

**Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. Georg Ertl**

**Die konventionelle Plättchenaggregometrie
unterschätzt das unzureichende Ansprechen auf Clopidogrel bei KHK-Patienten
im Vergleich zu einem P2Y₁₂-spezifischen Test**

Inaugural – Dissertation

**zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

**vorgelegt von
Sarah Weinberger
aus Bad Tölz**

Würzburg, Dezember 2009

Referent: Priv.-Doz. Dr. med. Andreas Schäfer

Koreferent: Prof. Dr. med. Ulrich Walter

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 12. April 2010

Die Promovendin ist Ärztin

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

I) Einleitung	S.1
<u>1) Koronare Herzkrankheit</u>	S.1
a) Epidemiologie der koronaren Herzkrankheit	S.1
b) Klinik der koronaren Herzkrankheit	S.1
c) Pathogenese der koronaren Herzkrankheit	S.2
<u>2) Thrombozyten</u>	S.4
a) Thrombozyten in Entstehung und Progression atherosklerotischer Läsionen	S.4
b) Physiologie der Thrombozytenaktivierung	S.6
c) Hemmung der Thrombozytenaktivierung	S.6
<u>3) Clopidogrel</u>	S.7
a) Wirkung von Clopidogrel	S.7
b) Anwendung von Clopidogrel	S.8
c) Individuelle Unterschiede in der Wirksamkeit von Clopidogrel	S.10
<u>4) Messung der Wirksamkeit von Clopidogrel</u>	S.11
a) Aggregometrische Verfahren	S.11
b) Durchflusszytometrische Verfahren	S.12
c) Schnelltests	S.13
II) Material und Methoden	S.16
<u>1) Material</u>	S.16
a) Studienpopulation	S.16
b) Blutproben	S.17
c) Substanzen	S.17
d) Pufferlösungen	S.18
<u>2) Methoden</u>	S.18
a) Konventionelle Plättchenaggregometrie	S.18
b) Platelet Reactivity Index	S.19
c) Durchflusszytometrische Bestimmung der P-Selektin-Expression	S.21
d) Verschlusszeit im PFA-100®	S.23
<u>3) Auswertung</u>	S.24
a) Statistik	S.24
b) Definitionen	S.24

III) Ergebnisse	S.25
<u>1) Einfluss von Clopidogrel auf die ADP-induzierte Thrombozytenaktivität</u>	S.25
a) Einfluss von Clopidogrel auf die Thrombozytenaggregation	S.25
b) Einfluss von Clopidogrel auf den PRI	S.27
c) Einfluss von Clopidogrel auf die P-Selektin-Expression	S.28
d) Einfluss von Clopidogrel auf die Verschlusszeit	S.30
<u>2) Heterogenität der Thrombozytenhemmung durch Clopidogrel</u>	S.31
a) Heterogenität der ADP-induzierten Aggregation	S.31
b) Heterogenität des PRI	S.33
c) Heterogenität der P-Selektin-Expression	S.35
d) Heterogenität der Verschlusszeit	S.36
<u>3) Korrelation der Methoden untereinander</u>	S.37
a) Korrelation von Aggregation und PRI	S.37
b) Korrelation von Aggregation und P-Selektin-Expression	S.38
c) Korrelation von Aggregation und Verschlusszeit	S.39
<u>4) Häufigkeit von Nonrespondern</u>	S.40
a) Detektion der Nonresponsiveness mit Aggregometrie und PRI	S.40
b) Vorkommen von Nonresponsiveness bei Diabetikern	S.41
<u>5) Einflussfaktoren der Clopidogrel-Responsiveness</u>	S.42
a) Kardiovaskuläre Risikofaktoren	S.42
b) Komorbiditäten	S.43
c) Medikation	S.43
d) Weitere Einflussfaktoren	S.44
IV) Diskussion	S.45
<u>1) Zusammenfassung und Beurteilung der Ergebnisse</u>	S.45
a) Plättchenhemmung durch Clopidogrel	S.45
b) Heterogenität der Plättchenhemmung und Häufigkeit von Nonresponsiveness	S.45
c) Methoden zur Beurteilung der Responsiveness	S.47
d) Einflussfaktoren der Clopidogrel-Responsiveness	S.48

<u>2) Diskussion der Problematik</u>	S.49
a) Die Rolle von Clopidogrel in der Behandlung der KHK	S.49
b) Auswirkungen der Nonresponsiveness	S.51
c) Drug-eluting Stents	S.51
<u>3) Lösungsmöglichkeiten</u>	S.52
a) Generelle Dosissteigerung	S.52
b) Individuelle Dosisanpassung	S.52
c) Neue Substanzen	S.53
V) Zusammenfassung	S.55
VI) Literaturverzeichnis	S.56

I) Einleitung

1) Koronare Herzkrankheit

a) Epidemiologie der koronaren Herzkrankheit

Über 30% der jährlich weltweit etwa 50 Millionen Todesfälle werden durch Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems verursacht.¹ Am häufigsten sind diese meist chronisch verlaufenden Krankheiten in Industrienationen. Dort stellen Herzkrankheiten, die man nach ihrer Entstehung in rheumatisch, hypertensiv, ischämisch und entzündlich unterteilen kann, die führende Todesursache dar.² Einen besonderen Stellenwert unter diesen Entitäten hat die ischämische oder auch so genannte koronare Herzkrankheit (KHK). Sie war bereits 1990 die häufigste Todesursache in den entwickelten Ländern¹ und ist es bis heute: Durch chronische und akute Manifestationen der KHK wurden zum Beispiel in Deutschland im Jahr 2006 mehr als 16% aller Todesfälle verursacht.³ Man nimmt an, dass die Häufigkeit dieses Krankheitsbildes sogar noch weiter zunehmen wird. Denn Ursache dieser akuten oder chronischen Minderversorgung des Herzmuskelgewebes sind atherosklerotische Veränderungen der Herzkranzgefäße. Und die wichtigsten Risikofaktoren, die in einem direkt oder indirekt kausalen Zusammenhang mit deren Genese stehen, sind hohes Alter, Nikotinabusus, Bluthochdruck, erhöhte Blutzucker- und Blutfettwerte, Fettleibigkeit und körperliche Inaktivität.⁴ Bei steigender Lebenserwartung, zunehmender Häufigkeit von Fettleibigkeit, Bluthochdruck und Diabetes in den Industrienationen, aber auch in Entwicklungsländern, wird die koronare Herzkrankheit im Jahr 2020 die führende Todesursache weltweit sein.^{1;2;4}

b) Klinik der koronaren Herzkrankheit

Die der KHK zu Grunde liegende Atherosklerose ist in erster Linie eine chronische Erkrankung der Gefäße, die im Verlauf von Jahrzehnten langsam fortschreitet und für den betroffenen Patienten lange Zeit keine akute Bedrohung darstellt. Mit zunehmender Progredienz steigt aber das Risiko für chronische Begleiterkrankungen und akute, lebensbedrohliche Komplikationen. Bei letzteren handelt es sich im Falle der KHK vor allem um plötzliche Verschlüsse von Koronararterien durch Thromben. Im günstigsten Fall äußert sich die resultierende akute Minderversorgung des Herzens (akutes Koronarsyndrom, ACS) nur in Form von Muskelschmerzen, der so genannten Brustenge oder Angina pectoris. Der Sauerstoffmangel kann jedoch so ausgeprägt sein,

dass das betroffene Herzmuskelgewebe abstirbt und einen Herzinfarkt oder sogar den plötzlichen Herztod zur Folge hat.⁵ Bei der chronischen Form der KHK bewirkt die langsame Größenzunahme von meist komplizierten Plaques eine progrediente Abnahme des Blutflusses durch die betroffenen Herzkranzgefäße. Ab einer 80-90%igen Lumeneinengung ist die Versorgung des Herzmuskels in der Regel so stark beeinträchtigt, dass hypoxisch bedingte pectanginöse Beschwerden auftreten. Typischerweise manifestieren sie sich zunächst unter Belastung, wenn der Sauerstoffbedarf des Herzmuskels besonders hoch und die Diastole, in der das Blut durch die Koronarien fließt, kurz ist. Okklusive Thromben mit der Klinik eines akuten Koronarsyndroms bilden sich auf den stenotischen Läsionen vergleichsweise selten.⁶ Wird die zugrunde liegende Gefäßenge aber nicht rechtzeitig therapiert, droht eine irreversible Schädigung des chronisch minderversorgten Herzmuskelgewebes. Diese kann eine Herzinsuffizienz und gefährliche Herzrhythmusstörungen zur Folge haben.

c) Pathogenese der koronaren Herzkrankheit

Bei der Erforschung der wesentlichen pathogenetischen Mechanismen, die zu den verschiedenen Manifestationsformen der KHK führen, hat man in den letzten Jahren enorme Fortschritte gemacht. Die Ergebnisse wurden in einem komplexen Modell zusammengefasst. Demnach geht man heute davon aus, dass ein zentrales Merkmal der Krankheit die Interaktion und gegenseitige Verstärkung von Entzündungsreaktion und Thrombosierung ist.⁷⁻⁹ Da Gefäßwandveränderungen und akute Verschlüsse somit in ihrer Entstehung eng miteinander verflochten sind, werden Atherosklerose und Thrombose im Folgenden unter dem Begriff der Atherothrombose zusammengefasst. Nach bisherigen Erkenntnissen handelt es sich bei ihr um eine systemische Krankheit, die primär die innerste Wandschicht, die so genannte Intima, der großen und mittelgroßen Arterien betrifft,^{10;11} und sich typischerweise über mehrere Jahrzehnte entwickelt.⁵ Ausgangspunkt ist wahrscheinlich ein funktioneller oder struktureller Schaden der innersten Zellschicht der Gefäße, dem Endothel. Dieser kann zum Beispiel durch erhöhten Blutdruck, hohe Blutzucker- und Blutfettwerte, freie Radikale, wie sie beim Zigarettenrauchen entstehen, oder bestimmte Erreger verursacht werden. In der Regel ist aber eine Kombination dieser und anderer Faktoren für die endotheliale Dysfunktion verantwortlich.¹² Da das Endothel ein multifunktionelles Organ ist, das viele komplexe Vorgänge reguliert, manifestiert sich seine Störung auf mehreren

Ebenen: Die Anheftung von weißen Blutkörperchen (Leukozyten) und Blutplättchen (Thrombozyten) an die Gefäßwände wird erleichtert, und die neuen Oberflächeneigenschaften fördern nun die Gerinnung, anstatt sie zu hemmen. Außerdem werden verschiedenste Botenstoffe freigesetzt, die unter anderem Entzündungszellen wie Monozyten und Lymphozyten anlocken.¹³ Eine der pathogenetisch wichtigsten Veränderungen ist aber, dass die Durchgängigkeit des Endothels für verschiedenste Substanzen steigt. Dies führt dazu, dass sich im Blut zirkulierende Lipoproteine wie das cholesterinreiche Low Density Lipoprotein (LDL) in die Intima einlagern können.⁶ Besteht gleichzeitig ein Mangel an High Density Lipoprotein (HDL), das die Fähigkeit besitzt, Cholesterin von LDL zu übernehmen und ins Blut zurückzuführen, reichern sich die Fette in der Gefäßwand an. Dort können sie durch Enzyme oder reaktive Sauerstoffspezies modifiziert werden. Die so entstandenen biologisch aktiven Fette induzieren eine Entzündungsreaktion und wirken somit proinflammatorisch. In Folge dessen wandern Monozyten in die Gefäßwand ein, wo sie sich zu Fresszellen (Makrophagen) differenzieren und modifiziertes LDL aufnehmen. Nach ihrem histologischen Erscheinungsbild, das aus den multiplen intrazellulären Fettröpfchen resultiert, werden diese auch als Schaumzellen bezeichnet. Sie setzen Botenstoffe wie Zytokine und Wachstumsfaktoren frei, die eine Aufrechterhaltung der Entzündungsreaktion mit Anlockung weiterer Entzündungszellen, Teilung glatter Muskelzellen, Produktion extrazellulärer Matrix und zunehmender Degeneration des ursprünglichen intimalen Gewebes bewirken.⁵ Pathologisches Korrelat dieser Vorgänge sind mit dem Lebensalter fortschreitende Veränderungen der Gefäßwände. So entstehen schon in jungen Jahren Vorläuferläsionen, die im Wesentlichen aus Ansammlungen von Schaumzellen, extrazellulären Fettröpfchen und glatten Muskelzellen bestehen.¹⁴ Diese verursachen zwar noch keine Symptome oder Komplikationen, können sich aber bei anhaltender Entzündungsreaktion zu fortgeschrittenen Läsionen weiterentwickeln. Durch quantitative Zunahme und Konfluens der extrazellulären Lipidtröpfchen entstehen atherosklerotische Plaques mit einem zentralen Lipidkern. Dieser verändert und verdrängt das ursprüngliche Gewebe der Intima. Außerdem induziert er die Bildung von faserreichem Bindegewebe, das schließlich den Lipidkern in Form einer fibrösen Kappe bedeckt. Aus dem ursprünglichen Atherom ist ein so genanntes Fibroatherom geworden. Bei diesen beiden Formen des fibrösen Plaques handelt es sich um

unkomplizierte Läsionen, die in der Regel erst klinisch relevant werden, wenn Material tieferer Schichten an die Oberfläche gelangt. Auslöser der Freilegung ist die übermäßige mechanische Beanspruchung eines instabilen Plaques. Dessen Vulnerabilität wird von verschiedenen Faktoren beeinflusst. So spielen Zusammensetzung und Morphologie der Läsion eine entscheidende Rolle.¹⁵ Und auch die Aktivität der lokalen und systemischen Entzündungsprozesse ist wichtig.^{9;10;16} Vor allem das Vorkommen von Makrophagen im Plaque ist prognostisch bedeutsam,¹⁷ denn sie setzen Matrixmetalloproteinasen (MMPs) frei, die eine enzymatische Degeneration des stabilisierenden Bindegewebes bewirken.^{6;18}

2) Thrombozyten

a) Thrombozyten in Entstehung und Progression atherosklerotischer Läsionen

Diese Progression fibröser Plaques zu komplizierten Läsionen unterscheidet sich von den bisherigen Vorgängen grundlegend: Durch die Freilegung subendothelialer Strukturen kommt es zur Aktivierung von Thrombozyten, die wandständige Thromben bilden.¹⁹ Das Ausmaß der thrombotischen Antwort und der resultierenden Obstruktion hängt von Art und Menge des freigesetzten thrombogenen Materials, dem Grad einer eventuell präexistenten Stenose und der systemischen Thromboseneigung ab. So wird sich zum Beispiel bei Rauchern, in deren Plasma Fibrinogen in besonders hohen Konzentrationen vorkommt, schneller ein thrombozytäres Aggregat bilden, als bei Nichtrauchern. Handelt es sich nur um einen kleinen Endotheldefekt, ist der thrombogene Stimulus in der Regel nur gering. Bei einer vollständigen Plaqueruptur dahingegen kommt es zur Freisetzung von Kollagen und Gewebefaktor.²⁰ Diese können die Bildung eines großen Thrombus induzieren, der den Blutstrom massiv behindert und meist mit akuten pectanginösen Beschwerden einhergeht. In bereits stenotischen Gefäßen reicht in der Regel schon ein kleiner Thrombus aus, um ein Gefäß vollständig zu verschließen.²¹ Für das betroffene Gebiet hat das aber häufig keine klinische Relevanz, da sich durch die schon bestehende chronische Minderversorgung bereits Kollateralkreisläufe ausbilden konnten,¹⁹ so dass nur etwa ein Drittel aller akuten Koronarsyndrome durch Ruptur stenosierender Plaques entstehen.²² Kleine Thromben in Gefäßen ohne präexistente Stenosen werden in der Regel keine akute Symptomatik zur Folge haben. Allerdings wird durch sie die Gefäßwand weiter geschädigt und

deformiert. So kommt es durch wiederholte thrombogene Stimuli zu einem episodischen Wachstum des Thrombus, der intermittierend zwar wieder abgebaut werden kann, allerdings das Gefäßlumen auch progredient verschließt.⁶ Blutplättchen spielen also eine wesentliche Rolle bei der Progression fortgeschrittener Läsionen zu komplizierten Plaques. Ihre Aktivierung durch eine Störung der endothelialen Barriere ist einfach zu erklären. Denn die wichtigste Aufgabe der kernlosen Zellfragmente ist die primäre Hämostase, also die schnelle Blutstillung bei Verletzung von Blutgefäßen.²³ Dazu müssen sie in der Lage sein entsprechende Defekte in der Gefäßwand zu detektieren. Neuere Erkenntnisse zeigen aber, dass Blutplättchen schon bei der Entstehung atherosklerotischer Vorläuferläsionen beteiligt sind.²³⁻²⁵ Bereits eine funktionelle Störung des Endothels führt zur vermehrten Ausschüttung von Zytokinen und Expression von Adhäsionsmolekülen. Zirkulierende Blutplättchen können sich so zum Beispiel durch Bindung ihres oberflächlichen Glykoproteins GPIb an endotheliales P-Selektin (CD62P) oder von-Willebrand-Faktor locker an die Gefäßwand anlagern.^{25;26} Die folgende feste Adhäsion der Thrombozyten geht mit ihrer Aktivierung einher. Es kommt zur Degranulation mit Freisetzung proinflammatorischer Zytokine und Chemokine.²⁷ Außerdem exprimieren sie Adhäsionsmoleküle wie CD62P und CD40Ligand auf ihrer Oberfläche.²⁸ CD40Ligand spielt eine entscheidende Rolle bei der Stabilisierung arterieller Thromben²⁹ und löst wie das Zytokin Interleukin-1 β eine Entzündungsreaktion der Endothelzellen aus.^{30;31} P-Selektin interagiert unter anderem mit dem leukozytären Rezeptor GPIb, wodurch es zur Bildung von Leukozyten-Thrombozyten-Aggregaten kommt.³² Die Leukozyten können sich dann durch Bindung endothelialer Adhäsionsmoleküle fest an die Gefäßwand anlagern.³³ Letztendlich schütten sowohl das aktivierte Endothel, als auch die so aktivierten weißen Blutkörperchen proinflammatorische Zytokine aus. Sie bewirken die Rekrutierung von Monozyten, die in die Intima einwandern.³⁴ Insgesamt induzieren aktivierte Blutplättchen also eine Entzündungsreaktion, in deren Folge es zu Initiation und Progression atherosklerotischer Läsionen kommt. Es scheint sogar so zu sein, dass die Adhäsion aktivierter Thrombozyten an die Gefäßwand für die nachfolgende Rekrutierung weißer Blutkörperchen obligatorisch ist.²⁵ Außerdem ist die Inflammation ein wichtiger Faktor bei der Plaqueruptur, die wiederum die Aktivierung von Blutplättchen bewirkt.

b) Physiologie der Thrombozytenaktivierung

Thrombozyten können durch verschiedenste Mechanismen aktiviert werden. Die physiologische Aktivierung im Rahmen der primären Hämostase wird durch Gefäßverletzungen mit Zerstörung von Endothel und Freilegung tieferer Gefäßschichten ausgelöst. Nach einer ersten reversiblen Interaktion adherieren die Blutplättchen fest an die Gefäßwand. Dies geschieht durch Bindung von subendothelialen Proteinen wie Kollagen und von-Willebrand-Faktor an die thrombozytären Glykoproteine GPVI und GPIIb. Durch diese Ligand-Rezeptor-Interaktion wird eine Kaskade von Reaktionen in Gang gesetzt, die letztendlich eine Aktivierung der Plättchen induziert. Sie verändern durch die Ausbildung von Pseudopodien ihre Form so, dass eine effektivere Abdichtung der Gefäßwand möglich ist. Außerdem synthetisieren die aktivierten Thrombozyten aus Arachidonsäure Thromboxan A₂ (TxA₂) und es kommt zur Entleerung sekretorischer Granula, wodurch große Mengen an ADP, ATP, Serotonin und Calcium freigesetzt werden. Diese Stoffe verstärken wie TxA₂ die Thrombozytenaktivierung und bewirken eine Rekrutierung großer Mengen bisher noch ruhender Plättchen, welche sich in der Phase der primären Aggregation zunächst locker miteinander verbinden. Dabei spielt das membranständige Glykoprotein GPIIb/IIIa eine entscheidende Rolle. Es hat im Rahmen der Thrombozytenaktivierung seine Konformation so geändert, dass es freies Fibrinogen binden kann. Dies ermöglicht die Vernetzung der Plättchen zu einem Thrombus, der im Folgenden durch die Umwandlung der Fibrinogenbrücken zu Fibrin im Rahmen der sekundären Hämostase stabilisiert wird.²³

c) Hemmung der Thrombozytenaktivierung

Betrachtet man die wichtige Rolle, die Plättchen bei der Entstehung der Atherothrombose spielen, ist es nicht verwunderlich, dass die effektive Hemmung der Thrombozytenaktivität ein wesentlicher Bestandteil der Behandlung der akuten und chronischen KHK ist.³⁵ Basierend auf den komplexen Aktivierungsvorgängen kann man sich prinzipiell verschiedenste Ansatzpunkte für plättchenhemmende Substanzen vorstellen. Dazu gehören Eingriffe in den Arachidonsäuremetabolismus, Erhöhung der thrombozytären cAMP-Konzentration und Blockade von Rezeptoren, die bei Interaktion mit ihren Liganden eine Adhäsion, Aggregation oder Aktivierung der Thrombozyten bewirken. Da verschiedene Aktivierungsmechanismen in gleichen Signalwegen zusammenlaufen, also eine gewisse Redundanz besteht, ist es aber schwierig die

Aktivierung durch eine Substanz vollständig zu unterdrücken. Das bekannteste plättchenhemmende Medikament ist Acetylsalicylsäure (ASS), dessen inhibitorische Wirkung auf Thrombozyten bereits vor über 40 Jahren beschrieben wurde.³⁶ Durch die irreversible Hemmung der Zykllooxygenase 1 (COX-1) wird die Synthese von TxA₂ aus Arachidonsäure verhindert.³⁷ Leider ist ASS mit einigen negativen Eigenschaften behaftet, zu denen ein ungünstiges Nebenwirkungsprofil gehört. Dieses resultiert aus der unspezifischen Hemmung der Zykllooxygenase 2 (COX-2), die im Körper ubiquitär vorkommt und einige wichtige Funktionen hat.³⁸ So ist zum Beispiel die endotheliale Synthese des vasoprotektiv wirkenden Prostaglandins PGI₂ hauptsächlich von COX-2 abhängig.³⁹ Die wesentlich bessere Wahl wäre ein effektives und spezifisch auf Thrombozyten wirkendes Medikament. Als Ansatzpunkt für dieses bietet sich der oben schon erwähnte Fibrinogenrezeptor GPIIb/IIIa an. Denn bei dessen Blockade kann der zentrale Schritt der Aggregation, die Vernetzung der Thrombozyten über Fibrinogen zu einem Thrombus, nicht stattfinden. Parenteral verfügbare GPIIb/IIIa-Antagonisten wie Abciximab, Eptifibatid und Tirofiban werden in der Klinik erfolgreich bei akuten Koronarsyndromen eingesetzt.⁴⁰ Die Bioverfügbarkeit von oral applizierbaren GPIIb/IIIa-Antagonisten ist jedoch für eine wirksame Sekundärprävention ischämischer Ereignisse nicht ausreichend.⁴¹⁻⁴⁴

3) Clopidogrel

a) Wirkung von Clopidogrel

Anfang der 1970er Jahre stieß man zufällig auf die Lösung des Problems. Auf der Suche nach einem neuen entzündungshemmenden Medikament entwickelte man das Thienopyridin Ticlopidin. Seine antiinflammatorische Wirkung konnte zwar nicht überzeugen, dafür fand man aber schnell heraus, dass die neue Substanz die Aktivierung von Thrombozyten effektiv reduziert.⁴⁵ Die Einnahme von Ticlopidin führte zu einer Verlängerung der Blutungszeit und zu einer verzögerten Stabilisierung von Thromben.⁴⁶ Aufgrund des relativ ungünstigen Nebenwirkungsprofils von Ticlopidin, entwickelte man das besser verträgliche und ebenso gut wirksame Thienopyridin Clopidogrel. Als Angriffspunkt beider Medikamente identifizierte man 2001 den ADP-Rezeptor P2Y₁₂.⁴⁷

Bei diesem handelt es sich um einen von zwei G-Protein-gekoppelten P2Y Rezeptoren, die für die Effekte von ADP auf Thrombozyten verantwortlich sind.⁴⁸ (s. Abb. 1)

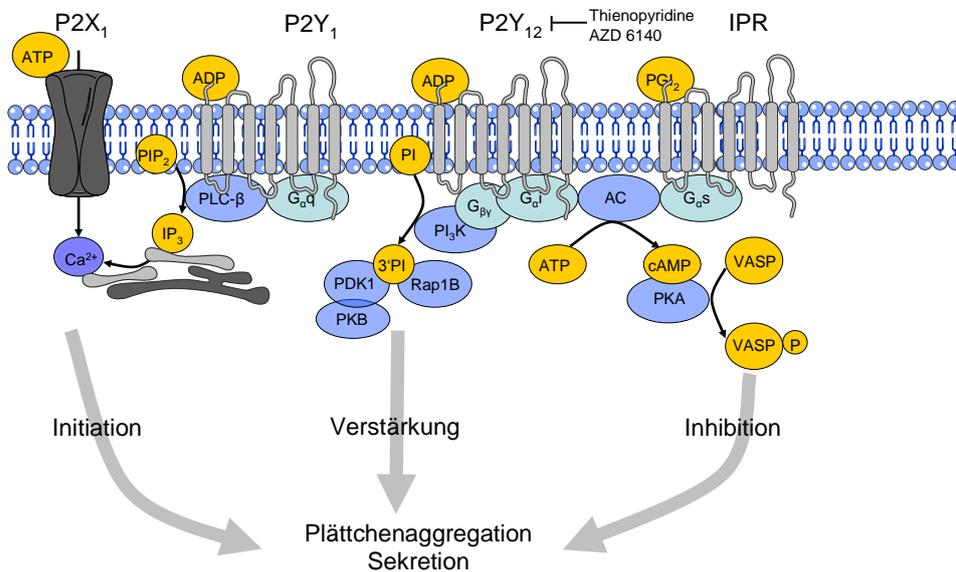


Abbildung 1: Wirkung von ADP auf seine Rezeptoren P2Y₁ und P2Y₁₂

P2Y₁ spielt eine Schlüsselrolle bei den ersten Schritten der Thrombusbildung. Durch die G_{αq}- und Phospholipase C-vermittelte Freisetzung von Calcium aus den inneren Speicherorganen der Thrombozyten, kommt es zu deren Aktivierung und Formveränderung mit der Ausbildung von Pseudopodien.^{49;50} Die Effekte von P2Y₁₂ werden über das G-Protein G_i vermittelt. Dessen α-Untereinheit inhibiert die Adenylatzyklase, die für den Umbau von ATP zu cAMP verantwortlich ist, so dass die cAMP-Konzentration abnimmt.^{51;52} Dies beeinflusst eine Vielzahl anderer Reaktionen, wie zum Beispiel die cAMP-abhängige Phosphorylierung von VASP (vasodilator-stimulated phosphoprotein), die invers mit der Bindung von Fibrinogen an GPIIb/IIIa korreliert.⁵³ Letztendlich werden die Effekte aller bekannten Plättchenagonisten (Kollagen, Thrombin, TxA₂, Adrenalin, Serotonin, etc.), verstärkt. Damit ist P2Y₁₂ für die Aufrechterhaltung der Plättchenaggregation und somit Wachstum und Stabilisierung von Thromben entscheidend.⁵¹

Die Thienopyridine Ticlopidin und Clopidogrel hemmen den P2Y₁₂ Rezeptor selektiv und irreversibel, so dass eine Verstärkung der Plättchenagonisten ausbleibt. Das hat indirekt zur Folge, dass auch die Konformationsänderung von GPIIb/IIIa, die erst die Bindung von freiem Fibrinogen ermöglicht, verhindert wird.

b) Anwendung von Clopidogrel

In vielen großen Studien wurde die gute Wirksamkeit und Verträglichkeit von Clopidogrel belegt.^{45;54} Die CAPRIE-Studie (clopidogrel versus aspirin in patients at risk of ischaemic events) zeigte bereits 1996 die Überlegenheit von Clopidogrel

gegenüber Aspirin bei der Sekundärprävention ischämischer Ereignisse. Bei 19185 Patienten mit frischen arteriellen Verschlüssen (Herzinfarkt, Hirninfarkt) oder einer klinisch manifesten peripheren arteriellen Verschlusskrankheit konnte das Risiko innerhalb eines Jahres einen Herzinfarkt oder Schlaganfall zu erleiden oder aufgrund einer kardiovaskulären Komplikation zu versterben durch eine Tagesdosis von 75 mg Clopidogrel von 5,83% auf 5,32% gesenkt werden. Das entspricht einer relativen Risikoreduktion (RRR) von 8,7%⁵⁵ und ist ein beachtlicher Erfolg, wenn man bedenkt, dass die Patienten der Kontrollgruppe ASS 325 mg täglich bekamen, für das allein eine RRR von etwa 25% gezeigt wurde. In Hochrisiko-Subpopulationen (Patienten mit Diabetes mellitus⁵⁶, Zustand nach Revaskularisierung⁵⁷ und Zustand nach ischämischen Ereignissen⁵⁸) war der Benefit noch größer. Außerdem war das Risiko einer gastrointestinalen Blutung unter Clopidogrel signifikant geringer als unter ASS. Die Raten anderer relevanter häufiger Nebenwirkungen zeigten keine bedeutenden Unterschiede.⁵⁵ Daraufhin wurde Clopidogrel 1997 für die sekundäre Prävention ischämischer Ereignisse zugelassen.⁵⁹ 2001 wurden dann die Ergebnisse der CURE-Studie (clopidogrel in unstable angina to prevent recurrent ischemic events) veröffentlicht. Studienteilnehmer waren 12562 Patienten mit einem akuten Koronarsyndrom ohne ST-Hebungen im EKG. Es zeigte sich, dass sie unter einer Standardmedikation mit ASS von der zusätzlichen Gabe von Clopidogrel profitierten. Das Risiko eines kardiovaskulär bedingten Todes, Herzinfarkts oder Schlaganfalls konnte durch das Thienopyridin von 11,4% auf 9,3% gesenkt werden (RRR = 18,4%).⁶⁰ Damit wurde die Rolle von Clopidogrel als neues hocheffektiv plättchenhemmendes Medikament zur Behandlung der Atherothrombose bestätigt. Es folgten weitere große Studien, die die gute Wirksamkeit von Clopidogrel vor allem in bestimmten Patientenkollektiven untermauerten.⁶¹⁻⁶⁴ Bei solch fundierten Daten ist es nicht verwunderlich, dass es sich bei Clopidogrel inzwischen um ein Standardmedikament handelt, das in vielen Behandlungsleitlinien zu finden ist.^{40;65} Als Standard gilt in den Leitlinien jeweils eine Tagesdosis (Maintenance Dose, MD) von 75 mg nach einer einmaligen Startdosis (Loading Dose, LD) von 300-600 mg. Die Dosierung ist so gewählt, dass bei gesunden Probanden eine etwa 50%ige Plättchenhemmung erreicht wird.^{66;67}

c) Individuelle Unterschiede in der Wirksamkeit von Clopidogrel

Leider gibt es aber eine beträchtliche Anzahl von Patienten mit ischämischen Ereignissen trotz Behandlung mit ASS und Clopidogrel. 8,5% der Patienten unter einer solchen dualen Antiplättchentherapie erleiden innerhalb eines Jahres ein ischämisches Ereignis in Form von Herzinfarkt, Schlaganfall oder Tod. Insgesamt ist über diesen Zeitraum bei mehr als 20% der Patienten eine Revaskularisierung erforderlich.⁶⁴ 2002 zeigte eine erste Studie den möglichen Grund hierfür: Nicht alle Patienten sprechen gleich gut auf Clopidogrel an.⁶⁸ Es folgten zahlreiche Veröffentlichungen, die diese individuellen Unterschiede in der Wirksamkeit des Plättchenhemmers bestätigten.⁶⁹ Das Phänomen, dass Patienten unter Clopidogrel in Standarddosierung im Vergleich zum unbehandelten Zustand nur geringe Unterschiede in der ADP-induzierten Plättchenaktivierung zeigen, wurde mit Clopidogrel-Resistenz oder -Nonresponsiveness bezeichnet. Als Ursache einer solch insuffizienten Thrombozytenhemmung werden verschiedenste Mechanismen diskutiert. So könnte etwa die mangelhafte hepatische Metabolisierung des Medikaments für eine schwächere Wirkung verantwortlich sein. Denn normalerweise wird ein Teil der wirkungslosen Vorläufersubstanz Clopidogrel in der Leber durch das Cytochrom P450 abhängige Enzym CYP3A4 zum aktiven Thiolderivat umgebaut.⁷⁰⁻⁷² Die individuell unterschiedliche Aktivität von CYP3A4 korreliert in Studien mit dem Ansprechen auf Clopidogrel.^{59;73} Es kommt aber auch ein Polymorphismus von P2Y₁₂ in Frage. *Fontana et al* konnten zeigen, dass einer der Haplotypen des Rezeptors mit einer überdurchschnittlich starken ADP-induzierten Thrombozytenaktivierung assoziiert ist.⁷⁴ Ebenso könnte eine verminderte intestinale Absorption ursächlich sein.⁷⁵ Es kommen also verschiedenste Gründe für ein vermindertes Ansprechen auf Clopidogrel in Frage. Bei vielen Patienten kann jedoch durch Steigerung der Dosis eine bessere Wirkung erreicht werden. In diesen Fällen ist der Begriff Clopidogrel-Resistenz nicht angebracht, weshalb man in letzter Zeit eher zu den Begriffen des Nonresponders bzw. des Lowresponders tendiert. Diese scheinen höhere Dosen zu benötigen, um den antithrombozytären Effekt eines Responders zu erreichen.⁷⁶⁻⁸⁰ Da eine Dosissteigerung aber Gefahren wie Neutropenie und eine erhöhte Blutungsneigung⁶⁶ mit sich bringt, sollte sie nur bei entsprechender Notwendigkeit erfolgen. Voraussetzung für eine individuelle Dosisanpassung ist die quantitative Messung der Thrombozytenhemmung durch Clopidogrel.

4) Messung der Wirksamkeit von Clopidogrel

a) Aggregometrische Verfahren

Anfang des 20. Jahrhunderts wurde in Frankreich mit der Blutungszeit das erste Verfahren zur Beurteilung der Plättchenfunktion entwickelt. Die Zeit bis zum Blutungsstillstand einer standardisierten Wunde am Patienten ist von der Aggregabilität der Plättchen abhängig. Der Test ist physiologisch zwar relevant, hat jedoch viele Nachteile wie die fehlende Spezifität, eine hohe Variabilität abhängig vom Untersucher und die Entstehung von Narben,⁸¹ so dass die klinische Messung der Blutungszeit nicht mehr empfohlen wird.⁸² Eine spezifischere Bestimmung der Aggregation ist mit in-vitro-Verfahren wie der konventionellen turbidimetrischen Plättchenaggregometrie in plättchenreichem Plasma (PRP) und der Impedanzaggregometrie möglich. Letztere Methode hat den Vorteil, dass mit Vollblut gearbeitet werden kann, wodurch der arbeits- und zeitintensive Arbeitsschritt der PRP-Herstellung entfällt. Durch eine verdünnte, antikoagulierte Vollblutprobe wird mit Hilfe von zwei Platinelektroden Strom geleitet. Dies führt zu einer Adhäsion von Blutplättchen an die Elektroden. Wird ein Plättchenagonist hinzu gegeben, kommt es zur Anlagerung von Thrombozyten an die auf der Elektrode adhären Plättchen. Der folgende Anstieg des elektrischen Widerstandes, der von dem Gerät aufgezeichnet wird, verhält sich proportional zur Thrombozytenaggregation.^{83;84} Die konventionelle Plättchenaggregometrie beruht auf dem Prinzip, dass die optische Dichte einer Partikelsuspension abhängig von der Partikelanzahl und nicht ihrer Größe ist. Nach Zusatz von Plättchenagonisten zu PRP setzt die Aggregation der Plättchen ein. Es kommt zum Auftreten großer Plättchenaggregate und einer Zunahme der Lichttransmission bei abnehmender optischer Dichte. Die Lichttransmission wird fortlaufend photometrisch registriert und in Kurvenform kontinuierlich aufgezeichnet. Aus ihren Änderungen leiten sich die Maße für die Aggregabilität der Thrombozyten ab. So kann mit aggregometrischen Verfahren die wichtigste Funktion von Thrombozyten beurteilt werden. Nachteil beider Methoden ist, dass der Plättchenagonist ADP die Aggregation auch über den P2Y₁-Rezeptor beeinflusst, so dass die Verfahren nicht spezifisch für den P2Y₁₂-Rezeptor sind.^{85;86} Zusätzlich bewirken hohe interindividuelle Unterschiede in der Aggregation im unbehandelten Zustand, dass die Methoden nur aussagekräftig sind, wenn die Aggregation vor und nach Behandlung mit Clopidogrel gemessen wird.⁸⁷ Ist zum

Beispiel bei einem Patienten die Aggregation bereits vor der Einnahme von Clopidogrel relativ gering, so kann nach der Einnahme die erreichte Hemmung leicht überschätzt werden. Die konventionelle Plättchenaggregometrie hat außerdem den Nachteil, dass das Vollblut innerhalb von zwei Stunden zu PRP weiterverarbeitet werden muss, woraus ein hoher Zeit- und Personalaufwand resultiert.⁸² Im Gegensatz zur Impedanzaggregometrie ist sie aber spezifischer für die Thrombozytenaktivität, da es nicht die Möglichkeit gibt, dass andere Zellen die Aggregation beeinflussen.

b) Durchflusszytometrische Verfahren

Die Durchflusszytometrie erlaubt die Analyse von Einzelzellen, die bei konstantem Fluss durch einen Laserstrahl detektiert werden. Durch spezifische Photodioden können Streulicht und Fluoreszenzintensität registriert werden. So können die Zellen anhand dem der Zellgröße entsprechenden Vorwärtsstreulicht (forward scatter), dem der Granularität entsprechenden Seitwärtsstreulicht (side scatter) und der mittleren Immunfluoreszenz charakterisiert werden. Letztere entspricht der Menge an gebundenen fluoreszierenden Antikörpern. So lässt sich mit Hilfe von spezifisch bindenden Antikörpern eine Aussage über das Expressionsmuster intra- und extrazellulärer Moleküle der Thrombozyten treffen. Da sich dieses bei Aktivierung ändert,²⁸ kann so die Plättchenaktivität auf molekularer Ebene beurteilt werden. Am weitesten verbreitet ist die Bestimmung des Oberflächenmarkers CD62P, der Teil der Membran der α -Granula ist und nach Degranulation auf der Plättchenoberfläche exprimiert wird.^{88;89} Es wird also wie bei den aggregometrischen Verfahren einer der letzten Schritte der Plättchenaktivierung beurteilt, der auf vielen Ebenen beeinflussbar und somit relativ unspezifisch ist. Eine für den P2Y₁₂-Rezeptor spezifische Methode ist die Bestimmung des Platelet Reactivity Index (PRI). Dies geschieht mit Hilfe der durchflusszytometrischen Messung der VASP-Phosphorylierung in Thrombozyten, die von P2Y₁₂ über die intrazelluläre Signaltransduktion beeinflusst wird. (s. Abb. 2) Bestimmt man die Menge von phosphoryliertem VASP (VASP-P) nach Stimulation mit PGE₁ und vergleicht sie mit der VASP-P-Menge nach Stimulation mit PGE₁ und ADP, zeigt sich, wie groß die P2Y₁₂ vermittelte Wirkung von ADP ist.⁹⁰

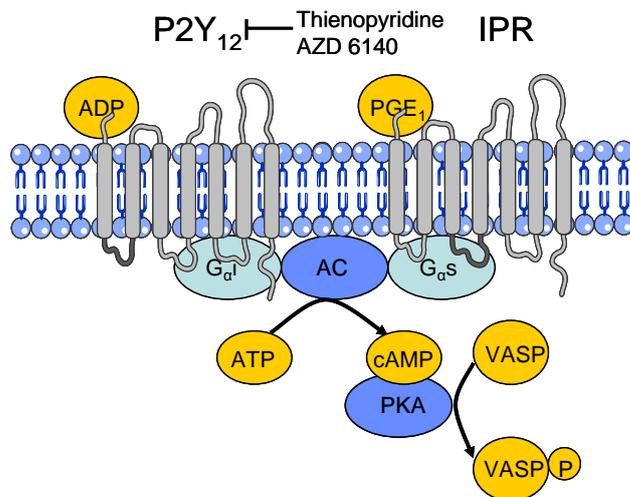


Abbildung 2: Die VASP-Phosphorylierung beeinflussende Signaltransduktion

Die Phosphorylierung des intrathrombozytären Proteins VASP wird unter anderem von der Proteinkinase A (PKA) gesteuert. Deren Aktivität ist abhängig von der intrazellulären cAMP-Konzentration, die wiederum durch die Adenylatzyklase (AC) reguliert wird. Bei Aktivierung der AC kommt es so zu einem Anstieg der cAMP-Konzentration und der VASP-Phosphorylierung. PGE₁ bewirkt über seinen Rezeptor IPR und die α-Untereinheit des regulatorischen G-Proteins G_s eine Aktivierung, ADP über den P2Y₁₂-Rezeptor und G_{ai} eine Inhibierung der AC.^{91;92}

Ändert sich die VASP-P-Immunfluoreszenz nur wenig, ist der P2Y₁₂-Rezeptor gut inhibiert, so dass ADP kaum wirken kann. Eine große Differenz zwischen den beiden Proben spricht dahingegen für eine fehlende bzw. mangelhafte Inhibition des ADP-Effekts. Wesentliche Vorteile dieser Methode sind, dass nur wenig Vollblut benötigt wird, und dass die Wirkung von Clopidogrel auch ohne einen Referenzwert vor Einnahme beurteilt werden kann.^{86;93} Außerdem ist der Test im Gegensatz zu vielen anderen Verfahren für P2Y₁₂ spezifisch, so dass dieser Test in Zukunft wahrscheinlich der Standard für die Ermittlung der Wirksamkeit von Clopidogrel sein wird.⁹⁴

c) Schnelltests

Alle bisher beschriebenen Verfahren haben den Nachteil, dass sie zeitaufwändig sind und speziell geschulte Mitarbeiter benötigt werden.⁸² Das macht einen Einsatz im klinischen Alltag schwierig. Schnellere und einfachere Tests der Plättchenfunktion wären dafür geeigneter. Ein Beispiel für solch einen Schnelltest ist die im Platelet

Function Analyzer (PFA-100[®]) bestimmte Verschlusszeit. Das Gerät simuliert in seinem Messsystem die Verhältnisse in einem verletzten Gefäß. (s. Abb. 3)

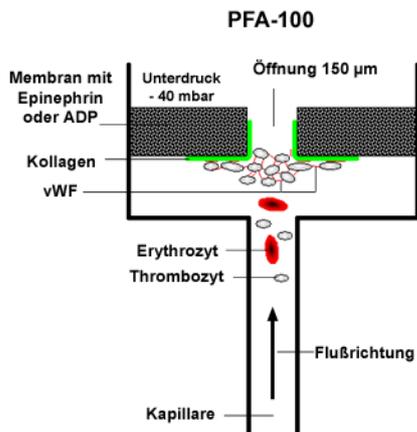


Abbildung 3: Funktionsweise der Verschlusszeitbestimmung im PFA-100[®]

Speziell antikoaguliertes Vollblut wird mittels einer Vakuumpumpe aus einem Reservoir durch eine Kapillare und die etwa 150 µm große Öffnung einer biologischen Membran befördert. Bei einem Unterdruck von etwa -40 mbar entstehen dadurch hohe Scherkräfte von 5000 bis 6000 s⁻¹. Die Kollagenbeschichtung der Membran dient als initiale Matrix für die Adhäsion und Aktivierung der Thrombozyten. Der zusätzlich in der Membran vorhandene Plättchenagonist löst bei Kontakt mit den adhärennten Thrombozyten deren Degranulation aus. Dies führt zur weiteren Aktivierung von vorbeiströmenden Thrombozyten und zur Aggregation dieser mit den bereits adhärennten Blutplättchen. So kommt es im Zeitverlauf durch sich ausbildende Thrombozytenaggregate zum allmählichen Verschluss der im Messsystem vorhandenen Membranöffnung. Dies wird über Drucksensoren detektiert. Als Messwert wird dann die Zeit zwischen Beginn der Messung und dem vollständigen Verschluss der Membranöffnung als so genannte Verschlusszeit ausgegeben.

Vorteile der Methode sind die einfache und schnelle Bedienung des Geräts, die vollautomatische Messung in drei bis fünf Minuten und exakt reproduzierbare Versuchsbedingungen.⁹⁵ Leider konnten aber mehrere Studien zeigen, dass bei Patienten mit Clopidogrel die Verschlusszeit nicht mit den Werten des aktuellen Goldstandards, der Plättchenaggregometrie, korreliert,^{96,97} so dass man davon ausgehen muss, dass die Verschlusszeit im PFA-100[®] die Plättcheninhibition durch Clopidogrel nicht korrekt wiedergibt. Der VerifyNow-Test dahingegen ist ein Schnelltest, der von der US Food and Drug Administration (FDA) zur Messung der Thienopyridin-induzierten Plättchenhemmung zugelassen wurde. Da er auf dem Prinzip der konventionellen Plättchenaggregometrie basiert, hat er die entsprechenden Vor- und Nachteile. Zeit- und Personalaufwand sind bei dieser Methode allerdings deutlich geringer. Denn kleine Mengen Vollblut reichen als Probe aus, so dass die PRP-Herstellung entfällt. Abbildung 4 zeigt, wie der Test funktioniert.

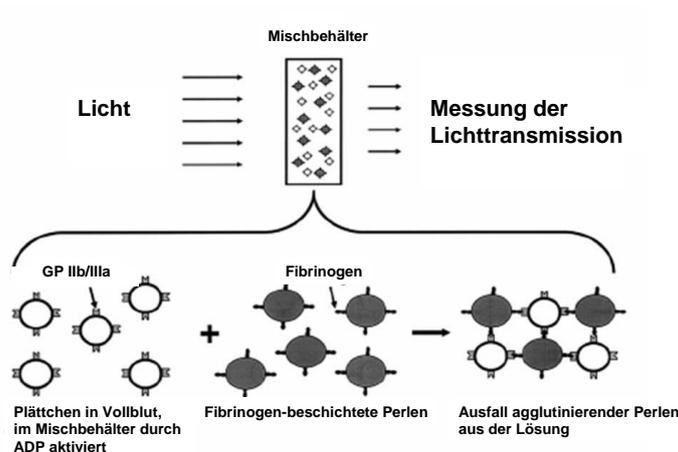


Abbildung 4: Funktion von VerifyNow

Mit Fibrinogen beschichtete Perlen zur Verstärkung der Aggregation werden mit Vollblut vermischt. Nach Zugabe eines Plättchenagonisten wird die Lichttransmission gemessen. Im VerifyNow-P2Y₁₂-Test wird ADP als Agonist verwendet. Ebenfalls zugegebenes PGE₁ bewirkt über eine Senkung der intrazellulären Calcium-Spiegel, dass die ADP-abhängige Plättchenaktivierung über den P2Y₁-Rezeptor unterdrückt wird.⁸²

Es existieren noch weitere Schnelltests, die bisher nicht ausreichend auf ihre Eignung zur Kontrolle der Antiplättchentherapie untersucht wurden. Dazu gehört zum Beispiel der Plateletworks-Test, bei dem die Anzahl der Thrombozyten in einem EDTA-haltigen Kontrollröhrchen mit der Thrombozytenanzahl in Citratblut nach Induktion der Aggregation mit einem Plättchenagonisten verglichen wird. Die relative Abnahme der Plättchen dient als Maß für die Aggregation und korreliert gut mit den Ergebnissen der konventionellen Plättchenaggregometrie. Eine Korrelation mit klinischen Ereignissen konnte bisher aber nicht gezeigt werden.⁸² Zusammenfassend lässt sich sagen, dass bisher kein Test zur Überprüfung der Plättcheninhibition in Patienten unter dualer Antiplättchentherapie existiert, der für den klinischen Alltag geeignet wäre. Da aber bereits mehrere Studien zeigen konnten, dass eine mangelhafte Plättcheninhibition zu einem gehäuften Auftreten ischämischer Ereignisse führt,^{93;98-101} wäre bei Patienten, die eine suffiziente antithrombozytäre Therapie benötigen, eine Testung wichtig.

Bisherige Studien haben das Vorkommen von Clopidogrel-Nonrespondern nur in streng definierten Populationen untersucht. Deshalb war das Ziel dieser Arbeit die tatsächliche Relevanz eines verminderten Ansprechens auf Clopidogrel in einem alltäglichen Patientenkollektiv unter Zuhilfenahme des P2Y₁₂-spezifischen PRI zu untersuchen.

II) Material und Methoden

1) Material

a) Studienpopulation

Untersucht wurden 100 konsekutive Patienten mit stabiler KHK, die in der kardiologischen Abteilung der Universitätsklinik Würzburg behandelt wurden und nach einer LD von 300-600mg mindestens 5 Tage lang eine Dosis von 75 mg Clopidogrel eingenommen hatten. 33 Patienten mit stabiler KHK ohne Clopidogrel dienten als Kontrollen. Um Fehler durch mögliche Einflussfaktoren der Thrombozytenaktivität zu minimieren, wurde auf eine möglichst genaue Übereinstimmung von Alter, Geschlecht, Medikation und kardiovaskulären Risikofaktoren (CVRF) in Fall- und Kontrollgruppe geachtet. (s. Tab. 1)

Parameter	Kontrollen	Clopidogrel
n	33	100
Geschlecht m/w, m [%]	24/9, 73	70/30, 70
Alter [Jahre]	70 ± 2	68 ± 1
Acetylsalicylsäure [%]	84,8	89,0
ACE-Hemmer [%]	66,7	73,0
Angiotensin-Rezeptor-Blocker [%]	21,2	14,0
BetaBlocker [%]	90,9	90,0
Statin [%]	78,8	86,0
Aldosteronantagonist [%]	15,2	9,0
Thiazid [%]	15,2	25
Schleifendiuretikum [%]	45,5	41
HbA1c [%]	6,3 ± 0,2	6,2 ± 0,1
Cholesterin [mg/dl]	182,1 ± 8,0	189,1 ± 4,3
LDL [mg/dl]	108,9 ± 7,6	103,3 ± 3,9
HDL [mg/dl]	46,44 ± 2,5	46,83 ± 1,4
MDRD [ml/min]	75,9 ± 5,5	81,4 ± 3,0
BMI [kg/m ²]	27,9 ± 0,7	28,1 ± 0,7
Adipositas (BMI > 30 kg/m ²) [%]	24,1	40,5
Diabetes mellitus [%]	24,2	30,0
Hypercholesterinämie [%]	81,8	92,0
Hypertonie [%]	93,9	82,0
Nikotinabusus [%]	12,9	30,5
positive Familienanamnese [%]	33,3	27,0

Tabelle 1: Alter, Geschlecht, Medikation und CVRF in Fall- und Kontrollgruppe

n = Anzahl der Patienten, HbA1c = glykosyliertes Hämoglobin, LDL = Low Density Lipoprotein, HDL = High Density Lipoprotein, MDRD = Glomeruläre Filtrationsrate, BMI = Body Mass Index

b) Blutproben

Zur Gewinnung der Blutproben wurde den Patienten 2-4 Stunden nach Medikamenteneinnahme aus einer Unterarmvene mit einer 21 Gauge Nadel Blut abgenommen. Um einer spontanen Plättchenaktivierung vorzubeugen, wurden die ersten 5ml Blut verworfen. Danach wurde das Studienblut in S-Monovetten® (*Sarstedt AG & Co*, Nümbrecht, Deutschland) gesammelt. Pro Studienteilnehmer wurden 3,8 ml Blut in eine 9NC (PFA) S-Monovette® (Citrat/Puffer 1:10) und mindestens 10 ml Blut in 9NC S-Monovetten® (Citrat 1:10) entnommen. Innerhalb der ersten zwei Stunden nach Blutentnahme wurde aus dem Citratblut PRP gewonnen. Dazu wurde das Vollblut in den 9NC S-Monovetten® bei Raumtemperatur 10 Minuten mit 180g zentrifugiert (Zentrifuge Universal 32R, *HettichZentrifugen*, Tuttlingen, Deutschland). Das Plasma wurde abpipettiert und nach Messung der Anzahl der enthaltenen Thrombozyten, Erythrozyten und Leukozyten im automatischen Durchflusszytometer (Sysmex XT 2000, *Sysmex*, Norderstedt, Deutschland) mit Puffer 1 auf 250000 Plättchen/ μ l verdünnt. Zur Herstellung von PPP wurde ein Teil des bereits verdünnten PRPs bei Raumtemperatur 10 Minuten mit 2000g zentrifugiert (Zentrifuge 5415C, *Eppendorf*, Hamburg, Deutschland). Bis zur Weiterverarbeitung wurden PRP und PPP im Wasserbad bei 37°C gelagert.

c) Substanzen

Adenosindiphosphat (ADP) (*Sigma*, Deisenofen, Deutschland)

Antikörper 555523 (*Becton Dickinson*, Heidelberg, Deutschland)

FITC-markierter monoklonaler Antikörper der Maus gegen humanes P-Selektin
Antikörper 557273 (*Becton Dickinson*, Heidelberg, Deutschland)

FITC-markierte Isotyp-Kontrolle IgG1 κ der Maus

Aqua ad iniectabilia (*DeltaSelect*, München, Deutschland)

Bovines Serum Albumin (*Sigma*, Deisenofen, Deutschland)

FACS-Clean (*Becton Dickinson*, Heidelberg, Deutschland)

FACS-Flow (*Becton Dickinson*, Heidelberg, Deutschland)

FACS-Rinse (*Becton Dickinson*, Heidelberg, Deutschland)

Formaldehyd 15%, methanolfrei (*Polysciences, Inc.*, Warrington, USA)

Glucose (*Sigma*, Deisenofen, Deutschland)

Hepes (*Sigma*, Deisenofen, Deutschland)

Kaliumchlorid (KCl) (*Sigma*, Deisenofen, Deutschland)

Natriumchlorid (NaCl) (*Sigma*, Deisenofen, Deutschland)

Natriumhydrogencarbonat (NaHCO₃) (*Sigma*, Deisenofen, Deutschland)

Phosphate Buffered Saline (PBS) (*PAN Biotech*, Aidenbach, Deutschland)

PLT VASP/P2Y12 Kit (*Biocytex*, Marseille, Frankreich)

d) Pufferlösungen

Puffer 1:

- 0,05 g BSA
- 0,05 g Glucose
- 5 ml Thyrodes 10x (80g NaCl; 10,15g NaHCO₃; 1,95g KCl ; 1000µl Aqua)
- 45 ml Aqua
- Hepes nach pH (Ziel-pH: 7,4)

Puffer 2:

- 100mg BSA
- 20 mg Glucose
- 20 ml PBS

2) Methoden

Die Effektivität der Plättchenhemmung durch Clopidogrel wurde mit vier verschiedenen Methoden bestimmt: der konventionellen turbidimetrischen Plättchenaggregometrie, dem Platelet Reactivity Index, der durchflusszytometrischen Messung der ADP-induzierten P-Selektin-Expression und der Verschlusszeit im PFA-100[®].

a) Konventionelle Plättchenaggregometrie

Zur Messung der ADP-induzierten Plättchenaggregation in PRP wurde ein handelsübliches Aggregometer mit acht Kanälen (PAP-8E, *möLabBioData*, Hilden, Deutschland) verwendet. Die Messröhrchen (TestTubes 7,25 x 5 mm, silikonisiert, *möLab*, Hilden, Deutschland) wurden mit je 300 µl PRP oder PPP und je einem Rührstab (Rührstab mikro, silikonisiert, *möLab*, Hilden, Deutschland) befüllt und vor Messung ihrer Lichttransmission (LT) genau fünf Minuten unter Rühren mit 1000 Umdrehungen/min bei 37°C inkubiert. Vor Beginn der Messungen wurde die LT von PPP in allen Kanälen auf 100% und die LT von PRP auf 0% Aggregation geeicht. Nach

Stimulation von PRP mit 5, 10, 15 und 20 μM ADP wurde die LT sechs Minuten lang aufgezeichnet. Eine typische Aggregationskurve ist in Abbildung 5 dargestellt.

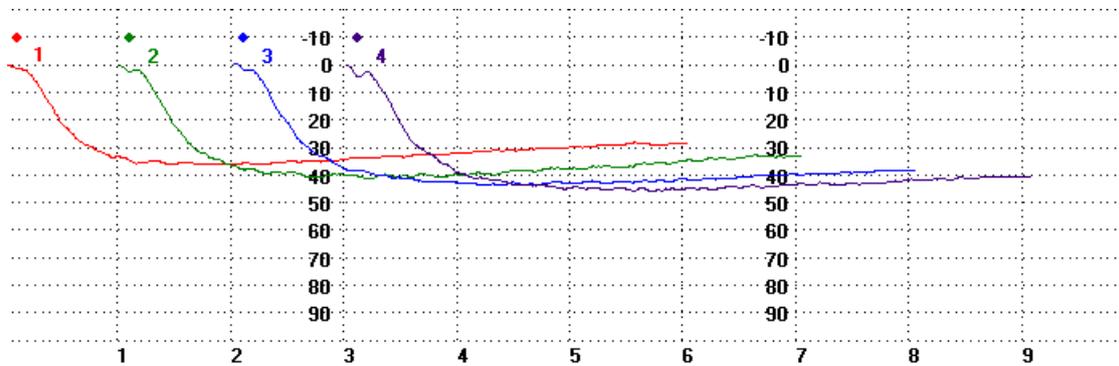


Abbildung 5: typische Kurve einer Aggregationsmessung

Änderung der Lichttransmission von PRP nach Stimulation mit 5 (1), 10 (2), 15 (3) und 20 (4) μM ADP
 Nach der Formveränderung der Thrombozyten, die sich in den Kurven als primäre, kurzzeitige Abnahme der LT darstellt, kommt es zu einer kontinuierlichen Zunahme der LT auf maximal 100% durch eine zunächst noch reversible Aggregation der Thrombozyten. Abhängig von der Aktivität von P2Y_{12} , der eine Stabilisierung der Aggregate bewirkt, kann es nach Erreichen der maximalen Aggregation zu einer Deaggregation der Plättchen mit erneuter Abnahme der LT kommen. Eine 100%ige Aggregation ist erreicht, wenn die LT von PRP nach Zugabe des Plättchenagonisten ADP der LT von plättchenarmen Plasma (PPP) entspricht.

In der Auswertung wurde die Aggregation durch zwei verschiedene Werte beschrieben: Die maximale Aggregation (Agg_{max}), die die Aktivität beider P2Y -Rezeptoren widerspiegelt und die finale Aggregation (Agg_{fin}), die hauptsächlich eine Funktion des P2Y_{12} -Rezeptors ist.⁵²

b) Platelet Reactivity Index

Der Platelet Reactivity Index (PRI) beschreibt die Abnahme der PGE_1 -induzierten VASP-Phosphorylierung in Thrombozyten nach Stimulation mit ADP. Er wurde mit Hilfe eines handelsüblichen Testkits (PLT VASP/ P2Y_{12} Kit, *Biocytex*, Marseille, Frankreich) ermittelt. Dazu wurden zunächst die Proben nach Anleitung des Herstellers mit den im Kit enthaltenen Reagenzien vorbereitet. Pro Patient wurden jeweils 10 μl Citratblut zehn Minuten lang mit 10 μl Reagens 2a [$\text{PGE}_1(0.5 \mu\text{mol/L})$] oder Reagens 2b [$\text{PGE}_1(0.5 \mu\text{mol/L}) + \text{ADP}(20 \mu\text{mol/L})$] inkubiert. Nach der fünfminütigen Fixation mit je 10 μl Reagens 3 wurden beide Proben durch Zugabe von 10 μl Reagens 4a [FITC-anti-VASP-P + PE-anti-CD61] gefärbt, nach fünf Minuten Inkubationszeit mit

0,5 ml Reagens 1 verdünnt und im Dunkeln bei 4° C gelagert. Spätestens fünf Stunden nach Fertigstellung der Proben, wurde die VASP-Phosphorylierung der Thrombozyten im Durchflusszytometer (FACSCalibur, *Becton Dickinson*, Heidelberg, Deutschland) mit Hilfe des Programms BD CellQuest Pro™ bestimmt. (s. Abb. 6)

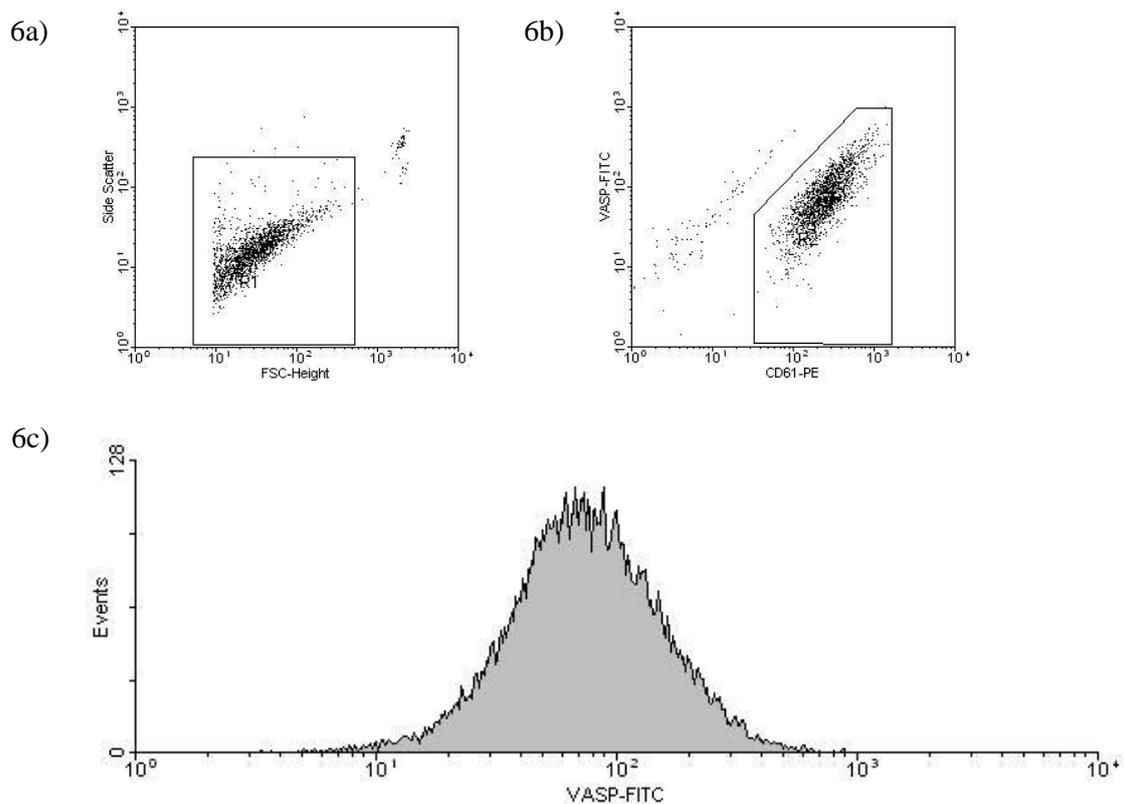


Abbildung 6: Messung der VASP-Phosphorylierung am FACS mit BD CellQuest Pro™

6a) Charakterisierung der Thrombozyten anhand von FSC-Height und Side Scatter (Gate1/G1)

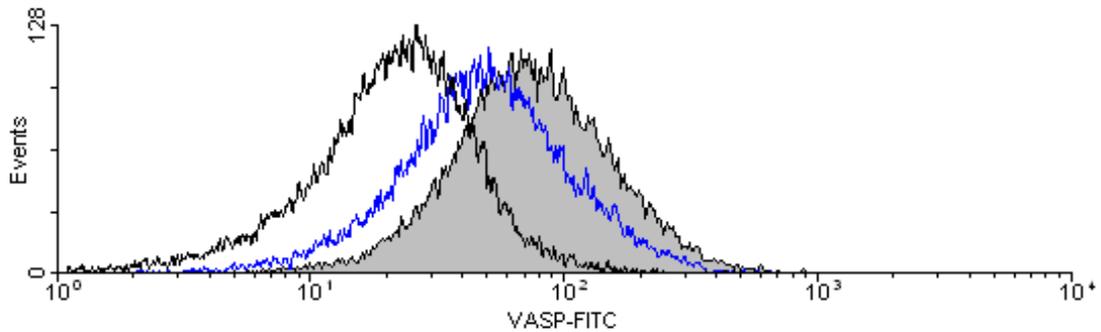
6b) Charakterisierung der Thrombozyten aus G1 anhand der CD61-Immunfluoreszenz (G2)

6c) Messung der VASP-P-Immunfluoreszenz der Thrombozyten aus G2

Die Thrombozyten wurden anhand von Zellgröße (FSC-Height), Granularität (Side Scatter) (s. Abb. 6a) und Expression von CD61 (CD61-PE) (s. Abb. 6b) charakterisiert. Danach wurde die Spannung der FITC-registrierenden Photodiode so eingestellt, dass die mittlere VASP-P-Immunfluoreszenz der Thrombozyten nach Stimulation mit PGE₁ bei einer Intensität von etwa 100 lag. (s. Abb. 6c) Schließlich wurde bei niedrigen Durchflussraten die Immunfluoreszenz von 20000 Thrombozyten gemessen.

Die Auswertung der so gewonnenen Daten mit dem Programm WinMDI 2.8 ergab mittlere Fluoreszenzintensitäten (MFI), die durch Subtraktion der MFI einer Negativkontrolle mit isotypischen Maus-Antikörpern (Reagens 4b anstatt Reagens 4a)

korrigiert wurden. Aus den korrigierten mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFIC) wurde dann der PRI errechnet. (s. Abb. 7)



$$PRI = \frac{\text{Grey Box} - \text{Blue Box}}{\text{Grey Box} - \text{Black Box}}$$

$FI_{[PGE]}$

 $FI_{[PGE+ADP]}$

 $FI_{[Negativkontrolle]}$

Abbildung 7: Rechnerische Ermittlung des PRI

Der PRI ist definiert als $(MFIC_{[PGE]} - MFIC_{[PGE+ADP]}) / MFIC_{[PGE]} * 100\%$.

Aus der Formel ergibt sich, dass Clopidogrel den P2Y₁₂-Rezeptor umso besser hemmt, je niedriger der PRI ist. Ein PRI von 100% bedeutet, dass ADP die durch PGE₁ stimulierte VASP-Phosphorylierung vollständig unterdrückt, Clopidogrel also nicht wirkt. Beträgt der PRI 0%, ist ADP dahingegen unfähig die Adenylatzyklase über P2Y₁₂ zu inhibieren.¹⁰²

c) Durchflusszytometrische Bestimmung der P-Selektin-Expression

Zur Bestimmung der ADP-induzierten P-Selektin-Expression wurden 20 µl PRP in 65 µl Puffer 2 mit 0, 5, 10, 15 und 20 µM ADP durch Zugabe von 5 µl Puffer 2 bzw. 5 µl ADP der Konzentrationen 100, 200, 300 und 400 µM stimuliert. Nach zehn Minuten Inkubationszeit bei Raumtemperatur mit dem gleichzeitig hinzu gegebenen FITC-markierten Antikörper gegen CD62P wurden die Proben zehn Minuten lang in 1,5%

Formaldehyd fixiert. Anschließend wurden sie mit 300 µl Puffer 2 verdünnt und bei 4°C gelagert. Inkubation und Lagerung der Proben erfolgten im Dunkeln, um eine vorzeitige Fluoreszenzabnahme der Antikörper zu vermeiden. Die Intensität der CD62P-Immunfluoreszenz in den Proben wurde innerhalb der nächsten fünf Stunden am Durchflusszytometer bestimmt. (s. Abb. 8)

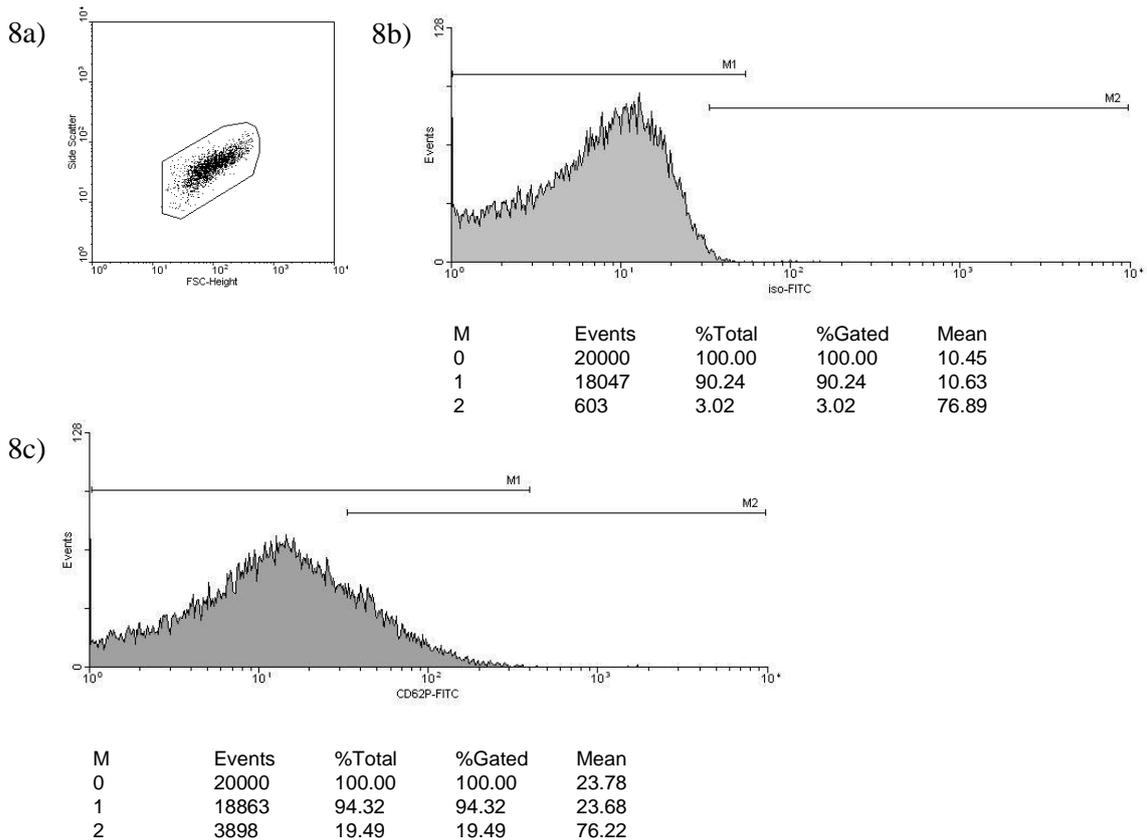


Abbildung 8: Messung und Auswertung der CD62P-Immunfluoreszenz

8a) Thrombozyten in Vorwärts- (FSC-Height) und Seitwärts-Scatter (Side Scatter)

8b) FITC-Immunfluoreszenz der Isotyp-Kontrolle

8c) FITC-CD62P-Immunfluoreszenz nach Stimulation mit 20 µM ADP

Die Plättchen wurden zunächst mit Hilfe des Programms BD CellQuest ProTM anhand ihrer typischen Verteilung in Vorwärts- und Seitwärts-Scatter identifiziert. (s. Abb. 8a) Die mittlere Immunfluoreszenz durch unspezifische Antikörperbindung wurde in einer Isotyp-Kontrolle bestimmt und auf eine Intensität von etwa 10 eingestellt. (s. Abb. 8b) Dann wurde in allen Proben bei niedrigen Durchflussraten die Immunfluoreszenz von jeweils 20000 Thrombozyten gemessen. In der Auswertung mit WinMDI 2.8 wurde ein Bereich (M2) so festgelegt, dass sich möglichst genau 3% der Thrombozyten in M2 befanden. (s. Abb. 8b) Dann wurde von allen Proben die mittlere Immunfluoreszenz und die Anzahl der in M2 liegenden Plättchen bestimmt, die den CD62P-exprimierenden Thrombozyten entsprechen. Abbildung 8c zeigt, dass die mittlere CD62P-Immunfluoreszenz der Thrombozyten nach Stimulation mit 20 µM ADP deutlich über der Fluoreszenz der unspezifisch bindenden Antikörper liegt und auch die Anzahl der Thrombozyten in M2 signifikant zugenommen hat.

d) Verschlusszeit im PFA-100®

Die Verschlusszeit wurde im Zentrallabor der Universitätsklinik Würzburg im Platelet Function Analyzer (PFA-100®, *Dade Behring*, Newark, USA) (s. Abb. 9) aus dem speziell antikoagulierten Blut der 9NC (PFA) S-Monovette® (Citrat/Puffer 1:10) bestimmt.

9a)



9b)

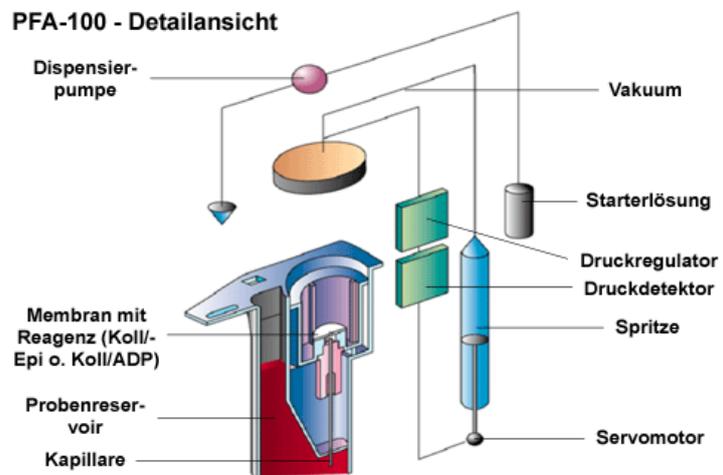


Abbildung 9: PFA-100®

9a) Außenansicht des PFA-100® von *Dade Behring*

9b) schematischer Aufbau des Messsystems:

Das Messsystem besteht aus der eigentlichen Messeinheit mit Kapillare und beschichteter Membran, einem Probenreservoir, sowie einem Vakuumsystem mit Druckdetektoren. In der Membran befindet sich eine zentrale Öffnung von 150 µm Durchmesser. Zusätzlich ist eine Vorrichtung vorhanden, um die Membran zu Beginn der Messung mit einer Starterlösung (isotonische Kochsalzlösung) zu benetzen. Nach Befüllen der Messzelle mit 800 µl des gepufferten Citratblutes, taucht die Kapillare in das Probenreservoir ein und der unterdruckgesteuerte Blutfluss durch die Kapillare beginnt. Sobald die Membranöffnung der Kapillare durch ein Plättchenaggregat verschlossen ist, endet die Messung.

Der Normbereich der Zeit von Beginn der Messung bis zum vollständigen Verschluss liegt für den unbehandelten Patienten zwischen 71 und 118 Sekunden. Für die Verschlusszeit in einem effektiv mit Clopidogrel behandelten Patienten konnte noch kein Normbereich beschrieben werden.

3) Auswertung

a) Statistik

Die gewonnenen Daten wurden mit Hilfe des Statistik-Programms Graph Pad Prism (GraphPad Prism, Version 4.03, *GraphPad Software*, San Diego, California, USA) ausgewertet und als Mittelwerte \pm Standardfehler angegeben. Die generierten Abbildungen zeigen die einzelnen Messwerte und ihren Mittelwert. Unterschiede zwischen zwei Gruppen wurden mit dem Mann-Whitney U-Test auf Signifikanz untersucht, wobei ein p-Wert $< 0,05$ als signifikant gewertet wurde. Die Assoziation zwischen dichotom abhängigen Variablen (z.B. PRI $> 50\%$) und Einflussfaktoren, wurde mittels logistischer Regression analysiert und das Odds Ratio (OR) mit seinem 95% Konfidenzintervall (CI) angegeben. Dazu wurden rückwirkend Parameter ausgewählt, die mit einer signifikanten Wahrscheinlichkeit ($p < 0,20$) Prädiktoren der Aggregometrie waren. Die Überprüfung des Gesamtmodells erfolgte mit Hilfe des Hosmer-Lemeshow-Chi-Quadrat-Tests und Nagelkerke's-R².

b) Definitionen

Zur Unterteilung der Patienten in Responder und Nonresponder, wurden Grenzwerte für den PRI und die maximale Aggregation unter 20 μ M ADP festgelegt. Basierend auf Studien, die zeigen konnten, dass Patienten mit einem PRI $> 50\%$ ^{93;102} bzw. einer $\text{Agg}_{\text{max}} > 50\%$ ^{98;99} ein erhöhtes Risiko für ischämische Ereignisse haben, wurden diese als Nonresponder definiert. Umgekehrt wurden Patienten mit einer maximalen Aggregation $< 50\%$ bzw. einem PRI $< 50\%$ als Responder bezeichnet. Bei Nutzung dieser Definitionen ergaben sich im Rahmen der Studie folgende Referenzbereiche: Beim PRI lagen die Werte der unbehandelten Patienten mit einer 95%igen Wahrscheinlichkeit zwischen 78.9% und 87.1%, und bei den Clopidogrel-Respondern zwischen 26.7% und 37.5%. Für die Aggregation ergab sich ein Referenzbereich von 72.2% bis 81.4% für unbehandelte Patienten und von 34.4% bis 39.7% für Clopidogrel-Responder.

III) Ergebnisse

1) Einfluss von Clopidogrel auf die ADP-induzierte Thrombozytenaktivität

Alle verwendeten Methoden zur Messung der Plättchenhemmung durch Clopidogrel zeigten eine signifikant geringere ADP-induzierte Plättchenaktivität bei den mit Clopidogrel behandelten Patienten im Vergleich zu den Kontrollen.

a) Einfluss von Clopidogrel auf die Thrombozytenaggregation

Die Auswertung der Plättchenaggregometrie zeigte, dass in der mit Clopidogrel behandelten Gruppe sowohl die maximale Aggregation, als auch die finale Aggregation unter allen ADP-Konzentrationen signifikant geringer als in der Kontrollgruppe waren.

(s. Abb. 10,11)

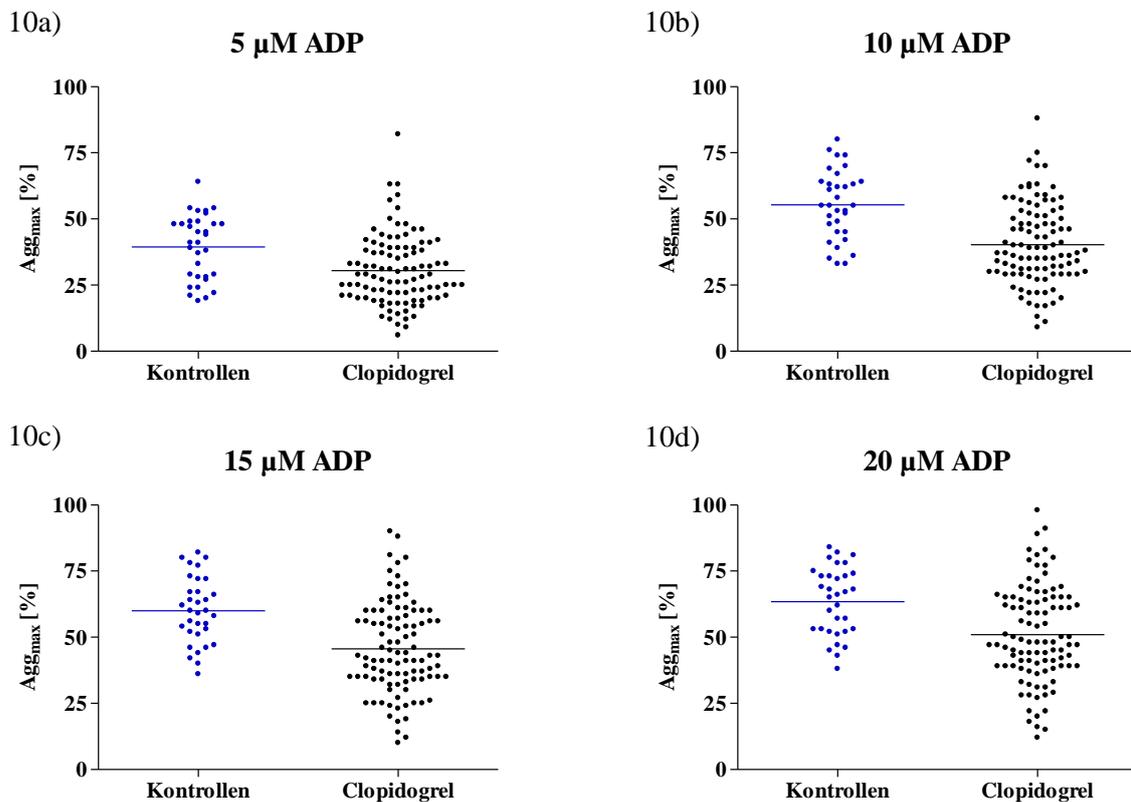


Abbildung 10: Maximale Aggregation nach Stimulation mit 5, 10, 15 und 20 µM ADP

Signifikant reduzierte Agg_{max} bei mit Clopidogrel behandelten Patienten (Fälle/schwarz/n = 100) im Vergleich zu nicht mit Clopidogrel behandelten Patienten (Kontrollen/blau/n = 33)

10a) 5 µM ADP: 539,4 ± 2,1 vs. 30,5 ± 1,3; p = 0,0004

10b) 10 µM ADP: 55,4 ± 2,3 vs. 40,3 ± 1,5; p < 0,0001

10c) 15 µM ADP: 60,0 ± 2,2 vs. 45,7 ± 1,7; p < 0,0001

10d) 20 µM ADP: 63,5 ± 2,2 vs. 51,0 ± 1,8; p = 0,0002

Agg_{fin} war dabei stets signifikanter reduziert als Agg_{max}, was sich damit erklären lässt, dass Agg_{max} auch von der Aktivität des P2Y₁-Rezeptors abhängt, während die finale Aggregation die von Clopidogrel gehemmte P2Y₁₂-Aktivität selektiver widerspiegelt.

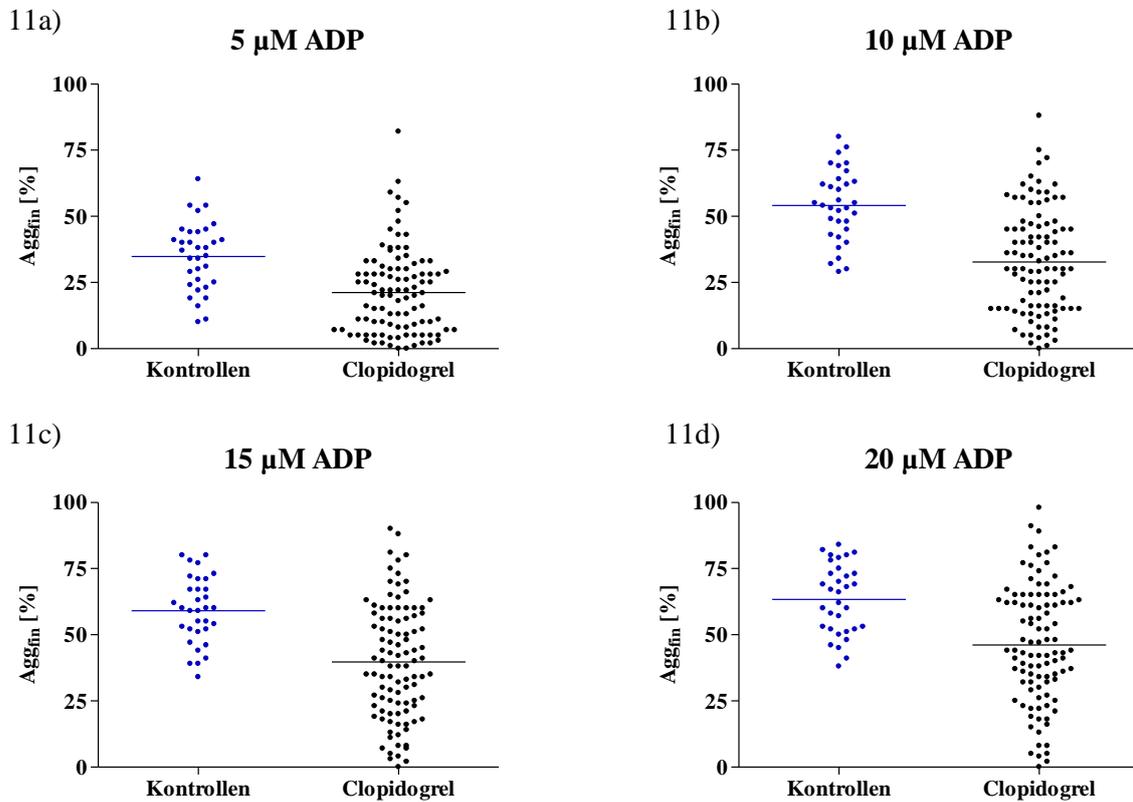


Abbildung 11: Finale Aggregation nach Stimulation mit 5, 10, 15 und 20 μM ADP

Signifikant reduzierte Agg_{fin} bei mit Clopidogrel behandelten Patienten (Fälle/schwarz/n = 100) im Vergleich zu nicht mit Clopidogrel behandelten Patienten (Kontrollen/blau/n = 33)

11a) 5 μM ADP: 39,4 ± 2,2 vs. 21,2 ± 1,6; p < 0,0001

11b) 10 μM ADP: 54,1 ± 2,4 vs. 32,8 ± 2,0; p < 0,0001

11c) 15 μM ADP: 59,2 ± 2,2 vs. 39,7 ± 2,1; p < 0,0001

11d) 20 μM ADP: 63,4 ± 2,3 vs. 46,1 ± 2,2; p < 0,0001

b) Einfluss von Clopidogrel auf den PRI

Auch der PRI war in der Kontrollgruppe signifikant höher als bei den mit Clopidogrel behandelten Patienten. (s. Abb. 12)

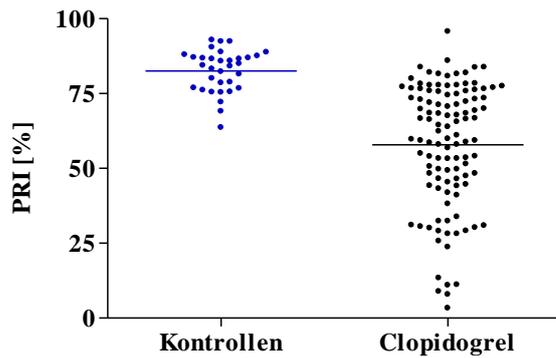


Abbildung 12: PRI

Signifikant reduzierter PRI bei mit Clopidogrel behandelten Patienten (Fälle/schwarz/n = 100) im Vergleich zu nicht mit Clopidogrel behandelten Patienten (Kontrollen/blau/n = 33)
 $82,6 \pm 1,2$ vs. $57,9 \pm 2,0$ vs.; $p < 0,0001$

c) Einfluss von Clopidogrel auf die P-Selektin-Expression

In der durchflusszytometrischen Analyse zeigte sich, dass die CD62P-Expression nach Stimulation mit ADP auf den Plättchen der mit Clopidogrel behandelten Patienten signifikant geringer als auf den Plättchen der Kontrollpersonen war. Die mittlere CD62P-Immunfluoreszenz der Plättchen war bei den Kontrollpersonen unter allen ADP-Konzentrationen signifikant höher als bei den mit Clopidogrel behandelten Patienten. (s. Abb. 13)

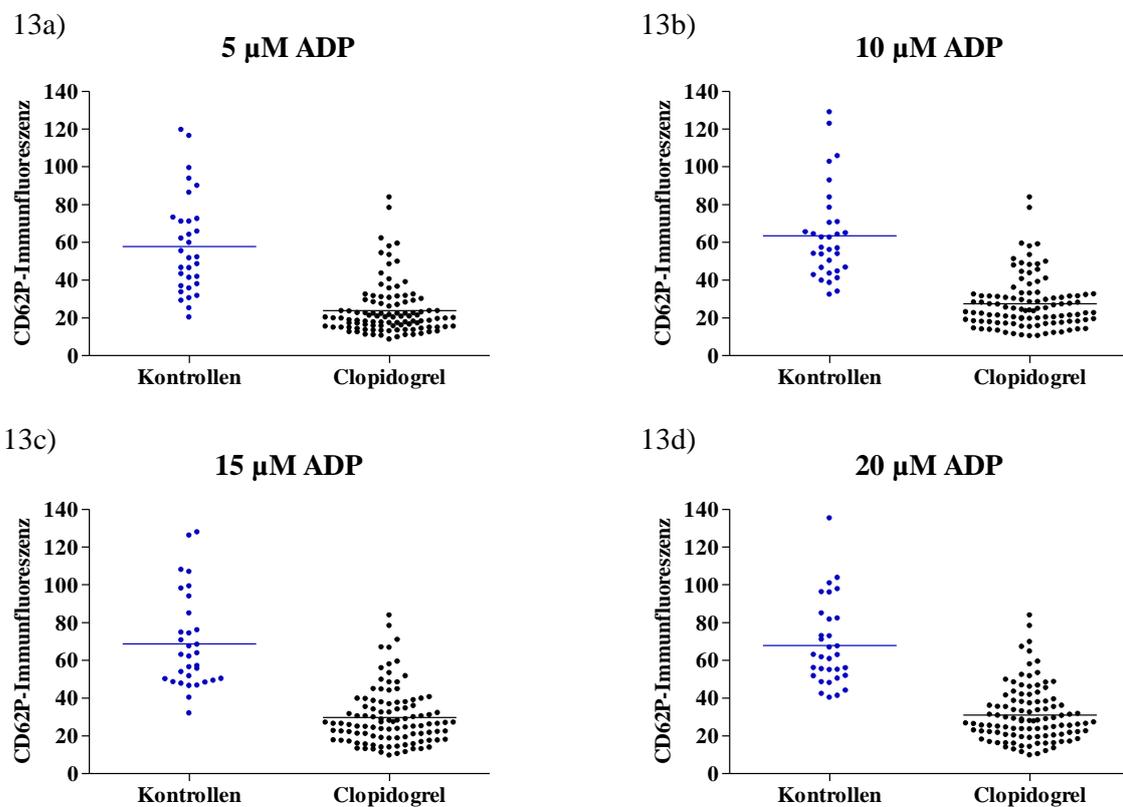


Abbildung 13: CD62P-Immunfluoreszenz nach Stimulation mit 5, 10, 15 und 20 µM ADP

Signifikant reduzierte Intensität der CD62P-Immunfluoreszenz bei mit Clopidogrel behandelten Patienten (Fälle/schwarz/n = 100) im Vergleich zu unbehandelten Patienten (Kontrollen/blau/n = 33)

13a) 5 µM ADP: $57,9 \pm 4,6$ vs. $23,9 \pm 1,4$; $p < 0,0001$

13b) 10 µM ADP: $63,5 \pm 4,3$ vs. $27,4 \pm 1,4$; $p < 0,0001$

13c) 15 µM ADP: $68,7 \pm 4,4$ vs. $29,7 \pm 1,5$; $p < 0,0001$

13d) 20 µM ADP: $67,9 \pm 3,9$ vs. $31,0 \pm 1,4$; $p < 0,0001$

Und auch die Anzahl der CD62P exprimierenden (+) Plättchen war bei den mit Clopidogrel behandelten Patienten unter allen ADP-Konzentrationen signifikant reduziert. (s. Abb. 14)

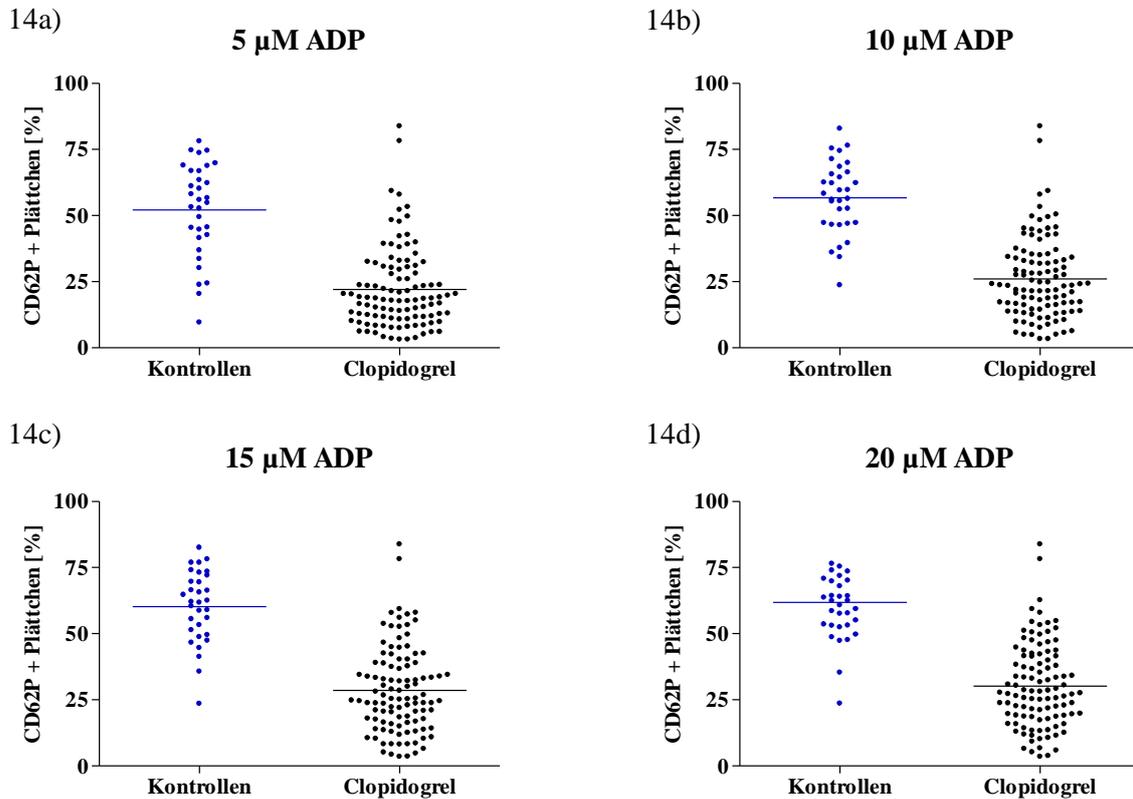


Abbildung 14: CD62P + Plättchen nach Stimulation mit 5, 10, 15 und 20 µM ADP

Signifikant weniger CD62P + Plättchen bei behandelten Patienten (Fälle/schwarz/n = 100) im Vergleich zu nicht mit Clopidogrel behandelten Patienten (Kontrollen/blau/n = 33)

14a) 5 µM ADP: $52,2 \pm 3,1$ vs. $22,1 \pm 1,5$; $p < 0,0001$

14b) 10 µM ADP: $56,7 \pm 2,4$ vs. $26,0 \pm 1,5$; $p < 0,0001$

14c) 15 µM ADP: $60,2 \pm 2,4$ vs. $28,6 \pm 1,6$; $p < 0,0001$

14d) 20 µM ADP: $61,9 \pm 3,1$ vs. $30,2 \pm 1,6$; $p < 0,0001$

d) Einfluss von Clopidogrel auf die Verschlusszeit

Bei der Analyse der Verschlusszeit im PFA-100[®] zeigte sich eine signifikante Verlängerung der Verschlusszeit unter Behandlung mit Clopidogrel. (s. Abb. 15)

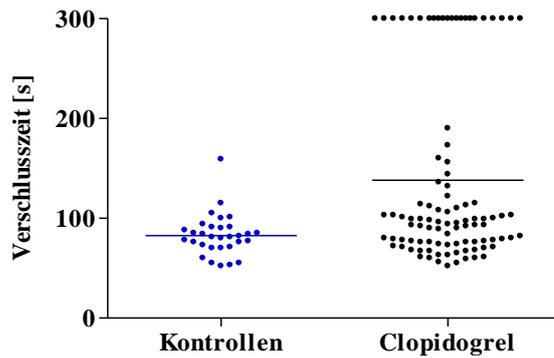


Abbildung 15: Verschlusszeit im PFA-100

Signifikant erhöhte Verschlusszeit bei mit Clopidogrel behandelten Patienten (Fälle/schwarz/n = 100) im Vergleich zu nicht mit Clopidogrel behandelten Patienten (Kontrollen/blau/n = 33)
 $138,2 \pm 9,3$ vs. $82,7 \pm 3,7$; $p = 0,0040$

2) Heterogenität der Thrombozytenhemmung durch Clopidogrel

Zwar zeigten alle Methoden eine signifikante Hemmung der Thrombozytenaktivität unter Clopidogrel, besonders in der Gruppe der behandelten Patienten waren die Messwerte jedoch sehr heterogen.

a) Heterogenität der ADP-induzierten Aggregation

So betrug zum Beispiel bei 39% der mit Clopidogrel behandelten Patienten die maximale Aggregation unter 20 μM ADP mehr als 58,9%, was der unteren Grenze des 95% Konfidenzintervalls der Kontrollgruppe entsprach. (s. Abb. 16b) Weitere 5% der behandelten Patienten hatten Aggregationswerte zwischen 50% und 58,9%, so dass 44% der Patienten definitionsgemäß als Nonresponder bezeichnet werden konnten. (s. Abb. 16a) Betrachtete man die finale Aggregation, ergaben sich praktisch identische Werte. Das lässt sich damit erklären, dass die finale Aggregation nur bei einigen gut gehemmten Patienten im Vergleich zur maximalen Aggregation noch absank.

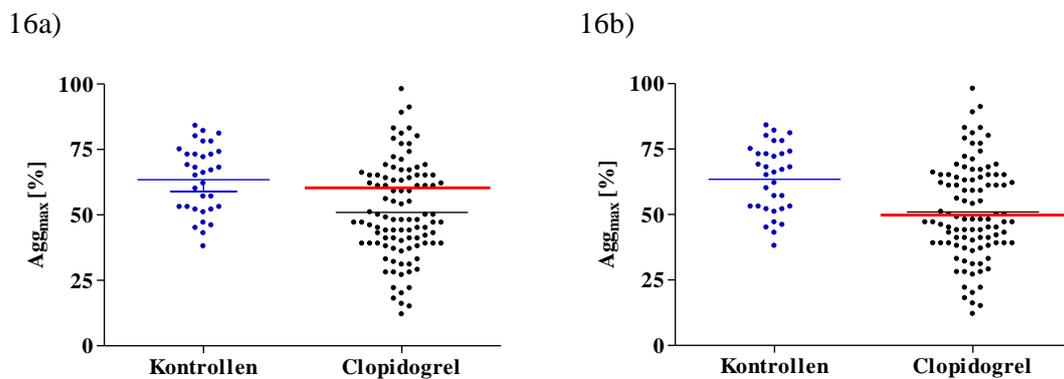


Abbildung 16: Heterogenität der maximalen Aggregation nach Stimulation mit 20 μM ADP

16a) $\text{Agg}_{\text{max}} > 58,9\%$ bei 39 der 100 mit bei mit Clopidogrel behandelten Patienten

16b) $\text{Agg}_{\text{max}} > 50\%$ bei 44 der 100 mit Clopidogrel behandelten Patienten

Abbildung 17 zeigt anhand von drei Patientenbeispielen die verschiedenen Aggregationskurven bei guter (s. Abb. 17a), mittelmäßiger (s. Abb. 17b) und schlechter Plättchenhemmung (s. Abb. 17c) durch Clopidogrel.

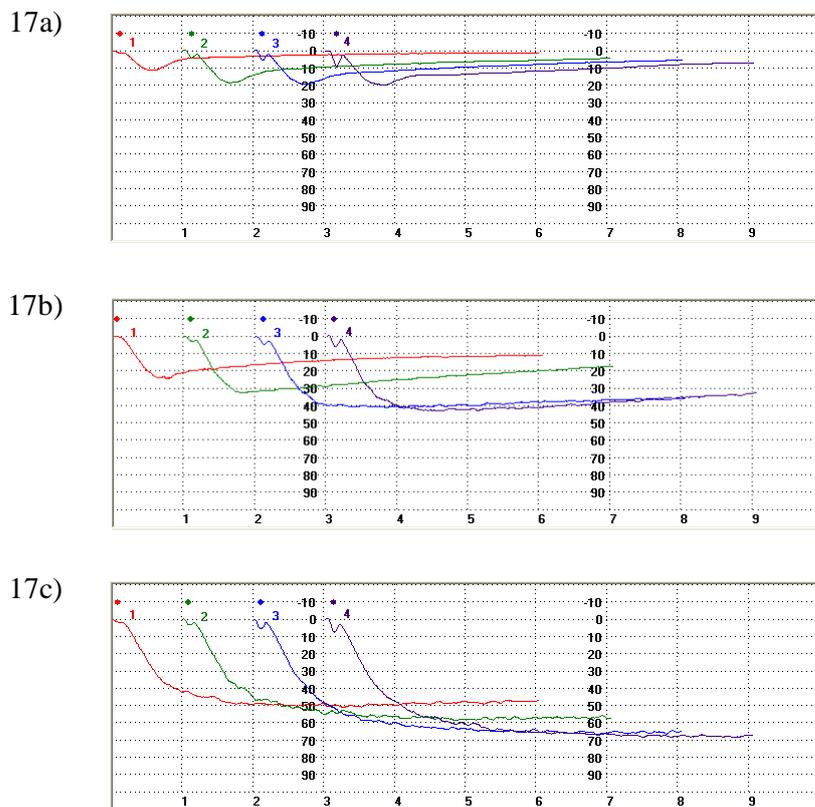


Abbildung 17: Aggregationskurven verschiedener mit Clopidogrel behandelter Patienten
 17a) Aggregationskurve bei guter Plättchenhemmung
 17b) Aggregationskurve bei mittelmäßiger Plättchenhemmung
 17c) Aggregationskurve bei schlechter Plättchenhemmung

b) Heterogenität des PRI

Betrachtete man den PRI der mit Clopidogrel behandelten Patienten, so war der Anteil der Nonresponder noch wesentlich höher: Bei 70% betrug der PRI über 50%. (s. Abb. 18b) 9% der Nonresponder lagen mit Werten über 80,1% sogar über der Untergrenze des 95% Konfidenzintervalls der unbehandelten Kontrollgruppe. (s. Abb. 18a)

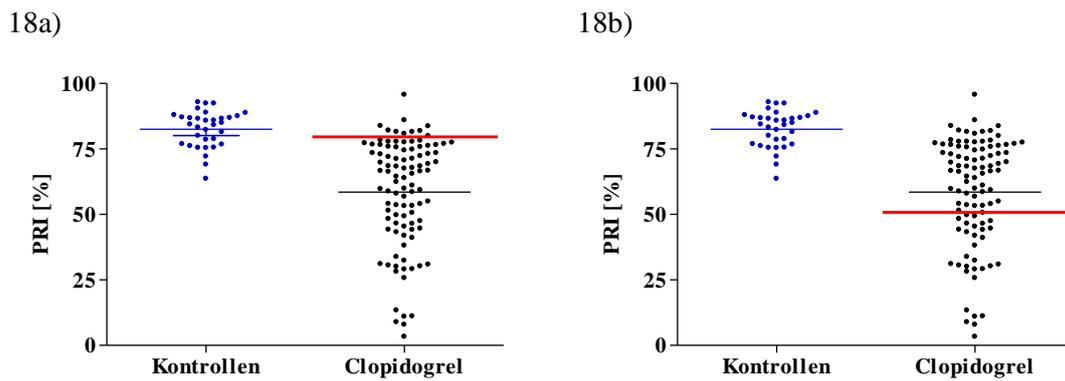


Abbildung 18: Heterogenität des PRI

18a) PRI > 80,1% bei 9 der 100 mit Clopidogrel behandelten Patienten

18b) PRI > 50% bei 70 der 100 mit Clopidogrel behandelten Patienten

Abbildung 19 zeigt die VASP-P-Immunfluoreszenz in Patienten mit gut, mittelmäßig und schlecht gehemmter Thrombozytenaktivität.

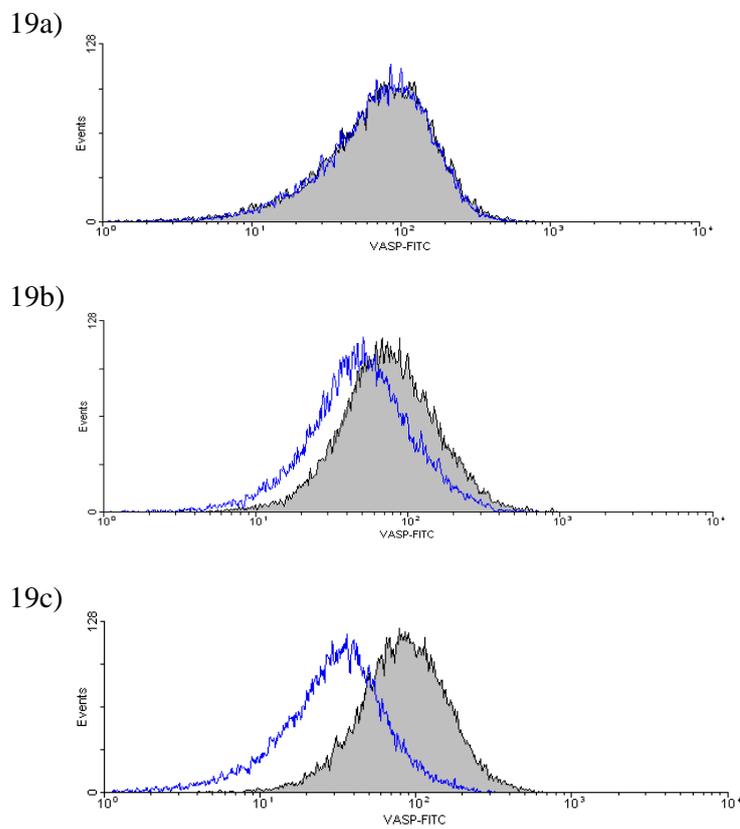


Abbildung 19: VASP-P-Immunfluoreszenz verschiedener mit Clopidogrel behandelter Patienten nach Stimulation mit PGE₁ (grau) und PGE₁/ADP (blau)

19a) VASP-P-Immunfluoreszenz bei einem Patienten mit gut gehemmter Thrombozytenaktivität

19b) VASP-P-Immunfluoreszenz bei einem Patienten mit mittelmäßig gehemmter Thrombozytenaktivität

19c) VASP-P-Immunfluoreszenz bei einem Patienten mit schlecht gehemmter Thrombozytenaktivität

c) Heterogenität der P-Selektin-Expression

Nach Stimulation mit 20 μM ADP lagen bei CD62P-Immunfluoreszenz und Anzahl der CD62P exprimierenden Plättchen jeweils etwa 5% der behandelten Patienten oberhalb der Grenze des 95% Konfidenzintervalls der unbehandelten Kontrollgruppe. (s. Abb. 20) Normbereiche für die Beurteilung der Responsiveness wurden für die P-Selektin-Expression noch nicht beschrieben.

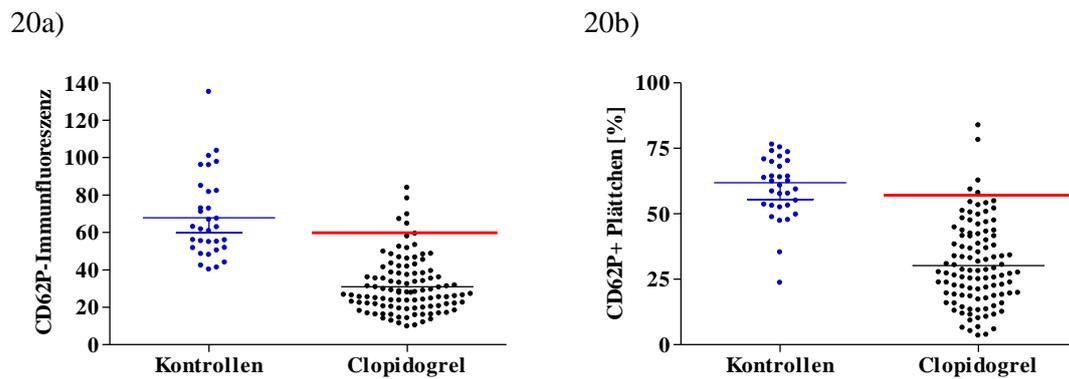


Abbildung 20: Heterogenität der CD62P-Expression

20a) CD62P-Immunfluoreszenz bei mit Clopidogrel behandelten Patienten > 59,9%

20b) Anteil der CD62P+ Plättchen bei mit Clopidogrel behandelten Patienten > 55,5 %

d) Heterogenität der Verschlusszeit

Die deutlichste Heterogenität war bei der Messung der Verschlusszeit der mit Clopidogrel behandelten Patienten zu erkennen. Während sie bei 21 Patienten mit einem PRI zwischen 3,32% und 83,78% deutlich auf über 300 Sekunden verlängert war, lag sie bei 39 Patienten (40%) unterhalb der Obergrenze des 95% Konfidenzintervalls von 90,3 Sekunden. (s. Abb. 21)

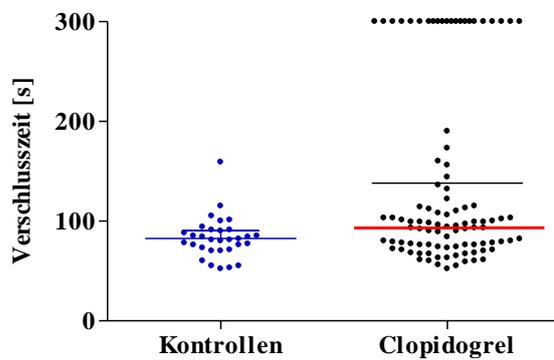


Abbildung 21: Heterogenität der Verschlusszeit

Verschlusszeit bei mit Clopidogrel behandelten Patienten < 90,3 Sekunden

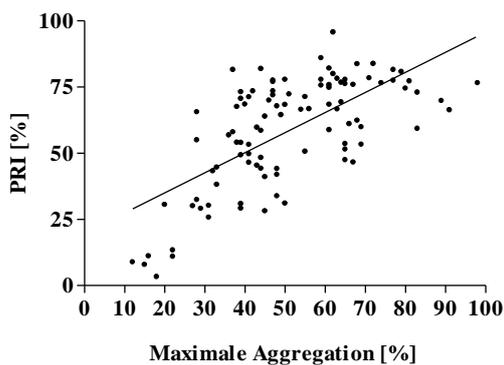
3) Korrelation der Methoden untereinander

Zur Beurteilung der sehr heterogenen Messergebnisse der einzelnen Methoden ist es wichtig, diese bezüglich ihrer Zuverlässigkeit einordnen zu können. Deshalb wurden die einzelnen Methoden auf die Korrelation ihrer Ergebnisse mit dem Goldstandard der Thrombozytenaktivitätsmessung untersucht: der konventionellen turbidimetrischen Plättchenaggregometrie.

a) Korrelation von Aggregation und PRI

Die Korrelationsanalyse von Aggregation und PRI ergab signifikante Korrelationen des PRI mit der maximalen Aggregation und der finalen Aggregation nach Stimulation mit 20 μM ADP. (s. Abb. 22)

22a)



22b)

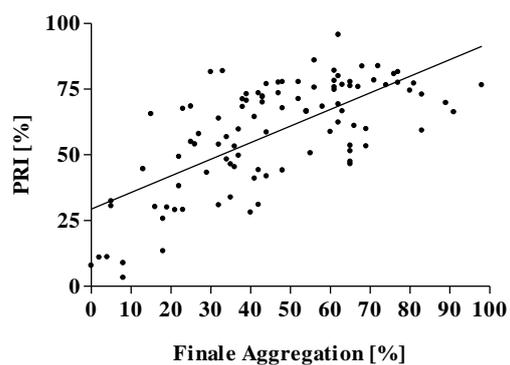


Abbildung 22: Korrelation von PRI und Plättchenaggregometrie

22a) Korrelation von PRI und maximaler Aggregation ($r^2 = 0,4434$; $p < 0,0001$)

22b) Korrelation von PRI und finaler Aggregation ($r^2 = 0,4651$; $p < 0,0001$)

b) Korrelation von Aggregation und P-Selektin-Expression

Auch die Korrelationsanalysen von Aggregation und CD62P-Expression zeigten signifikante Korrelationen. (s. Abb. 23) Im Einzelnen korrelierten mittlere CD62P-Immunfluoreszenz und Agg_{max} , CD62P-Immunfluoreszenz und Agg_{fin} , Anzahl der CD62P + Plättchen und Agg_{max} und CD62P + Plättchen und Agg_{fin} zwar jeweils schwach, aber dennoch signifikant miteinander.

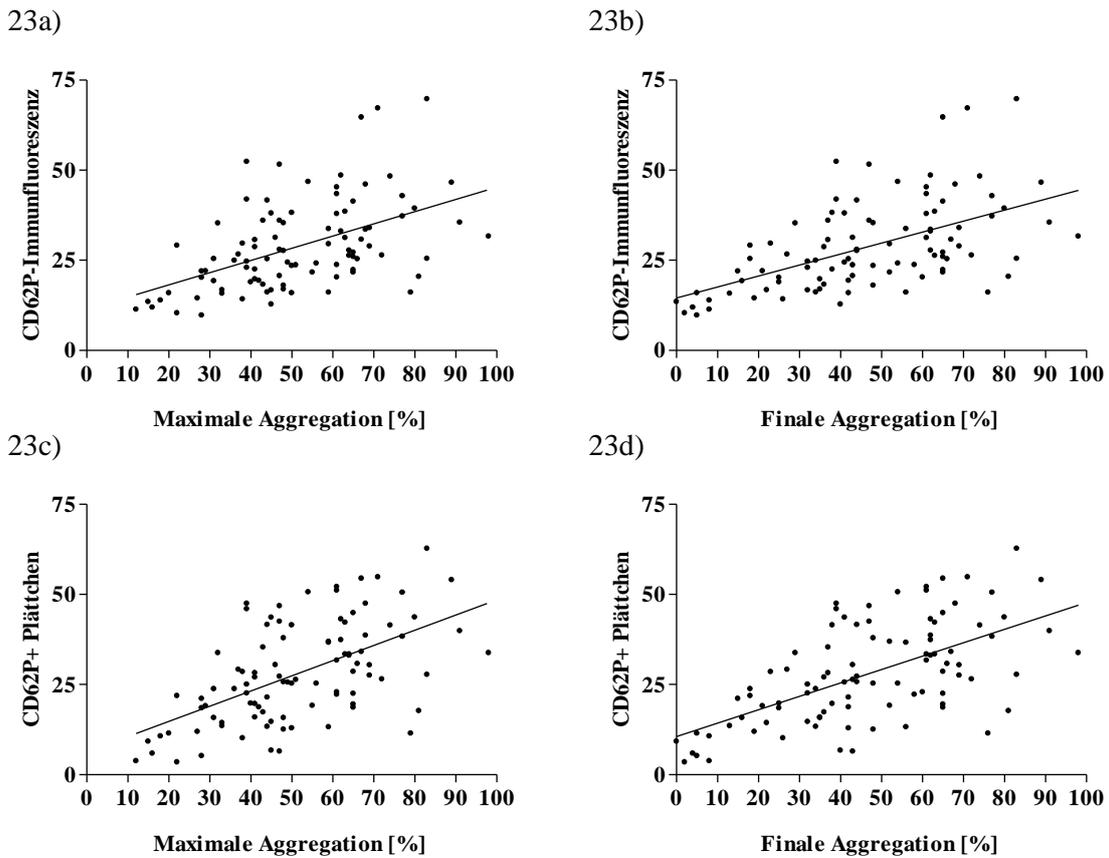


Abbildung 23: Korrelation von CD62P-Expression und Plättchenaggregometrie

23a) Korrelation von CD62P-Immunfluoreszenz und maximaler Aggregation ($r^2 = 0,2514$; $p < 0,0001$)

23b) Korrelation von CD62P-Immunfluoreszenz und finaler Aggregation ($r^2 = 0,3017$; $p < 0,0001$)

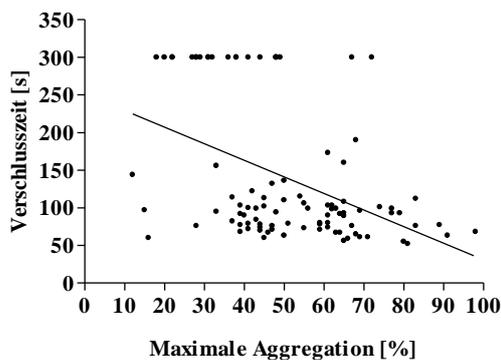
23c) Korrelation von CD62P + Plättchen und maximaler Aggregation ($r^2 = 0,3172$; $p < 0,0001$)

23d) Korrelation von CD62P + Plättchen und finaler Aggregation ($r^2 = 0,3661$; $p < 0,0001$)

c) Korrelation von Aggregation und Verschlusszeit

Die Korrelationsanalyse von Verschlusszeit und Aggregation ergab zwar ebenfalls eine signifikante Korrelation; der Korrelationskoeffizient war jedoch von allen Methoden am schwächsten. (s. Abb. 24) Wie wenig die beiden Methoden korrelieren, wird auch deutlich, wenn man sich die Aggregation der Patienten mit einer Verschlusszeit von über 300 Sekunden anschaut. Deren maximale Aggregation nach Stimulation mit 20 μM ADP schwankte zwischen 18% und 72%, die finale Aggregation sogar zwischen 2% und 72%.

24a)



24b)

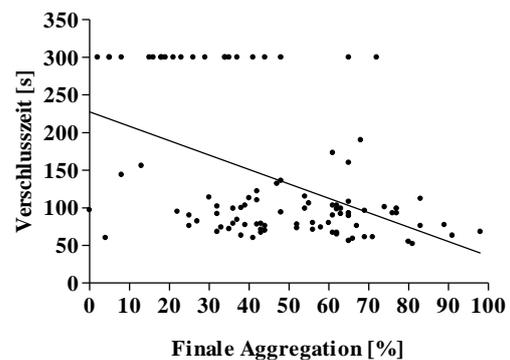


Abbildung 24: Korrelation von Verschlusszeit und Plättchenaggregometrie

24a) Korrelation von Verschlusszeit und maximaler Aggregation ($r^2 = 0,1941$; $p < 0,0001$)

24b) Korrelation von Verschlusszeit und finaler Aggregation ($r^2 = 0,2190$; $p < 0,0001$)

4) Häufigkeit von Nonrespondern

Obwohl von allen Methoden der PRI am deutlichsten mit den Werten der konventionellen Plättchenaggregometrie korrelierte (Agg_{max} : $r^2 = 0,4434$; Agg_{fin} : $r^2 = 0,4651$), unterschied sich die Häufigkeit der Nonresponsiveness in den beiden Methoden doch deutlich.

a) Detektion der Nonresponsiveness mit Aggregometrie und PRI

Während die Plättchenaggregometrie 44% der Patienten als Nonresponder identifizierte, betrug die mit dem PRI ermittelte Häufigkeit der Nonresponder 69%. Bei 42% der Patienten waren beide Methoden auffällig, nur 29% waren in beiden Tests Responder. (s. Abb. 25)

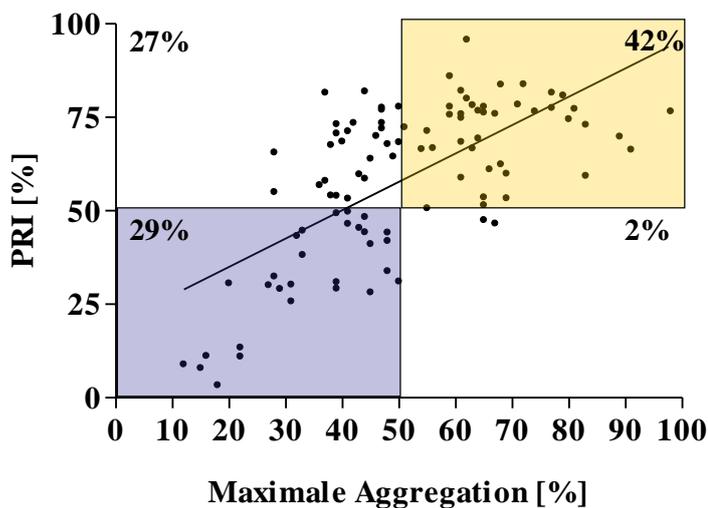


Abbildung. 25: Häufigkeit von Respondern und Nonrespondern

Responder (blau) und Non-Responder (gelb) definiert durch Agg_{max} und PRI

Wie man an Abbildung 25 ebenfalls erkennen kann, war bei 27% der Patienten die konventionelle Plättchenaggregometrie falsch negativ für das Vorliegen einer Clopidogrel-Nonresponsiveness. Der PRI erkannte dahingegen nur 2% der Patienten mit auffälliger Aggregation nicht. Keiner der Patienten mit einer Agg_{max} in der obersten Quartile befand sich beim PRI in der untersten Quartile. Und umgekehrt lag nur ein Patient mit einem hohen PRI bei der Aggregation in der untersten Quartile.

b) Häufigkeit von Nonresponsiveness bei Diabetikern

Da vor kurzem berichtet worden war, dass der Anteil der Nonresponder bei Diabetikern höher ist als in der Normalbevölkerung,¹⁰³ wurde die Häufigkeit von Nonresponsiveness in dieser Untergruppe genauer untersucht. 30 der 100 in die Studie eingeschlossenen Patienten waren Diabetiker. 27% der Patienten zeigten in beiden Tests ein gutes Ansprechen auf Clopidogrel und konnten somit eindeutig der Gruppe der Responder zugeordnet werden. (s. Abb. 26) Dies entsprach etwa der Häufigkeit in der gesamten Studienpopulation. Der PRI war bei 22 Patienten, also bei 73% der Diabetiker höher als 50%. Bei 53% waren sowohl PRI, als auch Aggregometrie auffällig. Die über den PRI definierte Nonresponsiveness war bei Diabetikern und der gesamten Studienpopulation also annähernd gleich häufig.

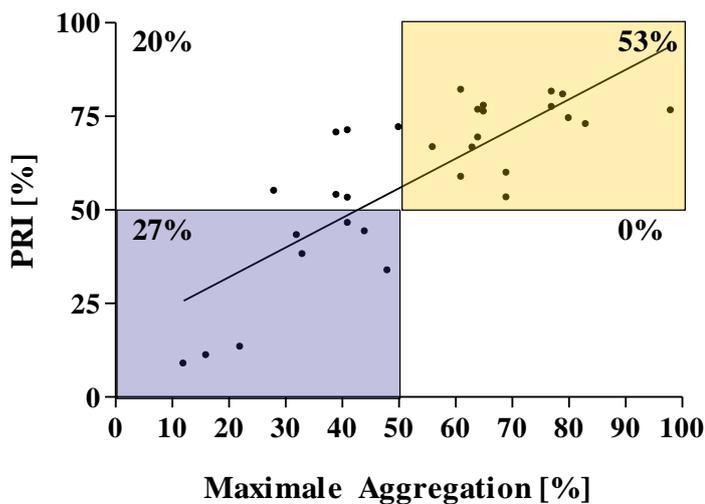


Abbildung. 26: Häufigkeit von Respondern und Nonrespondern bei Diabetikern

Responder (blau) und Non-Responder (gelb) definiert durch Agg_{max} und PRI

5) Einflussfaktoren der Clopidogrel-Responsiveness

Die in allen Methoden sehr heterogene Plättchenaktivität gab Anlass zur Suche nach unabhängigen Einflussfaktoren, die das individuell unterschiedliche Ansprechen auf Clopidogrel erklären könnten. Dazu wurden PRI und die maximale Aggregation nach Stimulation mit 20 μ M ADP in Gruppen mit verschiedenen kardiovaskulären Risikofaktoren, Begleiterkrankungen und Dauermedikationen mittels logistischer Regression untersucht. Abhängige Variable war jeweils ein PRI bzw. eine maximale Aggregation von mehr als 50%.

a) Kardiovaskuläre Risikofaktoren

Tabelle 2 zeigt die Ergebnisse der multivariaten Regressionanalyse für kardiovaskuläre Risikofaktoren.

Parameter	PRI > 50%	p	β	Agg _{max} > 50%	p	β
BMI	0,950-1,158	0,345		0,954-1,126	0,392	
Adipositas	0,886-6,355	0,086		0,85-4,792	0,112	
HTN	0,730-6,900	0,158		0,543-5,499	0,355	
HLP	1,076-6,675	0,034	0,986	0,689-4,069	0,255	
Cholesterin	0,981-1,002	0,115		0,988-1,007	0,659	
LDL	0,984-1,007	0,42		0,987-1,008	0,672	
HDL	0,916-0,985	0,006	-0,051	0,962-1,023	0,623	
Triglyceride	0,998-1,007	0,221		0,999-1,005	0,294	
HbA1c	0,826-2,511	0,198		0,765-1,927	0,41	
DM	0,292-1,977	0,574		0,258-1,464	0,267	
FA	0,332-2,215	0,75		0,412-2,460	0,989	
NA	0,501-3,242	0,611		0,573-3,432	0,459	
n [CVRF]	0,863-1,924	0,215		0,866-1,829	0,229	

Tabelle 2: Beeinflussung der Clopidogrel-Responsiveness durch kardiovaskuläre Riskofaktoren

Die Tabelle zeigt für verschiedene CVRF das Odds Ratio (OR) in seinem 95% Konfidenzintervall (CI). p = Signifikanzniveau, β = Regressionskoeffizient β , BMI = Body Mass Index, HTN = arterielle Hypertonie, HLP = Hypercholesterinämie, LDL = Low Density Lipoprotein, HDL = High Density Lipoprotein, HbA1c = glykosyliertes Hämoglobin, DM = Diabetes mellitus, FA = positive Familienanamnese für kardiovaskuläre Erkrankungen, NA = Nikotinabusus, n [CVRF] = Anzahl der vorhandenen CVRF

Auffällig war, dass Patienten mit einer Hypercholesterinämie (HLP) in der Anamnese ein signifikant höheres Risiko für ein unzureichendes Ansprechen auf Clopidogrel hatten (OR = 0,950, p = 0,006). Das Gleiche galt für Patienten mit niedrigen HDL-Werten (OR = 2,680, p = 0,034). Bei Diabetikern zeigte sich dahingegen kein erhöhtes Risiko für eine Nonresponsiveness: Weder PRI noch Agg_{max} unterschieden sich bei Diabetikern oder Patienten mit einer Erhöhung des Langzeitzuckwerts HbA1c

signifikant von den Werten der Kontrollen. Das passt auch zu der bereits gezeigten unveränderten Häufigkeit von Nonrespondern bei Diabetikern im Vergleich zur gesamten Studienpopulation. Adipositas, Body Mass Index, arterielle Hypertonie, eine positive Familienanamnese, Nikotinabusus und die Anzahl aller vorhandenen kardiovaskulären Risikofaktoren korrelierten ebenfalls nicht mit einer maximalen Aggregation oder einem PRI von mehr als 50%.

b) Komorbiditäten

Bezüglich der Komorbiditäten wurde untersucht, ob eine schwere Schädigung von Herz oder Nieren mit Insuffizienz des entsprechenden Organs, Auswirkungen auf die Plättchenaktivität hat. Aggregation und PRI bei Patienten mit einer Herzinsuffizienz, also einer eingeschränkten Pumpfunktion des Herzens mit einer verminderten linksventrikulären Ejektionsfraktion, wurden mit der Plättchenaktivität von Patienten mit einer normalen Pumpfunktion verglichen. Tabelle 3 zeigt, dass Clopidogrel in diesem Patientenkollektiv weder eine signifikant höhere noch eine niedrigere Wirksamkeit hatte. Auch das Vorliegen einer Niereninsuffizienz mit einer verminderten glomerulären Filtrationsrate hatte keinen Einfluss auf die Plättchenaktivität.

Parameter	PRI > 50%	p	Agg _{max} > 50%	p
LV EF	0,968-1,035	0,951	0,974-1,036	0,764
MDRD	0,993-1,022	0,313	0,989-1,015	0,804

Tabelle 3: Beeinflussung der Clopidogrel-Responsiveness durch Komorbiditäten

Die Tabelle zeigt das OR mit 95% CI für Herz- und Nieren-insuffiziente Patienten.

LV EF = linksventrikuläre Ejektionsfraktion, MDRD = glomeruläre Filtrationsrate

c) Medikation

Untersucht wurde ebenfalls, ob von den Patienten dauerhaft eingenommene Medikamente zu einer Beeinflussung der Thrombozytenaktivität führten. Im Einzelnen handelte es sich bei den häufig eingenommenen Medikamenten um ACE-Hemmer, Angiotensin-Rezeptor-Blocker, Betablocker, Aldosteron-Antagonisten, Thiazide, Schleifendiuretika und Statine. Wie Tabelle 4 zeigt, war nur bei Patienten, die Betablocker einnahmen, die Plättchenaktivität in der Aggregometrie im Vergleich zur Kontrollgruppe grenzwertig signifikant erhöht (OR = 4,565, p = 0,059). Andere Medikamente beeinflussten die Plättchenaktivität nicht signifikant.

Parameter	PRI > 50%	p	β	Agg _{max} > 50%	p	β
ACE I	0,780-5,028	0,151		0,546-3,388	0,509	
ARB	0,204-2,282	0,535		0,489-5,081	0,446	
ACE I/ ARB	0,726-6,809	0,161		0,721-8,289	0,151	
BB	0,495-5,860	0,398		0,945-22,048	0,059	1,518
Statin	0,515-4,970	0,416		0,396-3,709	0,735	
AA	0,097-1,783	0,237		0,076-2,070	0,273	
Thiazid	0,355-2,487	0,901		0,619-3,817	0,354	
Schleifendiuretikum	0,311-1,733	0,481		0,403-2,025	0,805	
ASS				0,172-1,692	0,29	

Tabelle 4: Beeinflussung der Clopidogrel-Responsiveness durch Medikamenteneinnahme

Die Tabelle zeigt das OR mit 95% CI für verschiedene Dauermedikationen.

ACE I = ACE-Hemmer, ARB = Angiotensin-Rezeptor-Blocker, BB = Betablocker, AA = Aldosteron-Antagonisten, ASS = Acetylsalicylsäure

d) Weitere Einflussfaktoren

Bei der Analyse weiterer Parameter fiel außerdem auf, dass Patienten mit niedrigen Thrombozytenzahlen ein signifikant erhöhtes Risiko für eine Nonresponsiveness in Aggregometrie (OR = 0,993, p = 0,025) und PRI (OR = 0,993, p = 0,017) hatten. Alter, Geschlecht, Leukozytenzahlen im Blut sowie eine Erhöhung des Entzündungswertes CRP bzw. der kardialen Marker CK und Troponin T beeinflussten die Thrombozytenaktivität nicht. (s. Tab. 5)

Parameter	PRI > 50%	p	β	Agg _{max} > 50%	p	β
Alter	0,983-1,057	0,298		0,983-1,054	0,321	
Geschlecht	0,369-2,369	0,887		0,774-4,610	0,162	
Thrombozyten	0,967-0,999	0,017	-0,007	0,987-0,999	0,025	-0,007
Leukozyten	0,875-1,134	0,956		0,874-1,114	0,826	
CRP	0,895-1,10	0,956		0,930-1,138	0,58	
CK	0,999-1,001	0,888		1,000-1,001	0,465	
Troponin T	0,780-1,619	0,532		0,913-1,708	0,164	

Tabelle 5: Beeinflussung der Clopidogrel-Responsiveness durch andere Faktoren

Die Tabelle zeigt das OR mit 95% CI für Alter, Geschlecht und verschiedene Laborwerte.

IV) Diskussion

1) Zusammenfassung und Beurteilung der Ergebnisse

a) Plättchenhemmung durch Clopidogrel

Wie erwartet konnte gezeigt werden, dass Clopidogrel zu einer Hemmung der Plättchenaktivität führt: In allen verwendeten Methoden fand sich eine signifikant geringere Thrombozytenaktivität bei den mit Clopidogrel behandelten Patienten als in der Kontrollgruppe. Diese Ergebnisse waren nicht überraschend, da sie die aktuelle Datenlage nur bestätigten: Dass die ADP-induzierte Plättchenaktivität nach Einnahme von Clopidogrel abnimmt, zeigten bereits 1999 *Thebault et al.* In ihrer Studie untersuchten sie die Plättchenaktivität gesunder Personen vor und während der Einnahme von 75 mg Clopidogrel täglich. Unter Clopidogrel nahm die ADP-induzierte Aggregation (5 μ M ADP) im Schnitt um 52% ab.⁶⁶ Die aktuelle Studie ergab ein vergleichbares Ergebnis: Die finale Aggregation nach Stimulation mit 5 μ M ADP war in der mit Clopidogrel behandelten Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe um 39% reduziert. Ebenfalls bereits 1999 konnten *Schwarz et al* zeigen, dass die VASP-Phosphorylierung nach Stimulation mit ADP und PGE₁ in mit Clopidogrel behandelten Patienten signifikant höher war, als bei den unbehandelten Kontrollen.⁹⁰ Und auch für die P-Selektin-Expression existieren schon länger entsprechende Daten: *Moshfegh et al* zeigten im Jahr 2000, dass durch Clopidogrel die Expression des thrombozytären Aktivitätsmarkers CD62P nach Stimulation mit ADP signifikant reduziert wird.¹⁰⁴ Komplizierter ist die Datenlage für die Verschlusszeit im PFA-100®. Hier gibt es einerseits Studien, die keine signifikante Veränderung der Verschlusszeit unter Behandlung mit Clopidogrel feststellen konnten.^{96;97;105;106} Andererseits existieren aber auch Studien, die eine signifikante Verlängerung der Verschlusszeit unter Clopidogrel zeigen.¹⁰⁷ Hier fehlt zur abschließenden Evaluation der häufig kleinen Studien eine Meta-Analyse der Ergebnisse.

b) Heterogenität der Plättchenhemmung und Häufigkeit von Nonresponsiveness

Bei der genaueren Betrachtung der Ergebnisse fiel in allen Methoden eine deutliche Heterogenität in der Plättchenaktivität bei mit Clopidogrel behandelten Patienten auf. So lag zum Beispiel der PRI zwischen 3,32% und 95,69%. Die maximale Aggregation nach Stimulation mit 20 μ M ADP schwankte zwischen 12% und 98%. Daraus ergaben sich Standardabweichungen (SD) von 20,59% bzw. 18,07%. Die Standardabweichung

der Verschlusszeit (SD = 91,31) war sogar noch deutlich höher. Fast die Hälfte der Patienten (42%) zeigte sowohl beim PRI als auch in der Aggregometrie eine beeinträchtigte Plättcheninhibition mit Werten über 50%. Bei 27% der Patienten war allein der PRI erhöht, und nur 2 Patienten hatten allein in der Aggregometrie hohe Plättchenaktivitäten. Insgesamt wurden also mit Hilfe des PRI 69% der Patienten als Nonresponder definiert, in der Aggregometrie gelang dies nur bei 44%. In 39% der Fälle war die konventionelle Aggregometrie also falsch negativ für das Vorliegen einer Clopidogrel-Nonresponsiveness, was einer Sensitivität von 61% entspricht. Der PRI war mit über 95% deutlich sensitiver. Wie bereits erläutert wurde, ist die Heterogenität der Plättchenhemmung durch Clopidogrel kein neues Phänomen. Sie wurde bereits 2002 zum ersten Mal beobachtet und in einer Vielzahl von Studien bestätigt.^{68;69} *Aleil et al* fanden zum Beispiel bei der Auswertung des PRI von 33 mit Clopidogrel behandelten Patienten eine mit 17% ähnlich hohe Standardabweichung.⁹⁴ Und bei der aggregometrischen Untersuchung der Plättchenaktivität von 84 bzw. 96 mit Clopidogrel behandelten Patienten durch *Angiolillo et al* und *Gurbel et al* ergaben sich entsprechend der aktuellen Ergebnisse Standardabweichungen von 20% bzw. 18%.^{108;109} Eine suboptimale Thrombozyteninhibition fand man bisher insgesamt bei zwischen 5% und 58% der Patienten.^{76;77;94;102;108-114} Diese sehr unterschiedlichen Prävalenzen verwundern nicht, wenn man bedenkt, dass es noch keine einheitliche Definition der Nonresponsiveness gibt. Bisher wurden weder Grenzwerte noch Messverfahren einheitlich festgelegt. In einigen Studien wurde zum Beispiel die prozentuale Änderung der Plättchenaktivität nach Einnahme von Clopidogrel im Vergleich zum unbehandelten Zustand beobachtet. Andere Studien wiederum verwendeten zur Definition einer Nonresponsiveness nur die Plättchenaktivität nach Behandlung. Da aktuell in einer normalen Krankenhauspopulation mit Hilfe des P2Y₁₂ spezifischen PRIs 70% der Patienten als Nonresponder definiert werden konnten, muss man wahrscheinlich von einer deutlich höheren Prävalenz als bisher angenommen ausgehen. Die deutlich größere Prävalenz der Nonresponsiveness bei KHK-Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden spiegelt dabei die gestörte Homöostase der Plättchenfunktion in diesen Patienten wieder.

c) Methoden zur Beurteilung der Responsiveness

Obwohl in allen Methoden eine geringere Plättchenaktivität bei mit Clopidogrel behandelten Patienten nachgewiesen werden konnte, zeigte der Vergleich der Methoden nur relativ schwache Korrelationen. Die deutlichste ($r^2 = 0,4651$) und gleichzeitig hoch signifikante ($p < 0,0001$) Korrelation fand sich zwischen der finalen Aggregation in der konventionellen Plättchenaggregometrie und dem PRI. Dass der Korrelationskoeffizient trotzdem relativ weit von 1 entfernt war, was einer linearen Korrelation entsprochen hätte, passt zu der Tatsache, dass die ADP-induzierte Aggregation nicht allein eine Funktion von P2Y₁₂ ist, sondern auch von anderen Faktoren beeinflusst wird. Die VASP-Phosphorylierung dahingegen ist ausschließlich von P2Y₁₂ abhängig und damit selektiv für diesen Rezeptor. Am wenigsten deutlich korrelierte die Verschlusszeit im PFA-100[®] mit den Werten der Aggregometrie ($r^2 = 0,1941$).

Die relativ gute Korrelation von Aggregometrie und PRI konnte bereits mehrfach gezeigt werden.¹¹⁵⁻¹¹⁷ Bezüglich P-Selektin-Expression und Verschlusszeit ist die Studienlage weniger einheitlich: *Angiolillo et al* konnten keine Korrelation zwischen CD62P-Expression und Responsiveness in der Aggregometrie nachweisen.¹⁰⁸ Bei *Sbrana et al* korrelierten die beiden Methoden dahingegen hochsignifikant.¹¹⁸ Und während *Lordkipanidze et al* eine signifikante ($p < 0,05$) Korrelation zwischen Aggregation und Verschlusszeit im PFA-100[®] ($r^2 = 0,274$) zeigen konnten,¹¹⁹ existieren mehrere Studien, in denen die Verschlusszeit nicht mit der Aggregation korreliert.^{96;115} Deshalb muss davon ausgegangen werden, dass PFA-100[®] und P-Selektin-Expression die Plättcheninhibition durch Clopidogrel nicht korrekt wiedergeben. Anders verhält es sich beim PRI. Wie oben bereits ausgeführt, ist die gute Korrelation mit dem aktuellen Goldstandard der Thrombozytenaktivitätsmessung, der konventionellen turbidimetrischen Plättchenaggregometrie bekannt. Außerdem ist der PRI klinisch äußerst relevant. So wurde bereits eine gute Korrelation des PRI mit klinischen Ereignissen wie der Stentthrombose gezeigt.^{93;101} Anhand von 195 Patienten mit NSTEMI fanden *Angiolillo et al* jedoch heraus, dass die höhere Sensitivität mit einer geringeren Spezifität einhergeht.¹²⁰ Trotzdem wird dieser Test aufgrund seiner klinischen Relevanz und seiner hohen Spezifität für den von Clopidogrel gehemmten P2Y₁₂-Rezeptor in Zukunft wahrscheinlich der Standard für die Ermittlung der Wirksamkeit von Clopidogrel sein.⁹⁴

d) Einflussfaktoren der Clopidogrel-Responsiveness

Bei der Untersuchung möglicher Einflussfaktoren der Responsiveness in der multivariaten Regressionsanalyse zeigte sich, dass niedrige HDL-Cholesterin-Werte, eine Hyperlipoproteinämie in der Vorgeschichte sowie niedrige Thrombozytenzahlen Risikofaktoren für ein vermindertes Ansprechen auf Clopidogrel im PRI waren. In der Aggregometrie konnten ebenfalls niedrige Thrombozytenzahlen und zusätzlich die Einnahme von Betablockern als Risikofaktoren für eine Nonresponsiveness identifiziert werden. Diese Faktoren wurden noch nicht als mögliche Einflussfaktoren einer Clopidogrel-Nonresponsiveness beschrieben. In bisherigen Studien wurden jedoch andere Risikofaktoren diskutiert: So konnten zum Beispiel *Serebruany et al* zeigen, dass Diabetiker eine signifikant höhere Thrombozytenaktivität in Aggregometrie und CD62P-Expressionsmessung haben und nach Behandlung mit Clopidogrel geringere Ansprechraten haben.¹²¹ *Cuisset et al* identifizierten außerdem Alter und BMI als Risikofaktoren für eine Nonresponsiveness.¹²² Zusätzlich besteht wohl auch eine Assoziation zwischen Clopidogrel- und Aspirin-Nonresponse.¹²² Betrachtet man Arzneimittelinteraktionen, so weiß man, dass Omeprazol zu einem verminderten Ansprechen auf Clopidogrel führt. *Gilard et al* konnten dieses Phänomen an 105 KHK-Patienten zeigen.¹²³ Statine, ACE-Hemmer, Angiotensin-Rezeptor-Blocker und Betablocker hatten in dieser Studie keinen Einfluss auf den PRI. Eine andere Studie zeigte, dass Calcium-Kanal-Blocker zu einer Abnahme der Wirksamkeit von Clopidogrel führen.¹²⁴

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es wohl eine Vielzahl von Einflussfaktoren gibt. Bei den Medikamenten sind besonders solche Substanzen bedenklich, die wie Clopidogrel hepatisch metabolisiert werden und so zu einer Beeinflussung der Pharmakokinetik des Thienopyridins führen. Klinisch relevant werden diese Erkenntnisse aber höchstens im Sinne einer erhöhten Aufmerksamkeit in bestimmten Risikogruppen werden. Ein Verzicht auf Omeprazol könnte bei Patienten, die mit Clopidogrel behandelt werden, in Erwägung gezogen werden, da Alternativen, wie zum Beispiel Pantoprazol, zur Verfügung stehen.¹²⁵

2) Diskussion der Problematik

a) Die Rolle von Clopidogrel in der Behandlung der KHK

Clopidogrel ist aktuell ein fester Bestandteil der leitliniengerechten Therapie der KHK, deren Ziel es ist, die beeinträchtigte Durchblutung des Herzmuskelgewebes zu verbessern bzw. wiederherzustellen. Hierzu gibt es prinzipiell drei verschiedene Therapieansätze. Zum Einen ist eine rein medikamentöse, konservative Therapie mit antithrombozytär wirksamen Substanzen möglich. Im Gegensatz dazu ist die operative Revaskularisierung im Rahmen einer Bypass-Operation eine sehr invasive Behandlungsoption und deshalb nur in bestimmten Fällen indiziert.¹²⁶ Die dritte Möglichkeit einer minimal invasiven, interventionellen Behandlung stellt in vielerlei Hinsicht einen Mittelweg zwischen den beiden zuerst genannten Optionen dar. Bei der so genannten perkutanen koronaren Intervention (PCI) können Koronarstenosen nach einer konservativen angiographischen Darstellung unter Durchleuchtung noch in gleicher Sitzung mit Hilfe eines Ballonkatheters behoben werden. In der Regel wird im Anschluss an die erfolgreiche Ballondilatation, oder auch so genannte perkutane transluminale Koronarangioplastie (PTCA), ein Stent platziert, der das Gefäß auf Dauer offen halten soll. Dieser besteht aus Metall, das zu einer Thrombozytenaktivierung führt und deshalb zur Vermeidung von Stentthrombosen und anderen kardiovaskulären Ereignissen eine postinterventionelle antithrombozytäre Therapie notwendig macht. Dass eine duale Antiplättchentherapie mit ASS und Clopidogrel kardiovaskuläre Ereignisse nach einer PCI effektiver verhindert als ASS allein, konnte bereits in vielen großen Studien gezeigt werden. So beobachtete man zum Beispiel bei 2658 Patienten mit einer PCI bei akutem Koronarsyndrom ohne ST-Hebungen im EKG eine relative Risikoreduktion um 31% bezüglich des kombinierten Endpunktes kardiovaskulärer Tod, Herzinfarkt und dringliche Revaskularisierung innerhalb von 30 Tagen nach Intervention bei Vor- und Nachbehandlung mit ASS und Clopidogrel im Vergleich zu ASS und Placebo.⁶² Mit der randomisiert-kontrollierten Studie CREDO (clopidogrel for the reduction of events during observation) konnte außerdem die Effektivität des Thienopyridins in der Langzeittherapie gezeigt werden. 2116 KHK-Patienten mit ASS als Standardmedikation wurden nach einer elektiven PCI über ein Jahr beobachtet. Die zusätzliche Gabe von Clopidogrel bewirkte eine relative Risikoreduktion von 26,9% bezüglich des kombinierten Endpunktes Tod, Herzinfarkt und Schlaganfall. Außerdem

hatte eine Vorbehandlung mit Clopidogrel mindestens sechs Stunden vor der geplanten PCI eine relative Risikoreduktion bezüglich des kombinierten Endpunktes Tod, Herzinfarkt und dringliche Revaskularisierung von 38,6% im Vergleich zu nicht vorbehandelten Patienten zur Folge. Eine kurzfristigere Vorbehandlung zeigte dahingegen keinen signifikanten Effekt.⁶⁴ In zwei neueren Studien konnte außerdem gezeigt werden, dass auch bei der primär konservativen, medikamentösen Therapie eines akuten Herzinfarkts, die zusätzliche Gabe von Clopidogrel zu einer Abnahme der kardiovaskulären Ereignisse, sowie der Mortalität führt. So beobachteten *Chen et al* bei 45852 Patienten mit akuten ST-Hebungs-Infarkten eine hochsignifikante relative Risikoreduktion von 9% bezüglich des kombinierten Endpunkts Tod, erneuter Infarkt oder Schlaganfall bei Behandlung mit Clopidogrel.⁶¹ Ähnliches war bereits einige Monate zuvor von *Sabatine et al* gezeigt worden.⁶³ Es verwundert also nicht, dass Clopidogrel ein fester Bestandteil der Behandlungsleitlinien der KHK ist. So wird eine mindestens einmonatige duale Antiplättchentherapie mit ASS und Clopidogrel nach einem akuten Herzinfarkt oder nach Implantation eines unbeschichteten Stents im Rahmen einer PCI empfohlen.^{127;128} Und da die Prävalenz der KHK weiter zunimmt und betroffene Patienten immer häufiger interventionell behandelt werden, wird die suffiziente Hemmung der Thrombozytenaktivität immer wichtiger.¹²⁹ Zum Beispiel stieg die Anzahl der perkutanen Interventionen in den USA zwischen 1987 und 2003 um 326% auf 664000 pro Jahr. Und auch die Rate der Stentimplantationen nimmt zu: So stieg sie beispielsweise zwischen 1996 und 2000 um 147%. 2003 wurden bei etwa 84% der durchgeführten PCIs Stents implantiert.¹³⁰

b) Auswirkungen der Nonresponsiveness

Eine wichtige Frage, die sich nun stellt, ist, welche Auswirkungen eine unvollständige Hemmung der Plättchenaktivität auf Patienten hat, die eigentlich von dieser profitieren sollten. Denn man weiß bereits seit einigen Jahren, dass nach Stentimplantation in 1-2% der Fälle trotz dualer Antiplättchentherapie akute oder subakute Stentthrombosen entstehen.⁹³ Und da sich Berichte über Stentthrombosen in Patienten mit hoher Thrombozytenaktivität unter dualer Antiplättchentherapie häufen,^{93;98-101;131;132} muss davon ausgegangen werden, dass ein vermindertes Ansprechen auf Clopidogrel ein wichtiger Risikofaktor für ein postinterventionelles ischämisches Ereignis ist. Das erhöhte Risiko für Stentthrombosen in Clopidogrel-Nonrespondern wurde sogar bereits

durch prospektive Studien bestätigt und liegt bei bis zu 4,7%.^{98;111-113} Das hat zur Folge, dass diese Patienten nach einer PCI signifikant mehr kardiovaskuläre Ereignisse erleiden und auch häufiger versterben.¹³³ Insbesondere nach Intervention am dominanten oder letzten offenen Gefäß kann eine insuffiziente Plättchenhemmung mit resultierendem Verschluss des Stents für den Patienten fatal sein. Außerdem sind bei Clopidogrel-Nonrespondern im Falle eines akuten Herzinfarktes Morbidität und Mortalität erhöht.^{79;111} Besonders problematisch ist die Tatsache, dass durch Standarddosen Clopidogrel häufig keine ausreichende Plättchenhemmung erreicht wird, bei Patienten, die sich einer elektiven PCI unterziehen. Denn der Eingriff per se senkt bei diesem Kollektiv nur die Symptomatik, nicht aber das Herzinfarkttrisiko.^{134;135} So kann die Intervention bei einem Nonresponder mit einer stabilen KHK das Risiko eines akuten Verschlusses, der als akuter Herzinfarkt mit allen üblichen Komplikationen imponieren kann, erhöhen. Das Ziel sollte aber vielmehr sein, jeden Patienten so zu behandeln, dass ischämische Ereignisse effektiv verhindert werden.¹³⁶⁻¹³⁹

c) Drug-eluting Stents

Die so genannten Drug-eluting-Stents (DES) sind in diesem Zusammenhang besonders problematisch. Bei diesen wird die Endothelialisierung des Stents, durch die es zu Stent-Stenosen kommen kann, durch die Ausschüttung zytostatisch wirksamer Medikamente wie Sirolimus unterdrückt.¹⁴⁰ In einem handelsüblichen Metallstent (Bare-Metal-Stent, BMS) ist die Endothelialisierung der Metalloberfläche in der Regel nach etwa drei Monaten abgeschlossen. Damit gibt es dann kein freiliegendes Fremdmaterial mehr, das von den Thrombozyten erkannt werden kann. Ein DES kann dahingegen über einen längeren Zeitraum Thrombozyten aktivieren. So wurden zum Beispiel nach frühzeitigem Absetzen von Clopidogrel späte Stentthrombosen, die mehr als 30 Tage nach Intervention auftraten, beschrieben.¹⁴¹⁻¹⁴³ Deshalb entschieden sich FDA und AHA (American Heart Association) in ihren Leitlinien nach Implantation eines DES eine mindestens zwölfmonatige Therapie mit Clopidogrel zu empfehlen.¹⁴⁴⁻¹⁴⁶ Dies zeigt auch, dass nach DES-Implantation eine insuffiziente Plättchenhemmung wesentlich bedrohlicher ist als nach Implantation eines BMS. Die erhebliche Anzahl von Nonrespondern, die in der klinischen Routine bisher nicht identifiziert werden können und erst bei Auftreten von Komplikationen auffallen, ist bei dem immer größer werdenden Anteil von DES bei Stentimplantationen problematisch.

3) Lösungsmöglichkeiten

Lösungsmöglichkeiten für das Problem einer insuffizienten Plättchenhemmung umfassen eine Steigerung der Clopidogreldosis und eine individuelle Dosisanpassung bei Clopidogrel-Nonresponsiveness. Alternativ kommt auch der Einsatz neuer antithrombozytär wirksamer Substanzen in Frage.

a) Generelle Dosissteigerung

Dass eine Erhöhung der Clopidogreldosis zu einer Abnahme der Nonresponsiveness führt, konnte bereits in vielen großen Studien gezeigt werden. Eine Optimierung der Clopidogrel-Wirkung mit konsekutiver Senkung des Risikos für klinische Ereignisse kann durch Erhöhung der Startdosis^{76;78;79} oder der Erhaltungsdosis^{86;87} erreicht werden. Problematisch an einer generellen Anpassung der Dosierung ist jedoch, dass höhere Dosen des Thienopyridins auch mit Gefahren wie einer Neutropenie oder einer erhöhten Blutungsneigung einhergehen.⁶⁶ Andererseits scheinen diese höheren Dosen nicht bei allen Patienten eine adäquate Plättchenhemmung zu bewirken. So zeigten zum Beispiel *Fontana et al*, dass trotz einer Verdopplung der Erhaltungsdosis bei 45 Nonrespondern diese nicht die Thrombozytenhemmung eines Responders aufwiesen.¹⁴⁷ *Angiolillo et al* bestätigten diese Ergebnisse bei Diabetikern. Eine Erhöhung der Erhaltungsdosis bewirkte nur bei 35% der Nonresponder eine gute Clopidogrel-Response.¹⁴⁸ Sinnvoller wäre also eine selektive Dosis-Anpassung bei entsprechender Notwendigkeit.

b) Individuelle Dosisanpassung

Benefit und Sicherheit einer individuellen Anpassung der Clopidogrel-Dosis bei Nonresponse wurden bereits gezeigt.¹⁴⁹ *Bonello et al* fanden in ihrer prospektiven Multicenter-Studie eine Abnahme kardiovaskulärer Ereignisse durch die PRI-gesteuerte Dosisanpassung. Das Blutungsrisiko war dabei nicht erhöht. Voraussetzung für eine individuelle Dosisanpassung ist die quantitative Messung der Thrombozytenhemmung durch Clopidogrel. Hier kommt nun jedoch wieder oben genannte Problematik zu tragen: Bisher existieren keine standardisierten Methoden und Grenzwerte, mit Hilfe derer man eine Aussage zum klinischen Risiko eines Patienten treffen kann. Bei zusätzlich aufwändigen Testverfahren mit hohem Zeit- und Personalaufwand ist die klinisch routinemäßige Thrombozytenaktivitätsmessung zur Beurteilung der Clopidogrel-Response aktuell nur in einigen wenigen Kliniken möglich.¹¹⁹

c) Neue Substanzen

Da eine unzureichende Metabolisierung die wahrscheinlichste Ursache der Clopidogrel-Nonresponsiveness ist, könnte die Lösung des Problems bei neuen Substanzen liegen, die wie das neue, oral verfügbare Thienopyridin Prasugrel, einheitlicher metabolisiert werden und somit eine höhere Bioverfügbarkeit besitzen. Auch andere P2Y₁₂-Antagonisten wie Cangrelor oder Ticagrelor (AZD6140), die gar nicht metabolisiert werden müssen, kommen als Alternativen in Frage.¹⁵⁰ Das Thienopyridin Prasugrel zum Beispiel hat in klinischen Studien Erfolg versprechende Ergebnisse geliefert. So fand man heraus, dass in gesunden Kontrollen eine LD mit 60 mg Prasugrel schneller, einheitlicher und effektiver wirkt als 300 mg Clopidogrel.^{151;152} Bereits 2005 zeigten *Wiviott et al* in der Phase II Studie JUMBO-TIMI 26 (joint utilization of medications to block platelets optimally-thrombolysis in myocardial infarction) an 904 PCI-Patienten eine ähnliche Effektivität von Prasugrel im Vergleich zu Clopidogrel bei vergleichbarer Sicherheit.¹⁵³ Und *Jernberg et al* konnten zeigen, dass Prasugrel zu einer besseren Plättcheninhibition bei Patienten mit stabiler KHK führt als Clopidogrel.¹⁵⁴ In der 2007 veröffentlichten Phase III Studie TRITON-TIMI 38 (trial to assess improvement in therapeutic outcomes by optimizing platelet inhibition with prasugrel) war die Behandlung mit Prasugrel 10 mg täglich bei ACS zwar mit signifikant weniger kardiovaskulären Ereignissen als unter Clopidogrel 75 mg assoziiert. Gleichzeitig war aber das Risiko für schwere Blutungen erhöht und die Gesamtmortalität wurde nicht beeinflusst. Erwähnenswert ist aber die in dieser Studie gezeigte signifikante Reduktion von Stentthrombosen um 52% und der größere Benefit von Diabetikern.^{155;156} Eine weitere Phase III Studie (prasugrel in comparison to clopidogrel for inhibition of platelet activation and aggregation-thrombolysis in myocardial infarction /PRINCIPLE-TIMI 44) zeigte bei 201 KHK-Patienten mit elektiver PCI eine signifikant bessere Plättcheninhibition durch Prasugrel (LD 60 mg/MD 10 mg) im Vergleich zu hoch dosiertem Clopidogrel (LD 600 mg/MD 150mg) in der Plättchenaggregometrie.¹⁵⁷ Dies lässt vermuten, dass eine Erhöhung der Clopidogreldosis keine Auswirkungen auf die Ergebnisse von TRITON-TIMI 38 gehabt hätte. Zur weiteren Evaluation von Effektivität und Sicherheit von Prasugrel sind weitere große Studien wie zum Beispiel TRILOGY ACS (targeted platelet inhibition to clarify the optimal strategy to medically manage acute coronary syndromes) geplant. Und in der OPTIMUS-3 Studie (optimizing

antiplatelet therapy in diabetes mellitus) soll der Benefit von Prasugrel für Diabetiker genauer untersucht werden.¹⁵⁰

Cangrelor und Ticagrelor sind direkte, reversible P2Y₁₂-Antagonisten, die nicht erst durch Metabolisierung aktiviert werden müssen. Während Ticagrelor oral verabreicht werden kann, ist Cangrelor nur für die intravenöse Applikation geeignet.¹⁵⁸ Dass Ticagrelor (2 x 100/200mg) gut toleriert wird und in der Plättchenaggregometrie einen besseren antithrombozytären Effekt als Clopidogrel hat, wurde von *Husted et al* 2006 an 200 KHK-Patienten gezeigt.¹⁵⁹ Dieses Ergebnis konnte bei ACS-Patienten in der DISPERSE-2 Studie (dose confirmation study assessing anti-platelet effects of AZD6140 vs. Clopidogrel in non-ST-segment elevation myocardial infarction) reproduziert werden.¹⁶⁰ Und eine Subgruppenanalyse der Studie zeigte außerdem, dass bei mit Clopidogrel vorbehandelten Patienten die Plättchenhemmung durch Ticagrelor noch verstärkt wird.¹⁶¹ Ein weiterer Vorteil der neuen Substanz ist die schnellere Wirkung: Bereits vier Stunden nach Einnahme werden 90% der endgültigen Hemmung erreicht. Unter Clopidogrel werden zum gleichen Zeitpunkt lediglich 60% erreicht.¹⁵⁹ Aufgrund der viel versprechenden Ergebnisse wird die Effektivität und Sicherheit von Ticagrelor aktuell in einer Phase III Studie (platelet inhibition and patient outcomes/PLATO) untersucht, in die 18000 Patienten eingeschlossen wurden. Cangrelor stellt wegen der intravenösen Applikation und seiner sehr kurzen Halbwertszeit von weniger als einer Stunde keine Alternative für eine Langzeittherapie mit Clopidogrel dar. Allerdings existieren bereits Phase II Studien, in denen gezeigt wurde, dass Cangrelor ähnlich effektiv und sicher wie GPIIb/IIIa-Antagonisten ist. In Studien wie CHAMPION-PCI (cangrelor vs standard therapy to achieve optimal management of platelet inhibition – percutaneous coronary intervention) und CHAMPION-PLATFORM (cangrelor vs placebo to achieve optimal management of platelet inhibition) soll Cangrelor an insgesamt etwa 15000 Patienten genauer auf seine Effektivität und Sicherheit untersucht werden.

Mit Prasugrel und Ticagrelor existieren also zwei neue Substanzen, die eine ernst zu nehmende Alternative zu Clopidogrel darstellen und aktuell in Phase III Studien weiter überprüft werden.

V) Zusammenfassung

Die koronare Herzkrankheit ist die häufigste Todesursache in Industrienationen und wird mit Zunahme ihrer Risikofaktoren in Zukunft weiter an Bedeutung gewinnen. Seitdem große Studien zeigen konnten, dass KHK-Patienten von der Behandlung mit dem Thrombozytenaggregationshemmer Clopidogrel profitieren, ist das Thienopyridin Bestandteil der leitliniengerechten Therapie der akuten und chronischen KHK. In den letzten Jahren fanden Forscher jedoch heraus, dass individuelle Unterschiede in der Wirksamkeit von Clopidogrel existieren, die bei Nonrespondern mit einem erhöhten kardiovaskulären Risiko einhergehen.

Zur Beurteilung der Relevanz eines verminderten Ansprechens auf Clopidogrel in einem alltäglichen Patientenkollektiv wurde aktuell die Thrombozytenaktivität von 100 konsekutiven Patienten mit stabiler KHK untersucht, die mit mindestens 75 mg Clopidogrel täglich behandelt wurden. Neben dem P2Y₁₂-spezifischen PRI kam dazu auch die Messung der Verschlusszeit im PFA-100[®], die ADP-induzierte P-Selektin-Expression und der aktuelle Goldstandard der Thrombozytenaktivitätsmessung, die ADP-induzierte Plättchenaggregometrie, zum Einsatz.

Trotz guter Korrelation der Ergebnisse von PRI und Aggregometrie, war die Rate der Nonresponder mit einem PRI > 50% deutlich höher als in der Aggregometrie. Insgesamt fand sich bei 69% der Patienten ein unzureichendes Ansprechen auf Clopidogrel. 39% der Clopidogrel-Nonresponder konnten in der Aggregometrie nicht als solche detektiert werden. In der statistischen Analyse zeigten sich niedrige HDL-Spiegel und eine Hypercholesterinämie in der Vorgeschichte als Einflussfaktoren der Clopidogrel-Nonresponsiveness. Andere kardiovaskuläre Risikofaktoren, Komorbiditäten und Medikamente hatten keine Auswirkung auf die Clopidogrel-Responsiveness.

Die Problematik der Clopidogrel-Nonresponsiveness bedarf vor allem wegen der Korrelation mit klinischen Ereignissen und der erhöhten Mortalität einer baldigen Lösung. In Frage kommen dazu der Einsatz neuer Substanzen und eine generelle oder individuelle Dosisanpassung. Unklar ist allerdings noch, welches Konzept am sichersten und ökonomischsten ist. Aktuell ist besonders bei Hochrisikopatienten eine Testung der Clopidogrel-Responsiveness mit individueller Dosisanpassung sinnvoll. Aufgrund der höheren Sensitivität im Vergleich zur Plättchenaggregometrie wäre ein P2Y₁₂-spezifischer Test ähnlich dem PRI dazu am ehesten geeignet.

VI) Literaturverzeichnis

1. Lopez AD, Murray CC. The global burden of disease, 1990-2020. *Nat Med*. 1998;4:1241-1243.
2. Beaglehole R, Irwin A. The World Health Report 2003, Chapter 6: Neglected Global Epidemics: three growing threats. 83-102. 2003.
3. statistisches Bundesamt. Todesursachen in Deutschland. 2007.
4. Yusuf S, Reddy S, Ounpuu S et al. Global burden of cardiovascular diseases: part I: general considerations, the epidemiologic transition, risk factors, and impact of urbanization. *Circulation*. 2001;104:2746-2753.
5. Chapman MJ. From pathophysiology to targeted therapy for atherothrombosis: a role for the combination of statin and aspirin in secondary prevention. *Pharmacol Ther*. 2007;113:184-196.
6. Fuster V, Moreno PR, Fayad ZA et al. Atherothrombosis and high-risk plaque: part I: evolving concepts. *J Am Coll Cardiol*. 2005;46:937-954.
7. Croce K, Libby P. Intertwining of thrombosis and inflammation in atherosclerosis. *Curr Opin Hematol*. 2007;14:55-61.
8. Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med*. 2005;352:1685-1695.
9. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature*. 2002;420:868-874.
10. Corti R, Hutter R, Badimon JJ et al. Evolving concepts in the triad of atherosclerosis, inflammation and thrombosis. *J Thromb Thrombolysis*. 2004;17:35-44.
11. Rauch U, Osende JI, Fuster V et al. Thrombus formation on atherosclerotic plaques: pathogenesis and clinical consequences. *Ann Intern Med*. 2001;134:224-238.
12. Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med*. 1999;340:115-126.
13. Bonetti PO, Lerman LO, Lerman A. Endothelial dysfunction: a marker of atherosclerotic risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003;23:168-175.
14. Stary HC, Chandler AB, Glagov S et al. A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation*. 1994;89:2462-2478.
15. Falk E. Why do plaques rupture? *Circulation*. 1992;86:III30-III42.

16. Schroeder AP, Falk E. Vulnerable and dangerous coronary plaques. *Atherosclerosis*. 1995;118 Suppl:S141-S149.
17. Moreno PR, Falk E, Palacios IF et al. Macrophage infiltration in acute coronary syndromes. Implications for plaque rupture. *Circulation*. 1994;90:775-778.
18. Schroeder AP, Falk E. Pathophysiology and inflammatory aspects of plaque rupture. *Cardiol Clin*. 1996;14:211-220.
19. Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE et al. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation*. 1995;92:1355-1374.
20. Fernandez-Ortiz A, Badimon JJ, Falk E et al. Characterization of the relative thrombogenicity of atherosclerotic plaque components: implications for consequences of plaque rupture. *J Am Coll Cardiol*. 1994;23:1562-1569.
21. Falk E. Morphologic features of unstable atherothrombotic plaques underlying acute coronary syndromes. *Am J Cardiol*. 1989;63:114E-120E.
22. Falk E, Shah PK, Fuster V. Coronary plaque disruption. *Circulation*. 1995;92:657-671.
23. Ruggeri ZM. Platelets in atherothrombosis. *Nat Med*. 2002;8:1227-1234.
24. Huo Y, Ley KF. Role of platelets in the development of atherosclerosis. *Trends Cardiovasc Med*. 2004;14:18-22.
25. Massberg S, Brand K, Gruner S et al. A critical role of platelet adhesion in the initiation of atherosclerotic lesion formation. *J Exp Med*. 2002;196:887-896.
26. Frenette PS, Johnson RC, Hynes RO et al. Platelets roll on stimulated endothelium in vivo: an interaction mediated by endothelial P-selectin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92:7450-7454.
27. Lindemann S, Tolley ND, Dixon DA et al. Activated platelets mediate inflammatory signaling by regulated interleukin 1beta synthesis. *J Cell Biol*. 2001;154:485-490.
28. Schwarz UR, Kobsar AL, Koksich M et al. Inhibition of agonist-induced p42 and p38 mitogen-activated protein kinase phosphorylation and CD40 ligand/P-selectin expression by cyclic nucleotide-regulated pathways in human platelets. *Biochem Pharmacol*. 2000;60:1399-1407.
29. Andre P, Prasad KS, Denis CV et al. CD40L stabilizes arterial thrombi by a beta3 integrin--dependent mechanism. *Nat Med*. 2002;8:247-252.
30. Henn V, Slupsky JR, Grafe M et al. CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature*. 1998;391:591-594.

31. Gawaz M, Brand K, Dickfeld T 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;148:75-85.
32. Furie B, Furie BC, Flaumenhaft R. A journey with platelet P-selectin: the molecular basis of granule secretion, signalling and cell adhesion. *Thromb Haemost*. 2001;86:214-221.
33. Gawaz M, Langer H, May AE. Platelets in inflammation and atherogenesis. *J Clin Invest*. 2005;115:3378-3384.
34. Gawaz M, Neumann FJ, Dickfeld T et al. Activated platelets induce monocyte chemotactic protein-1 secretion and surface expression of intercellular adhesion molecule-1 on endothelial cells. *Circulation*. 1998;98:1164-1171.
35. McNicol A, Israels SJ. Platelets and anti-platelet therapy. *J Pharmacol Sci*. 2003;93:381-396.
36. Weiss HJ, Aledort LM. Impaired platelet-connective-tissue reaction in man after aspirin ingestion. *Lancet*. 1967;2:495-497.
37. Roth GJ, Majerus PW. The mechanism of the effect of aspirin on human platelets. I. Acetylation of a particulate fraction protein. *J Clin Invest*. 1975;56:624-632.
38. Vane JR, Bakhle YS, Botting RM. Cyclooxygenases 1 and 2. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1998;38:97-120.
39. McAdam BF, Catella-Lawson F, Mardini IA et al. Systemic biosynthesis of prostacyclin by cyclooxygenase (COX)-2: the human pharmacology of a selective inhibitor of COX-2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96:272-277.
40. Meadows TA, Bhatt DL. Clinical aspects of platelet inhibitors and thrombus formation. *Circ Res*. 2007;100:1261-1275.
41. Chew DP, Bhatt DL, Topol EJ. Oral glycoprotein IIb/IIIa inhibitors: why don't they work? *Am J Cardiovasc Drugs*. 2001;1:421-428.
42. Chew DP, Bhatt DL, Sapp S et al. Increased mortality with oral platelet glycoprotein IIb/IIIa antagonists: a meta-analysis of phase III multicenter randomized trials. *Circulation*. 2001;103:201-206.
43. Chew DP, Bhatt DL. Oral glycoprotein IIb/IIIa antagonists in coronary artery disease. *Curr Cardiol Rep*. 2001;3:63-71.
44. Topol EJ, Easton D, Harrington RA et al. Randomized, double-blind, placebo-controlled, international trial of the oral IIb/IIIa antagonist lotrafiban in coronary and cerebrovascular disease. *Circulation*. 2003;108:399-406.

45. Thebault JJ, Blatrix CE, Blanchard JF et al. Effects of ticlopidine, a new platelet aggregation inhibitor in man. *Clin Pharmacol Ther.* 1975;18:485-490.
46. Di Minno G, Cerbone AM, Mattioli PL et al. Functionally thrombasthenic state in normal platelets following the administration of ticlopidine. *J Clin Invest.* 1985;75:328-338.
47. Hollopeter G, Jantzen HM, Vincent D et al. Identification of the platelet ADP receptor targeted by antithrombotic drugs. *Nature.* 2001;409:202-207.
48. Hechler B, Cattaneo M, Gachet C. The P2 receptors in platelet function. *Semin Thromb Hemost.* 2005;31:150-161.
49. Gachet C. Identification, characterization, and inhibition of the platelet ADP receptors. *Int J Hematol.* 2001;74:375-381.
50. Gachet C, Leon C, Hechler B. The platelet P2 receptors in arterial thrombosis. *Blood Cells Mol Dis.* 2006;36:223-227.
51. Gachet C. Regulation of platelet functions by P2 receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2006;46:277-300.
52. Geiger J, Brich J, Honig-Liedl P et al. Specific impairment of human platelet P2Y₁₂ ADP receptor-mediated signaling by the antiplatelet drug clopidogrel. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999;19:2007-2011.
53. Horstrup K, Jablonka B, Honig-Liedl P et al. Phosphorylation of focal adhesion vasodilator-stimulated phosphoprotein at Ser157 in intact human platelets correlates with fibrinogen receptor inhibition. *Eur J Biochem.* 1994;225:21-27.
54. Savi P, Herbert JM. Clopidogrel and ticlopidine: P2Y₁₂ adenosine diphosphate-receptor antagonists for the prevention of atherothrombosis. *Semin Thromb Hemost.* 2005;31:174-183.
55. A randomised, blinded, trial of clopidogrel versus aspirin in patients at risk of ischaemic events (CAPRIE). CAPRIE Steering Committee. *Lancet.* 1996;348:1329-1339.
56. Bhatt DL, Marso SP, Hirsch AT et al. Amplified benefit of clopidogrel versus aspirin in patients with diabetes mellitus. *Am J Cardiol.* 2002;90:625-628.
57. Bhatt DL, Chew DP, Hirsch AT et al. Superiority of clopidogrel versus aspirin in patients with prior cardiac surgery. *Circulation.* 2001;103:363-368.
58. Ringleb PA, Bhatt DL, Hirsch AT et al. Benefit of clopidogrel over aspirin is amplified in patients with a history of ischemic events. *Stroke.* 2004;35:528-532.
59. Lau WC, Gurbel PA, Watkins PB et al. Contribution of hepatic cytochrome P450 3A4 metabolic activity to the phenomenon of clopidogrel resistance. *Circulation.* 2004;109:166-171.

60. Yusuf S, Zhao F, Mehta SR et al. Effects of clopidogrel in addition to aspirin in patients with acute coronary syndromes without ST-segment elevation. *N Engl J Med.* 2001;345:494-502.
61. Chen ZM, Jiang LX, Chen YP et al. Addition of clopidogrel to aspirin in 45,852 patients with acute myocardial infarction: randomised placebo-controlled trial. *Lancet.* 2005;366:1607-1621.
62. Mehta SR, Yusuf S, Peters RJ et al. Effects of pretreatment with clopidogrel and aspirin followed by long-term therapy in patients undergoing percutaneous coronary intervention: the PCI-CURE study. *Lancet.* 2001;358:527-533.
63. Sabatine MS, Cannon CP, Gibson CM et al. Addition of clopidogrel to aspirin and fibrinolytic therapy for myocardial infarction with ST-segment elevation. *N Engl J Med.* 2005;352:1179-1189.
64. Steinhubl SR, Berger PB, Mann JT, III et al. Early and sustained dual oral antiplatelet therapy following percutaneous coronary intervention: a randomized controlled trial. *JAMA.* 2002;288:2411-2420.
65. Eshaghian S, Kaul S, Amin S et al. Role of clopidogrel in managing atherothrombotic cardiovascular disease. *Ann Intern Med.* 2007;146:434-441.
66. Thebault JJ, Kieffer G, Lowe GD et al. Repeated-dose pharmacodynamics of clopidogrel in healthy subjects. *Semin Thromb Hemost.* 1999;25 Suppl 2:9-14.
67. Quinn MJ, Fitzgerald DJ. Ticlopidine and clopidogrel. *Circulation.* 1999;100:1667-1672.
68. Jaremo P, Lindahl TL, Fransson SG et al. Individual variations of platelet inhibition after loading doses of clopidogrel. *J Intern Med.* 2002;252:233-238.
69. Maree AO, Fitzgerald DJ. Variable platelet response to aspirin and clopidogrel in atherothrombotic disease. *Circulation.* 2007;115:2196-2207.
70. Savi P, Herbert JM, Pflieger AM et al. Importance of hepatic metabolism in the antiaggregating activity of the thienopyridine clopidogrel. *Biochem Pharmacol.* 1992;44:527-532.
71. Savi P, Combalbert J, Gaich C et al. The antiaggregating activity of clopidogrel is due to a metabolic activation by the hepatic cytochrome P450-1A. *Thromb Haemost.* 1994;72:313-317.
72. Savi P, Pereillo JM, Uzabiaga MF et al. Identification and biological activity of the active metabolite of clopidogrel. *Thromb Haemost.* 2000;84:891-896.
73. Suh JW, Koo BK, Zhang SY et al. Increased risk of atherothrombotic events associated with cytochrome P450 3A5 polymorphism in patients taking clopidogrel. *CMAJ.* 2006;174:1715-1722.

74. Fontana P, Dupont A, Gandrille S et al. Adenosine diphosphate-induced platelet aggregation is associated with P2Y12 gene sequence variations in healthy subjects. *Circulation*. 2003;108:989-995.
75. Taubert D, Kastrati A, Harlfinger S et al. Pharmacokinetics of clopidogrel after administration of a high loading dose. *Thromb Haemost*. 2004;92:311-316.
76. Angiolillo DJ, Fernandez-Ortiz A, Bernardo E et al. High clopidogrel loading dose during coronary stenting: effects on drug response and interindividual variability. *Eur Heart J*. 2004;25:1903-1910.
77. Gurbel PA, Bliden KP, Hayes KM et al. The relation of dosing to clopidogrel responsiveness and the incidence of high post-treatment platelet aggregation in patients undergoing coronary stenting. *J Am Coll Cardiol*. 2005;45:1392-1396.
78. Montalescot G, Sideris G, Meuleman C et al. A randomized comparison of high clopidogrel loading doses in patients with non-ST-segment elevation acute coronary syndromes: the ALBION (Assessment of the Best Loading Dose of Clopidogrel to Blunt Platelet Activation, Inflammation and Ongoing Necrosis) trial. *J Am Coll Cardiol*. 2006;48:931-938.
79. Cuisset T, Frere C, Quilici J et al. Benefit of a 600-mg loading dose of clopidogrel on platelet reactivity and clinical outcomes in patients with non-ST-segment elevation acute coronary syndrome undergoing coronary stenting. *J Am Coll Cardiol*. 2006;48:1339-1345.
80. Angiolillo DJ, Shoemaker SB, Desai B et al. Randomized comparison of a high clopidogrel maintenance dose in patients with diabetes mellitus and coronary artery disease: results of the Optimizing Antiplatelet Therapy in Diabetes Mellitus (OPTIMUS) study. *Circulation*. 2007;115:708-716.
81. Rodgers RP, Levin J. A critical reappraisal of the bleeding time. *Semin Thromb Hemost*. 1990;16:1-20.
82. Michelson AD, Frelinger AL, III, Furman MI. Current options in platelet function testing. *Am J Cardiol*. 2006;98:4N-10N.
83. Ingerman-Wojenski C, Smith JB, Silver MJ. Evaluation of electrical aggregometry: comparison with optical aggregometry, secretion of ATP, and accumulation of radiolabeled platelets. *J Lab Clin Med*. 1983;101:44-52.
84. Rand ML, Leung R, Packham MA. Platelet function assays. *Transfus Apher Sci*. 2003;28:307-317.
85. Angiolillo DJ, Fernandez-Ortiz A, Bernardo E et al. Variability in individual responsiveness to clopidogrel: clinical implications, management, and future perspectives. *J Am Coll Cardiol*. 2007;49:1505-1516.
86. Gurbel PA, Tantry US. Aspirin and clopidogrel resistance: consideration and management. *J Interv Cardiol*. 2006;19:439-448.

87. O'Donoghue M, Wiviott SD. Clopidogrel response variability and future therapies: clopidogrel: does one size fit all? *Circulation*. 2006;114:e600-e606.
88. McEver RP, Martin MN. A monoclonal antibody to a membrane glycoprotein binds only to activated platelets. *J Biol Chem*. 1984;259:9799-9804.
89. Shattil SJ, Cunningham M, Hoxie JA. Detection of activated platelets in whole blood using activation-dependent monoclonal antibodies and flow cytometry. *Blood*. 1987;70:307-315.
90. Schwarz UR, Geiger J, Walter U et al. Flow cytometry analysis of intracellular VASP phosphorylation for the assessment of activating and inhibitory signal transduction pathways in human platelets--definition and detection of ticlopidine/clopidogrel effects. *Thromb Haemost*. 1999;82:1145-1152.
91. Eigenthaler M, Nolte C, Halbrugge M et al. Concentration and regulation of cyclic nucleotides, cyclic-nucleotide-dependent protein kinases and one of their major substrates in human platelets. Estimating the rate of cAMP-regulated and cGMP-regulated protein phosphorylation in intact cells. *Eur J Biochem*. 1992;205:471-481.
92. Walter U, Eigenthaler M, Geiger J et al. Role of cyclic nucleotide-dependent protein kinases and their common substrate VASP in the regulation of human platelets. *Adv Exp Med Biol*. 1993;344:237-249.
93. Barragan P, Bouvier JL, Roquebert PO et al. Resistance to thienopyridines: clinical detection of coronary stent thrombosis by monitoring of vasodilator-stimulated phosphoprotein phosphorylation. *Catheter Cardiovasc Interv*. 2003;59:295-302.
94. Aleil B, Ravanat C, Cazenave JP et al. Flow cytometric analysis of intraplatelet VASP phosphorylation for the detection of clopidogrel resistance in patients with ischemic cardiovascular diseases. *J Thromb Haemost*. 2005;3:85-92.
95. Kundu SK, Heilmann EJ, Sio R et al. Description of an in vitro platelet function analyzer--PFA-100. *Semin Thromb Hemost*. 1995;21 Suppl 2:106-112.
96. Agarwal S, Coakley M, Reddy K et al. Quantifying the effect of antiplatelet therapy: a comparison of the platelet function analyzer (PFA-100) and modified thromboelastography (mTEG) with light transmission platelet aggregometry. *Anesthesiology*. 2006;105:676-683.
97. Mani H, Linnemann B, Luxembourg B et al. Response to aspirin and clopidogrel monitored with different platelet function methods. *Platelets*. 2006;17:303-310.
98. Bliden KP, DiChiara J, Tantry US et al. Increased risk in patients with high platelet aggregation receiving chronic clopidogrel therapy undergoing percutaneous coronary intervention: is the current antiplatelet therapy adequate? *J Am Coll Cardiol*. 2007;49:657-666.

99. Gurbel PA, Bliden KP, Guyer K et al. Platelet reactivity in patients and recurrent events post-stenting: results of the PREPARE POST-STENTING Study. *J Am Coll Cardiol.* 2005;46:1820-1826.
100. Wenaweser P, Hess O. Stent thrombosis is associated with an impaired response to antiplatelet therapy. *J Am Coll Cardiol.* 2005;46:CS5-CS6.
101. Gurbel PA, Bliden KP, Samara W et al. Clopidogrel effect on platelet reactivity in patients with stent thrombosis: results of the CREST Study. *J Am Coll Cardiol.* 2005;46:1827-1832.
102. Grossmann R, Sokolova O, Schnurr A et al. Variable extent of clopidogrel responsiveness in patients after coronary stenting. *Thromb Haemost.* 2004;92:1201-1206.
103. Angiolillo DJ, Shoemaker SB, Desai B et al. Randomized Comparison of a High Clopidogrel Maintenance Dose in Patients With Diabetes Mellitus and Coronary Artery Disease. Results of the Optimizing Antiplatelet Therapy in Diabetes Mellitus (OPTIMUS) Study. *Circulation.* 2007;115:708-716.
104. Moshfegh K, Redondo M, Julmy F et al. Antiplatelet effects of clopidogrel compared with aspirin after myocardial infarction: enhanced inhibitory effects of combination therapy. *J Am Coll Cardiol.* 2000;36:699-705.
105. Velik-Salchner C, Maier S, Innerhofer P et al. Point-of-care whole blood impedance aggregometry versus classical light transmission aggregometry for detecting aspirin and clopidogrel: the results of a pilot study. *Anesth Analg.* 2008;107:1798-1806.
106. Mueller T, Dieplinger B, Poelz W et al. Utility of the PFA-100 Instrument and the Novel Multiplate Analyzer for the Assessment of Aspirin and Clopidogrel Effects on Platelet Function in Patients With Cardiovascular Disease. *Clin Appl Thromb Hemost.* 2008.
107. Serebruany VL, Malinin AI, Pokov A et al. Effects of clopidogrel and aspirin in combination versus aspirin alone on platelet activation and major receptor expression in diabetic patients: the PLavix Use for Treatment Of Diabetes (PLUTO-Diabetes) trial. *Am Heart J.* 2008;155:93-97.
108. Angiolillo DJ, Fernandez-Ortiz A, Bernardo E et al. Identification of low responders to a 300-mg clopidogrel loading dose in patients undergoing coronary stenting. *Thromb Res.* 2005;115:101-108.
109. Gurbel PA, Bliden KP, Hiatt BL et al. Clopidogrel for coronary stenting: response variability, drug resistance, and the effect of pretreatment platelet reactivity. *Circulation.* 2003;107:2908-2913.
110. Lepantalo A, Virtanen KS, Heikkila J et al. Limited early antiplatelet effect of 300 mg clopidogrel in patients with aspirin therapy undergoing percutaneous coronary interventions. *Eur Heart J.* 2004;25:476-483.

111. Matetzky S, Shenkman B, Guetta V et al. Clopidogrel resistance is associated with increased risk of recurrent atherothrombotic events in patients with acute myocardial infarction. *Circulation*. 2004;109:3171-3175.
112. Mobley JE, Bresee SJ, Wortham DC et al. Frequency of nonresponse antiplatelet activity of clopidogrel during pretreatment for cardiac catheterization. *Am J Cardiol*. 2004;93:456-458.
113. Muller I, Besta F, Schulz C et al. Prevalence of clopidogrel non-responders among patients with stable angina pectoris scheduled for elective coronary stent placement. *Thromb Haemost*. 2003;89:783-787.
114. Samara WM, Bliden KP, Tantry US et al. The difference between clopidogrel responsiveness and posttreatment platelet reactivity. *Thromb Res*. 2005;115:89-94.
115. Paniccia R, Antonucci E, Gori AM et al. Different methodologies for evaluating the effect of clopidogrel on platelet function in high-risk coronary artery disease patients. *J Thromb Haemost*. 2007;5:1839-1847.
116. Jakubowski JA, Payne CD, Li YG et al. A comparison of the antiplatelet effects of prasugrel and high-dose clopidogrel as assessed by VASP-phosphorylation and light transmission aggregometry. *Thromb Haemost*. 2008;99:215-222.
117. Blindt R, Stellbrink K, de Taeye A et al. The significance of vasodilator-stimulated phosphoprotein for risk stratification of stent thrombosis. *Thromb Haemost*. 2007;98:1329-1334.
118. Sbrana S, Della PF, Rizza A et al. Relationships between optical aggregometry (type born) and flow cytometry in evaluating ADP-induced platelet activation. *Cytometry B Clin Cytom*. 2008;74:30-39.
119. Lordkipanidze M, Pharand C, Nguyen TA et al. Comparison of four tests to assess inhibition of platelet function by clopidogrel in stable coronary artery disease patients. *Eur Heart J*. 2008;29:2877-2885.
120. Angiolillo DJ, Alfonso F. Platelet function testing and cardiovascular outcomes: steps forward in identifying the best predictive measure. *Thromb Haemost*. 2007;98:707-709.
121. Serebruany V, Pokov I, Kuliczowski W et al. Baseline platelet activity and response after clopidogrel in 257 diabetics among 822 patients with coronary artery disease. *Thromb Haemost*. 2008;100:76-82.
122. Cuisset T, Frere C, Quilici J et al. Relationship between aspirin and clopidogrel responses in acute coronary syndrome and clinical predictors of non response. *Thromb Res*. 2008.

123. Gilard M, Arnaud B, Le Gal G et al. Influence of omeprazol on the antiplatelet action of clopidogrel associated to aspirin. *J Thromb Haemost.* 2006;4:2508-2509.
124. Siller-Matula JM, Lang I, Christ G et al. Calcium-channel blockers reduce the antiplatelet effect of clopidogrel. *J Am Coll Cardiol.* 2008;52:1557-1563.
125. Siller-Matula JM, Spiel AO, Lang IM et al. Effects of pantoprazole and esomeprazole on platelet inhibition by clopidogrel. *Am Heart J.* 2009;157:148-5.
126. Serruys PW, Morice MC, Kappetein AP et al. Percutaneous coronary intervention versus coronary-artery bypass grafting for severe coronary artery disease. *N Engl J Med.* 2009;360:961-972.
127. Silber S, Albertsson P, Aviles FF et al. Guidelines for percutaneous coronary interventions. The Task Force for Percutaneous Coronary Interventions of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J.* 2005;26:804-847.
128. Smith SC, Jr., Feldman TE, Hirshfeld JW, Jr. et al. ACC/AHA/SCAI 2005 Guideline Update for Percutaneous Coronary Intervention--summary article: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (ACC/AHA/SCAI Writing Committee to Update the 2001 Guidelines for Percutaneous Coronary Intervention). *Circulation.* 2006;113:156-175.
129. Cook S, Walker A, Hugli O et al. Percutaneous coronary interventions in Europe: prevalence, numerical estimates, and projections based on data up to 2004. *Clin Res Cardiol.* 2007;96:375-382.
130. Thom T, Haase N, Rosamond W et al. Heart disease and stroke statistics--2006 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation.* 2006;113:e85-151.
131. Glowczynska R, Malek LA, Spiewak M et al. Clinical, biochemical and genetical resistance to clopidogrel in a patient with the recurrent coronary stent thrombosis--a case report and review of the literature. *Int J Cardiol.* 2006;111:326-328.
132. Schafer A, Bonz AW, Eigenthaler M et al. Late thrombosis of a drug-eluting stent during combined anti-platelet therapy in a clopidogrel nonresponsive diabetic patient: shall we routinely test platelet function? *Thromb Haemost.* 2007;97:862-865.
133. Geisler T, Langer H, Wydymus M et al. Low response to clopidogrel is associated with cardiovascular outcome after coronary stent implantation. *Eur Heart J.* 2006;27:2420-2425.
134. Boden WE, O'Rourke RA, Teo KK et al. Optimal medical therapy with or without PCI for stable coronary disease. *N Engl J Med.* 2007;356:1503-1516.

135. Hochman JS, Steg PG. Does preventive PCI work? *N Engl J Med.* 2007;356:1572-1574.
136. Tempe DK. Drug-eluting stent thrombosis in patients undergoing non-cardiac surgery. *Br J Anaesth.* 2008;101:282.
137. Chechi T, Vecchio S, Vittori G et al. ST-segment elevation myocardial infarction due to early and late stent thrombosis a new group of high-risk patients. *J Am Coll Cardiol.* 2008;51:2396-2402.
138. Ramakrishna H. Drug-eluting stent thrombosis in patients undergoing non-cardiac surgery. *Br J Anaesth.* 2008;101:130.
139. Yan BP, Duffy SJ, Clark DJ et al. Rates of stent thrombosis in bare-metal versus drug-eluting stents (from a large Australian multicenter registry). *Am J Cardiol.* 2008;101:1716-1722.
140. Joner M, Finn AV, Farb A et al. Pathology of drug-eluting stents in humans: delayed healing and late thrombotic risk. *J Am Coll Cardiol.* 2006;48:193-202.
141. Iakovou I, Schmidt T, Bonizzoni E et al. Incidence, predictors, and outcome of thrombosis after successful implantation of drug-eluting stents. *JAMA.* 2005;293:2126-2130.
142. Ong AT, McFadden EP, Regar E et al. Late angiographic stent thrombosis (LAST) events with drug-eluting stents. *J Am Coll Cardiol.* 2005;45:2088-2092.
143. Pfisterer M, Brunner-La Rocca HP, Buser PT et al. Late clinical events after clopidogrel discontinuation may limit the benefit of drug-eluting stents: an observational study of drug-eluting versus bare-metal stents. *J Am Coll Cardiol.* 2006;48:2584-2591.
144. Hodgson JM, Stone GW, Lincoff AM et al. Late stent thrombosis: considerations and practical advice for the use of drug-eluting stents: a report from the Society for Cardiovascular Angiography and Interventions Drug-eluting Stent Task Force. *Catheter Cardiovasc Interv.* 2007;69:327-333.
145. Eisenstein EL, Anstrom KJ, Kong DF et al. Clopidogrel use and long-term clinical outcomes after drug-eluting stent implantation. *JAMA.* 2007;297:159-168.
146. Choi SH, Prasad A, Tsimikas S. The evolution of thienopyridine therapy clopidogrel duration, diabetes, and drug-eluting stents. *J Am Coll Cardiol.* 2008;51:2228-2229.
147. Fontana P, Senouf D, Mach F. Biological effect of increased maintenance dose of clopidogrel in cardiovascular outpatients and influence of the cytochrome P450 2C19*2 allele on clopidogrel responsiveness. *Thromb Res.* 2008;121:463-468.

148. Angiolillo DJ, Costa MA, Shoemaker SB et al. Functional effects of high clopidogrel maintenance dosing in patients with inadequate platelet inhibition on standard dose treatment. *Am J Cardiol.* 2008;101:440-445.
149. Bonello L, Camoin-Jau L, Arques S et al. Adjusted clopidogrel loading doses according to vasodilator-stimulated phosphoprotein phosphorylation index decrease rate of major adverse cardiovascular events in patients with clopidogrel resistance: a multicenter randomized prospective study. *J Am Coll Cardiol.* 2008;51:1404-1411.
150. Angiolillo DJ, Bhatt DL, Gurbel PA et al. Advances in antiplatelet therapy: agents in clinical development. *Am J Cardiol.* 2009;103:40A-51A.
151. Brandt JT, Close SL, Iturria SJ et al. Common polymorphisms of CYP2C19 and CYP2C9 affect the pharmacokinetic and pharmacodynamic response to clopidogrel but not prasugrel. *J Thromb Haemost.* 2007;5:2429-2436.
152. Brandt JT, Payne CD, Wiviott SD et al. A comparison of prasugrel and clopidogrel loading doses on platelet function: magnitude of platelet inhibition is related to active metabolite formation. *Am Heart J.* 2007;153:66-16.
153. Wiviott SD, Antman EM, Winters KJ et al. Randomized comparison of prasugrel (CS-747, LY640315), a novel thienopyridine P2Y12 antagonist, with clopidogrel in percutaneous coronary intervention: results of the Joint Utilization of Medications to Block Platelets Optimally (JUMBO)-TIMI 26 trial. *Circulation.* 2005;111:3366-3373.
154. Jernberg T, Payne CD, Winters KJ et al. Prasugrel achieves greater inhibition of platelet aggregation and a lower rate of non-responders compared with clopidogrel in aspirin-treated patients with stable coronary artery disease. *Eur Heart J.* 2006;27:1166-1173.
155. Wiviott SD, Braunwald E, McCabe CH et al. Prasugrel versus clopidogrel in patients with acute coronary syndromes. *N Engl J Med.* 2007;357:2001-2015.
156. Wiviott SD, Antman EM, Gibson CM et al. Evaluation of prasugrel compared with clopidogrel in patients with acute coronary syndromes: design and rationale for the TRial to assess Improvement in Therapeutic Outcomes by optimizing platelet Inhibition with prasugrel Thrombolysis In Myocardial Infarction 38 (TRITON-TIMI 38). *Am Heart J.* 2006;152:627-635.
157. Wiviott SD, Trenk D, Frelinger AL et al. Prasugrel compared with high loading- and maintenance-dose clopidogrel in patients with planned percutaneous coronary intervention: the Prasugrel in Comparison to Clopidogrel for Inhibition of Platelet Activation and Aggregation-Thrombolysis in Myocardial Infarction 44 trial. *Circulation.* 2007;116:2923-2932.
158. Steinhubl S, Roe MT. Optimizing platelet P2Y12 inhibition for patients undergoing PCI. *Cardiovasc Drug Rev.* 2007;25:188-203.

159. Husted S, Emanuelsson H, Heptinstall S et al. Pharmacodynamics, pharmacokinetics, and safety of the oral reversible P2Y12 antagonist AZD6140 with aspirin in patients with atherosclerosis: a double-blind comparison to clopidogrel with aspirin. *Eur Heart J*. 2006;27:1038-1047.
160. Cannon CP, Husted S, Harrington RA et al. Safety, tolerability, and initial efficacy of AZD6140, the first reversible oral adenosine diphosphate receptor antagonist, compared with clopidogrel, in patients with non-ST-segment elevation acute coronary syndrome: primary results of the DISPERSE-2 trial. *J Am Coll Cardiol*. 2007;50:1844-1851.
161. Storey RF, Husted S, Harrington RA et al. Inhibition of platelet aggregation by AZD6140, a reversible oral P2Y12 receptor antagonist, compared with clopidogrel in patients with acute coronary syndromes. *J Am Coll Cardiol*. 2007;50:1852-1856.

Danksagung

Mein Dank gilt vor allem meinem Doktorvater Priv.-Doz. Dr. med. Andreas Schäfer, der mich während der Erstellung dieser Arbeit stets mit Rat und Tat unterstützt hat. Er hat durch seine unkomplizierte und hilfreiche Art die rasche Veröffentlichung der Ergebnisse und Fertigstellung meiner Doktorarbeit ermöglicht.

Bedanken muss ich mich auch bei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe, die mir mit ihren Erfahrungen immer tatkräftig zur Seite standen.

Ganz besonders danken möchte ich aber meinen Eltern und meiner Familie, die mich während Studium und Promotion nicht nur in finanzieller Hinsicht unterstützt haben.

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name Sarah Andrea Weinberger
Geburtstag 17/05/1984
Geburtsort Bad Tölz

Schule und Studium

09/1990 – 09/1992 Volksschule Feldkirchen-Westerham
09/1992 – 09/1994 Volksschule Kolbermoor
09/1994 – 06/2003 Karolinengymnasium Rosenheim

10/2003 – 09/2005 Grundstudium Medizin, Universität Würzburg
09/2005 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Universität Würzburg
10/2005 – 10/2009 Hauptstudium Medizin, Universität Würzburg
11/2005 – 10/2009 Begleitstudium Experimentelle Medizin, Universität Würzburg
10/2009 – 11/2009 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Universität Würzburg

Praktisches Jahr

08/2009 – 11/2009 1. Terial: Chirurgie, Groote Schuur Hospital, Kapstadt, Südafrika
12/2009 – 03/2009 2. Terial: Innere, Medizinische Klinik der Universität Würzburg
03/2009 – 07/2009 3. Terial: Pädiatrie, Kinderklinik der Universität Würzburg

Famulaturen

03/2006 – 04/2006 Allgemeinchirurgie, Triamed Kreisklinik, Bad Aibling
03/2007 – 04/2007 Kardiologie, Medizinische Klinik I der Universität Würzburg
08/2007 – 09/2007 Urologie, Urologische Poliklinik der Universität Würzburg
09/2007 – 10/2007 HNO, Klinik für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde der Universität Würzburg

Krankenpflegepraktika

07/2003 – 08/2003 Neurologie, Neurologische Klinik, Bad Aibling
03/2004 – 04/2004 Innere Medizin, Triamed Kreisklinik, Bad Aibling

Tätigkeit als studentische Lehr-Assistentin

05/2005 – 07/2005 Histologie-Assistentin, Institut für Anatomie, Universität Würzburg
01/2006 – 02/2006 Physiologie-Assistentin, Institut für Physiologie, Universität Würzburg

Stipendien und Auszeichnungen

10/2003 – 07/2006 Förderung durch die Bayerische Begabtenförderung
08/2006 – 03/2010 Förderung durch die Bayerische Elitförderung/
Max Weber-Programm der Studienstiftung des Deutschen Volkes
10/2003 – 09/2005 Förderung durch e-fellows.net
06/2003 Karl-von-Frisch-Abiturienten-Preis