sondern auch von endothelialen und mesenchymalen Zellen synthetisiert werden kann.

Die Produktion von IL6 wird durch bakterielle Toxine, Viren, aber auch durch andere Zytokine wie TNF alpha und Interleukin 1 induziert. Interleukin 6 löst die Aktivierung und Differenzierung von Immunzellen aus und induziert die Akutphase-Reaktion mit Ausschüttung von C-reaktivem Protein in der Leber.

Der Interleukin 6 Plasmaspiegel geht dem CRP-Konzentrationsanstieg 24-48 Stunden voraus. Diese Eigenschaft macht man sich in der Intensivmedizin zur raschen Beurteilung akuter septischer Krankheitsbilder zunutze.

Interleukin 6 wird sowohl bei der koronaren Herzkrankheit, als auch bei der Herzinsuffizienz erhöht vorgefunden.

Es wird angenommen, dass als Folge der chronischen Herzinsuffizienz, TNF alpha die Interleukin 6- Produktion induziert (Seta, Shan et al., 1996). Darüber hinaus ist die Höhe des Interleukin 6- Spiegels ein starker eigenständiger Prädiktor für das Überleben bei Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz (Tsutamoto, Hisanaga et al., 1998).

Interleukin 6 steht zudem auch in Beziehung zu inflammatorischen Prozessen bei der koronaren Herzkrankheit. Nijm et al. konnten signifikant erhöhte Plasmaspiegel bei Patienten im akuten Koronarsyndrom nachweisen (Nijm, Wikby et al., 2005).

1.5.5 BNP (Brain-natriuretic-peptide)

BNP ist ein 32- Aminosäuren-Neurohormon, dass bei erhöhter Wandspannung des linken oder rechten Ventrikels intraventrikulär ausgeschüttet wird (Yasue, Yoshimura et al., 1994; Levin, Gardner et al., 1998).

Die Höhe des BNP korreliert mit der klinischen Symptomatik der Herzinsuffizienz (Remme e Swedberg, 2001).

Darüber hinaus hat BNP einen prognostischen Wert als Marker bei Myokardinfarkt (Richards, Nicholls et al., 1998) und Herzinsuffizienz (De Lemos, Morrow et al., 2001).

Es ist erforderlich, dass bei der Interpretation der BNP-Plasmakonzentration die Einflussnahme von Alter, Geschlecht, Nierenfunktion und Pharmakotherapie mit berücksichtigt wird (Luchner, Burnett et al., 2000; Luchner, Hengstenberg et al., 2002).

1.5.6 Elastase

Elastase ist ebenso wie MPO ein Enzym, das in den azurophilen Granula von neutrophilen Granulozyten gespeichert wird und bei Aktivierung derselben ins Plasma freigegeben wird.

In unserer Studie bestimmten wir Elastase, um zu untersuchen, ob und inwieweit die MPO-Plasmaspiegelveränderung auf eine vermehrte Degranulation von Leukozyten basiert.

Elastase ist zudem ein von MPO unabhängiger Marker für vaskuläre Inflammation bei der KHK als auch ein Parameter für die Progression der chronischen Herzinsuffizienz. Clark et al. konnten bei Patienten mit hochgradig eingeschränkter LV-Funktion nach Implantation linksventrikulärer Herzunterstützungssysteme (left ventricular assist devices, LVAD) einen Abfall erhöhter Elastasespiegel im Serum zeigen (Clark, Loebe et al., 2001).

Amaro et al. konnten im Serum signifikant höhere Elastasekonzentrationen messen bei Patienten mit KHK und angiographisch gesicherten Koronarstenosen (Amaro, Gude et al., 1995).

1.6 Ziele der Studie

Das Ziel dieser Studie war, die antiinflammatorischen Effekte einer Dauertherapie von Clopidogrel 75 mg im Vergleich zu ASS 100 mg bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit und eingeschränkter linksventrikulärer Funktion zu evaluieren.

Heitzer et al. konnten unter einer dualen Therapie mit ASS und Clopidogrel die antiinflammatorischen Effekte unter Clopidogrel durch Verbesserung der Endothelfunktion bei Patienten nach akutem Koronarsyndrom belegen (Heitzer, Rudolph *et al.*, 2006). Auch in anderen Arbeitsgruppen wurden diese Effekte gezeigt. Molero et al. konnten die Abnahme der Expression von P-Selectin und CD40L als zusätzlichen Wirkmechanismus von Clopidogrel nachweisen (Molero, Lopez-Farre et al., 2005).

Darüber hinaus wurde nachgewiesen, dass Clopidogrel die Interaktionen von Thrombozyten und Leukozyten reduziert (Xiao e Theroux, 2004).

Bislang liegen keine Daten darüber vor, ob und welche antiinflammatorischen Effekte Clopidogrel bei Patienten mit ischämischer Kardiomyopathie hervorruft.

Die Effekte von Clopidogrel auf die Endothelfunktion bzw. auf die vaskulären Inflammation sind in bisherigen Studien bei Patienten mit kompensierter Herzinsuffizienz noch nicht untersucht worden.

In der vorliegenden Untersuchung wurde erstmalig die Endothelfunktion und die vaskuläre Inflammation bei kompensierter ischämischer Herzinsuffizienz analysiert.

Primärer Endpunkt der gegenwärtigen Studie war die Veränderung der flussabhängigen Dilatation der A. brachialis, gemessen mittels Ultraschall vor und unter einer Therapie mit Clopidogrel versus ASS.

Sekundärer Endpunkt dieser Untersuchung war die Veränderung der inflammatorischen Marker und dem Herzinsuffizienzmarker BNP.

II. Material und Methode

2.1 Auswahl der Patienten

Es wurden 64 Patienten eingeschlossen, die im Universitären Herzzentrum Hamburg-Eppendorf im Jahr 2007 stationär oder ambulant vorstellig wurden. Alle Patienten gaben ihr schriftliches Einverständnis.

Die Studie wurde durch die Ethikkommission der Ärztekammer Hamburg genehmigt (EudraCt-Nnummer: 2006-000001-27).

Einschlusskriterien

- männliche und weibliche Patienten
- chronische ischämische Kardiomyopathie mit LV-EF \leq 40% (ermittelt mittels TTE/TEE oder LV-Angio)
- Vorliegen der schriftlichen Einverständniserklärung

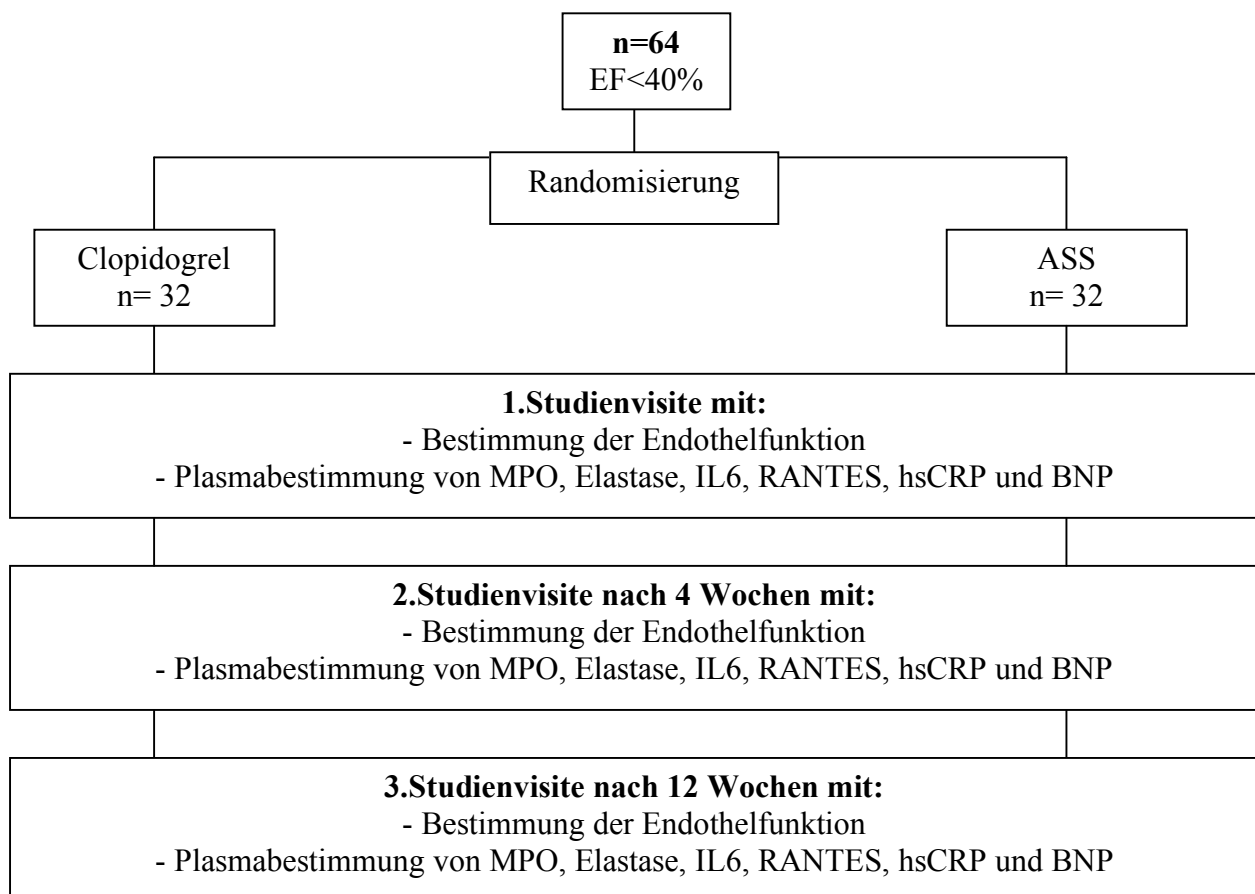
Ausschlusskriterien

- Alter unter 18 Jahren
- Schwangerschaft, Stillzeit
- bekannte Niereninsuffizienz (Kreatinin $>$ 1,5 mg/dl)
- bekannte Leberinsuffizienz
- schweres Asthma bronchiale
- Herzinsuffizienz valvulärer oder kongenitaler Ätiologie
- höhergradige Klappenitien
- Perkutane Intervention während der Studiendauer
- Akutes Koronarsyndrom
- bekannte Unverträglichkeit gegen eines der verwandten Medikamente bzw. gegen NSAR
- bekanntes Magen- oder Duodenalulkus
- gleichzeitige Therapie mit anderen Antikoagulanzen (Cumarin-Derivate oder Heparin in therapeutischer Dosierung; Ausnahme: niedrig-dosierte Heparin-Therapie)
- krankhaft erhöhte Blutungsneigung (hämorrhagische Diathese)
- intrakranielle Blutung

2.2 Studienprotokoll

In dieser monozentrisch, randomisierten, doppelblind kontrollierten Studie wurden 64 Patienten mit chronisch ischämischer Kardiomyopathie untersucht und behandelt - davon 32, die mit Clopidogrel 75 mg und eine Vergleichsgruppe von 32 Patienten, die mit ASS 100 mg therapiert wurden. Zuvor waren alle Patienten auf eine Monotherapie mit ASS 100 mg eingestellt. Die übrige medikamentöse Therapie wurde unverändert fortgeführt. Es wurde explizit darauf geachtet, dass keine weiteren zusätzlichen, insbesondere endothelfunktionsbeeinflussenden Medikamente, verordnet wurden. Die Gesamtdauer der Studie betrug 3 Monate. In dieser Zeit musste jeder Patient an drei Studienvisiten teilnehmen, in denen Endothelfunktion, das Routinelabor und die Plasmaspiegel verschiedener inflammatorischer Marker untersucht wurden.

So ergab sich folgender Studienablauf:



2.3. Endothelfunktionsmessung

Die Endothelfunktionsmessung wurde nach den Empfehlungen der internationalen Leitlinie für Endothelfunktionsmessung durchgeführt (Corretti, Anderson *et al.*, 2002).

Da die Endothelfunktion durch Faktoren wie z.B. Nahrungsaufnahme, Temperaturschwankungen und Rauchen beeinflusst wird, wurden alle Patienten nüchtern untersucht und durften 6 Stunden nicht geraucht haben. Die Untersuchungen fanden in einem abgedunkelten, leisen und temperierten Raum statt.

FMD (flow mediated dilation)

Unter Verwendung eines hochauflösenden Ultraschallgerätes (12 MHz-Schallkopf) wurde die A. brachialis oberhalb der Fossa antecubitalis in einer Filmsequenz aufgenommen und der Gefäßdurchmesser dokumentiert. Nach suprasystolischer Kompression über 5 Minuten wurde der Durchmesser erneut an exakt derselben Stelle bestimmt. Zusätzlich erfolgte die Messung des Flusses pro Zeiteinheit (VTI) mit Hilfe eines PW-Dopplers vor und nach Okklusion. Die Zunahme des Blutflusses und Auslösung von Scherstress nach Lösen der Manschette stellt den Stimulus für die NO-Freisetzung aus dem Endothel dar und wird als reaktive Hyperämie bezeichnet.

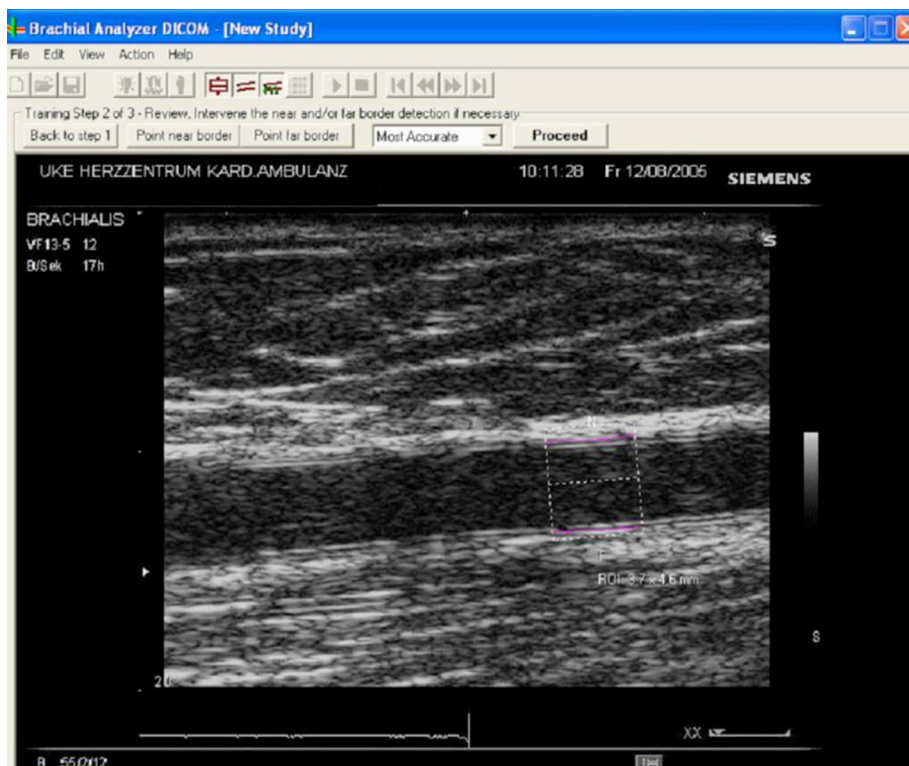


Abb. 7 Ultraschalldarstellung der A. brachialis im Längsschnitt und Messung des Gefäßdurchmessers

NMD (glycerin mediated dilation)

Nach einer Ruhephase von 10 Minuten wurde die nitroinduzierte Vasodilatation ermittelt. Vor einer sublingualen Nitroglyzeringabe wurde zunächst erneut der Gefäßdurchmesser bestimmt. 4 Minuten nach Nitrogabe wurde die flussunabhängige Vasodilatation in einer Filmsequenz dokumentiert.

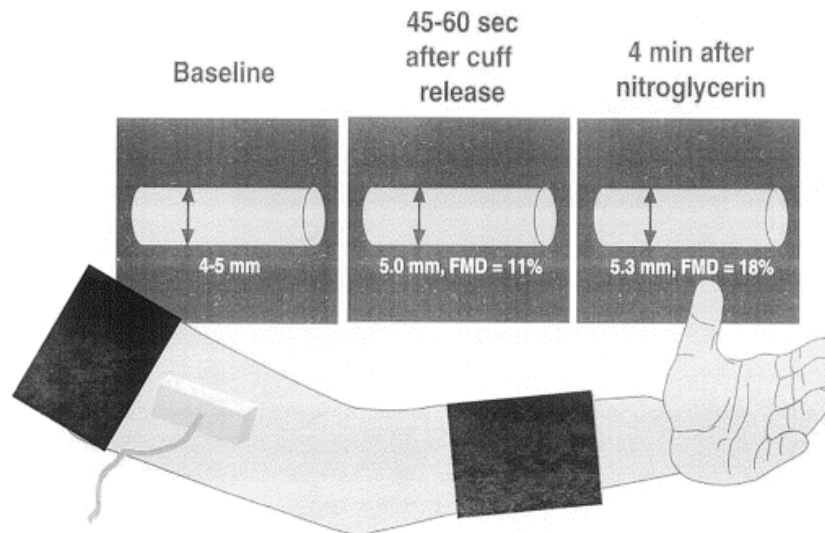


Abb.8 Endothelfunktionsmessung aus (Corretti, Anderson et al., 2002)

Die Diameter wurden mit Hilfe einer speziellen Auswertesoftware (Brachial Analyzer, Medical Imaging Application LLC) ermittelt.

2.4. Probengewinnung

In jeder Studienvisite erfolgte eine Blutentnahme. Das Blut wurde in einem Heparinröhrchen gewonnen und im Anschluss bei 4000 Umdrehungen/Minute 3 Minuten zentrifugiert. Der Plasmaüberstand wurde bei -80 Grad bis zur endgültigen Messung der inflammatorischen Marker eingefroren.

2.5. Sandwich-ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

Das Plasma wurde zunächst über Nacht bei +4°C aufgetaut und am nächsten Morgen mit einem Probenverdünnungspuffer in vorgegebener Anleitung des ELISA-Testherstellers verdünnt. Daraufhin erfolgte die Pipettierung und Inkubation einer Mess- und Standardreihe auf eine Mikrotiterplatte. Diese Platte ist mit einem polyklonalen Antikörper (*coating*-Antikörper) beschichtet, sodass das im Plasma befindliche Antigen hier binden kann.

Nach Ablauf der Inkubationsphase wird die Platte mit einem dafür vorgesehenen Waschpuffer gewaschen. Die ungebundenen Bestandteile der Probe werden dadurch entfernt und zurück bleibt nur das am (*coating*-) Antikörper gebundene Antigen. Im nächsten Schritt wird ein Detektions- (*detection*)-Antikörper, gekoppelt mit einem Enzym zugegeben. Dieser bindet ebenfalls an das Antigen und es entsteht der Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex (deshalb der Name Sandwich-ELISA - das Antigen ist zwischen die beiden Antikörper wie in einem Sandwich gepackt). Durch erneutes Waschen der Platte wird der überschüssige zweite Antikörper ausgewaschen und dann ein zum an den Antikörper gebundenes Enzym passendes chromogenes Substrat zugegeben. Dieses wird vom Enzym zu einem Reaktionsprodukt umgesetzt. Es kommt zu einem Farbumschlag, der in einem Photometer verfolgt werden kann. Die Intensität der Farbe ist dabei proportional zu der Konzentration des zu bestimmenden Antigens in der Probe.

Nach diesem Testprinzip erfolgte die Plasmakonzentrationsbestimmung der folgenden Marker:

- **Elastase ng/ml**
- **RANTES pg/ml**
- **Hochsensitives CRP (hsCRP) mg/l**
- **Interleukin 6 (IL6) g/ml**
- **proBNP ng/l**
- **Myeloperoxidase (MPO) ng/ml**

2.6. Statistische Auswertung

Der primäre Zielparameter war die Clopidogrel- beziehungsweise die ASS- induzierte Änderung der FMD. Kontinuierliche Variablen wurden mit Hilfe des Kolmogorov-Smirnov Tests auf Normalverteilung geprüft. Normalverteilte Daten wurden als Mittelwert \pm Standardabweichung, nicht-normalverteilte Daten als Median und interquartile Ränge angegeben. Für den Vergleich von normalverteilten Parametern kam der gepaarte bzw. der ungepaarte Student's T-Test (2-seitig) zur Anwendung. Der Vergleich von nicht-normalverteilten Parametern erfolgte mit Hilfe des Mann-Whitney U Test und des Wilcoxon's signed Rang Summen Test. Für die Untersuchung eines Zusammenhanges zwischen FMD und anderer im Serum erhobener Parameter kam eine Korrelation nach Pearson bzw. Spearman zur Anwendung. Kategorische Daten wurden als Häufigkeiten und Prozente angegeben und mit Hilfe des χ^2 -Tests bzw. des Fisher's Test verglichen. Alle Analysen außer des gepaarten Vergleichs der Änderung der FMD nach Clopidogrel bzw. nach ASS erfolgten auf einer explorativen Basis, um mögliche Mechanismen aufzudecken. Es wurde hierbei keine weitere Korrektur eines Typ I-Fehlers vorgenommen.

Ein P-Wert $< 0,05$ wurde als statistisch signifikant betrachtet. Die gesamte statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe von SPSS Version 12.0.

III. Ergebnisse

3.1. Patientencharakteristika

	ASS n=28	Clopidogrel n=28	p-Wert
Alter, (Jahre)	63,2	67,4	0,07
Männlich, (%)	82,1	96,4	0,06
BMI, (kg/m²)	28,2	28,8	0,7
Nikotinabusus, (%)	57,1	64,3	0,61
Hypercholesterinämie, (%)	75	75	0,57
Diabetes mellitus, (%)	17,8	7,1	0,26
Art. Hypertonus, (%)	60,7	71,4	0,4

Tab. 1 Patientencharakteristika

Die Tabelle zeigt die Verteilung des Alters und der kardiovaskulären Risikofaktoren der Patienten beider Studienarme im Vergleich (links ASS, rechts Clopidogrel). Das Alter ist als arithmetisches Mittel in Jahren und der Body-Maß-Index (BMI) als arithmetisches Mittel in kg/m²-Körperoberfläche angegeben. Die übrigen kardiovaskulären Risikofaktoren (männliches Geschlecht, Nikotinabusus, Hypercholesterinämie, Diabetes mellitus und arterieller Hypertonus) sind in Prozent (%) angegeben.

In dieser doppelblind randomisierten Studie zeigten sich keine signifikante Unterschiede in den klinischen Ausgangsparametern.

Das Alter der Patienten war im Mittel tendenziell 4 Jahre älter mit einem p-Wert von p=0,07. Auch das männliche Geschlecht war im Trend in der Clopidogrelgruppe im Mittel um 14 Prozentpunkte eher stärker vertreten mit einem p-Wert von p=0,06.

Die übrigen kardiovaskulären Risikofaktoren waren annähernd in beiden Gruppe gleich verteilt.

3.2. Flussabhängige Dilatation (FMD)

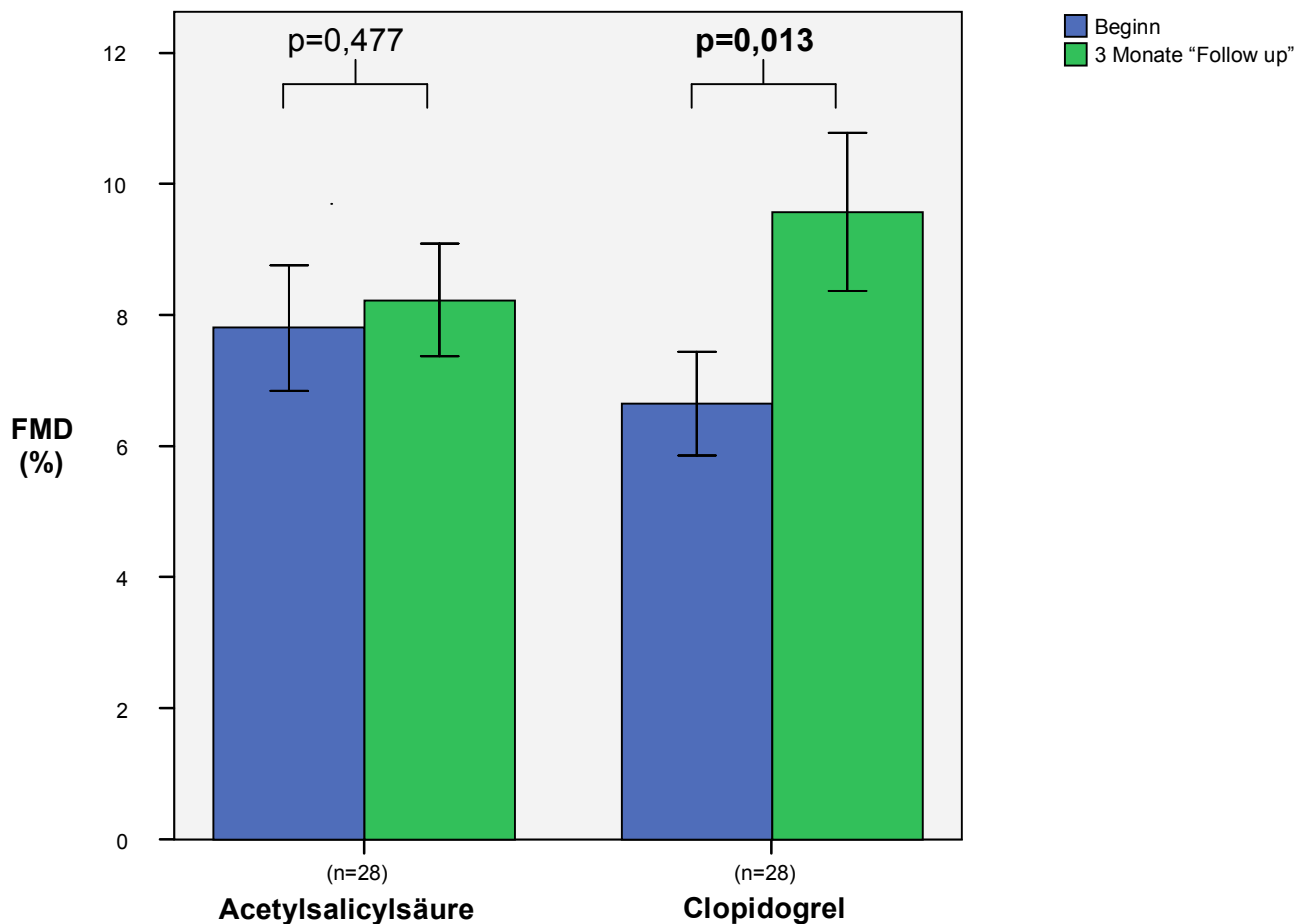


Abb.9 Effekt von ASS und Clopidogrel auf die Endothelfunktion

Der primäre Endpunkt der Studie war der Effekt auf die endotheliale Funktion von Clopidogrel bzw. ASS gemessen mittels flussabhängiger Dilatation (FMD).

Die blauen Balken zeigen die gemittelte Endothelfunktion der Patienten zu Beginn der Studie, die grünen Balken stellen die FMD nach einer Therapiedauer von 3 Monaten dar. Im Vergleich zeigten sich gleiche Ausgangsbedingungen der Endothelfunktion beider Gruppen zu Beginn der Untersuchung; *FMD/Beginn* ([7,81 vs. 6,65]%; $p=0,374$).

Nach der Therapie mit Acetylsalicylsäure zeigte sich keine signifikante Änderung; *FMD/ASS* ([7,81 vs. 8,23]%; $p=0,477$). Hingegen resultierte eine signifikante Zunahme der endothelabhängigen Vasodilatation nach einer dreimonatigen Clopidogreltherapie; *FMD/Clopidogrel* ([6,65 vs. 9,57]%; $p=0,013$).

Auch wenn nach drei Monaten die FMD in der Clopidogrelgruppe im Mittel größer war, so war dieser Unterschied zur ASS-Gruppe nicht signifikant; *FMD/"Follow up"* ([8,23 vs. 9,57]%; $p=0,369$).

3.3. Effekte auf die biochemischen Parameter

3.3.1. Plasmaspiegel des hs-CRP in der ASS-/Clopidogrel- Gruppe

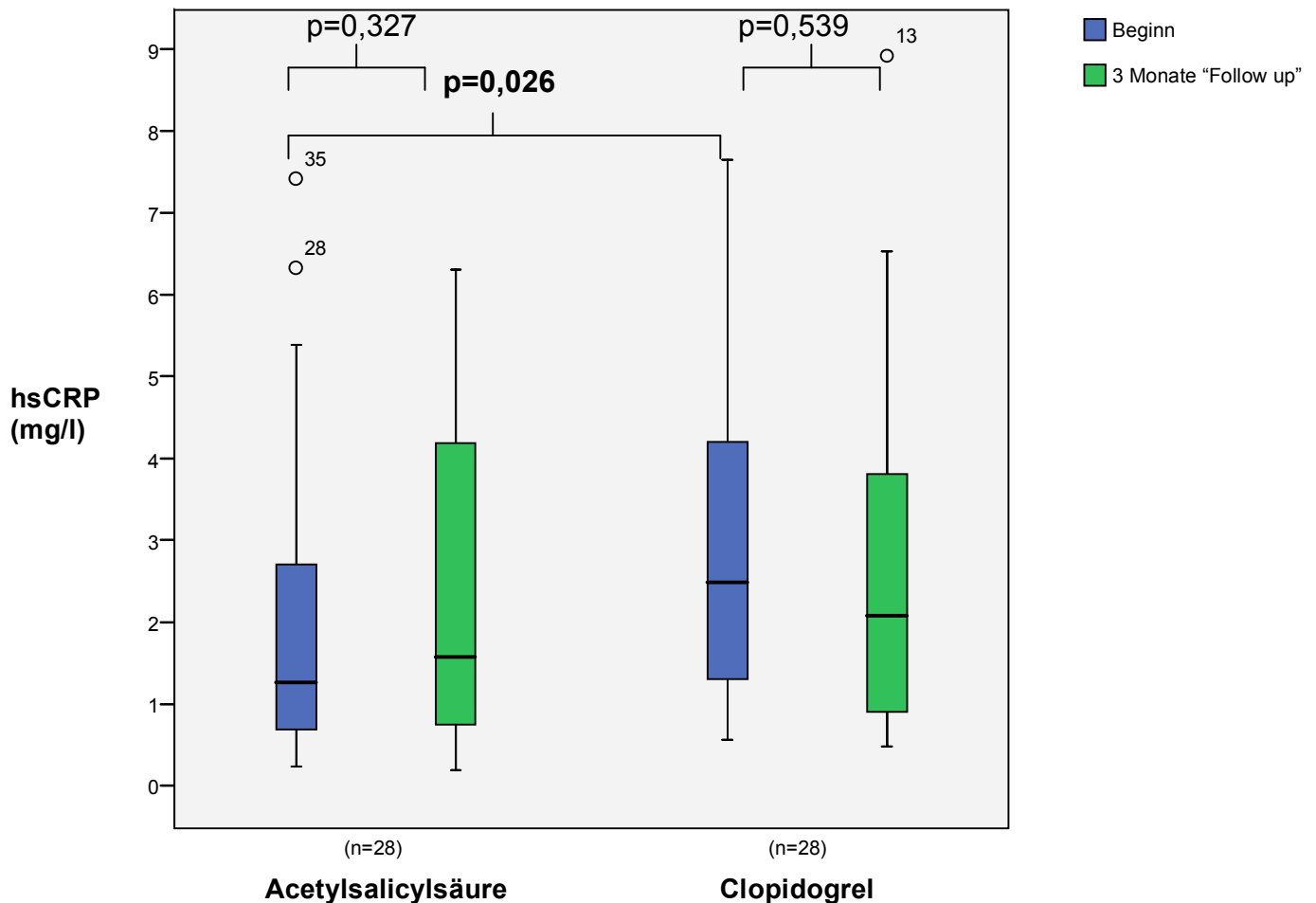


Abb.10 Effekt von ASS und Clopidogrel auf den hs-CRP-Plasmaspiegel

Es zeigten sich signifikant ungleiche Ausgangsbedingungen der hs-CRP-Spiegel beider Gruppen zu Beginn der Untersuchung mit höheren hs-CRP-Spiegeln in der Clopidogrelgruppe; *hs-CRP/Beginn*(1,26[IR:0,68-2,87]vs.2,49[IR:1,27-4,44]mg/l; $p=0,026$). Dieser Unterschied war nach dreimonatiger Therapie mit Clopidogrel nicht mehr nachweisbar; *hs-CRP/"Follow up"*(1,58[IR:0,68-4,19]vs.2,49[IR:1,27-4,44]mg/l; $p=0,394$). Für Acetylsalicylsäure ergab sich keine signifikante Änderung; *hs-CRP/ASS*(1,26[IR:0,68-2,87]vs.1,58[IR:0,68-4,19]mg/l; $p=0,327$). Der Vergleich im Clopidogrelarm vor und nach drei Monaten Therapie ergab ebenfalls keine statistisch signifikante Änderung; *hs-CRP/Clopidogrel*(2,49[IR:1,27-4,44]vs.2,07[IR:0,89-3,92]mg/l; $p=0,539$).

3.3.2. RANTES-Plasmaspiegel in der ASS-/Clopidogrel- Gruppe

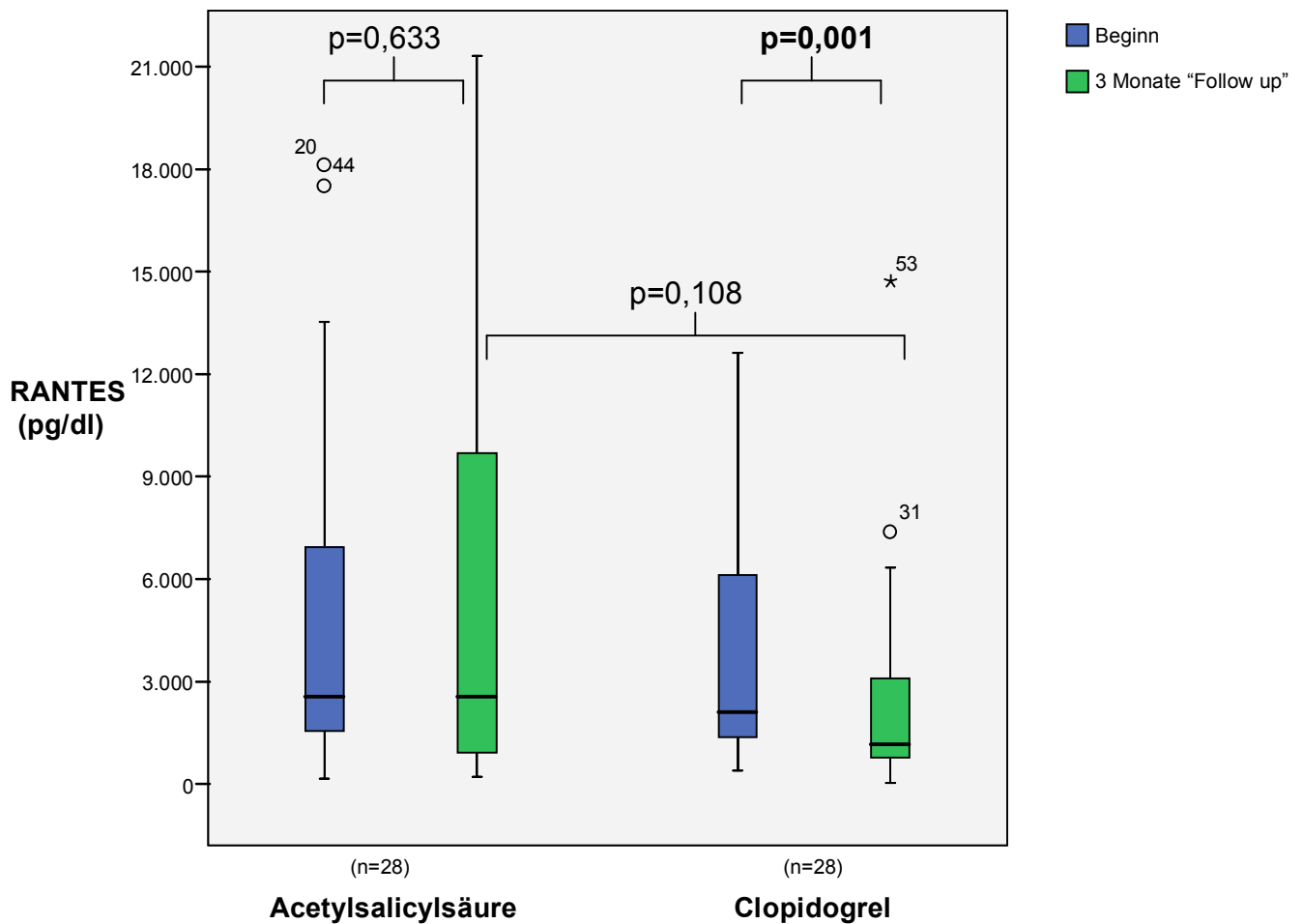


Abb.11 Effekt von ASS und Clopidogrel auf den RANTES-Plasmaspiegel

Im Vergleich zeigten sich nahezu gleiche RANTES-Plasmakonzentrationen beider Gruppen zu Beginn der Untersuchung; *RANTES/Beginn*(3124[IR:2073-7783]vs. 2675[IR:1941-6901]pg/dl; $p=0,445$).

Nach der dreimonatigen Standardtherapie mit ASS zeigte sich keine signifikante Veränderung der RANTES-Konzentration im Blut des Kontrollkollektivs; *RANTES/ASS*(3124[IR:2073-7783]vs.3135[IR:1456-10743]pg/dl; $p=0,633$).

Unter der Therapie mit Clopidogrel hingegen konnte eine signifikante Verminderung der RANTES-Konzentration im Plasma beobachtet werden; *RANTES/Clopidogrel*(2675[IR:1941-6901]vs.1735[IR:1347-3683]pg/dl; $p=0,001$).

Im „Follow up“ – Vergleich zwischen den beiden Gruppen zeigte sich eine Tendenz zu einer Reduktion der Plasmakonzentration unter einer Clopidogreltherapie; *RANTES/"Follow up"*(3135[IR:1456-1074]vs.1735[IR:1347-3683]pg/dl; $p=0,108$).

3.3.3. MPO-Plasmaspiegel in der ASS-/Clopidogrel-Gruppe

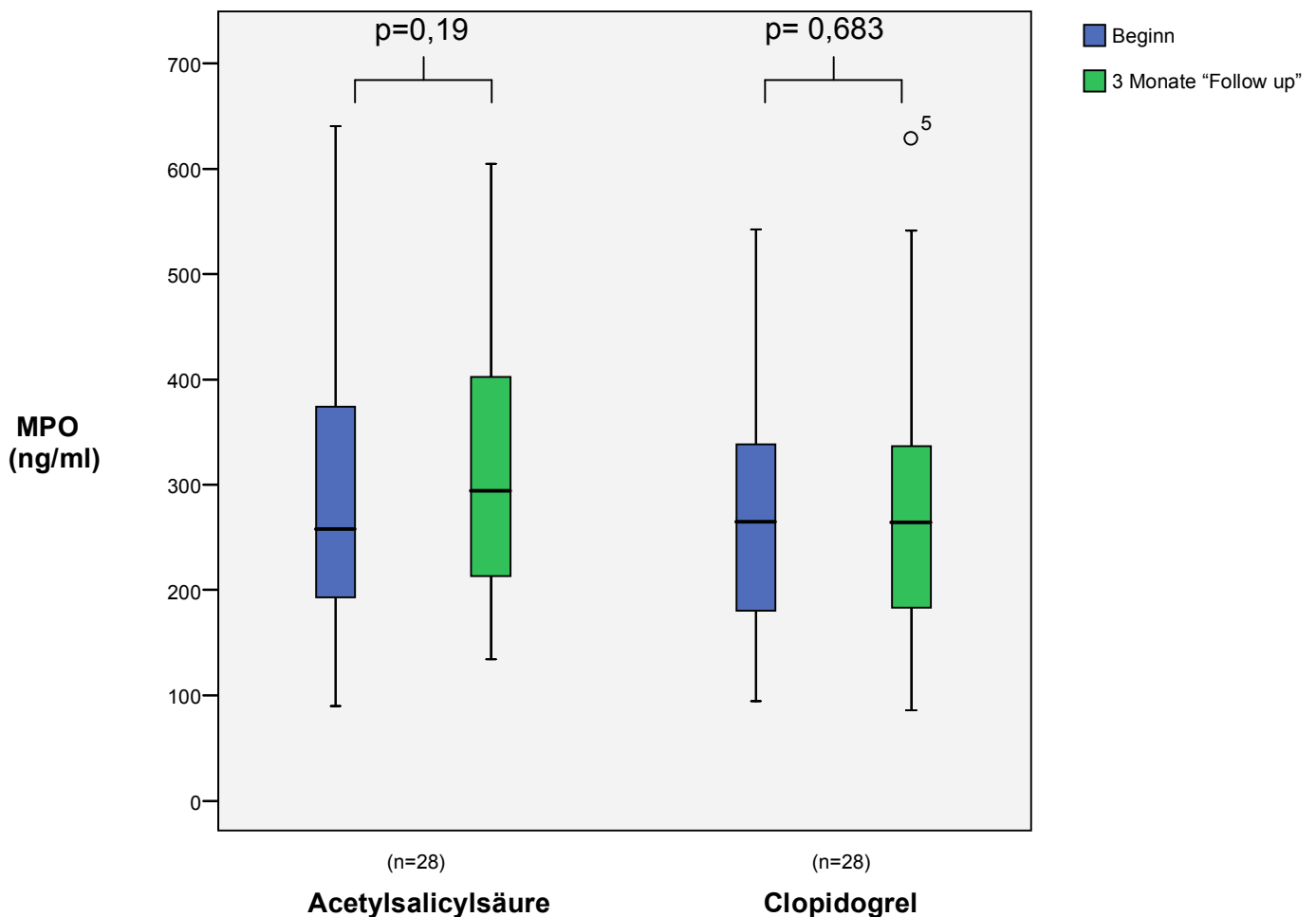


Abb.12 Effekt von ASS und Clopidogrel auf den MPO-Plasmaspiegel

Auch für MPO ergaben sich zu Beginn der Untersuchung vergleichbare Plasmaspiegel; MPO/Beginn(258[IR:194-381]vs.256[IR:172-348]ng/ml; $p=0,815$).

Nach der dreimonatigen Therapie mit Clopidogrel zeigte sich keine signifikante Veränderung der MPO-Konzentration im Blut; MPO/Clopidogrel(256[IR:172-348]vs.264[IR:183-338]ng/ml; $p=0,683$).

Nach der Therapie mit ASS war der MPO-Plasmaspiegel ebenfalls nicht signifikant verändert; MPO/ASS(258[IR:194-381]vs.294[IR:207-402]ng/ml; $p=0,19$). Auch der Vergleich der MPO-Plasmaspiegel nach drei Monaten zwischen den Gruppen zeigte keinen statistisch signifikanten Unterschied; MPO/"Follow up"(294[IR:207-402]vs. 264[IR:183-338]ng/ml; $p=0,265$).

3.3.4. Elastase-Plasmaspiegel in der ASS-/Clopidogrel-Gruppe

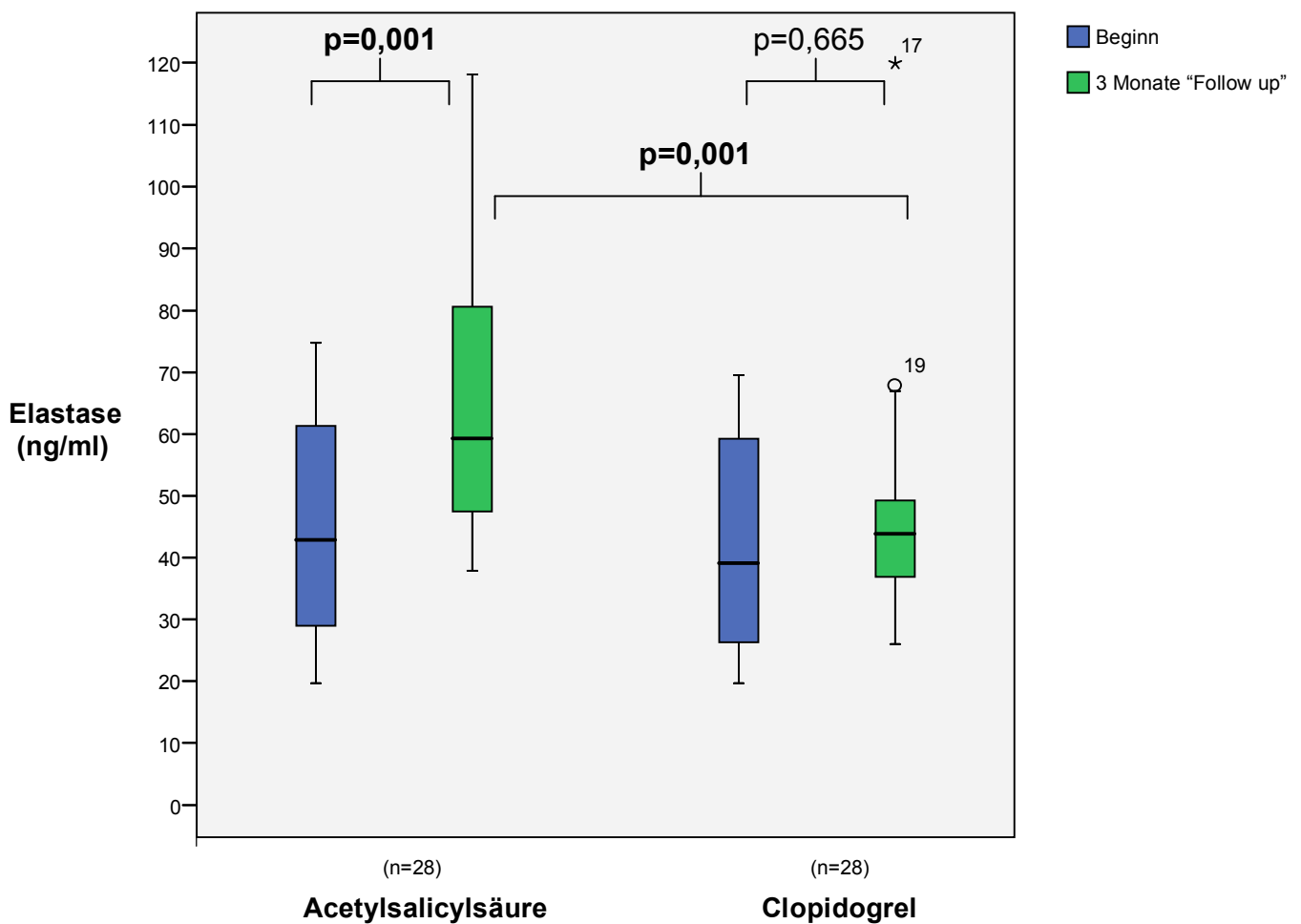


Abb.13 Effekt von ASS und Clopidogrel auf den Elastase-Plasmaspiegel

Für Elastase zeigten sich fast gleiche Plasmakonzentrationen zu Beginn der Untersuchung; *Elastase/Beginn*(42,8[IR:28,4-61,8]vs.39,11[IR:28,4-61,8]ng/ml; $p=0,425$).

Die Elastasespiegel stiegen nach dreimonatiger Therapie in der ASS-Gruppe an; *Elastase/ASS*(42,8[IR:28,4-61,8]vs.59,3[IR:47,3-80,8]ng/ml; $p=0,001$), blieben in der Clopidogrelgruppe hingegen unverändert; *Elastase/Clopidogrel*(39,11[IR:28,4-61,8]vs.43,9[IR:36,8-49,4]ng/ml; $p=0,665$).

Im „Follow up“ –Vergleich zwischen den Gruppen zeigten sich signifikant niedrigere Elastasespiegel im Serum unter einer Clopidogreltherapie; *Elastase/„Follow up“*(59,3[IR:47,3-80,8]vs.43,9[IR:36,8-49,4]ng/ml; $p=0,001$).

3.3.5. Interleukin 6-Plasmaspiegel in der ASS-/Clopidogrel-Gruppe

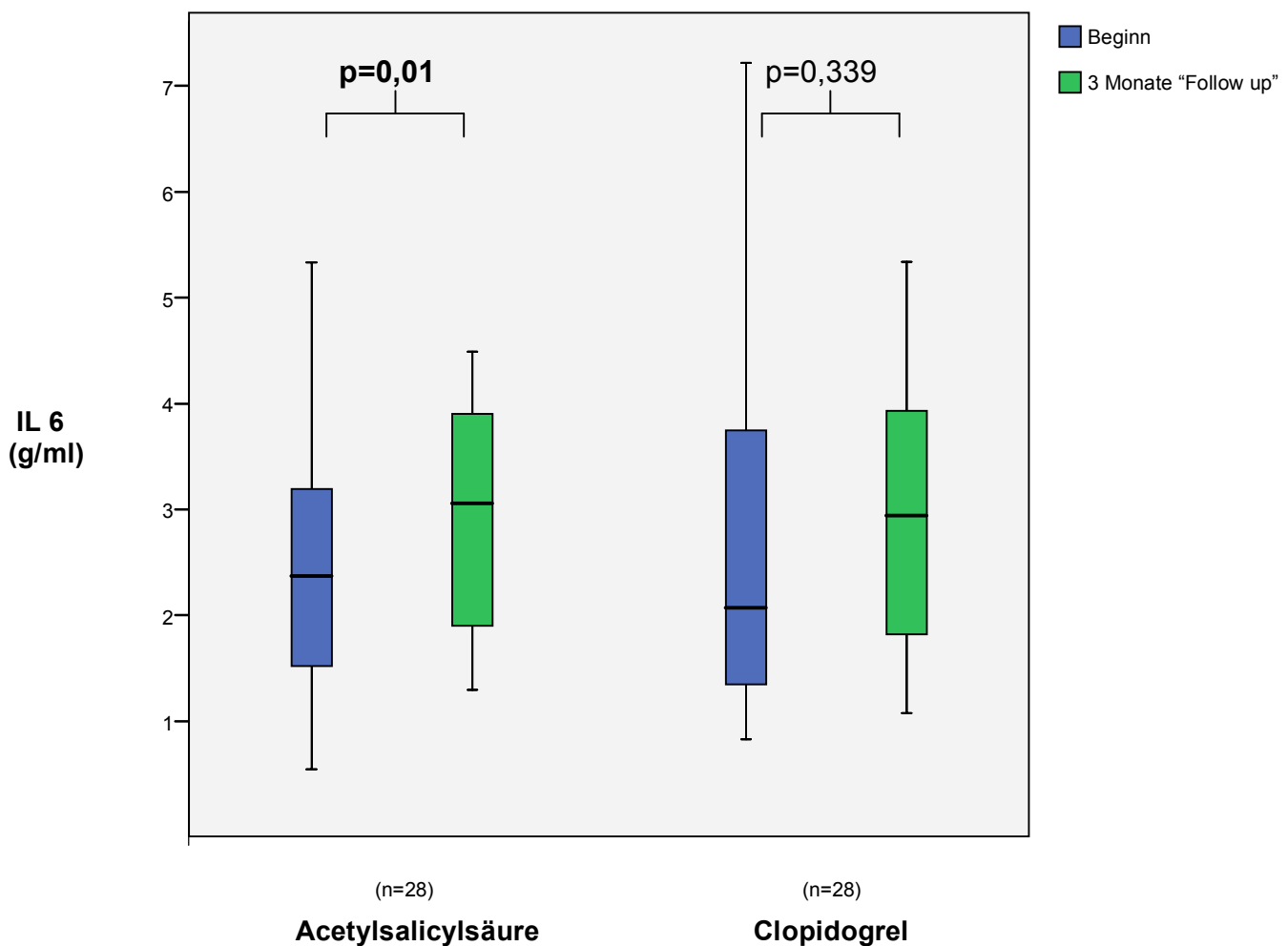


Abb.14 Effekt von ASS und Clopidogrel auf den Interleukin-6-Plasmaspiegel

Interleukin 6 wies zu Beginn eine nahezu gleiche Verteilung zwischen den Gruppen auf; $IL6/Beginn(2,37[IR:1,47-3,32]vs. 2,07[IR:1,24-3,86]g/ml; p=0,445)$.

Nach einer dreimonatigen Therapie mit Clopidogrel zeigte sich keine signifikante Veränderung des inflammatorischen Markers Interleukin 6; $IL6/Clopidogrel(2,07[IR:1,24-3,86]vs.2,94[IR:0,68-3,97]g/ml; p=0,339)$.

Hingegen konnte nach drei Monaten eine signifikante Zunahme der Interleukin 6 Spiegel im Plasma bei Patienten, die weiter mit ASS behandelt wurden, verzeichnet werden; $IL6/ASS(2,37[IR:1,47-3,32]vs.3,06[IR:1,85-3,9]g/ml; p=0,01)$.

Im Vergleich der Interleukinspiegel nach drei Monaten zeigt sich keine statistische Signifikanz; $IL6/"Follow up"(1,85-3,9]vs.2,94[IR:0,68-3,9]g/ml; p=0,762)$.

3.3.6. Plasmaspiegel von BNP in der ASS-/Clopidogrel-Gruppe

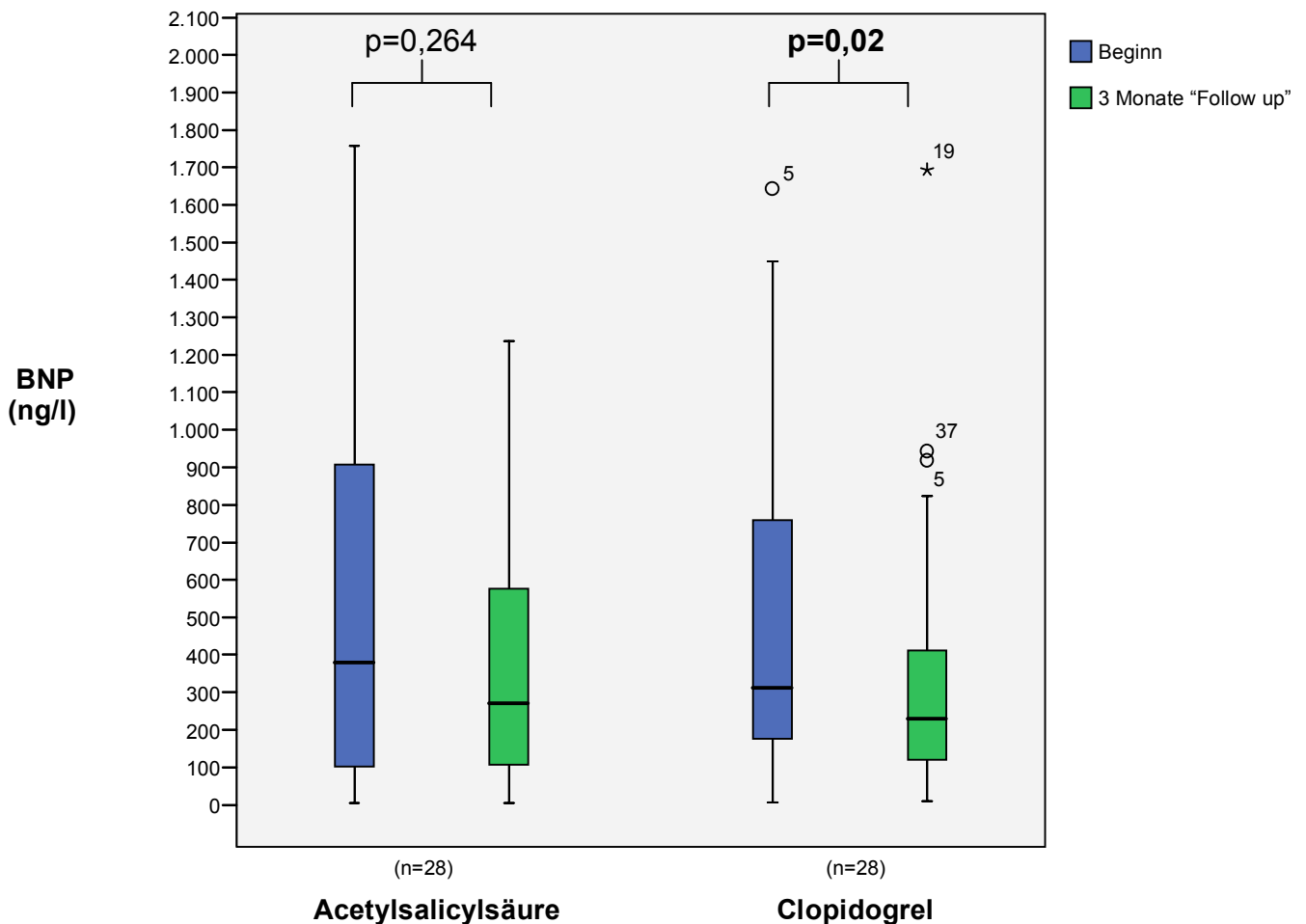


Abb.15 Effekt von ASS und Clopidogrel auf den BNP-Plasmaspiegel

Zu Beginn bestanden keine signifikanten Unterschiede für den Herzinsuffizienzmarker BNP; *BNP/Beginn*(379[IR:102-932,5]vs. 311[IR:170-830]ng/l; $p=0,445$).

Die BNP-Spiegel fielen in der Clopidogrelgruppe nach drei Monaten signifikant; *BNP/Clopidogrel*(311[IR:170-830]vs.229[IR:120.5-413,25]ng/l; $p=0,02$). In der Vergleichsgruppe mit ASS hingegen kam es zu keiner signifikanten Änderung; *BNP/ASS*(379[IR:102-932,5]vs.270[IR:85-578]ng/l, $p=0,26$).

Im Vergleich der BNP-Plasmaspiegel nach drei Monaten ergab sich keine statistische Signifikanz; *BNP/"Follow up"*(270[IR:85-578vs.229[IR:120.5-413,25]ng/l; $p =0,625$).

IV. Diskussion

Das Verständnis der Pathogenese der koronaren Herzkrankheit und der Herzinsuffizienz hat sich in den letzten Jahren entscheidend weiter entwickelt. Zunehmend konnte inflammatorischen Komponenten eine pathophysiologische Bedeutung zugeschrieben werden.

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Entwicklung der Endothelfunktion bzw. der vaskulären Inflammation unter Therapie mit ASS einerseits und Clopidogrel andererseits. In bisherigen Studien konnte eine antiinflammatorische Wirkung für ASS, Clopidogrel und insbesondere für die Kombination beider Substanzen nachgewiesen werden (Molero, Lopez-Farre *et al.*, 2005; Heitzer, Rudolph *et al.*, 2006; Kuller, Grandits *et al.*, 2007).

Heitzer *et al.* konnten die antiinflammatorische Potenz von Clopidogrel bei Patienten mit stabiler Angina pectoris belegen (Heitzer, Rudolph *et al.*, 2006).

Die antientzündliche Wirkung von Clopidogrel bei Patienten mit chronisch ischämischer Herzinsuffizienz wurde bislang noch nicht untersucht.

Dass entzündliche Prozesse eine große Rolle spielen bei Patienten mit Herzinsuffizienz, gleichwohl welcher Genese, ist mehrfach dokumentiert worden (Torre-Amione, Kapadia *et al.*, 1996; Rauchhaus, Doehner *et al.*, 2000).

In der vorliegenden Arbeit wurden 64 Patienten mit chronisch ischämischer Kardiomyopathie behandelt. 32 Patienten mit Clopidogrel 75 mg und eine Vergleichsgruppe von 32 Patienten mit ASS 100 mg.

Unter einer Therapie mit Clopidogrel ergaben sich zusammenfassend nachfolgende Ergebnisse:

1. Für Clopidogrel konnte eine signifikante Verbesserung der Endothelfunktion nachgewiesen werden, nicht dagegen für ASS.
2. Als Marker für Thrombozytenaktivierung konnten nach Therapie mit Clopidogrel die zirkulierenden RANTES-Plasmaspiegel signifikant gesenkt werden.
3. Elastase und IL6 waren in der Vergleichsgruppe nach dreimonatiger Therapie mit ASS signifikant höher als der Ausgangswert. Für Clopidogrel ergab sich keine bedeutsame Konzentrationsänderung dieser Marker der Leukozytenaktivierung.
4. Der Herzinsuffizienzmarker BNP zeigte sich im Clopidogrelarm nach Therapie signifikant reduziert – nicht aber in der ASS-Gruppe.

Aus der Reduktion der RANTES-Plasmakonzentration als Marker für Thrombozytenaktivierung unter der Clopidogreltherapie, lässt sich schlussfolgern, dass die Thrombozytenaggregationshemmung unter einer Therapie mit Clopidogrel wirkungsvoller ist als unter ASS. Diese intensivierete Hemmung der Thrombozytenfunktion ist wahrscheinlich die Grundlage für die differentiellen Veränderungen der inflammatorischen Prozesse im Vergleich von ASS und Clopidogrel.

Die verbesserte Endothelfunktion in der vorliegenden Untersuchung ist damit möglicherweise Folge der effektiveren Thrombozytenaggregationshemmung.

Denkbar sind in diesem Zusammenhang zwei mögliche Reaktionswege, die unter einer intensivierten Thrombozytenaggregationshemmung mit Clopidogrel vermehrt inhibiert werden:

a) Modulation der Superoxidanion-Generation in Thrombozyten

Der derzeitige Wissensstand postuliert, dass die Expression von Oxidantien wie Superoxid eine fast unvermeidbare Nebenreaktion des zellulären Elektronentransfers sind, wie z.B. bei der Atmungskette, Oxygenasereaktionen und Reaktionen bei Sulfhydrylverbindungen.

Eine vermehrte Produktion dieser Sauerstoffradikale, die unterschiedlichen Ursprungs sein können, hat einen entscheidenden Einfluß in der Genese der vaskulären Inflammation.

Ein wesentlicher Bestandteil der Superoxidanionen entsteht bei der Entkopplung der Atmungskette in den Mitochondrien. Diese Einflussnahme in die Reaktionen der Atmungskette wird z.B. beobachtet bei der Stoffwechselkrankheit Diabetes mellitus, die mit einem enorm erhöhten Risiko der Entwicklung einer koronaren Herzkrankheit einhergeht. Durch ein erhöhtes Angebot von Glucose und freien Fettsäuren besteht ein Überschuss an Substrat der Atmungskette und führt damit konsekutiv zur vermehrten Bildung von Superoxidanionen (Brownlee, 2001).

Zudem spielen auch Leukozyten eine große Rolle in der Sequestration von Superoxidanionen. Das wohl wichtigste Enzym zur Generierung von Superoxid ist NADPH-Oxidase. Mit Hilfe dieses Enzyms kommt es zur Übertragung von Elektronen auf ein Sauerstoffmolekül, welches wiederum durch Chloroperoxidase und Myeloperoxidase zu Hypochlorit umgesetzt wird. Hypochlorit kann als gutes Bakterizid fungieren (Shatwell e Segal, 1996).

In jüngster Zeit konnte gezeigt werden, dass auch ein wesentlicher Bestandteil der Superoxidanionen von aktivierten Thrombozyten stammt. Diese führen direkt zur Oxidation von NO und damit zur endothelialen Dysfunktion (Cai e Harrison, 2000; Krotz, Sohn et al.,

2004).

Wie und aus welchem Grund es zur Produktion von Superoxid aus Thrombozyten kommt, ist bisher nicht endgültig geklärt. Kanaya et al. zeigten im Tierexperiment, dass bei einem Mangel an Tetrahydrobiopterin, einem Kofaktor der NO-Synthase, vermehrt Superoxid gebildet wird (Kanaya, Ikeda et al., 2001). Digox et al. konnten bei dekompensierter Herzinsuffizienz durch Entkopplung der NO-Synthase eine erhöhte Superoxidproduktion beobachten. Bei diesen Patienten zeigte sich zudem auch eine damit einhergehende endotheliale Dysfunktion (Dixon, Morgan et al., 2003).

Der Zusammenhang von intensivierter Thrombozytenaggregationshemmung und verminderter ROS-Produktion (Reactive oxygen species) konnte kürzlich auch schon für einen GP-IIb/IIIa-Rezeptorantagonisten gezeigt werden (Chakrabarti, Clutton *et al.*, 2004).

Aus Genanntem geht hervor, dass Superoxid auch aus Thrombozyten einen Einfluss auf die NO-Bioverfügbarkeit hat. Bis zu welchem Anteil die verbesserte NO-Bioverfügbarkeit durch eine verminderte Superoxidproduktion verursacht ist, kann nicht abschließend geklärt werden.

b) Modulation der Interaktionen von Thrombozyten mit Leukozyten und Endothelzellen

Die verbesserte NO-Bioverfügbarkeit unter einer intensiveren Thrombozytenaggregationshemmung ist sicher nicht allein durch die verminderte Superoxidproduktion aus Thrombozyten bedingt, vielmehr auch durch eine direkte Interaktion von Thrombozyten mit Zellen der weißen Reihe und konsekutiver Einflussnahme auf die Freisetzung inflammatorischer Mediatoren.

Resultierend aus der erhöhten Leukozytenaktivierung mit vermehrter Produktion von Zytokinen und Chemokinen kommt es wiederum zum erhöhten Verbrauch von NO und damit zur Verschlechterung der endothelialen Funktion (Henn, Slupsky *et al.*, 1998; Hingorani, Cross *et al.*, 2000).

Huo et al. konnten zeigen, dass aktivierte Thrombozyten die Bindung von Leukozyten an Adhäsionsmoleküle des Endothels fördert (Huo, Schober *et al.*, 2003).

Aktivierte Leukozyten setzen ihrerseits auch reaktive Sauerstoffspezies frei, sodass es zur vermehrten Oxidation von NO, und damit einhergehend zur Reduktion der Endothelfunktion

kommt.

Interessanterweise agieren Superoxidanionen nicht nur über die direkte Oxidation von NO als Induktoren vaskulärer Schädigung, sondern können das proinflammatorische Potential steigern durch die Induktion intrazellulärer Transkriptionsfaktoren für Adhäsionsmoleküle (z.B. ICAM, VCAM), die ihrerseits erneut Leukozyten binden (Barnes e Adcock, 1997).

In dieser Untersuchung konnte MPO unter einer Clopidogreltherapie nach drei Monaten nicht reduziert gemessen werden. Zu berücksichtigen ist aber, dass ein großer Anteil der MPO am Endothel gebunden ist und deshalb im Plasma nicht messbar ist (Baldus, Rudolph *et al.*, 2006). In der subendothelialen Lokalisation ist MPO in der Lage endothelial generiertes NO auf dem Weg zu dessen Wirkort in die Tunica media zu oxidieren. Dieser Zusammenhang wäre eine Erklärung für die verbesserte Endothelfunktion bei unverändertem Plasmaspiegel von MPO.

Die fehlende Konzentrationsminderung der inflammatorischen Marker wie IL6 und Elastase unter Clopidogrel kann nicht sicher geklärt werden. Auffällig in diesem Zusammenhang war der signifikante Anstieg von IL6 und Elastase in der ASS-Gruppe - möglicherweise als Zeichen der raschen Progredienz des entzündlichen Prozesses bei chronischer Herzinsuffizienz, die unter Clopidogrel eventuell prozessverzögert stattfindet.

Die nahezu gleichbleibende Konzentration des hs-CRP vor und nach Clopidogreltherapie ist möglicherweise durch nichtvaskuläre Entzündungsprozesse, z.B. durch Virusinfektionen einzelner Patienten in der Clopidogrel-Gruppe zum Zeitpunkt der Ausgangsuntersuchung hervorgerufen. Zum Zeitpunkt der Ausgangsmessungen bestand ein signifikanter Konzentrationsunterschied mit deutlich höheren Spiegeln für hsCRP in der Clopidogrelgruppe.

Der signifikante Abfall des BNP-Plasmaspiegels nach Therapie mit Clopidogrel lässt vermuten, dass es durch eine verbesserte Endothelfunktion zur peripheren Vasodilatation und damit zur einer Vergrößerung des Gesamtgefäßquerschnittes und als Folge davon zur Nachlastsenkung kommt. Die daraus resultierende verminderte Wandspannung und Dehnung des linken Ventrikels wäre die Erklärung für eine verminderte ventrikuläre BNP-Expression.

Ob und wie weit die Reduktion des BNP-Plasmaspiegels unter Clopidogreltherapie mit einer nachhaltigen Verbesserung der systolischen und/oder diastolischen Funktion einhergeht bleibt zunächst ungeklärt, ist aber denkbar, da die Korrelation: Schweregrad der Herzinsuffizienz und BNP-Konzentration belegt ist (Remme e Swedberg, 2001).

V. Zusammenfassung

In jüngster Zeit konnte mehrfach nachgewiesen werden, dass die Verschlechterung der Endothelfunktion Folge eines entzündlichen Prozesses ist. Chronisch entzündliche vaskuläre Prozesse spielen eine entscheidende Rolle in der Entwicklung und Progression der koronaren Herzkrankheit und der Herzinsuffizienz.

Die vorliegende Arbeit untersuchte die Endothelfunktion und vaskuläre Inflammation bei chronischer Herzinsuffizienz ischämischer Genese.

Es konnte gezeigt werden, dass die Endothelfunktion unter einer Therapie mit Clopidogrel im Gegensatz zu ASS verbessert werden kann, was einherging mit einer Reduktion verschiedener inflammatorischer Marker.

Eine interessante Beobachtung war der Rückgang der BNP-Plasmakonzentration unter Clopidogreltherapie, der eine Verbesserung der systolischen und/oder diastolischen linksventrikulären Funktion vermuten lässt, was Ziel zukünftiger Untersuchungen sein sollte.

Ob die Prognose von Patienten mit ischämischer Kardiomyopathie durch eine intensivierete Thrombozytenaggregationshemmung günstig beeinflusst werden kann bleibt abzuwarten und müsste durch größere randomisierte Studien untersucht werden.

VI. Literaturverzeichnis

A randomised, blinded, trial of clopidogrel versus aspirin in patients at risk of ischaemic events (CAPRIE). CAPRIE Steering Committee. Lancet, v.348, n.9038, Nov 16, p.1329-39. 1996.

Aleil, B., C. Ravanat, *et al.* Flow cytometric analysis of intraplatelet VASP phosphorylation for the detection of clopidogrel resistance in patients with ischemic cardiovascular diseases. J Thromb Haemost, v.3, n.1, Jan, p.85-92. 2005.

Amaro, A., F. Gude, *et al.* Activity of leucocyte elastase in women with coronary artery disease documented using angiography. J Cardiovasc Risk, v.2, n.2, Apr, p.149-53. 1995.

Baldus, S., C. Heeschen, *et al.* Myeloperoxidase serum levels predict risk in patients with acute coronary syndromes. Circulation, v.108, n.12, Sep 23, p.1440-5. 2003.

Baldus, S., V. Rudolph, *et al.* Heparins increase endothelial nitric oxide bioavailability by liberating vessel-immobilized myeloperoxidase. Circulation, v.113, n.15, Apr 18, p.1871-8. 2006.

Barnes, P. J. e I. M. Adcock. NF-kappa B: a pivotal role in asthma and a new target for therapy. Trends Pharmacol Sci, v.18, n.2, Feb, p.46-50. 1997.

Boisvert, W. A., R. Santiago, *et al.* A leukocyte homologue of the IL-8 receptor CXCR-2 mediates the accumulation of macrophages in atherosclerotic lesions of LDL receptor-deficient mice. J Clin Invest, v.101, n.2, Jan 15, p.353-63. 1998.

Brennan, M. L. e S. L. Hazen. Emerging role of myeloperoxidase and oxidant stress markers in cardiovascular risk assessment. Curr Opin Lipidol, v.14, n.4, Aug, p.353-9. 2003.

Brownlee, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. Nature, v.414, n.6865, Dec 13, p.813-20. 2001.

Cai, H. e D. G. Harrison. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. Circ Res, v.87, n.10, Nov 10, p.840-4. 2000.

Celermajer, D. S. Endothelial dysfunction: does it matter? Is it reversible? J Am Coll Cardiol, v.30, n.2, Aug, p.325-33. 1997.

Chakrabarti, S., P. Clutton, *et al.* Glycoprotein IIb/IIIa inhibition enhances platelet nitric oxide release. Thromb Res, v.113, n.3-4, p.225-33. 2004.

Clark, A. L., M. Loebe, *et al.* Ventricular assist device in severe heart failure: effects on cytokines, complement and body weight. Eur Heart J, v.22, n.24, Dec, p.2275-83. 2001.

Cohn, J. N., T. B. Levine, *et al.* Plasma norepinephrine as a guide to prognosis in patients with chronic congestive heart failure. N Engl J Med, v.311, n.13, Sep 27, p.819-23. 1984.

Corretti, M. C., T. J. Anderson, *et al.* Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-dependent flow-mediated vasodilation of the brachial artery: a report of the International Brachial Artery Reactivity Task Force. J Am Coll Cardiol, v.39, n.2, Jan 16, p.257-65. 2002.

Davenpeck, K. L., T. W. Gauthier, *et al.* Inhibition of endothelial-derived nitric oxide promotes P-selectin expression and actions in the rat microcirculation. Gastroenterology, v.107, n.4, Oct, p.1050-8. 1994.

De Lemos, J. A., D. A. Morrow, *et al.* The prognostic value of B-type natriuretic peptide in patients with acute coronary syndromes. N Engl J Med, v.345, n.14, Oct 4, p.1014-21. 2001.

Dixon, L. J., D. R. Morgan, *et al.* Functional consequences of endothelial nitric oxide synthase uncoupling in congestive cardiac failure. Circulation, v.107, n.13, Apr 8, p.1725-8. 2003.

Felker, G. M., R. E. Thompson, *et al.* Underlying causes and long-term survival in patients with initially unexplained cardiomyopathy. N Engl J Med, v.342, n.15, Apr 13, p.1077-84. 2000.

Forslund, T., H. M. Nilsson, *et al.* Nitric oxide regulates the aggregation of stimulated human neutrophils. Biochem Biophys Res Commun, v.274, n.2, Aug 2, p.482-7. 2000.

Gabay, C. e I. Kushner. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. N Engl J Med, v.340, n.6, Feb 11, p.448-54. 1999.

Gawaz, M., H. Langer, *et al.* Platelets in inflammation and atherogenesis. J Clin Invest, v.115, n.12, Dec, p.3378-84. 2005.

Heitzer, T., S. Baldus, *et al.* Systemic endothelial dysfunction as an early predictor of adverse outcome in heart failure. Arterioscler Thromb Vasc Biol, v.25, n.6, Jun, p.1174-9. 2005.

Heitzer, T., V. Rudolph, *et al.* Clopidogrel improves systemic endothelial nitric oxide bioavailability in patients with coronary artery disease: evidence for antioxidant and antiinflammatory effects. Arterioscler Thromb Vasc Biol, v.26, n.7, Jul, p.1648-52. 2006.

Henn, V., J. R. Slupsky, *et al.* CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. Nature, v.391, n.6667, Feb 5, p.591-4. 1998.

Hingorani, A. D., J. Cross, *et al.* Acute systemic inflammation impairs endothelium-dependent dilatation in humans. Circulation, v.102, n.9, Aug 29, p.994-9. 2000.

Hollopeter, G., H. M. Jantzen, *et al.* Identification of the platelet ADP receptor targeted by antithrombotic drugs. Nature, v.409, n.6817, Jan 11, p.202-7. 2001.

Huo, Y., A. Schober, *et al.* Circulating activated platelets exacerbate atherosclerosis in mice deficient in apolipoprotein E. Nat Med, v.9, n.1, Jan, p.61-7. 2003.

Kanaya, S., H. Ikeda, *et al.* Intraplatelet tetrahydrobiopterin plays an important role in regulating canine coronary arterial thrombosis by modulating intraplatelet nitric oxide and superoxide generation. Circulation, v.104, n.20, Nov 13, p.2478-84. 2001.

Kaneko, K., T. Kanda, *et al.* C-Reactive protein in dilated cardiomyopathy. Cardiology, v.91, n.4, p.215-9. 1999.

Kojda, G. e D. Harrison. Interactions between NO and reactive oxygen species: pathophysiological importance in atherosclerosis, hypertension, diabetes and heart failure. Cardiovasc Res, v.43, n.3, Aug 15, p.562-71. 1999.

Krotz, F., H. Y. Sohn, *et al.* Reactive oxygen species: players in the platelet game. Arterioscler Thromb Vasc Biol, v.24, n.11, Nov, p.1988-96. 2004.

Kubes, P., M. Suzuki, *et al.* Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. Proc Natl Acad Sci U S A, v.88, n.11, Jun 1, p.4651-5. 1991.

Kuller, L. H., G. Grandits, *et al.* Lipoprotein particles, insulin, adiponectin, C-reactive protein and risk of coronary heart disease among men with metabolic syndrome. Atherosclerosis, v.195, n.1, Nov, p.122-8. 2007.

Levin, E. R., D. G. Gardner, *et al.* Natriuretic peptides. N Engl J Med, v.339, n.5, Jul 30, p.321-8. 1998.

Li, H. e U. Forstermann. Nitric oxide in the pathogenesis of vascular disease. J Pathol, v.190, n.3, Feb, p.244-54. 2000.

Libby, P., P. M. Ridker, *et al.* Inflammation and atherosclerosis. Circulation, v.105, n.9, Mar 5, p.1135-43. 2002.

Luchner, A., J. C. Burnett, Jr., *et al.* Evaluation of brain natriuretic peptide as marker of left ventricular dysfunction and hypertrophy in the population. J Hypertens, v.18, n.8, Aug, p.1121-8. 2000.

Luchner, A., C. Hengstenberg, *et al.* N-terminal pro-brain natriuretic peptide after myocardial infarction: a marker of cardio-renal function. Hypertension, v.39, n.1, Jan, p.99-104. 2002.

Marnett, L. J. e A. S. Kalgutkar. Cyclooxygenase 2 inhibitors: discovery, selectivity and the future. Trends Pharmacol Sci, v.20, n.11, Nov, p.465-9. 1999.

Mcmurray, J. J. e S. Stewart. Epidemiology, aetiology, and prognosis of heart failure. Heart, v.83, n.5, May, p.596-602. 2000.

Modena, M. G., P. Aveta, *et al.* Aldosterone inhibition limits collagen synthesis and progressive left ventricular enlargement after anterior myocardial infarction. Am Heart J, v.141, n.1, Jan, p.41-6. 2001.

Molero, L., A. Lopez-Farre, *et al.* Effect of clopidogrel on the expression of inflammatory markers in rabbit ischemic coronary artery. Br J Pharmacol, v.146, n.3, Oct, p.419-24. 2005.

Mollnau, H., E. Schulz, *et al.* Nebivolol prevents vascular NOS III uncoupling in experimental hyperlipidemia and inhibits NADPH oxidase activity in inflammatory cells. Arterioscler Thromb Vasc Biol, v.23, n.4, Apr 1, p.615-21. 2003.

Munger, M. A., B. Johnson, *et al.* Circulating concentrations of proinflammatory cytokines in mild or moderate heart failure secondary to ischemic or idiopathic dilated cardiomyopathy. Am J Cardiol, v.77, n.9, Apr 1, p.723-7. 1996.

Nijm, J., A. Wikby, *et al.* Circulating levels of proinflammatory cytokines and neutrophil-platelet aggregates in patients with coronary artery disease. Am J Cardiol, v.95, n.4, Feb 15, p.452-6. 2005.

- Pedersen, A. K. e G. A. Fitzgerald. Dose-related kinetics of aspirin. Presystemic acetylation of platelet cyclooxygenase. N Engl J Med, v.311, n.19, Nov 8, p.1206-11. 1984.
- Pepys, M. B. C-reactive protein fifty years on. Lancet, v.1, n.8221, Mar 21, p.653-7. 1981.
- Radomski, M. W., R. M. Palmer, *et al.* The role of nitric oxide and cGMP in platelet adhesion to vascular endothelium. Biochem Biophys Res Commun, v.148, n.3, Nov 13, p.1482-9. 1987.
- Remme, W. J. e K. Swedberg. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic heart failure. Eur Heart J, v.22, n.17, Sep, p.1527-60. 2001.
- Richards, A. M., M. G. Nicholls, *et al.* Plasma N-terminal pro-brain natriuretic peptide and adrenomedullin: new neurohormonal predictors of left ventricular function and prognosis after myocardial infarction. Circulation, v.97, n.19, May 19, p.1921-9. 1998.
- Ridker, P. M. Fibrinolytic and inflammatory markers for arterial occlusion: the evolving epidemiology of thrombosis and hemostasis. Thromb Haemost, v.78, n.1, Jul, p.53-9. 1997.
- Inflammatory biomarkers and risks of myocardial infarction, stroke, diabetes, and total mortality: implications for longevity. Nutr Rev, v.65, n.12 Pt 2, Dec, p.S253-9. 2007.
- Ruggeri, Z. M. Platelets in atherothrombosis. Nat Med, v.8, n.11, Nov, p.1227-34. 2002.
- Savi, P., C. Labouret, *et al.* P2y(12), a new platelet ADP receptor, target of clopidogrel. Biochem Biophys Res Commun, v.283, n.2, May 4, p.379-83. 2001.
- Savi, P., J. M. Pereillo, *et al.* Identification and biological activity of the active metabolite of clopidogrel. Thromb Haemost, v.84, n.5, Nov, p.891-6. 2000.
- Schömig, A. Ticagrelor--is there need for a new player in the antiplatelet-therapy field? N Engl J Med, v.361, n.11, Sep 10, p.1108-11. 2009.
- Seta, Y., K. Shan, *et al.* Basic mechanisms in heart failure: the cytokine hypothesis. J Card Fail, v.2, n.3, Sep, p.243-9. 1996.
- Shatwell, K. P. e A. W. Segal. NADPH oxidase. Int J Biochem Cell Biol, v.28, n.11, Nov, p.1191-5. 1996.
- Sigusch, H. H., M. H. Lehmann, *et al.* Chemotactic activity of serum obtained from patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. Pharmazie, v.61, n.8, Aug, p.706-9. 2006.
- Springer, T. A. Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration. Annu Rev Physiol, v.57, p.827-72. 1995.
- Suwaidi, J. A., S. Hamasaki, *et al.* Long-term follow-up of patients with mild coronary artery disease and endothelial dysfunction. Circulation, v.101, n.9, Mar 7, p.948-54. 2000.
- Szmitko, P. E., C. H. Wang, *et al.* New markers of inflammation and endothelial cell activation: Part I. Circulation, v.108, n.16, Oct 21, p.1917-23. 2003.

Torre-Amione, G., S. Kapadia, *et al.* Proinflammatory cytokine levels in patients with depressed left ventricular ejection fraction: a report from the Studies of Left Ventricular Dysfunction (SOLVD). J Am Coll Cardiol, v.27, n.5, Apr, p.1201-6. 1996.

Tsutamoto, T., T. Hisanaga, *et al.* Interleukin-6 spillover in the peripheral circulation increases with the severity of heart failure, and the high plasma level of interleukin-6 is an important prognostic predictor in patients with congestive heart failure. J Am Coll Cardiol, v.31, n.2, Feb, p.391-8. 1998.

Von Hundelshausen, P., R. R. Koenen, *et al.* Heterophilic interactions of platelet factor 4 and RANTES promote monocyte arrest on endothelium. Blood, v.105, n.3, Feb 1, p.924-30. 2005.

Von Hundelshausen, P., K. S. Weber, *et al.* RANTES deposition by platelets triggers monocyte arrest on inflamed and atherosclerotic endothelium. Circulation, v.103, n.13, Apr 3, p.1772-7. 2001.

Welt, F. G., S. D. Rogers, *et al.* GP IIb/IIIa inhibition with eptifibatid lowers levels of soluble CD40L and RANTES after percutaneous coronary intervention. Catheter Cardiovasc Interv, v.61, n.2, Feb, p.185-9. 2004.

Weyrich, A. S., S. M. Prescott, *et al.* Platelets, endothelial cells, inflammatory chemokines, and restenosis: complex signaling in the vascular play book. Circulation, v.106, n.12, Sep 17, p.1433-5. 2002.

Xiao, Z. e P. Theroux. Clopidogrel inhibits platelet-leukocyte interactions and thrombin receptor agonist peptide-induced platelet activation in patients with an acute coronary syndrome. J Am Coll Cardiol, v.43, n.11, Jun 2, p.1982-8. 2004.

Yasue, H., M. Yoshimura, *et al.* Localization and mechanism of secretion of B-type natriuretic peptide in comparison with those of A-type natriuretic peptide in normal subjects and patients with heart failure. Circulation, v.90, n.1, Jul, p.195-203. 1994.

Yudkin, J. S., C. D. Stehouwer, *et al.* C-reactive protein in healthy subjects: associations with obesity, insulin resistance, and endothelial dysfunction: a potential role for cytokines originating from adipose tissue? Arterioscler Thromb Vasc Biol, v.19, n.4, Apr, p.972-8. 1999.

Yusuf, S., F. Zhao, *et al.* Effects of clopidogrel in addition to aspirin in patients with acute coronary syndromes without ST-segment elevation. N Engl J Med, v.345, n.7, Aug 16, p.494-502. 2001.

Zeiger, A. M., H. Drexler, *et al.* Modulation of coronary vasomotor tone in humans. Progressive endothelial dysfunction with different early stages of coronary atherosclerosis. Circulation, v.83, n.2, Feb, p.391-401. 1991.

VII. Danksagung

Diese Arbeit wurde in der Klinik für Kardiologie des Universitären Herzzentrums Hamburg durchgeführt. Mein Dank gilt dem Leiter dieser Klinik, Herrn Prof. Dr. Thomas Meinertz.

Ich danke meinem Doktorvater Prof. Dr. Stephan Baldus für die sehr gute Betreuung über den ganzen Zeitraum, sowohl während der Datenerhebung, als auch bei der Patientenbetreuung, sowie für seine intensive Unterstützung bei der Auswertung und Diskussion der Daten.

Er war immer da, wenn ich Ihn brauchte.

Zudem möchte ich mich bei Dres. Volker und Tanja Rudolph bedanken, die als meine Betreuer mir perfekte Ausgangsbedingungen geschaffen haben, ehe sie im Rahmen eines Forschungsaufenthaltes nach Pittsburgh zogen. Auch während ihrer Zeit in Pittsburgh waren sie mir über den E-Mailkontakt eine große Hilfe.

Bedanken möchte ich mich auch bei dem ganzen Team aus unserem Labor, insbesondere bei Hartwig Wieboldt, der mir bei den Laborarbeiten immer zur Seite stand.

IX. Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig 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 Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

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

Unterschrift: