

Aus dem Fachbereich Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

Institut für klinische Pharmakologie
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. G. Geißlinger

Thrombozytenfunktion und PLA-Bildung bei Patienten mit peripherer arterieller Verschlusskrankheit. Ein Vergleich von ASS und Clopidogrel

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

vorgelegt von
Jan Adams
aus Lingen

Frankfurt am Main 2004

1	Einleitung	1
2	Material und Methoden	5
2.1	Patienten	5
2.2	Diagnose	7
2.3	Antiaggregatorische Therapie	7
2.4	Ein- und Ausschluss	8
2.5	Proben	8
2.6	Thrombozytenaggregation	9
2.7	Flowzytometrie	10
2.8	Messung der ICAM-1 Konzentration	14
2.9	Statistische Auswertung	14
3	Ergebnisse	15
3.1	Patientenkollektiv	15
3.2	Thrombozytenaggregation	15
3.3	PAC-1-Expression	16
3.4	CD62-Expression	17
3.5	PLA-Bildung	18
3.6	Mac-1-Expression	21
3.7	sICAM-1-Plasmakonzentrationen	22
4	Diskussion	23
4.1	Studiendesign	24
4.2	CD62	25
4.3	PLA-Bildung	27
4.4	Mac-1	30
4.5	sICAM-1	32
4.6	PAC-1	34
4.7	Induzierte Thrombozytenaggregation	36
4.8	Vergleich von Clopidogrel und ASS	37
4.9	In vitro Stimulation mit ADP/TRAP	39
4.10	Ausblick	40

5	Zusammenfassung	41
6	Abstract	42
7	Danksagung	43
8	Abkürzungen und Synonyme	44
9	Literaturverzeichnis	45

1 Einleitung

Die periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK) umfasst stenosierende und okkludierende Veränderungen der Aorta und der Extremitäten versorgenden Arterien. Sie sind zu einem Großteil artherosklerotisch bedingt. Symptomatische artherosklerotische Durchblutungsstörungen an Armen und Händen sind wesentlich seltener als an den Beinen. Untersuchungen mit nicht invasiven Techniken zeigen, dass eine asymptomatische pAVK 3mal häufiger ist als eine symptomatische. Die Prävalenz der pAVK insgesamt beträgt für Männer und Frauen im Alter von 55 bis 74 Jahren etwa 20%, für die symptomatische Form etwa 4,5%. Ihr Auftreten ist positiv korreliert mit männlichem Geschlecht, Alter, Diabetes mellitus, inhalierendem Rauchen, Hypertonie, Hypercholesterinämie, Hyperfibrinogenämie und Hyperhomozysteinämie. Mehrere Risikofaktoren potenzieren die Häufigkeit der pAVK. Rauchen scheint der wichtigste Einzelrisikofaktor zu sein. Raucher entwickeln 3mal häufiger eine pAVK als Nichtraucher. Die kumulative Fünfjahresmortalitätsrate von Männern mit pAVK reicht von 5–17% und ist damit erheblich höher als in einer gleich alten Kontrollgruppe ohne pAVK. Männliche pAVK-Patienten haben eine um 10 Jahre verminderte Lebenserwartung. Häufige Todesursachen sind die koronare Herzkrankheit (Patienten mit pAVK 55%, Patienten ohne pAVK 36%), zerebrale Todesursachen (11%, 4%) und andere vaskuläre Todesursachen (10%, 10%). Die pAVK ist also oft mit anderen atherosklerotischen Erkrankungen assoziiert¹.

Die Atherosklerose wird heute als entzündlicher Prozess betrachtet. Am Beginn einer sich entwickelnden Artherosklerose steht eine endotheliale Dysfunktion, die durch unterschiedliche Faktoren verursacht sein kann, z.B. Nikotinabusus, arterieller Hypertonus, Diabetes mellitus, erhöhtes LDL-Cholesterin, erhöhtes Plasmahomocystein. Unter dieser Dysfunktion kommt es zu einer vermehrten Adhäsion von Leukozyten und Thrombozyten an das Endothel, einer erhöhten Permeabilität der Gefäßwand und einer Immigration von Zellen in das betroffene Gebiet. Hinzu kommen eine Zunahme prokoagulativer Eigenschaften am Endothel und die Bildung verschiedener vasoaktiver Substanzen, Zytokine und Wachstumsfaktoren. Besteht das auslösende Agens für längere Zeit, kommt es

zur Einwanderung und Proliferation von glatten Muskelzellen in das geschädigte Gebiet. Typisch ist die Anwesenheit von Makrophagen/Monozyten und Lymphozyten in solchen Läsionen, die ihrerseits durch die Bildung eigener hydrolytischer Enzyme, Zytokine, Chemokine und Wachstumsfaktoren die Entzündung unterhalten und Nekrosen in der Gefäßwand verursachen können. Ein Fortlaufen dieses Prozesses und die Bildung von Bindegewebe im Sinne einer bindegewebigen Kappe bedingen ein weiteres Wachstum der Läsion, das im späteren Verlauf zu einer Einengung des Gefäßlumens führen kann.²

Bei den entzündlichen Vorgängen im Rahmen der Atherosklerose spielen Thrombozyten eine bedeutende Rolle. Es konnte gezeigt werden, dass Patienten mit pAVK eine gestörte Plättchenfunktion haben. Die Thrombozyten zeigen sich hier bereits *in vivo* aktiviert^{3 4} und *in vitro* hyperreagibel auf Stimulanzen wie ADP oder Thrombin^{5 6}. Es scheint plausibel, dass sie direkt an der Entstehung und dem Fortschreiten der Artherosklerose als auch von Entzündungen im Allgemeinen beteiligt sind. So trägt das aus Thrombozyten stammende Chemokin RANTES (regulated upon activation normal T cell expressed and secreted) zu Arrest und Akkumulation von Monozyten an atherosklerotischen Läsionen bei und beeinflusst die monozytäre Signalkaskade⁷. Des Weiteren beeinflussen Thrombozyten Leukozyten und Endothelzellen sowohl über direkte Interaktion, beispielsweise von P-Selectin (CD62) mit PSGL-1 (P-Selectin Glykoprotein Ligand 1) bzw. von Integrin $\beta 2$ mit ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule-1) oder Mac-1, als auch über Freisetzung von Substanzen wie RANTES, ENA-78, MIP-1 α , PF4, Prostanoiden, IL-1 β und PAF⁸. Beispielsweise konnte gezeigt werden, dass aktivierte Thrombozyten in Monozyten die Bildung von IL-1 β , IL-8 und MCP-1 anregen können⁹.

Als Marker der *in vivo* Aktivierung von Thrombozyten haben sich die Bestimmung der Expression von aktiviertem GP IIb/IIIa mittels Bindung des monoklonalen Antikörpers PAC-1, der Expression von oberflächlichem P-Selectin und der Bildung von Plättchen-Monozyten-Aggregaten etabliert^{10 11}. Bei Patienten mit pAVK wurde in der Literatur bereits über eine vermehrte P-Selectin Expression, ein vermehrtes Auftreten von Plättchen-Monozyten-Aggregaten und eine

erhöhte Freisetzung von platelet-derived-microparticles berichtet⁴. Weiterhin erscheint es sinnvoll, Bestimmungen der Mac-1-Expression als Marker einer Leukozytenaktivierung und der sICAM-Plasmakonzentration als Marker einer entzündlichen endothelialen Reaktion durchzuführen.

Die Bestimmung der Oberflächenexpression des aktivierten GP IIb/IIIa-Rezeptors auf Thrombozyten wird als allgemeiner Gradmesser des Aktivierungsniveaus dieser Zellen angesehen. Er stellt als Fibrinogenrezeptor der Thrombozyten die gemeinsame Endstrecke der zur Thrombozytenaggregation führenden Aktivierungswege dar. Mittels eines speziellen Antikörpers (PAC-1) ist selektiv dieser aktivierte Rezeptor nachweisbar¹².

CD62 ist ein nur nach vorangegangener Aktivierung auf der Thrombozytenoberfläche exprimierter Adhäsionsrezeptor, der insbesondere bei der Adhäsion von Plättchen an Leukozyten beteiligt ist¹².

Durch Interaktion verschiedener Adhäsionsrezeptoren wird nach vorangegangener Aktivierung von Thrombozyten die vermehrte Bildung von Plättchen-Leukozyten-Aggregaten beobachtet. Dabei sind als Rezeptoren CD62 und GP Ib auf thrombozytärer und PSGL-1 und Mac-1 auf leukozytärer Seite maßgeblich beteiligt. Die vergleichsweise lange Halbwertszeit von PLA in der Zirkulation macht sie zu einem gut geeigneten indirekten Gradmesser einer Thrombozyten-aktivierung über eine nachfolgende Interaktion mit Leukozyten¹³.

Mac-1 (CD11b) gilt als Aktivierungsmarker von Leukozyten. Es konnte eine vermehrte Mac-1-Expression auf Monozyten nach Interaktion von CD62 mit PSGL-1 nachgewiesen werden. Funktionell beeinflusst Mac-1 die PLA-Bildung und die Leukozyten-Immobilisierung und -Migration^{14 15}.

Das auf Endothelzellen vorkommende ICAM-1 vermittelt bei der Interaktion des Endothels mit Leukozyten. Es wird nach Stimulation durch beispielsweise entzündliche Vorgänge vermehrt gebildet und auch ins Blutplasma als sICAM-1 freigesetzt. Die sICAM-1-Blutplasmakonzentration erlaubt also Rückschlüsse auf entzündliche Prozesse am Endothel und deren Aktivitätsgrad^{16 17}.

Die pharmakologische Hemmung der Thrombozytenaggregation ist ein Hauptbestandteil der pAVK-Therapie. Trotz einer klinischen Überlegenheit von Clopidogrel über ASS in der CAPRIE Studie ist ASS nach wie vor das Therapeutikum der ersten Wahl. Clopidogrel kommt aber als Reservetherapeutikum bei ASS-Unverträglichkeit oder in besonderen Einzelfällen zunehmend, teilweise auch in Kombination mit ASS, zum Einsatz. Normalerweise werden ASS 100mg täglich oder Clopidogrel 75mg täglich verabreicht¹⁸.

Der positive Effekt einer antiaggregatorischen Therapie auf die Progredienz der pAVK und der Nachweis einer vermehrten Plättchenaktivierung bei Patienten mit pAVK haben zu einer pathophysiologischen Vorstellung geführt, bei der aktivierte Plättchen über eine Interaktion mit Leukozyten und deren Aktivierung und eine direkte Interaktion mit dem Gefäßendothel an der Entstehung und dem Fortschreiten der Erkrankung entscheidend beteiligt sind. Die nachgewiesene unterschiedliche klinische Wirksamkeit der verschiedenen antiaggregatorisch wirksamen Substanzen sollte nach dem genannten Modell auch laborchemisch mittels geeigneter Messparameter nachvollziehbar sein.

In dieser Arbeit sollte der Einfluss der unterschiedlichen Therapieregime auf die Thrombozytenaktivierung, die Thrombozyten-Leukozyten-Interaktion, die Leukozytenaktivierung und die entzündliche Aktivität am Endothel untersucht werden. Als Messparameter dienten hierzu die PAC-1- und CD62-Expression, die PLA-Bildung, die Mac-1-Expression und die sICAM Konzentration im Plasma. Für die Untersuchungen wurden Patienten mit pAVK mit und ohne antiaggregatorische Therapie und gesunde Probanden als Kontrollgruppe gewonnen. Es wurden Blutproben entnommen und nachfolgend mittels des Verfahrens der Flowzytometrie, der induzierten Aggregation und eines Immunoassays analysiert.

2 Material und Methoden

2.1 Patienten

Es wurden Patienten unabhängig von Geschlecht und Alter mit bestehender pAVK aus dem laufenden Betrieb der Angiologischen Ambulanz der Uniklinik Frankfurt für diese Studie rekrutiert. Die Patienten wurden bei gesicherter Diagnose einer pAVK und bei Fehlen von Ausschlussfaktoren je nach bestehender antiaggregatorischer Therapie in 4 Gruppen eingeteilt. Patienten mit ASS-Monotherapie bildeten Gruppe 1, Patienten mit Clopidogrel-Monotherapie Gruppe 2, Patienten mit ASS-Clopidogrel-Kombinationstherapie Gruppe 3 und Patienten ohne antiaggregatorische Therapie Gruppe 4. Gesunde Mitarbeiter der Uniklinik dienten als Kontrollgruppe und bildeten Gruppe 5. Die Zustimmung der Patienten und Probanden zur Teilnahme an der Studie wurde schriftlich festgehalten. Die demographischen Charakteristika der Patienten und Probanden der einzelnen Gruppen sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Gruppe	1	2	3	4	5
Therapie	ASS	Clopidogrel	ASS + Clopidogrel	keine	gesunde Probanden
Dosis (mg/diem)	100	75	100 + 75	-	-
Anzahl	17	12	8	7	9
Alter in Jahren, Median (Min-Max)	69 (46-82)	62 (48-82)	72 (50-81)	68 (57-73)	30 (27-60)
Männer/Frauen	12/5	7/5	6/2	5/2	8/1
Krankheitsdauer in Jahren, Median (Min-Max)*	6 (3-9)	8 (4-10)	8 (6-12)	3 (2-5)	-
vorhergehende PTA**	11	7	6	0	-
Doppler Index, Median (Min-Max)	0,6 (0,4-1,1)	0,7 (0,5-0,9)	0,6 (0,2-1,3)	0,6 (0,4-1,0)	-
Anzahl Diabetiker	5	2	3	1	-
Anzahl Raucher	5	4	5	4	3
Anzahl Statintherapie	9	6	6	1	-

*nach Patientenakte oder Anamnese; ** perkutane transluminale Angioplastie

Tabelle 1: Übersicht über die demografischen und klinischen Daten der Patienten und Probanden der einzelnen Gruppen

2.2 Diagnose

Die Diagnose einer pAVK wurde bei den Patienten in der Angiologischen Ambulanz der Uniklinik Frankfurt gemäß den Richtlinien der Deutschen Gesellschaft für Angiologie gestellt und geprüft¹⁹. Es wurden ausführliche klinische, Doppler- und/oder duplexsonographische Untersuchungen durchgeführt. Eine pAVK wurde unter anderem bei typischer Anamnese, einem ermittelten Doppler-Index von $\leq 0,9$, entsprechendem Farbduplexbefund und/oder bei einer vorausgegangenen Intervention oder Operation wegen vorbestehender pAVK angenommen. Entsprechend der Untersuchungsergebnisse wurden die Patienten in die Klassifikationen nach Rutherford und Fontaine eingeordnet.

2.3 Antiaggregatorische Therapie

Die Therapie der Patienten erfolgte mit Ausnahme der Gruppen 4 und 5 nach den Richtlinien der Deutschen Gesellschaft für Angiologie¹⁹. Dabei erhalten Patienten mit pAVK im Regelfall eine antiaggregatorische Therapie mit ASS 100mg täglich. Im Falle einer ASS-Unverträglichkeit, bei Patienten mit besonderem kardiovaskulären Risiko oder bei einem Versagen der ASS-Therapie wird eine Therapie mit Clopidogrel 75mg täglich oder eine Kombinationstherapie aus ASS und Clopidogrel empfohlen.

Die in dieser Arbeit untersuchten Patienten erhielten dementsprechend ASS 100mg täglich (Gruppe 1), Clopidogrel 75mg täglich (Gruppe 2) oder beides (Gruppe 3). Eine evtl. bestehende Begleitmedikation wurde detailliert erfasst. Die Patienten bzw. Probanden der Gruppen 4 und 5 nahmen keine Medikamente ein.

2.4 Ein- und Ausschluss

Eingeschlossen in die Studie wurden Patienten mit gesicherter pAVK Grades I nach Rutherford Klassifikation unabhängig von Alter, Geschlecht und Begleiterkrankungen, die sich einer der oben genannten Gruppe zuordnen ließen.

Gewisse Kriterien führten zum Ausschluss aus der Studie. Dazu gehörten die Einnahme von Medikamenten mit Einfluss auf die Thrombozytenfunktion wie Cox-Hemmer o.ä., Heparin oder Marcumar in den letzten 2 Wochen, invasive chirurgische oder interventionelle Eingriffe wie beispielsweise perkutane transluminale Angioplastien (PTA), Thrombendarteriektomie (TEA) oder Bypasschirurgie in den letzten 3 Monaten.

Die Einnahme von u.a. Betablockern, Calciumantagonisten, ACE-Hemmern, AT1-Antagonisten, Diuretika oder Statinen führte dagegen nicht zum Ausschluss aus der Studie. Gleiches gilt für Begleiterkrankungen wie z.B. Diabetes mellitus, Koronare Herzkrankheit, Hyperlipidämie u.a. sowie Nikotinabusus.

2.5 Proben

Die Entnahme der Blutproben erfolgte standardisiert vor morgendlicher Einnahme der Medikation nach leichter Stauung aus einer Kubitalvene mittels Venofix Venenpunktionsbesteck (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) und Coagulation 9 NC/10 ml Monovette (Sarstedt, Deutschland). Es wurden insgesamt 20 ml Citratblut gewonnen. Anschließend wurden die Proben umgehend ins Thrombozytenfunktionslabor des Instituts für Klinische Pharmakologie transportiert. Innerhalb von 30 Minuten nach Abnahme wurden dort zunächst 1 ml Vollblut für die Flowzytometrie abgetrennt und der verbleibende Rest der Proben bei 400-mal g für 2 Minuten zentrifugiert. Das so gewonnene plättchenreiche Plasma (PRP) wurde in ein eigenes Reagenzglas abpipettiert. Die Thrombozytenzahl des PRP wurde mittels halbautomatischen Zellzählgerät Sysmex F-820 (Sysmex, Japan) bestimmt und das PRP dann der Thrombozytenaggregation zugeführt. Der verbleibende Rest wurde weitere 10 Minuten bei 1000-mal g zentrifugiert und das so als Überstand entstehende plättchenarme

Plasma (PPP) vom verbleibenden Zellsediment getrennt. Beides wurde bis zur weiteren Verwendung bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Später wurde im PPP der sICAM-1-Level bestimmt.

2.6 Thrombozytenaggregation

Die Messung der induzierten Aggregation wurde in einem Zeitfenster 60-180 Minuten nach Blutentnahme mittels eines turbidimetrisch messenden Aggregometers (APACT, Labor Inc.) durchgeführt. Dazu wurden $500\text{ }\mu\text{l}$ PRP in eine Mikro-Küvette mit Magnetrührer pipettiert und diese in das Aggregometer eingebracht. Nach dem Start der turbidimetrischen Messung wurde entweder ADP- oder Collagenreagenz mit einer Endkonzentration von $5\text{ }\mu\text{M}$ bzw. $2\text{ }\mu\text{g}$ pro ml als Induktor der Aggregation zugegeben. Gemessen wurde die Änderung der Lichttransmission über einen Zeitraum von insgesamt 10 Minuten, wobei die Lichttransmission von destilliertem Wasser gleich 100% gesetzt wurde. Die Messergebnisse wurden über einen Plotter ausgegeben und per Hand grafisch vermessen. Bestimmt wurden die maximale Transmission A_{max} in Prozent, die Zeit T von der Zugabe des Induktors bis zum Beginn der Transmissionsänderung und Winkel α , der die maximale Steilheit der Transmissionsänderung wiedergibt. Dabei entsprachen auf dem Ausdruck 7,5 cm auf der Abszisse einer Zeit von 10 Minuten und 10 cm auf der Ordinate einer Lichttransmission von 100%. (Abbildung 1)

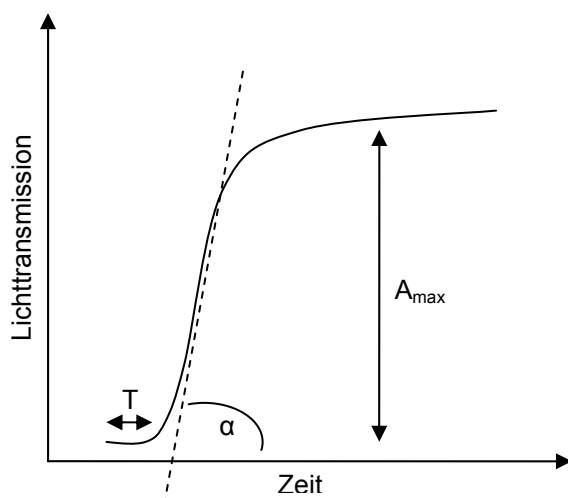


Abbildung 1: Verkleinert dargestellt ist der typische Verlauf einer auf dem Plotter ausgegebenen Kurve der Lichttransmission nach Zugabe eines Induktors (hier Kollagen). Zu erkennen sind A_{max} , T und Winkel α .

2.7 Flowzytometrie

Die Aufbereitung der Blutproben erfolgte angelehnt an ein Konsensusprotokoll²⁰, modifiziert nach einem Protokoll zur Messung der PLA-Formation²¹ wie bereits anderweitig beschrieben. 200 µl Citrat-antikoaguliertes Vollblut wurde mittels modifiziertem HEPES (N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonysäure) Puffer 1:1 (v/v) verdünnt und mit TRAP-7 (thrombin receptor-activating peptide; H-Ser-Phe-Leu-Leu-Arg-Asn-Pro-OH; Bachem, Heidelberg, Deutschland) oder ADP (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) bei einer Endkonzentration von 0 (unstimulierte Kontrolle) oder 2 µM bei Raumtemperatur über 10 Minuten aktiviert.

Die Bestimmung der PLA-Bildung und CD11b/CD18 (MAC-1) Expression auf Monozyten erfolgte in zwei getrennten Ansätzen mittels Dreifarbmessung im Flowzytometer. Dazu wurden jeweils 50 µl der Proben mit gesättigten Konzentrationen der Antikörper CD45-Peridinin-Chlorophyll-Protein (PerCP), CD14-Fluoreszein-Isothiocyanat (FITC) (leukozytenspezifisch) (Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland) und CD42b-Phycoerythrin (PE) (thrombozytenspezifisch) (Beckman Coulter Krefeld, Germany) bzw. CD11b-PE (Becton-Dickinson, Heidelberg, Germany) für 10 Minuten inkubiert. Die in den Proben enthaltenen Erythrozyten wurden mittels FACSlysing-Lösung (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) lysiert.

Zur Bestimmung des Plättchenaktivierungsmarkers CD62 und des aktivierten Fibrinogenrezeptorglykoproteins GPIIb/IIIa (mittels PAC-1) wurden jeweils 5 µl der Proben mit gesättigten Konzentrationen der Antikörper CD42a-PerCP, PAC-1-FITC und CD62-PE (alle Becton Dickinson, Heidelberg, Germany) über 10 Minuten aktiviert und anschließend mit 1%-iger Formaldehydlösung fixiert.

Zur Bestimmung der Hintergrund-Fluoreszenz sowie der unspezifischen Bindung wurde als Kontrolle eine weitere nicht aktivierte Probe bestehend aus mit den entsprechenden Farbstoffen markierten Isotype-IgG1 und IgM Antikörpern inkubiert.

Im Anschluss an die Inkubation wurden alle Proben in zwei Waschschritten mit Cellwash (Becton Dickinson, Heidelberg, Germany) bei 610-mal g für 4 Minuten gewaschen. Nach Aufnahme in 300 µl Cellwash standen die Proben anschließend zur Messung im Flowzytometer bereit.

Die Datenmessung erfolgte mit dem FACSCalibur Flowzytometer mit der Software CELLQuest (Becton Dickinson, Rutherford). Routinemäßig erfolgte wöchentlich eine Kalibrierung des Gerätes mittels Calibrite Beads (Becton Dickinson, Heidelberg, Germany) über FACSComp (Becton Dickinson, Heidelberg, Germany).

Zur Bestimmung der PLA-Bildung wurde zunächst die Gesamtpopulation Leukozyten nach ihrer CD45-PerCP-Fluoreszenz in FL3 identifiziert und nach unterschiedlichen Subpopulationen gegatet. Dabei wurden Monozyten durch ihre charakteristische Bindung von CD14-FITC identifiziert und die Population im Dot Plot FL1 versus FL3 dargestellt. Neutrophile Granulozyten wurden auf gleiche Weise über ihre geringere CD14 Bindung im FL1 versus FL3 Dot Plot gegatet. In einem weiteren Dot Plot wurden die gegateten Leukozyten nach ihrer FL1 und FL2 Fluoreszenz aufgetragen. Als Leukozyten, die Thrombozyten gebunden haben, wurden die Ereignisse in den verschiedenen Subpopulationen gewertet, die eine anti-CD42b-PE Fluoreszenz über der der Isotype-Kontrolle (Hintergrundfluoreszenz, unspezifische Bindung) aufzeigten. Zusätzlich wurde in den jeweiligen Subpopulationen die mittlere PE-Fluoreszenzintensität (mean fluorescence intensity, MFI) der CD42b positiven Zellen bestimmt (4 Quadrantenstatistik). Die Expression des CD11b Oberflächenantigens wurde über die PE-Fluoreszenz der Gesamtpopulation der Monozyten bestimmt (Histogramm) und als MFI ausgegeben.

Zur Bestimmung der CD62 und der PAC-1-Expression auf Plättchen wurden diese zunächst nach Größe und Granularität im Vorwärts (FSC)- gegen Seitwärtsstreulicht (SSC) dargestellt. Das Gaten erfolgte im SSC versus FL3 Dot Plot, wobei Thrombozyten über die CD42b-PerCP-Fluoreszenz identifiziert wurden. Zur Bestimmung der CD62-Expression wurden die gegateten Plättchen nach ihrer PE Fluoreszenz im Dot Plot aufgetragen (Quadrantenanalyse). Als

CD62 positive Plättchen wurden die Plättchen gewertet, deren PE-Fluoreszenzintensität über der einer PE-markierten Isotype-IgG1-Kontrolle lag. Die PAC-1-Expression wurde über die mittlere FITC-Fluoreszenzintensität der Gesamt-Thrombozytenpopulation im Histogramm dargestellt und als MFI ausgegeben. Alle Messungen wurden zweifach ausgeführt und der Mittelwert aus beiden Messungen gebildet.

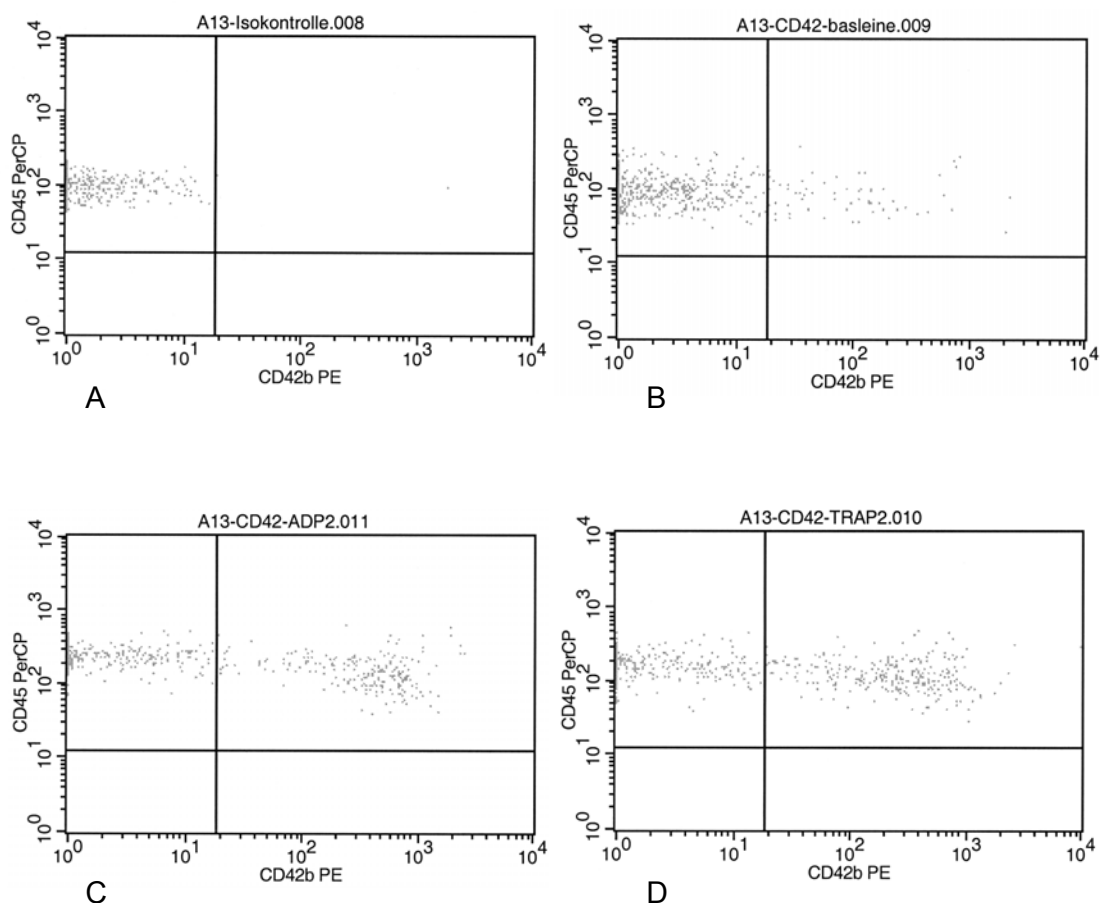


Abbildung 2: Die Bestimmung der PLA (hier Plättchen-Monozyten-Aggregate) erfolgte im CD42b-PE- versus CD45-PerCP-Dot Plot. Zuvor wurden die Monozyten nach ihrer CD14-Bindung identifiziert und gegatet. Als PLA wurden die Ereignisse gewertet, die eine CD42b-PE-Fluoreszenz über der einer Isokontrolle zeigten und sich damit im rechten oberen Quadranten darstellten. Ihre Anzahl wurde dann in Verhältnis zur Monozytengesamtpopulation gesetzt [Anteil in Prozent]. Gezeigt sind die Dot Plots der Isokontrolle [0%] (A), der unstimulierten [6%] (B), der ADP stimulierten [37%] (C) und der TRAP stimulierten Probe [40%] (D) eines Patienten der Gruppe 1 (ASS).

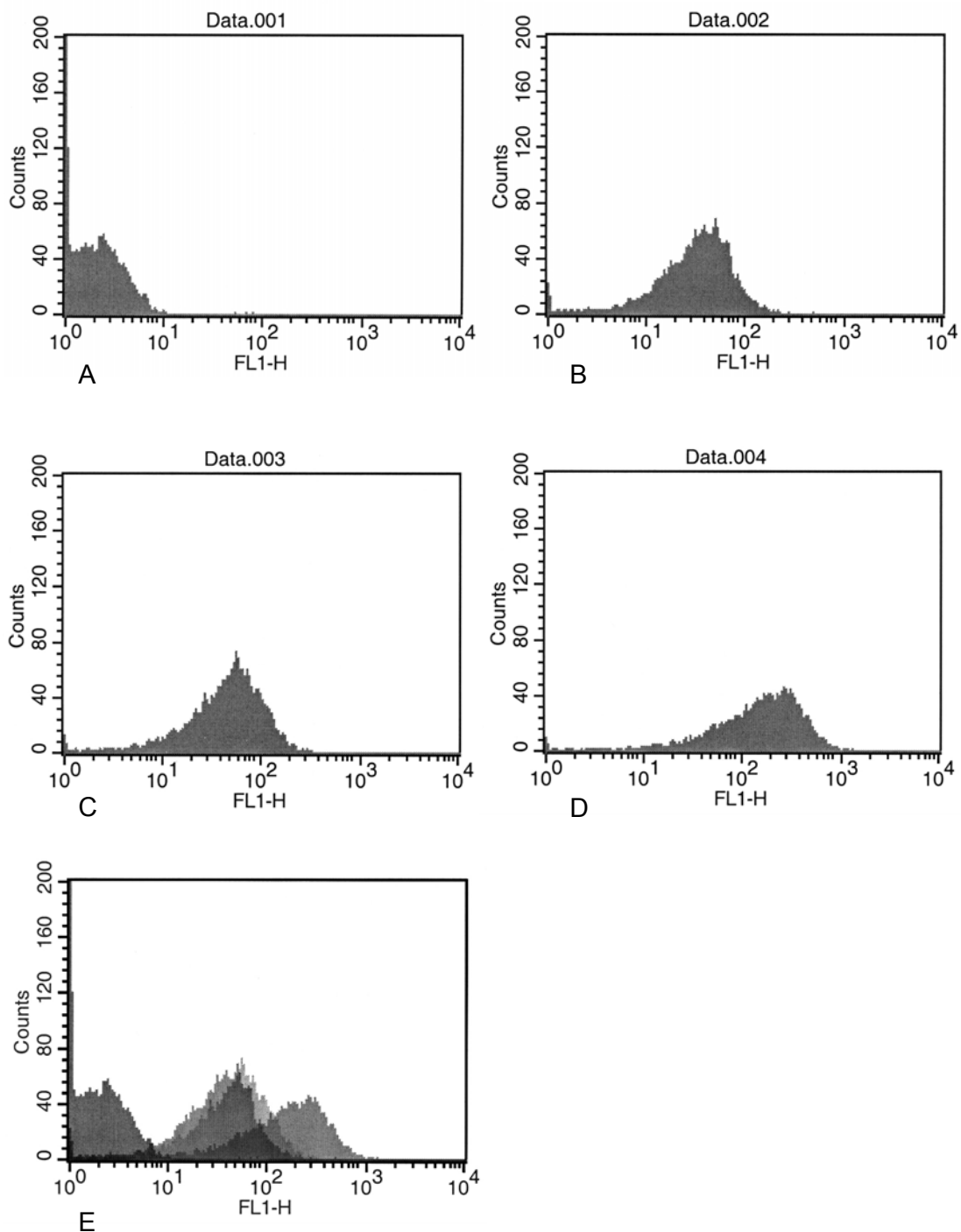


Abbildung 3: Gezeigt ist die Häufigkeitsverteilung der Thrombozytengesamtpopulation (Counts, Abszisse) über die mittlere Intensität der PAC-1-FITC-Fluoreszenz (MFI) (FL1-H, Ordinate) in der Isokontrolle (A), der unstimulierten (B), der TRAP stimulierten (C) und der ADP stimulierten Probe (D) bei einem Patienten der Gruppe 1 (ASS). In (E) lässt sich durch ein Übereinanderlegen der Einzelkurven gut eine „Rechtsverschiebung“ der Häufigkeitsverteilung unter Stimulation erkennen (v.l.n.r Isokontrolle, unstimulierte, TRAP stimulierte und ADP stimulierte Probe).

2.8 Messung der ICAM-1 Konzentration

Im PPP wurde mittels eines handelsüblichen quantitativen Sandwich-Immunoassays (R&D Systems, Minneapolis, USA) die Konzentration des löslichen ICAM-1 bestimmt.

2.9 Statistische Auswertung

Aufgrund der unterschiedlichen Häufigkeit des Auftretens der verschiedenen Therapieregime bei den Patienten in der Angiologischen Ambulanz waren unterschiedlich viele Probanden in den einzelnen Gruppen. Aufgrund der besonderen Situation einer Ambulanz einer Uniklinik, die Patienten nur mit Überweisung durch einen Facharzt aufsuchen können, waren insbesondere unbehandelte pAVK-Patienten selten. Dadurch war es erforderlich, nicht-parametrische Testverfahren zu verwenden. Dementsprechend erfolgt die Darstellung der Ergebnisse als Median und Streuungsbreite (Minimum und Maximum). Die demographischen Charakteristika der Patienten und deren Doppler-Index-Werte wurden mittels des Mantel-Haenzel-Zimmermann-Tests zwischen den unterschiedlichen Gruppen verglichen. Alle anderen Daten wurden unter Verwendung der Software BiAS 7.0 mit Kruskal-Wallis ANOVA adjustiert für multiple Testung nach Holm analysiert. Als statistisch signifikant wurde ein Ergebnis ab einem p-Wert kleiner dem Signifikanzniveau von 0,05 für den Fehler erster Ordnung angesehen.

3 Ergebnisse

3.1 Patientenkollektiv

Die verschiedenen antiaggregatorischen Therapieregime kommen bei den Patienten in der angiologischen Ambulanz der Uniklinik Frankfurt unterschiedlich häufig vor. Entsprechend unterscheiden sich die einzelnen Gruppen deutlich in der Anzahl der Patienten. Allerdings finden sich keine signifikanten Differenzen zwischen den Gruppen 1, 2 und 3 bezüglich Alter der Patienten und Krankheitsdauer. Patienten der Gruppe 4 zeigten eine vergleichsweise kurze Krankheitsdauer. Kein Patient der Gruppe 4 war im Voraus interventionell behandelt worden, während die Mehrheit der Patienten in den Gruppen 1, 2 und 3 sich bereits einer PTA (perkutane transluminale Angioplastie) unterzogen hatten. Die Mediane der Dopplerindices zeigten nur geringe, nicht signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen 1 bis 4.

3.2 Thrombozytenaggregation

Eine signifikant reduzierte ADP induzierte Aggregation fand sich bei den Patienten, die Clopidogrel erhielten (entsprechend den Gruppen 2 und 3). Die Kollagen induzierte Aggregation zeigte sich signifikant reduziert bei den Patienten, die mit ASS behandelt wurden (entsprechend den Gruppen 1 und 3). Verglichen wurde dabei jeweils mit den Werten der Gruppen 4 und 5 ($p < 0,05$). (Tabelle 2)

Gruppe	Anzahl	A_{\max} nach Stimulation mit	
		ADP	Kollagen
1 (nur ASS)	17	73 (62-83)	61 (21-72)*
2 (nur Clopidogrel)	12	61 (21-70)*	80 (60-86)
3 (ASS + Clopidogrel)	8	50 (20-69)*	24 (1-56)*
4 (keine Therapie)	7	86 (85-89)	87 (86-89)
5 (gesunde Kontrolle)	9	83 (72-93)	86 (73-93)

Werte als Median (Minimum-Maximum); * $p < 0,05$ im Vergleich mit Gruppe 4 oder 5

Tabelle 2: Dargestellt ist die maximale Lichttransmission A_{\max} in Prozent nach Stimulation mit ADP ($5\mu\text{mol/l}$) oder Kollagen ($2\mu\text{mol/l}$). Die Lichttransmission von destilliertem Wasser entspricht 100%.

3.3 PAC-1-Expression

Die PAC-1-Expression wurde sowohl in unstimulierten als auch in TRAP und ADP stimulierten Proben untersucht. Nach ADP-Stimulation fand sich unter Clopidogrel (Gruppen 2 und 3) eine signifikant (gegenüber den Gruppen 1 und 4) reduzierte PAC-1-Expression. In den unstimulierten Proben fand sich nur zwischen den Gruppen 3 (kombinierte Therapie) und 4 (keine Therapie) ein signifikanter Unterschied. Unter TRAP Stimulation fanden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen. (Tabelle 3)

Gruppe	Anzahl	PAC-1-Expression (MFI)		
		Baseline	TRAP	ADP
1 (nur ASS)	17	45 (29-103)	57 (31-117)	302 (104-663)
2 (nur Clopidogrel)	12	47 (16-70)	57 (24-82)	99 (42-136)* **
3 (ASS + Clopidogrel)	8	33 (13-72)**	42 (27-70)	53 (43-138) * **
4 (keine Therapie)	7	65 (39-113)	91 (43-117)	381 (212-486)
5 (gesunde Kontrolle)	9	52 (16-80)	61 (18-92)	182 (65-369)

Werte als Median (Minimum-Maximum); * p<0,05 im Vergleich mit Gruppe 1; ** p<0,05 im Vergleich mit Gruppe 4

Tabelle 3: PAC-1-Expression als Mean Fluorescence Intensity (MFI) der gesamten Plättchenpopulation ohne Stimulation (Baseline) und nach Stimulation mit TRAP oder ADP.

3.4 CD62-Expression

Bei Patienten unter Clopidogrel allein oder in Kombination mit ASS (Gruppen 2 und 3) fanden sich sowohl in den unstimulierten als auch in den mit ADP und TRAP stimulierten Proben signifikant reduzierte Werte der CD62-Expression gegenüber der Gruppe 1 (nur ASS). Im Vergleich zur Gruppe 4 (keine Therapie) fand sich nur in den TRAP und ADP stimulierten Proben eine signifikante Reduktion. Die Proben aus Gruppe 5 (Gesunde) zeigten unstimuliert und TRAP stimuliert signifikant reduzierte Werte gegenüber den Gruppen 1 und 4, nicht jedoch in der ADP stimulierten Probe. (Tabelle 4)

Gruppe	Anzahl	CD62-Expression (prozentualer Anteil positiver Thrombozyten)		
		Baseline	TRAP	ADP
1 (nur ASS)	17	15,9 (8,2-33,0)	40,8 (18,4-90,6)	85,0 (59,1-95,3)
2 (nur Clopidogrel)	12	9,5 (3,6-13,1)*	12,6 (5,6-27,9)* **	38,8 (12,2-52,9)* **
3 (ASS + Clopidogrel)	8	5,1 (2,1-15,9)*	10,4 (5,2-32,6)* **	19,5 (10,7-61,1)* **
4 (keine Therapie)	7	21,6 (6,4-31,7)	44,0 (22,3-68,2)	82,6 (69,7-92,4)
5 (gesunde Kontrolle)	9	6,3 (3,4-8,6)* **	10,7 (8,8-27,3)* **	69,8 (58,1-75,5)

Werte als Median (Minimum-Maximum); * p<0,05 im Vergleich mit Gruppe 1; ** p<0,05 im Vergleich mit Gruppe 4

Tabelle 4: CD62-Expression auf Thrombozyten dargestellt als prozentualer Anteil CD62-positiver Thrombozyten an der Gesamtpopulation

3.5 PLA-Bildung

Der prozentuale Anteil an mit Thrombozyten besetzten Monozyten zeigte sich unter Kombinationstherapie aus ASS und Clopidogrel (Gruppe 3) in unstimulierten und TRAP oder ADP stimulierten Proben signifikant geringer als unter ASS Monotherapie (Gruppe 1) oder fehlender Therapie (Gruppe 4). Die gesunden Probanden (Gruppe 5) zeigten in den unstimulierten Proben gegenüber den nicht antiaggregatorisch behandelten Patienten (Gruppe 4) eine signifikante Reduktion der Monozyten-Thrombozyten-Aggregate. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5 zusammengestellt.

Gruppe	Anzahl	Anteil der Plättchen tragenden Monozyten in Prozent		
		Baseline	TRAP	ADP
1 (nur ASS)	17	16,4 (6,3-74,8)	56,7 (13,0-100,0)	46,6 (20,4-100,0)
2 (nur Clopidogrel)	12	13,3 (6,2-25,6)	22,1 (10,2-37,0)	30,1 (7,1-53,0)
3 (ASS + Clopidogrel)	8	7,1 (4,9-11,0)* **	11,7 (6,9-21,6)* **	24,3 (5,2-33,1)* **
4 (keine Therapie)	7	27,3 (19,2-40,8)	63,1 (30,3-70,2)	53,4 (38,3-72,7)
5 (gesunde Kontrolle)	9	8,0 (3,6-15,5)**	13,6 (10,4-80,8)	36,0 (22,7-65,4)

Werte als Median (Minimum-Maximum); * p<0,05 im Vergleich mit Gruppe 1; ** p<0,05 im Vergleich mit Gruppe 4

Tabelle 5: Darstellung der Plättchen-Monozyten-Aggregate als Anteil Plättchen tragender Monozyten (identifiziert nach anti-CD42b-PE-Fluoreszenz über Hintergrundfluoreszenz) an der Monozytengesamtpopulation.

Beim Vergleich der MFI der Plättchen tragenden Monozyten zeigte sich eine signifikante Reduktion in den unstimulierten Proben der Gruppen 2 und 3 (Clopidogrel Monotherapie bzw. Clopidogrel / ASS Kombinationstherapie) verglichen mit Gruppe 4 (keine Therapie). In den TRAP und ADP stimulierten Proben der Gruppen 2 und 3 zeigte sich zusätzlich eine signifikante Reduktion der MFI gegenüber Gruppe 1 (ASS Monotherapie). Die gesunden Probanden (Gruppe 5) hatten signifikant geringere Werte als Patienten ohne Therapie (Gruppe 4). (Abbildung 4)

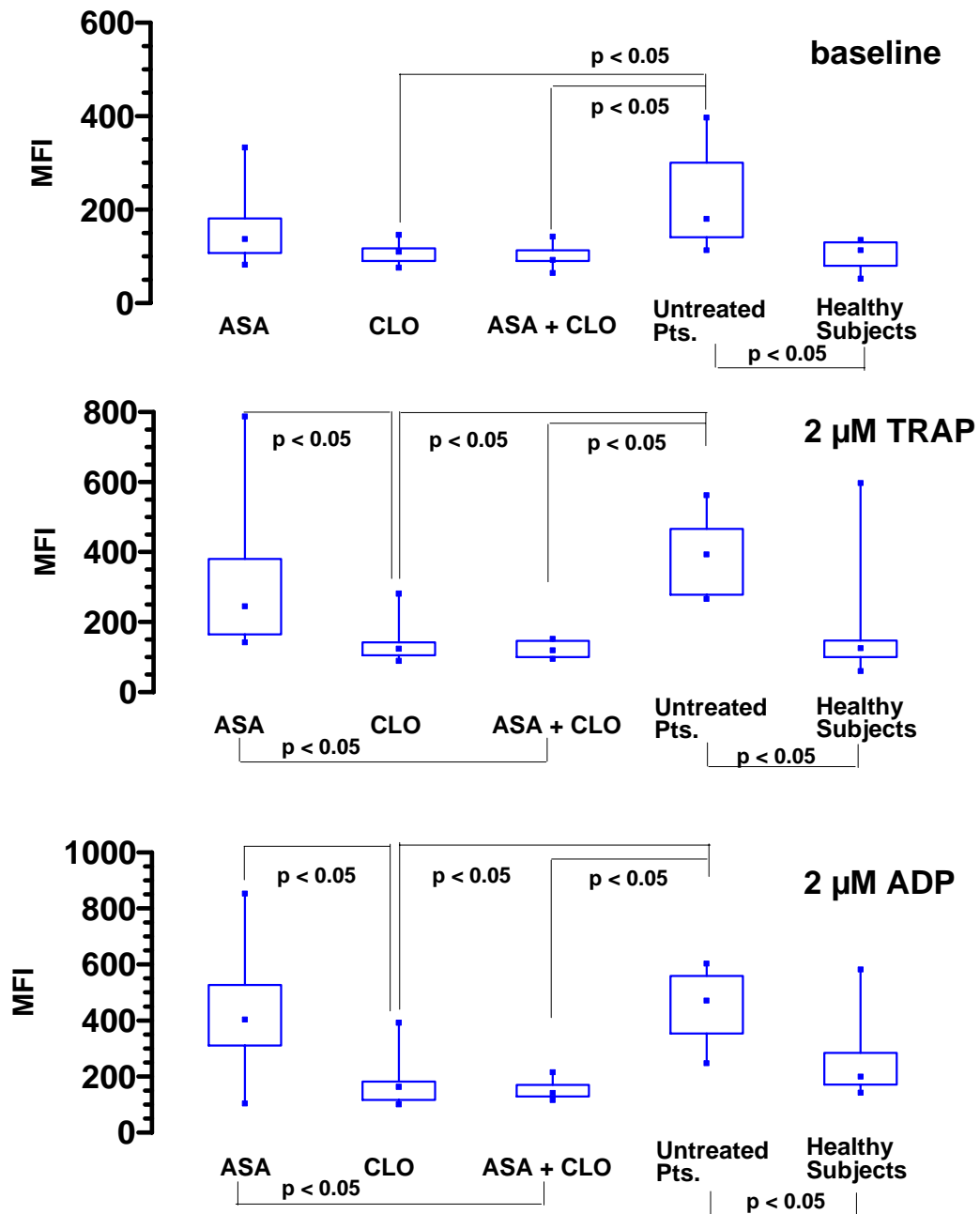


Abbildung 4: Mean Fluorescence Intensity (MFI) der anti-CD42b-PE-Fluoreszenz der Plättchen tragenden Monozyten ohne und nach Stimulation mit TRAP oder ADP. Darstellung als Boxplot. Gekennzeichnet sind signifikante Unterschiede ($p < 0,05$). Werte der Gruppe 1 (ASA), Gruppe 2 (CLO), Gruppe 3 (ASA+CLO), Gruppe 4 (Untreated Pts.) und Gruppe 5 (Healthy Subjects).

Der Anteil der mit Plättchen besetzten Neutrophilen fand sich nur in Gruppe 3 (ASS / Clopidogrel Kombinationstherapie) unter Stimulation mit TRAP gegenüber Gruppe 1 (nur ASS) und unter Stimulation mit ADP gegenüber den Gruppen 1 und 4 (nur ASS bzw. keine Therapie) signifikant reduziert. (Tabelle 6)

Gruppe	Anzahl	Anteil Plättchen tragender neutrophiler Granulozyten in %		
		Baseline	TRAP	ADP
1 (nur ASS)	17	6,2 (2,3-20,2)	14,3 (4,3-52,7)	21,1 (6,5-44,8)
2 (nur Clopidogrel)	12	6,6 (3,1-13,5)	7,4 (3,9-26,3)	11,5 (5,1-38,7)
3 (ASS + Clopidogrel)	8	4,4 (2,2-8,5)	4,9 (3,3-9,5)*	8,0 (4,0-19,8)* **
4 (keine Therapie)	7	8,9 (3,7-21,8)	10,9 (5,5-20,7)	29,8 (12,0-49,5)
5 (gesunde Kontrolle)	9	5,3 (2,5-10,5)	9,7 (2,8-15,6)	14,6 (4,2-23,9)

Werte als Median (Minimum-Maximum); * p<0,05 im Vergleich mit Gruppe 1; ** p<0,05 im Vergleich mit Gruppe 4

Tabelle 6: Dargestellt ist der prozentuale Anteil Plättchen tragender neutrophiler Granulozyten an deren Gesamtpopulation ohne und nach Stimulation mit TRAP oder ADP.

Der relative Anteil von Plättchen-Lymphozyten-Aggregaten an der Lymphozytengesamtpopulation lag zwischen 7 und 10%. Er war unabhängig von der in vitro Stimulation und zeigte keine größeren Unterschiede zwischen den Gruppen.

3.6 Mac-1-Expression

Die Mac-1-Expression auf Monozyten zeigte bei Patienten der Gruppe 3 (ASS und Clopidogrel) unter Stimulation mit TRAP oder ADP eine signifikante Mindere- rung gegenüber den Gruppen 1 (nur ASS) und 4 (keine Therapie). Unter Clopi- dogrel-Monotherapie (Gruppe 2) zeigten sich die Werte unter ADP-Stimulation signifikant gegenüber Gruppe 4 reduziert. (Tabelle 7)

Gruppe	Anzahl	Mac-1-Expression (MFI)		
		Baseline	TRAP	ADP
1 (nur ASS)	17	418 (325-764)	797 (224-1219)	959 (770-1466)
2 (nur Clopidogrel)	12	398 (221-554)	458 (211-970)	698 (433-1032)**
3 (ASS + Clopidogrel)	8	303 (169-689)	352 (169-921)* **	672 (388-1221)* **
4 (keine Therapie)	7	512 (424-590)	796 (642-930)	1171 (813-1502)
5 (gesunde Kontrolle)	9	498 (252-599)	512 (249-692)	797 (614-1212)

Werte als Median (Minimum-Maximum); * p<0,05 im Vergleich mit Gruppe 1; ** p<0,05 im Vergleich mit Gruppe 4

Tabelle 7: Darstellung der Mac-1-Expression auf Monozyten als Mean Fluorescence Intensity (MFI) der CD11b-PE-Fluoreszenz der CD14 positiven Population.

3.7 sICAM-1-Plasmakonzentrationen

Die sICAM-1-Plasmakonzentrationen bei Patienten ohne Therapie (Gruppe 4) waren signifikant gegenüber den Werten der Patienten unter antiaggregatorischer Therapie (Gruppen 1, 2 und 3) erhöht. Die niedrigsten s-ICAM-Werte wiesen die gesunden Probanden (Gruppe 5) auf, mit signifikant gegenüber der Gruppe 4 verminderten Plasmakonzentrationen. Zwischen den Gruppen 1, 2 und 3 fanden sich keine größeren Unterschiede. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5 zusammengefasst.

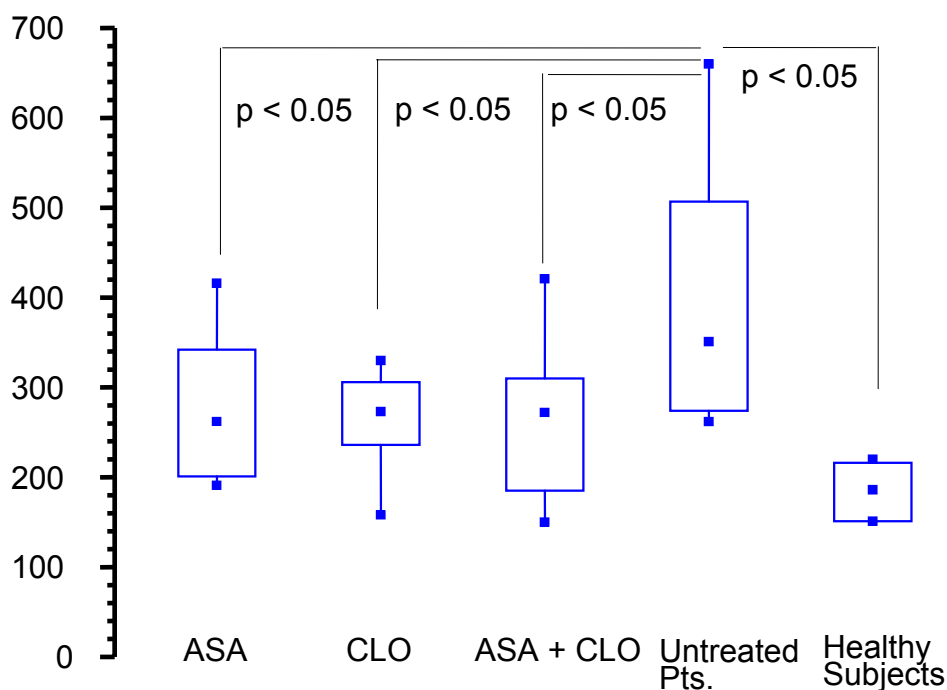


Abbildung 5: Darstellung der sICAM-1-Plasmakonzentrationen in ng/ml. Werte der Gruppe 1 (ASA), Gruppe 2 (CLO), Gruppe 3 (ASA+CLO), Gruppe 4 (Untreated Pts.) und Gruppe 5 (Healthy Subjects).

4 Diskussion

Die Hauptbefunde der vorliegenden Arbeit sind wie folgt:

- Patienten unter Clopidogrel- oder Clopidogrel/ASS-Kombinationstherapie zeigten eine signifikant niedrigere CD62-Expression und eine signifikant geringere PLA-Bildung als Patienten unter ASS oder ohne Therapie.
- Patienten mit Clopidogrel/ASS-Kombinationstherapie zeigten unter Stimulation mit TRAP oder ADP eine signifikant reduzierte Mac-1-Expression.
- Patienten ohne Therapie hatten signifikant erhöhte sICAM-1-Werte gegenüber gesunden oder behandelten Probanden bzw. Patienten.
- Signifikante Unterschiede in der PAC-1-Expression fanden sich nur unter Stimulation mit ADP zwischen Patienten unter Clopidogrel-Mono- oder Kombinationstherapie und unbehandelten oder nur mit ASS behandelten Patienten.
- In den Messungen der induzierten Aggregation zeigte sich eine signifikante Reduktion der ADP induzierten Aggregation bei Patienten, die Clopidogrel allein oder in Kombination erhielten, und der Kollagen induzierten Aggregation bei Patienten unter ASS-Mono- oder Kombinations-therapie, was als Bestätigung für ein entsprechendes Therapieregime gewertet wurde.

4.1 Studiendesign

Flowzytometrische Messungen sind relativ aufwendig und können somit nur an spezialisierten Zentren durchgeführt werden. Die Zeitspanne zwischen Blutentnahme und Messung muss wie oben ausgeführt relativ kurz gehalten werden. Ein länger dauernder Transport der Proben aus peripheren Häusern oder Praxen zum Labor ist somit nicht möglich. Deswegen wurde ein monozentrisches Studiendesign für diese Arbeit gewählt. Diese Bedingungen begrenzen jedoch die Anzahl der zur Verfügung stehenden Patienten. Des Weiteren bedingt die besondere Situation einer universitären Spezialsprechstunde, in der elektiv nur Patienten nach externer Zuweisung durch einen Facharzt betreut werden können, dass insbesondere Patienten ohne bereits eingeleitete medikamentöse pAVK-Therapie sehr selten sind, es somit nur schwer möglich ist, ausreichend Patienten der Gruppe 4 zu rekrutieren. Eine fehlende antiaggregatorische Therapie von Patienten resultierte zumeist aus mangelnder Compliance der Patienten oder fehlerhafter Diagnose und Therapie des zuweisenden Arztes.

Ein prospektiver Studienansatz mit Messungen vor und nach Therapieeinleitung wäre sicherlich wünschenswert gewesen, war aber aus Mangel an nicht bereits antiaggregatorisch therapierten Patienten nicht durchführbar. Ein Aussetzen einer schon bestehenden Therapie im Rahmen dieser Studie scheint unter Berücksichtigung des aus einem solchen Vorgehen resultierenden relativ langen therapiefreien Intervalls nicht vertretbar. Somit wurde die vorliegende Untersuchung als Querschnittsstudie konzipiert.

Die einzelnen Gruppen zeigen eine gewisse Heterogenität bezüglich des relativen Anteils an Rauchern, Diabetikern und einer bestehenden Statintherapie. Eine Varianzanalyse konnte darin aber keine Ursache für die gemessenen Unterschiede zwischen den Gruppen feststellen.

Die vorliegenden Ergebnisse sind aufgrund dieser Tatsachen und der kleinen Studiengröße entsprechend zu bewerten und sicherlich nur begrenzt generalisierbar.

4.2 CD62

Selectine sind Adhäsionsrezeptoren, von denen bislang drei Subtypen beschrieben sind: E- / L- / P-Selectin. P-Selectin (synonym: CD62, PADGEM, GMP-140) kommt auf den Zellmembranen aktivierter Endothelzellen und Thrombozyten vor. In ruhenden Thrombozyten findet es sich ausschließlich in deren α -Granula. Erst nach einer Aktivierung der Thrombozyten erfolgt die Freisetzung von CD62 und dessen Expression an der Membranoberfläche. Somit kann der Nachweis von oberflächlich exprimiertem CD62 als Marker für die vorangegangene Aktivierung der Thrombozyten genutzt werden¹³. Besondere Bedeutung erlangt CD62 auch durch seine physiologische Funktion als Adhäsionsmolekül. Über eine Interaktion mit leukozytärem PSGL-1 ist es funktionell eng mit der Leukozytenaktivierung und der Bildung von PLA verbunden²². Dabei vermittelt CD62 unter anderem einen ersten adhäsiven Kontakt zwischen Plättchen und Leukozyten (Monozyten und Granulozyten). Im Gefolge der Adhäsion kann es zur Bildung von dauerhaften Plättchen-Leukozyten-Aggregaten kommen, die dann im Blut der Patienten nachweisbar sind¹². Auf Endothelzellen vermittelt CD62 das Rolling der Leukozyten²³. Inzwischen stehen auch eine pharmakologische Beeinflussung von CD62 oder der CD62-PSGL-1-Interaktion als neue therapeutische Konzepte in der Diskussion.

Es konnte bereits in Studien gezeigt werden, dass bei Patienten mit peripherer Atherosklerose die CD62-Expression von Thrombozyten erhöht ist^{4 6}.

Im Hinblick auf einen Einfluss einer antiaggregatorischen Therapie auf die CD62-Expression ist in einer ex vivo in vitro Studie gezeigt worden, dass Clopidogrel in gesunden Probanden geeignet ist, die CD62-Expression auf in vitro aktivierten Thrombozyten zu reduzieren²⁴. Dagegen fanden sich bislang keine Hinweise darauf, dass ASS dazu in der Lage ist^{25 26}.

In der vorliegenden Studie konnte nun erstmals bei Patienten mit pAVK gezeigt werden, dass unter Clopidogrel Monotherapie oder unter Clopidogrel-ASS-Kombinationstherapie die CD62-Expression signifikant niedriger ist als unter einer ASS-Monotherapie. Dies gilt sowohl für die unstimulierten als auch die

TRAP oder ADP stimulierten Proben. Des Weiteren fand sich auch in dieser Arbeit eine signifikant erhöhte CD62-Expression von nicht behandelten pAVK-Patienten und auch von mit ASS behandelten Patienten gegenüber der gesunden Kontrollgruppe, was gut mit bereits oben genannten Studienergebnissen korreliert.

Galt et al konnten in einer Arbeit keine signifikante Erhöhung der CD62-Expression bei Patienten mit pAVK messen²⁷. Auch in einer kürzlich erschienenen Arbeit konnte keine erhöhte CD62-Expression nachgewiesen werden. Die Patienten in dieser Studie waren allerdings mehrheitlich mit ASS antiaggregatorisch therapiert und die Proben wurden nicht in vitro stimuliert. Die Untersuchungen zeigten jedoch eine erhöhte CD62-Expression bei Patienten mit arterieller Verschlusskrankheit der Hirnarterien²⁸. Dazu passend fand man an anderer Stelle bei akuter cerebraler Ischämie ebenfalls eine erhöhte CD62-Expression²⁹. Auch bei Patienten mit stabiler KHK konnte eine signifikante Erhöhung nachgewiesen werden¹¹.

Andere Untersuchungen zeigten, dass Thrombozyten ihr oberflächlich exprimiertes CD62 in vivo, aber nicht in vitro schnell wieder verlieren. Es wird deswegen postuliert, dass eine Bestimmung von CD62 nur sinnvoll sein kann, wenn die Blutentnahmen direkt distal des Ortes der Thrombozytenaktivierung, innerhalb von 5 Minuten nach dem aktivierenden Stimulus oder bei kontinuierlicher Thrombozytenaktivierung erfolgt^{10 13}. Letzteres sollte bei Patienten mit pAVK zumindest in fortgeschritteneren Krankheitsstadien und auch für die Patienten der vorliegenden Studie gelten, da die Blutentnahmen in keiner Verbindung zu einem akuten ischämischen Ereignis noch direkt an einem betroffenen Gefäß erfolgten.

4.3 PLA-Bildung

Plättchen-Leukozyten-Aggregate spielen wahrscheinlich eine bedeutende Rolle im Rahmen von atherosklerotischen Prozessen. So soll diese Interaktion von Leukozyten und Thrombozyten gewährleisten, dass die entsprechenden Zellen durch die jeweils anderen an den Ort des Geschehens gebracht werden. So kommen Thrombozyten mit den Leukozyten zu Orten entzündlicher Reaktionen und umgekehrt Leukozyten zu Prozessen mit Thrombozytenaktivierung, wie z.B. atherosklerotischen Läsionen. Ein substantieller Vorgang bei der PLA-Bildung ist die Interaktion von thrombozytärem CD62 mit dem leukozytären PSGL-1²³. Es konnte gezeigt werden, dass im weiteren Verlauf dieser Interaktion aktivierte Plättchen in der Lage sind, die Synthese leukozytärer Mediatoren wie IL-1 β , IL-8 und MCP-1, die ihrerseits wiederum entzündliche Prozesse modulieren, zu stimulieren²². Weiterhin wird eine verstärkte Mac-1-Expression neutrophiler Granulozyten, eine vermehrte monozytäre Gewebefaktor- (Tissue Factor) Expression und eine vermehrte Thrombinbildung beschrieben^{15 30}.

Die Bestimmung von PLA gilt inzwischen als sensitiver Marker für eine in vivo erfolgte Thrombozytenaktivierung. Insbesondere die Tatsache, dass aktivierte Thrombozyten in vivo ihr oberflächliches CD62 relativ schnell verlieren und PLA länger nach dem aktivierenden Stimulus im Blut zirkulieren, macht deren eigenständige Bestimmung sinnvoll¹⁰. So konnte in Studien beispielsweise bei Patienten mit stabiler und instabiler Angina pectoris, akutem Myokardinfarkt oder kardiopulmonalem Bypass eine vermehrte PLA-Bildung nachgewiesen werden^{11 31 32 33 34}.

Zur PLA-Bildung bei Patienten mit pAVK ist bislang wenig bekannt. Zu pharmakologischen Einflüssen auf die Plättchen-Leukozyten-Interaktion finden sich einige Voruntersuchungen. Eine Studie bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt zeigte eine Reduktion der PLA-Bildung durch Abciximab¹⁵. In einer anderen Arbeit konnte bei Patienten nach koronarer Stentimplantation durch eine Ticlopidin-ASS-Kombinationstherapie eine Verminderung der PLA gemessen werden. Eine Medikation aus Heparin/Phenprocoumon und ASS vermochte dies dage-

gen nicht.³⁵ Eine andere Arbeit konnte des Weiteren zeigen, dass Clopidogrel im Gegensatz zu ASS in der Lage ist, bei gesunden Probanden die ADP induzierte PLA-Bildung und CD62-Expression zu reduzieren³⁶. Klinkhardt et al zeigten, dass in einem ex vivo in vitro Modell die PLA-Bildung unter Clopidogrel-Therapie signifikant in unstimulierten und ADP oder TRAP stimulierten Proben vermindert werden konnte²⁴.

Vor diesem Hintergrund zeigt die vorliegende Studie, dass bei Patienten mit pAVK mehr Plättchen-Monozyten-Aggregate vorkommen als bei gesunden Kontrollen. Weiterhin wird deutlich, dass eine Kombinationstherapie aus Clopidogrel und ASS in der Lage ist, die Bildung von Plättchen-Monozyten-Aggregaten, gemessen am Anteil der Plättchen tragenden Monozyten an der Gesamtpopulation, gegenüber Patienten ohne Therapie oder unter einer ASS-Monotherapie signifikant zu reduzieren. Die MFI der Plättchen tragenden Monozyten zeigte sich sogar in den Proben der Gruppen 2 und 3 (Clopidogrel bzw. Clopidogrel und ASS) unstimuliert gegenüber der Gruppe 4 (keine Therapie), TRAP und ADP stimuliert gegenüber den Gruppen 1 und 4 (ASS bzw. keine Therapie) signifikant reduziert. Die niedrigsten absoluten Werte für die MFI zeigten dabei Patienten, die eine Clopidogrel-ASS-Kombinationstherapie erhielten. Dieses Therapieregime erreichte dabei sogar Werte für den prozentualen Anteil der Plättchen tragenden Monozyten und deren MFI, die unterhalb derer der gesunden Kontrollpersonen lagen.

Weniger deutlich sind die Unterschiede zwischen den Gruppen in Bezug auf die untersuchten Plättchen-Neutrophilen-Aggregate. Dort konnte nur bei Patienten unter Clopidogrel-ASS-Kombinationstherapie in den stimulierten Proben gegenüber den nicht oder nur mit ASS behandelten Patienten ein signifikanter Unterschied gemessen werden. Insgesamt sind die Unterschiede zwischen den Gruppen geringer ausgeprägt als bei den Plättchen-Monozyten-Aggregaten und großteils nicht signifikant. Die verminderte oder erschwerte Bildung von Plättchen-Neutrophilen-Aggregaten im Vergleich zu Plättchen-Monozyten-Aggregaten unter Konditionen mit Thrombozytenaktivierung ist aber ein schon öfter bemerktes Phänomen. So scheinen sich Monozyten und Plättchen leichter miteinander zu verbinden oder ihre Aggregate dauerhafter zu sein^{11 31 37 38}.

Durch den engen Zusammenhang von CD62 und PLA-Bildung scheint gerade auch im Vergleich mit oben beschriebenen Messungen der CD62-Expression ein Zusammenhang zwischen diesen beiden Messparametern wahrscheinlich. Ob die veränderte PLA-Bildung direkt auf die unterschiedliche Expression von CD62 zurückzuführen ist oder noch andere Effekte (z.B. Mac-1-Expression) eine bedeutende Rolle spielen, bleibt fraglich. Insgesamt lässt sich vor dem Hintergrund der möglichen pathophysiologischen Rolle der PLA eine Überlegenheit der Therapie mit Clopidogrel gegenüber einer ASS-Monotherapie diskutieren. Eine Kombination von Clopidogrel und ASS scheint dazu noch additive Effekte zu haben, die auf zumindest teilweise unterschiedliche Wirkmechanismen schließen lassen.

4.4 Mac-1

Der auf Leukozyten vorkommende Adhäsionsrezeptor Mac-1 (CD11b/CD18) ist Teil der Integrin-Superfamilie und kann über Adhäsion an Liganden Signale zur Zellaktivierung kommunizieren. Typische Liganden von Mac-1 sind ICAM-1, C3bi, Fibrinogen und Faktor X¹². Dabei kann es unter anderem in vivo durch kontinuierliche Aktivierung und Deaktivierung die Immobilisation und Migration von neutrophilen Granulozyten vermitteln³⁹.

Thrombozyten-Leukozyten-Interaktionen werden zu einem bedeutenden Anteil von CD62 bestimmt. Die Bindung von P-Selectin an PSGL-1 kann eine vermehrte Expression des $\beta 2$ Integrins Mac-1 bewirken¹⁵. Im weiteren Verlauf der Interaktion spielt dann Mac-1 auch als leukozytärer Adhäsionsrezeptor eine wichtige Rolle. Man spricht in diesem Zusammenhang auch von einem „Cross Talk“ zwischen CD62 und dem $\beta 2$ Integrin Mac-1. Im Rahmen der PLA-Bildung und gegenseitiger Aktivierung geht man von einem initialen CD62 abhängigen Initiierungs- und erstem Adhäsionsvorgang und einem folgenden Mac-1 abhängigen festeren Adhäsionsschritt aus. Der thrombozytäre Ligand für Mac-1 ist möglicherweise das Glykoprotein Ib α (von-Willebrand-Faktor-Rezeptor)⁴⁰. Des Weiteren spielt Mac-1 eine bedeutende Rolle im Rahmen der Leukozytenmigration, -phagozytose u.a. Es bindet und aktiviert Faktor X und vermittelt über ICAM-1 eine Leukozyten-Endothel-Interaktion. In ruhenden Zellen liegt Mac-1 verteilt auf der Plasmamembran und in größerer Dichte auch in intrazellulären Granula vor. Nach Aktivierung der Zellen erfolgt dann eine vermehrte Expression der aggregierten Rezeptoren an der Oberfläche¹⁴.

Die Mac-1-Expression gilt aufgrund ihrer Eigenschaften als Marker einer Monozytenaktivierung. In einer Studie von Murphy et al konnte beispielsweise bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom eine erhöhte Mac-1-Expression gemessen werden⁴¹. Eine andere Arbeitsgruppe fand bei Patienten mit pAVK dagegen keine erhöhten Werte für den ebenfalls zur Messung der Monozytenaktivierung benutzten und nahe verwandten Parameter CD11c/CD18. Allerdings wurde dort im Gegensatz zur vorliegenden Studie nur in unstimulierten Proben gemessen⁴².

In dieser Arbeit zeigte sich in den TRAP und ADP stimulierten Proben eine signifikant höhere MFI der CD11b-PE-Fluoreszenz auf Monozyten bei Patienten ohne Therapie oder unter ASS-Monotherapie als bei Patienten unter Kombination aus Clopidogrel und ASS. Absolut gesehen zeigten die Patienten unter der Kombinationstherapie die niedrigsten MFI Werte aller Gruppen. Damit scheint dieses Therapieregime geeignet zu sein, den Aktivierungszustand zirkulierender Leukozyten bei pAVK-Patienten zu senken. Zwischen gesunden Probanden und unbehandelten Patienten konnte kein signifikanter Unterschied gemessen werden. Dies passt gut zu den Ergebnissen der oben genannten Studie von Murphy et al. Dennoch zeigten die unbehandelten Patienten die höchsten absoluten MFI-Werte. Unter Clopidogrel-Monotherapie konnten, außer unter ADP-Stimulation im Vergleich zu unbehandelten Patienten, keine solch signifikanten Unterschiede wie unter der Kombinationstherapie festgestellt werden, was man eventuell als Hinweis auf einen additiven Effekt von Clopidogrel und ASS auf die Reduktion der Mac-1-Expression interpretieren könnte.

4.5 sICAM-1

ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule–1) ist Teil der ICAM Familie, welche zur Immunglobulin Superfamilie gehört. ICAM-1 wird von vielen hämatopoetischen und nicht-hämatopoetischen Zellen und insbesondere auch von Gefäßendothelzellen exprimiert. Als Liganden funktionieren beispielsweise die Adhäsionsrezeptoren Mac-1 und Leucocyte Adhesion LFA-1 Protein (Intergrin α -L/ β -2) auf Leukozyten⁴³. Durch seine Rolle im Rahmen der Leukozyten-Aktivierung, -Adhäsion und -Migration ist es ein wichtiger Faktor im Rahmen entzündlicher Vorgänge. ICAM-1 ist beteiligt an der Adhäsion und Migration von Neutrophilen an und durch Endothelien. Des Weiteren ist es an der Aktivierung von Neutrophilen beteiligt⁴⁴. Lösliche Formen von ICAM-1 (soluble, sICAM-1) sind im Blutplasma nachzuweisen. Sie scheinen einen hemmenden Effekt auf die Neutrophilen Adhäsion und Aktivierung zu haben⁴⁵. Bei vermehrter Oberflächenexpression von ICAM-1 auf Endothelzellen – beispielsweise nach Zytokinstimulation - wird auch vermehrt ICAM-1 in löslicher Form ins Plasma freigesetzt^{46 47}. In atherosklerotischen Plaques konnten beim Menschen erhöhte ICAM-1-Konzentrationen gemessen werden^{16 48}. Im Rahmen von entzündlichen Prozessen und auch bei atherosklerotischen Erkrankungen sind Veränderungen der Plasmakonzentration zu beobachten⁴⁹. Es ist also möglich, über die sICAM-1-Konzentration im Plasma Rückschlüsse auf die Fähigkeit des Endothels zu ziehen, aktivierte Neutrophile zu binden. Sie kann somit zur Abschätzung der Entzündungsaktivität herangezogen werden.

Thrombozyten scheinen in der Lage zu sein, unter anderem die Expression von ICAM-1 auf Endothelzellen über einen IL-1-abhängigen Mechanismus zu induzieren und dadurch der Progression einer Atherosklerose Vorschub zu leisten¹⁷. Damit scheint es möglich, dass eine antiaggregatorische Therapie sich auf die sICAM-1-Konzentration im Plasma auswirken könnte.

Bei unterschiedlichen Erkrankungen konnten bislang erhöhte Werte für lösliches ICAM-1 im Plasma der entsprechenden Patienten nachgewiesen werden. So zeigten prospektive Studien einen Zusammenhang zwischen erhöhten sICAM-1-Konzentrationen und der Inzidenz der KHK⁵⁰. Murphy et al fanden in einer Studie bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom erhöhte sICAM-1-Werte in Verbindung mit erhöhten Werten für die Mac-1-Expression auf Monozyten im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe⁴¹. Pradhan et al fanden eine positive Korrelation zwischen erhöhten sICAM-1-Werten und der nachfolgenden Entwicklung einer pAVK bei Männern⁵¹.

Die in dieser Studie gemessenen erhöhten sICAM-1-Werte bei Patienten mit pAVK ohne Therapie könnten ein Hinweis auf eine erhöhte entzündliche Aktivität bei diesen Patienten und damit insbesondere im Hinblick auf die Progredienz ihrer pAVK relevant sein. Die Senkung der sICAM-1-Plasmakonzentration unter einer antiaggregatorischen Therapie auf das Niveau der gesunden Kontrolle mag als Hinweis auf eine wirksame Unterdrückung der entzündlichen Aktivität bei pAVK-Patienten gewertet werden und als eine mögliche Erklärung für die klinisch beobachtbaren günstigen Effekte solcher Therapien auf den Krankheitsverlauf dienen. Im Vergleich der unterschiedlichen Therapieregime zueinander zeigen die Werte keine größeren Unterschiede.

In der vorliegenden Studie erhielten einige Patienten eine Statintherapie. In einer in vitro Studie waren Statine in der Lage, die sICAM-1-Konzentration in einer menschlichen Endothelzellkultur zu reduzieren⁵². Allerdings konnte in einer Studie bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom keine signifikante Verminderung der sICAM-1-Konzentration im Serum durch eine bereits bestehende Statintherapie nachgewiesen werden⁵³.

Bei einem orientierenden Vergleich zwischen mit und ohne Statin behandelten Patienten innerhalb der einzelnen Gruppen fanden sich in der vorliegenden Arbeit keine signifikanten Unterschiede der sICAM-1-Plasmakonzentrationen. Beispielhaft sind in Tabelle 8 die entsprechenden Werte der Gruppen 1 und 2 aufgeführt.

Gruppe	Anzahl	sICAM-Plasmakonzentration*
1 (nur ASS) mit Statin	9	119 (83-333)
1 (nur ASS) ohne Statin	8	135 (90-185)
2 (nur Clopidogrel) mit Statin	6	114 (76-136)
2 (nur Clopidogrel) ohne Statin	6	101 (82-118)

Werte als Median (Minimum-Maximum); * in ng/ml

Tabelle 8: Vergleich der sICAM-Plasmakonzentration in den Gruppen 1 und 2 bzgl. Statingabe

4.6 PAC-1

GP IIb/IIIa ist ein zu den β 3-Integrinen gehörendes Glykoprotein, das Bestandteil der Plasmamembran, des offenen kanalikulären Systems und der α -Granula von Thrombozyten ist. 70% dieser Rezeptoren liegen konstitutiv auf der Oberfläche der Thrombozyten vor, 30% werden erst nach Aktivierung aus den intrazellulären Speichern an die Oberfläche gebracht. Liganden für den Rezeptor sind Fibrinogen, Vitronektin, von Willebrand Faktor und Fibronektin. Man unterscheidet einen ruhenden, nicht aktivierten (niedrig affinen) von einem aktivierten (hoch affinen) und einem ligandenbesetzten Funktionszustand. Die Bindung von Fibrinogen an den aktivierten GP IIb/IIIa Rezeptor ist Voraussetzung für die Thrombozytenaggregation. Es wird vermutet, dass ein noch zu identifizierender Aktivator bei Patienten mit pAVK eine vermehrte Expression und Aktivierung von GP IIb/IIIa auf der Plasmamembran bedingt und damit die Reaktivität der Thrombozyten erhöht⁵⁴. Man kann mittels eines spezifischen monoklonalen Antikörpers (PAC-1) selektiv den aktivierten, hoch affinen Rezeptor nachweisen und dies zur Messung des Grades der Thrombozytenaktivierung nutzen. PAC-1 ist dabei gegen ein Epitop gerichtet, das auf oder nahe der Fibrinogenbindungsstelle des Rezeptorkomplexes liegt und nur auf dem aktivierten Rezeptor für eine Bindung des Antikörpers zugänglich ist¹².

In dieser Arbeit wurde mit der Messung der Expression des aktivierten Fibrinogenrezeptors GPIIb/IIIa mittels PAC-1-FITC-Fluoreszenz der Aktivierungszustand zirkulierender Thrombozyten erfasst.

Klinkhardt et al zeigten, dass Clopidogrel bei gesunden Probanden in der Lage ist, die PAC-1-Expression unter Stimulation mit TRAP oder ADP zu senken²⁴. Robless et al fanden in einer kürzlich veröffentlichten Studie keine signifikanten Unterschiede in der PAC-1-Expression bei Patienten mit pAVK, arterieller Verschlusskrankheit der Hirnarterien oder abdominellen Aortenaneurysma im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe²⁸. Allerdings wurde bei diesen Messungen keine in vitro Stimulation durchgeführt und die Patienten erhielten überwiegend eine antiaggregatorische Therapie mit ASS.

In dieser Arbeit fand sich in den Proben unter ADP-Stimulation eine signifikante Erhöhung der PAC-1-Expression bei Patienten unter ASS-Medikation oder ohne Therapie gegenüber den Patienten mit Clopidogrel als Monotherapie oder in Kombination mit ASS. Bei Patienten ohne Therapie fand sich zusätzlich in den unstimulierten Proben eine signifikante Erhöhung der Werte im Vergleich zu Patienten mit Kombinationstherapie. Wenn auch Patienten ohne Therapie höhere PAC-1-Werte aufwiesen als die gesunden Kontrollen, war dieser Unterschied nicht signifikant. Auch war eine ASS-Therapie nicht in der Lage, die PAC-1-Expression signifikant zu senken, was mit den Ergebnissen von Robless et al übereinstimmt. Dabei ist aber zu berücksichtigen, dass in der vorliegenden Studie relativ kleine Gruppen untersucht wurden.

Die höchsten Werte zeigten Patienten mit pAVK ohne Therapie, was für einen erhöhten Aktivierungszustand der Thrombozyten bei diesen Patienten spricht, wovon, wie bereits beschrieben, ausgegangen werden kann. Anders als ASS scheint Clopidogrel dabei in der Lage zu sein, diesem Aktivierungsvorgang deutlich entgegenzuwirken.

4.7 Induzierte Thrombozytenaggregation

Die induzierte Thrombozytenaggregation ist ein seit längerer Zeit gebräuchliches Verfahren zur Charakterisierung der Thrombozytenfunktion. Typischerweise finden dabei Induktoren wie ADP oder Kollagen Verwendung⁵⁵.

Aufgrund der unterschiedlichen Wirkmechanismen von Clopidogrel (ADP-Antagonist) und ASS (Hemmung des Prostaglandinstoffwechsels) kann man unterschiedliche Einflüsse einer entsprechenden Therapie auf die Messwerte erwarten. So sollte Clopidogrel einen hemmenden Einfluss auf die ADP induzierte und ASS einen hemmenden Einfluss auf die Kollagen induzierte Aggregation bedingen, wie auch Storey et al zeigen konnten. Die Messung der induzierten Aggregation wird wegen dieser Tatsache auch zum Monitoring einer entsprechenden Therapie empfohlen¹².

Storey et al fanden eine signifikante Hemmung der durch Kollagen induzierbaren Aggregation durch ASS in vitro wie in vivo in einer turbidimetrischen Messanordnung. Eine Blockade der ADP-Rezeptoren P2Y₁ und P2Y₁₂, welcher auch durch Clopidogrel blockiert wird, bewirkte eine Hemmung der ADP induzierten Aggregation⁵⁶.

Robless et al fanden in einer Arbeit, in der sie die Plättchenaggregation nach der Anzahl verbliebener freier Plättchen spontan, nach ADP- oder Kollagen-Stimulation untersuchten, eine vermehrte Aggregationsneigung bei Patienten mit pAVK unter antiaggregatorischer Therapie im Vergleich zu gesunden Kontrollen. Allerdings zeigten sich diese Unterschiede nur in der spontanen und in der Kollagen induzierten Aggregation. In der ADP stimulierten Probe fand sich keine signifikante Differenz²⁸.

Die in dieser Studie ermittelten Daten zeigten erwartungsgemäß, dass ASS die Kollagen induzierte, aber nicht die ADP induzierte Aggregation signifikant hemmte, gemessen an der maximalen Lichttransmission (Gruppe 1). Clopidogrel hemmte dagegen signifikant nur die ADP induzierte Aggregation (Gruppe 2). Diese Patientengruppen wurden jeweils mit den Patienten ohne anti-

aggregatorische Therapie (Gruppe 4) oder gesunden Probanden (Gruppe 5) verglichen. Bei Patienten mit einer Kombinationstherapie konnten beide Effekte registriert werden (Gruppe 3).

Anders als bei Robless et al fand sich in der Kollagen induzierten Aggregation kein signifikanter Unterschied zwischen Patienten unter ASS-Therapie und gesunden Probanden.

4.8 Vergleich von Clopidogrel und ASS

ASS hemmt irreversibel die ubiquitär vorkommende, zelluläre Zyklooxygenase (COX) und damit die Synthese verschiedener Arachidonsäuremetabolite. In Thrombozyten wird so die Synthese von prothrombogenem Thromboxan A₂ gehemmt. Da Thrombozyten die Fähigkeit zur Proteinsynthese fehlt, dauert die Hemmung über die gesamte Lebensdauer des Thrombozyten an. Dies erklärt auch die lange Wirkungsdauer von ASS von mehreren Tagen bei zugleich kurzer Plasmahalbwertszeit von nur einigen Minuten. Auch in Endothelzellen wird die COX gehemmt, was unter anderem zu einer verminderten Bildung von Prostazyklin PGI₂ führt, welches antithrombogene Eigenschaften besitzt. Insgesamt überwiegt aber bei ASS-Gabe der aggregationshemmende Effekt an den Thrombozyten. Bei Gefäßkrankheiten wird von einem Überwiegen der Thromboxane gegenüber den Prostazyklinen und damit einem Überwiegen prothrombogener Substanzen ausgegangen, verursacht durch eine Prostazyklinsynthesestörung des betroffenen Endothels¹². Dies Ungleichgewicht auszugleichen ist folglich das Ziel einer entsprechend eingeleiteten ASS-Therapie. In Studien konnte der positive Effekt von ASS auf die Progredienz atherosklerotischer Erkrankungen und ihrer Prognose nachgewiesen werden. Die Antiplatelet Trialists' Collaboration fand, dass eine antiaggregatorische Therapie mit ASS bei Patienten mit kardiovaskulären Erkrankungen eine Prognoseverbesserung bewirkt. Bei einer Subgruppenanalyse konnte für Patienten mit pAVK eine wenn auch nicht signifikante Senkung der kardiovaskulären Ereignisse erreicht werden⁵⁷. In der Physicians' Health Study verringerte ASS bei pAVK die Rate an nachfolgend notwendig werdenden gefäßchirurgischen Interventionen⁵⁸.

Einige neuere Studien zeigen, dass Medikamente der Klasse der Thienopyridine (Ticlopidin und Clopidogrel) offensichtlich eine Überlegenheit gegenüber ASS in der Langzeittherapie atherosklerotischer Krankheitsbilder und insbesondere bei pAVK aufzeigen^{59 60}.

Clopidogrel gehört zur Gruppe der Thienopyridine und ist aufgrund seines günstigeren Nebenwirkungsprofils im Vergleich zu Ticlopidin der bevorzugte Vertreter dieser Substanzgruppe. Sein aktiver Metabolit hemmt irreversibel einen thrombozytären ADP-Rezeptor. Dieser Rezeptor konnte kürzlich als P2Y₁₂ identifiziert werden⁶¹. Obwohl ADP für sich betrachtet ein eher schwacher Induktor der Thrombozytenaggregation ist, ist seine Bedeutung für diese im Rahmen einer Interaktion mit anderen Induktoren groß. Insbesondere bei der irreversiblen Thrombozytenaggregation scheint ADP eine Schlüsselrolle zu spielen⁶².

Es wird in der Literatur eine ASS-Resistenz bei manchen Patienten beschrieben. Dabei wird zwischen klinischer, welche das auftreten kardiovaskulärer Ereignisse trotz ASS-Therapie beschreibt, und biochemischer ASS-Resistenz unterschieden. Letztere wird unterschiedlich definiert. Allgemein kann sie als mangelnde hemmende Wirkung von ASS auf die Thrombozytenaktivierung beschrieben werden, gemessen in gängigen Testverfahren wie der induzierten Aggregation. Es konnte gezeigt werden, dass eine labortechnisch erfassbare ASS-Resistenz mit einem erhöhten Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse korreliert ist^{63 64}. Es scheint dabei keine dichotome Spaltung der Patienten nach ASS resistent oder nicht ASS resistent zu geben. Ebenso wenig ist über die mögliche zeitliche Veränderlichkeit einer solchen Resistenz bekannt. Vielmehr scheint die inter- und intraindividuelle Antwort auf ASS einer kontinuierlichen Variationsbreite zu unterliegen. Die Angaben zur Häufigkeit einer ASS-Resistenz schwanken von 5 bis 40%, je nach untersuchter Population und Methodik⁶⁵. Es konnten in dieser Arbeit keine Hinweise darauf gefunden werden, dass die gemessenen Unterschiede zwischen der ASS-Gruppe und den anderen Gruppen darauf beruhen, dass wenige „Therapieversager“ die Statistik der Gruppe 1 signifikant verändern, was sich in einer zweigipfeligen Verteilungskurve äußern könnte. Diese hätte sicherlich als starker Hinweis auf eine ASS-

Resistenz mancher Patienten gewertet werden können. Des Weiteren sollte die Anwendung von Median und Variationsbreite in der Auswertung geeignet sein, solche Effekte zu kompensieren, da wenige Ausreißer den Median nicht entscheidend beeinflussen. Es konnte bei weiterer Betrachtung der Ergebnisse auch keine Korrelation von beispielsweise hohen Werten für die induzierte Aggregation mit geringer Hemmung der CD62-Expression in der ASS-Gruppe festgestellt werden, welches bei einer ASS-Resistenz sicherlich zu erwarten gewesen wäre. Es muss beachtet werden, dass die äußerst geringe Patientenzahl in den Gruppen naturgemäß nicht geeignet ist, auf die Art der Häufigkeitsverteilung genauere Hinweise zu liefern. Insgesamt fanden sich also keine Hinweise auf eine ASS-Resistenz mancher Patienten. Ausschließen ließ sie sich aber nicht.

4.9 *In vitro* Stimulation mit ADP/TRAP

In der vorliegenden Arbeit wurden die Messungen zum einen ohne und zum anderen mit *in vitro* Stimulation mit ADP oder TRAP durchgeführt. Eine *in vitro* Stimulation von Proben wird eingesetzt zur genaueren Untersuchung einer vorangegangenen *in vivo* Aktivierung von Plättchen. Man geht davon aus, dass dadurch auch eine leichte Aktivierung erfasst werden kann, die einer Messung ohne Stimulation entgehen würde. Normalerweise kommen Aktivatoren wie ADP, TRAP 6 oder TRAP 14 zur Anwendung²⁰.

Thrombin ist ein wichtiger Aktivator von Thrombozyten *in vivo* und *in vitro*. An menschlichen Thrombozyten wirkt Thrombin über die G-Protein gekoppelten Rezeptoren Protease-activated Receptor-1 und 4 (PAR-1, PAR-4). Dabei spaltet Thrombin ein Stück vom N-terminalen Ende des Rezeptors ab und legt somit ein neues N-terminales Ende frei. Dies kann nun an eine andere Domäne des Rezeptors binden und diesen damit aktivieren.

TRAP interagiert direkt mit dieser Domäne und imitiert somit einen wichtigen physiologischen Aktivierungsweg^{66 67}.

Clopidogrel hemmt den thrombozytären ADP-Rezeptor P2Y₁₂. Sein Einfluss auf die Aktivierung mit ADP ist somit leicht verständlich. Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass die thrombozytäre Antwort auf eine Stimulation mit TRAP über den P2Y₁₂-Rezeptor moduliert wird, wird die Bedeutung dieses Rezeptors auch bei einer nicht ADP induzierten Plättchenaktivierung und der Einfluss von Clopidogrel auf die in vitro Stimulation mit TRAP deutlich⁵⁶. Somit erscheint der teilweise beobachtete hemmende Einfluss einer Clopidogreltherapie auf eine in vitro Stimulation mit ADP oder TRAP aufgrund seines Wirkmechanismus über eine entsprechende Rezeptorblockade verständlich.

4.10 Ausblick

Wie auch diese Arbeit nahe legt, stellt die pharmakologische Beeinflussung der CD62-Expression und der PLA-Bildung direkt oder indirekt über eine Hemmung der Thrombozytensekretion einen wirkungsvollen therapeutischen Ansatz bei peripherer Atherosklerose dar. Offensichtlich sind Substanzen wie Clopidogrel hier wirksam. Eine aktuelle prospektive Studie bei Patienten nach Nierentransplantation zeigt, dass Clopidogrel die PLA-Bildung wirkungsvoll hemmen kann⁶⁸.

Prospektive Studien bei Patienten mit peripherer Atherosklerose mit dem Ziel, die PLA-Bildung als Marker zu reduzieren und gleichzeitig klinische Endpunkte zu erfassen, stehen derzeit noch aus, scheinen aber nun sicherlich sinnvoll. Die aktuellen Therapiestrategien könnten so besser bewertet und gegebenenfalls auch modifiziert werden.

5 Zusammenfassung

Die Thrombozytenaktivierung, die PLA-Bildung via CD62, die Leukozytenaktivierung und die entzündliche Aktivität am Endothel nehmen in der heutigen pathophysiologischen Vorstellung der peripheren Atherosklerose und ihrer Entstehung eine zentrale Rolle ein. In dieser Querschnittstudie wurden die PLA-Bildung und Marker der Plättchen-, Leukozyten- und Endothelaktivierung (PAC-1, CD62, Mac-1 und sICAM-1) bei 44 Patienten mit peripherer arterieller Verschlusskrankheit unter Therapie mit ASS (n=17), Clopidogrel (n=12), ihrer Kombination (n=8) oder ohne Therapie (n=7) und bei einer Kontrollgruppe, bestehend aus gesunden Probanden (n=9), untersucht. Die Messungen wurden mittels Flowzytometrie im Vollblut ohne (baseline) und nach in vitro Stimulation mit ADP oder TRAP und eines Immunoassays durchgeführt. Die CD62-Expression zeigte sich bei unbehandelten und mit ASS behandelten Patienten ohne und nach Stimulation signifikant höher als bei mit Clopidogrel oder mit einer Kombination aus ASS und Clopidogrel behandelten Patienten. Gleiches galt für die PLA-Bildung (Monozyten-Leukozyten-Aggregate). Die Mac-1-Expression zeigte sich in den mit TRAP oder ADP stimulierten Proben unter einer Kombinationstherapie aus ASS und Clopidogrel gegenüber Patienten ohne oder mit ASS Monotherapie signifikant reduziert. Die sICAM-1-Plasmakonzentrationen waren bei gesunden Probanden und bei antiaggregatorische behandelten Patienten signifikant niedriger als bei unbehandelten Patienten. Die Werte unterschieden sich dabei zwischen den verschiedenen antiaggregatorischen Therapien nur unwesentlich. Dies ist die erste Studie, die zeigt, dass die PLA-Bildung bei Patienten mit pAVK vermehrt ist und unter einer Therapie mit Clopidogrel gemindert wird.

6 Abstract

Formation of platelet-leukocyte aggregates via the CD62 ligand represents an important mechanism by which leukocytes contribute to thrombotic events. In a cross-sectional study, we investigated platelet-leukocyte aggregate formation and markers indicative for platelet, leukocyte, and endothelial activation (CD62, activated fibrinogen receptor glycoprotein IIb/IIIa [PAC-1], CD11b/CD18 [MAC-1], and soluble intercellular adhesion molecule 1) in 44 patients with atherosclerotic vascular disease and peripheral occlusions receiving clopidogrel (n=12), aspirin (n=17), their combination (n=8), or no treatment (n=7), as well as in a group of healthy subjects (n=9). Whole-blood flow cytometry was performed before (baseline) and after stimulation with thrombin receptor-activating peptide or adenosine diphosphate. Both at baseline and after stimulation, untreated patients and those receiving aspirin monotherapy exhibited significantly higher levels of platelet CD62 expression and had higher rates of platelet-leukocyte aggregate formation when compared with patients receiving clopidogrel alone or combined with aspirin. Up-regulation of MAC-1 on monocytes after stimulation with thrombin receptor-activating peptide and adenosine diphosphate was significantly lower in patients treated with clopidogrel and aspirin. Plasma levels of soluble intercellular adhesion molecule 1 were significantly lower in the group of healthy subjects when compared with those in untreated patients, whereas intercellular adhesion molecule 1 levels in treated patients were similar for any antiplatelet regimen but significantly lower than those in untreated patients. This is the first report showing that platelet-leukocyte aggregate formation is enhanced in atherosclerotic vascular disease but was found to be reduced in patients receiving clopidogrel.

7 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Zustandekommen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt

Frau Dr. med. U. Klinkhardt für die Einführung in die Flowzytometrie, ihre Unterstützung und die Bereitschaft, mir jederzeit mit Rat und Hilfe zur Seite zu stehen,

Herrn Priv. Doz. Dr. med. R. Bauersachs für die Hilfe bei der Rekrutierung und Erfassung der Patienten in der Angiologischen Ambulanz der Uniklinik Frankfurt,

Herrn Prof. Dr. med. S. Harder für die Bereitstellung des Themas, sein persönliches Engagement und die hervorragende wissenschaftliche Betreuung.

8 Abkürzungen und Synonyme

ADP	Adenosindiphosphat
ASS	Acetylsalicylsäure
CD	Cluster of Differentiation
CD62	P-Selectin, PADGEM, GMP-140
COX	Zyklooxygenase
ENA-78	Epithelial Neutrophil-Activating Protein-78
g	Erdbeschleunigung
GP	Glykoprotein
GP Ib α	Von-Willebrand-Faktor-Rezeptor
GP IIb/IIIa	Fibrinogen-Rezeptor
ICAM / sICAM	(soluble) Intercellular Adhesion Molecule-1
IL	Interleukin
Mac-1	CD11b/CD18
MCP	Monocyte Chemotactic Protein-1
MIP-1 α	Macrophage Inflammatory Protein-1 α
PAC-1	Antikörper gegen aktivierten GPIIb/IIIa Rezeptor
PAF	Platelet Activating Factor
PAR-1, PAR-4	Protease-activated Receptor-1 und 4
pAVK	Periphere arterielle Verschlusskrankheit
PF4	Platelet Factor 4
PLA	Plättchen-Leukozyten-Aggregat
PPP	Plättcharmes Plasma
PRP	Plättchenreiches Plasma
PSGL-1	P-Selectin Glykoprotein Ligand 1
PTA	Perkutane transluminale Angioplastie
RANTES	Regulated upon activation normal T cell expressed and secreted

9 Literaturverzeichnis

- ¹ Deutsche Gesellschaft für Angiologie, Gesellschaft für Gefäßmedizin: Leitlinien zur Diagnostik und Therapie der arteriellen Verschlusskrankheit der Becken-Beinarterien, Stand Juli 2001. VASA 2001 Aug Supplementum 57
- ² Ross R.: Atherosclerosis--an inflammatory disease. N Engl J Med. 1999 Jan 14;340(2):115-26.
- ³ Kokschi M, Zeiger F, Wittig K, Siegemund A, Reiningner CB, Pfeiffer D, Ruehlmann C: Coagulation, fibrinolysis and platelet P-selectin expression in peripheral vascular disease. Eur J Vasc Endovasc Surg. 2001 Feb;21(2):147-54.
- ⁴ Zeiger F, Stephan S, Hoheisel G, Pfeiffer D, Ruehlmann C, Kokschi M.: P-Selectin expression, platelet aggregates, and platelet-derived microparticle formation are increased in peripheral arterial disease. Blood Coagul Fibrinolysis. 2000 Dec;11(8):723-8.
- ⁵ Woinke M, Zeiger F, Ruehlmann C, Pfeiffer D, Kokschi M: Changes in signal transduction in the platelets of patients with peripheral occlusive arterial disease. Int Angiol. 2000 Dec;19(4):345-50.
- ⁶ Kokschi M, Zeiger F, Wittig K, Pfeiffer D, Ruehlmann C: Haemostatic derangement in advanced peripheral occlusive arterial disease. Int Angiol. 1999 Dec;18(4):256-62.
- ⁷ von Hundelshausen P, Weber KS, Huo Y, Proudfoot AE, Nelson PJ, Ley K, Weber C: RANTES deposition by platelets triggers monocyte arrest on inflamed and atherosclerotic endothelium. Circulation. 2001 Apr 3;103(13):1772-7.
- ⁸ Weyrich AS, Lindemann S, Zimmerman GA: The evolving role of platelets in inflammation. J Thromb Haemost. 2003 Sep;1(9):1897-905.
- ⁹ Marx N, Neumann FJ, Ott I, Gawaz M, Koch W, Pinkau T, Schomig A.: Induction of cytokine expression in leukocytes in acute myocardial infarction. J Am Coll Cardiol. 1997 Jul;30(1):165-70.
- ¹⁰ Michelson AD, Barnard MR, Krueger LA, Valeri CR, Furman MI.: Circulating monocyte-platelet aggregates are a more sensitive marker of in vivo platelet activation than platelet surface P-selectin: studies in baboons, human coronary intervention, and human acute myocardial infarction. Circulation. 2001 Sep 25;104(13):1533-7.
- ¹¹ Furman MI, Benoit SE, Barnard MR, Valeri CR, Borbone ML, Becker RC, Hechtman HB, Michelson AD.: Increased platelet reactivity and circulating monocyte-platelet aggregates in patients with stable coronary artery disease. J Am Coll Cardiol. 1998 Feb;31(2):352-8.
- ¹² Gawaz M.: Das Blutplättchen. Thieme 1999
- ¹³ Michelson AD, Furman MI.: Laboratory markers of platelet activation and their clinical significance. Curr Opin Hematol. 1999 Sep;6(5):342-8. Review.
- ¹⁴ Arnaout MA.: Structure and function of the leukocyte adhesion molecules CD11/CD18. Blood. 1990 Mar 1;75(5):1037-50. Review.
- ¹⁵ Neumann FJ, Zohlnhofer D, Fakhoury L, Ott I, Gawaz M, Schomig A.: Effect of glycoprotein IIb/IIIa receptor blockade on platelet-leukocyte interaction and surface expression of the leukocyte integrin Mac-1 in acute myocardial infarction.
- ¹⁶ O'Brien KD, McDonald TO, Chait A, Allen MD, Alpers CE.: Neovascular expression of E-selectin, intercellular adhesion molecule-1, and vascular cell adhesion molecule-1 in human atherosclerosis and their relation to intimal leukocyte content. Circulation. 1996 Feb 15;93(4):672-82.
- ¹⁷ Gawaz M, Brand K, Dickfeld T, Pogatsa-Murray G, Page S, Bogner C, Koch W, Schomig A, Neumann F.: Platelets induce alterations of chemotactic and adhesive properties of endothelial cells mediated through an interleukin-1-dependent mechanism. Implications for atherogenesis. Atherosclerosis. 2000 Jan;148(1):75-85.
- ¹⁸ Hiatt WR.: Medical treatment of peripheral arterial disease and claudication.

N Engl J Med. 2001 May 24;344(21):1608-21. Review.

¹⁹ Spengel F, Deutsche Gesellschaft für Angiologie, 065/00, 14.01.2001, <http://www.uni-duesseldorf.de/WWW/AWMF/III/index.html>

²⁰ Schmitz G, Rothe G, Ruf A, Barlage S, Tschöpe D, Clemetson KJ, Goodall AH, Michelson AD, Nurden AT, Shankey TV: European Working Group on Clinical Cell Analysis: Consensus protocol for the flow cytometric characterisation of platelet function.

Thromb Haemost. 1998 May;79(5):885-96

²¹ Tarnok A, Mahnke A, Müller M, Zötl RJ: Rapid in vitro biocompatibility assay of endovascular stents by flow cytometry using platelet activation and platelet-leukocyte aggregation. Cytometry. 1999 Feb 15;38(1):30-9.

²² Neumann FJ, Marx N, Gawaz M, Brand K, Ott I, Rokitta C, Sticherling C, Meinel C, May A, Schomig A.: Induction of cytokine expression in leukocytes by binding of thrombin-stimulated platelets.

Circulation. 1997 May 20;95(10):2387-94.

²³ Hamburger SA, McEver RP.: GMP-140 mediates adhesion of stimulated platelets to neutrophils.

Blood. 1990 Feb 1;75(3):550-4.

²⁴ Klinkhardt U, Graff J, Harder S.: Clopidogrel, but not abciximab, reduces platelet leukocyte conjugates and P-selectin expression in a human ex vivo in vitro model.

Clin Pharmacol Ther. 2002 Mar;71(3):176-85.

²⁵ Klinkhardt U, Kirchmaier CM, Westrup D, Graff J, Mahnel R, Breddin HK, Harder S.: Ex vivo--in vitro interaction between aspirin, clopidogrel, and the glycoprotein IIb/IIIa inhibitors abciximab and SR121566A.

Clin Pharmacol Ther. 2000 Mar;67(3):305-13.

²⁶ Chronos NA, Wilson DJ, Janes SL, Hutton RA, Buller NP, Goodall AH.: Aspirin does not affect the flow cytometric detection of fibrinogen binding to, or release of alpha-granules or lysosomes from, human platelets.

Clin Sci (Lond). 1994 Nov;87(5):575-80.

²⁷ Galt SW, McDaniel MD, Ault KA, Mitchell J, Cronenwett JL.: Flow cytometric assessment of platelet function in patients with peripheral arterial occlusive disease.

J Vasc Surg. 1991 Dec;14(6):747-55; discussion 755-6.

²⁸ Robless PA, Okonko D, Lintott P, Mansfield AO, Mikhailidis DP, Stansby GP.: Increased platelet aggregation and activation in peripheral arterial disease.

Eur J Vasc Endovasc Surg. 2003 Jan;25(1):16-22.

²⁹ Grau AJ, Ruf A, Vogt A, Lichy C, Buggle F, Patscheke H, Hacke W.: Increased fraction of circulating activated platelets in acute and previous cerebrovascular ischemia.

Thromb Haemost. 1998 Aug;80(2):298-301.

³⁰ Lindmark E, Tenno T, Siegbahn A.: Role of platelet P-selectin and CD40 ligand in the induction of monocytic tissue factor expression.

Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2000 Oct;20(10):2322-8.

³¹ Rinder CS, Bonan JL, Rinder HM, Mathew J, Hines R, Smith BR.: Cardiopulmonary bypass induces leukocyte-platelet adhesion.

Blood. 1992 Mar 1;79(5):1201-5.

³² Zahler S, Massoudy P, Hartl H, Hahnel C, Meisner H, Becker BF.: Acute cardiac inflammatory responses to postischemic reperfusion during cardiopulmonary bypass.

Cardiovasc Res. 1999 Mar;41(3):722-30.

³³ Ott I, Neumann FJ, Gawaz M, Schmitt M, Schomig A.: Increased neutrophil-platelet adhesion in patients with unstable angina.

Circulation. 1996 Sep 15;94(6):1239-46.

³⁴ Ott I, Neumann FJ, Kenngott S, Gawaz M, Schomig A.: Procoagulant inflammatory responses of monocytes after direct balloon angioplasty in acute myocardial infarction.

Am J Cardiol. 1998 Oct 15;82(8):938-42.

³⁵ May AE, Neumann FJ, Gawaz M, Ott I, Walter H, Schomig A.: Reduction of monocyte-platelet interaction and monocyte activation in patients receiving antiplatelet therapy after coronary stent implantation.

Eur Heart J. 1997 Dec;18(12):1913-20.

³⁶ Storey RF, Judge HM, Wilcox RG, Heptinstall S.: Inhibition of ADP-induced P-selectin expression and platelet-leukocyte conjugate formation by clopidogrel and the P2Y₁₂ receptor antagonist AR-C69931MX but not aspirin.

Thromb Haemost. 2002 Sep;88(3):488-94.

³⁷ Rinder HM, Bonan JL, Rinder CS, Ault KA, Smith BR.: Dynamics of leukocyte-platelet adhesion in whole blood.

Blood. 1991 Oct 1;78(7):1730-7.

³⁸ Rinder HM, Bonan JL, Rinder CS, Ault KA, Smith BR.: Activated and unactivated platelet adhesion to monocytes and neutrophils.

Blood. 1991 Oct 1;78(7):1760-9.

³⁹ Sheikh S, Nash GB.: Continuous activation and deactivation of integrin CD11b/CD18 during de novo expression enables rolling neutrophils to immobilize on platelets.

Blood. 1996 Jun 15;87(12):5040-50.

⁴⁰ Simon DI, Chen Z, Xu H, Li CQ, Dong J, McIntire LV, Ballantyne CM, Zhang L, Furman MI, Berndt MC, Lopez JA.: Platelet glycoprotein Iba1 is a counterreceptor for the leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18).

J Exp Med. 2000 Jul 17;192(2):193-204.

⁴¹ Murphy RT, Foley JB, Crean P, Walsh MJ.: Reciprocal activation of leukocyte-endothelial adhesion molecules in acute coronary syndromes.

Int J Cardiol. 2003 Aug;90(2-3):247-52.

⁴² Fiotti N, Giansante C, Ponte E, Delbello C, Calabrese S, Zacchi T, Dobrina A, Guarnieri G.: Atherosclerosis and inflammation. Patterns of cytokine regulation in patients with peripheral arterial disease.

Atherosclerosis. 1999 Jul;145(1):51-60.

⁴³ ExPASy (Expert Protein Analysis System).

<http://au.expasy.org/cgi-bin/niceprot.pl?P05362#ref>, 2004 Mar.

⁴⁴ Tyagi S, Nicholson-Weller A, Barbashov SF, Tas SW, Klickstein LB.: Intercellular adhesion molecule 1 and beta2 integrins in C1q-stimulated superoxide production by human neutrophils: an example of a general regulatory mechanism governing acute inflammation.

Arthritis Rheum. 2000 Oct;43(10):2248-59.

⁴⁵ Ohno N, Ichikawa H, Coe L, Kvietys PR, Granger DN, Alexander JS.: Soluble selectins and ICAM-1 modulate neutrophil-endothelial adhesion and diapedesis in vitro.

Inflammation. 1997 Jun;21(3):313-24.

⁴⁶ Gearing AJ, Newman W. Related: Circulating adhesion molecules in disease.

Immunol Today. 1993 Oct;14(10):506-12. Review.

⁴⁷ Pigott R, Dillon LP, Hemingway IH, Gearing AJ.: Soluble forms of E-selectin, ICAM-1 and VCAM-1 are present in the supernatants of cytokine activated cultured endothelial cells.

Biochem Biophys Res Commun. 1992 Sep 16;187(2):584-9.

⁴⁸ Davies MJ, Gordon JL, Gearing AJ, Pigott R, Woolf N, Katz D, Kyriakopoulos A.: The expression of the adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1, PECAM, and E-selectin in human atherosclerosis.

J Pathol. 1993 Nov;171(3):223-9.

⁴⁹ Roebuck KA, Finnegan A.: Regulation of intercellular adhesion molecule-1 (CD54) gene expression.

J Leukoc Biol. 1999 Dec;66(6):876-88. Review.

⁵⁰ Ballantyne CM, Entman ML.: Soluble adhesion molecules and the search for biomarkers for atherosclerosis.

Circulation. 2002 Aug 13;106(7):766-7.

⁵¹ Pradhan AD, Rifai N, Ridker PM.: Soluble intercellular adhesion molecule-1, soluble vascular adhesion molecule-1, and the development of symptomatic peripheral arterial disease in men.

Circulation. 2002 Aug 13;106(7):820-5.

⁵² Mueck AO, Seeger H, Wallwiener D.: Further evidence for direct vascular actions of statins: effect on endothelial nitric oxide synthase and adhesion molecules.

Exp Clin Endocrinol Diabetes. 2001;109(3):181-3.

⁵³ Murphy RT, Foley JB, Mulvihill N, Crean P, Walsh MJ.: Impact of preexisting statin use on adhesion molecule expression in patients presenting with acute coronary syndromes.

Am J Cardiol. 2001 Feb 15;87(4):446-8, A6.

⁵⁴ Reininger CB, Graf J, Reininger AJ, Spannagl M, Steckmeier B, Schweiberer L.: Increased platelet and coagulatory activity indicate ongoing thrombogenesis in peripheral arterial disease.

Thromb Res. 1996 Jun 15;82(6):523-32.

⁵⁵ Breddin HK, Harder S.: [The value of platelet function tests]

Vasa. 2003 Aug;32(3):123-9. Review. German.

-
- ⁵⁶ Storey RF, Sanderson HM, White AE, May JA, Cameron KE, Heptinstall S.: The central role of the P(2T) receptor in amplification of human platelet activation, aggregation, secretion and procoagulant activity.
Br J Haematol. 2000 Sep;110(4):925-34.
- ⁵⁷ Collaborative overview of randomised trials of antiplatelet therapy--I: Prevention of death, myocardial infarction, and stroke by prolonged antiplatelet therapy in various categories of patients. Antiplatelet Trialists' Collaboration.
BMJ. 1994 Jan 8;308(6921):81-106. Erratum in: BMJ 1994 Jun 11;308(6943):1540.
- ⁵⁸ Goldhaber SZ, Manson JE, Stampfer MJ, LaMotte F, Rosner B, Buring JE, Hennekens CH.: Low-dose aspirin and subsequent peripheral arterial surgery in the Physicians' Health Study.
Lancet. 1992 Jul 18;340(8812):143-5.
- ⁵⁹ CAPRIE Steering Committee: A randomised, blinded, trial of clopidogrel versus aspirin in patients at risk of ischaemic events (CAPRIE)..
Lancet. 1996 Nov 16;348(9038):1329-39.
- ⁶⁰ Bellavance A.: Efficacy of ticlopidine and aspirin for prevention of reversible cerebrovascular ischemic events. The Ticlopidine Aspirin Stroke Study.
Stroke. 1993 Oct;24(10):1452-7.
- ⁶¹ Savi P, Labouret C, Delesque N, Guette F, Lupker J, Herbert JM.: P2y(12), a new platelet ADP receptor, target of clopidogrel.
Biochem Biophys Res Commun. 2001 May 4;283(2):379-83.
- ⁶² Trumel C, Payrastre B, Plantavid M, Hechler B, Viala C, Presek P, Martinson EA, Cazenave JP, Chap H, Gachet C.: A key role of adenosine diphosphate in the irreversible platelet aggregation induced by the PAR1-activating peptide through the late activation of phosphoinositide 3-kinase.
Blood. 1999 Dec 15;94(12):4156-65.
- ⁶³ Gum PA, Kottke-Marchant K, Welsh PA, White J, Topol EJ.: A prospective, blinded determination of the natural history of aspirin resistance among stable patients with cardiovascular disease.
J Am Coll Cardiol. 2003 Mar 19;41(6):961-5.
- ⁶⁴ Gum PA, Kottke-Marchant K, Poggio ED, Gurm H, Welsh PA, Brooks L, Sapp SK, Topol EJ.: Profile and prevalence of aspirin resistance in patients with cardiovascular disease.
Am J Cardiol. 2001 Aug 1;88(3):230-5.
- ⁶⁵ Bhatt DL.: Aspirin resistance: more than just a laboratory curiosity.
J Am Coll Cardiol. 2004 Mar 17;43(6):1127-9.
- ⁶⁶ Brass LF.: Thrombin and platelet activation.
Chest. 2003 Sep;124(3 Suppl):18S-25S. Review.
- ⁶⁷ Sambrano GR, Weiss EJ, Zheng YW, Huang W, Coughlin SR.: Role of thrombin signalling in platelets in haemostasis and thrombosis.
Nature. 2001 Sep 6;413(6851):74-8.
- ⁶⁸ J. Graff, U Klinkhardt, J. Gossmann, O. Wahl, S. Harder: Effects of p2y12 inhibition on platelet function in renal transplant patients.
Clinical Pharmacology and Therapeutics 2004, Vol. 75,(2), 7