

Aus dem Zentrum für Herzchirurgie Erlangen-Nürnberg  
(Direktor Prof. Dr. med. M. Weyand)  
der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen

Angefertigt unter der Leitung von  
PD Dr. med. S. Ensminger

Vorgelegt über  
Prof. Dr. med. vet. B. Kaspers  
am Institut für Physiologie, Physiologische Chemie und Tierernährung  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

## **Clopidogrel reduziert die Entwicklung der Transplantat-Arteriosklerose im Mausmodell**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde  
der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von  
Silke Abele  
aus  
Nürnberg  
München, 2007

**Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität München**

Dekan: Univ.-Prof. Dr. E. P. Märtlbauer

Referent: Univ.-Prof. Dr. Kaspers

Korreferenten: Univ.-Prof. Dr. Hermanns  
Univ.-Prof. Dr. Ammer  
Univ.-Prof. Dr. Hirschberger  
Univ.-Prof. Dr. Matis

Tag der Promotion: 20. Juli 2007

Meinen Eltern

Lia

Luna Minnie Putzi Lacrima  
Bazi Tassilo Cassandra Papageno

Den Mäusen,  
die für diese Studie ihr Wertvollstes gegeben haben

# 1 Inhalt

## I Inhaltsverzeichnis

1	Inhalt.....	3
2	Einleitung und Literatur.....	7
2.1	Der Aufbau einer Arterie .....	8
2.2	Die akute und chronische Transplantat-Abstoßung .....	9
2.2.1	Mechanismen der Transplantat-Abstoßung .....	9
2.2.1.1	MHC- Komplex.....	10
2.2.1.2	Antigenerkennung durch T-Zellen.....	12
2.2.2	Immunsuppression .....	13
2.2.3	Transplantat-Arteriosklerose.....	15
2.2.3.1	Mechanismen.....	15
2.2.3.2	Das Endothel .....	17
2.2.3.3	Thrombozyten in der chronischen Abstoßung.....	17
2.3	Clopidogrel (Plavix®).....	21
2.3.1	Der Rezeptor P2Y <sub>12</sub> und sein Wirkmechanismus .....	21
2.3.2	Der Metabolit von Clopidogrel .....	22
2.4	Ziel der Studie .....	23
	<b>Manuskript: Clopidogrel reduces the development of transplant arteriosclerosis</b> Abele et al. (J Thorac Cardiovasc Surg 2006;131:1161-6)	
3	Diskussion .....	24
3.1	Experimentelles Modell.....	24
3.1.1	Thrombozytenaggregationshemmung und Applikationsform von Clopidogrel	25
3.2	Aktivierte Thrombozyten und ihre weitreichenden Folgen .....	27
3.3	Glatte Muskelzellen und ihre Bedeutung für Transplantat-Arteriosklerose .....	30
3.4	Der Mechanismus von Clopidogrel und seine Wirkung auf die Transplantat- Arteriosklerose.....	31
3.4.1	Clopidogrel versus Acetylsalicylsäure.....	34
3.5	Zusammenfassung und Ausblick.....	35
4	Zusammenfassung .....	38
5	Summary .....	39
6	Literaturverzeichnis.....	40

---

## II Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Aufbau einer Arterie. ....	9
Abb. 2: Komplett verschlossene Maus-Aorta.....	10
Abb. 3: Leukozyten-Adhäsion und -Transmigration.....	20
Abb. 4: Aortentransplantation nach Koulak. ....	23
Abb. 5: Messung der mRNA von ICAM-1, PDGF- $\beta$ , E-Selektin und P-Selektin im Transplantat .....	33
Abb. 6: DC Zellinfiltration nach Clopidogrelbehandlung in transplantierte Mausorta am Tag 30 nach TX.....	36

### III Verzeichnis der Abkürzungen

<b>ADP</b>	Adenosindiphosphat
<b>ASS</b>	Acetylsalicylsäure
<b>ATP</b>	Adenosintriphosphat
<b>cAMP</b>	zyklisches Adenosinmonophosphat
<b>CD</b>	cluster of differentiation (Oberflächenmarker auf Zellen)
<b>CD11b</b>	siehe MAC-1
<b>CD40L</b>	CD 40 Ligand
<b>CMV</b>	Cytomegalievirus
<b>CD3</b>	Antigen auf T-Zellen
<b>CD11c</b>	Antigen auf myeloiden Zellen
<b>CD25</b>	Antigen auf aktivierten T-Zellen, B-Zellen und Monozyten
<b>CD31</b>	siehe PECAM
<b>CD205</b>	Antigen auf dendritischen Zellen
<b>CD62P</b>	P-Selektin
<b>CD63</b>	Melanoma 1 Antigen
<b>CD154</b>	CD40-Ligand
<b>COX</b>	Zyklooxygenase
<b>ELISA</b>	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
<b>eNOS</b>	endotheliale Stickstoffmonoxid Synthase
<b>GPIb</b>	Glykoprotein Ib
<b>GP IIb/IIIa</b>	Glykoprotein IIb/IIIa
<b>HLA</b>	human leukocyte antigen
<b>ICAM-1</b>	Interzelluläres Adhäsions Molekül 1
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Interferon Gamma
<b>IL</b>	Interleukin
<b>LDL</b>	low density Lipoprotein
<b>LIBS-1</b>	ligand-induced binding site 1
<b>MAC-1</b>	chemoattractant activation-dependend molecule 1
<b>MCP-1</b>	chemotaktisches Monozyten Protein 1
<b>MHC</b>	Haupthistokompatibilitätskomplex
<b>MIP-1<math>\alpha</math></b>	Makrophagen Entzündungsprotein

---

<b>MMF</b>	Mykophenolat Mofetil
<b>MMP-2</b>	Matrix Metalloproteinase 2
<b>mRNA</b>	messenger RNA
<b>mTOR</b>	mammalian target of Rapamycin
<b>NF<math>\kappa</math>B</b>	Transkriptionsfaktor nuclear factor kappa B
<b>NO</b>	Stickstoffmonoxid
<b>PAF</b>	Thrombozyten aktivierender Faktor
<b>PDGF</b>	platelet derived growth factor
<b>PECAM</b>	platelet/endothelial cell adhesion molecul
<b>PF4</b>	Thrombozyten Faktor 4
<b>PKA</b>	Proteinkinase A
<b>PLA</b>	Thrombozyten -Leukozyten -Aggregate
<b>RANTES</b>	regulated on activation, normal T cell expressed and secreted
<b>sCD40L</b>	soluble CD 40-Ligand
<b>SMC</b>	smooth muscle cell (glatte Muskelzelle)
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	transforming growth factor beta
<b>Thy-1</b>	CD 90
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Tumor Nekrose Faktor alpha
<b>TxA</b>	Transplantat-Arteriosklerose
<b>VASP</b>	Vasodilatator stimuliertes Phosphoprotein
<b>VCAM</b>	vascular cell adhesion molecul 1
<b>vWF</b>	von Willebrand Faktor

## 2 Einleitung und Literatur

Im Jahr 1905 wurde in Wien ein Hund zum ersten Herztransplantatempfänger der Welt [1]. Da die Herz-Lungen-Maschine noch nicht erfunden war, transplantierte ihm Marie Joseph Auguste (Alexis) Carrel ein allogenes Herz heterotop in den Hals [2]. Mit der Erfindung der Herz-Lungen-Maschine im Jahre 1937 durch den Amerikaner John Gibbon wurde der Grundstein für die extrakorporale Zirkulation gelegt, und zumindest theoretisch die Möglichkeit, einem unheilbar herzkranken Menschen das eigene Herz zu entfernen, und durch ein geeignetes gesundes Organ zu ersetzen. Eine 18jährige Frau wurde im Jahre 1953 als erste Person an eine solche Herz-Lungen-Maschine angeschlossen, und 45 Minuten lang an einem Vorhofseptumdefekt am offenen Herzen operiert [3].

In Südafrika führte schließlich Christiaan Barnard am 03.12.1967 im Groote Schuur Hospital in Cape Town die erste Herztransplantation am Menschen durch. Nach einer Operationszeit von fünf Stunden schlug in Louis Washkansky's Brust das Herz von Denise Durvall, die bei einem Autounfall ums Leben gekommen war. Der Patient überlebte 18 Tage, und starb schließlich an einer Lungenentzündung. Der zweite Patient, bei dem diese Therapie durchgeführt wurde, war Philip Blaiberg. Er wurde am 02.01.1968 operiert, und überlebte 1,5 Jahre mit dem fremden Organ, bis er schließlich an Herzversagen verstarb, vermutlich verursacht durch den sukzessiven Verschluss der Herzkranzgefäße [4]. Mittlerweile haben weltweit mehrere 10 000 Menschen ein „neues Herz“ erhalten und leben im Durchschnitt ungefähr zehn Jahre länger als es ihnen mit ihrem eigenen Herzen möglich gewesen wäre. Damals wie heute stellt die pathologische Veränderung der Gefäße nach der Transplantation – Folge eines chronischen Abstoßungsprozesses – immer noch die häufigste Todesursache für herztransplantierte Patienten ab dem dritten Jahr nach erfolgter Operation dar [5, 6] und man hat dieser Krankheit schon lange einen eigenen Namen gegeben: *Transplantat-Arteriosklerose (TxA)*.

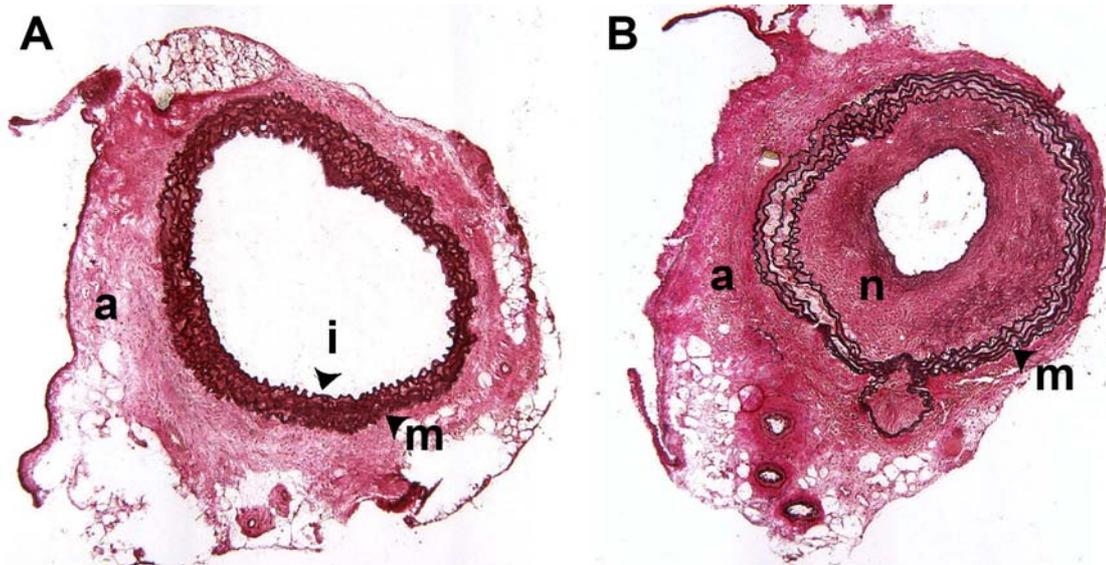
Diese krankhafte Veränderung der Gefäße ist charakterisiert durch diffuse und progressive Verdickung der arteriellen Tunica intima, die sowohl kleinere als auch größere Koronararterien von transplantierten Herzen betrifft [7, 8]. Es handelt sich hierbei vor allem um eine Anreicherung von Matrixproteinen, sowie um eine Infiltration sowohl glatter Muskelzellen als auch mononukleärer Leukozyten [9-11].

Die zunehmende Okklusion der Gefäße bewirkt einen plötzlichen oder chronisch progressiven ischämischen Schaden des transplantierten Herzens und führt so zu späterem Organversagen. Da das transplantierte Herz denerviert ist und der Patient somit keine typischen Angina pectoris Symptome hat, kann die erste klinische Manifestation dieser Krankheit in progressivem Herzversagen, ventrikulären Arrhythmien oder plötzlichem Herztod bestehen. TxA ist diffus und involviert häufig lange Segmente der betroffenen Arterien. Im Gegensatz zu alimentär-induzierter Arteriosklerose, die normalerweise einen bestimmten Teil einer Arterie stärker betrifft als andere und prominente Läsionen verursacht, ist die TxA durch eine konzentrische Intima –Verdickung charakterisiert [7, 8, 12].

Zahlreichen pathogenetischen Mechanismen wurde ein Einfluß auf die Entstehung der TxA zugesprochen. Der detaillierte zeitliche Ablauf der Pathogenese ist jedoch nach wie vor unklar.

## **2.1 Der Aufbau einer Arterie**

Von innen nach außen folgt dem Lumen einer Arterie die Intima, welche aus einer einschichtigen Lage von Endothelzellen besteht, die auf einer dünnen Schicht extrazellulärer Matrix und gelegentlich glatten Muskelzellen (*smooth muscle cells*, SMC) liegen. Weiter nach außen gehend folgt die innere elastische Lamina. Die nächste Schicht stellt die Tunica Media dar, die aus mehreren Lagen arterieller SMC besteht, welche in einer elastin- und collagenreichen extrazellulären Matrix eingebettet sind. Anschließend folgt die äußere elastische Lamina. Die äußerste Schicht einer Arterie stellt die Adventitia dar, die sich aus Myofibroblasten, autonomen Nervenendigungen, wenigen Leukozyten und extrazellulärer Matrix zusammensetzt [13].



**Abb. 1: Aufbau einer Arterie.**

A) Isograft und B) Allograft einer Mauseorta als Gefrierschnitt, gefärbt nach Elastin van Gieson. Im Isograft ist das einschichtige Endothel stellvertretend für die Intima (i), die etwas dunkler gefärbten elastischen Fasern der Media (m) und die Adventitia (a) zu erkennen. Bei dem Allograft ist die neugebildete Neointima (n) zu sehen, die das Gefäßlumen konzentrisch nach medial verkleinert und hauptsächlich aus glatten Muskelzellen besteht.

## 2.2 Die akute und chronische Transplantat-Abstoßung

### 2.2.1 Mechanismen der Transplantat-Abstoßung

Die Transplantat-Arteriosklerose ist ein Effekt des Abstoßungsprozesses, der nach einer allogenen Herztransplantation auftritt. Abstoßungsprozesse werden in drei Kategorien unterteilt:

#### a) Hyperakute/perakute Abstoßung

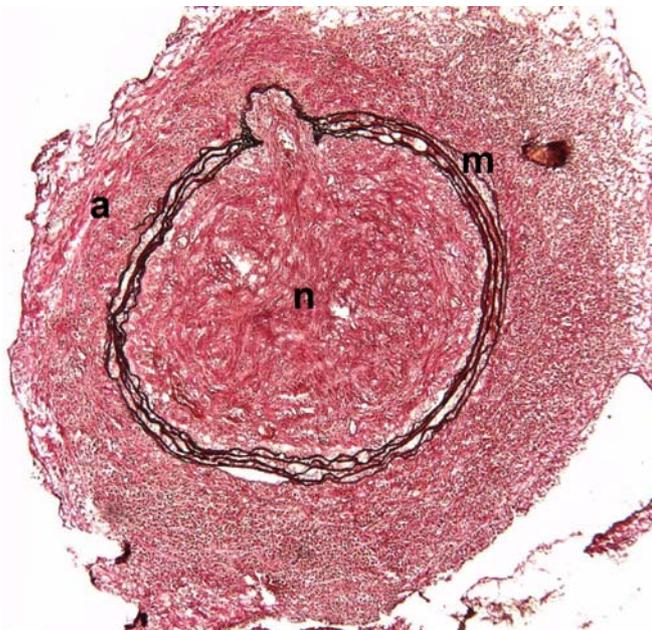
Diese Form der Abstoßung tritt innerhalb von Minuten bzw. Stunden nach erfolgter Transplantation auf. Verursacht wird sie durch präformierte Antikörper, die allo- oder blutgruppenspezifisch sind und sich gegen HLA Moleküle oder ABO-Antigene des Transplantates richten. Es kommt zur Komplementaktivierung und anschließenden Fibrinablagerung in den Gefäßen, wodurch diese verschlossen werden, und das Transplantat letztendlich abstirbt. Durch Kreuztests der Seren von Spender und Empfänger wird das Vorhandensein solcher Antikörper vor der Transplantation geprüft [14].

### b) Akute Abstoßung

Diese Form der Abstoßung erfolgt meist innerhalb von Tagen bis Wochen nach Transplantation und ist gekennzeichnet durch Infiltration des Organs mit zytotoxischen T-Lymphozyten. Die akute Abstoßung ist mit Steroiden, Immunsuppressiva oder auch Lymphozytenantikörpern in der Regel gut behandelbar [14].

### c) Chronische Abstoßung

Die Hauptmanifestation der chronischen Abstoßung bei herztransplantierten Patienten ist die so genannte Transplantat-Arteriosklerose oder TxA der Koronararterien. Sie kann bereits nach einigen Wochen beginnen und der meist progressive Verlauf erstreckt sich über Jahre hinweg. Es handelt sich um eine Transplantatvaskulopathie, die sich in einer irreversiblen Verengung der Blutgefäße äußert. Die medikamentöse Therapie der TxA ist bisher sehr enttäuschend verlaufen, die einzige kausative Therapie ist eine Re-Transplantation mit entsprechend erhöhtem Risiko.



**Abb. 2: Komplett verschlossene Maus-Aorta.**

Die Neointima (n) füllt das gesamte Gefäßlumen aus und die fibrosierten Fasern der Media (m) sind auseinandergebrochen.  
(a, Adventitia)

#### **2.2.1.1 MHC- Komplex**

MHC steht für Major Histocompatibility Complex oder Haupthistokompatibilitätskomplex. Er stellt eine große Gruppe von Genen dar, die MHC-Glykoproteine codieren. Diese wurden erstmals entdeckt, weil sie die

Immunantwort auf transplantiertes Gewebe stark beeinflussen. T-Zellen erkennen Antigene, die ihnen auf der Zelloberfläche präsentiert werden. Die MHC-Moleküle spielen eine entscheidende Rolle bei der Antigenpräsentation. Sie bringen Peptide von Krankheitserregern an die Zelloberfläche, und markieren eine solche Zelle damit als infiziert. Peptide, die aus dem Cytosol einer Zelle stammen, werden an MHC I Moleküle gebunden und von  $CD\ 8^+$  T-Zellen erkannt. Diese zytotoxischen T-Zellen können die Zielzelle dann vernichten. Peptide, die nach Phagozytose in Vesikeln einer Zelle entstehen, werden dagegen an MHC II Moleküle gebunden und von  $CD4^+$  T-Zellen erkannt. Die TH-1 Zellen, die auch inflammatorische T-Zellen genannt werden und zu den  $CD4^+$  T-Zellen gehören, aktivieren Makrophagen, welche die Erreger anschließend abtöten. TH-2 Zellen veranlassen B-Zellen zur Produktion von Antikörpern gegen den Erreger, welche letztendlich zu seiner Blockierung oder Zerstörung führen. Bakterien, die sich außerhalb einer Zelle vermehren und Toxine sezernieren, werden von Dendritischen Zellen, Makrophagen oder B-Zellen als Antigen präsentierenden Zellen aufgenommen, prozessiert und anschließend den T-Zellen als Antigene präsentiert. Jede T-Zelle ist spezifisch für ein bestimmtes Peptid im Komplex mit einem bestimmten MHC-Molekül. Mit Hilfe dieses MHC-Komplexes ist der Organismus in der Lage zwischen körpereigenen und körperfremden Antigenen zu unterscheiden. Somit ist er auch für die Organtransplantation von ganz entscheidender Bedeutung. Im Gegensatz zur niedrigen Frequenz spezifischer T-Zellen, die gegen bakterielle und andere Antigene reagieren, reagieren etwa ein bis zehn Prozent aller T-Zellen auf eine allogene Stimulierung mit „nicht-selbst-MHC-Molekülen“, deshalb kommt es nach einer Transplantation durch diese zellvermittelte Immunantwort sehr schnell zur Abstoßung [15]. MHC I wird auf jeder Zelle eines Individuums exprimiert, MHC II dagegen nur auf Antigen präsentierenden Zellen.

Der Haupthistokompatibilitätskomplex setzt sich folgendermaßen zusammen: Es existieren die Major- und die Minorhistokompatibilitätsantigene. Die Gruppe der Majorhistokompatibilitätsantigene läßt sich unterteilen in MHC Klasse I, II oder III Gene, wobei letztere eine untergeordnete Rolle spielen. Der MHC ist polygen, deshalb besitzt jeder Mensch und jede Maus MHC-Moleküle (Glykoproteine) mit unterschiedlichen Peptidbindungsspezifitäten. Außerdem ist er polymorph- d.h. für jedes Gen existieren mehrere Allele [15].

Beim Menschen liegt dieser Komplex auf dem Chromosom 6 und darin befindliche Gene werden HLA-Gene genannt, eine Bezeichnung die für Human Leukocyte

Antigen steht, da sie als Unterschiede in den Antigenen auf weißen Blutkörperchen entdeckt wurden. Die drei Hauptgene der MHC I werden als HLA A, B oder C bezeichnet, in der MHC II als HLA-DR, -DQ oder -DP, welche in der MHC II jeweils aus einer  $\alpha$ - und  $\beta$ - Kette bestehen. Bei Mäusen dagegen liegt der MHC-Komplex auf Chromosom 17 [15]. Die MHC Klasse I Gene der H-2 Region verschlüsseln Transplantations Antigene, welche auf allen kernhaltigen Zellen der Maus exprimiert werden [16]. Die drei Hauptgene dieser Klasse werden bei der Maus H2 K, D oder L genannt [16], die Gene der MHC Klasse II I-A bzw. I-E [15]. Transplantierte Organe von Spendern mit MHC-Molekülen, die sich von denen des Empfängers unterscheiden, werden immer abgestoßen. Diese zellvermittelte Immunantwort auf das transplantierte Gewebe resultiert aus der Anzahl von T-Zellen in jedem Individuum, die speziell auf bestimmte fremde bzw. allogene MHC-Moleküle reagieren [15].

In unseren Experimenten wurde ein kompletter MHC-*missmatch* verwendet, da die Spendermäuse C57/BL 6 H2-K<sup>b</sup>, -L<sup>b</sup> und -D<sup>b</sup> als MHC I sowie I-A<sup>b</sup> und I-E<sup>b</sup> als MHC II besitzen, wohingegen die Empfängermäuse CBA in beiden Klassen das k-Allel an der Stelle des b-Allels besitzen. Mit der Auswahl dieser genetischen Spender-Empfänger-Kombination wird eine starke Alloimmunreaktion provoziert. Eine singulär vermehrte MHC Klasse I Expression in allogenen Herztransplantaten führt eher zu akuter [17], eine vermehrte MHC Klasse II Expression in Aorten dagegen eher zu einer chronischen Abstoßung des Organs [18].

### **2.2.1.2 Antigenerkennung durch T-Zellen**

Man unterscheidet CD8<sup>+</sup> Zellen, welche auch cytotoxische T-Zellen genannt werden, und CD4<sup>+</sup> T-Zellen, die sogenannten T-Helferzellen [15]. CD4<sup>+</sup> T Zellen spielen die wichtigere Rolle in der Transplantatabstoßung. Man unterscheidet zwei Subpopulationen, Th1 und Th 2 T-Helfer-Zellen. Sie unterscheiden sich durch die Produktion von unterschiedlichen Zytokinen und durch unterschiedliche Effektorfunktionen. Während eine TH1 CD4<sup>+</sup> Zelle IFN- $\gamma$  und IL2 produziert, und hauptsächlich an der zellulären Immunantwort beteiligt ist, produziert eine TH2 CD4<sup>+</sup> Zelle IL4, IL5, IL10, IL13, und ist vorwiegend für die B-Zellhilfe bei der humoralen Immunantwort verantwortlich.

Die Erkennung der Alloantigene durch T Zellen kann über zwei Mechanismen geschehen. Bei der *direkten Erkennung* interagieren alloreaktive T-Zellen des

Empfängers direkt mit antigenpräsentierenden Zellen des Spenders aus dem Organtransplantat. Dies sind hauptsächlich dendritische Zellen, welche das Transplantat verlassen, um über die Lymphflüssigkeit zu den regionalen Lymphknoten zu wandern. Diese Donorzellen tragen MHC-Moleküle der Klassen I und II des Spenders und besitzen costimulierende Aktivität. Sie fungieren als antigenpräsentierende Zellen und aktivieren in den Lymphknoten naive alloreaktive T-Zellen des Empfängers. Diese werden zur Zellteilung angeregt und die daraus resultierenden aktivierten alloreaktiven T-Effektorzellen gelangen über den Ductus thoracicus ins Blut und schließlich zum Transplantat, welches sie angreifen, da es als fremd erkannt wurde [15]. CD8<sup>+</sup> T-Zellen können das Antigen auch direkt auf den Endothelzellen erkennen und vor Ort aktiviert werden.

Der zweite Mechanismus ist die *indirekte Erkennung*, bei der antigenpräsentierende Zellen des Empfängers Proteine aus dem Spenderorgan aufnehmen. Peptidfragmente dieser Proteine, die eine vom Empfänger abweichende Sequenz haben können, präsentieren sie anschließend in eigenen MHC-Molekülen den allopeptidspezifischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen des Empfängers, welche die fremden Proteine erkennen und aktiviert werden [15].

### **2.2.2 Immunsuppression**

Tolypocladium Gams ist ein Pilz, der zum Schutz gegen andere Pilze ein Undecapeptid bildet, welches Geschichte machte: Cyclosporin. 1970 waren die Cyclosporine in Bodenproben aus Norwegen entdeckt worden, aber der Schweizer Jean Borel entdeckte erst 1976, dass diese Substanz eine immunsuppressive Wirkung hat. Er drückte die Wirkungsweise folgendermaßen aus: „Vergleicht man die Immunantwort mit beißenden Hunden, dann ist Cyclosporin A ein Maulkorb, der bestimmte Zellen des Immunsystems am Beißen hindert, ohne sie umzubringen“ [19]. Damit meinte er die T-Lymphozyten. Das erste Mal wurde es 1980 nach einer Herztransplantation eingesetzt, und seine immunomodulierende Wirkung macht man sich auch heute noch als Cyclosporin A zu Nutze [7].

Als Basis-Immunsuppression werden meist Calcineurininhibitoren, Antimetaboliten der Purinbiosynthese und Corticosteroide verwendet [14]. Calcineurininhibitoren sind z.B. Cyclosporin A und FK 506. 1999 wurde eine weitere Medikamentengruppe in das Behandlungsschema nach Herztransplantation eingeführt: Inhibitoren von mTOR (mammalian target of Rapamycin). Dazu gehören Präparate mit Wirkstoffen wie

Sirolimus und Everolimus. Sie inhibieren die mTOR abhängige Signal-Transduktion des Zell-Zyklus, die in einer Suppression der Lymphozytenproliferation und anderer nicht lymphoider mTOR abhängiger Zellen, wie zum Beispiel Endothelzellen und glatter Muskelzellen, resultiert [7]. Antimetaboliten der Purinbiosynthese hemmen die Synthese von Purinnukleotiden und vermindern so die Proliferation der Allogen spezifischen T-Lymphozyten. Zu dieser Medikamentengruppe gehören Wirkstoffe wie Azathioprin und Mycophenolat Mofetil (MMF) [14]. Trotz ihrer potenten immunsuppressiven Fähigkeiten durch eine Blockade der Synthese von Makrophagen produziertem IL-1, TNF- $\alpha$  und IL-6 und resultierende Hemmung der T-Lymphozytenproliferation [20], kann die Anwendung von Corticosteroiden die Entwicklung einer TxA beschleunigen, da die Nebenwirkungen wie Diabetes mellitus, Hyperlipidämie und Bluthochdruck sehr oft auftreten. Diese Nebenwirkungen können durch gleichzeitige Anwendung von Calcineurininhibitoren noch verstärkt werden. Zusätzlich besteht die Möglichkeit der Durchführung einer Induktionstherapie mit mono- oder polyklonalen Antikörpern gegen aktivierte T-Lymphozyten. Monoklonale Antikörper gegen bestimmte Lymphozytendeterminanten, wie CD3 oder CD25, sind in ihrer Zusammensetzung einheitlich und werden gut vertragen. Durch diese Antikörper können jene T-Zell-Populationen neutralisiert werden, die durch den Kontakt mit dem Transplantat aktiviert wurden [21].

Ein herztransplantiertes Patient muss sich regelmäßigen ärztlichen Untersuchungen unterziehen, unter anderem werden in bestimmten Abständen Biopsien des Transplantates entnommen, um eine etwaige Abstoßung rechtzeitig zu erkennen und durch Umstellung der Medikation evtl. entgegenwirken zu können. Die lebenslange Immunsuppression erhöht das Risiko für Infektionen und Neoplasien, und führt nicht selten zu Nierenschäden. Eine akute Abstoßung ist mittlerweile durch Immunsuppressiva gut kontrollierbar, mit längerer Überlebensdauer der Transplantate treten aber vor allem die Nebenwirkungen der Immunsuppressiva und die Ausbildung der TxA in den Vordergrund, auf die ausführlich im nächsten Abschnitt eingegangen wird.

## 2.2.3 Transplantat-Arteriosklerose

### 2.2.3.1 Mechanismen

Immunologisch	Nicht immunologisch
Histokompatibilität	Ischämie/Reperfusion
akute Abstoßungsepisoden	Cytomegalovirusinfektion
Zellulär: Makrophagen T-Zellen DCs	Hypertonie, Hyperlipidämie, Hyperhomocysteinämie, Diabetes mellitus, Adipositas
Humoral: Alloantikörper	Spenderalter und -geschlecht
Zytokine	Hirntod

Tab. 1: Risikofaktoren für Transplantat-Arteriosklerose [7, 8]

Bei der TxA, der Hauptmanifestation der chronischen Abstoßung, spielen zahlreiche Faktoren eine wichtige Rolle. Zwei Hauptfaktoren, die zu einer Endothelaktivierung führen sind der Gehirntod des Spenders [22] und die Folgen der kalten Ischämie/Reperfusion während und unmittelbar nach der Transplantation [23]. Während des Gehirntodes kann die massive Freisetzung verschiedenster Entzündungsmediatoren, akuter Phase Proteine und Catecholamine zu einer Hypoperfusion des zu transplantierenden Organs führen, auch wenn die sonstige Umgebung normotensiv ist [24]. Weiterhin kann eine hohe Konzentration zirkulierender Catecholamine eine massive Gefäßverengung verursachen, welche bereits vor der Transplantation zu Kontraktionsbandnekrose und zur Verletzung des glatten Muskels in der Media der Allograft Arterien führt [24, 25]. Die Ischämie/Reperfusionsverletzung kann diese Effekte noch verstärken, indem die Expression von Spender MHC Molekülen auf dem Endothel der Spender Koronarien hochreguliert wird, wodurch die Immunogenität des Transplantates zunimmt [26, 27]. Auf zellulärer Ebene wird durch den Endothelschaden eine Reihe von Mechanismen mit dem Ziel der Gefäßreparatur aktiviert. Es werden z.B. Entzündungszellen angezogen, die verschiedenste Wachstumsfaktoren (z.B. PDGF) freisetzen können,

wodurch die Proliferation von glatten Muskelzellen gefördert wird [28]. Diese inflammatorischen Infiltrate und Mediatoren können zu einer gesteigerten Bildung von endothelialen Alloantikörpern führen [28]. Aktivierte Endothelzellen erhalten die Fähigkeit den Empfänger T-Zellen Alloantigene zu präsentieren. Auf diese Weise kann die Endothelaktivierung Autoreaktivität vermitteln und indirekt zur Steigerung der gegen den Spender gerichteten Alloantworten beitragen [7].

Kardiovaskuläre Risikofaktoren haben tiefgreifende Auswirkungen auf die ordnungsgemäße Funktion des Endothels. Zum Beispiel spielen Low density Lipoprotein (LDL) bzw. oxidiertes LDL bei Ereignissen in einer frühen Phase der Plaque-Bildung eine Rolle, z.B. die Aktivierung von Transkriptionsfaktor nuclear factor kappa B (NF $\kappa$ B). Hierdurch kommt es zur Produktion von inflammatorischen Cytokinen (z.B. TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ) und zur Expression von Adhäsionsmolekülen (z.B. ICAM-1, PECAM, P-Selektin). Eine endotheliale Dysfunktion schreitet in den meisten Fällen einer TxA voran und in einigen Studien wurde sie als Marker benutzt, um die Entstehung von TxA möglichst früh zu entdecken [29-31]. Die Verdickung der koronaren Intima bei TxA wird in den Anfangsstadien von einer Ausweitung der externen elastischen Membran begleitet, ein Vorgang, der zum Ziel hat, ein gewisses Gefäßlumen zu erhalten. In der darauf folgenden Zeit gehen die Reserven dieser Membran immer mehr verloren [32]. Diese kompensatorische Gefäßerweiterung als Versuch das Lumen zu erhalten wird nach ihrem Entdecker „Glagov Phänomen“ genannt und kann zur Unterschätzung der koronaren Gefäßverengung führen [33]. TxA formt in den frühen Stadien auch atheromatöse Plaques. Aber die innere elastische Membran ist nur selten gebrochen und Calcium wird ebenfalls nur selten abgelagert. Typischerweise werden keine Kollateralgefäße ausgebildet [34]. Die zellulären Elemente der Plaques in der chronischen Abstoßung sind hauptsächlich SMC, Makrophagen und T-Zellen. Durch die Präsentation fremder Antigene des transplantierten Organs ist eindeutig auch eine immunogene Genese vorhanden [35]. Bei der TxA wandern alloreaktive CD4<sup>+</sup> T-Effektorzellen vom TH1-Typ in die Gefäßwände ein und stimulieren dort durch freigesetzte Cytokine Makrophagen und Endothelzellen. Durch die Sezernierung von Chemokinen wie z.B. RANTES (regulated on activation, normal T cell expressed and secreted) durch die T-Effektorzellen wandern weitere Monozyten ein und differenzieren zu Makrophagen, welche Tumor Nekrose Faktor Alpha (TNF- $\alpha$ ), IL1 und chemotaktisches Monozyten Protein 1 (MCP-1) sezernieren, was zu einer weiteren Mobilisierung von

Makrophagen führt. Hierdurch wird die Expression von Adhäsionsmolekülen im Endothel stimuliert. Es entsteht eine chronische Entzündung der Gefäßwand, die durch Fibrosierung und Vernarbung allmählich zu einer Gefäßstenose führt und sich als Koronararteriosklerose manifestiert. Diese bedingt letztendlich das terminale Organversagen [15]. Betroffen ist primär die Intima. Abhängig von der Progression der Erkrankung in der Intima nimmt die Fibrose auch in der Media zu. Es können sogar Venen betroffen sein [36].

### **2.2.3.2 Das Endothel**

Die Endothelzellen regulieren den Gefäßtonus und verhindern lokale Thrombose, indem sie Gewebe Plasminogen Aktivator produzieren. Dieser sorgt dafür, dass die Endotheloberfläche negativ geladen bleibt. Außerdem sezerniert das Endothel weitere Substanzen, die einer Thrombozytenaggregation bzw. einer Entzündungsreaktion entgegen wirken, nämlich Heparane, Stickstoffmonoxid (NO) und Thrombomodulin [36]. Weiterhin reagiert das Endothel einer Arterie auf Fließ- und Scherkräfte mit Aktivierung der endothelialen Stickstoff-Synthetase (eNOS), wodurch über NO-Produktion eine Gefäßerweiterung induziert wird. Außerdem hat NO inhibitorische Effekte auf Leukozyten-Adhäsion, Thrombozytenaggregation, proinflammatorische Cytokin-Produktion, neutrophile Superoxid-Produktion und SMC Proliferation [36]. Somit können zahlreiche Veränderungen im Endothel zu einem „prokoagulatorischen Status“ führen: Eine verminderte Sekretion von Gewebe Plasminogen Aktivator, vermehrte Sekretion von Plasminogen Aktivator Inhibitor, Aktivierung und gesteigerte Reaktivität von Thrombozyten, lokale Produktion von *tissue factor* und eine Exposition von Collagen [36]. Bei TxA dienen Endothelzellen sowohl als Stimulatoren als auch als Zielzellen für allogene Lymphozyten.

### **2.2.3.3 Thrombozyten in der chronischen Abstoßung**

Die Thrombozyten oder Blutplättchen von Mäusen reagieren bezüglich der Aktivierung mit dem Plättchenagonisten Adenosin-Di-Phosphat (ADP) sehr ähnlich wie die von Menschen [37]. Mäuse-Thrombozyten bilden Aggregate mit sich selbst und mit Leukozyten, wenn sie *in vitro* durch Zugabe von Arachidonsäure, Thrombin, Collagen oder ADP aktiviert werden. Sie besitzen genau wie die Thrombozyten des Menschen den Lipogenase- und Cyclooxygenase-Wirkungsweg, und produzieren Thromboxan. Aufgrund dieser Ähnlichkeiten im Aggregationsverhalten der

Thrombozyten sind die Blutplättchen der Maus als Model für die Untersuchung des Aggregationsverhalten von humanen Thrombozyten sehr gut geeignet [38].

ADP wird von verletzten Blutgefäßen, roten Blutzellen und von aktivierten Thrombozyten freigesetzt und induziert die Blutplättchenaggregation durch die Aktivierung von Integrin IIa/IIIb und der darauf folgenden Bindung von Fibrinogen. Durch die Freisetzung von ADP aus den aktivierten Blutplättchen wird die Wirksamkeit vieler Plättchenaktivatoren noch potenziert [39, 40].

Die zu transplantierenden Organe weisen bei der Transplantation unterschiedliche Grade von Endothelschäden mit interzellulären Spalten oder partiellem Verlust von Zellen auf. Diese Stellen werden im Rahmen der Reparaturmechanismen mit Thrombozyten bedeckt [36]. Die Adhäsion von Leukozyten an Blutplättchen führt zur Bildung von Plättchen-Leukozyten-Aggregaten (PLA). Diese PLA lagern sich an einer Stelle mit Gefäßverletzung an, ein Prozess, der einen wichtigen Mechanismus darstellt, durch den Leukozyten zur Thrombose und Thrombozyten zur Entzündung beitragen können [41, 42]. Die Thrombozytenaktivierung im Rahmen eines thrombotischen Ereignisses beginnt mit der Interaktion von Adhäsionsmolekülen auf der Oberfläche von Thrombozyten mit extrazellulären Matrix-Bestandteilen. Diese Interaktion von extrazellulären Matrixproteinen wie z. B. von Willebrand Faktor (vWF) und Collagen mit den Blutzellen initiiert die Thrombozytenadhäsion an das Endothel und leitet damit die Bildung eines Thrombus ein. Dieser Prozess wird weiter verstärkt durch  $\alpha$ -Thrombin und Thromboxane A<sub>2</sub>, die beide in stimulierten Thrombozyten produziert werden, sowie durch ADP. Neben diesen Faktoren wirkt auch Epinephrin stimulierend [43]. Eine Thrombusbildung wird normalerweise von intakten, nicht aktivierten Endothelzellen verhindert, kann aber zum Beispiel durch das Aufbrechen eines Plaques und bei entzündeten Endothelzellen auftreten [44]. vWF wird konstitutiv auf dem Endothel exprimiert, in  $\alpha$ -Granula von Thrombozyten und in subendotheliale Bindegewebe. Seine Hauptaufgabe ist es an andere Proteine zu binden, v. a. an Gerinnungsfaktor VIII und er ist wichtig bei der Thrombozyten Adhäsion an subendotheliale Strukturen bei Gefäßverletzungen über Glykoprotein Ib (GPIb). Auch bindet er an andere Thrombozyten Rezeptoren, wenn sie z.B. durch Thrombin aktiviert werden. Es wird angenommen, dass vWF zusätzlich zu P-Selektin und GPIb ein wichtiges Molekül ist, das Thrombozyten an Stellen, die für Arteriosklerose anfällig sind, lockt und diese Thrombozyten aktiviert [45].

Aktivierete Thrombozyten können eine Vielzahl von entzündlichen Faktoren wie P-Selektin [46] und *platelet derived growth factor* (PDGF) [47] aus ihren Granula freisetzen, die Monozyten, Granulozyten und Endothelzellen aktivieren. Diese Aktivierung trägt wiederum zur Pathologie vieler systemischer Entzündungsantworten, wie der TxA, bei [7, 13]. Die Identifikation aktivierter Thrombozyten anhand der Expression des Adhäsionsmolekül P-Selektin (CD62P) an ihrer Oberfläche, wurde erstmals von Fitzgerald et al. in peripherem Blut von Patienten mit instabiler Koronarerkrankung durchgeführt [48]. Seither wird CD62P als Marker für Thrombozyten-Aktivierung angesehen [49-51]. Unter den Leukozyten sind es vor allem Monozyten und polymorphkernige neutrophile Zellen, die mit Glykoprotein ligand 1 an aktivierte Thrombozyten über deren P-Selektin binden. P-Selektin wird in den Granula der Blutplättchen konstitutiv exprimiert, und wird an die Thrombozyten-Oberfläche transportiert, sobald eine Stimulation mit Plättchen Agonisten wie z.B. ADP erfolgt. Durch die Interaktion mit von Thrombozyten stammendem P-Selektin wird die Transkription von *tissue factor* induziert und der Transkriptionsfaktor NF $\kappa$ B mobilisiert, welcher die Expression von TNF- $\alpha$  und chemotaktischem Monozyten Protein 1 (MCP-1) induziert [52].

PDGF ist der Hauptwachstumsfaktor in Thrombozyten, der Migration und Proliferation von glatten Muskelzellen stimuliert und Intima Proliferation triggert. Während der Thrombozytenaggregatbildung wird er in das Serum abgegeben, woraufhin Fibroblasten mit der Zellreplikation beginnen, welche zur „Wundheilung“ führt. Außerdem wirkt PDGF chemotaktisch und aktivierend auf Monozyten. Gewöhnliche Makrophagen und solche Makrophagen, die LDL eingelagert haben und deshalb „Schaumzellen“ genannt werden, produzieren während des Fortschreitens der Arteriosklerose ebenfalls PDGF. Ein entzündlicher Stimulus auf das Endothel vermittelt eine vermehrte Produktion und Abgabe des Integrin-Liganden Interzelluläres Adhäsions Molekül 1 (ICAM-1). Folglich kann lösliches ICAM-1 eine entzündliche Irritation und die Kapazität des Endothels mit aktivierten Leukozyten zu interagieren reflektieren [53].

Thrombozytenadhäsion an intakten Endothelzellen wird durch einen Mechanismus vermittelt, der aus lockerer Plättchen-Adhäsion und anschließender Aktivierung, genannt „Rolling“ entlang des Endothel und nachfolgender festen Adhäsion an die Gefäßwand besteht. Die wichtigsten zwei Rezeptorengruppen stellen hier die Selektine und Integrine dar. Erstere vermitteln die lockere Anheftung an das



Adhäsionsmolekülen, und proinflammatorischen Cytokinen/Chemokinen mündet [56, 57]. Nachdem die Thrombozyten an der Gefäßwand haften, treiben sie die Entzündungsreaktion voran, indem sie Mediatoren ausschütten wie beispielsweise *platelet activating factor* (PAF) und *macrophage inflammatory protein* (MIP-1 $\alpha$ ). Außerdem stimulieren sie die Proliferation glatter Muskelzellen mit Hilfe von dem transformierenden Wachstumsfaktor (TGF- $\beta$ ), PDGF und Serotonin [58]. Die Sekretion von Matrix Metalloproteinase 2 (MMP-2) durch die Aggregatbildung von aktivierten Blutplättchen trägt wahrscheinlich zusätzlich zur Veränderung der extrazellulären Matrix bei [59, 60].

## **2.3 Clopidogrel (Plavix<sup>®</sup>)**

Clopidogrel (Plavix<sup>®</sup>), ein Mitglied der Gruppe der Thienopyridine, ist mittlerweile zu einem wichtigen Therapeutikum für Patienten mit koronarer Herzkrankheit geworden [61, 62]. Es vermindert sowohl die Inzidenz von Stent-Thrombosen der Koronararterien als auch weitere Herzinfarkte und ggf. Schlaganfälle bei diesen Patienten [62]. Clopidogrel verhindert die Aggregation von Blutplättchen indem es den ADP-Rezeptor P2Y<sub>12</sub> [39, 63] auf Thrombozyten nicht-kompetitiv und irreversibel blockiert [64].

### **2.3.1 Der Rezeptor P2Y<sub>12</sub> und sein Wirkmechanismus**

Der Rezeptor P2Y<sub>12</sub> wird ausschließlich im Gehirn, auf Megakaryozyten und auf Thrombozyten exprimiert [39] und ist an verschiedenen entscheidenden Schritten der Thrombusbildung beteiligt. Er beeinflusst die Thrombozytenadhäsion und deren Aktivierung, sowie Thrombuswachstum und dessen Stabilität. Er bindet an ADP, welches von verletzten Blutgefäßen, Erythrozyten und aktivierten Thrombozyten produziert wird [39], und ist einer der Hauptregler der Thrombozytenaktivierung [65]. Mäuse, die diesen Rezeptor nicht besitzen, laufen bei der Verletzung eines Blutgefäßes nicht Gefahr, dass dasselbige durch Thrombusformation verschlossen wird [66]. Der P2Y<sub>12</sub>-Rezeptor gehört zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Wird er stimuliert, dann aktiviert er zwei intrazelluläre Signalwege, die entweder zu Zellproliferation oder zu Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts führen. P2Y<sub>12</sub> agiert hauptsächlich als Coaktivator für die meisten Plättchenagonisten und steigert deren stimulatorischen Effekt auf weitere Thrombozyten durch seine eigene

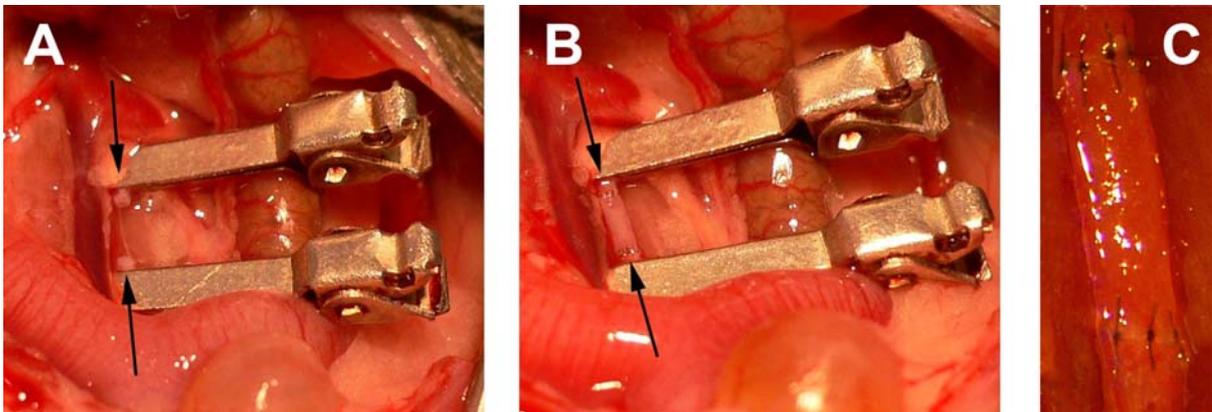
Aktivierung [67, 68]. ADP ist ein solcher Plättchenagonist und arbeitet über den P2Y<sub>12</sub>-Rezeptor durch den Gi-Signalweg, um anschließend die Adenylyl-Cyclase, welche für die Herstellung von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) aus Adenosintriphosphat (ATP) gebraucht wird, in den Thrombozyten zu inhibieren [69]. Der P2Y<sub>12</sub>-Rezeptor wirkt nicht nur durch die Herunterregulierung der Adenylyl-Cyclase proaggregatorisch [70]. Andere mögliche Wege von größerer Wichtigkeit werden über diesen Rezeptor beeinflusst und tragen zur ADP-vermittelten Thrombozytenaggregation bei [71]. Die ADP-vermittelte Aktivierung des GP-IIb/IIIa-Rezeptorkomplexes wird ebenfalls verhindert, welche für die Thrombozytenvernetzung durch Fibrinogen nötig ist. Zusätzlich zu dem P2Y<sub>12</sub>-Rezeptor ist die Aktivierung eines weiteren Rezeptors nötig, um eine ADP induzierte Plättchenaggregation zu bewirken, nämlich die Aktivierung von P2Y<sub>1</sub> [72-74].

### **2.3.2 Der Metabolit von Clopidogrel**

Bei Clopidogrel handelt es sich um eine so genannte „Prodrug“, die *in vitro* inaktiv ist und *in vivo* in der Leber durch Oxidation und anschließende Hydrolyse zum aktiven Metaboliten biotransformiert wird [64]. Dieser labile aktive Metabolit enthält eine freie Thiolgruppe, welche den P2Y<sub>12</sub> Rezeptor auf durch die Leber passagierenden Thrombozyten inaktiviert, indem sie Disulfid-Brücken mit zwei freien extrazellulären Cystein-Resten bildet [64, 75-77]. Beide oben genannte Effekte, sowohl die Zellproliferation als auch die Reorganisation des Cytoskeletts, werden durch den aktiven Metaboliten von Clopidogrel blockiert, da dieser Wirkstoff ein spezifischer Antagonist von P2Y<sub>12</sub> ist [65]. Damit kann ADP nicht mehr an die Thrombozyten binden, und somit ist die Aktivierung weiterer Blutplättchen und deren Aggregatbildung durch ADP verhindert. Durch die irreversible Bindung von Clopidogrel werden nach Absetzen des Medikamentes ca. 5-7 Tage benötigt, um die Thrombozytenfunktion durch Plättchenneubildung wieder herzustellen [76]. Es erscheint unwahrscheinlich, dass der klinische Nutzen dieses Arzneistoffs ausschließlich darauf beruht, die ADP-vermittelte Thrombozytenaggregation zu vermindern. Deshalb werden andere mögliche Mechanismen diskutiert, z.B. dass eine Thrombozyten-vermittelte Entzündungsreaktion eine Rolle spielen könnte [63].

## 2.4 Ziel der Studie

Ziel der Studie war es zu untersuchen, ob eine Monotherapie mit Clopidogrel (Plavix<sup>®</sup>, Sanofi-Synthelabo, Berlin, Germany) in einer signifikanten Verringerung der TxA resultiert. Clopidogrel wird derzeit ausschließlich bis zu sechs Monate nach Stentimplantation verwendet, um eine Thrombosierung des Stents zu verhindern. Als experimentelles Modell wurde die abdominelle Aortentransplantation in der Maus verwendet. Dieses Modell weist ähnliche Gefäßläsionen auf wie sie in humanen, von TxA betroffenen, Koronararterien vorkommen. Zusätzlich ist eine präzise Analyse des zellulären Infiltrates möglich.



**Abb. 4: Aortentransplantation nach Koulak.**

A) OP-situs im Mausabdomen, die infrarenale Empfängeraorta ist durchtrennt und geklemmt. B) Fertiggestellte Transplantation, die Pfeile markieren die Anastomosen. C) Vergrößerte Darstellung der Anastomosen zwischen dem Transplantat und den Empfänger-Aorten-Stümpfen.

Die durchgeführten Untersuchungen sollten zeigen, ob die Liste der Indikationen für dieses Medikament um die Anwendung nach einer Organtransplantation zur Reduzierung der TxA oder langfristig evtl. auch für alimentär-induzierte Arteriosklerose erweiterbar ist, und damit einer großen Anzahl von Patienten helfen könnte.

# Clopidogrel reduces the development of transplant arteriosclerosis

Silke Abele,<sup>a</sup> Michael Weyand, MD,<sup>a</sup> Martina Wollin,<sup>a,b</sup> Nicola E. Hiemann, MD,<sup>c</sup> Frank Harig, MD,<sup>a</sup> Teddy Fischlein, MD,<sup>a</sup> and Stephan M. Ensminger, MD, DPhil<sup>a</sup>

**Background:** Transplant arteriosclerosis, the hallmark feature of chronic rejection, is still the major limiting factor for the long-term success of heart transplantation. Platelets have been implicated to play a role in the pathogenesis of this disease. Therefore the aim of this study was to investigate whether platelet inhibition alone has a positive effect on the development of transplant arteriosclerosis.

**Methods:** Fully major histocompatibility complex–mismatched C57BL/6 (H2<sup>b</sup>) donor aortas were transplanted into CBA (H2<sup>k</sup>) recipients, and mice received different doses (1, 10, and 20 mg/kg) of clopidogrel or control saline as a daily intraperitoneal injection for 30 days. Blood was analyzed on days 2, 7, 14, and 30 by using a platelet aggregation test (adenosine diphosphate) for effectiveness of the treatment. Grafts were analyzed by means of histology and morphometry on day 30 after transplantation.

**Results:** When mice were treated daily with 1 mg/kg clopidogrel in the absence of any other immunosuppression, transplant arteriosclerosis was significantly reduced compared with that seen in saline-treated control animals (intimal proliferation of 66% ± 9% [1 mg/kg clopidogrel] vs 77% ± 5% [control], n = 7, *P* ≤ .03). Daily application of 10 mg/kg and 20 mg/kg clopidogrel also significantly reduced the development of transplant arteriosclerosis compared with that seen in control animals (intimal proliferation of 61% ± 11% [10 mg/kg clopidogrel] vs 54% ± 10% [20 mg/kg clopidogrel] vs 77% ± 5% [control], n = 8, *P* ≤ .003). There was, however, no additional beneficial effect when compared with mice treated with 1 mg/kg clopidogrel (*P* = .06). Isografts did not show any signs of vascular lesions on day 30 after transplantation.

**Conclusion:** These results demonstrate that monotherapy with clopidogrel can effectively reduce the formation of transplant arteriosclerosis in a murine aortic allograft model.

From the Department of Cardiac Surgery<sup>a</sup> and the Department of Medicine III, Institute for Clinical Immunology,<sup>b</sup> Friedrich-Alexander University Erlangen-Nuernberg, Erlangen, Germany, and the Department of Cardiothoracic Surgery,<sup>c</sup> Deutsches Herzzentrum, Berlin, Germany.

Supported by grants from the ELAN-Fonds and the IZKF of the University of Erlangen-Nuernberg and the ADUMED-Stiftung.

Received for publication Sept 20, 2005; revisions received Dec 6, 2005; accepted for publication Jan 13, 2006.

Address for reprints: Stephan M. Ensminger, MD, DPhil, Department of Cardiac Surgery, Friedrich-Alexander University Erlangen-Nuernberg, Krankenhausstrasse 12, 91054 Erlangen, Germany (E-mail: stephan.ensminger@herz.imed.uni-erlangen.de).

J Thorac Cardiovasc Surg 2006;131:1161-6  
0022-5223/\$32.00

Copyright © 2006 by The American Association for Thoracic Surgery

doi:10.1016/j.jtcvs.2006.01.010

**T**ransplant arteriosclerosis, the hallmark feature of chronic rejection, is still the leading cause of late mortality and limits the long-term success of heart transplantation.<sup>1</sup> It is characterized by a diffuse and progressive thickening of the arterial intima that affects minor, as well as major, coronary arteries of transplanted cardiac allografts.<sup>2,3</sup> This results in sudden or chronic progressive ischemic damage to the transplanted heart, with subsequent organ failure. As the transplanted heart is denervated, the first clinical manifestations of transplant arteriosclerosis might be progressive heart failure, ventricular arrhythmia, or sudden cardiac death. Transplant arteriosclerosis is diffuse and frequently involves long segments of the affected arteries. In contrast to ordinary arteriosclerosis, which usually affects one part of the artery more severely than other parts and produces prominent lesions, transplant arteriosclerosis is characterized by concentric intimal thickening.<sup>2,3</sup>

**Abbreviations and Acronyms**

ADP = adenosine diphosphate  
 CD40L = CD40 ligand  
 PDGF = platelet-derived growth factor

Numerous pathogenetic mechanisms have been suggested to be involved in the development of transplant arteriosclerosis, including immune-mediated vascular injury, inflammation of the vascular endothelium, ischemia-reperfusion injury, cytomegalovirus infection, and metabolic risk factors.<sup>2,3</sup> The role of platelets during the development of ordinary arteriosclerosis is meanwhile established,<sup>4,5</sup> and interactions of platelets with the endothelium induce significant changes in the adhesive and chemotactic properties of endothelial cells that trigger monocyte adhesion and transmigration. This results in early inflammation during the process of arteriosclerosis within the vessel wall,<sup>6,7</sup> and therefore recent interest has focused on the involvement of platelets in the pathogenesis of transplant arteriosclerosis. While comparing the results of intracoronary ultrasonographic examinations and platelet analyses from patients undergoing heart transplantation, Fateh-Moghadam and colleagues<sup>8</sup> showed that platelet activation by increased expression of ligand-induced binding site 1 was strongly associated with the development and progression of transplant arteriosclerosis. In a similar study Hognestad and associates<sup>9</sup> could demonstrate an enhanced expression of P-selectin, CD63, and soluble CD154 by platelets from patients undergoing heart transplantation severely affected by transplant arteriosclerosis.

Clopidogrel, a member of the thienopyridines, has become an important therapeutic agent for patients with coronary heart disease<sup>10,11</sup> and has been shown to decrease the incidence of coronary artery stent thrombosis and to reduce myocardial infarction, stroke, and vascular death within these patients.<sup>11</sup> It inhibits platelet activation by blocking an adenosine diphosphate (ADP) receptor on platelets, recently designated P2Y<sub>12</sub>.<sup>12,13</sup> Clopidogrel is inactive in vitro and requires hepatic metabolism for production of its active metabolite, which has also been identified recently.<sup>14</sup> It seems unlikely that the clinical benefit of this drug can be adequately explained by its ability to decrease ADP-induced platelet aggregation alone, suggesting that other not yet defined mechanisms, such as a platelet-mediated inflammatory reaction, might play a role.<sup>13</sup>

This study tested the hypothesis as to whether treatment with clopidogrel (Plavix, Sanofi-Synthelabo, Berlin, Germany) alone results in a significant reduction of transplant arteriosclerosis. Mouse abdominal aortic allografts were used as the experimental model because they have been shown to represent vascular lesions similar to those ob-

served in human coronary arteries that are affected by transplant arteriosclerosis and therefore allow a precise analysis of the composition of the vascular lesions.<sup>15</sup>

**Materials and Methods****Animals**

C57BL/6 (H2<sup>b</sup>) and CBA.J (H2<sup>k</sup>) mice were originally purchased from Charles River (Sulzbach, Germany). C57BL/6 (H2<sup>b</sup>) mice were used as donors, and CBA.J (H2<sup>k</sup>) mice were used as recipients of the aortic allografts. All mice used in this study were aged between 6 and 12 weeks at the time of experimental use and were bred and maintained at the animal facility of the Department of Experimental Surgery at the University of Erlangen-Nuernberg under specific pathogen-free conditions and treated in accordance with institutional and state guidelines.

**Treatment Protocol**

Clopidogrel (Plavix) was obtained from the local hospital pharmacy, and 75-mg tablets were dissolved in 0.9% saline under sterile conditions. This solution was then diluted appropriately in the following concentrations: group 1, 1 mg/kg clopidogrel equivalent of a human daily dose; group 2, 10 mg/kg clopidogrel; and group 3, 20 mg/kg clopidogrel. Daily treatment with clopidogrel was started immediately after transplantation for 30 days. Because dissolved clopidogrel is unstable,<sup>14</sup> the clopidogrel solution was freshly prepared every day and injected intraperitoneally immediately after preparation. The overall injection volume was 0.5 mL for each treatment group.

**Platelet Aggregation**

For ex vivo platelet aggregation, blood was collected in 3.2% citrate. Approximately 0.5 mL of blood could be obtained from each mouse, and samples were immediately processed after blood drawing. Platelet aggregation was evaluated by means of optical aggregometry in citrated blood samples at 37°C by using a 2-channel Chronolog aggregometer Elvi Logos, Milan, Italy. Because mice have slightly more platelets compared with human subjects, for technical reasons, the amount of citrate within the test tubes was increased to 500  $\mu$ L of citrate (500  $\mu$ L citrate/500  $\mu$ L blood) for ex vivo platelet aggregation. Therefore in our setting even untreated control animals showed a relative reduction of platelet aggregation to about 50%. However, this did not affect absolute differences seen in platelet aggregation between the experimental groups. Platelet-rich and platelet-poor plasma was prepared from citrated whole blood by means of centrifugation (100g for 10 minutes). The final platelet count was adjusted to an average of  $2.5 \times 10^5$  platelets/mL with autologous plasma. Twenty microliters of ADP Sigma, St Louis, Mo; final concentration,  $2 \times 10^{-4}$  mol/L, respectively was added to induce platelet activation, and aggregation was recorded for at least 10 minutes. Maximal aggregation was mostly seen around 5 minutes and was used as a measurement of aggregation.

**Abdominal Aortic Transplantation**

The procedure was performed with a modified technique initially described by Koulack and coworkers.<sup>16</sup> In brief, the donor thoracic aorta was isolated, resected, and transferred to the recipient animal.

The recipient aorta was clamped and then transected with sharp microvascular scissors. A proximal end-to-end anastomosis was performed. The aortic graft was then repositioned, and the anastomosis was continued with single interrupted sutures.

### Analysis of the Aortic Graft

Aortic grafts were removed after achievement of anesthesia on days 14 and 30 after transplantation. Grafts were perfused with saline and were flash frozen in OCT medium (Tissue-Tek, Sakura, Netherlands) in liquid nitrogen for morphometric analysis of 5- $\mu\text{m}$  cryostat sections. A minimum of 10 transverse sections was analyzed from each graft.

### Morphometry

Five sections from each graft harvested at days 14 and 30 were stained with Elastin–van Gieson and analyzed by 2 independent examiners (S.A. and S.M.E.) blinded to the experimental conditions at an original magnification of 200 $\times$  using a conventional light microscope. A digitized image of each section was captured, and the areas within the lumen and the internal and external elastic lamina were circumscribed manually and measured as previously described.<sup>17</sup> All image analyses were carried out on a color display monitor with ANalysis Image Analysis software (Olympus, Hamburg, Germany).

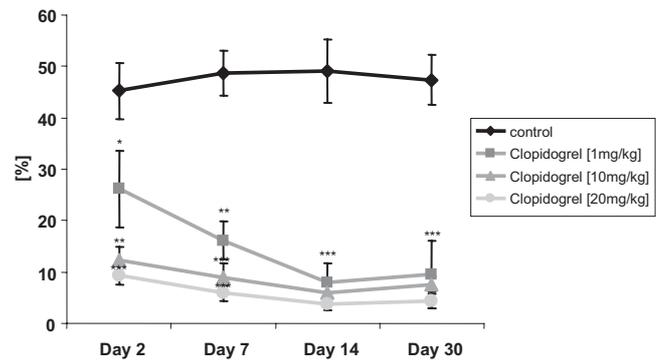
### Statistical Analysis

Results are given as the mean per group  $\pm$  standard deviation, which was derived from the mean per graft. The data were analyzed by using a 2-tailed unpaired Student *t* test.

## Results

### Platelet Aggregation Was Effectively Inhibited After Clopidogrel Administration

Ex vivo blood samples were harvested on days 2, 7, 14, 21, and 30 to evaluate the effect of clopidogrel on platelet function and to ensure sufficient platelet aggregation inhibition within the CBA/J recipient mice. Aggregation was determined by means of light transmittance aggregometry in response to ADP ( $2 \times 10^{-4}$  mol/L, Figure 1). Blood drawn from recipient mice treated with 1, 10, and 20 mg/kg clopidogrel showed significantly reduced platelet aggregation on day 2 ( $26\% \pm 7\%$  [1 mg/kg clopidogrel,  $n = 5$ ,  $P \leq .05$ ] vs  $12\% \pm 4\%$  [10 mg/kg clopidogrel,  $n = 5$ ,  $P \leq .03$ ] vs  $9\% \pm 3\%$  [20 mg/kg clopidogrel,  $n = 5$ ,  $P \leq .01$ ] vs  $45\% \pm 5\%$  [control]) and day 7 ( $16\% \pm 4\%$  [1 mg/kg clopidogrel,  $n = 5$ ,  $P \leq .03$ ] vs  $9\% \pm 2\%$  [10 mg/kg clopidogrel,  $n = 5$ ,  $P \leq .01$ ] vs  $4\% \pm 1\%$  [20 mg/kg clopidogrel,  $n = 5$ ,  $P \leq .001$ ] vs  $48\% \pm 4\%$  [control]) after transplantation (Figure 1). Application of 10 mg/kg and 20 mg/kg clopidogrel also significantly reduced platelet aggregation compared with 1 mg/kg clopidogrel on day 2 ( $12\% \pm 4\%$  [10 mg/kg clopidogrel,  $n = 5$ ,  $P \leq .05$ ] vs  $9\% \pm 3\%$  [20 mg/kg clopidogrel,  $n = 5$ ,  $P \leq .03$ ] vs  $26\% \pm 7\%$  [1 mg/kg clopidogrel]) and day 7 ( $9\% \pm 2\%$  [10 mg/kg clopidogrel,  $n = 5$ ,  $P \leq .05$ ] vs  $4\% \pm 1\%$  [20 mg/kg clopidogrel,  $n =$

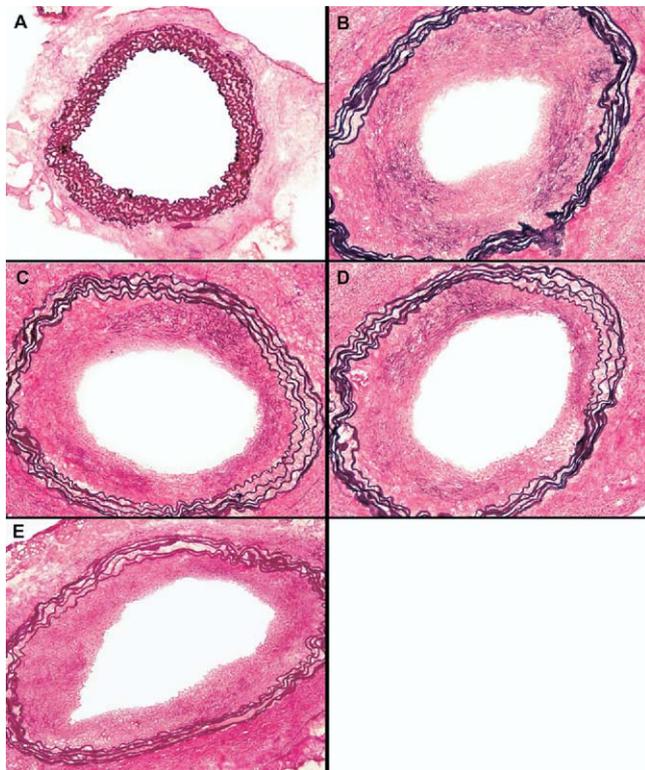


**Figure 1.** Effect of clopidogrel on adenosine diphosphate (ADP)–induced platelet aggregation in mice after transplantation. Platelet aggregation was studied after stimulation with ADP ( $20 \mu\text{mol/L}$ ) by means of light transmittance aggregometry. \* $P < .05$  versus untreated control animals, \*\* $P < .03$  versus untreated control animals, \*\*\* $P < .01$  versus untreated control animals ( $n = 5$  animals per group).

5,  $P \leq .03$ ] vs  $16\% \pm 4\%$  [1 mg/kg clopidogrel]; Figure 1). From day 14 onward, platelet aggregation in all groups was significantly inhibited compared with that seen in untreated control animals, and there were no differences between 1, 10, and 20 mg/kg clopidogrel (Figure 1). Blood from untreated control animals showed unimpaired platelet function throughout all time points (Figure 1).

### Clopidogrel Significantly Reduced the Development of Transplant Arteriosclerosis

A total of 58 transplantations were performed for this study, with an overall complication rate of 6.8%, the most frequent complication being thrombosis of the aortic graft ( $n = 3$ ) and one late recipient death caused by other courses. Aortic allografts (C57BL/6 [H-2b]) from recipients (CBA/J [H-2<sup>k</sup>]) were analyzed 30 days after transplantation, the time point at which distinctive changes of transplant arteriosclerosis are most evident.<sup>18</sup> When recipient mice were treated daily with 1 mg/kg clopidogrel in the absence of any other immunosuppression, transplant arteriosclerosis was significantly reduced compared with that seen in untreated control animals (intimal proliferation of  $66\% \pm 9\%$  [1 mg/kg clopidogrel] vs  $77\% \pm 5\%$  [control],  $n = 8$ ,  $P \leq .03$ ; Figures 2, B and C, and 3). Daily application of 10 mg/kg and 20 mg/kg clopidogrel also significantly reduced the development of transplant arteriosclerosis compared with that seen in untreated control animals (intimal proliferation of  $61\% \pm 11\%$  [10 mg/kg clopidogrel,  $n = 8$ ,  $P \leq .003$ ] vs  $54\% \pm 10\%$  [20 mg/kg clopidogrel,  $n = 8$ ,  $P \leq .001$ ] vs  $77\% \pm 5\%$  [control]; Figures 2, D and E, and 3). However, there was no additional beneficial effect when compared with mice treated with 1 mg/kg clopidogrel ( $P = .06$ ,



**Figure 2.** Histopathologic evaluation of the morphology of untreated fully allogeneic C57BL/6 aortic grafts implanted into CBA recipients showed high levels of intimal proliferation (B), whereas C57BL/6 aortic grafts of recipients treated with 1 mg/kg clopidogrel (C), 10 mg/kg clopidogrel (D), and 20 mg/kg clopidogrel (E) showed significantly reduced intimal proliferation 30 days after transplantation. Syngeneic control animals did not show any vascular lesions (A). The tissue was snap-frozen, and sections were stained with Miller’s Elastin–van Gieson stain. (Original magnification 200×.)

Figure 3). Syngeneic control grafts (C57BL/6 [H2<sup>b</sup>] into C57BL/6 [H2<sup>b</sup>] recipients) did not show any signs of transplant arteriosclerosis at 30 days after transplantation, indicating that nonimmunologic mechanisms alone were not sufficient to initiate the development of transplant arteriosclerosis in this model (Figure 2, A). None of the recipient mice showed any kind of hemorrhage or major postoperative bleeding.

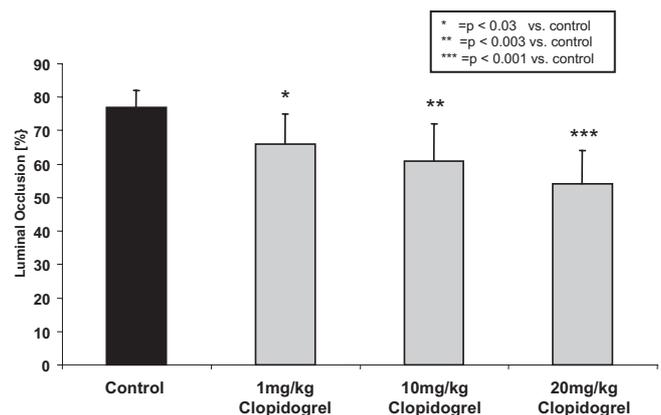
**Discussion**

The development of transplant arteriosclerosis in cardiac allografts is a multifactorial process, with macrophages, T cells, proinflammatory cytokines, adhesion molecules, growth factors, and alloantibodies implicated in both the initiation and progression of this chronic inflammatory process.<sup>3,19</sup> It is well established nowadays that platelets play an important

role in thrombus formation and atherogenesis, but several studies suggest that these cells might also play an important role in inflammation.<sup>6,20</sup>

This study demonstrates that (1) treatment with different doses of clopidogrel significantly inhibited platelet aggregation in a murine aortic allograft model, (2) that monotherapy with clopidogrel significantly reduced the development of transplant arteriosclerosis in the absence of any additional immunosuppression, and (3) that there was no significant beneficial effect when the daily clopidogrel dose was increased. The level of reduction of intimal proliferation by clopidogrel was as effective as anti-CD8<sup>+</sup> T-cell depletion.<sup>17</sup> These findings imply that circulating platelets in recipients with aortic transplants might contribute to the development of transplant arteriosclerosis.

Three different treatment groups (1, 10, and 20 mg/kg) were examined to find the most effective dose of clopidogrel for the prevention of transplant arteriosclerosis. Administration of 1 mg/kg clopidogrel, the equivalent of a human daily dose, already showed a strong platelet aggregation inhibitory effect and resulted in a significant reduction of transplant arteriosclerosis. Kinetic analysis revealed that higher doses of clopidogrel caused a more rapid inhibition of platelet aggregation but failed to prove an additional therapeutic effect. These results imply that reduction of the development of transplant arteriosclerosis by clopidogrel might not be entirely due to its ability to decrease ADP-induced platelet aggregation, suggesting that additional immunomodulatory effects, such as a platelet-mediated inflammatory reaction, might play a role.<sup>13</sup>



**Figure 3.** For the morphometric analysis of the degree of intimal thickening, Miller’s Elastin–van-Gieson–stained sections were used. Areas within the lumen and the internal and external elastic lamina were circumscribed manually and measured. From these measurements, a quotient for the thickness of the intima ( $Q_{int}$ ) was calculated.  $Q_{int}$  indicates the relative thickness (in percentage) of the intima. Five measurements from different areas of each aortic graft were obtained for this analysis. (n = 8 animals per group, P values as indicated in the diagram).

Activated platelets are able to release a number of inflammatory compounds from their granules, such as P-selectin<sup>21</sup> and platelet-derived growth factor (PDGF),<sup>22</sup> that can activate monocytes, granulocytes, and endothelial cells, all contributing to a systemic inflammatory response in various pathologic conditions, such as transplant arteriosclerosis.<sup>3,19</sup> In addition, platelets can induce enhanced surface expression of adhesion receptors, such as intercellular adhesion molecule 1<sup>23</sup> and E-selectin<sup>24</sup> on endothelial cells that mediate adhesion and transmigration of leukocytes, an essential step during the development of transplant arteriosclerosis.<sup>25</sup> Furthermore, activated platelets contain high levels of intracellular soluble CD40 ligand (CD40L).<sup>6</sup> Most of these molecules have been shown to be involved in the pathogenesis of transplant arteriosclerosis.

Experimental data from carotid artery allografts have demonstrated that intracellular adhesion molecule 1 plays a critical role through modulation of leukocyte adhesion and infiltration into the vessel wall.<sup>26</sup> During chronic rejection in a murine heterotopic cardiac allograft model, the intensity of arterial intimal thickening was significantly correlated with the intensity of P-selectin expression on endothelial cells, and therefore a crucial role for P-selectin in the pathogenesis of transplant arteriosclerosis by augmenting immune-mediated injury was concluded.<sup>27</sup> In addition, Lemstrom and associates<sup>28</sup> showed that suppression of PDGF expression inhibited the development of transplant arteriosclerosis through regulation of cell migration and proliferation. Finally, the importance of CD40L-CD40 interaction during the development of transplant arteriosclerosis has been highlighted in numerous experimental studies.<sup>29,30</sup>

In a prospective clinical study Fateh-Moghadam and colleagues<sup>8</sup> found that transplant arteriosclerosis in patients receiving heart transplants was associated with enhanced fibrinogen receptor activation (ligand-induced binding site 1) and P-selectin surface expression of the circulating platelets. These authors concluded that increased activation of circulating platelets in these patients might contribute to the development and progression of transplant arteriosclerosis. Similar results were obtained by Hognestad and coworkers,<sup>9</sup> demonstrating enhanced expression of P-Selectin and soluble CD40L by analyzing platelet activation in long-term survivors of heart transplantation. They could also show that heart transplant recipients were characterized by a persistent immune activation even several years after transplantation, suggesting that enhanced platelet activation might have contributed to this inappropriate immune activation after heart transplantation.

Clopidogrel inhibits platelet activation by blocking the P2Y<sub>12</sub> ADP receptor on platelets.<sup>12</sup> Analysis of the relationship between P-selectin expression and PDGF secretion in human platelets revealed that treatment with clopidogrel resulted in downregulation of P-selectin expression and re-

duced PDGF secretion.<sup>31</sup> When patients with anti-thy1 glomerulonephritis were treated with clopidogrel, they showed significantly limited extracellular matrix deposition, as well as transforming growth factor  $\beta_1$  expression,<sup>32</sup> both pathologic mechanisms involved in the formation of transplant arteriosclerosis.<sup>30,33</sup> Recently, it was also shown that administration of clopidogrel reduced P-selectin and CD40L expression in an experimental rabbit ischemic coronary artery model.<sup>34</sup> Experiments to further clarify and understand the underlying pathologic mechanisms of the beneficial effect of clopidogrel on the development of transplant arteriosclerosis are currently ongoing in our laboratory. However, we already think at this stage that effective anti-platelet strategies might be a reasonable addition to the clinical therapy to improve the long-term outcome of heart transplantation.

In conclusion, we have shown that monotherapy with clopidogrel can effectively reduce the formation of transplant arteriosclerosis in a murine aortic allograft model. Furthermore, clopidogrel is a readily available and widely used drug with an established clinical safety profile. These findings therefore have important clinical implications because patients who are predisposed to or have transplant arteriosclerosis after cardiac transplantation might substantially benefit from treatment with this drug.

We thank Professor Michael Stuerzl for permission to use his facilities and Mr Johannes Roesch for expert technical assistance. We also thank Dr Dirk Labahn and the staff of the animal facility of the University of Erlangen-Nuernberg for their expert care of animals used for this study.

## References

1. Hertz MI, Taylor DO, Trulock EP, et al. The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: nineteenth official report—2002. *J Heart Lung Transplant.* 2002;21:950-70.
2. Weis M, von Scheidt W. Coronary artery disease in the transplanted heart. *Annu Rev Med.* 2000;51:81-100.
3. Lietz K, Miller LW. Current understanding and management of allograft vasculopathy. *Semin Thorac Cardiovasc Surg.* 2004;16:386-94.
4. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature.* 1993;362:801-9.
5. Huo Y, Ley KF. Role of platelets in the development of atherosclerosis. *Trends Cardiovasc Med.* 2004;14:18-22.
6. Henn V, Slupsky JR, Grafe M, et al. CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature.* 1998;391:591-4.
7. Gawaz M. Role of platelets in coronary thrombosis and reperfusion of ischemic myocardium. *Cardiovasc Res.* 2004;61:498-511.
8. Fateh-Moghadam S, Bocksch W, Ruf A, et al. Changes in surface expression of platelet membrane glycoproteins and progression of heart transplant vasculopathy. *Circulation.* 2000;102:890-7.
9. Hognestad A, Michelsen A, Brosstad F, et al. Platelet activation in heart transplant recipients. *Clin Transplant.* 2004;18:142-7.
10. CAPRIE Steering Committee. A randomised, blinded, trial of clopidogrel versus aspirin in patients at risk of ischaemic events (CAPRIE). *Lancet.* 1996;348:1329-39.
11. Investigators TC. Effects of clopidogrel in addition to aspirin in patients with acute coronary syndromes without ST-segment elevation. *N Engl J Med.* 2001;345:494-502.

12. Hollopeter G, Jantzen HM, Vincent D, et al. Identification of the platelet ADP receptor targeted by antithrombotic drugs. *Nature*. 2001;409:202-7.
13. Santa-Cruz RA, Steinhubl SR. Clopidogrel: how good is it and how does it work? *Curr Cardiol Rep*. 2004;6:264-8.
14. Savi P, Pereillo JM, Uzabiaga MF, et al. Identification and biological activity of the active metabolite of clopidogrel. *Thromb Haemost*. 2000;84:891-6.
15. Ensminger SM, Billing JS, Morris PJ, Wood KJ. Development of a combined cardiac and aortic transplant model to investigate the development of transplant arteriosclerosis in the mouse. *J Heart Lung Transplant*. 2000;19:1039-46.
16. Koulack J, McAlister VC, Giacomantonio CA, Bitter-Suermann H, MacDonald AS, Lee TD. Development of a mouse aortic transplant model of chronic rejection. *Microsurgery*. 1995;16:110-3.
17. Ensminger SM, Witzke O, Spriewald BM, et al. CD8+ T cells contribute to the development of transplant arteriosclerosis despite cd154 blockade. *Transplantation*. 2000;69:2609-13.
18. Ensminger SM, Spriewald BM, Witzke O, et al. Kinetics of transplant arteriosclerosis in MHC-Class I mismatched and fully allogeneic mouse aortic allografts. *Transplantation*. 2002;73:1068-74.
19. Libby P, Pober JS. Chronic rejection. *Immunity*. 2001;14:387-97.
20. Lefer AM. Platelets: unindicted conspirators in inflammatory tissue injury. *Circ Res*. 2000;87:1077-8.
21. Mayadas TN, Johnson RC, Rayburn H, Hynes RO, Wagner DD. Leukocyte rolling and extravasation are severely compromised in P selectin-deficient mice. *Cell*. 1993;74:541-54.
22. Kaplan DR, Chao FC, Stiles CD, Antoniades HN, Scher CD. Platelet alpha granules contain a growth factor for fibroblasts. *Blood*. 1979;53:1043-52.
23. Khandoga A, Biberthaler P, Enders G, et al. Platelet adhesion mediated by fibrinogen-intercellular adhesion molecule-1 binding induces tissue injury in the postischemic liver in vivo. *Transplantation*. 2002;74:681-8.
24. Yu G, Rux AH, Ma P, Bdeir K, Sachais BS. Endothelial expression of E-selectin is induced by the platelet-specific chemokine platelet factor 4 through LRP in an NF-kappaB-dependent manner. *Blood*. 2005;105:3545-51.
25. Stoica SC, Goddard M, Large SR. The endothelium in clinical cardiac transplantation. *Ann Thorac Surg*. 2002;73:1002-8.
26. Dietrich H, Hu Y, Zou Y, et al. Mouse model of transplant arteriosclerosis: role of intercellular adhesion molecule-1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000;20:343-52.
27. Koskinen PK, Lemstrom KB. Adhesion molecule P-selectin and vascular cell adhesion molecule-1 in enhanced heart allograft arteriosclerosis in the rat. *Circulation*. 1997;95:191-6.
28. Lemstrom K, Sihvola R, Koskinen P. Expression of platelet-derived growth factor in the development of cardiac allograft vasculopathy in the rat. *Transplant Proc*. 1997;29:1045-6.
29. Larsen CP, Alexander DZ, Hollenbaugh D, et al. CD40-gp39 interactions play a critical role during allograft rejection. Suppression of allograft rejection by blockade of the CD40-gp39 pathway. *Transplantation*. 1996;61:4-9.
30. Ensminger SM, Spriewald BM, Sorensen HV, et al. Critical role for IL-4 in the development of transplant arteriosclerosis in the absence of CD40-CD154 costimulation. *J Immunol*. 2001;167:532-41.
31. Graff J, Klinkhardt U, Schini-Kerth VB, et al. Close relationship between the platelet activation marker CD62 and the granular release of platelet-derived growth factor. *J Pharmacol Exp Ther*. 2002;300:952-7.
32. Peters H, Eisenberg R, Daig U, et al. Platelet inhibition limits TGF-beta overexpression and matrix expansion after induction of anti-thy1 glomerulonephritis. *Kidney Int*. 2004;65:2238-48.
33. Le Moine A, Flamand V, Demoor FX, et al. Critical roles for IL-4, IL-5, and eosinophils in chronic skin allograft rejection. *J Clin Invest*. 1999;103:1659-67.
34. Molero L, Lopez-Farre A, Mateos-Caceres PJ, et al. Effect of clopidogrel on the expression of inflammatory markers in rabbit ischemic coronary artery. *Br J Pharmacol*. 2005;146:419-24.

### 3 Diskussion

Die Entwicklung der TxA in Herztransplantaten ist ein multifaktorieller Prozess, der durch chronisch entzündliche Vorgänge gekennzeichnet ist. Makrophagen, T-Zellen, proinflammatorische Zytokine, Adhäsionsmoleküle, Wachstumsfaktoren und Alloantikörper sind sowohl in der Entstehung als auch im Fortschreiten dieser chronisch entzündlichen Prozesse involviert [7, 13]. Es ist heutzutage unumstritten, dass Thrombozyten eine wichtige Rolle in der Thrombenentstehung und der Atherogenese spielen und darüber hinaus zeigen viele Studien Evidenz, dass diese auch eine Schlüsselfunktion bei Entzündungsreaktionen einnehmen könnten [78, 79]. Bisher wurde Clopidogrel bei Patienten eingesetzt, die sich einer gefäßerweiternden Stent-Implantation unterziehen mußten, um zu verhindern, dass der Stent innerhalb kürzester Zeit zu thrombosiert. Diese Studie sollte zeigen, ob sich die Indikation für dieses Medikament auf die Anwendung nach einer Herztransplantation zur Verminderung der TxA erweitern läßt. Dass Mäuse den P2Y<sub>12</sub>-Rezeptor besitzen, und damit das Zielmolekül, welches Clopidogrel zur Entfaltung seiner Wirkung benötigt, wurde bereits gezeigt [37]. In der vorliegenden Studie konnten wir nachweisen, dass unterschiedliche Dosierungen von Clopidogrel die Thrombozytenaggregation in einem murinen Aortentransplantatmodell signifikant unterdrückten. Außerdem zeigten wir, dass eine Monotherapie mit Clopidogrel die Entwicklung der TxA signifikant reduzierte, dass aber bei erhöhter Dosis kein zusätzlicher signifikanter Effekt bezüglich der Intimaproliferation auftrat. Mit Clopidogrel ließ sich die Intimaproliferation genauso erfolgreich hemmen wie durch anti-CD8<sup>+</sup> T-Zelldepletion [80]. Dadurch liegt der Schluss nahe, dass zirkulierende Thrombozyten bei Aortentransplantatempfängern zur Entwicklung von TxA beitragen könnten.

#### 3.1 Experimentelles Modell

Die Herztransplantation beim Menschen und die daraus resultierende chronische Abstoßung des Transplantates, die sich beim Herzen in Form von TxA in den Koronar-Gefäßen äußert, stellt ein großes medizinisches Problem dieser Therapieform dar. Das abdominale Aortentransplantationsmodell spiegelt die

Gefäßveränderungen wieder, die auch beim Menschen, die an einer TxA leiden, sukzessive auftreten. Dies konnte in zahlreichen Studien [81-84] gezeigt werden.

Außerdem erlaubt dieses Modell die exakte Quantifikation der Intima-Proliferation, welche für das Ausmaß des vaskulären Schadens steht [81].

Unser experimentelles Modell weicht von der Herztransplantation beim Menschen insofern ab, als dass die in unserer Studie verwendeten und transplantierten Mäuse keinerlei immunsuppressive Medikation bekamen, mit Ausnahme von der zu untersuchenden Substanz, Clopidogrel. Dies hatte den Vorteil, die zu Grunde liegenden Mechanismen von Clopidogrel untersuchen zu können, ohne dabei auf Wechselwirkungen von anderen Medikamenten Rücksicht zu nehmen.

### **3.1.1 Thrombozytenaggregationshemmung und Applikationsform von Clopidogrel**

Um die optimale Dosierung von Clopidogrel zu finden, die am effektivsten die TxA unterdrückt, wurden drei verschiedene Dosierungen untersucht (1mg/kg, 10mg/kg und 20mg/kg). Schon die Gabe von 1mg/kg - entsprechend der humanen Tagesdosis - zeigte einen stark inhibitorischen Effekt auf die Plättchenaggregation und reduzierte die TxA in unserem experimentellen Modell signifikant.

Beim Menschen wird durch die äquivalente Gabe dieses Medikamentes eine 50%ige Inhibition der ADP-induzierten Thrombozytenaggregation erreicht, was für einen inkompletten P2Y<sub>12</sub>-Antagonismus spricht [82]. Gleiches konnten wir im Mausmodell beobachten. Auch hier wurden, unter Berücksichtigung der experimentellen Bedingungen nach zwei Tagen Standard-Dosis Clopidogrel ebenfalls ca. 50% Thrombozytenaggregation gemessen, was den inkompletten P2Y<sub>12</sub>-Antagonismus bestätigt (Manuskript Abb. 1). Kinetische Analysen verdeutlichten, dass höhere Dosen Clopidogrel in unserem Versuch eine schnellere und vollständigere Inhibition der Plättchenaggregation verursachten, aber keinen zusätzlichen therapeutischen Effekt hinsichtlich der TxA bewirkten. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Reduktion der Entwicklung einer TxA durch Clopidogrel nicht allein auf einer Unterdrückung der ADP-induzierten Plättchenaggregation beruht, sondern dass zusätzliche immunmodulatorische Effekte, z.B. eine Thrombozyten vermittelte Entzündungsreaktion, eine Rolle spielen könnten [63]. Da kein zusätzlicher positiver Effekt auf die Verringerung der TxA festgestellt werden konnte als die Dosis erhöht wurde, lässt sich weiterhin folgern, dass nicht die schnelle Inhibition der

Thrombozyten entscheidend ist, sondern es eher die Konstanz bei der Gabe dieses Medikamentes ist, die für den positiven Effekt Ausschlag gebend ist.

Die Messung der Thrombozytenaggregation nach Gabe von Clopidogrel geht auch nach Steigerung der Dosis nicht gegen 0%. Somit bleibt letztendlich offen, ob die Thrombozyten tatsächlich nicht aggregieren, weil ihr P2Y<sub>12</sub>-Rezeptor durch Clopidogrel blockiert wird oder ob zusätzliche Mechanismen hierfür verantwortlich sind. Deshalb wäre eine spezifischere Aussage über den ADP-vermittelten antiaggregatorischen Effekt, der von Clopidogrel bewirkt wird, nur möglich, wenn man die Hemmung der Adenylyl-Cyclase messen würde. Diese wird ausschließlich über den P2Y<sub>12</sub>-Rezeptor aktiviert [83]. Ein solcher Test wäre spezifischer als der Thrombozytenaggregationstest. Geiger et al. haben gezeigt, daß der Status der Phosphorylierung von *vasodilator stimulated phosphoprotein* (VASP) mit der Inhibition der Thrombozytenaggregation korreliert. Der P2Y<sub>12</sub>-Rezeptor auf Blutplättchen ist an das inhibitorische G-Protein (Gi) gekoppelt: eine Rezeptoraktivierung bewirkt eine Inhibition der Adenylyl-Cyclase. Daraufhin nimmt die Aktivität der *cAMP-dependent protein kinase* (PKA) ab, die zwangsläufig ihre Ziel-Proteine weniger phosphoryliert. Eines dieser Zielproteine ist VASP und es ist möglich dessen Phosphorylierungszustand zu messen [84].

Im klinischen Alltag wird Clopidogrel oral in Tablettenform verabreicht. Dies gestaltete sich in unserem experimentellen Modell jedoch als schwierig, da es nicht möglich war die äquivalente Dosis über das Trinkwasser zu verabreichen. Gelöstes Clopidogrel ist generell instabil [64], bleibt aber nach Rücksprache mit Sanofi-Synthelabo in wässriger Lösung für ca. 1 Std. stabil. Um sicher zu gehen, dass die erforderliche Dosis in jeder Maus zuverlässig wirken konnte, wurde die Lösung mit der jeweiligen Tagesdosis jeden Tag frisch hergestellt und unmittelbar im Anschluss intraperitoneal injiziert. Clopidogrel ist nicht magensaft-resistent und wird folglich vom Gastrointestinaltrakt absorbiert. Es unterliegt einem starken *first pass* Effekt in der Leber, wodurch der aktive Metabolit entsteht. Auch nach einer intraperitonealen Injektion erfolgt eine Absorption über den Gastrointestinaltrakt mit einer anschließenden Metabolisierung in der Leber [64]. Somit besteht kein relevanter Unterschied zu einer oralen Aufnahme. Die behandelten Mäuse haben das Medikament gut vertragen, es kam zu keinerlei offensichtlichen Nebenwirkungen wie z.B. erhöhter Blutungsneigung.

### 3.2 Aktivierte Thrombozyten und ihre weitreichenden Folgen

Thrombozyten sind nicht nur entscheidend an Hämostase und Thrombose beteiligt, ihre Rolle in der Entstehung der Arteriosklerose wurde mittlerweile detailliert untersucht [35, 85]. Für verschiedene arteriosklerotische Erkrankungen wie die Koronare Herzerkrankung [86], die Transplantat- Arteriosklerose [87], und die Stenose der Arteria Carotis [88] konnte ein Anstieg der Thrombozytenaktivierung gezeigt werden. So wird durch Wechselwirkungen zwischen Thrombozyten und Endothelzellen die Monozytenadhäsion und –transmigration signifikant verändert, was wiederum im Verlauf der Arteriosklerose zu einer frühen Entzündungsreaktion in der Gefäßwand und damit zur Entwicklung und zum Fortschreiten von arteriosklerotischen Läsionen führt [78, 89].

Bei Ischämie – Reperfusion sammeln sich im Myokard Thrombozyten an [90] und tragen zur Gefäßverletzung bei, indem sie die Entzündungsvorgänge sowohl in Leukozyten als auch in Endothelzellen verstärken [91, 92]. Deshalb ist die Rolle von Thrombozyten bei der Pathogenese der TxA von großem Interesse. Durch Vergleich von intrakoronaren Ultraschalluntersuchungen und Thrombozytenanalysen von Herztransplantatpatienten konnten Fateh-Moghadam et al. zeigen, dass eine Thrombozytenaktivierung durch erhöhte Expression des Fibrinogenrezeptors (LIBS-1, *ligand-induced binding site 1*) stark mit der Entstehung und der Progression von TxA assoziiert war und mit einer erhöhten P-Selektin- Expression auf der Oberfläche von Thrombozyten einher ging [87]. Die Autoren schlossen daraus, dass die verstärkte Aktivierung der zirkulierenden Thrombozyten bei diesen Patienten zur Entwicklung und Progression der TxA beitragen. In einer ähnlichen Studie konnte eine verstärkte Expression von P-Selektin, CD63 (Melanoma 1 Antigen) und löslichem CD154 (CD40-Ligand) bei Patienten, die unter einer schweren TxA litten, aufgezeigt werden [93]. Zusätzlich konnte bei Typ II Diabetes-Patienten ein Zusammenhang zwischen dem Anstieg aktivierter Thrombozyten und dem Fortschreiten der Dickenzunahme von Intima und Media der Arteria Carotis gefunden werden [88]. Hinzu kommt, dass Thrombozytenabhängige Chemokine und andere Wachstumsfaktoren, sowie Thrombozytenfaktor 4 (PF4) in Plaques von Arteriosklerose-Patienten gefunden wurden [94, 95]. Lemstrom et al. zeigten, dass eine Unterdrückung der PDGF-Expression die Entwicklung der TxA inhibiert, indem Zellmigration und -proliferation herunterreguliert werden [96]. Der endgültige Beweis,

dass PDGF, welches an der Formation von arteriosklerotischen Läsionen beteiligt ist, wirklich von den Thrombozyten stammt, steht noch aus [85].

Während der chronischen Abstoßungsreaktion in einem murinen heterotopen Herztransplantatmodell korrelierte das Ausmaß der arteriellen Intimaproliferation signifikant mit der P-Selektin-Expression auf Endothelzellen; daraus konnte man schließen, dass P-Selektin in der Pathogenese der TxA eine wichtige Rolle inne hat, indem es die immunologisch vermittelte Schädigung verstärkt [97].

Des Weiteren können Thrombozyten eine verstärkte Oberflächenexpression von Adhäsionsrezeptoren, wie ICAM-1 [98] und E-Selektin [99] auf Endothelzellen induzieren, welche die Adhäsion und Transmigration von Leukozyten vermitteln. Beide Prozesse stellen wichtige Schritte bei der Zellmigration in ein Transplantat dar [28]. Experimentelle Daten über Karotistransplantate haben aufgezeigt, dass ICAM-1 eine entscheidende Rolle spielt, indem es Adhäsion und Infiltration von Leukozyten in die Gefäßwand moduliert [100]. Es wurde gezeigt, dass auch arteriosklerotische Läsionen in Koronargefäßen ICAM-1 exprimieren [101], und dass die Freisetzung von Thrombozyten abstammenden Produkten ICAM-1 auf der Oberfläche von Endothelzellen exprimieren lassen. Dies wiederum erleichtert die Migration von Monozyten [102].

Aktivierte Thrombozyten enthalten hohe Konzentrationen an intrazellulärem löslichem CD40-Ligand (sCD40L) [78], das auch bei der Pathogenese der TxA eine Rolle spielt. Es handelt sich um ein Transmembran Protein auf aktivierten T-Zellen und auf Thrombozyten, welches zur Familie von TNF- $\alpha$  gehört. Es befindet sich im Zytoplasma der Blutplättchen und wird nach deren Aktivierung schnell auf der Zelloberfläche präsentiert [103]. Laut Hakkinen et al. wird es aber auch auf Endothelzellen, glatten Muskelzellen und Leukozyten exprimiert [104]. Die Oberflächen-Expression von CD40L dauert nur Minuten oder Stunden an, während ein lösliches, aber funktionelles Fragment entsteht: sCD40L. Von Thrombozyten stammendes CD40L ist in der Lage verschiedene Entzündungsreaktionen auf Endothelzellen zu initiieren, darin eingeschlossen die Produktion von freien Sauerstoff-Radikalen [105], die Expression von Adhäsionsmolekülen wie z. B. Gefäßzell Adhäsionsmolekül 1 (VCAM-1), ICAM-1 und E-Selectin, Chemokinen wie z.B. MCP-1 und IL8, Cytokine wie IL6 [78], und *tissue factor* [106].

Hognestad et al. machten die Feststellung, dass in den Thrombozyten von herztransplantierten Patienten eine erhöhte Expression sowohl von CD40L als auch von

P-Selektin zu verzeichnen war. Da sie CD40L aber nicht im Plasma dieser Patienten nachweisen konnten, kamen sie zu dem Schluss, dass die Thrombozyten zwar aktiviert, aber noch nicht degranuliert waren. Überraschend war auch die Entdeckung, dass niedrigere Spiegel von löslichem CD40L unter den Patienten waren, die an TxA litten, als unter Herztransplantierten ohne TxA. Die Erklärung dafür ist vielleicht, dass unter den Bedingungen von bestehender TxA eine größere Menge sCD40L an CD40 auf Endothelzellen und Leukozyten gebunden ist und folglich nicht mehr im Gefäßsystem zirkuliert [93]. Sie konnten außerdem zeigen, dass Herztransplantatempfänger sogar noch etliche Jahre nach Transplantation eine anhaltende Immunaktivierung aufwiesen, und deuten an, dass eine verstärkte Thrombozytenaktivierung zu dieser unangemessenen Immunaktivierung nach Herztransplantation beigetragen haben könnte.

Nach der Behandlung unserer Mäuse mit Clopidogrel konnten wir im Serum mittels eines durchgeführten ELISA signifikant weniger sCD40-L und P-Selektin nachweisen, was oben genannte Theorie und den anti-inflammatorischen Effekt dieses Wirkstoffes bestätigt (Abele et al., nicht publizierte Daten). Die Wichtigkeit der CD40L-CD40-Interaktion während der Entwicklung der TxA wurde in zahlreichen experimentellen Studien aufgezeigt [107, 108]. Die Blockade von CD40/CD40L hat laut Mach et al. die Entwicklung von Arteriosklerose dramatisch vermindert [109]. Allerdings weiß man noch nicht, wie groß dabei der Anteil an CD40L ist, der von Thrombozyten stammt.

Wenn Thrombozyten aktiviert werden, wird auch IL-1 $\beta$  produziert [110]. Ein Teil davon wird auf der Thrombozytenmembran präsentiert und induziert Endothelzelladhäsivität [111]. Des weiteren wurde gezeigt, dass Thrombozyten nach Interaktion mit arteriosklerotischem Endothel das Chemokin RANTES (*regulated on activation, normal T cell expressed and secreted*) freisetzen [112]. Hierbei handelt es sich um ein Produkt von aktivierten T-Zellen, welches chemoattraktiv auf Gedächtnis T-Lymphozyten und Monozyten wirkt [85]. Da diese Freisetzung Thrombin -vermittelt geschieht, findet sie trotz Anwendung von Clopidogrel statt. Da Clopidogrel nur die Plättchenaktivierung über ADP verhindert, ist dies eine der Erklärungen, warum nicht alle Thrombozyten mit Clopidogrel inaktiviert werden.

### 3.3 Glatte Muskelzellen und ihre Bedeutung für Transplantat-Arteriosklerose

Die genaue Funktion von glatten Muskelzellen (*vascular smooth muscle cells*, SMC) für die Arteriosklerose ist nach wie vor umstritten. Es wäre jedoch denkbar, dass die fokale Akkumulation von SMC in der Intima ein Vorläufer für die Entwicklung einer solchen Läsion im Menschen sein könnte. Jedenfalls tragen diese glatten Muskelzellen vermutlich durch die Produktion von proinflammatorischen Mediatoren wie MCP-1 oder VCAM und durch die Synthese von Matrixmolekülen zur Anbindung an Lipoproteine und zur Entwicklung eines Atheromas bei [113]. SMC stellen neben Lymphozyten und Makrophagen den Hauptanteil in den TxA Läsionen [36]. Über den Ursprung der SMC existieren unterschiedliche Meinungen, zum einen wird behauptet sie kämen von den SMC der Media [114], zum anderen von Zellen aus der Adventitia [115], des weiteren von vorher schon existenten intimalen Klonen [116], von Vorläuferzellen die von der Gefäßwand an sich stammen oder aber von im Blutgefäßsystem zirkulierenden Vorläuferzellen [117]. Beschädigte Endothelzellen, wie sie nach einer Transplantation durch die Immunantwort des Empfängers auf den Spender vorzufinden sind, sezernieren Wachstums- und andere chemotaktische Faktoren, die mononukleäre Zellen anlocken, welche inflammatorische Zytokine sezernieren. Eine solche lokale Produktion von Zytokinen führt zur Aktivierung von normaler Weise inaktiven SMC [36]. Die SMC machen als Reaktion auf diese löslichen Faktoren eine Umwandlung durch. Normalerweise befinden sich die SMC Zellen in einem differenzierten kontraktilen Status, die den Muskeltonus des Gefäßes kontrollieren können. Nach der Umwandlung stellen sie undifferenzierte synthetische Zellen dar, welche die Fähigkeit besitzen zu migrieren, zu proliferieren und Cytokine zu synthetisieren, worauf andere SMC in einer selbst stimulierenden Weise antworten. Durch Proliferation und Matrix Ablagerung kommt es zur Verringerung des Lumendurchmessers und Verschlechterung der Kontraktilität des Gefäßes. Dies gilt auch für die meisten obliterativen Intimaverdickungen in einer Arterie wie sie in soliden Organ Allografts mit TxA vorkommen [36, 118]. Autieri zeigte auch, dass die Zytokin-induzierte Aktivierung und Proliferation von glatten Muskelzellen das kritischste zelluläre Ereignis in der Entwicklung einer Neointima darstellt. TxA entwickelt eine hauptsächlich SMC-reiche Neointima [36].

### 3.4 Der Mechanismus von Clopidogrel und seine Wirkung auf die Transplantat-Arteriosklerose

Clopidogrel hemmt die Plättchenaktivierung, indem es den P2Y<sub>12</sub>-Adenosindiphosphatrezeptor auf den Thrombozyten blockiert [39]. Diese Wirkung ist für betroffene Thrombozyten irreversibel. Um sie aufzuheben bedarf es neu gebildeter Zellen aus dem Knochenmark. Eine Studie zeigte kürzlich, dass die Disulfid-Brücken-Bildung zwischen dem aktiven Metaboliten von Clopidogrel und dem Cystein-Rest 97 in der ersten extrazellulären Schleife statt findet. Dieser Vorgang führt dazu, dass der als Oligomer vorliegende Komplex des P2Y<sub>12</sub>-Rezeptors sich in dimere und monomere Einheiten aufteilt, welche sich durch den Kontakt mit dem aktiven Metaboliten aus den sog. *Lipid rafts* der Zellmembran lösen und dabei ihre Fähigkeit verlieren, an ihre endogenen Liganden zu binden [119].

Als Graff et al. die Beziehung zwischen der P-Selektin-Expression und einer PDGF-Sekretion bei humanen Thrombozyten untersuchte, konnte aufgezeigt werden, dass bei Behandlung mit Clopidogrel sowohl die Expression von P-Selektin als auch die Sekretion von PDGF herunterreguliert wurden [50]. Das konnten wir im Mausmodell zwei Wochen nach erfolgter Transplantation durch Messung der mRNA von P-Selektin und PDGF in transplantierten Aorten bestätigen (Abb. 5, Abele et al., nicht publizierte Daten). In Übereinstimmung hiermit hat nach 30 Tagen Behandlungszeitraum eine Auszählung der mit fluorchrommarkierten Antikörpern gefärbten Zellen auf Gefrierschnitten der Aorten eine geringere Expression von P-Selektin und PDGF in der Intima des transplantierten Gefäßes ergeben (Abele et al, nicht publizierte Daten).

Patienten, die unter einer anti-thy1 Glomerulonephritis litten und mit Clopidogrel behandelt wurden, zeigten sowohl eine signifikant verringerte Deposition von extrazellulärer Matrix als auch eine signifikant reduzierte TGF-β1-Expression [120], beides pathologische Mechanismen, die auch bei der Entstehung der TxA eine Rolle spielen [108, 121]. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass die Gabe von Clopidogrel die Expression von P-Selektin, von CD40L und *Tissue factor* in einem experimentellen Ischämie-Koronararterien-Modell am Kaninchen reduzierte [122].

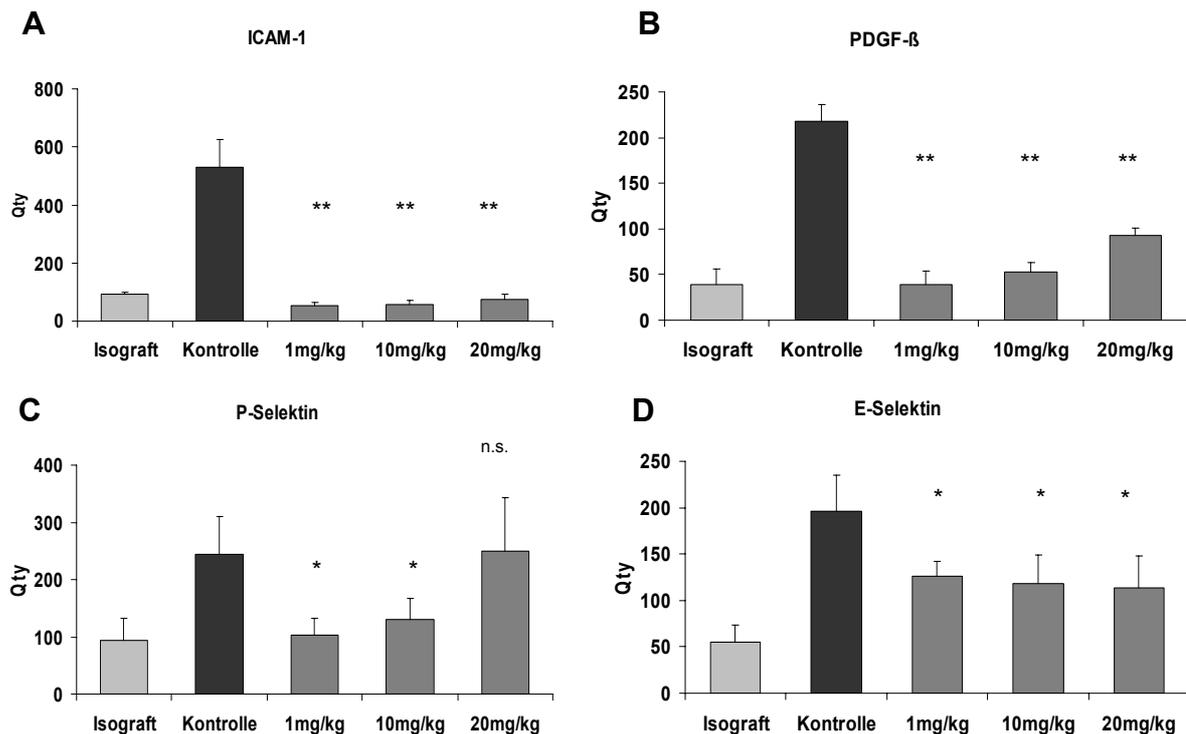
Clopidogrel schützt in der ischämischen Koronararterie die Expression eines Enzyms, welches Stickstoffoxid im Endothel produziert, nämlich eNOS. Hieraus lässt sich schließen, dass Thrombozyten auch in endotheliale Dysfunktion als Folge von

Ischämie involviert sind [122]. Während einer Entzündungsreaktion ist eNOS herunterreguliert, und wird mit endothelialer Dysfunktion in Verbindung gebracht [123]. Allerdings lassen o.g. Studien offen, ob diese Protektion von eNOS durch Clopidogrel mit dem antiinflammatorischen Effekt dieses Medikamentes in Zusammenhang steht oder mit der Inhibition der Thrombozyten und/oder zu einem direkten Effekt der Blutplättchen auf die Regulation der eNOS Expression führt [122]. In diesem Zusammenhang konnte von Zeiher et al. gezeigt werden, dass intrakoronare Thrombi zu einer Vasokonstriktion in epikardialen Arterien von Patienten mit Koronarer Herzerkrankung führen. Dieser Effekt war komplett reversibel durch eine intrakoronare Injektion von dem NO-Donor Nitroglycerin, weshalb die Autoren eine direkte Wirkung der Thrombozyten auf die Gefäßfunktion vermuteten [124]. 24 Std. nach eingetretener Ischämie reduzierte Clopidogrel beinahe vollständig die entzündliche Antwort in der ischämischen Koronararterie. Daraus lässt sich die Wichtigkeit der Thrombozyten in der Entzündungsantwort einer Gefäßwand ableiten, welche Ischämie ausgesetzt wird [122]. Folgerichtig wurde in einem murinen Modell für chronische Abstoßung gezeigt, dass in Aorten Allografts von eNOS defizienten Mäusen TxA beschleunigt auftrat [125].

Quinn et al. konnten zeigen, dass eine Vorbehandlung mit Clopidogrel bei Patienten, die eine perkutane Koronarintervention bekamen, zu reduziertem CD40L Spiegel und reduziertem Serum Interleukin-6-Spiegel führten. Auch dieses Ergebnis unterstützt die antiinflammatorische Wirkung von Clopidogrel [126].

Eine anti-Thrombozyten-Therapie, welche die Behandlung mit Clopidogrel darstellt, hat auch den Effekt, einer Entzündungsreaktion entgegen zu wirken. Dadurch, dass weniger Blutplättchen an anderen Thrombozyten und am Endothel haften bleiben, werden weniger Leukozyten aktiviert. Die Spiegel von löslichem ICAM-1 waren signifikant niedriger bei Patienten, die mit Clopidogrel, Acetylsalicylsäure (ASS) oder beidem behandelt wurden, im Vergleich zu Patienten ohne anti-Thrombozyten-Therapie [49].

In unserem verwendetem Mausmodell konnte nach 14 Tagen Clopidogrel-Behandlung ebenfalls ein signifikant niedrigerer Wert an mRNA -Expression von ICAM-1 in den transplantierten Gefäßen gemessen werden und auch histologisch wurde auf zellulärer Ebene im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe weniger ICAM-1 gezählt (Abb. 5, Abele et al., nicht publizierte Daten).



**Abb. 5: Messung der mRNA von ICAM-1, PDGF-β, E-Selektin und P-Selektin im Transplantat**

RT-PCR an der RNA isoliert aus Maus-Aorten am Tag 14 nach Transplantation. Die Isolation erfolgte aus verschiedenen Transplantaten (Isograft, Allograft unbehandelt bzw. mit verschiedenen Dosen Clopidogrel behandelt, wie auf den X-Achsen beschrieben). Es wird die Anzahl der mRNA Kopien dargestellt. Die Signifikanz wurde mit dem t-test berechnet (\*=  $p < 0.05$ , \*\*=  $p < 0.01$ ,  $n=5$ ). Signifikante Reduktion der ICAM-1 Expression (A), PDGF-β Expression (B) und E-Selektin Expression (D) in allen mit Clopidogrel behandelten Gruppen. Die P-Selektin Expression (C) war signifikant reduziert in den mit 1 bzw. 10 mg/kg Clopidogrel behandelten Gruppen (20 mg/kg n.s. = nicht signifikant).

Klinkhardt et al. konnten beobachten, dass bei den Patienten, die Clopidogrel einnahmen, nach Stimulation des Blutes mit ADP oder Thrombin-Rezeptor aktivierendem Peptid die Expression von MAC-1 signifikant reduziert war [49]. Dadurch, dass durch Clopidogrel weniger aktivierte Leukozyten am Endothel adhären und ihnen dadurch die Möglichkeit der festen Bindung an die Endothelzellen erschwert wird, migrieren weniger solcher Zellen ins Gewebe. Deshalb kann man die Wirkung von Clopidogrel als deutlichen indirekten anti-inflammatorischen Effekt bezeichnen.

Bei Patienten mit akutem Koronar-Syndrom und während eines kardiopulmonalen Bypass wurde ein Anstieg der Plättchen-Leukozyten-Aggregate gemessen [127-129]. In Patienten mit arteriosklerotischen Gefäßveränderungen und peripheren Gefäßokklusionen war die Expression von Selektin [130] und die Reaktivität der Neutrophilen auf den Plättchen aktivierenden Faktor erhöht, beides im Vergleich zum Gesunden [131]. Klinkhardt et al. zeigten, dass Patienten, die Clopidogrel erhielten, signifikant weniger Formation an Plättchen-Leukozyten-Aggregaten hatten als unbehandelte Patienten. Interessanterweise zeigten Patienten, die Aspirin erhielten, nach Stimulation mit ADP weder reduzierte PLA Formation noch reduzierte Expression von P-Selektin.

### 3.4.1 Clopidogrel versus Acetylsalicylsäure

Aspirin<sup>®</sup> ist wohl der bekannteste Thrombozytenhemmer, welcher weltweit für viele Indikationen, vor allem bei thromboembolischen Erkrankungen wie Herzinfarkt oder Gehirnschlag angewendet wird. Sein Wirkstoff Acetylsalicylsäure (ASS) acetyliert das in der Prostaglandinbiosynthese wichtige Enzym Zykllooxygenase (COX) und hemmt irreversibel die Aktivität des Isoenzym COX-1 in den Thrombozyten. Die wesentliche antithrombotische Wirkung beruht auf der Blockade der Thromboxan A<sub>2</sub> Synthese [132].

In einer vergleichenden Studie spielte es bei der Messung der ICAM-1 Expression keine Rolle, ob die Patienten mit ASS oder mit Clopidogrel behandelt wurden, in beiden Fällen war ICAM-1 signifikant erniedrigt [49]. Da der P<sub>2</sub>Y<sub>12</sub> Rezeptor auch die Degranulation über Signalwege für Thrombin erweitert [133, 134] ist es nicht verwunderlich, dass Klinkhardt et al. zeigen konnten, dass in einer Kombinationstherapie mit Clopidogrel und ASS die niedrigsten Werte bezüglich Aktivierung gemessen wurden. ASS scheint folglich den Effekt von Clopidogrel auf die Formation von PLA noch zu verstärken [49]. Eine Langzeit-Behandlung mit ASS scheint das periphere Ausbreiten der arteriosklerotischen Plaques zu verlangsamen [135], aber das Vorkommen von Schlaganfall, Myokardinfarkt oder Gefäßverschluss bedingter Tod war in der CAPRIE-Studie deutlich reduziert durch Clopidogrel im Vergleich zu ASS bei Patienten mit peripherer okklusierender Arteriosklerose [61].

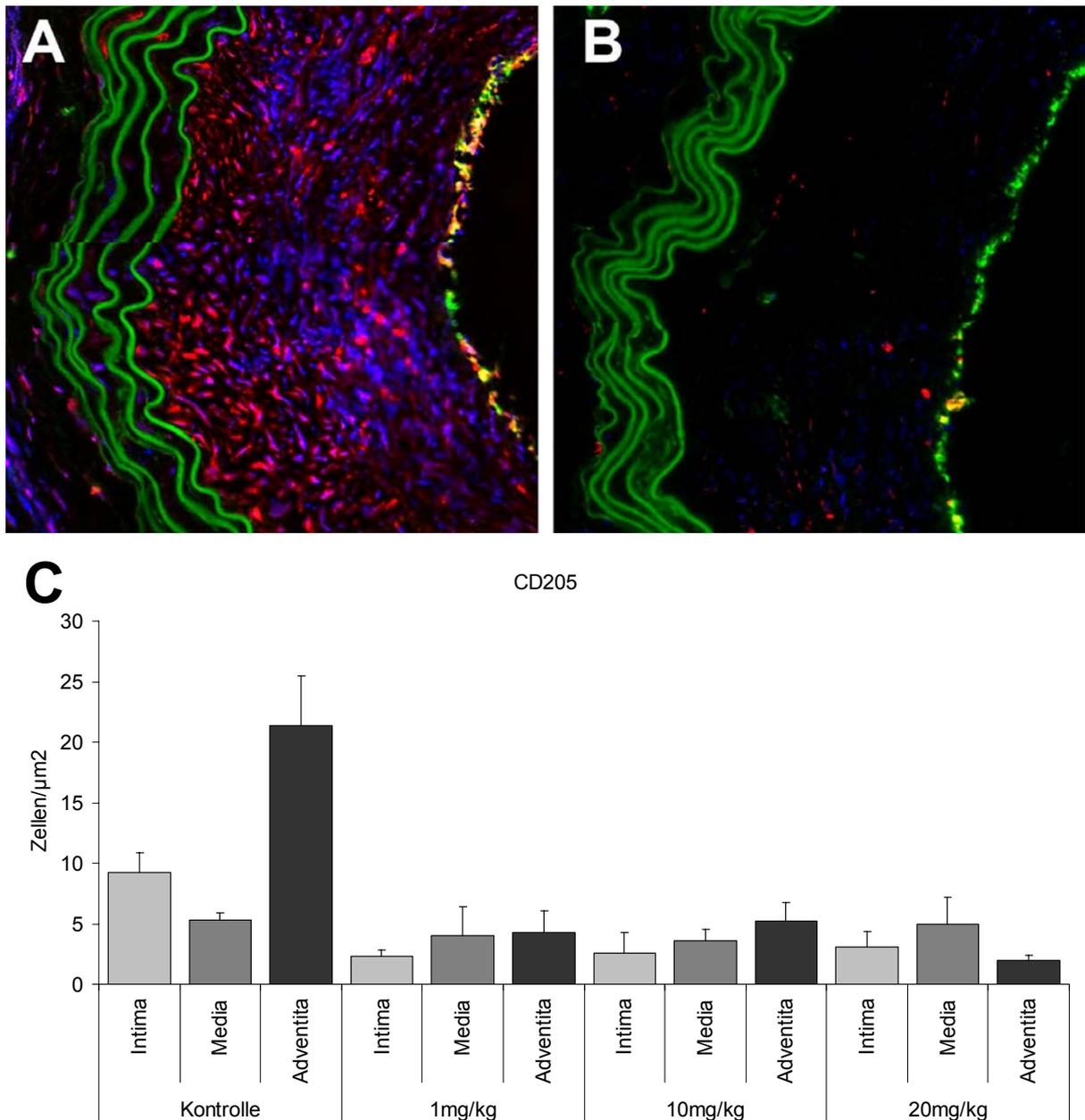
### 3.5 Zusammenfassung und Ausblick

Zusammenfassend konnte diese Studie zeigen, dass sich durch Monotherapie mit Clopidogrel (Plavix®) die Entstehung von TxA in einem murinen Aortentransplantationsmodell effektiv verringern lässt. Nach 30 Tagen Applikation von Clopidogrel in Allograft-Empfängern wurden signifikant niedrigere Werte für Intimaproliferation als in der unbehandelten Kontrollgruppe erreicht. Man kann an dieser Stelle nur spekulieren, dass die Reduktion der Entzündungsprozesse durch Clopidogrel weitere biologische Effekte vermuten lässt als nur die Verhinderung von Thrombozytenaktivierung bzw. von Thrombusbildung.

Clopidogrel verhindert nicht nur die ADP-abhängige Aggregation von Thrombozyten, sondern schafft durch die Herunterregulierung von entzündungsfördernden Cytokinen und Adhäsionsmolekülen eine „Art Immunsuppression“. Die Thrombozyten-Thrombozyten-Interaktion bzw. auch die Thrombozyten-Leukozyten-Interaktionen werden verringert, Leukozyten „rollen“ in ihrer Anzahl verringert entlang dem Endothel. Deshalb können weniger Entzündungszellen in das Gewebe transmigrieren. Die komplette chronische Entzündungsreaktion wird heruntergefahren, es werden scheinbar weniger glatte Muskelzellen zur Proliferation angeregt und es kommt zu geringerer Deposition von extrazellulärer Matrix.

Neuere Experimente mit immunhistochemischer Färbung von Gefrierschnitten mit fluorchrommarkierten Antikörpern bestätigen die Hypothese, dass nach der Behandlung mit Clopidogrel weitaus weniger antigenpräsentierende Zellen in Form von Makrophagen und Dendritische Zellen in der transplantierten Aorta vorhanden sind als bei der unbehandelten Kontrollgruppe (Abb.6, Abele et al., nicht publizierte Daten).

Weiterhin konnte durch Analyse der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen festgestellt werden, dass es in operierten und Clopidogrel behandelten Mäusen im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich ihrer Zellzahl gab. Daraus lässt sich folgern, dass Clopidogrel offenbar keinen Einfluss auf T-Zellen ausübt. Deshalb wäre evtl. eine Kombination von Clopidogrel mit den neuen TOR-Inhibitoren wie z.B. Everolimus sinnvoll, gerade weil dieses auch die Proliferation der glatten Muskelzellen hemmt.



**Abb. 6: DC Zellinfiltration nach Clopidogrelbehandlung in transplantierte Mauseaorta am Tag 30 nach TX**

A) und B) Immunfluoreszenzaufnahme eines Gefrierschnitts einer Mauseaorta, kompletter MHC-*missmatch*, unbehandelt (A) und mit Clopidogrel behandelt (B). Die Färbung erfolgte mit Antikörpern gegen CD205(rot), CD11c(blau) und CD31(grün). C) Quantifizierung der CD205 positiv gefärbten Zellen in den einzelnen Schichten der Mauseaorta. Die X-Achse unterteilt die unterschiedlich behandelten experimentellen Gruppen sowie Intima, Media und Adventitia (n=5, 3 Schnitte je Transplantat).

Die vorliegende Studie unterstützt die Hypothese, dass eine effektive Anti-Thrombozyten-Strategie eine sinnvolle Ergänzung der immunsuppressiven Therapie darstellt, um das Langzeitüberleben der Herztransplantate zu verbessern. Es konnte gezeigt werden, dass eine Monotherapie mit Clopidogrel die Entstehung der TxA in einem murinen Aortentransplantatmodell signifikant reduzierte. Clopidogrel ist ein zugelassenes, häufig verwendetes Medikament mit etabliertem klinischem Sicherheitsprofil. Aus diesen Gründen lässt sich schlussfolgern, dass Patienten, die nach einer Herztransplantation das Risiko zeigen, eine TxA zu entwickeln, oder gar darunter leiden, wesentlichen Nutzen aus der Behandlung mit diesem Wirkstoff ziehen könnten.

## 4 Zusammenfassung

Transplantat-Arteriosklerose als Hauptmanifestation der chronischen Abstoßung ist immer noch die Hauptursache für den limitierten Langzeit-Erfolg der Herztransplantation. Thrombozyten wird eine entscheidende Rolle in der Pathogenese dieser Erkrankung zugeschrieben. Das Ziel dieser Studie war es heraus zu finden, ob eine Inhibition der Blutplättchen alleine einen positiven Effekt auf die Entwicklung von Transplantat-Arteriosklerose hat. In unserem Modell wurde ein kompletter MHC Mismatch verwendet, das bedeutet, es wurden Aorten aus Spender-Mäusen vom Stamm C57BL6 (H2<sup>b</sup>) in Empfänger-Mäuse vom Stamm CBA (H2<sup>k</sup>) transplantiert. Die Mäuse erhielten 30 Tage lang einmal täglich eine intraperitoneale Injektion verschiedener Dosierungen (1, 10 und 20 mg/kg) von Clopidogrel bzw. NaCl als Kontrolle. An den Tagen 2, 7, 14 und 30 wurden Blutanalysen in Form eines Thrombozyten-Aggregationstest mit Adenosin-Di-Phosphat (ADP) durchgeführt, um die Effektivität der Behandlung zu verfolgen. Die Transplantate wurden am Tag 30 nach der Transplantation bezüglich Histologie und Morphometrie analysiert. Mäuse, die täglich mit einer Dosis von 1 mg/kg Clopidogrel behandelt wurden, zeigten im Vergleich zu NaCl behandelten Kontrollmäusen eine signifikant reduzierte Ausprägung von Transplantat-Arteriosklerose. Dieser Effekt wurde ohne die zusätzliche Gabe von immunsupprimierenden Medikamenten erreicht. Auch die Behandlung mit 10 bzw. 20 mg/kg Clopidogrel einmal täglich verursachte eine signifikant verringerte Ausprägung der Transplantat-Arteriosklerose, verglichen mit den Kontroll-Tieren. Allerdings führte die erhöhte Dosis von Clopidogrel in diesen Gruppen zu keiner weiteren Verringerung der Ausprägung der Transplantat-Arteriosklerose. Isotransplantate zeigten keinerlei Gefäßläsionen am Tag 30 nach Transplantation. Diese Ergebnisse veranschaulichen, dass eine Monotherapie mit Clopidogrel in einem murinen Aorten-Transplantations-Modell effektiv die Ausbildung einer Transplantat-Arteriosklerose verringern kann.

## 5 Summary

### **Clopidogrel reduces the development of transplant arteriosclerosis**

Transplant arteriosclerosis, the hallmark feature of chronic rejection, is still the major limiting factor for the long-term success of heart transplantation. Platelets have been implicated to play a role in the pathogenesis of this disease. Therefore the aim of this study was to investigate whether platelet inhibition alone has a positive effect on the development of transplant arteriosclerosis. Fully major histocompatibility complex-mismatched C57BL6 (H2<sup>b</sup>) donor aortas were transplanted into CBA (H2<sup>k</sup>) recipients, and mice received different doses (1, 10 and 20 mg/kg) of clopidogrel or control saline as a daily intraperitoneal injection for 30 days. Blood was analysed on days 2, 7, 14 and 30 by using a platelet aggregation test (adenosine diphosphate) for effectiveness of the treatment. Grafts were analysed by means of histology and morphometry on day 30 after transplantation. When mice were treated daily with 1 mg/kg clopidogrel in the absence of any other immunosuppression, transplant arteriosclerosis was significantly reduced compared with that seen in saline-treated control animals. Daily application of 10 mg/kg and 20 mg/kg clopidogrel also significantly reduced the development of transplant arteriosclerosis compared with that seen in control animals. There was, however, no additional beneficial effect when compared with mice treated with 1 mg/kg clopidogrel. Isografts did not show any signs of vascular lesions on day 30 after transplantation. These results demonstrate that monotherapy with clopidogrel can effectively reduce the formation of transplant arteriosclerosis in a murine aortic allograft model.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Carrell A., G.C., *The transplantation of veins and organs*. American Medicine, 1905(10): p. 1101-02.
2. Cusimano, R., M. Cusimano, and S. Cusimano, *The genius of Alexis Carrel*. Can Med Assoc J, 1984. **131**(9): p. 1142-50.
3. Pastuszko, P. and R.N. Edie, *John H. Gibbon, Jr., the inventor of the first successful heart-lung machine*. J Card Surg, 2004. **19**(1): p. 65-73.
4. Hall, G.C., *Groote Schuur Hospital: the first human heart transplantation. Ward case history*. SA Nurs J, 1968. **35**(3): p. 27-33.
5. Hertz, M.I., et al., *The registry of the international society for heart and lung transplantation: nineteenth official report-2002*. J Heart Lung Transplant, 2002. **21**(9): p. 950-70.
6. Hosenpud, J.D., et al., *The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: sixteenth official report--1999*. J Heart Lung Transplant, 1999. **18**(7): p. 611-26.
7. Lietz, K. and L.W. Miller, *Current understanding and management of allograft vasculopathy*. Semin Thorac Cardiovasc Surg, 2004. **16**(4): p. 386-94.
8. Weis, M. and W. von Scheidt, *Coronary artery disease in the transplanted heart*. Annu Rev Med, 2000. **51**: p. 81-100.
9. Hruban, R.H., et al., *Accelerated arteriosclerosis in heart transplant recipients is associated with a T-lymphocyte-mediated endothelialitis*. Am J Pathol, 1990. **137**(4): p. 871-82.
10. Oguma, S., et al., *Participation of dendritic cells in vascular lesions of chronic rejection of human allografts*. Lancet, 1988. **2**(8617): p. 933-6.
11. Tilney, N.L., et al., *Chronic rejection--an undefined conundrum*. Transplantation, 1991. **52**(3): p. 389-98.
12. Abele, S., et al., *Clopidogrel reduces the development of transplant arteriosclerosis*. J Thorac Cardiovasc Surg, 2006. **131**(5): p. 1161-6.
13. Libby, P. and J.S. Pober, *Chronic rejection*. Immunity, 2001. **14**(4): p. 387-97.
14. Beyersdorf, F.u.M., J., *Aktuelle Aspekte der Herztransplantation*. 2005, Bremen, Germany: UNI-MED Verlag AG.
15. Janeway, T., Walport, Shlomchik, *Immunologie*. 5. ed. 2002, Heidelberg, Berlin: Spektrum Akademischer Verlag GmbH. 777.
16. Hood, L., M. Steinmetz, and B. Malissen, *Genes of the major histocompatibility complex of the mouse*. Annu Rev Immunol, 1983. **1**: p. 529-68.
17. Salom, R.N., J.A. Maguire, and W.W. Hancock, *Endothelial activation and cytokine expression in human acute cardiac allograft rejection*. Pathology, 1998. **30**(1): p. 24-9.
18. Libby, P. and H. Tanaka, *The pathogenesis of coronary arteriosclerosis ("chronic rejection") in transplanted hearts*. Clin Transplant, 1994. **8**(3 Pt 2): p. 313-8.
19. Borel, J.F., *History of the discovery of cyclosporin and of its early pharmacological development*. Wien Klin Wochenschr, 2002. **114**(12): p. 433-7.
20. Dupont, E., et al., *Assessment of production of tumor necrosis factor alpha under the influence of immunosuppressive drugs*. Transplant Proc, 1989. **21**(1 Pt 1): p. 70-1.

21. Henry, M.L. and A. Rajab, *The use of basiliximab in solid organ transplantation*. Expert Opin Pharmacother, 2002. **3**(11): p. 1657-63.
22. Mehra, M.R., et al., *The impact of mode of donor brain death on cardiac allograft vasculopathy: an intravascular ultrasound study*. J Am Coll Cardiol, 2004. **43**(5): p. 806-10.
23. McGiffin, D.C., et al., *Cardiac transplant coronary artery disease. A multivariable analysis of pretransplantation risk factors for disease development and morbid events*. J Thorac Cardiovasc Surg, 1995. **109**(6): p. 1081-8; discussion 1088-9.
24. Herijgers, P., et al., *Changes in organ perfusion after brain death in the rat and its relation to circulating catecholamines*. Transplantation, 1996. **62**(3): p. 330-5.
25. Rose, A.G., D. Novitzky, and S.M. Factor, *Catecholamine-associated smooth muscle contraction bands in the media of coronary arteries of brain-dead baboons*. Am J Cardiovasc Pathol, 1988. **2**(1): p. 63-7.
26. Shoskes, D.A., N.A. Parfrey, and P.F. Halloran, *Increased major histocompatibility complex antigen expression in unilateral ischemic acute tubular necrosis in the mouse*. Transplantation, 1990. **49**(1): p. 201-7.
27. Wilhelm, M.J., et al., *Activation of the heart by donor brain death accelerates acute rejection after transplantation*. Circulation, 2000. **102**(19): p. 2426-33.
28. Stoica, S.C., M. Goddard, and S.R. Large, *The endothelium in clinical cardiac transplantation*. Ann Thorac Surg, 2002. **73**(3): p. 1002-8.
29. Davis, S.F., et al., *Early endothelial dysfunction predicts the development of transplant coronary artery disease at 1 year posttransplant*. Circulation, 1996. **93**(3): p. 457-62.
30. Hollenberg, S.M., et al., *Coronary endothelial dysfunction after heart transplantation predicts allograft vasculopathy and cardiac death*. Circulation, 2001. **104**(25): p. 3091-6.
31. Wolford, T.L., et al., *Heterogeneity of coronary flow reserve in the examination of multiple individual allograft coronary arteries*. Circulation, 1999. **99**(5): p. 626-32.
32. Tsutsui, H., et al., *Lumen loss in transplant coronary artery disease is a biphasic process involving early intimal thickening and late constrictive remodeling: results from a 5-year serial intravascular ultrasound study*. Circulation, 2001. **104**(6): p. 653-7.
33. Glagov, S., et al., *Compensatory enlargement of human atherosclerotic coronary arteries*. N Engl J Med, 1987. **316**(22): p. 1371-5.
34. Billingham, M.E., *Histopathology of graft coronary disease*. J Heart Lung Transplant, 1992. **11**(3 Pt 2): p. S38-44.
35. Ross, R., *The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s*. Nature, 1993. **362**(6423): p. 801-9.
36. Rahmani, M., et al., *Allograft vasculopathy versus atherosclerosis*. Circ Res, 2006. **99**(8): p. 801-15.
37. Foster, C.J., et al., *Molecular identification and characterization of the platelet ADP receptor targeted by thienopyridine antithrombotic drugs*. J Clin Invest, 2001. **107**(12): p. 1591-8.
38. Rosenblum, W.I., et al., *Some properties of mouse platelets*. Thromb Res, 1983. **30**(4): p. 347-55.
39. Hollopeter, G., et al., *Identification of the platelet ADP receptor targeted by antithrombotic drugs*. Nature, 2001. **409**(6817): p. 202-7.

40. Mills, D.C., *ADP receptors on platelets*. Thromb Haemost, 1996. **76**(6): p. 835-56.
41. Evangelista, V., et al., *Platelet/polymorphonuclear leukocyte interaction in dynamic conditions: evidence of adhesion cascade and cross talk between P-selectin and the beta 2 integrin CD11b/CD18*. Blood, 1996. **88**(11): p. 4183-94.
42. Rinder, H.M., et al., *Activated and unactivated platelet adhesion to monocytes and neutrophils*. Blood, 1991. **78**(7): p. 1760-9.
43. Ruggeri, Z.M., *Platelets in atherothrombosis*. Nat Med, 2002. **8**(11): p. 1227-34.
44. Gawaz, M., *Platelets in the onset of atherosclerosis*. Blood Cells Mol Dis, 2006. **36**(2): p. 206-10.
45. Theilmeyer, G., et al., *Endothelial von Willebrand factor recruits platelets to atherosclerosis-prone sites in response to hypercholesterolemia*. Blood, 2002. **99**(12): p. 4486-93.
46. Mayadas, T.N., et al., *Leukocyte rolling and extravasation are severely compromised in P selectin-deficient mice*. Cell, 1993. **74**(3): p. 541-54.
47. Kaplan, D.R., et al., *Platelet alpha granules contain a growth factor for fibroblasts*. Blood, 1979. **53**(6): p. 1043-52.
48. Fitzgerald, D.J., et al., *Platelet activation in unstable coronary disease*. N Engl J Med, 1986. **315**(16): p. 983-9.
49. Klinkhardt, U., et al., *Clopidogrel but not aspirin reduces P-selectin expression and formation of platelet-leukocyte aggregates in patients with atherosclerotic vascular disease*. Clin Pharmacol Ther, 2003. **73**(3): p. 232-41.
50. Graff, J., et al., *Close relationship between the platelet activation marker CD62 and the granular release of platelet-derived growth factor*. J Pharmacol Exp Ther, 2002. **300**(3): p. 952-7.
51. Hamburger, S.A. and R.P. McEver, *GMP-140 mediates adhesion of stimulated platelets to neutrophils*. Blood, 1990. **75**(3): p. 550-4.
52. Weyrich, A.S., et al., *Monocyte tethering by P-selectin regulates monocyte chemotactic protein-1 and tumor necrosis factor-alpha secretion. Signal integration and NF-kappa B translocation*. J Clin Invest, 1995. **95**(5): p. 2297-303.
53. Ohno, N., et al., *Soluble selectins and ICAM-1 modulate neutrophil-endothelial adhesion and diapedesis in vitro*. Inflammation, 1997. **21**(3): p. 313-24.
54. Altieri, D.C., J.H. Morrissey, and T.S. Edgington, *Adhesive receptor Mac-1 coordinates the activation of factor X on stimulated cells of monocytic and myeloid differentiation: an alternative initiation of the coagulation protease cascade*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(20): p. 7462-6.
55. Massberg, S., et al., *Platelet adhesion via glycoprotein IIb integrin is critical for atheroprogession and focal cerebral ischemia: an in vivo study in mice lacking glycoprotein IIb*. Circulation, 2005. **112**(8): p. 1180-8.
56. May, A.E., et al., *Engagement of glycoprotein IIb/IIIa (alpha(IIb)beta3) on platelets upregulates CD40L and triggers CD40L-dependent matrix degradation by endothelial cells*. Circulation, 2002. **106**(16): p. 2111-7.
57. Shattil, S.J. and P.J. Newman, *Integrins: dynamic scaffolds for adhesion and signaling in platelets*. Blood, 2004. **104**(6): p. 1606-15.
58. Ross, R., D.F. Bowen-Pope, and E.W. Raines, *Platelets, macrophages, endothelium, and growth factors. Their effects upon cells and their possible roles in atherogenesis*. Ann N Y Acad Sci, 1985. **454**: p. 254-60.

59. Sawicki, G., et al., *Release of gelatinase A during platelet activation mediates aggregation*. Nature, 1997. **386**(6625): p. 616-9.
60. Fernandez-Patron, C., et al., *Differential regulation of platelet aggregation by matrix metalloproteinases-9 and -2*. Thromb Haemost, 1999. **82**(6): p. 1730-5.
61. Committee", C.S., *A randomised, blinded, trial of clopidogrel versus aspirin in patients at risk of ischaemic events (CAPRIE)*. Lancet, 1996. **348**(9038): p. 1329-39.
62. Yusuf, S., et al., *Effects of clopidogrel in addition to aspirin in patients with acute coronary syndromes without ST-segment elevation*. N Engl J Med, 2001. **345**(7): p. 494-502.
63. Santa-Cruz, R.A. and S.R. Steinhubl, *Clopidogrel: how good is it and how does it work?* Curr Cardiol Rep, 2004. **6**(4): p. 264-8.
64. Savi, P., et al., *Identification and biological activity of the active metabolite of clopidogrel*. Thromb Haemost, 2000. **84**(5): p. 891-6.
65. Soulet, C., et al., *Gi-dependent and -independent mechanisms downstream of the P2Y12 ADP-receptor*. J Thromb Haemost, 2004. **2**(1): p. 135-46.
66. Andre, P., et al., *P2Y12 regulates platelet adhesion/activation, thrombus growth, and thrombus stability in injured arteries*. J Clin Invest, 2003. **112**(3): p. 398-406.
67. Gachet, C., *ADP receptors of platelets and their inhibition*. Thromb Haemost, 2001. **86**(1): p. 222-32.
68. Goto, S., et al., *Functional significance of adenosine 5'-diphosphate receptor (P2Y(12)) in platelet activation initiated by binding of von Willebrand factor to platelet GP Ibalpha induced by conditions of high shear rate*. Circulation, 2002. **105**(21): p. 2531-6.
69. Macfarlane, D.E. and D.C. Mills, *Inhibition by ADP of prostaglandin induced accumulation of cyclic AMP in intact human platelets*. J Cyclic Nucleotide Res, 1981. **7**(1): p. 1-11.
70. Savi, P., A.M. Pflieger, and J.M. Herbert, *cAMP is not an important messenger for ADP-induced platelet aggregation*. Blood Coagul Fibrinolysis, 1996. **7**(2): p. 249-52.
71. Daniel, J.L., et al., *Role of intracellular signaling events in ADP-induced platelet aggregation*. Thromb Haemost, 1999. **82**(4): p. 1322-6.
72. Hechler, B., et al., *The P2Y1 receptor is necessary for adenosine 5'-diphosphate-induced platelet aggregation*. Blood, 1998. **92**(1): p. 152-9.
73. Jin, J. and S.P. Kunapuli, *Coactivation of two different G protein-coupled receptors is essential for ADP-induced platelet aggregation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(14): p. 8070-4.
74. Savi, P., et al., *Role of P2Y1 purinoceptor in ADP-induced platelet activation*. FEBS Lett, 1998. **422**(3): p. 291-5.
75. Bennett, J.S., *Novel platelet inhibitors*. Annu Rev Med, 2001. **52**: p. 161-84.
76. Savi, P., et al., *P2y(12), a new platelet ADP receptor, target of clopidogrel*. Biochem Biophys Res Commun, 2001. **283**(2): p. 379-83.
77. Ding, Z., et al., *Inactivation of the human P2Y12 receptor by thiol reagents requires interaction with both extracellular cysteine residues, Cys17 and Cys270*. Blood, 2003. **101**(10): p. 3908-14.
78. Henn, V., et al., *CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells*. Nature, 1998. **391**(6667): p. 591-4.
79. Lefer, A.M., *Platelets: unindicted coconspirators in inflammatory tissue injury*. Circ Res, 2000. **87**(12): p. 1077-8.

80. Ensminger, S.M., et al., *CD8+ T cells contribute to the development of transplant arteriosclerosis despite CD154 blockade*. *Transplantation*, 2000. **69**(12): p. 2609-12.
81. Chow, L.H., et al., *Intimal thickening develops without humoral immunity in a mouse aortic allograft model of chronic vascular rejection*. *Circulation*, 1996. **94**(12): p. 3079-82.
82. Thebault, J.J., et al., *Repeated-dose pharmacodynamics of clopidogrel in healthy subjects*. *Semin Thromb Hemost*, 1999. **25 Suppl 2**: p. 9-14.
83. Cattaneo, M., *Aspirin and clopidogrel: efficacy, safety, and the issue of drug resistance*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004. **24**(11): p. 1980-7.
84. Geiger, J., et al., *Monitoring of clopidogrel action: comparison of methods*. *Clin Chem*, 2005. **51**(6): p. 957-65.
85. Huo, Y. and K.F. Ley, *Role of platelets in the development of atherosclerosis*. *Trends Cardiovasc Med*, 2004. **14**(1): p. 18-22.
86. Willoughby, S., A. Holmes, and J. Loscalzo, *Platelets and cardiovascular disease*. *Eur J Cardiovasc Nurs*, 2002. **1**(4): p. 273-88.
87. Fateh-Moghadam, S., et al., *Changes in surface expression of platelet membrane glycoproteins and progression of heart transplant vasculopathy*. *Circulation*, 2000. **102**(8): p. 890-7.
88. Fateh-Moghadam, S., et al., *Platelet degranulation is associated with progression of intima-media thickness of the common carotid artery in patients with diabetes mellitus type 2*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005. **25**(6): p. 1299-303.
89. Gawaz, M., *Role of platelets in coronary thrombosis and reperfusion of ischemic myocardium*. *Cardiovasc Res*, 2004. **61**(3): p. 498-511.
90. Bednar, M., et al., *Neutrophil depletion suppresses 111In-labeled platelet accumulation in infarcted myocardium*. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1985. **7**(5): p. 906-12.
91. Gawaz, M., et al., *Activated platelets induce monocyte chemotactic protein-1 secretion and surface expression of intercellular adhesion molecule-1 on endothelial cells*. *Circulation*, 1998. **98**(12): p. 1164-71.
92. Neumann, F.J., et al., *Effect of glycoprotein IIb/IIIa receptor blockade on platelet-leukocyte interaction and surface expression of the leukocyte integrin Mac-1 in acute myocardial infarction*. *J Am Coll Cardiol*, 1999. **34**(5): p. 1420-6.
93. Hognestad, A., et al., *Platelet activation in heart transplant recipients*. *Clin Transplant*, 2004. **18**(2): p. 142-7.
94. Coppinger, J.A., et al., *Characterization of the proteins released from activated platelets leads to localization of novel platelet proteins in human atherosclerotic lesions*. *Blood*, 2004. **103**(6): p. 2096-104.
95. Pitsilos, S., et al., *Platelet factor 4 localization in carotid atherosclerotic plaques: correlation with clinical parameters*. *Thromb Haemost*, 2003. **90**(6): p. 1112-20.
96. Lemstrom, K., R. Sihvola, and P. Koskinen, *Expression of platelet-derived growth factor in the development of cardiac allograft vasculopathy in the rat*. *Transplant Proc*, 1997. **29**(1-2): p. 1045-6.
97. Koskinen, P.K. and K.B. Lemstrom, *Adhesion molecule P-selectin and vascular cell adhesion molecule-1 in enhanced heart allograft arteriosclerosis in the rat*. *Circulation*, 1997. **95**(1): p. 191-6.

98. Khandoga, A., et al., *Platelet adhesion mediated by fibrinogen-intercellular adhesion molecule-1 binding induces tissue injury in the postischemic liver in vivo*. *Transplantation*, 2002. **74**(5): p. 681-8.
99. Yu, G., et al., *Endothelial expression of E-selectin is induced by the platelet-specific chemokine platelet factor 4 through LRP in an NF-kappaB-dependent manner*. *Blood*, 2005. **105**(9): p. 3545-51.
100. Dietrich, H., et al., *Mouse model of transplant arteriosclerosis: role of intercellular adhesion molecule-1*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000. **20**(2): p. 343-52.
101. O'Brien, K.D., et al., *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. **93**(4): p. 672-82.
102. Gawaz, M., et al., *Platelets induce alterations of chemotactic and adhesive properties of endothelial cells mediated through an interleukin-1-dependent mechanism. Implications for atherogenesis*. *Atherosclerosis*, 2000. **148**(1): p. 75-85.
103. Hermann, A., et al., *Platelet CD40 ligand (CD40L)--subcellular localization, regulation of expression, and inhibition by clopidogrel*. *Platelets*, 2001. **12**(2): p. 74-82.
104. Hakkinen, T., K. Karkola, and S. Yla-Herttuala, *Macrophages, smooth muscle cells, endothelial cells, and T-cells express CD40 and CD40L in fatty streaks and more advanced human atherosclerotic lesions. Colocalization with epitopes of oxidized low-density lipoprotein, scavenger receptor, and CD16 (Fc gammaRIII)*. *Virchows Arch*, 2000. **437**(4): p. 396-405.
105. Urbich, C., et al., *CD40 ligand inhibits endothelial cell migration by increasing production of endothelial reactive oxygen species*. *Circulation*, 2002. **106**(8): p. 981-6.
106. Slupsky, J.R., et al., *Activated platelets induce tissue factor expression on human umbilical vein endothelial cells by ligation of CD40*. *Thromb Haemost*, 1998. **80**(6): p. 1008-14.
107. Larsen, C.P., et al., *CD40-gp39 interactions play a critical role during allograft rejection. Suppression of allograft rejection by blockade of the CD40-gp39 pathway*. *Transplantation*, 1996. **61**(1): p. 4-9.
108. Ensminger, S.M., et al., *Critical role for IL-4 in the development of transplant arteriosclerosis in the absence of CD40-CD154 costimulation*. *J Immunol*, 2001. **167**(1): p. 532-41.
109. Mach, F., et al., *Reduction of atherosclerosis in mice by inhibition of CD40 signalling*. *Nature*, 1998. **394**(6689): p. 200-3.
110. Hawrylowicz, C.M., et al., *Activated platelets express IL-1 activity*. *J Immunol*, 1989. **143**(12): p. 4015-8.
111. Lindemann, S., et al., *Activated platelets mediate inflammatory signaling by regulated interleukin 1beta synthesis*. *J Cell Biol*, 2001. **154**(3): p. 485-90.
112. von Hundelshausen, P., et al., *RANTES deposition by platelets triggers monocyte arrest on inflamed and atherosclerotic endothelium*. *Circulation*, 2001. **103**(13): p. 1772-7.
113. Schwartz, S.M., D. deBlois, and E.R. O'Brien, *The intima. Soil for atherosclerosis and restenosis*. *Circ Res*, 1995. **77**(3): p. 445-65.
114. Campbell, G.R., et al., *Arterial smooth muscle. A multifunctional mesenchymal cell*. *Arch Pathol Lab Med*, 1988. **112**(10): p. 977-86.

115. Scott, N.A., et al., *Identification of a potential role for the adventitia in vascular lesion formation after balloon overstretch injury of porcine coronary arteries*. Circulation, 1996. **93**(12): p. 2178-87.
116. Schwartz, S.M. and C.E. Murry, *Proliferation and the monoclonal origins of atherosclerotic lesions*. Annu Rev Med, 1998. **49**: p. 437-60.
117. Religa, P., et al., *Smooth-muscle progenitor cells of bone marrow origin contribute to the development of neointimal thickenings in rat aortic allografts and injured rat carotid arteries*. Transplantation, 2002. **74**(9): p. 1310-5.
118. Autieri, M.V., *Allograft-induced proliferation of vascular smooth muscle cells: potential targets for treating transplant vasculopathy*. Curr Vasc Pharmacol, 2003. **1**(1): p. 1-9.
119. Savi, P., et al., *The active metabolite of Clopidogrel disrupts P2Y12 receptor oligomers and partitions them out of lipid rafts*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(29): p. 11069-74.
120. Peters, H., et al., *Platelet inhibition limits TGF-beta overexpression and matrix expansion after induction of anti-thy1 glomerulonephritis*. Kidney Int, 2004. **65**(6): p. 2238-48.
121. Le Moine, A., et al., *Critical roles for IL-4, IL-5, and eosinophils in chronic skin allograft rejection*. J Clin Invest, 1999. **103**(12): p. 1659-67.
122. Molero, L., et al., *Effect of clopidogrel on the expression of inflammatory markers in rabbit ischemic coronary artery*. Br J Pharmacol, 2005. **146**(3): p. 419-24.
123. Yoshizumi, M., et al., *Tumor necrosis factor downregulates an endothelial nitric oxide synthase mRNA by shortening its half-life*. Circ Res, 1993. **73**(1): p. 205-9.
124. Zeiher, A.M., et al., *Intracoronary thrombus formation causes focal vasoconstriction of epicardial arteries in patients with coronary artery disease*. Circulation, 1991. **83**(5): p. 1519-25.
125. Lee, P.C., et al., *Endothelial nitric oxide synthase protects aortic allografts from the development of transplant arteriosclerosis*. Transplantation, 2000. **69**(6): p. 1186-92.
126. Quinn, M.J., et al., *Effect of clopidogrel pretreatment on inflammatory marker expression in patients undergoing percutaneous coronary intervention*. Am J Cardiol, 2004. **93**(6): p. 679-84.
127. Ott, I., et al., *Increased neutrophil-platelet adhesion in patients with unstable angina*. Circulation, 1996. **94**(6): p. 1239-46.
128. Rinder, C.S., et al., *Cardiopulmonary bypass induces leukocyte-platelet adhesion*. Blood, 1992. **79**(5): p. 1201-5.
129. Zahler, S., et al., *Acute cardiac inflammatory responses to postischemic reperfusion during cardiopulmonary bypass*. Cardiovasc Res, 1999. **41**(3): p. 722-30.
130. Zeiger, F., et al., *P-Selectin expression, platelet aggregates, and platelet-derived microparticle formation are increased in peripheral arterial disease*. Blood Coagul Fibrinolysis, 2000. **11**(8): p. 723-8.
131. Egger, G., et al., *Blood polymorphonuclear leukocyte activation in atherosclerosis: effects of aspirin*. Inflammation, 2001. **25**(2): p. 129-35.
132. Meyer, B.J., *Thrombozytenhemmer in der Kardiologie*. Schweizer Medizinisches Forum, 2001(7): p. 155-160.
133. Storey, R.F., et al., *The central role of the P(2T) receptor in amplification of human platelet activation, aggregation, secretion and procoagulant activity*. Br J Haematol, 2000. **110**(4): p. 925-34.

134. Trumel, C., et al., *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. **94**(12): p. 4156-65.
135. Aronow, W.S., *Antiplatelet agents in the prevention of cardiovascular morbidity and mortality in older patients with vascular disease*. *Drugs Aging*, 1999. **15**(2): p. 91-101.

# Danksagung

Ich danke PD Dr. med. Stephan Ensminger für die Betreuung meiner Arbeit, die Möglichkeiten der Erweiterung meines beruflichen und privaten Horizontes, der Erlangung neuer Fähigkeiten und das mir entgegen gebrachte Vertrauen sowie die Finanzierung im Rahmen des IZKF. Bei Prof. Dr. med. vet. B. Kaspers bedanke ich mich für die Annahme und Betreuung meiner Arbeit an der LMU.

Prof. Dr. med. M. Weyand danke ich für die Möglichkeit der Durchführung der Arbeiten für meine Promotion unter anderem im Labor für Herzchirurgie und Prof. Dr. med. vet. Reinhold Förster für die Möglichkeit der Nutzung seines hervorragenden Mikroskopes zur Aufnahme meiner Immunfluoreszenz-Bilder, seines Labors zur Durchführung der dafür notwendigen Färbungen und nicht zuletzt für die Hilfe seiner kompetenten und sehr netten Mitarbeiter in der MH Hannover. Ein großes Dankeschön geht an das Labor der Kinderklinik des Uni-Klinikums Erlangen, und hier insbesondere an Frau Gudrun Weißmann, für die Durchführung der Aggregationstests. Dr. med. vet. Dirk Labahn und den Tierpflegern des FPZ danke ich sehr für die Erfüllung meiner Sonderwünsche, das säckeweise Autoklavieren der Klopapier-Rollen und das professionelle Versorgen unserer Mäuse.

Ein besonderer Dank geht an die eifrigen Klorollen-Sammler: meine Eltern, meine langjährige Freundin Marion Eberle, Dr. med. Matthias Fittkau, Familie Ewert, Gudrun Weißmann.

Ich danke Stephanie Helm für die nette Einarbeitung in diverse Arbeitsabläufe. Martina Ramsperger-Gleißner, Martina Wollin und Martina Leis danke ich besonders herzlich für ihre Hilfe, ihre angenehme Gesellschaft und die freundschaftliche Atmosphäre.

Den Mäusen bin ich zutiefst dankbar für ihre amüsante, unterhaltsame Gesellschaft, für ihr Leben, ihre Kooperationsbereitschaft und die nur selten ausgeteilten Bisse.

Meinen Eltern danke ich von ganzem Herzen für alles.

Lars, ich danke Dir unendlich dafür, dass es Dich gibt in meinem Leben.