

Aus dem
Institut für Klinische Biochemie und Pathobiochemie
der Universität Würzburg
Direktor Prof. Dr. Ulrich Walter

Variabilität der Thrombozytenhemmung durch den
ADP-Antagonisten Clopidogrel bei Patienten mit
koronarer Herzerkrankung

Inaugural-Dissertation

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

Vorgelegt von
Axel Schnurr
aus Detmold, Nordrhein-Westfalen
Oktober 2008

Referent: Professor Dr. med. Martin Eigenthaler

Koreferent: Professor Dr. med. Georg Ertl

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 01.12.2009

Der Promovend ist Arzt

Inhaltsverzeichnis:

0. Häufig verwendete Abkürzungen	
1. Einleitung und Themenstellung	1
1.1. Gerinnung und Thrombozytenhemmung	1
1.2. Themenstellung	3
2. Studienprotokoll	5
2.1. Ermittlung des Normwertes	5
2.2. Patientenauswahl	5
2.2.1. Einschlusskriterien	6
2.2.2. Ausschluss von Daten	6
2.3. Patientenkollektiv	7
2.4. Therapieschema	11
2.5. Begleitmedikation	15
3. Materialien und Methoden	18
3.1. Geräte und Verbrauchsmaterialien	18
3.2. Methoden	21
3.2.1. Thrombozytenisolation und -stimulation	21
3.2.2. Durchflusszytometrisches Messverfahren	23
3.2.3. Western-Blot Analyse	27
3.2.4. Genetische Analyse des P2Y12-ADP-Rezeptors	27
4. Ergebnisse	29
4.1. Plättchen-Aktivierungs-Index	29
4.2. Statistische Analyse	35
4.3. Gehalt an inhibitorischen G-Protein und VASP in humanen Thrombozyten	38
4.4. P2Y12-ADP-Rezeptor-Genanalyse	39
5. Diskussion	41
6. Zusammenfassung	47
7. Literaturverzeichnis	48

Abkürzungen:

ACE	Angiotensin Converting Enzyme
ADP	Adenosindiphosphat
ASS	Acetylsalicylsäure
Bp	Basenpaar (DNA)
BSA	Bovines Serumalbumin
COX ₂	Cyclo-Oxygenase Typ 2
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotid-Triphosphat (Nukleotide für PCR)
FACS	Durchflußzytometrie (Fluorescence-Activated-Cell-Sorting)
FITC	Fluoreszenzmarker
g	Erdbeschleunigung
G _i -Protein	Inhibitorisches G-Protein
HMG-CoA	Hydroxy-Methyl-Glutaryl-Co-Enzym A
HT-2	Histamin-2 Rezeptor
KCl	Kaliumchlorid
KHK	Koronare Herzerkrankung
µl	Mikroliter
mM	Millimolar
MgCl ₂	Magnesiumdichlorid
pAVK	Periphere, arterielle Verschlusskrankheit
PCR	Polymerasekettenreaktion (Polymerase Chain Reaction)
PG-E ₁	Prostaglandin E ₁
PRI	Platelet-Reactivity-Index (Thromb.-Aktivierungs-Index)
PRP	Thrombozytenreiches Plasma (Platelet-Rich-Plasma)
PTCA	Perkutane, transluminale Coronarangioplastie
SDS	Natrium-Dodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate)
VASP	Vasodilatator-stimuliertes Phosphoprotein

1. Einleitung

1.1. Gerinnung und Thrombozytenhemmung

Das Blut zirkuliert im Körper in einem geschlossenen Gefäßsystem, das zum Schutz vor pathologischen Gerinnungsvorgängen durch eine intakte Lage von Endothelzellen ausgekleidet wird. Bei Verletzungen findet eine rasche Blutungstillung statt mit Bildung eines Gefäßwandthrombus. Dieser Vorgang wird als Hämostase bezeichnet und stellt ein komplexes Zusammenspiel von Gefäßwandstrukturen, Endothelzellen, Blutzellen und Gerinnungsfaktoren dar. Unterschieden werden 4 Phasen:

Vasokonstriktion -> Primäre Hämostase -> Sekundäre Hämostase -> Fibrinolyse

Initial werden durch die Gefäßverletzung vermehrt Faktoren wie Adrenalin, Thromboxan A_2 , Serotonin oder Endothelin freigesetzt. Hierdurch kommt es zur Gefäßengstellung (Vasokonstriktion) und Minderung des Blutflusses zum verletzten Gefäßbereich.

Als primäre Hämostase bezeichnet man die Adhäsionen von Thrombozyten an die freigelegten extrazellulären Strukturen, insbesondere an Kollagen und den an Kollagen anhaftenden von-Willebrand-Faktor in der Gefäßwand. Durch diese beiden Maßnahmen kann im akuten Verletzungsfall ein schneller Verschluss des Gefäßsystems mit Verhinderung eines größeren Blutverlustes erreicht werden. Bei einer chronischen Schädigung der Endothelzellen, z.B. durch Nikotin, kann durch reduzierte endothel-protective Faktoren aufgrund dieser an sich physiologischen Mechanismen eine pathophysiologische Thrombozytenaktivierung mit nachfolgendem Gefäßverschluss entstehen.

In der nächsten Phase, genannt sekundäre Hämostase, kommt es zur Aktivierung der plasmatischen Gerinnungskaskade und zu einer zunehmenden Stabilisierung des Gefäßwandthrombus. Vor allem auf der Thrombozytenoberfläche werden vermehrt Rezeptoren exprimiert und/oder aktiviert, ebenso werden massiv prokoagulatorische Substanzen (z.B. ADP) freigesetzt (sogenannte prokoagulatorische Aktivität).

Zur Bildung eines stabilen Thrombus wird nach Aktivierung von Thrombin (aus Prothrombin) schließlich Fibrin aus Fibrinogen gebildet. Um eine überschießende Thrombusbildung zu verhindern, werden nun im Blutgefäß Antagonisten der Fibrinumwandlung, wie z.B. Protein C und S, Antithrombin III oder TFPI (Tissue Factor Pathway Inhibitor), freigesetzt.

In dieser letzten Phase der Gerinnung, als Fibrinolyse bezeichnet, beginnt der gezielte Abbau des Thrombus mit Wiederherstellung des intakten Gefäßlumens.

Wie bereits Ende der 60er Jahre des letzten Jahrhunderts entdeckt (1), vermittelt ADP zusammen mit anderen Faktoren (z.B. von-Willebrand-Faktor) die Aggregation von Thrombozyten und die gleichzeitige Ausschüttung weiterer die Gerinnung fördernder Stoffe. Dieser Effekt wurde später auf die Aktivierung eines spezifischen Membranrezeptors mit nachgeschalteten, intrazellulären Signalkaskaden zurückgeführt (2). Diese Kaskaden können sowohl aktivierende als auch hemmende Signalwege darstellen. Eine dieser Signalketten mündet in der durch cAMP-/cAMP-abhängige Proteinkinase (cAMP-PK) vermittelten Phosphorylierung des zytosolischen Proteins Vasodilatator-stimuliertes Phosphoprotein (VASP). Dieser Signalweg spielt eine wichtige Rolle in der durch ADP (Adenosindiphosphat) regulierten Thrombozytenaktivierung (2). Die cAMP-PK wird durch das an den ADP-Rezeptor gekoppelte inhibitorische G-Proteins (G_i-Protein) aktiviert (3;4), verändert den Phosphorylierungsstatus von VASP und greift in die Hemmung der Thrombozytenaktivierung ein. Die genaue molekulare Wirkungsweise des

VASP auf die weitere Aggregation ist derzeit noch nicht ausreichend belegt.

Pharmakologisch wird die ADP-abhängige Aktivierung von Thrombozyten durch die Wirkstoffe aus der Klasse der Thienopyridine (Ticlopidin und Clopidogrel) genutzt. Bei beiden Medikamenten hemmt der in der Leber aktivierte Metabolit auf kompetitive Weise den ADP-Rezeptor auf Thrombozyten und verhindert so eine pathologische Thrombozytenaktivierung (5).

1.2. Themenstellung

Eine unerwünschte Aktivierung der Thrombozyten erfolgt zum Beispiel an atherosklerotischen veränderten Gefäßabschnitten, einer in westlichen Ländern sehr verbreitete Erkrankung.

Bei dieser Erkrankung kommt es zu einem multifaktoriellen Umbau des Gefäßes und des geschädigten Gefäßendothels durch die Einwanderung von Makrophagen und Entzündungszellen, die unter anderem durch Freisetzung extrazellulärer Matrixproteine und weiterer Faktoren (z.B. ADP oder von-Willebrand-Faktor) eine Thrombozytenaktivierung bzw. –aggregation auslösen können. Darüberhinaus kommt es zu komplexen Zellmigrations und Zellproliferationsvorgängen in der Endothelläsion. Hierdurch nehmen die Engstellen in den Gefäßen durch Atheromentwicklung und Thrombusanlagerungen zu. Im äußersten Fall kommt es zu einem Verschluss des Gefäßes mit nachfolgendem Organinfarkt.

Zur Primär- und Sekundärprophylaxe wird besonders in der kardiologischen und neurologischen Therapie der unspezifische Cyclooxygenase-Hemmer Acetylsalicylsäure (ASS) eingesetzt. Auf diese Weise wird durch Hemmung der Thromboxan-Bildung in den Granula der

Thrombozyten eine stimulierte Thrombozytenaktivierung weitestgehend unterbunden. Allerdings nimmt man mit der weit verbreiteten ASS-Therapie auch erhebliche gastrointestinale Nebenwirkungen in Kauf. Diese reichen von leichten Beschwerden des Magen-Darm-Traktes bis hin zu lebensbedrohlichen Blutungen. Erschwerend ist außerdem die Tatsache, dass mittlerweile wiederholte Berichte über eine bis zu 10 %-ige Rate eines Nicht-Ansprechens therapiertter Patienten auf ASS beschrieben werden („non-responder“) (6;7).

Als Alternative zu dieser Therapie wurden die Wirkstoffe der Thienopyridine durch die Firma Sanofi[®] entwickelt. Mit Ticlopidin und Clopidogrel sind zwei Wirkstoffe dieser Gruppe für die Hemmung der Thrombozytenaggregation zugelassen worden. Insbesondere Clopidogrel wurde in zahlreichen Studien (8;9) in Kombination mit Aspirin[®] oder sogar als Ersatz von Aspirin[®] mit einem günstigerem Wirkprofil in dieser Indikation beschrieben. Doch auch unter der alleinigen Clopidogrel-Therapie wurde immer wieder von Fällen eines Therapieversagens mit zum Teil erheblichen klinischen Folgen berichtet (9).

Zur Untersuchung der individuellen Wirksamkeit von Clopidogrel wurde in dieser Arbeit eine neu entwickelte Methode zur Messung des Thrombozytenaktivierungs-Status mittels Bestimmung von phosphoryliertem VASP benutzt. Diese Methode wurde bei Patienten mit atherosklerotischen Erkrankungen oder nach Einlage eines Gefäßstents oder einer Gefäßprothese angewendet um die Rate der nicht ausreichenden Thrombozytenhemmung zu erfassen. Zusätzlich wurde bei Patienten mit unzureichender Clopidogrelwirkung eine molekulare und genetische Analyse durchgeführt, um mögliche Ursachen des Nicht-Ansprechens zu erkennen.

2. Studienprotokoll

2.1. Ermittlung des Normwertes

Zur Ermittlung eines Normwertes für den Versuchsablauf wurden 10 klinisch gesunde Probanden im Alter zwischen 24 und 30 Jahren, davon 5 Frauen und 5 Männer, untersucht. Um eine optimale, reproduzierbare Messung zu erhalten, wurden die Thrombozyten dieser Probanden unter verschiedenen Messbedingungen und Parametereinstellungen am Durchflußzytometer untersucht.

So wurde ein Normkollektiv erstellt unter Anpassung der vorbeschriebenen Untersuchungsmethode (2), um die zu erwartende Streuung der Messdaten ohne Clopidogreltherapie zu ermitteln. Alle 10 Probanden hatten für einen Mindestzeitraum von drei Wochen keine Schmerzmittel, insbesondere Aspirin oder ähnliche COX 2-Inhibitoren und auch keine anderen gerinnungsbeeinflussende Medikamente eingenommen. Für die Kontrollgruppe wurde den Probanden mindestens drei 0.7 ml Citrat-Röhrchen abgenommen. Das Blut wurde in einem Zeitraum unter 60 Minuten weiterverarbeitet, um Messfehler durch Gerinnungsvorgänge zu vermeiden.

2.2. Patientenauswahl

Für die Erhebung der Daten wurden Patienten der Medizinischen Universitätsklinik Würzburg ausgewählt und nach einer ausführlichen Aufklärung über die Ziele, Struktur, Umfang und Bedingungen der Untersuchungen in die Studie aufgenommen. Dieses Vorgehen war von der Ethikkommission der Universität Würzburg genehmigt worden. Es wurden insgesamt 79 Patienten untersucht. 25 der insgesamt erhobenen Patientendaten wurden nicht in die Ergebnisse aufgenommen, da die

Patienten durch Nichterfüllen von Studienbedingungen ausgeschlossen werden mussten.

2.2.1. Einschlusskriterien

Zu den Einschlusskriterien zählte die regelmäßige Einnahme von Clopidogrel in Form von Plavix[®] oder Iscover[®] nach einer Initialdosis von 300 mg und den folgenden Tagesdosen von 75 mg oder die regelmäßige Einnahme der gleichen Medikamente bei einer bereits zuvor begonnen Therapie in der Tagesdosis von 75 mg.

2.2.2. Ausschluss von Daten

Zum Ausschluss der bereits erhobenen Daten führte:

- die jederzeit mögliche Rücknahme der Einverständniserklärung
- eine aus medizinischen Gründen erforderliche Umstellung der Therapie auf ein anderes Behandlungsschema ohne Einnahme von Clopidogrel oder einer Entscheidung zur operativen Weiterbehandlung mit Herz-Bypass-Anlage
- Weigerung für eine zweite oder weitere Blutentnahme zur Messung der längerfristigen Einnahme nach der Mindesteinnahme von Clopidogrel für drei Tage
- Einnahme von Medikamenten, die die Messung verfälschen können. Hierunter fällt insbesondere die Gabe des Medikamentes ReoPro[®], das einen Antikörper enthält, der die Durchflusszytometrie (FACS) Messungen verfälschen kann (siehe auch 3.2. Versuchsmethode)

2.3. Patientenkollektiv

Die in dieser Promotionsarbeit untersuchten Patienten setzten sich im Wesentlichen aus zwei Gruppen zusammen:

Der erste auch zeitlich zuerst erfasste Anteil der Patienten, insgesamt 17 von 34 in der Studie eingeschlossen Patienten, wurden in einer parallel in der Medizinischen Klinik der Universität Würzburg laufenden Studie (TOPSTAR) untersucht. Das Zweite, sich zeitlich direkt anschließende Patientenkollektiv (17 von 34) wurde direkt aus den Patienten auf den kardiologischen Stationen der Medizinischen Klinik der Universität Würzburg zusammengestellt.

Die 17 Patienten aus der als TOPSTAR (Troponin in Planned PTCA/Stent Implantation With or Without Administration of the Glycoprotein IIb/IIIa Receptor Antagonist Tirofiban) bezeichneten Studie der Medizinischen Universitätsklinik wurden im Langzeitverlauf nach Stent-Implantation bei akut aufgetretenem Koronarsyndrom untersucht. Zu diesem Zweck wurden Patienten der internistischen Notaufnahme des Universitätsklinikum Würzburgs mit akutem Koronarsyndrom beziehungsweise instabiler Angina pectoris registriert. Vor und nach der schnellstmöglich durchgeführten Koronarangiographie mit Stent-Implantation wurden Routine-Blutwerte abgenommen, darunter mindestens ein 0.7 ml Citrat-Röhrchen vor oder unmittelbar nach der Gabe von Clopidogrel in einer Standardanfängsdosierung von 300 mg. Da Clopidogrel pharmakologisch in der Leber erst in seinen aktiven Metaboliten umgewandelt wird (11;12) und auch bei einer Gabe der vierfachen Tagesdosis (75 mg) ein nachweisbarer Eintritt der Gerinnungshemmung frühestens 8 Stunden nach erstmaliger Gabe eintritt (13), konnten auch die Patienten eingeschlossen werden, denen Plavix® beziehungsweise Iscover® bis zu 6 Stunden vor Beginn des Thrombozytenfunktionstest gegeben worden war.

Innerhalb dieser Patientengruppe gab es 15 Patienten mit der Diagnose Koronare Herzerkrankung/Koronarsklerose (KHK), bei 10 Patienten wurde eine arterielle Hypertonie diagnostiziert. Insgesamt 12 Patienten zeigten eine Hypercholesterinämie. Bei 7 Patienten lag ein akuter Myokardinfarkt vor, ein weiterer Patient litt an einer Herzinsuffizienz. Desweiteren gab es bei 5 Patienten andere Herzerkrankungen, 3 Patienten wiesen eine periphere arterielle Gefäßerkrankung auf, 2 Patienten wurden aufgrund eines Diabetes mellitus behandelt und 5 Patienten waren chronische Raucher. Bei allen Patienten gab es mehr als eine Diagnose, insgesamt mindestens 3 Diagnosen, maximal 9. Die Anzahl der Diagnosen ist insgesamt höher als die Patientenanzahl, was durch die klassischerweise vorliegende Multimorbidität der Patienten bedingt ist. Die detaillierten Angaben sind in der folgenden Abbildung 1 zusammengefasst:

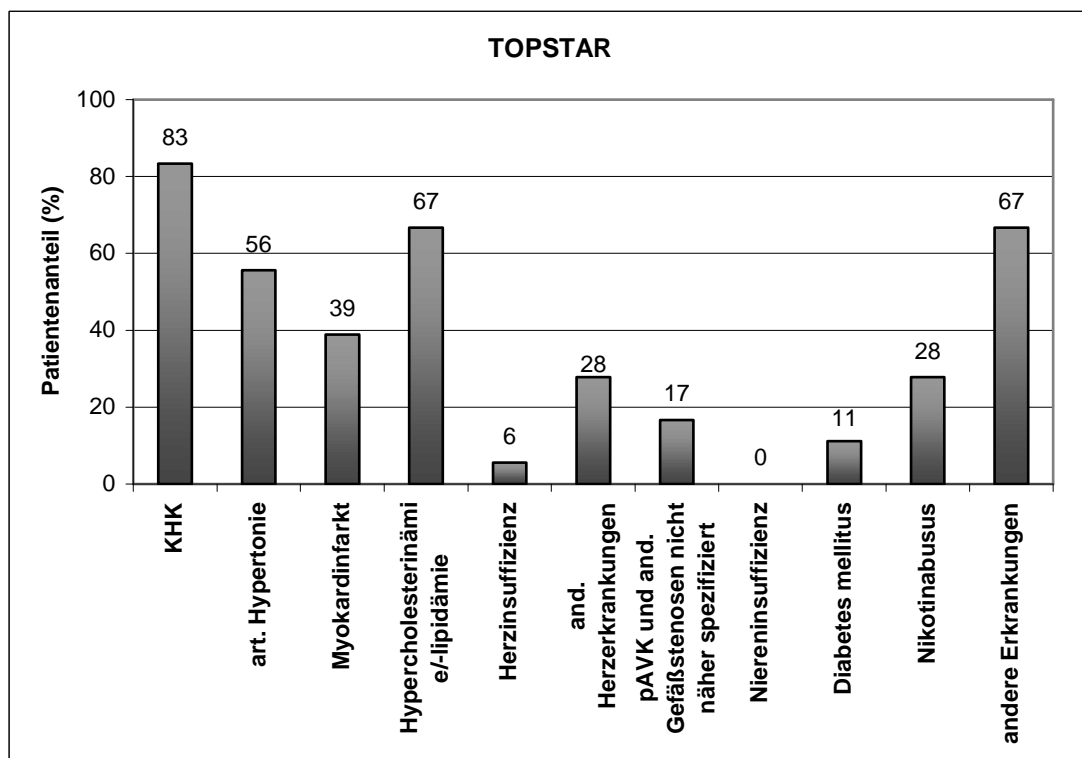


Abbildung 1: Diagnosen des untersuchten Patientenkollektivs (in %) aus der TOPSTAR Studie.

Die übrigen untersuchten 17 Patienten setzten sich aus einer Patientenauswahl der kardiologischen Stationen der Medizinischen Universitätsklinik Würzburg zusammen. Hierfür wurde nach Rücksprache mit den jeweiligen Stationsärzten und der entsprechenden Durchsicht der Krankenakten den Patienten eine Studienteilnahme nach der oben bereits dargestellten Aufklärung angeboten.

In dieser Patientengruppe konnte aufgrund der bereits vorab begonnenen Gerinnungstherapie kein Thrombozytenfunktionswert ohne Clopidogrel ermittelt werden, zur Vereinfachung wird diese Gruppe im Weiteren als „2. Werte“ bezeichnet. Innerhalb dieser Patientengruppe gab es 12 Patienten mit der Diagnose KHK, bei 12 Patienten wurde eine Hypertonie diagnostiziert. Insgesamt 9 Patienten waren an einer Hypercholesterinämie erkrankt. Die weiteren Diagnosen waren: Bei 7 Patienten lag ein akuter Myokardinfarkt vor, eine Herzinsuffizienz bei 2 Patienten, andere Herzerkrankung hatten insgesamt 5 Patienten. Desweiteren gab es eine Gefäßerkrankung der peripheren Arterien bei 6 Patienten, 4 zeigten eine Niereninsuffizienz und 3 Patienten hatten einen behandlungspflichtigen Diabetes mellitus. Bei allen Patienten lag mehr als eine Diagnose vor, insgesamt mindestens 3, maximal 8 verschiedene Diagnosen. Die graphische Auswertung ist in der Abbildung 2 dargestellt.

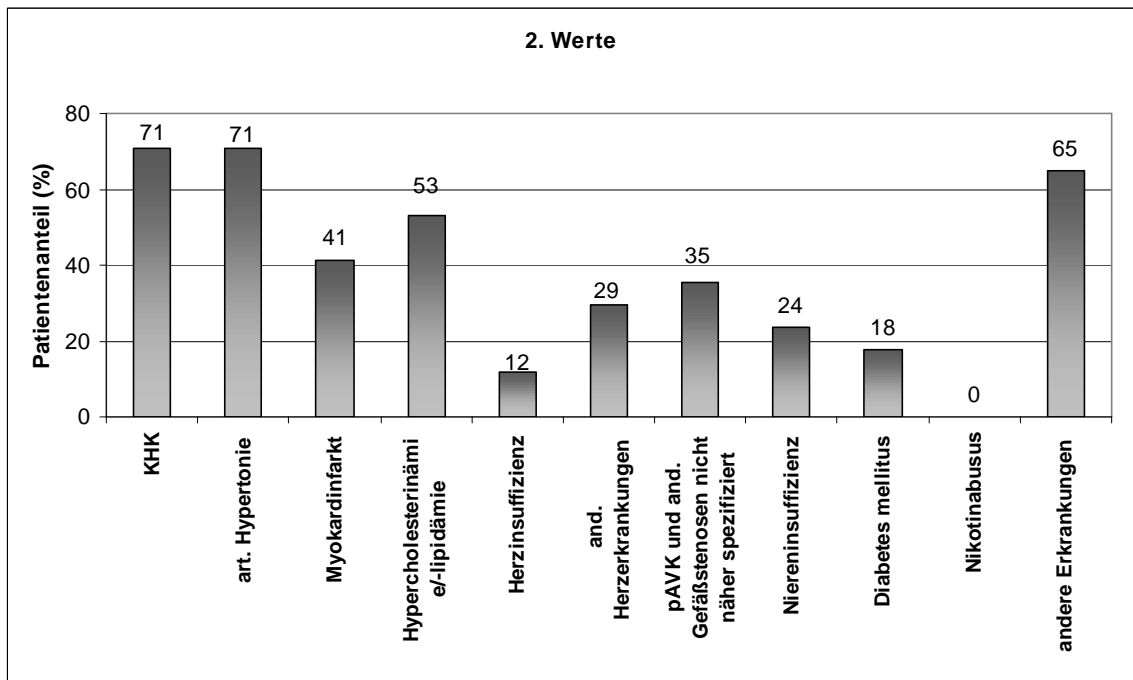


Abbildung 2: Erkrankungen des untersuchten Patientenkollektivs (in %) außerhalb der TOPSTAR-Studie nach unterschiedlicher Dauer der Clopidogreleinnahme (genannt 2. Werte).

Alle in den Daten erfasste Patienten (TOPSTAR und 2 Werte) befanden sich in einem Altersbereich von 43 bis 85 Jahren. Im Detail waren 3 Patienten im Alter unter 50 Jahren, 8 im Alter von 51-60 Jahren, 9 im Alter von 61-70 Jahren, 13 im Alter von 71-80 Jahren und 2 im Alter über 80 Jahren. Die folgende Abbildung 3 stellt die Alters- und Geschlechtsverteilung graphisch dar:

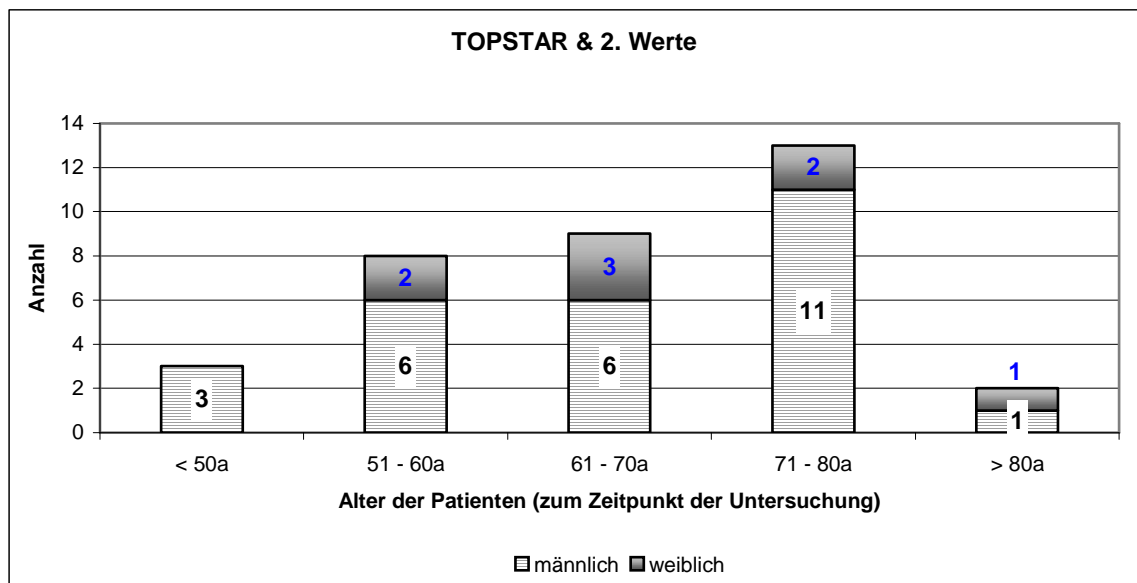


Abbildung 3: Alters- und Geschlechtsverteilung des untersuchten Patientenkollektives zusätzlich nach Geschlecht aufgeschlüsselt.

2.4. Therapieschema

Wie im vorangehenden Kapitel beschrieben, wurden alle 17 Patienten aus der TOPSTAR-Studie mit einer Koronarangiographie und -plastie (PTCA, perkutane transluminale Coronarangioplastie) behandelt. Allen 17 wurde mindestens ein Stent in mindestens einem Koronargefäß implantiert. In allen 17 Fällen erfolgte diese Stentimplantation innerhalb von 7 Tagen vor dem Zeitpunkt der zweiten Datenerhebung unter Clopidogrel-Therapie.

Von den übrigen 17 Patienten der Studie wurden insgesamt 10 Patienten ebenfalls durch eine Koronarangiographie mit oder ohne Stentimplantation versorgt. All diese 10 invasiven Behandlungen lagen maximal 6 Wochen zurück, was auch der empfohlenen Therapiedauer mit Thienopyridinen zur intensiven Anti-Gerinnungstherapie entspricht (14). Von diesen Patienten wurden 3 weitere mit einer perkutanen transluminalen Angioplastie, beziehungsweise einer anderen invasiven Gefäßtherapie behandelt. Für diese

Therapie wird ein vergleichbares Anti-Gerinnungstherapieschema empfohlen, wie für die Perkutane transluminale Coronarangioplastie (PTCA) (15).

Einer dieser 17 Patienten wurde wegen einer ASS-Unverträglichkeit auf Clopidogrel umgestellt. Drei Patienten aus dieser zweiten Gruppe wurden konservativ, das bedeutet ohne invasive Therapie, gerinnungshemmend behandelt.

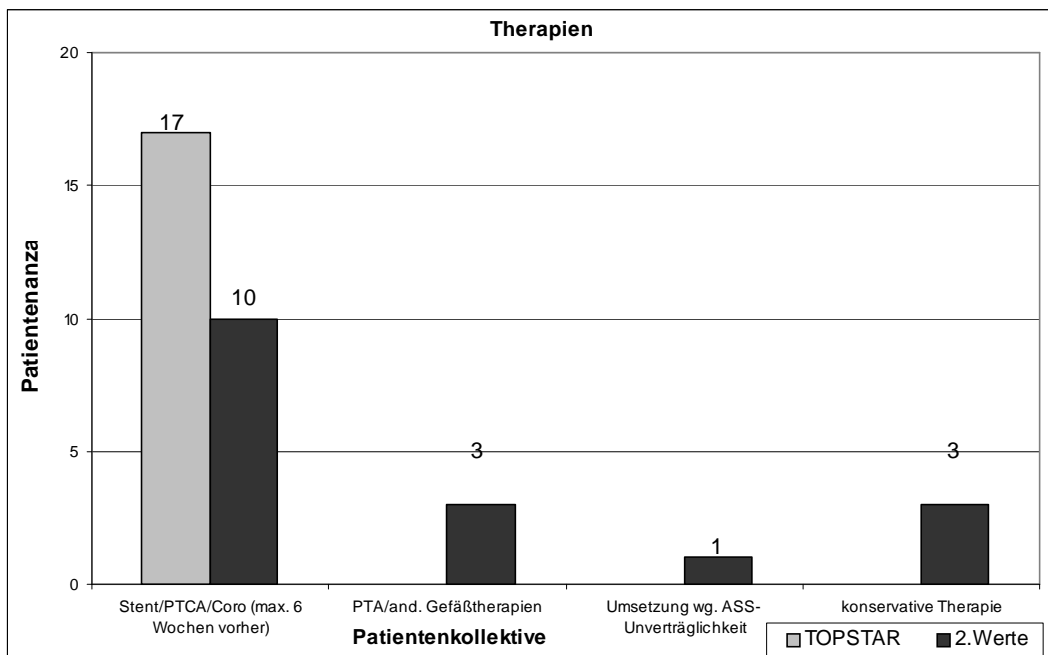


Abbildung 4: Bei allen Patienten durchgeführte Therapien in absoluter Anzahl, 17 mit Koronarangiographie, 3 mit Angiographie, 1 ASS-Unverträglichkeit, 3 konservative Therapien

Von den insgesamt 34 untersuchten Patienten nahmen 5 Clopidogrel für einen Zeitraum von wenigstens 48 Stunden ein. Weitere 9 Patienten nahmen für einen Zeitraum von 3 Tagen, 2 für einen Zeitraum von 4 Tagen, 6 für einen Zeitraum von 5 Tagen Clopidogrel ein. Weiteren 3 Patienten wurde Clopidogrel für einen Zeitraum von 6 Tagen, 1 für einen Zeitraum von 7 Tagen verschrieben und 9 Patienten hatten Clopidogrel bereits wenigstens 7 Tage eingenommen.

In den folgenden Tabellen 1 und 2 ist die genaue Verteilung der Clopidogrel-Einnahme aufgeführt. Ebenfalls wird in den Tabellen zwischen den Patienten unterschieden, die eine so genannte *Loadingdose* erhalten hatten, diese entspricht einer mindestens 3-fachen Tagesdosis (75 mg) als Initialdosis. Diese *Loadingdose* wird gegeben, wenn ein möglichst schneller Beginn der Anti-Gerinnungstherapie mit Clopidogrel indiziert ist, da unter der Einnahme der einfachen Tages-/bzw. Erhaltungsdosis eine sichere antithrombotische Wirkung frühestens nach zwei bis drei Tagen eintritt (14;16)

Tage bis zur Untersuchung	Mit <i>Loadingdose</i> 300 mg am Tag 0		
	TOPSTAR	2. Werte	Gesamt
<1			
1			
2	2	1	3
3	6	1	7
4	1		1
5	2		2
6			
7			
>7	3	1	4

Tabelle 1: Patienten mit *Loadingdose* (300 mg Clopidogrel), in der TOPSTAR-Studie wurden 2 Pat. nach 2 Tagen Einnahme von Copidogrel, 6 Pat. nach 3 und 2 Pat. nach 5 Tagen Einnahme. 3 Pat. wurden nach über 7 Tagen Einnahme untersucht. Aus der Gruppe der Patienten außerhalb der TOPSTAR-Studie (2. Werte) wurde je 1 Pat. nach 2 bzw. 3 Tagen Einnahme von Clopidogrel untersucht. 1 Patienten hatte bereits vor über 7 Tagen vor Untersuchung mit der Einnahme begonnen.

Tage bis zur Untersuchung	Ohne <i>Loadingdose</i>		
	TOPSTAR	2. Werte	Gesamt
<1			
1			
2		2	2
3	1	1	2
4		1	1
5	1	3	4
6	2	1	3
7		1	1
>7	1	4	5

Tabelle 2: Patienten ohne *Loadingdose*. In der TOPSTAR-Studie entsprach dies je 1 Patient mit 3, 5 und über 7 Tagen Einnahme der Tagesdosis von Clopidogrel (75 mg). 2 Patienten hatten Clopidogrel für 6 Tage eingenommen. In der Studiengruppe außerhalb der TOPSTAR-Studie (2. Werte) gab es 2 Patienten mit einer Clopidogrel-Einnahme-Dauer von 2 Tagen. Je 1 Patient wurde nach der Einnahme nach 3, 4, 6 bzw. 7 Tagen untersucht. 3 Patienten nahmen Clopidogrel für 5 Tage ein, 4 Patienten für eine Dauer über 7 Tagen ein.

2.5. Begleitmedikation

Von den 34 in dieser Studie aufgenommenen Patienten nahm jeder Patient mindestens drei verschiedene Medikamente ein (inklusive Clopidogrel). Die häufigsten Medikamente werden im Folgenden aufgeführt.

Insgesamt 28 Patienten nahmen neben Clopidogrel auch ASS 100 mg zur Gerinnungshemmung ein. 15 Patienten bekamen eine Therapie mit niedermolekularem Heparin. Ein Patient wurde zusätzlich mit Tirofiban (Hemmer des Fibrinogenrezeptors) antikoagulatorisch therapiert. Im Bereich der Herz- und Kreislauftherapie bekamen 21 Patienten einen oder sogar mehrere ACE-Hemmer. 5 Patienten erhielten alternativ zu ACE-Hemmern den AT-II Antagonisten Losartan. 7 Patienten wurden mit Nitraten in Tablettenform oder als Spray behandelt. In insgesamt 3 Fällen wurde Digitalis verschrieben, in 24 ein β -Blocker (meist Metoprolol). 19 Patienten erhielten den HT-2 Antagonisten Omeprazol oder Pantoprazol zur Blockade der Säureproduktion der Parietalzellen des Magens. Insgesamt 28 Patienten wurden mit einem HMG-CoA-Reduktasehemmer zur Therapie einer Hypercholesterinämie behandelt, als Präparate kamen hier vor allem Atorvastatin oder Simvastatin zum Einsatz. 9 der untersuchten Patienten wurden mit einem Diuretikum behandelt, bevorzugt mit Thiaziden oder Spironolacton, seltener mit anderen Diuretika. Zur Therapie einer Hyperurikämie bekamen 5 Patienten Allopurinol verschrieben. Zur Therapie eines Diabetes mellitus Typ II wurden in 5 Fällen Sulfonylharnstoffe eingesetzt, in weiteren 4 Fällen Metformin.

Neben diesen aufgeführten Medikamenten bekamen 33 Patienten auch noch weitere Medikamente, die jedoch nach bisherigem Wissensstand mit der Anti-Gerinnungstherapie nicht interagieren oder interferieren.

Bei der Behandlung mit Clopidogrel ist zu beachten, dass der wirksame Metabolit über das Cytochrom P 450 Enzymsystem vor allem in der

menschlichen Leber produziert wird (5;33). Daher sollte der gleichzeitigen Gabe von Medikamenten, die über dieses enzymatische System abgebaut oder in einen wirksamen Metaboliten umgewandelt werden, aufgrund einer möglichen kompetitiven Hemmung besonderes Augenmerk gegeben werden.

Im Folgenden sind die eingenommenen Medikamente tabellarisch (Tabelle 3) zusammengestellt und in Abbildung 5 graphisch aufgeführt.

	TOPSTAR (17 Pat.)	2.Werte (17 Pat.)	Insgesamt 35 Patienten)
ASS	16 (89%)	12 (71%)	28 (80%)
niedermolekulares Heparin	8 (44%)	7 (45%)	15 (43%)
ACE-Hemmer	10 (56%)	11 (65%)	21 (60%)
Tirofiban		1 (6%)	1 (3%)
Losartan	4 (22%)	1 (6%)	5 (14%)
Nitrate	4 (22%)	3 (18%)	7 (20%)
Digitalis	1 (6%)	2 (12%)	3 (9%)
Metoprolol	15 (83%)	9 (53%)	24 (69%)
Omeprazol/Pantozol	9 (50%)	10 (59%)	19 (53%)
Atorvastatin/Simvastatin	16 (89%)	12 (71%)	28 (80%)
Thiazid/Spironolacton/and Diuretika	4 (22%)	5 (29%)	9 (26%)
Allopurinol	3 (17%)	2 (12%)	5 (14%)
Sulfonylharnstoffe	2 (11%)	2 (12%)	4 (11%)
Metformin	1 (6%)	3 (18%)	4 (11%)
Andere	16 (89%)	17 (100%)	33 (94%)
Euglucon (Cytochrom P450 Induktor)		1 (6%)	1 (3%)

Tabelle 3: Übersicht über die im gesamten Patientenkollektiv eingenommenen Medikamente als Begleitmedikation

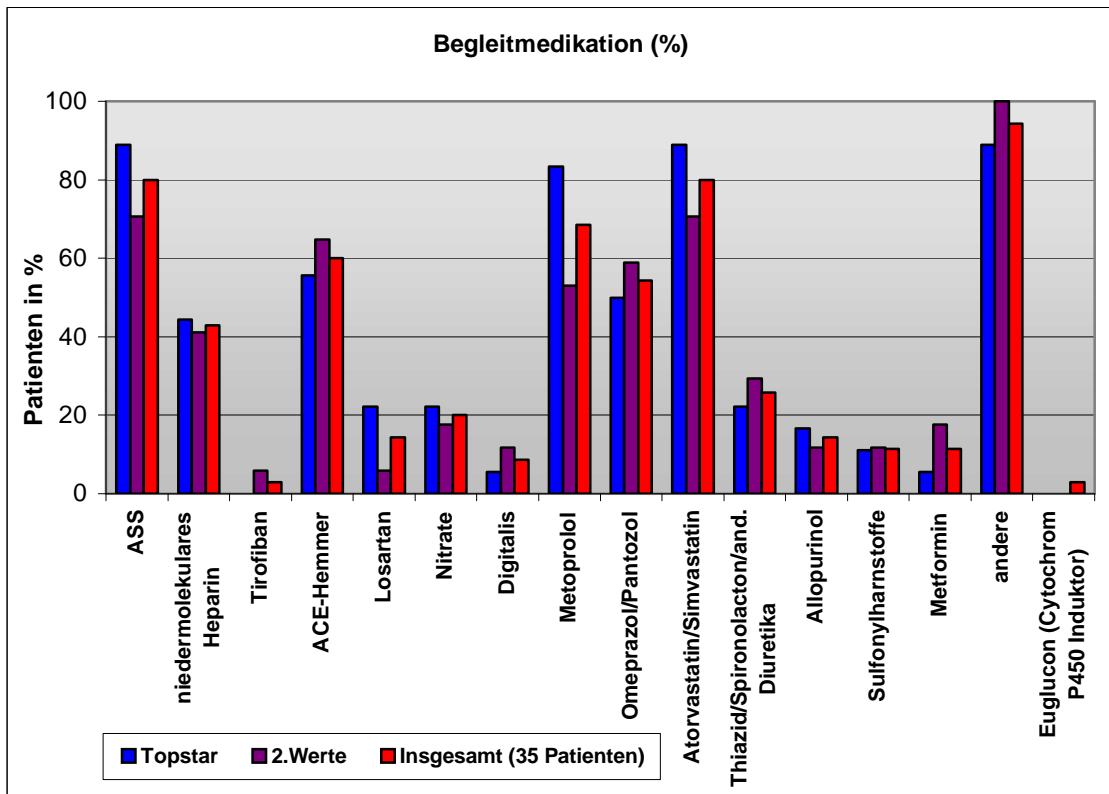


Abbildung 5: Graphische Darstellung der am häufigsten verwendeten Medikamente als Begleitmedikation

3. Materialien und Methoden

3.1. Geräte und Verbrauchsmaterialien

Jedem Patienten wurde zur Thrombozytenfunktionsanalyse mittels Citrat-Monovetten[®] (Firma Sarstaedt[®]) Blut abgenommen. Diese Monovetten[®] gibt es in den Größen von 7.5 ml und 10 ml. Zum Aufbereiten der abgenommenen Blutproben wurde eine Zentrifuge der Firma Hettich[®] mit ungebremster Zentrifugation eingesetzt, um eine artefizielle Aktivierung der Thrombozyten zu verhindern. Das thrombozytenreiche Plasma (PRP) wurde unter Verwendung von Pipetten der Firma Eppendorf[®] mit einem Fassungsvermögen von 1000 µl, 100 µl und 10 µl weiter verarbeitet.

Für die weitere Untersuchung wurde ebenfalls eine kleinere Zentrifuge der Firma Eppendorf[®] für die Verarbeitung der Thrombozytenpellets benötigt. Zum Absaugen des flüssigen Überstandes, der während der einzelnen Arbeitsschritte immer wieder anfiel, wurde eine Wasserstrahlpumpe genutzt.

Zur Aufbewahrung der Thrombozytenpellets während der Verarbeitung kamen Eppendorf[®] Probenbehälter zur Anwendung. Außerdem hat sich die Nutzung von passenden Ständern bzw. Haltevorrichtungen für die Probengefäße bewährt, da in den ersten Arbeitsschritten unter Zeitdruck gearbeitet werden muss, und so die Arbeitsschritte verkürzt wurden.

Um das PRP während der Vorbereitung des Versuches aufzubewahren, wurde ein Wasserbad mit 37°C benutzt. Das Heizelement war temperaturgesteuert und die Temperatur wurde extern durch ein handelsübliches, geeignetes und geeichtes Thermometer kontrolliert. Die Zeitmessung erfolgte mit einer handelsüblichen, geeichten Stoppuhr. Zur Sicherstellung der gleichmäßigen Aktivierung der Proben wurde ein Vortex[®]-Mischer verwendet.

Die Messung der Thrombozytenaktivierung nach dem Versuch wurde mit einem Durchflusszytometer (FACS) der Firma Becton-Dickenson[®] erzielt. Die so gemessenen Daten wurden unmittelbar folgend mit einem Power PC der Firma Apple Computer[®] mittels der Software CELLQuest Version 3.1f analysiert.

Während der Verarbeitung des thrombozytenreichen Plasmas (PRP) wurden folgende Chemikalien verwendet:

- Adenosindiphosphat (ADP) 1.5 mM
- Antikörper Anti-VASP clone 16C2 (anti-VASP-pSER 239), 100 µg/ml
- Antikörper F-2012, FITC-markiert, Firma Sigma[®]
- Antikörper Anti-G_i-Protein-Alpha
- Antikörper Anti-P2X1 (Anti-Purinerger-ATP-Rezeptor)
- BSA-Lösung, 0.1 g in 20 ml PBS und Glucose-Lösung
- Citrat-Monovetten[®] der Firma Sarstaedt[®]
- D(extro)-Glucose 5%
- dNTP der Firma MBI Fermentas[®]
- Dulbeccos PBS
- Ethanol 0.17 %
- Formaldehyd 10 %
- KCl (Kalium-Chlorid)
- Magnesiumdichlorid (MgCl₂)
- Meerrettich Peroxidase
- Milchpulver
- Nitrozellulose
- Nonidet P40
- Prostaglandin-E₁ 19 µM
- Puffer, destilliertes H₂O (Wasser)
- QIAmp DNA Blood Midi Kit, Firma Hilden[®]

- QIAquick PCR Purification Kit, Firma QIAGEN®
- SDS-Polyacrylamid-Gelmatrix
- Taq DNA Polymerase, Firma MBI Fermentas®
- Triton X-100 Lösung
- Tris-HCl
- TWEEN®

3.2. Methoden

3.2.1. Thrombozytenisolation und -stimulation

Bei der Blutentnahme wurde auf eine Stauungszeit unter 60 Sekunden geachtet, um so eine Voraktivierung der Thrombozyten zu verhindern. Zur Gewinnung des PRP wurde die Citrat-Monovette[®] für 5 Minuten bei 400 g ungebremst zentrifugiert, um eine vorzeitige Thrombozytenaktivierung zu vermeiden. Der PRP-Überstand wurde abpipettiert und zur vorübergehenden Aufbewahrung in einem Eppendorf-Probengefäße im 37° Celsius Wasserbad gelagert. Es folgte die Bereitstellung der folgenden Eppendorf-Probengefäße:

1. **Leerprobe ohne Aktivierung** mit 2 µl destilliertem Wasser (Puffer), 4,5 µl Ethanol (0,17 %-ig) zusammen mit 143,5 µl PRP (Thrombozyten)
2. **Aktivierung** mit 2 µl ADP (1,5 mM), 4,5 µl Ethanol (0,17 %ig) und 143,5 µl PRP
3. **Prostaglandin-Hemmung** mit 4,5 µl PG-E₁, 2µl H₂O (destilliert) und 143,5 µl PRP
4. **Aktivierung und PG-Hemmung** mit 2 µl ADP (1,5 mM), 4,5 µl PG-E₁ und 143,5 µl PRP
5. **Zusätzliche Probe**, falls ausreichend Material vorlag, wurde eine weitere Aktivierung wie Probe 2 durchgeführt (insgesamt in 46 Untersuchungen möglich)

Die Endkonzentration von PG-E₁ in Probe 3 und 4 war 1.0 µM, von ADP in den Proben 2 und 4 je 20 µM.

ADP wurde jeweils vor Zugabe frisch aus dem Kühlschrank entnommen und unmittelbar vor Zugabe des PRP zupipettiert um eine vorzeitige Aktivierung zu vermeiden. Die fertig vermengten (mittels Vortex[®]-Mischer) Probengefäße wurden für 3 Minuten im Wasserbad (37° Celsius) inkubiert. Zum Fixieren des Reaktionsvorganges erfolgte dann unmittelbar die Zugabe von 70 µl Formaldehyd (10 %). Die Probengefäße lagerten für 5 Minuten bei Raumtemperatur. Die Fixation endete durch Zentrifugieren für 1 Minute bei 5000 Umdrehungen pro Minute. Der flüssige Überstand wurde mittels Pipette oder Wasserstrahlpumpe abgesaugt und die an der Wand haftenden Thrombozytenpellets in 400 µl BSA-Lösung resuspendiert. Zur Permeabilisierung der Thrombozytenmembran wurde 40 µl Triton X-100 in jedes Probengefäß gegeben und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Permeabilisierung wurde beendet durch erneutes Zentrifugieren für 1 Minute bei 2000 g und anschließendem Absaugen (Pipette bzw. Wasserstrahlpumpe) des flüssigen Überstandes. Die Resuspendierung der Thrombozytenpellets erfolgt erneut mit 100 µl BSA-Lösung.

Als nächstes folgte die Zugabe von 10 µl Antikörper gegen das phosphorylierte VASP (anti-phospho VASP-Serin 239, Konzentration 100 µg in 1 ml), der auch bereits mehrmals in verschiedenen Veröffentlichungen beschrieben wurde (2;3;4). Anschließend wurden die Lösungen für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Auch diese Reaktion wurde mittels Zentrifugation für 1 Minute bei 2000 g gestoppt und der Überstand durch Absaugen (Pipette/Wasserstrahlpumpe) entfernt. Die Pellets wurden erneut in 100 µl BSA-Lösung resuspendiert. Für die folgende Durchführung der FACS-Messung erhielt jedes Probengefäß 3 µl FITC-markierten anti-Maus-Antikörper und wurde 20 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Auch diese Reaktion endete nach den erforderlichen 20 Minuten durch Zentrifugation bei 2000 g für 1 Minute mit anschließendem Absaugen.

Für die anschließende FACS-Messung wurden die mit Antikörper beladenen Thrombozytenpellets wieder in 300 µl PBS-Lösung resuspendiert.

Für eine eventuell verlängerte Wartezeit zwischen dem Ende der Versuchsdurchführung und dem Start der FACS-Messung erfolgte die Umfüllung der Proben in die erforderlichen Glasreagenzgläser und Zwischenlagerung bei 4°C.

3.2.2. Durchflusszytometrisches Messverfahren

Die Bestimmung der Thrombozytenhemmung durch Clopidogrel basiert auf der publizierten Methode von Schwartz et al., die mit geringen Modifikationen eingesetzt wurde (2).

Um die Menge an phosphorylierten VASP zu bestimmen, wurde die Durchflußzytometrie (FACS) genutzt. Diese Methode kombiniert einen Strom mit markierten Zellen und eine Laserstrahl-Streuungsmessung. Der Mantelstrom wird benötigt, um die Menge der aktuell gemessenen Zellen so klein wie möglich zu halten. Die Zellen müssen vorher mit einem fluoreszierenden Stoff markiert werden, in unserem Fall mit markierten Antikörpern gegen das Protein VASP. Während eine so markierte Zelle durch den Mantelstrom fließt, wird ein in den Strom gerichteter Laserstrahl auf die Zelle treffen. Durch die reflektierende Markierung der Zielzellen wird der Laserstrahl ausreichend gestreut, so dass um den Mantelstrom angeordnete Lichtdetektoren diesen nachweisen können (Forward-Scatter und Side-Scatter).

VASP kann an drei verschiedenen Stellen phosphoryliert werden. Für die Untersuchung des Thrombozyten-Aktivierungsindex wurde - wie in der Voruntersuchung - der Antikörper gegen phosphoryliertes Serin 239 verwendet (2). In den Vorbereitungen für die Messreihe kamen auch andere Antikörper gegen phosphoryliertes VASP zum Testeinsatz, aufgrund der

positiven Vorerfahrungen und erfolgreicher, reproduzierbarer Wiederholungen der Untersuchung fiel die Entscheidung für diesen Antikörper.

Nach der Permeabilisierung der Thrombozytenmembran ist es möglich das intrazelluläre, phosphorylierte VASP mit dem Antikörper zu markieren. Der gebundene Antikörper wurde dann in einem späteren Arbeitsschritt mit einem FITC-markierten Antikörper gegen das F_c-Fragment des VASP-Antikörpers markiert. In der Analyse der beim FACS angezeigten Graphen wurde der Side-Scatter, bzw. die seitwärtsgerichtete Streuung, über den Forward-Scatter, bzw. die vorwärtsgerichtete Streuung, aufgetragen. Alle so ermittelten Streuungswerte wurden akkumuliert. Erfahrungsgemäß ergibt sich nach dem oben angegebenen Protokoll (siehe auch 3.2.1) jeweils ein sehr homogenes Feld, um welches möglichst enge Messfeldgrenzen („Gate“) gelegt wurden, um die Fehler durch „Ausreißer“ zu vermeiden. Aus diesem Messfeld berechnete der Computer sowohl die Gesamtzahl der gemessenen Ereignisse, als auch den Mittelwert (mean), den geographischen Mittelwert (geo-mean) und den Medianwert, die für die Berechnung der Statistik entscheidend war. Diese Messung erfolgte so für jede einzelne bearbeitete Probe, wobei die einzelnen Proben zum Einstellen einer einheitlichen Thrombozytenzahl je nach Bedarf mit Dulbeccos PBS verdünnt wurden, um exaktere Messungen zu erhalten.

Die nachgeschaltete durchflußzytometrische Bestimmung des P2Y₁₂-Thrombozyten Aktivierungs Index (Platelet Reactivity Index – PRI) erfasst die Clopidogrelwirkung durch den Nachweis der Phosphorylierung des Vasodilator-stimulated Phosphoproteins (VASP). Der Assay basiert auf der P2Y₁₂-abhängigen Hemmung der thrombozytären Adenylatzyklase, gemessen mit und ohne Stimulation durch ADP (2). Bei vollständiger Hemmung des P2Y₁₂-Rezeptors durch Clopidogrel resultiert ein Aktivierungsindex von 0%, da ADP in diesem Fall nicht in der Lage ist, die Adenylatzyklase zu hemmen. Im Gegenzug zeigt ein Index von 100% eine

komplette Wirkungslosigkeit von Clopidogrel an (2;45). Die PRI-Bestimmung ist gegenwärtig die einzige kommerziell verfügbare Testung, welche selektiv P2Y12-vermittelte Signalwege erfasst, ohne daß eine Bestimmung vor Therapiebeginn notwendig ist (17;44;45).

Die nachfolgende Abbildung zeigt beispielhaft die Analyse eines Patienten, der gut auf Clopidogrel anspricht (Responder) und eines Therapieversagens (Non-Responder):

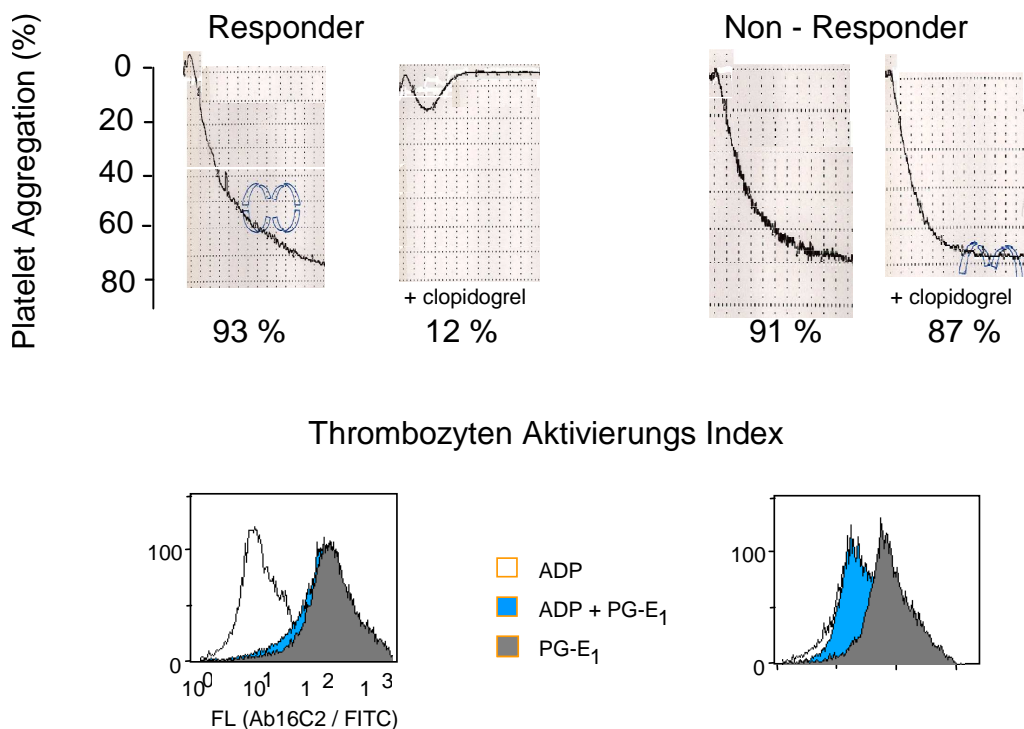


Abbildung 6: Aggregationsmessung vor/während Clopidogreltherapie und zugehörige durchflußzytometrische Analyse bei einem Patienten mit gutem Ansprechen auf Clopidogrel (Responder) und einem Patienten mit Therapieversagen (Non-Responder). Angegeben ist die maximale Thrombozytenaggregation. Im Falle des Responders kommen die durchflußzytometrischen Kurven für ADP+PG-E₁ und PG-E₁ zur Deckung, während im Falle des Nicht-Ansprechens die Kurve für ADP+PG-E₁ nach links verschoben wird in Richtung ADP-messung. Aus dem Verhältnis der Kurven untereinander wird der Thrombozyten-Aktivierungsindex berechnet.

Die Messung des phosphorylierten VASP-Anteils in den Thrombozyten ermöglicht somit eine sehr differenzierte Beurteilung des Thrombozyten-Aktivierungsstatus. Somit ist diese Messung den derzeit vor allem in der

Laborroutine verwendeten Methoden, wie zum Beispiel der Aggregometrie, überlegen (17).

3.2.3. Western-Blot Analyse

Zum Zeitpunkt der Untersuchung (2001) waren Antikörper gegen den spezifischen P2Y₁₂ Rezeptor noch nicht verfügbar, so dass alternativ der verfügbare P2X₁-Rezeptor-Antikörper verwendet wurde. Der ADP-Rezeptor P2X₁ wird ebenfalls durch ADP aktiviert (33). Es wurde von einer annähernd äquimolaren Verteilung dieser beiden Rezeptoren in humanen Thrombozyten ausgegangen.

Das hier verwendete Patienten-Blut wurde nach der Bestimmung mittels Durchflusszytometrie erneut den entsprechenden Patienten abgenommen, wie nachfolgend beschrieben aufbereitet und vor der Untersuchung bei -70° Celsius gelagert.

Das thrombozytenreiche Plasma (PRP) von 4 Patienten wurde untersucht. Zwei dieser Patienten zeigten in der Durchflußzytometrie ein nicht adäquates Ansprechen auf die Clopidogrel-Therapie, die anderen beiden entsprachen dem Normkollektiv. Das PRP wurde zentrifugiert, die Thrombozyten lysiert und in SDS-Stoppuffer resuspendiert. Die Proteine aus den Thrombozyten wurden mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt und mittels Elektrotransfer auf Nitrozellulosemembranen transferiert. Die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen erfolgte mit 6% Milchpulver in Pufferlösung (PBS) mit 0,1 % Tween[®].

Diese so beladenen Membranen wurden mit dem primären Antikörper gegen P2X₁-Rezeptoren, dem VASP-Protein (M4) und gegen G_i-Alpha-1,2 inkubiert. Direkt darauf erfolgte die Markierung durch einen Peroxidase-gekoppelten Antikörper. Die verwendeten Antikörperkonzentrationen richteten sich nach den Empfehlungen der jeweiligen Herstellerfirmen.

Um die Spezifität des Antikörpers gegen den P2X1-Rezeptor zu überprüfen, wurde ein korrespondierendes, blockierendes Peptid benutzt. Für die Positivkontrolle der G_i-Alpha Analyse wurde eine rekombinante G_i-Alpha-2 Untereinheit verwendet. Um die auf diese Weise hergestellten Proteinbanden auf den Membranen sichtbar zu machen, wurde ein chemilumineszierendes Darstellungsverfahren (ECL, enhanced chemiluminescence detection kit) benutzt. Nach der Belichtung auf einem Röntgenfilm wurden die Banden für G_i-Alpha, phosphoryliertem VASP und dem P2X1-Purin-Rezeptor durch Zuhilfenahme eines Scanners quantifiziert.

3.2.4. Genetische Analyse des P2Y₁₂-ADP-Rezeptors

Zur Analyse des P2Y₁₂ ADP-Rezeptor-Genes wurde aus einem EDTA-Blutbildröhrchen von acht mit Clopidogrel behandelten Patienten jeweils 2 ml Probenmaterial gewonnen und die DNA durch Verwendung eines entsprechendem QIAamp DNA Blood Midi Kit[®] nach den Empfehlungen des Herstellers gewonnen.

Die Exons 1 und 2 wurden mit 25 oder 30 Reproduktionszyklen mittels einer PCR (Polymerase Chain Reaction) gewonnen. Im Einzelnen wurde in der PCR jeweils 500 ng DNA verwendet, gelöst in 10 mM Tris-HCl (pH 8,8), 50 mM KCl, 0,08% Nonidet P40, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP, 0,1 U Taq DNA Polymerase der Firma MBI Fermentas und 0,2 µM des jeweiligen Primers. Die Einstellung der Zyklen erfolgte bei 45 Sekunden unter 94° Celsius, 60 Sekunden bei 57° Celsius und 90 Sekunden bei 72° Celsius.

Die Primer waren folgendermaßen konstruiert:

- Exon 1: 5'-Ende: 5'-GAGGCTAATTAACAATTGTCTCTG-3',
3'-Ende: 5'-GCCATCCTCATCCCACATTTCCAG-3'

- Exon 2: 5'-Ende:GGTAAGAAGATTATATCCAATTGATCG-3'
3'-Ende: 5'-AGCAATAATAACTACCTTAGGCGT-3'

Diese Primer-Sequenzen wurden publizierten Daten entnommen (18).

Die Produkte der PCR wurden gereinigt durch das QIAquick PCR Purification Kit[®] der Firma QIAGEN. Die Genanalyse der Produkte erfolgte durch einen automatisierten DNA-Sequenz-Analysator.

4. Ergebnisse

4.1 Thrombozyten-Aktivierungs-Index (PRI)

In den folgenden Datentabellen sind alle in der FACS-Analyse ermittelten Absolutwerte für jeden einzelnen Patienten angegeben. Die Werte entsprechen dem jeweiligen Mittelwert (mean) aller Fluoreszenzdaten pro Durchlauf. Entsprechend der vorher gebunden Menge an Antikörpern (spezifische und mit FITC-markierte) konnte so jeweils die Thrombozytenaktivität nach Zusatz von ADP (Agonist) sowie ADP + PG E₁ (Agonist mit Antagonist kombiniert) gemessen werden.

Der Thrombozyten-Aktivierungs-Index errechnet sich nach folgender Formel:

$$\text{Fluoreszenzwert (ADP + PG-E}_1\text{)} / \text{Fluoreszenzwert (ADP)}$$

Dieser Wert drückt in Prozent den Grad der Aktivierung aus. Nach Umrechnung in Prozentwerte ergibt sich ein Normalbereich für nicht-gehemmte Thrombozyten von > 50 %, im Bereich < 50 % ist von einer nahezu vollständigen, Thienopyridin-bedingten Hemmung der Thrombozytenaktivierung auszugehen. Entsprechend sollte sich nach der Gabe von Thienopyridinen dieser Wert deutlich verschieben.

In den Tabellen 4 und 5 ist jeweils in der letzten Spalte der entsprechende Aktivierungsgrad (in %) angegeben.

TOPSTAR-Studie	ADP mean	ADP+PG-E ₁ mean	ADP+PG- E ₁ /ADP mean	Aktivierung in Prozent
vor Clopidogrel	23,42	34,36	1,47	68%
nach	24,43	24,12	0,99	100%
vor Clopidogrel	28,93	28,31	0,98	100%
nach	19,72	35,87	1,82	55%
vor Clopidogrel	38,88	56,84	1,46	68%
nach	13,79	110,53	8,02	12%
vor Clopidogrel	27,16	34,73	1,28	78%
nach	20,67	72,57	3,51	28%
nach	24,00	83,22	3,47	29%
vor Clopidogrel	16,37	30,80	1,88	53%
nach	12,13	34,73	2,86	35%
vor Clopidogrel	18,18	17,81	0,98	100%
nach	13,67	61,46	4,50	22%
vor Clopidogrel	7,54	11,31	1,50	67%
nach	21,10	54,28	2,57	39%
vor Clopidogrel	30,83	33,83	1,10	91%
nach	74,65	252,76	3,39	29%
vor Clopidogrel	17,67	58,20	3,29	30%
nach	21,91	93,94	4,29	23%
vor Clopidogrel	19,50	60,16	3,09	32%
nach	19,91	97,52	4,90	20%
vor Clopidogrel	20,64	23,02	1,12	89%
nach	8,29	50,15	6,05	17%
vor Clopidogrel	26,23	35,95	1,37	73%
nach	20,34	55,69	2,74	36%
vor Clopidogrel	20,11	37,47	1,86	54%
nach	27,41	218,63	7,98	13%
vor Clopidogrel	27,45	28,86	1,05	95%
nach	18,76	102,41	5,46	18%
vor Clopidogrel	21,38	80,65	3,77	27%
nach	23,91	94,98	3,97	25%
vor Clopidogrel	13,96	22,88	1,64	61%
nach	16,60	83,58	5,03	20%
vor Clopidogrel	56,60	113,64	2,01	50%
nach	29,45	82,12	2,79	36%

Tabelle 4: Absolutwerte aller Untersuchung (mit Prozentangabe); die Werte vor und frühestens drei Tage nach Clopidogrel-Einnahme wurden einzeln angegeben

Die in der Tabelle aufgeführten Werte ergeben folgendes Schaubild. Zur besseren Übersicht wurden die Absolutwerte angegeben.

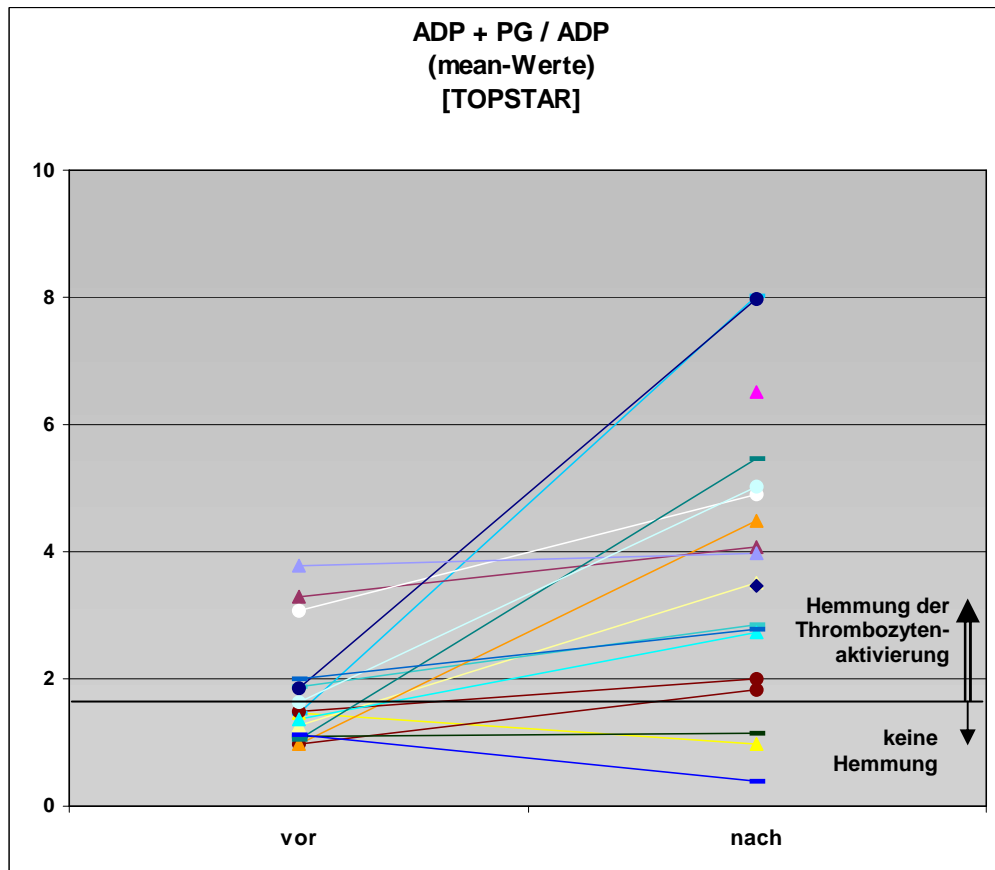


Abbildung 7: Graphische Darstellung der Thrombozytenaktivierung durch Prostaglandin E_1 vor und nach Clopidogrel-Einnahme. Patienten mit Vorwerten („TOPSTAR-Studie“); die Linien entsprechen der Trendentwicklungen der individuellen Patienten. Der Grenzwert der später als „non-responder“ bezeichneten Patienten entspricht etwa 1.8, die prozentuale Angabe folgt in Abbildung 9.

In einem Fall war es aus technischen Gründen nicht möglich einen Wert vor Clopidogreleinnahme zu erheben. Für alle anderen Untersuchungen wurde der Verlauf vor und nach Clopidogreleinnahme als Linie in der Abbildung angegeben.

In der folgenden Tabelle 5 sind die Werte angegeben, die nur nach dem Beginn der Einnahme von Clopidogrel ermittelt wurden („2. Werte“). Zur Verdeutlichung wurden die Daten als Diagramm (Abbildung 8) neben der

Tabelle eingefügt. Die x-Achse gibt auch hier den absoluten Wert des Quotienten ADP+PG/ADP wieder.

2. Werte	ADP mean	ADP + PG mean	ADP+PG/ADP mean	Aktivierung in Prozent
	28,72	187,03	6,51	15%
	17,31	78,59	4,54	22%
	19,10	146,78	7,68	13%
	24,60	88,82	3,61	28%
	21,53	157,29	7,31	14%
	33,11	243,09	7,34	14%
	28,40	48,04	1,69	59%
	31,50	73,53	2,33	43%
	20,03	140,26	7,00	14%
	31,68	114,10	3,60	28%
	14,46	62,89	4,35	23%
	19,07	99,99	5,24	19%
	15,83	84,40	5,33	19%
	20,18	128,24	6,35	16%
	37,90	57,34	1,51	66%
	13,71	214,04	15,61	6%
	27,74	48,11	1,73	58%

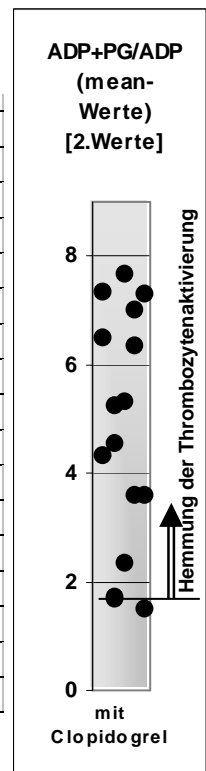


Tabelle 5 und Abbildung 8: Thrombozytenaktivierung bei Patienten ohne Werterhebung vor Clopidogrel-Einnahme absolut und prozentual. Rechts daneben die graphische Darstellung der Werte. Auch hier entspricht der Grenzwert etwa 1.8 für „non-responder“. Die prozentuale Angabe erfolgt in Abbildung 10.

Insgesamt ergab sich die im folgenden Diagramm (Abbildung 9) dargestellte Verteilung.

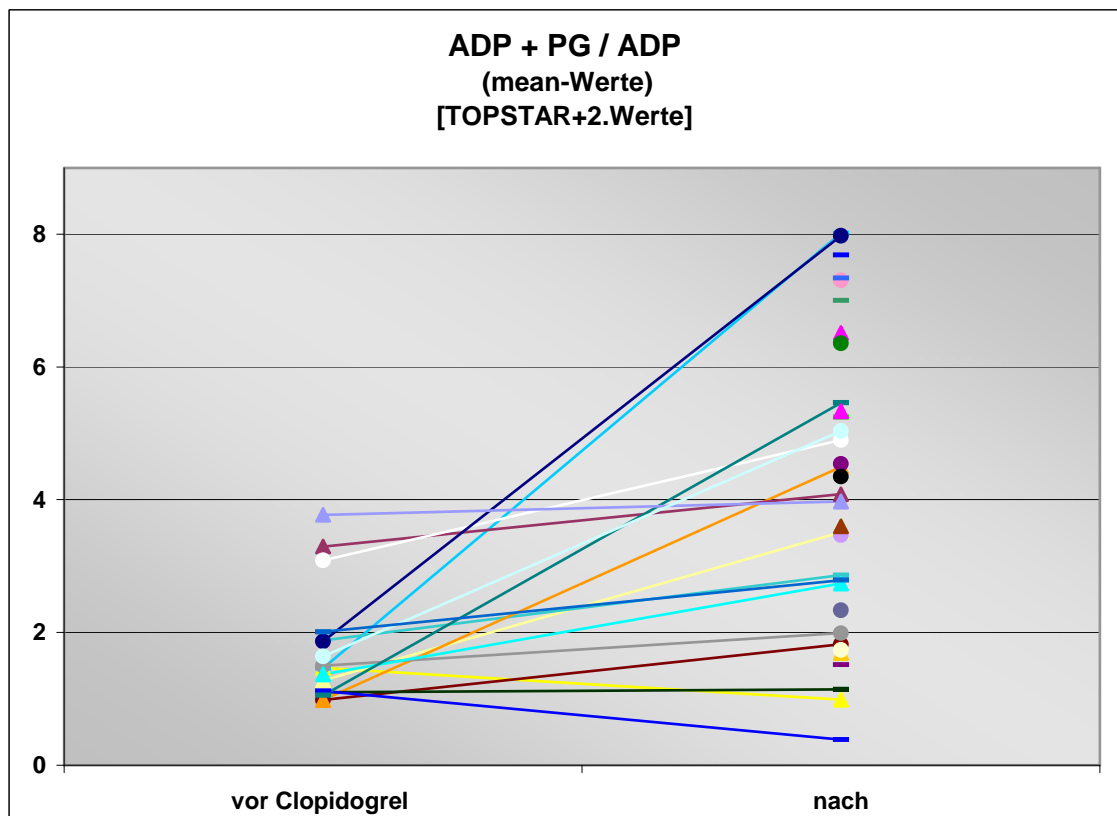


Abbildung 9: Kombination der Werte vor und nach Einnahme von Clopidogrel (diese sind mit Trendlinie für die individuellen Patienten versehen) und der 2. Werte, entsprechend nur nach Clopidogrel-Einnahme (ohne Trendlinie bei fehlenden Werten vor Clopidogrel-Einnahme).

Aus statistischen Gründen erfolgte bereits die Angabe der prozentualen Aktivierung in den oben angeführten Tabellen 4 und 5. In dem folgenden Diagramm (Abbildung 10) wurden diese Werte angeführt. Die Daten stammen sowohl aus der Patientengruppe mit Werten vor und nach Clopidogreleinnahme („TOPSTAR“), als auch aus der Gruppe in der nur Werte unter Clopidogreleinnahme ermittelt werden konnten („2. Werte“).

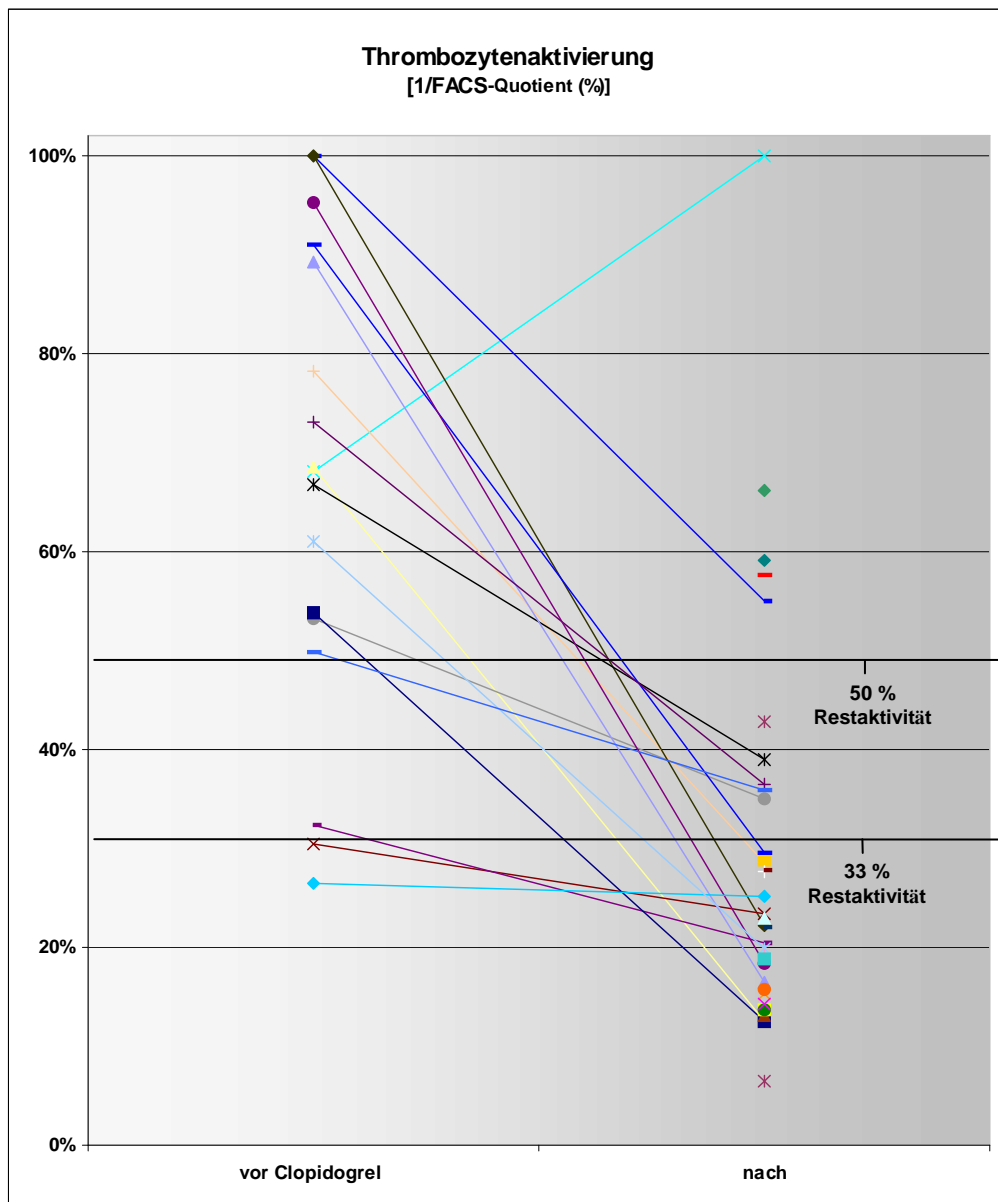


Abbildung 10: Graphische Darstellung aller Daten vor und nach Clopidogrel-Einnahme mit Angaben der prozentualen Restaktivitäten der Thrombozyten (nach Clopidogrel-Einnahme), für alle Patienten mit Vorwerten auch hier der Trend angegeben; die Restaktivität wurde in der x-Achse als Prozent angegeben; deutlich ist hier die weitere Streuung mit einzelnen Gruppierungen bei 20 % (Normalpopulation), bei 33 % Aktivität (später als „low-responder“ bezeichnet) und bei etwa 50 % Restaktivität (später als „non-responder“) definiert.

4.2. Statistische Analyse

Ein Thrombozyten-Aktiverungsindex von über 50 % trotz ausreichender Clopidogrel-Gabe wurde als Arbeitshypothese für die Gruppe der im Folgenden als Non-responder bezeichneten Patienten angesetzt. Dieser Wert basiert auf unseren Erhebungen eines Normalkollektivs sowie auf früheren Publikationen (2;44). Insgesamt gab es hier vier Fälle, in denen der Aktivierungsindex deutlich über 50 % lag. Zur Überprüfung der Nullhypothese (kein signifikanter Unterschied) wurde aufgrund der kleinen Fallzahl der Students-t-Test verwendet.

In Absolutwerten lag der Mittelwert der Normalpopulation (unter 50 % Aktivierung) bei 5.28 (in Prozent 18,9 %), in der Non-responder Gruppe lag der Mittelwert bei 1.56 (in Prozent 64,1 %). Die Standardabweichung in der normalen Gruppe lag bei 2.61 (6.3 % Unterschied), in der Non-responder Gruppe 0.382 (12.6 % Unterschied). Der Medianwert betrug in Absolutwerten für die erste Gruppe (Normalverteilung) 4.72, für die zweite Gruppe (Non-responder) 1.71. Als Ausdruck der Zuverlässigkeit der Analyse sei hier noch einmal das 95%ige Konfidenzintervall (95% aller Daten) beider Gruppen im Vergleich angegeben. Für die Normalgruppe lag das Intervall zwischen 4.354 und 6.201 (entsprechend 16,1 bis 23 % Aktivierung), in der Non-responder Gruppe lag das Intervall bei -0.9720 bis 4.087 (entsprechend 24 bis 100 %), eine Überschneidung der Intervalle ergibt sich nicht. Das Signifikanzniveau lag hiermit bei $p=0.008$ (Wahrscheinlichkeit des Ergebnisses bei Annahme der Nullhypothese). Der t-Wert liegt bei 2.81. Die Arbeitshypothese kann hiermit angenommen werden. In der folgenden Tabelle 6 sind diese Ergebnisse noch einmal aufgetragen.

	Normalverteilung		Non-responder	
	absolut	Angabe in %	absolut	Angabe in %
Mittelwert (Mean)	5.28	18.9	1.56	64.1
Median	4.72	21.2	1.71	58.5
Standardabweichung	2.61	6.3	0.382	12.6
Standardfehler			0.191	7
95 % Konfidenzintervall	4.35-6.2	16.1 bis 23	0.97-4.09	24 bis 100
t-Wert	2.81			
Signifikanzniveau	0.008			

Tabelle 6: Statistik der Werte (nicht gepaarter Students-t-Test) für „Non-Responder“ mit einem angenommenen Grenzwert von 50% Restaktivität (Plättchen-Reaktivität) der Thrombozyten nach Clopidogrel-Einnahme

Nach Durchsicht der Daten erfolgte die Aufstellung einer weiteren Hypothese. Die Verteilung der Daten ließ eine Gruppe von Patienten erkennen, die zwar eine verminderte Thrombozytenaktivierung nach Clopidogrel-Einnahme zeigten, aber immer noch eine gewisse Restaktivierbarkeit auch nach Loadingdosis oder nach Herstellerangaben zeitlich ausreichender Einnahmedauer aufwiesen. Diese Gruppe wird im Weiteren als Low-responder Gruppe betitelt. Diese retrospektive Hypothese ging davon aus, dass über 1/3 Restaktivität (entsprechend 33 %) nur einer teilweisen Hemmung der Thrombozyten durch Clopidogrel entspricht.

Unter Auslassung der oben definierten Non-responder gab es fünf aus den verbleibenden 30 Patienten, die eine Restaktivität der Thrombozytenaktivierung von mindestens 33 % aufwiesen. Auch hier wurde der Students-t-Test angewendet.

In Absolutwerten lag der Mittelwert der 25 in der Normalpopulation verbleibenden Patienten (unter 33 % Aktivierung) bei 5.80 (in Prozent entsprechend 17,2 %), in der Low-responder Gruppe lag der Mittelwert bei 2.54 (in Prozent 39,4 %). Die Standardabweichung der 25 gut reagierenden Patienten lag bei 2.55 (5.3 % Unterschied), in der schwach reagierenden Gruppe bei 0.368 (7 % Unterschied). Der Medianwert betrug in

Absolutwerten für die erste Gruppe (Normalverteilung) 5.24, für die zweite Gruppe (Low-responder) 2.74. Auch hier zur Vervollständigung die Angabe des 95% Konfidenzintervalls beider Gruppen im Vergleich. Für die Normalgruppe reicht das Intervall zwischen 4.834 und 6.769 (entsprechend 14.7 bis 20.7 % Aktivierung), das Intervall der Low-responder Gruppe von 0.3807 bis 4,707 (entsprechend 21.2 bis 100 %), eine Überschneidung der Intervalle ergibt sich so nicht. Das Signifikanzniveau lag hiermit bei $p=0.009$ (Wahrscheinlichkeit des Ergebnisses bei Annahme der Nullhypothese). Der t-Wert liegt bei 2.82. Die Arbeitshypothese, bzw. die Vermutung einer Gruppe von Patienten mit verminderter Thrombozytenhemmung durch Clopidogrel, kann somit angenommen werden.

Es folgt die tabellarische Angabe der Daten (Tabelle 7).

	Normalverteilung		Low-responder	
	absolut	Angabe in %	absolut	Angabe in %
Mittelwert (Mean)	5.8	17.2	2.54	39.4
Median	5.24	19.1	2.74	36.5
Standardabweichung	2.55	5.3	0.37	3.3
Standardfehler			0.18	2.6
95 % Konfidenzintervall	4.83-6.77	14.7 bis 20.7	0.38-4.7	21.2 bis 100
t-Wert	2.82			
Signifikanzniveau	0.009			

Tabelle 7: Statistik (nicht gepaarter Students-t-Test) der Werte für „Low-Responder“ mit einem festgelegten Grenzwert von 33% Restaktivität der Thrombozyten nach Clopidogrel-Einnahme

4.3. Gehalt an inhibitorischen G-Protein und VASP in untersuchten Thrombozyten

Um einen Mangel an G_i -Alpha-1,2 und VASP auszuschließen erfolgte die Western Blot Analyse von insgesamt 4 Patienten, davon 2 auf Clopidogrel normal reagierenden und 2 mit verminderter Clopidogrelwirkung. Diese beiden Proteine sind wichtige Schlüsselproteine im intrazellulären Signalweg des aktivierten P2Y₁₂ ADP-Rezeptors (19;43).

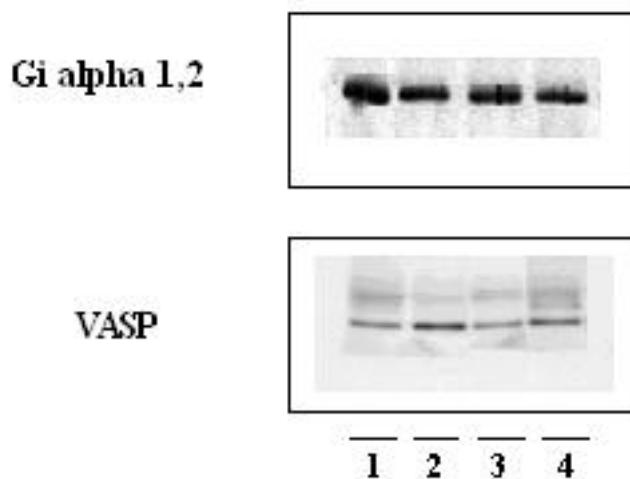


Abbildung 11: Western Blot-Analyse: Proteinbanden für G_i -Alpha-1,2 und VASP jeweils von zwei adäquat reagierenden Patienten (Responder, Spur 1 und 2) und zwei Patienten mit vermindertem Ansprechen auf die Clopidogrel-Einnahme (Low-/Non-Responder, Spuren 3 und 4).

Da während der Analyse der spezifische Antikörper gegen den P2Y₁₂-Rezeptor noch nicht verfügbar war, wurde ein damals verfügbarer, gegen den ebenfalls durch ADP aktivierten P2X₁-Rezeptor verwendet. Das Verhältnis zu den intrazellulären Proteinen sollte entsprechend eine durch individuelle Unterschiede unabhängige Möglichkeit des Vergleichs herbeiführen.

Die im Blot dargestellten Proteinbanden für G_i-Alpha-1,2 und VASP wurden eingescannt und es wurde aus den dadurch gewonnenen quantitativen Werten ein G_i-Alpha-1,2/P2X1- und ein VASP/P2X1-Verhältnis errechnet und im folgenden Diagramm (Abbildung 11) graphisch dargestellt.

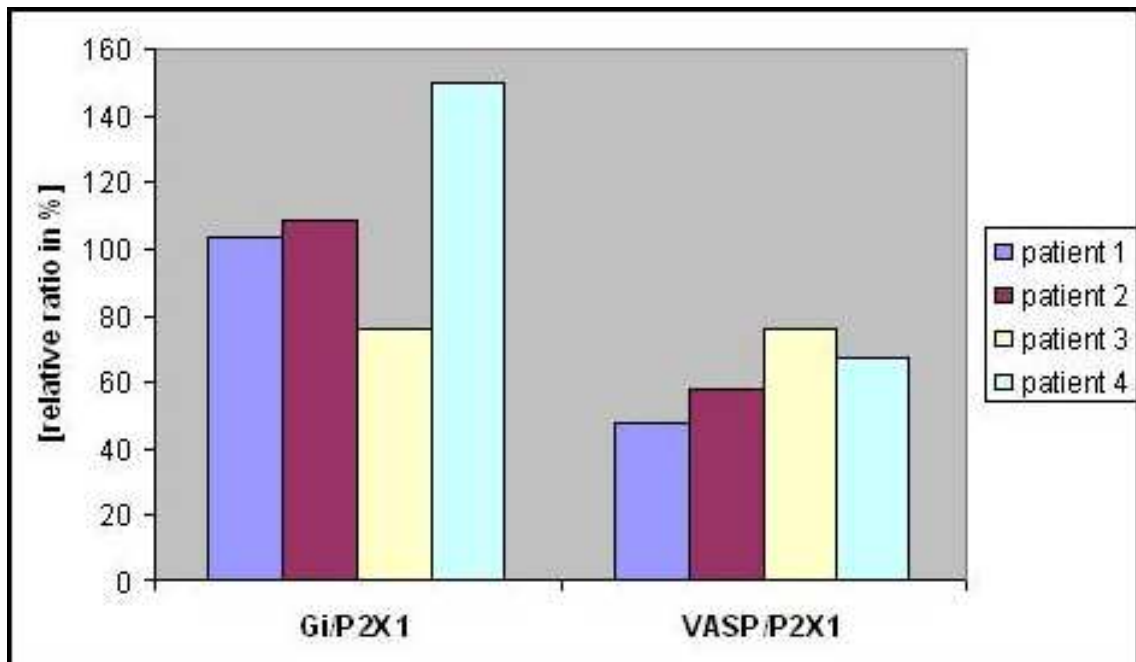


Abbildung 12: Verhältnis G_i-Protein/P2X1 und VASP-Protein/P2X1-Verhältnisse der gleichen Patienten (siehe Abbildung 10).

Sowohl Thrombozyten von auf Clopidogrel ansprechenden Patienten, als auch von Patienten mit Clopidogrel-Wirkungsvariabilität zeigten eine annähernd vergleichbare Relation an Proteinen, sowohl bezüglich G_i-Alpha-1,2 als auch P2X1-ADP-Rezeptor und VASP.

4.4. P2Y12-ADP-Rezeptor-Genanalyse

Zum Ausschluss einer molekularen Veränderung des P2Y12 Rezeptors, die auf diese Weise zu einer verminderten Bindungsaffinität zwischen Rezeptor und aktiviertem Clopidogrel-Metaboliten führen kann, wurden die Exons 1

und 2 des P2Y₁₂ ADP-Rezeptor-Genes von insgesamt acht mit Clopidogrel therapierten Patienten sequenziert. Sieben dieser Patienten zeigten zuvor eine deutliche Variabilität in der Clopidogrel-Wirkung. Ein Patient reagierte normal auf die Therapie. Zwei der vermindert ansprechenden Patienten und der normal reagierende Patient besaßen einen homozygoten Austausch von Guanin durch Adenin auf der Position 1828 (bp), entsprechend der Position 92 (bp) in der Messenger-RNA-Sequenz (GenBank[®] Zugriffs-Nummer AF 313449).

Drei weitere Patienten mit einem verminderten Ansprechen auf Clopidogrel zeigten sich heterozygot.

Dieser nachgewiesene Polymorphismus erwies sich als stumme Mutation ohne Veränderung der Proteinsequenz.

5. Diskussion

Zwei Hauptaussagen kann man aus diesen Ergebnissen postulieren:

- Zum einen ließ sich die bereits als Arbeitshypothese angenommene fast vollständig fehlende Reaktion auf Clopidogrel bei vier der insgesamt 35 untersuchten Patienten bestätigen. Zusätzlich wurden 5 Patienten mit einer nicht vollständigen Wirkung von Clopidogrel identifiziert.
- Zum zweiten lässt sich diese Variabilität der Clopidogrel-Wirkung nicht auf molekulare Veränderungen (verminderte Menge an G_i-Alpha-1,2-Protein oder VASP) oder einen molekularen Defekt des P2Y₁₂ ADP-Rezeptors zurückführen.

Aufgrund der Ergebnisse zahlreicher Studien in denen ASS und Clopidogrel, entweder als jeweilige Mono- oder Kombinationstherapie eingesetzt wurden (CAPRIE, etc.), wurde eine generelle Therapieempfehlung bei Stentimplantation mit der Kombination aus Acetylsalicylsäure und Clopidogrel für mindestens 6 Wochen von verschiedenen Fachgesellschaften (American College of Cardiology, Canadian Cardiology Society) herausgegeben (15;19). Die so zum sogenannten Goldstandard erhobene Therapie wurde entsprechend nach perkutaner, transluminaler Koronarangiographie mit Angioplastie mittels Stent oder zur Reinfarkt-Prophylaxe nach Schlaganfall weit verbreitet eingesetzt. In der Folge wurden jedoch zahlreiche Berichte über ein unzureichendes Ansprechen dieser Arzneimittelkombination veröffentlicht (6;7;20;21). Insbesondere die Monotherapie mit Clopidogrel zeigte immer wieder ein solches Therapieversagen. Um die Gefährdung von Patienten abschätzen zu können, wurden zeitgleich und auch nach Veröffentlichung der Daten dieser Arbeiten (22;23;24) eine Reihe von Testsystemen

evaluiert, um die Hemmung der Thrombozytenaktivierbarkeit zu erfassen. Die wohl am meisten benutzte Methode zum Nachweis der Thrombozytenaktivierung ist die sogenannte Lichtaggregometrie, in ihr wird die Änderung der Lichtdurchlässigkeit von Plättchen-reichem Plasma nach Thrombozytenaktivierung durch Adenosindiphosphat bestimmt. Ebenfalls häufig angewandt wurde der Thrombozytenaktivierungsnachweis mittels Durchflusszytometrie, anders als in dieser Promotionsarbeit vor allem mit spezifischen Antikörpern gegen thrombozytäre Oberflächenmarker wie P-Selectin oder GPIIb/IIIa (Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$)-Rezeptoren (19;30). Ungeachtet der Methode ließ sich in allen Studien relativ konstant das gleiche Ergebnis wie in der vorliegenden Abhandlung beobachten: in etwa 10 % der Patienten war trotz Thienopyridin-Therapie die Thrombozytenaktivierung nur ungenügend gehemmt. Diese Zahl deckt sich auch mit der in der Literatur als Fallbeispiele beschriebenen Reinfarktquote nach Stent-Implantation im akuten, koronaren Syndrom (27;28).

In den hier erhobenen Untersuchungen wurde die um das Jahr 2000 gültige Empfehlung der Erstgabe von 300 mg *Loadingdose* (14) eingehalten. Bei den Patienten mit bereits länger andauernder Therapie („2. Werte“) kann von einem effektiven Thienopyridin-Spiegel ausgegangen werden. In neueren Übersichtsarbeiten wurden nach Verdoppelung dieser Dosis auf 600 mg statistisch signifikant weniger negative Effekte, wie Reinfarkt oder Therapieversagen beschrieben (14). Als Ursache wird hier vor allem davon ausgegangen, dass die Umwandlung zum aktiven Metaboliten durch das Leberenzym Cytochrom P450 unterschiedlich stark ausgeprägt sein könnte (25). Auch die kompetitive Hemmung am gleichen Enzym durch eine Co-Medikation wie zum Beispiel Atorvastatin wird hier angeführt. Allerdings konnte hierfür im vorliegenden Patientenkollektiv kein statistischer Effekt zur vermehrten Clopidogrelresistenz in einer Co-Medikation, insbesondere nicht für Atorvastatin (insgesamt 28 Patienten), festgestellt werden. Auch in der

Literatur werden hierzu widersprüchliche Berichte veröffentlicht. So wurde in mehreren Studien ein deutlicher statistischer Zusammenhang nachgewiesen, in anderen Studien wiederum konnte dieser statistischer Unterschied zwischen Atorvastatin-Therapie und Versagen der Clopidogrel-Therapie nicht festgestellt werden (19, 29). Allerdings sollte eine kompetitive Beeinflussung am Leberenzym mit entsprechender therapeutischer Auswirkung im klinischen Kontext nicht ausser Betracht gelassen werden.

Die hier verwendete Methode des Nachweises der ADP-induzierten Thrombozytenaktivierung durch intrazelluläre Detektion des phosphorylierten VASP-Proteins wurde sicherlich auch aufgrund der relativ aufwendigen Untersuchungstechnik bislang eher selten angewandt. In der Literatur ist sie dennoch anerkannt (30), in mehreren Übersichtsarbeiten (4;17) wurde sie neben dem durchflußzytometrischen Nachweis des aktivierten ADP-Rezeptors P2Y₁₂ als beste, differenzierte Unterscheidung der unzureichenden Aktivierungshemmung durch Clopidogrel beschrieben (17). Vor allem aufgrund der leichten Anwendung, weiten Verbreitung und deutlicher Reduzierung der Untersuchungskosten wurde allerdings in den meisten Studien zur Resistenz gegen Clopidogrel die bereits oben angesprochene Lichtaggregationsmessung benutzt.

Wie oben angeführt ist der Zielrezeptor der Thienopyridine, der G_i-gekoppelte P2Y₁₂-Rezeptor in den Thrombozytenmembranen (30). Durch die irreversiblen Disulfid-Brücken von Ticlopidin- und Clopidogrelmetaboliten mit dem Rezeptor wird die Thrombozytenreaktion auf ADP verhindert (19;31). Genauso wird die durch Scherkräfte an den verletzten/strukturveränderten Gefäßwänden hervorgerufen Aktivierung der Thrombozyten nachweislich inhibiert (17). Der Effekt der irreversiblen Bindung verliert sich mit Ablauf der Lebensdauer der Thrombozyten (etwa 10 Tage).

Da die oben angeführten Faktoren insbesondere bei der Atherosklerose und anderen degenerativen Gefäßerkrankungen die Hauptauslöser der Thrombusbildung sind, ist eines der Hauptziele der pharmakologischen Forschungen weiterhin der P2Y₁₂ Rezeptor und damit auch die Thienopyridine (19;30). Ebenfalls interessant für die pharmakologische Nutzung bleibt die bei Thienopyridinen erhaltene generelle Fähigkeit einer Blutgerinnung, wenn auch mit verlängertem Zeitverlauf.

Um eine denkbare genetische Ursache dieser Clopidogrelresistenz am P2Y₁₂ ADP-Rezeptor nachzuweisen, wurde von 2 regelrecht reagierenden (Responder) und 2 nicht reagierenden Patienten (Non-Responder) in dieser Promotionsarbeit eine Gensequenzanalyse durchgeführt.

Der P2Y₁₂ Rezeptor wird mit seinen 7 transmembranösen Domänen hauptsächlich in Gehirnzellen und Thrombozyten exprimiert. Das Gen für den P2Y₁₂ Rezeptor wird durch zwei Exons (64 und 1269 Basenpaare) zusammen mit einem Intron (1735 Basenpaare) codiert (20, 32, 33). Die biologische Aktivität des aktivierten Clopidogrel-Metaboliten beruht sehr wahrscheinlich auf einer irreversiblen Disulfidbrücke zwischen einer reaktiven Thiol-Gruppe des Metaboliten und einem Zysteinrest auf dem Thrombozytenrezeptor (5;34). Der Rezeptor enthält insgesamt vier extrazelluläre Zysteinreste als mögliche Bindungsstellen. Ein Polymorphismus fand sich in unseren Untersuchungen im Exon 2 an der Position 1828, aber diese Mutation erwies sich als stumm (ohne Veränderung der Proteinsequenz). Ein molekularer Defekt des P2Y₁₂ ADP-Rezeptors mit einer verminderten Bindungsfähigkeit für den aktiven Clopidogrel-Metaboliten ließ sich daher bei unseren Patienten nicht finden. Eine veränderte Konzentration an P2Y₁₂ Rezeptor assoziierten G_i-Alpha Signalkettenprotein in der inadäquat auf Clopidogrel reagierenden Patientengruppe wurde durch die Durchführung einer quantitativen Western-Blot-Analyse ausgeschlossen. Der Proteingehalt sowohl für G_i-

Alpha-1,2 als auch für das ebenfalls relevante Signalmolekül VASP war in den verschiedenen Patientengruppen nicht verändert.

Seit der Erhebung der Daten in dieser Promotionsarbeit in den Jahren 2000 und 2001 wurde in verschiedenen Forschungsgruppen eine Variabilität der ADP-induzierten Thrombozyten- und Fibrinogenbindung nachgewiesen. (35, 36). Hierbei kristallisierte sich zunehmend die Erkenntnis, dass sich die empfohlene Initialdosis bzw. *Loadingdose* von 300 mg als klinisch nicht ausreichend zeitnah wirksam zeigte, insbesondere wenn sie unter 6 Stunden vor einer invasiven Gefäßkatheterisierung gegeben wurde (14;38).

Um einen exakten, quantitativen Nachweis der individuellen Clopidogrel-Wirkung zu führen, wurde in dieser Promotionsarbeit die Durchflußzytometrie genutzt. So wurde bereits im Vorfeld gezeigt, dass die ADP-induzierte Hemmung der durch Prostaglandin E₁ ausgelösten VASP Phosphorylierung mit einem Antikörper gegen Phospho-Ser-239-VASP nachgewiesen werden kann (2;17). Diese Nachweismethode zeigt sich der ADP-induzierten Thrombozytenaggregationsmessung und auch der durchflusszytometrischen Analyse thrombozytärer Oberflächenrezeptoren zumindest ebenbürtig, wenn nicht überlegen, da sie durch eine oft zeitgleich erfolgende Therapie mit Acetylsalicylsäure (37) oder durch eine ebenfalls zeitgleich mögliche Therapie mit GPIIb/IIIa Antagonisten (14;16) nicht beeinflusst wird. In einer anderen klinischen Studie wurde der Nachweis von phosphoryliertem VASP bereits erfolgreich dazu verwendet, um Wirkungsvariabilitäten von Thienopyridinen bei Patienten mit hohem Risiko für eine Koronarthrombose zu identifizieren (36, 37, 38, 40).

Dank der in dieser Arbeit erhobenen Daten und der immer wieder durch andere Forschergruppen bestätigten Ergebnisse ist von einer erheblichen Variabilität der Clopidogrelwirkung auszugehen. Teilweise kann man

hierdurch sogar eine komplette Resistenz gegen die gewünschte Hemmung der Thrombozytenaktivierung vermutet werden.

Erstmals konnte in dieser Dissertationsarbeit ein genetischer Defekt mit resultierender Strukturveränderung des P2Y₁₂ Rezeptor als Ursache für das reduzierte Ansprechen ausgeschlossen werden. Die kompetitive Hemmung des Leberenzym Cytochrom P450 1A durch andere Medikamente wie zum Beispiel HMG-CoA-Reduktasehemmer (Statine) und hierdurch Verhinderung der Aktivierung des Clopidogrel-Metaboliten, ist in mehreren Studien und Übersichtsarbeiten weder widerlegt noch nachgewiesen worden. Derartige Effekte konnten in der vorliegenden Arbeit ebenfalls nicht nachgewiesen werden. Über die intrazellulären Signalwege und ihre möglichen Variabilitäten sind erst einige wenige identifiziert worden, der von uns untersuchte intrazellulären Signalweg mittels Filament-assoziierten VASP zeigte keine Auffälligkeiten.

Bei der aktuell kritischen Bewertung der Medikamenten-freisetzen- Stents im Bereich der Kardiologie, (18, 41, 42) ist die Empfehlung der Nachbehandlung nach angiologischen Eingriffen erneut angepasst worden. Trotz der konstanten Meldungen der variablen Clopidogrelwirkung wurde erneut die Gabe von Clopidogrel in Kombination mit Acetylsalicylsäure für mindestens 6 Monate nach dem Gefäßeingriff empfohlen. Dies verdeutlicht die Aktualität der Ergebnisse dieser Doktorarbeit und auch die Notwendigkeit der immer wieder formulierten Forderung nach weiteren Forschungen auf diesem Gebiet.

6. Zusammenfassung

Zum Nachweis einer interindividuellen Variabilität bei der Therapie mit Clopidogrel wurden in dieser Promotionsarbeit Patienten mit ausreichender Therapiedauer auf eine verbleibende Aktivierbarkeit der Thrombozyten untersucht. Hierfür wurde eine auf Phosphorylierung des Proteins VASP basierender Assay, der mittlerweile auch kommerziell verfügbar ist, eingesetzt. Dieser auf einer durchflusszytometrischen Analyse beruhende Test zeigte bei 10 % der untersuchten Patienten eine Restaktivierbarkeit der Thrombozyten trotz ausreichender Thienopyridin-Einnahme. Die statistische Analyse erbrachte den Nachweis von zwei Untergruppen: Eine Untergruppe zeigte trotz Clopidogrel-Therapie eine fast normale Aktivierbarkeit der Thrombozyten („non-responder“), die andere zeigt eine teilweise Thrombozytenfunktionshemmung („low-responder“). In der statistischen Analyse wurde eine deutliche Signifikanz der Ergebnisse mittels Students-t-Test festgestellt.

Aus zufällig ausgewählten Proben der „non-responder“ und der adäquat reagierenden Patienten konnte eine Veränderung intrazellulärer Signalwege nicht nachgewiesen werden.

Nach Veröffentlichung der Gensequenz für den P2Y₁₂ Rezeptor erfolgte die entsprechende Genanalyse bei diesen Patienten. Es konnten 2 stumme Polymorphismen nachgewiesen werden, diese jedoch sowohl in der Gruppe der Responder als auch bei Low-/Non-Respondern.

Somit wurde in dieser Promotionsarbeit das mittlerweile von verschiedenen Arbeitsgruppen diskutierte, bei etwa 10 % der Patienten auftretende Therapieversagen von Thienopyridinen bestätigt. Eine Genveränderung oder Änderungen intrazellulärer Signalwege konnte als molekulare Ursache nicht gezeigt werden.

7. Literaturverzeichnis

- (1) Gaarder, A.; Jonson, J.; Laland, S.; Hellem, A.; Owren, P.A.; Adenosin diphosphate in red cells as a factor in the adhesiveness of human platelets. *Nature* (1961); 192: 531-532
- (2) Schwarz, A.; Geiger, J.; Walter, U.; Eigenthaler, M.; Flow cytometry analysis of intracellular VASP phosphorylation for the assesement of activating and inhibitory signal transduction pathways in human platelets definition and detection of ticlopidine/Clopidogrel effects. *Thrombosis and Haemostasis* (1999); 82(1): 1145-1152
- (3) Muller, I.; Bester I.; Schulz, C; Massberg, S.; Schoning, A.; Gawaz, M; Prevalance of Clopidogrel non-responder among patients with stable angina pectoris scheduled for elective coronary stent placement; *Thrombosis and Haemostasis* (2003); 89: 783-787
- (4) Mobley, J.E.; Bresee, S.J.; Wartham, D.C.; Craft, R.M.; Snider, C.C.; Carroll, R.C.; Frequency of nonresponse antiplatelet activity of Clopidogrel during pre-treatment for cardiac catherization; *American Journal of Cardiology* (2004); 94: 456-458
- (5) Savi; P.; Identification and biological activity of the active metabolite of Clopidogrel; *Thrombosis and Haemostasis* (2000); 84: 891-896;
- (6) Patrono, C.; Collier, B.; Fitzgerald, G.; Hirsh, J.; Roth, G.; Platelet-active drugs: the relationships among dose, effectiveness and side effects: the Sevnth ACCP Conference on Antithrombotic and Thrombolytic Therapy; *Chestjournal* (2004); 126 (3 suppl): 234S-264S
- (7) Hacke, W.; From CURE to MATCH: ADP-receptor antagonists as the treatment of choice for high-risk atherothrombotic patients; *Cerebrovascular Diseases* (2002); 13 Suppl 1: 22-26

- (8) Obergfell, A.; Strotmann, J.; Impaired platelet responses to Clopidogrel and ticlopidine in a patient with recurrent coronary stent stenosis; *Journal of Thrombosis and Haemostasis* (2004); 92[6]: 1446-1447
- (9) Savi, P.; Herbert, J.; Clopidogrel and ticlopidine: P2Y₁₂ adenosine diphosphate-receptor antagonists for the prevention of atherothrombosis; *Seminars of Thrombosis and Haemostasis* (2005); 31(2): 174-183
- (10) Lau, W.; Gurbel, P.; Watkins, P.; Neer, C.; Hopp, A.; Carville, D.; Guyer, K.; Tait, A.; Bates, E.; Contribution of hepatic cytochrome P450 3A4 metabolic activity to the phenomenon of Clopidogrel resistance; *Circulation* (2004); 109(2): 166-171
- (11) Savcic, M.; Hauert, J.; Bachmann, F.; Wyld, P.; Geudelin, B.; Cariou, R.; Clopidogrel loading dose regimens: kinetic profile of pharmacodynamic response in healthy subjects; *Seminars in Thrombosis and Haemostasis* (1999); 25(Suppl 2): 15-19
- (12) Von Beckerath, N.; Taubert, D.; Pagatsa-Murray, G., Schomig, E.; Kastrat, A.; Schomig, A.; Absorption, metabolization and antiplatelet effects of 300, 600 and 900 mg loading-doses of Clopidogrel: results of The ISAR-CHOICE (Intracoronary Stenting and Antithrombotic Regimen: Choose Between 3 High Doses for Immediate Clopidogrel Effect); *Circulation* (2005); 112: 2946-2950
- (13) Schroder, W.S.; Gandhi, P.J.; Ghabrial, L.; Possible mechanisms of drug-induced aspirin and Clopidogrel resistance; *Journal of Thrombosis and Thrombolysis* (2006); 22: 139-150
- (14) Seyfarth, H.; Kokschi, M.; Roethig, G.; Rother, T.; Neugebauer, A.; Klein, N.; Pfeiffer, D.; Effect of 300- and 450 mg Clopidogrel loading doses on membrane and soluble P-selectin in patients undergoing coronary stent implantation; *American Heart Journal* (2002); 143(8): 118-123
- (15) Suh, J.W.; Koo, B.K.; Zhang, S.Y.; Cho, J.V.; Park, K.W.; Jang, I.J.; Increased risk of atherothrombotic events associated with cytochrome P450 3A5 polymorphism in patients taking Clopidogrel; *CMAJ* (2006); 174: 1715-1722

- (16) Hulot, J.; Bura, A.; Villard, E.; Azizi, M.; Remonas, V., Jayonville, C.; et.al.; Cytochrome P450 2C19 loss-of-function polymorphism is a major determinant of Clopidogrel responsiveness in healthy subjects; *Blood* (2006); 108: 2244-2247
- (17) Aleil, B.; Ravanat, C.; Cazenave, J.; Rochoux, G.; Heitz, A.; Gache, C.; Flow cytometric analysis of intraplatelet VASP phosphorylation for the detection of clopidogrel resistance in patients with ischemic cardiovascular disease; *Journal of Thrombosis and Haemostasis* (2005); 3(8): 85-92;
- (18) Morel, O., Favre, A; Ohlmann, P; Jesel, L.; Desprez, D; Grunebaum, L.; Bareiss, S.P.; Impaired platelet responsiveness to Clopidogrel identified by flow cytometric vasodilator stimulated phosphoprotein (VASP) phosphorylation in patients with subacute stent thrombosis; *Thrombosis and Haemostasis* (2007); 98: 896-899;
- (19) Cattaneo, M.; Platelet P2 receptors: old and new targets for antithrombotic drugs; *Expert Review of Cardiovascular Therapy* (2007); 5(1): 45-55;
- (20) Hollopeter, G.; Jantzen, H.; Vincen, D.; Li, G; England, L.; Ramakrishanan, V.; Yang, R.; Nurden, P.; Nurden, A.; Julius, D.; Conley, P.; Identification of the platelet ADP receptor targeted by antithrombotic drugs; *Nature* (2001); 409(6817): 202-207;
- (21) Metha, S.R.; Yusuf, F.; Peters, R.J.; Bertrand, M.E.; Lewis, B.S.; Natavajan, M.R.; Clopidogrel in Unstable angina to prevent Recurrent Events trial (CURE) investigators: Effects of pretreatment with Clopidogrel and aspirin followed by long term therapy in patients undergoing percutaneous coronary intervention: the PCI-CURE study; *Lancet* (2007); 358(9281): 527-533;
- (22) Gurbel, P.A.; Bliden, K.P.; Hiatt, B.L.; O'Connor, C.M.; Clopidogrel for Coronary Stenting/Response Variability, Drug Resistance and the Effect of Pretreatment Platelet Reactivity; *Circulation* (2003); 107: 2908-13;
- (23) Gurbel, P.A.; Samura, W.M.; Bliden, K.P.; Failure of Clopidogrel to reduce platelet reactivity and activation following standard dosing in elective

- stenting: Implications for thrombotic events and resistances; Platelets (2004); 15: 95-99;
- (24) Wiviott, S.D.; Antmon, E.M.; Clopidogrel resistance: a new chapter in a fast moving story; Circulation (2004); 109: 3064-3067;
- (25) Pappas, J.M.; Westengand, J.C.; Bull, B.S.; Population variability in the effect of aspirin on platelet function: Implications for clinical trials and therapy; Archives of Pathology and Laboratory Medicine (1994); 118(10): 801-804;
- (26) Helgason, C.M.; Development of aspirin resistance in persons with previous ischemic stroke; Stroke (1994); 25(14): 2331-2336;
- (27) Gurbel, P.A.; Bliden, K.P.; Samara, W.; Clopidogrel effect on platelet REactivity in patients with Stent Thrombosis: results of the CREST Study; Journal of American College of Cardiology (2005); 46: 1827-1832;
- (28) Mueller, I; Besta, F.; Schulz, C.; Massberg, S.; Schoenig, A.; Gawaz, M.; Prevalance of Clopidogrel non-responders among patients with stable angina pectoris scheduled for elective coronary stent placement; Journal of Thrombosis and Haemostasis (2003); 89(7): 783-787;
- (29) Wenaweser, P.; Windecker; S.; Billinger, M.; Cook, S.; Togni, M.; Meier, B.; Haerberli, A.; Hess, O.M.; Effect of Atorvastatin and Pravastatin on Platelet Inhibition by Aspirin and Clopidogrel Treatment in Patients With Coronary Stent Thrombosis; American Journal of Cardiology (2007); 99: 353-356;
- (30) Gurbel, P.A.; Tantry, U.S.; Review Article: Clopidogrel resistance?; Thrombosis research (2006) 10(1016); 1-11;
- (31) Lau, W.C.; Gurbel, P.A.; Expert Review: Antiplatelet Drug Resistance and Drug-Drug Interactions: Role of Cytochrome P450 3A4;
- (32) Zhang, F.; ADP is the cognate ligand for the orphan G protein coupled receptor SP1999; Journal of Biology and Chemistry (2001); 276; 8608-8615;
- (33) Foster, C.; Prosser, D.; Agans, J.; Zhai, Y.; Smith, M.; Lachowicz, J.; Zhang, F.; Gustafson, E.; Monsma, F.; Wickowski, M.; Abbondanzo, S.;

- Cook, D.; Bayne, M.; Lira, S.; Chintala, M.; Molecular identification and characterization of the platelet ADP receptor targeted by thienopyridine antithrombotic drugs; *Journal of Clinical Investigations* (2001); 107(10): 1503-1505;
- (34) Savi, P.; Herbert, J.; Clopidogrel and ticlopidine: P2Y₁₂ adenosine diphosphate-receptor antagonists for the prevention of atherothrombosis; *Seminars in Thrombosis and Haemostasis* (2005); 31(2): 174-183;
- (35) Tantry, U.; Bliden, K.; Gurbel, P.; Resistance to antiplatelet drugs: current status and future research; *Expert Opinion on Pharmacotherapy* (2005); 6(10): 2027-2045;
- (36) Wenaweser, P.; Dorffler-Melly, J.; Imboden, K.; Windecker, S.; Togni, M.; Meier, B.; Haerberli, A.; Hess, O.; Stent thrombosis is associated with an impaired response to antiplatelet therapy; *Journal of the American College of Cardiology* (2005); 45(11): 1748-1753;
- (37) Hacke, W.; From CURE to MATCH: ADP receptor antagonists as the treatment of choice for high-risk atherothrombotic patients; *Cerebrovascular Disease* (2002); 13(Suppl 1): 22-26;
- (38) Angiolillo, D.J.; Fernandez-Ortiz, A.; Bernardo, E., et al; Identification of low responder to a 300 mg Clopidogrel loading dose in patients undergoing coronary stenting; *Thrombosis research* (2004); 115(1-2): 101-108;
- (39) McKee, S.A.; Sane, D.C.; Deliargyris, E.N.; Aspirin resistance in cardiovascular disease: a review of prevalence, mechanisms and clinical significance; *Journal of Thrombosis and Haemostasis* (2002); 88: 711-715;
- (40) Frere, C.; Cuisset, T.; Quilic, J.; Camoin, L.; Carvajal, J.; Morange, P.E.; Lambert, M.; Juhan-Vague, I.; Bonnet, J.L.; Alessi, M.C.; ADP-induced platelet aggregation and platelet reactivity index VASP are good predictive markers for clinical outcomes in non-ST elevation acute coronary syndrome; *Thrombosis and Haemostasis* (2007); 98: 838-843;
- (41) Gurbel, P.A.; DiChiara, J.; Tantry, U.S.; Antiplatelet therapy after implantation of drug-eluting stents: duration, resistance, alternatives and

- management of surgical patients; *American Journal of Cardiology* (2007), 100(8B): 18M-25M;
- (42) Buonamici, P.; Marcucci, R.; Migliorini, A.; Gensini, G.F.; Santini, A.; Paniccia, R.; Moschi, G.; Gori, A.M.; Abbate, R., Anoniucci, D.; Impact of platelet reactivity after Clopidogrel administration on drug-eluting stent thrombosis; *Journal of American College of Cardiology* (2007); 49(22): 2318-2319;
- (43) Geiger, J.; Brich, J.; Honig-Liedl, P.; Eigenthaler, M.; Schanzenbacher, P.; Herbert, J.; Walter, U.; Specific impairment of human platelet P2A(AC) ADP receptor-mediated signalling by the antiplatelet drug Clopidogrel; *Atherosclerotic, Thrombosis and Vascular Biology* (1999); 19(9): 2007-2011;
- (44) Barragan, P.; Bouvier, JL; Roquebert, PO, Macaluso, G; Commeau, P; Comet B; Lafont, A; Camoin, L; Walter, U.; Eigenthaler, M; Resistance to thienopyridines clinical detection of coronary stent thrombosis by monitoring of vasodilator-stimulated phosphoprotein phosphorylation; *Catheter Cardiovascular Intervention* (2003); 59(3): 295-302;
- (45) Grossmann, R; Sokolova, O; Schnurr, A; Bonz, A; Porsche, C; Obergfell, A; Lengenfelder, B; Walter, U; Eigenthaler, M; Variable extent of clopidogrel responsiveness in patients after coronary stenting; *Thrombosis and Haemostasis* (2004), 92(6): 1201-6;

Danksagung

Der erste besondere Dank geht an meine beiden Betreuer der Doktorarbeit, Professor Dr. med. Martin Eigenthaler und Privatdozent Dr. med. Ralf Grossmann für ihre kontinuierliche Unterstützung und Beiträge zum Gelingen des praktischen Anteils dieser Arbeit. Mein spezieller Dank gilt hier auch Prof. Dr. Ulrich Walter, der diese Doktorarbeit in seinem Institut ins Leben gerufen hat. Für die mehr als tatkräftige Unterstützung bei der praktischen Ausarbeitung des weiterführenden Anteils dieser Promotionsarbeit gilt ein grosser Dank Dr. rer. nat. Anna Kobsar und Dr. rer. nat. Olga Sokolova. Ein spezieller Dank an die Zulieferer aus der TOPSTAR-Studie, Dr. med. Andreas Bonz und Dr. med. Björn Lengfelder, ohne deren kontinuierliche Mitarbeit die Datenerhebung fast unmöglich gewesen wäre. An das Team des Zentrallabors der Uniklinik Würzburg ebenfalls ein besonderes Dankeschön für das freundliche Miteinander in den einzelnen Laboratorien. Ein Dank auch das Team der Zentralbibliothek der HELIOS Kliniken Berlin-Buch, die nach unzähligen Literaturanfragen ohne Schwierigkeiten immer mit dem entsprechenden Artikel aufwarten konnten.

An meine Schwester Dr. rer. nat. Beate Schnurr für das glänzende Beispiel einer naturwissenschaftlichen Promotion und Korrektur der ersten Version dieser Promotionsarbeit, sowie an meine Eltern, die unermüdlich an mich und das Endziel meiner medizinischen Promotion geglaubt haben.

Und ein sehr spezieller Dank an Dr. med. Franziska Schnurr, die besondere Frau an meiner Seite, deren Beispiel und unermüdliche Unterstützung diese Doktorarbeit überhaupt erst möglich gemacht hat. Als letztes danke ich meiner kleinen Tochter Lilian, da sie einfach alles verändert.

Axel Rolf Schnurr geb. 16.06.1976, in Detmold

Familie:

Ehefrau Dr. med. Franziska Schnurr
Tochter Lilian Franziska Schnurr

Schulbildung:

Abitur 1996 Bismarck-Gymnasium Karlsruhe
Note 2.0

Schüleraustausch Malvern Collegiate Institute Toronto, Canada
August bis November 1992

Studium:

1997 bis 2003 Julius-Maximilians-Universität Würzburg

1999 Physikum
2000 Erstes Staatsexamen
2002 Zweites Staatsexamen
2003 Drittes Staatsexamen
Gesamtnote: - gut -

Famulaturen:

1999

- Medizinische Klinik der Missionsärztlichen Klinik Würzburg

- 2001
 - Klinik für Allgemein- und Viszeralchirurgie
Unfallkrankenhaus Berlin-Marzahn
 - Radiologische Praxis Dr. Harth, Eisenach
 - 2002
 - Department for Anesthesiology
US-Army Hospital (USAMEDDAC) Würzburg
-

- Praktisches Jahr:**
2002-2003
- Klinik für Neurochirurgie der Universität
Würzburg
 - Unfallchirurgische Klinik der Universität
Würzburg
 - Colorectal Surgical Firm, NHS Good Hope
Hospital Sutton Coldfield, University of
Birmingham, United Kingdom
 - Medizinische Poliklinik der Universität
Würzburg
-

- Beruf:**
- Arzt im Praktikum &
Basisausbildung
(common trunk)
 - März 2004 bis Januar 2007
Klinik für Allgemein- und Viszeralchirurgie,
HELIOS Klinikum Erfurt GmbH
 - Assistenzarzt in
Weiterbildung zum
Facharzt für
Orthopädie und
Unfallchirurgie
 - Februar 2007 bis Dezember 2008
Klinik für Unfallchirurgie, HELIOS Kreis-
krankenhaus Gotha/Ohrdruf GmbH
 - Seit Januar 2009
Klinik für Orthopädie, St. Vincentius-Kliniken
gAG Karlsruhe

