

**Aus der Medizinischen Universitätsklinik Tübingen
Abteilung Innere Medizin III**

Ärztlicher Direktor: Professor Dr.Gawaz

**Klinische Bedeutung der Clopidogrel - Resistenz bei
Patienten mit koronarer Stentimplantation**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Magdalena Marta Wydymus**

**aus
Katowice-Polen**

2008

Dekan: Professor Dr. I.B. Autenrieth

- 1. Berichterstatter: Professor Dr. M. Gawaz**
- 2. Berichterstatter: Professor Dr. M. Schwarz**

Teile der vorliegenden Arbeit wurden veröffentlicht:

1. Geisler T., Wydymus M., Zürn Ch., Kapp M., Göhring K., Gawaz M.
„Ansprechen auf eine antithrombozytäre Therapie mit Clopidogrel ist vermindert bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom.“
Perfusion 02/2006
2. Zürn Ch., Wydymus M., Geisler T., Kapp M., Göhring K., Gawaz M.
„Die antithrombozytäre Wirksamkeit von Clopidogrel bei Patienten nach Stentimplantation wird von Statinen nicht beeinflusst.“
Perfusion 02/2006
3. Geisler T., Wydymus M., Göhring K., Langer H., May A., Gawaz M.
„Vermindertes Ansprechen auf Clopidogrel ist ein Prädiktor für kardiovaskuläre Ereignisse bei Patienten mit koronarer Stentimplantation.“
112. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin Wiesbaden
April 2006
4. Geisler T., Langer H., Wydymus M., Zürn Ch., Göhring K., May A., Gawaz M.
“Low response to Clopidogrel is Associated with Cardiovascular Outcome after Coronary Stent Implantation.”
Eur Heart J. 2006 Oct;27(20):2420-5.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	7
1.1. Koronare Herzerkrankung.....	7
1.2. Physiologie der Thrombozyten.....	8
1.2.1. Adhäsion und Aktivierung der Thrombozyten.....	9
1.2.2. Aggregation.....	10
1.3. ADP Rezeptoren.....	11
1.3.1. ADP-Rezeptor P2X ₁	11
1.3.2. ADP-Rezeptor P2Y.....	11
1.4. Thrombozyten und Pathophysiologie der koronaren Herzerkrankung	14
1.5. Antithrombozytäre Substanzen.....	16
1.5.1. Cyclooxygenase-Hemmer z. B. Acetylsalicylsäure (ASS).....	16
1.5.2. Fibrinogenrezeptorantagonisten (GP IIb-IIIa Rezeptor-Blocker)....	17
1.5.3. Thienopyridine.....	18
1.6. Clopidogrel Resistenz.....	21
1.7. Fragestellung.....	23
2. Material und Methodik	23
2.1. Material.....	23
2.1.1. Patientenkollektiv.....	23
2.1.2. Studienprotokoll.....	24
2.1.3. Geräte und Verbrauchsmaterial.....	25
2.1.4. Reagenzien.....	26
2.2. Methodik.....	26
2.2.1. Blutprobenvorbereitung.....	26
2.2.2. Aggregometrie.....	27
2.2.3. Kurvenanalyse.....	28
2.2.4. Aggregationskurve.....	29
2.2.5. Statistische Auswertung.....	31
3. Ergebnisse	32
3.1. Nachbeobachtungsstudie.....	32
3.2. Inzidenz kardiovaskulärer Ereignisse.....	34
3.3. „Clopidogrel low-response“ und klinische Prognosen.....	35

4. Diskussion	39
5. Zusammenfassung.....	43
6. Curriculum vitae	44
7. Danksagung.....	45
8. Abbildungsverzeichnis	46
9. Tabellenverzeichnis	46
10. Literaturverzeichnis	47

Abkürzungen

AC	Adenylatcyclase
ACS	Akutes Koronarsyndrom
ADP	Adenosindiphosphat
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CURE	Clopidogrel in Unstable angina to prevent Recurrent Events
CYP 3A	Cytochrom P450 3A4
GDP	Guanosin-5'-diphosphat
GP IIb-IIIa	Glykoprotein IIb-IIIa
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
IP3	Inosintrisphosphat
KHK	Koronare Herz Krankheit
NSTEMI	Nicht-ST-Strecken-Elevations-Myocardinfarkt
PKA	Protein Kinase Activation (aktivierte Proteinkinase)
PLC	Phospholipase C
PPP	Platelets Poor Plasma (Plättchenarmes Plasma)
PROCAM	Prospective Cardiovascular Münster
PRP	Platelets Rich Plasma (Plättchenreiches Plasma)
PTCA	perkutane transluminale Coronarangioplastie
SAP	Stabile Angina Pectoris
STEMI	ST-Strecken-Elevations-Myocardinfarkt
VASP	Vasodilator-Stimulated Phosphoprotein

1. Einleitung

1.1. Koronare Herzerkrankung

Kardiovaskuläre Erkrankungen stehen an erster Stelle der Todesursachenstatistik in der Bundesrepublik Deutschland und anderen Industrieländern. Die Lebenszeitprävalenz beträgt dabei in Deutschland für Männer 30% und für Frauen 15% (m : w = 2:1).¹ Die jährliche Sterblichkeitsrate der koronaren Herzerkrankung liegt bei 5-8%.

Die koronare Herzerkrankung (KHK) ist die Manifestation der Atherosklerose an den Herzkranzarterien. Die Myokardischämie ist als Ungleichgewicht zwischen Sauerstoffangebot und Sauerstoffbedarf des Herzens definiert. Eine Reihe von epidemiologischen Untersuchungen, vor allem die amerikanische Framingham und die deutsche PROCAM – Studie lieferten Hinweise auf epidemiologische Risikofaktoren der KHK.² Die wichtigsten sind: Hypercholesterinämie, arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus und Zigarettenkonsum. Hinzu kommen unbeeinflussbare Faktoren wie Lebensalter, Geschlecht und familiäre Belastung. (Die perkutane Behandlung von Stenosen der Herzkranzgefäße wird derzeit bei etwa 80% der Interventionen mit der Implantation eines oder mehrerer Stents durchgeführt.)

Die Methode der Wahl zur Versorgung von höhergradigen Koronarstenosen bei Patienten mit stabiler und instabiler Angina pectoris sowie akuten thrombotischen Koronarverschlüssen bei Patienten mit Myokardinfarkt ist die perkutane transluminale Koronarangioplastie mit anschließender Implantation eines Stents.

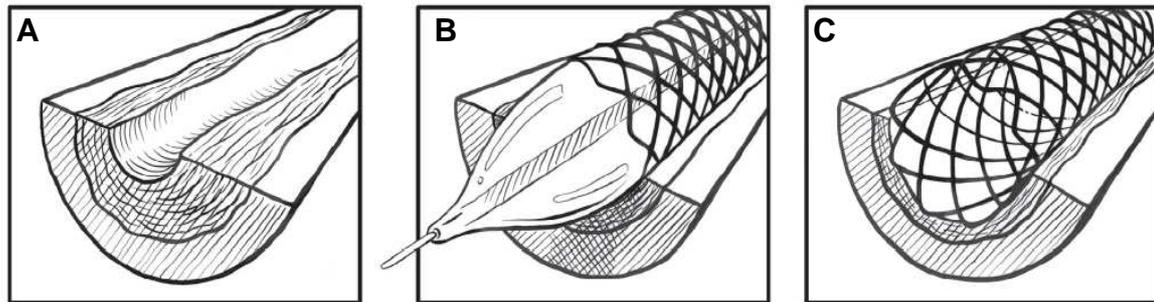


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Stentimplantation

(American Heart Association 2005)

- A: verengte Koronararterie mit atherosklerotischen Wandveränderungen
- B: Ballon mit Stent
- C: Stentimplantation mit Erweiterung des Gefäßdurchmessers

Thrombozyten spielen eine wichtige Rolle bei thromboischämischen Komplikationen nach einer Stentimplantation.³ Eine Subpopulation von Patienten, bei denen eine perkutane transluminale Koronarangioplastie durchgeführt wurde, zeigt eine erhöhte residuelle Thrombozytenaktivität trotz dualer antithrombozytärer Therapie und ist daher gefährdet eine subakute Stentthrombose zu entwickeln.^{4,5,6}

1.2. Physiologie der Thrombozyten

Thrombozyten sind anukleäre, korpuskuläre Blutbestandteile und werden im Knochenmark aus Megakaryozyten gebildet. Mit einer physiologischen Anzahl von 150.000 bis 300.000 / μ l Blut zirkulieren sie für neun bis zehn Tage im peripheren Blut.⁷ Als kleinste korpuskuläre Blutbestandteile weisen die Blutplättchen im nicht aktivierten Zustand eine diskoide Form mit einem Durchmesser von 2-4 μ m und einer Dicke von 0,75 μ m auf. Dabei beträgt die durchschnittliche Überlebenszeit im peripheren Blut etwa sieben Tage. Der Abbau der Plättchen erfolgt im retikuloendothelialen System der Leber und Milz.

Im intakten Gefäßsystem zirkulieren die Thrombozyten frei im Blut. Bei einer Verletzung der Gefäßinnenwand kommt es zu einer Freilegung von prothrombotischem Gewebe sowie zur Freisetzung von Plättchenagonisten,

was zu einer Aktivierung und Adhäsion von Thrombozyten an der Stelle der Verletzung führt. Die Folgen sind eine Formveränderung der Zellen („shape change“), die Sekretion von Plättchenaktivatoren aus den Granula und das Vernetzen von Thrombozyten miteinander, die sogenannte Aggregation. Dieser Prozess wird als primäre Hämostase bezeichnet, makroskopisch entsteht ein weißer Thrombus. Parallel dazu kommt es zu einer Aktivierung der Gerinnungskaskade. Dadurch werden Fibrinfibrillen gebildet, die sich an den Thrombus anlagern und diesen stabilisieren.

Das Ergebnis dieser sekundären Hämostase ist ein durch Miteinlagerung von Erythrozyten entstandener roter Thrombus.

1.2.1. Adhäsion und Aktivierung der Thrombozyten

Der Zusammenlagerung von Thrombozyten zu einem abdichtenden Thrombus geht die Adhäsion voraus. Man unterscheidet die primäre und die sekundäre Adhäsion. Bei einer Beschädigung der Gefäßinnenwand wird das darunter liegende Subendothel mit seinen Strukturen sowie Adhäsionsproteinen z.B. Kollagen und von-Willebrand-Faktor freigelegt.⁸ Der Thrombozyt hat auf seiner Oberfläche die spezifischen Rezeptoren, die einen Kontakt mit diesen Proteinen ermöglichen. Das macht die erste Bindung des Blutplättchens an die Gefäßwand möglich. Sie wird primäre Adhäsion genannt, wenn sich der Thrombozyt dabei in ruhigem Zustand befindet und sekundäre Adhäsion, wenn er bereits aktiviert ist.^{9,10}

Der Adhäsionsprozess führt zur Aktivierung des Thrombozyten.

- Durch Formveränderung vergrößern Thrombozyten ihre Oberfläche von 8 auf 13 μm^2 .
- Thrombozyten bilden Pseudopodien aus, um eine effektive Abdichtung der Gefäßwandläsion zu erzielen.
- Degranulationsphase – die Thrombozyten sezernieren ihre Inhaltsstoffe.

Die Formveränderung des Thrombozyten ist abhängig von Calciumionen.



Abbildung 2: Elektronenmikroskopische Aufnahme von Thrombozyten

Elektronenmikroskopische Aufnahme von Thrombozyten: links diskoider Thrombozyt im Ruhezustand, rechts aktivierte Thrombozyten mit Ausstülpungen der Plasmamembran (Pseudopodien).

Die Aktivierung von Thrombozyten ist daher ein kritischer Vorgang. Die lebenswichtige, physiologische Funktion der Plättchen kann unter pathophysiologischen Bedingungen lebensbedrohliche Folgen haben. Ziel der medikamentösen Therapie vaskulärer Erkrankungen ist es deshalb, das Gleichgewicht aus Plättchenhemmung und Plättchenaktivierung so zu verschieben, dass auf der einen Seite der Gefäßverschluss verhindert wird, auf der anderen Seite aber die Blutstillung aufrecht erhalten bleibt.

1.2.2. Aggregation

Die der Gefäßläsion anhaftenden Thrombozyten werden über Fibrinogenbrücken verbunden, diesen Prozess nennt man primäre Aggregation. Die sekundäre Aggregation findet statt, wenn das Fibrinogen zu Fibrin gespalten wird und die Inhaltsstoffe freigesetzt werden. Dieser Prozess ist irreversibel.¹¹

Eine Vielzahl von Substanzen kann zur Thrombozytenaktivierung führen und intrazelluläre Reaktionen auslösen. Teils werden diese Substanzen vom Thrombozyten selbst synthetisiert, teils vom umgebenden Gewebe oder Plasma bereitgestellt. Eine zentrale Rolle spielt die Sekretion von Adenosindiphosphat (ADP). Der Plättchenaktivator ADP wird von aktivierten Plättchen freigesetzt und induziert die Adhäsion, die weitere Aktivierung und die Aggregation von

Thrombozyten. Er wird ebenso vom geschädigten Gefäßwandgewebe wie auch von Endothelzellen und Erythrozyten freigesetzt.

1.3. ADP Rezeptoren

1.3.1. ADP-Rezeptor P2X₁

Der P2X₁-Rezeptor wurde erstmal 1994 beschrieben.¹² Er ist ein Liganden - gesteuerter Kationenkanal, der zum sofortigen Einstrom von Kalzium aus dem Extrazellulärraum führt. Die genomische Sequenz ist beim Menschen auf Chromosom 17 lokalisiert.¹³

P2X₁-Rezeptoren scheinen für die thrombozytäre Aggregation nicht wesentlich verantwortlich zu sein, denn diese funktioniert auch, wenn sich der Rezeptor im Refraktärzustand befindet. P2X₁ Rezeptoren stellen keinen Angriffspunkt für die Substanzklasse der Thienopyridine dar. Dies könnte eine Ursache dafür sein, dass trotz Behandlung mit Ticlopidin oder Clopidogrel ein intrazellulärer Kalziumanstieg sowie eine Formveränderung der Plättchen zu beobachten ist.¹⁴

1.3.2. ADP-Rezeptor P2Y

P2Y-Rezeptoren bestehen aus sieben transmembranösen Domänen, die an G-Proteine gekoppelt die ADP-induzierte Aktivierung amplifizieren. Im Ruhezustand ist ein G-Protein auf der Zellinnenseite mit einem Guanin - Dinukleotid verbunden. Die extrazelluläre Bindung von ADP an den Rezeptor bewirkt, dass im Zellinneren GDP durch GTP ersetzt wird. Es erfolgt eine Konformationsänderung des G-Proteins, worauf sich dessen aktive α -Untereinheit abspaltet und im Zellinneren über ein Signalmolekül („second messenger“, z. B. IP₃, cAMP) die Wirkung weiterleitet. Gleichzeitig wird das gebundene GTP zu GDP hydrolysiert und das G-Protein wieder inaktiviert. Nach den verschiedenen Signalmolekülen werden die G-Proteine sowie die P2Y-Rezeptoren klassifiziert.¹⁵

P2Y₁

Der P2Y₁-Rezeptor wurde erstmals 1993 im Huhn beschrieben, die humane Sequenz wurde 1996 publiziert. Im Menschen ist die genomische Sequenz auf Chromosom 3 lokalisiert.¹⁶ Der P2Y₁ besteht aus 373 Aminosäureresten und hat die klassische Struktur eines 7-Transmembran-Domänen G-Protein-gekoppelten Rezeptors.

P2Y₁₂

Der P2Y₁₂-Rezeptor wurde erstmals im Jahre 2000 auf molekularer Ebene beschrieben. Im Menschen ist die genomische Sequenz ebenfalls auf Chromosom 3 lokalisiert. Der P2Y₁₂ besteht aus 342 Aminosäureresten und hat ebenfalls die klassische Struktur eines 7-Transmembran-Domänen G-Protein-gekoppelten Rezeptors. Er wird nur auf Thrombozyten und in einigen Subregionen des Gehirns exprimiert.¹⁷

Eine vollständige ADP-induzierte Plättchenaggregation erfordert die Koaktivierung der Rezeptoren P2Y₁ und P2Y₁₂.

ADP löst durch Bindung an die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren P2Y₁ und P2Y₁₂ über einen „second messenger“ die Erhöhung der intrazellulären Konzentration an Kalziumionen und damit die Formveränderung und Aggregation des Thrombozyten aus. Die ADP-Wirkung am P2Y₁₂ wird unter Einfluss von Thienopyridinen blockiert.

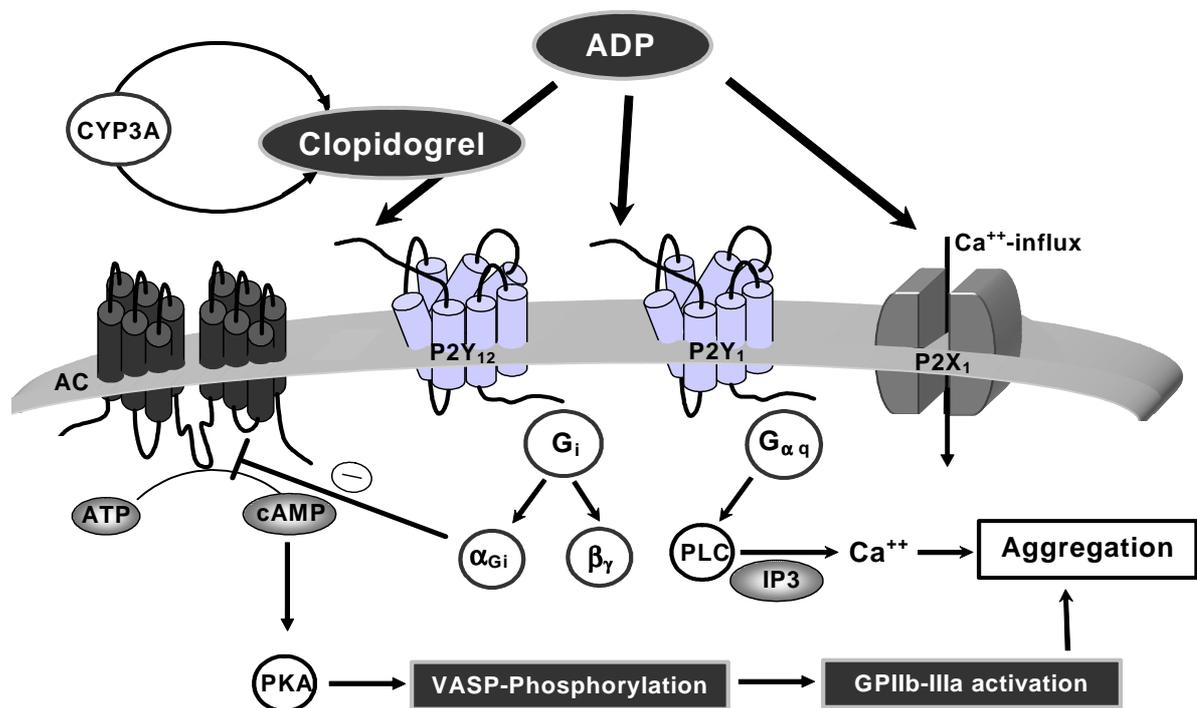


Abbildung 3: ADP Rezeptoren auf der Thrombozyten Oberfläche

(Quelle : Geisler T, Gawaz M Clopidogrel resistance *JLM* 2006;30:310-316.)

Abkürzungen:

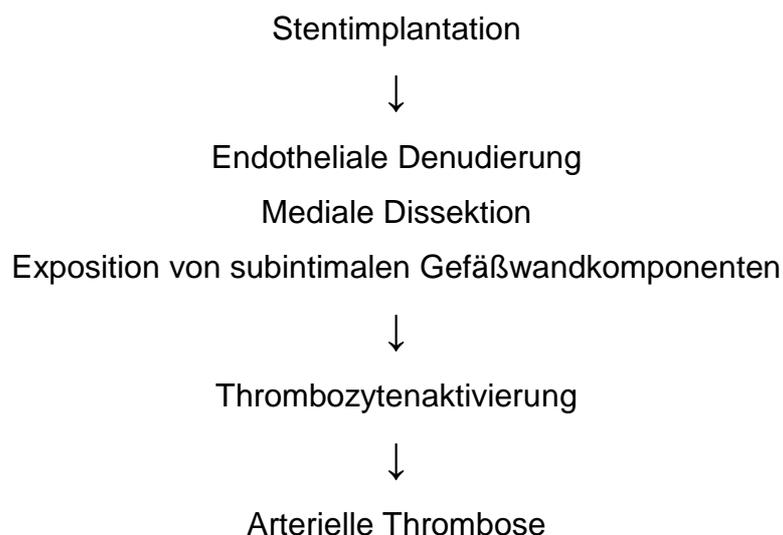
AC:	Adenylatcyclase
ADP:	Adenosindiphosphat
cAMP:	zyklisches Adenosinmonophosphat
CYP3A:	Cytochrom P450 3A4
GPIIb-IIIa:	Glykoprotein-IIb-IIIa
IP3:	Inosintrisphosphat
PKA:	Protein Kinase Activation (aktivierte Proteinkinase)
PLC:	Phospholipase C
VASP:	Vasodilator-Stimulated Phosphoprotein

1.4. Thrombozyten und Pathophysiologie der koronaren Herzerkrankung

Durch die klassischen Risikofaktoren Bluthochdruck, Diabetes, Hypercholesterinämie sowie Tabakkonsum kann es zur Ausbildung von Atherosklerose kommen. Die dadurch hervorgerufenen Veränderungen der Gefäßinnenwand bringen die normalerweise streng regulierte Balance von aktivierenden und hemmenden Einflüssen auf die im Blutfluss zirkulierenden Thrombozyten außer Kontrolle. Aktivierende Einflüsse gewinnen die Oberhand, eine unkontrollierte Thrombozytenaggregation kann die Folge sein.

Ähnlich dem physiologischen Vorgang der Aggregationseinleitung durch eine Freilegung von prothrombotischem Gewebe nach einer akuten Verletzung, können Thrombozyten auch auf rupturierten atherosklerotischen Plaques und in Regionen veränderten Blutflusses aktiviert werden, was zur Exazerbation der bestehenden Läsionen führt. Die Folge können Herzinfarkt, peripherer Gefäßverschluss oder ischämischer Schlaganfall sein.

Koronarinterventionen wie PTCA und die Implantation eines koronaren Stents führen ebenso zu einer Thrombozytenaktivierung.



Die Implantation eines Stents führt zur Interaktion zwischen Blutkomponenten und thrombogener Oberfläche des Stents, was zur Aktivierung von Thrombozyten und zur arteriellen Thrombose führen kann.

1.5. Antithrombozytäre Substanzen

Die Hemmung der Thrombozytenfunktion ist ein zentraler pharmakologischer Ansatzpunkt in der Behandlung der Arteriosklerose und zur Prophylaxe arterieller Thrombosen nach Stentimplantation.

Es gibt verschiedene Substanzklassen, die die Thrombozytenfunktion durch unterschiedliche Mechanismen beeinflussen können. Die Substanzen blockieren unterschiedliche intrazelluläre Aktivierungsschritte oder greifen direkt im Bereich der Thrombozytenoberfläche ein und haben dadurch eine Hemmwirkung.

Pharmakologische Klassifizierung antithrombozytärer Substanzen:

1.5.1. Cyclooxygenase-Hemmer z. B. Acetylsalicylsäure (ASS)

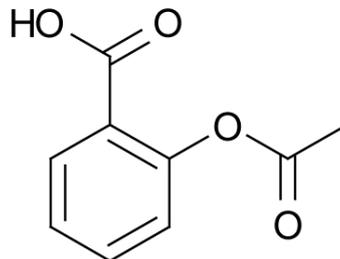


Abbildung 4: Chemische Struktur der Acetylsalicylsäure

Wurde erstmals in 1887 synthetisiert. 1954 wurde ihre Wirkung auf die Thrombozyten beschrieben und 1971 der inhibitorische Effekt auf die Thromboxan-Synthese erkannt.

Durch irreversible Acetylierung der thrombozytären Cyclooxygenase hemmt Acetylsalicylsäure die Bildung von Thromboxan A₂. Die antithrombotische Wirksamkeit bei kardiovaskulären Erkrankungen wurde in einer Vielzahl klinischer Studien belegt. Eine „niedrig dosierte“ Therapie mit ASS (100mg/d) hat sich als Standard in der Behandlung und Prophylaxe der koronaren Herzerkrankung durchgesetzt.¹⁸

1.5.2. Fibrinogenrezeptorantagonisten (GP IIb-IIIa Rezeptor-Blocker)

Glykoprotein IIb-IIIa Rezeptor-Blocker sind die bisher wirksamsten thrombozytenhemmenden Substanzen.

Die Fibrinogenrezeptorantagonisten blockieren die Thrombozyten-Fibrinogen-Vernetzung, indem sie den Fibrinogenrezeptor auf der Thrombozytenoberfläche irreversibel blockieren.

Die GPIIb-IIIa - Rezeptoren führen zu Entstehung eines festen Gerinnsels als Endstufe der Blutgerinnung unabhängig davon, welche Faktoren initial zur Thrombozytenaktivierung geführt haben.

Die GPIIb-IIIa Antagonisten verhindern die gemeinsame Endstrecke aller Reaktionswege, die eine Thrombozytenaggregation hervorrufen würden und hemmen die Thrombozytenaggregation sehr wirkungsvoll.¹⁹

Es gibt drei Gruppen von GP IIb-IIIa Rezeptor-Blockern:

1. Monoklonale Antikörper (Fab von c7E3): Abciximab (ReoPro®)
2. Niedermolekulare Peptide: Eptifibatid (Integrilin®)
3. Peptidomimetika (Fibane):
parenterale: Tirofiban (Aggrastat®), Lamifiban, Fradafiban
orale: Sibrafiban, Lefradafiban, Xemilofiban

Abciximab, Tirofiban und Eptifibatid sind in Deutschland zugelassen.

Abciximab ist ein monoklonaler Antikörper, der mit hoher Affinität an GPIIb-IIIa Rezeptoren bindet. Die Substanz wird bei Koronarinterventionen als Infusion eingesetzt. Häufigste Komplikationen sind Blutungen und immunologische Reaktionen.

Tirofiban und Eptifibatid sind Peptide mit hoher Spezifität und niedriger Affinität zu GP IIb-IIIa Rezeptoren.

1.5.3. Thienopyridine

Experimentelle und klinische Studien belegen die Bedeutung der ADP-induzierten Thrombozytenaktivierung, besonders unter hohen Strömungsbedingungen und bei gestörter Endothelfunktion.

Es wurde gezeigt, dass interventionelle Eingriffe an Blutgefäßen zu einer erhöhten Thrombozytenaktivität beitragen.^{20,21,22}

Seit mehr als 15 Jahren ist bekannt, dass Thienopyridine, zu denen die Substanzen Ticlopidin und Clopidogrel zählen, wirkungsvoll arterielle Thrombosen unterdrücken.

Thienopyridine hemmen die ADP-induzierte Thrombozytenaggregation, indem sie selektiv und irreversibel die Bindung von ADP am P2Y₁₂ – Rezeptor verhindern.²³

Damit hemmen die Thienopyridine die ADP-vermittelte Aktivierung des GPIIb-IIIa Rezeptors. Die Thrombozytenfunktion ist erst 5 bis 10 Tage nach Absetzen der Substanzen wiederhergestellt.

Zu der Gruppe der Thienopyridine gehören folgenden Substanzen :

Ticlopidin (Tiklyd ®)

Ticlopidin wurde initial in den achtziger Jahren im Rahmen der Schlaganfall-Therapie eingesetzt. Ticlopidin ist ein „prodrug“, das im Dünndarm absorbiert und in der Leber metabolisiert wird. Bei gesunden Probanden wird nach Einnahme von Ticlopidin (500mg/Tag) die ADP-induzierte Thrombozytenaggregation messbar gehemmt. Die maximale antithrombozytäre Wirkung wird nach vier bis sieben Tagen erzielt.

Clopidogrel (Iscover ®, Plavix ®)

Clopidogrel wurde im Jahr 1986 zugelassen.

Der chemische Wirkstoff ist:

(+)-(S)-Methyl 2-(2-Chlorophenyl)-2-(6,7-Dihydrothieno[3,2-c]Pyridin-5(4H)-yl)Acetat, (C₁₆ H₁₆ClNO₂S•H₂SO₄).

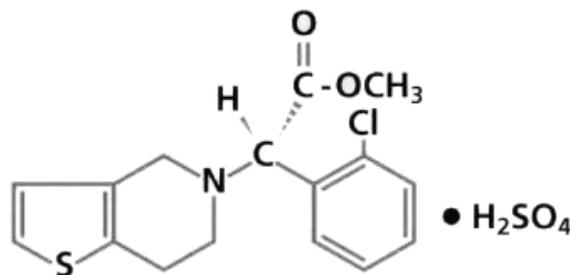


Abbildung 5: Chemische Struktur von Clopidogrel

Clopidogrel ist ebenfalls ein „prodrug“. Nach oraler Verabreichung entsteht durch hepatische Metabolisierung (CYP 450) der aktive Metabolit. Nach zwei Stunden ist bereits ein signifikanter Abfall der Thrombozytenfunktion messbar.

Nach den bisherigen Forschungsergebnissen empfiehlt sich eine Vorabgabe von 600mg Clopidogrel. Ohne Gabe einer „Loading Dosis“, bei täglicher Gabe von 75mg Clopidogrel, ist eine maximale Hemmung der ADP-induzierten Thrombozytenaggregation erst nach 5-7 Tagen nach der ersten Einnahme zu erwarten. Diesen Zeitraum kann man auf 24 Stunden bzw. 2 Stunden durch die Gabe einer Initial-Dosis von 300mg bzw. 600mg verkürzen. In der Praxis bedeutet dies, dass eine Stentimplantation zwei Stunden nach Gabe einer Aufsättigungsdosis von 600mg unter maximaler antithrombozytärer Wirkung von Clopidogrel durchgeführt werden kann.²⁴

In der multizentrischen Studie "Clopidogrel in Unstable Angina to prevent Recurrent Events" (CURE) wurden 12 562 Patienten innerhalb von 24 Stunden nach Beginn eines akuten Koronarsyndroms (instabile Angina oder Non-ST-Hebung Infarkt) randomisiert und entweder mit einer Clopidogrel- oder mit Plazebo-Therapie behandelt. In der Clopidogrelgruppe erhielten die Patienten eine Aufsättigungsdosis von 300mg Clopidogrel gefolgt von einer täglichen Dosierung mit 75mg Clopidogrel. In beiden Therapiearmen erhielten die Patienten als Basismedikation ASS in einer Dosierung von 75-325mg/d. Die Therapiedauer mit Clopidogrel/Plazebo betrug drei bis zwölf Monate.

Der kombinierte primäre Endpunkt (kardiovaskulärer Tod, Myokardinfarkt, Schlaganfall) trat bei 11,4 % der Patienten in der Plazebogruppe sowie bei 9,3% der Patienten in der Clopidogrelgruppe auf. Dies entspricht einer 2,1%igen Reduktion des absoluten Risikos sowie einer 20%igen relativen Risikoreduktion ($p < 0,001$). Der protektive Effekt war bereits während der ersten Tage nach Therapiebeginn sowie auch vom 30.Tag bis zum Ende der Studie nachweisbar.²⁵

Ebenso wurde die Wirksamkeit von Clopidogrel an mehr als 20.000 Patienten in der CAPRIE-Studie ("Clopidogrel versus Aspirin in Patients at Risk of Ischaemic Events") untersucht.

Es zeigte sich, dass die Behandlung mit Clopidogrel das Risiko eines kardiovaskulären Ereignisses im Vergleich zur Standardtherapie mit Acetylsalicylsäure (ASS) signifikant verminderte.²⁶

1.6. Clopidogrel Resistenz

Gegenwärtige verfügbare Daten zeigen, dass ungefähr 4 % bis 30 % der Patienten, die mit einer konventionellen Dosis Clopidogrel behandelt wurden keine ausreichende Thrombozytenhemmung zeigten.^{27, 28, 29}

Eine wesentliche Ursache für die in der Literatur zu findende Schwankungsbreite des Ansprechens besteht aufgrund der verschiedenen Meßmethoden, um die Wirkung von Clopidogrel zu beurteilen. (Lichttransmissionsaggregometrie, VASP, Ultegra-Rapid Platelet Funktion Analyzer).

Zahlreiche Mechanismen könnten die interindividuelle Variabilität des Ansprechens auf Clopidogrel beeinflussen.

1. Verminderte Medikamentenkonzentration im Plasma aufgrund einer verminderten gastrointestinalen Absorption.
2. Verminderte Medikamentenkonzentration im Plasma aufgrund eines zu großen Verteilungsvolumens.
3. Verminderter hepatischer Metabolismus des Medikaments zu seinem aktiven Metaboliten aufgrund einer reduzierten Cytochrom P450 3A4 Aktivität oder genetischer Polymorphismen des P450 Enzyms.
4. Verminderter hepatischer Metabolismus zum aktiven Metaboliten durch Interaktion anderer durch Cytochrom P450 3A4 verstoffwechselter Substanzen.
5. Verminderte Dichte des P2Y₁₂ Rezeptors auf der Thrombozytenoberfläche.
6. Polymorphismus im P2Y₁₂ Rezeptor.
7. Erhöhte lokale oder systemische Konzentration anderer Thrombozyten-Aktivatoren.

Tabelle 1: Zusammenfassung von ausgewählten klinischen Studien, die die Variabilität des Ansprechens auf Clopidogrel untersuchen.

Studie	Patienten Anzahl	Methode	Anzahl der “low-responder”
Lau et al. ³⁰	57 (elektive PCI)	Aggregometrie in PRP	22%
Müller et al. ³¹	150 (elektive PCI)	Aggregometrie in PRP	5%
Gurbel et al. ³²	96 (elektive PCI)	Aggregometrie in PRP	31%
Seburany et al. ⁴⁰	544 (KHK, Herzinsuffizienz, gesunde Probanden)	Aggregometrie in PRP	4,2%
Matetzky et al. ³⁹	60 (NSTEMI und PCI)	Aggregometrie in PRP	13%
Järemo et al. ³³	18 (elective PCI)	Flow Cytometrie in Vollblut	27%
Abeil et al. ³⁴	114 (elective PCI und gesunde Probanden)	VASP Phosphorylation	> 30%
Grossmann et al. ³⁵	57 (akute und elektive PCI)	VASP Phosphorylation	17,5%
Mobley et al. ³⁶	50 (elektive PCI)	Thromboelastograph	30%

1.7. Fragestellung

Es wurde ausreichend bewiesen, dass die Therapie mit dem Thrombozytenaggregationshemmer Clopidogrel im Rahmen einer Stent-Implantation bei Patienten mit symptomatischer koronarer Herzerkrankung eine Reduktion von kardiovaskulären Ereignissen und Mortalität bewirkt.

Es finden sich aber zunehmend Hinweise für ein inadäquates Ansprechen auf eine antithrombozytäre Therapie mit Clopidogrel (Clopidogrel „low-response“) bei einem bedeutenden Anteil kardiovaskulärer Patienten.

Das Ziel der Doktorarbeit ist es zu beurteilen, ob die Patienten, die nicht adäquat auf die Therapie mit Clopidogrel ansprechen, ein höheres Risiko für ein kardiovaskuläres Ereignis innerhalb von 3 Monaten nach Intervention zeigen.

Folgende Teilfragen wurden betrachtet:

- Hat die konsekutive Untersuchung des Ansprechens auf Clopidogrel eine prognostische Bedeutung bei Patienten mit koronarer Stentimplantation?
- Sollte diese Untersuchung bei jedem Patienten mit Stentimplantation empfohlen werden ?
- Profitieren Patienten mit nicht adäquatem Ansprechen auf Clopidogrel von einer alternativen Therapie ?

2. Material und Methodik

2.1. Material

2.1.1. Patientenkollektiv

Von März 2005 bis August 2005 wurden 379 Patienten mit symptomatischer koronarer Herzerkrankung, die eine koronare Stentimplantation erhielten, konsekutiv auf das Ansprechen auf Clopidogrel untersucht. Patienten mit

bekannten Thrombozytenfunktionsstörungen wurden von der Studie ausgeschlossen. Patienten, die eine Behandlung mit GP IIb-IIIa Antagonisten innerhalb einer Woche vor Messung erhielten, wurden frühestens eine Woche nach GP IIb-IIIa Gabe gemessen.

Die Patienten erhielten eine Initialdosis von 600mg Clopidogrel vor der geplanten Stentimplantation. Im Anschluss erfolgte eine Erhaltungstherapie mit 75mg/d Clopidogrel. Sofern keine Kontraindikationen gegen eine Therapie mit Aspirin (Risiko einer gastrointestinalen Blutung, allergische Reaktionen) bestanden, erhielten die Patienten eine Standardtherapie mit ASS 100mg/d vor Stentimplantation.

Niedriges Ansprechen auf Clopidogrel wurde bei einer Thrombozytenhemmung < 30% in der ADP (20µmol/L) induzierten Lichttransmissionsaggregometrie definiert.

Die Patientencompliance bezüglich der Medikamenteneinnahme sowie des klinischen Verlaufs wurden durch telefonische Befragung evaluiert und in einer Excel-Tabelle gesammelt.

363 (95,8%) Patienten konnten aus dieser Gruppe im 3-monatigen Follow-Up durch telefonische Befragung erfasst werden.

2.1.2. Studienprotokoll

Das Studienprotokoll wurde durch die Ethikkommission der Eberhard Karls Universität Tübingen genehmigt. Einschlusskriterien waren ein Alter > 18 Jahre sowie eine schriftliche Einverständniserklärung.

2.1.3. Geräte und Verbrauchsmaterial

1. Sarstedt Monovette Coagulation 9 NC/10ml
SARDTEDT Aktiengesellschaft & Co., Deutschland
2. Venisystems Butterfly – 21
ABBOTT IRELAND, Sligo, Rep. of Irland
3. Multi- Adapter
SARDTEDT Aktiengesellschaft & Co., Deutschland
4. PS – Röhrchen (5ml)
Greiner bio-one Frickenhausen, Deutschland
5. Glasküvetten
Zubehör zur Messung der Thrombozytenfunktion
Probe& Go Labordiagnostica, Endingen, Deutschland
6. Einmal – Rührstäbchen für Glasküvetten
Zubehör zur Messung der Thrombozytenfunktion
Probe& Go Labordiagnostica, Endingen, Deutschland
7. Pipetten Eppendorf Reference
Eppendorf AG Hamburg, Deutschland
8. Pipettenspitze
Eppendorf AG Hamburg, Deutschland
9. 1,5ml Microcentrifuge Tube
neoLab Migger Laborbedarf - Vertriebs GmbH
Heidelberg, Deutschland

10. Diagramm – Rollen Format

Diagramm Halbach GmbH & Co.KG, Schwerte, Deutschland

11. Zentrifuge Heraeus Sepatech

Georg Kästner Rottenbug Deutschland

12. Sysmex Deutschland SE - 9000

13. Aggro-meter +Software

Probe& Go Labordiagnostica, Endingen, Deutschland

14. HP Compaq Windows XP Professional+ Excel Version 98

2.1.4. Reagenzien

a) CHRONO – PAR ADP REAGENZ

Reagenz zur Messung der Thrombozytenfunktion (1mmol) 5ml Probe& Go Labordiagnostica, Endingen, Deutschland

2.2. Methodik

2.2.1. Blutprobenvorbereitung

Die Blutproben wurden frühestens 6 Stunden nach der Initial-Dosis Clopidogrel abgenommen, um den maximalen plättchenhemmenden Effekt zu gewährleisten.

Die Abnahme erfolgte in 3,8% Zitratplasma (10 ml venöses Blut pro Patient).

Die Proben wurden bei 1000U/min für 10 Minuten bei 20°C ohne Bremse zentrifugiert, um plättchenreiches Plasma (PRP) zu erhalten. 1 ml PRP wurde pro Probe abgenommen, und das restliche PRP wurde noch einmal für 10 Minuten bei 3500U/min bei 20 °C zentrifugiert, um plättchenarmes Plasma (PPP) zu gewinnen.

Die Thrombozytenanzahl im PRP wurde im Sysmex gemessen und auf $2 \times 10^5/\mu\text{l}$ durch Zusatz des homologen PPP eingestellt.

Für die Aggregation wurden 2 Küvetten benötigt:

- Referenzküvette mit 500 μl PPP: stellt den 100%-Wert der Lichttransmission dar.
- Küvette mit 490 μl PRP (mit $2 \times 10^5/\mu\text{l}$ Thrombozyten): bezeichnet den Nullwert der Lichttransmission.

Nach 2 Minuten wurde die Aggregation durch Hinzugabe von 20 $\mu\text{mol/L}$ ADP induziert. Die gesamte Aggregation dauerte 5 Minuten.

Die prozentuale Thrombozytenaggregation wurde mittels der turbodimetrischen Methode mit dem Chronolog Lumi Aggregometer in Verbindung mit der Aggro-Link Software erfasst.

2.2.2. Aggregometrie

Die heute gebräuchlichste Routinemethode für die Thrombozytenfunktionsdiagnostik ist die Bestimmung der Plättchenaggregation (turbodimetrische Verfahren nach Born) mittels eines Spektralphotometers mit fest eingestellter Wellenlänge.

Es handelt sich hierbei um ein photometrisches Messverfahren, bei dem mittels eines Schreibers die Änderung der optischen Dichte im zu bestimmenden Medium aufgezeichnet wird.

Nach Zusatz von Plättchenagonisten (z.B. ADP) zu plättchenreichem Zitratplasma (PRP) setzt die Aggregation der Plättchen ein.

Der Infrarotstrahl geht durch die PRP Küvette (zu untersuchende Probe) und ein weiterer Strahl geht durch die PPP Küvette (Referenzprobe).

PRP ist naturgemäß trübe. Die Lichtdurchlässigkeit durch diese getrübe Probe wird in Relation zum PPP gemessen. Wenn das Reagenz hinzugefügt wird, bilden die Plättchen größere Aggregate und das PRP beginnt aufzuklären, was die Lichtdurchlässigkeit erhöht. Der Anstieg der Lichtdurchlässigkeit ist direkt

proportional der Menge der Aggregate. Es wird fortlaufend photometrisch registriert und in Kurvenform kontinuierlich aufgezeichnet.

Die Aggregation wird in Prozent Lichttransmission angegeben, deren maximal möglicher Wert (100%) vorher mittels eines Nullabgleichs bestimmt wird.

2.2.3. Kurvenanalyse

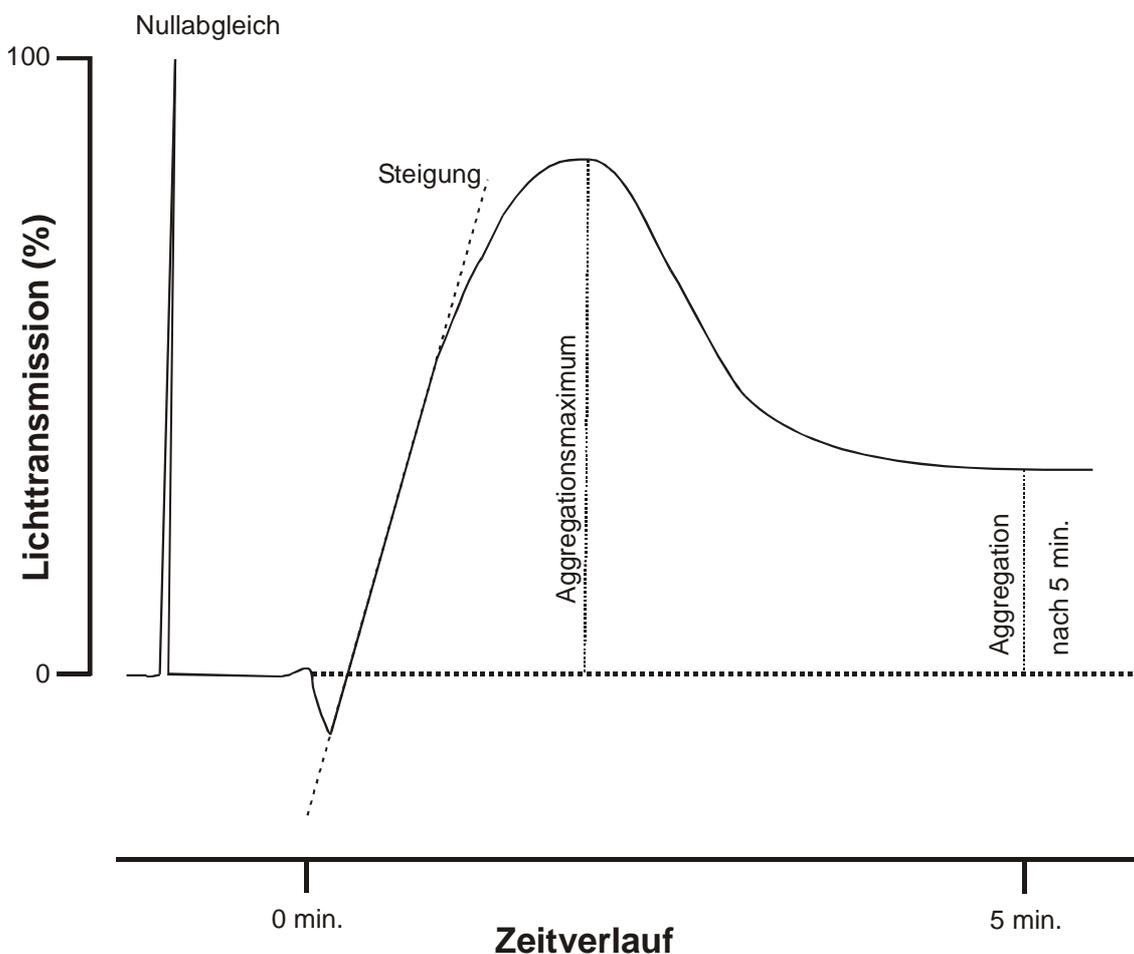


Abbildung 6: Kurvenverlauf mit Aggregationsparameter

Aus dem Kurvenverlauf lassen sich folgende Aggregationsparameter bestimmen:

- Maximale Aggregation
- Aggregation 5 Minuten nach Hinzugabe des Reagenz.

2.2.4. Aggregationskurve

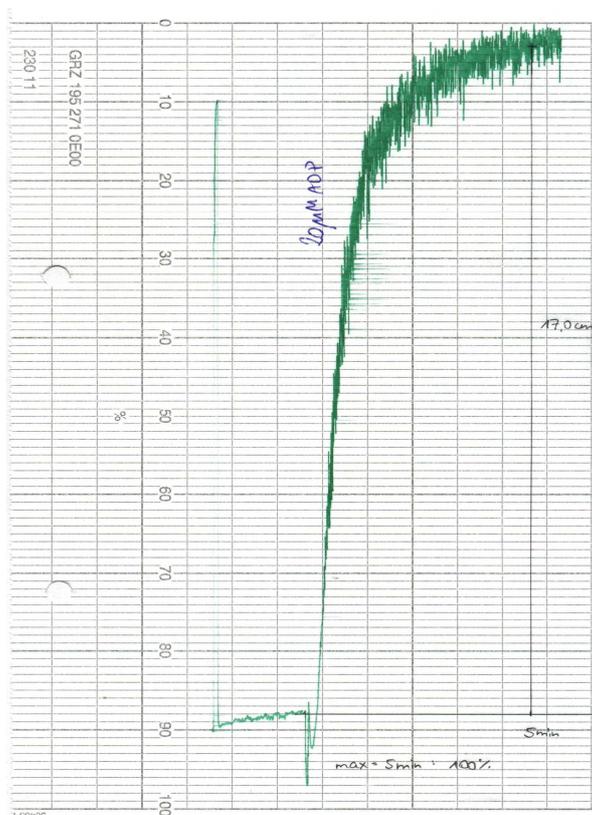


Abbildung 7: Aggregationskurve

100% Thrombozytenaggregation bei einem nicht vorbehandelten gesunden Probanden.

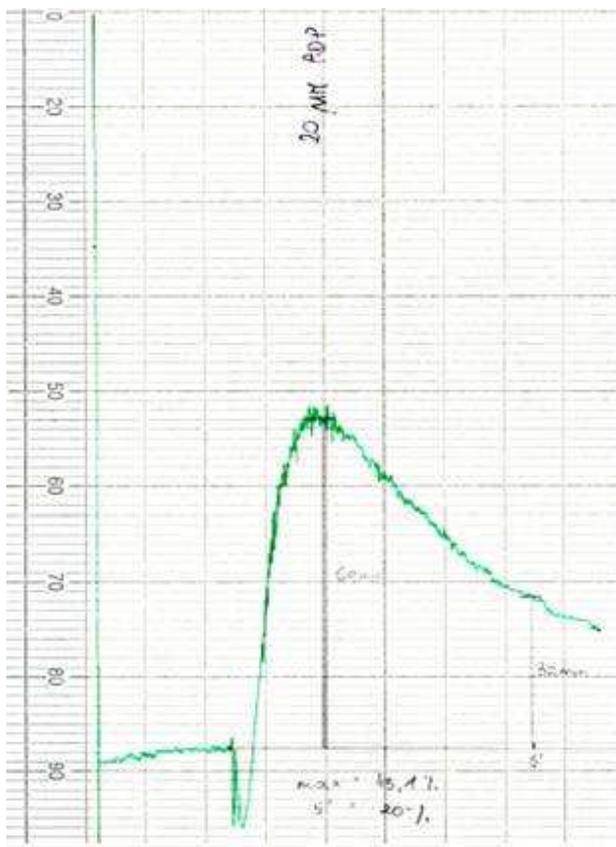


Abbildung 8: Clopidogrel “responder”

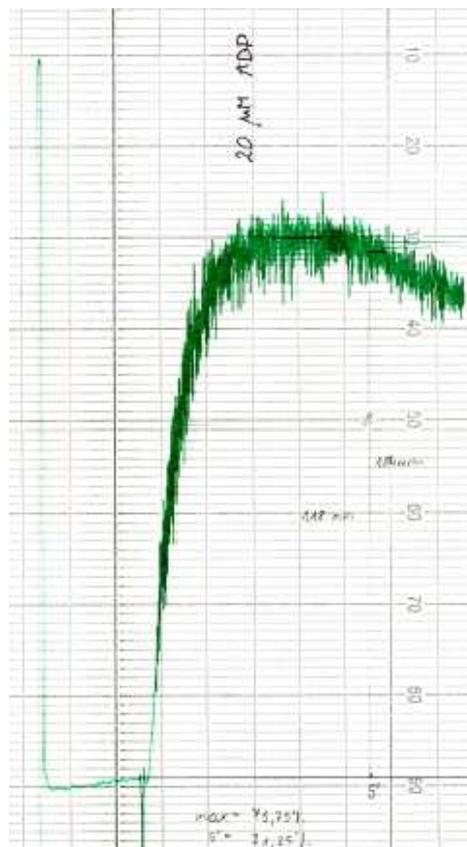


Abbildung 9: Clopidogrel “low-responder”

Hemmung der
Plättchenaggregation <30%

2.2.5. Statistische Auswertung

Die Assoziation des geringen Ansprechens auf Clopidogrel und des vordefinierten primären Endpunktes und der sekundären Zielkriterien Tod kardiovaskulärer Genese, nicht tödlicher Myokardinfarkt und nicht tödlicher ischämischer Insult wurde innerhalb der 3 monatigen Nachbeobachtung beurteilt. Die Mittelwerte zwischen zwei Variablen wurden mittels eines zweiseitigen ungepaarten t-Tests verglichen. Ein Chi-Quadrat Test wurde für die dichotome Analyse von kategorischen Variablen verwendet. Der Zusammenhang zwischen dem Ansprechen auf Clopidogrel und dem Überleben sowie den kombinierten kardiovaskulären Ereignissen wurde mit dem Log-rank test (Mantel-Cox) beurteilt.

Eine multivariante Cox Regressionsanalyse wurde für die Gesamtmortalität, die kombinierten kardiovaskulären Endpunkte sowie Tode kardiovaskulärer Genese nach Einschluss des Geschlechts, Alters (>65 Jahre), der Präsenz von kardiovaskulären Risikofaktoren (Diabetes, Hyperlipidämie, Hypertonus, Nikotinabusus, Familienanamnese bezüglich koronarer Herzerkrankung), der linksventrikulären Funktion sowie der Diagnose eines akuten Koronarsyndroms zum Zeitpunkt der Aufnahme in die Studie durchgeführt. Die Hazard Ratio stellt die vorhergesagte Änderung des Hazards bei einer Erhöhung des Prädiktors um eine Einheit (d.h. eine Änderung von normalem zu geringem Ansprechen auf Clopidogrel) dar. Kaplan-Meier Kurven wurden erstellt um das ereignisfreie Überleben und das Überleben eines kardiovaskulären Todes zu beurteilen.

Alle aufgeführten Signifikanz-Werte sind zweiseitig und ein P-Wert <0,05 wurde einer statistischen Signifikanz zugrunde gelegt.

Die statistische Analyse wurde mit SPSS, Version 13 für Windows (SPSS, Inc., Chicago, IL) durchgeführt. Die Klassifizierung von Ereignissen erfolgte von Untersuchern, die verblindet waren bezogen auf das Ergebnis der Aggregometrie.

3. Ergebnisse

3.1. Nachbeobachtungsstudie

Insgesamt 379 Patienten waren von März bis August 2005 konsekutiv untersucht worden. 363 (95,8%) Patienten konnten aus dieser Gruppe in eine 3- monatigen Nachverfolgung durch telefonische Befragung erfasst werden. Die einzelnen Patientencharakteristika sind in Tabelle 2 aufgelistet.

Der Mittelwert (\pm Standardabweichung) der ADP ($20\mu\text{mol/L}$)-induzierten Aggregation der nachverfolgten erfassten Patienten lag bei $34,5\pm 22,6\%$.

22 Patienten (5,8%) zeigten ein geringes Ansprechen auf Clopidogrel (Hemmung der Plättchenaggregation $<30\%$) und wurden als „low-responder“ definiert.

Tabelle 2: Demographische Daten der nachverfolgten Patienten bei Studienbeginn

Charakteristika	Gesamt (n=363)	Ansprechen auf Clopidogrel		p-Wert
		adäquat (n=341)	gering (n=22)	
Plättchenaggregation %	34,5±22,6	31,6 ±20,5	78,6±8,2	
Alter – Jahre	67,5±10,0	67,3 ±10,1	70,4±7,4	0,16
Geschlecht- Anzahl (%)				0,12
Männlich	277 (73,1)	258 (72,3)	19 (86,4)	
Weiblich	86 (26,9)	83 (27,7)	3 (13,6)	
Kardiovaskuläre Risiko- Faktoren – Anzahl (%)				
Arterielle Hypertonie	289 (79,6)	272 (79,8)	17 (77,3)	0,78
Diabetes	126 (34,7)	118 (34,6)	8 (36,4)	0,87
Positive Familienanamnese	109 (30)	105 (30,8)	4 (18,2)	0,19
Hyperlipidämie	220 (60,6)	214 (62,8)	6 (27,3)	0,001
Rauchen	151 (41,6)	145 (42,5)	6 (27,3)	0,15
Anamnese				
Akutes Koronarsyndrom	165 (45,5)	147 (43,1)	18 (81,8)	<0,001
Koronare Herzerkrankung Anzahl (%)				
1 Gefäß	92 (25,3)	88 (25,8)	4 (18,2)	0,41
2 Gefäße	112 (30,9)	105 (30,8)	7 (31,8)	0,92
3 Gefäße	159 (43,8)	148 (43,4)	11 (50,0)	0,55
Deutlich reduzierte LV- Funktion (EF<30 %) Anzahl (%)	38 (10,5)	36 (10,6)	2 (9,1)	0,82
Niereninsuffizienz	78 (24,3)	70 (23,3)	8 (40,0)	0,11
Medikation – Anzahl (%)				
ACE-Hemmer	296 (81,5)	280 (82,1)	16 (72,7)	0,3
AT-I Blocker	44 (12,1)	39 (11,4)	5 (22,7)	0,15
Aspirin	356 (98,1)	335 (98,2)	21 (95,5)	0,43
Beta Blocker	340 (93,7)	322 (94,4)	18 (81,8)	0,05
Diuretika	142 (39,1)	129 (37,8)	13 (59,1)	0,05
Ca-Antagonisten	32 (8,8)	28 (8,2)	4 (18,2)	0,15
Statine	317 (87,3)	301 (88,3)	16 (72,7)	0,06

3.2. Inzidenz kardiovaskulärer Ereignisse

Tabelle 3 zeigt die Inzidenz von kardiovaskulären Ereignissen innerhalb des 3-monatigen Beobachtungszeitraumes. Insgesamt starben 19 Patienten (5,2%), 14 aufgrund einer kardiovaskulären Ursache (3,9%); andere Ursachen waren akutes Nierenversagen (1), Pneumonien (2) und Multiorganversagen (2). 5 Patienten entwickelten einen nicht tödlichen akuten Myokardinfarkt (1,4%) und 5 Patienten einen ischämischen Insult (1,4%) innerhalb der 3 Monate.

Tabelle 3: Inzidenz von kardiovaskulären Ereignissen

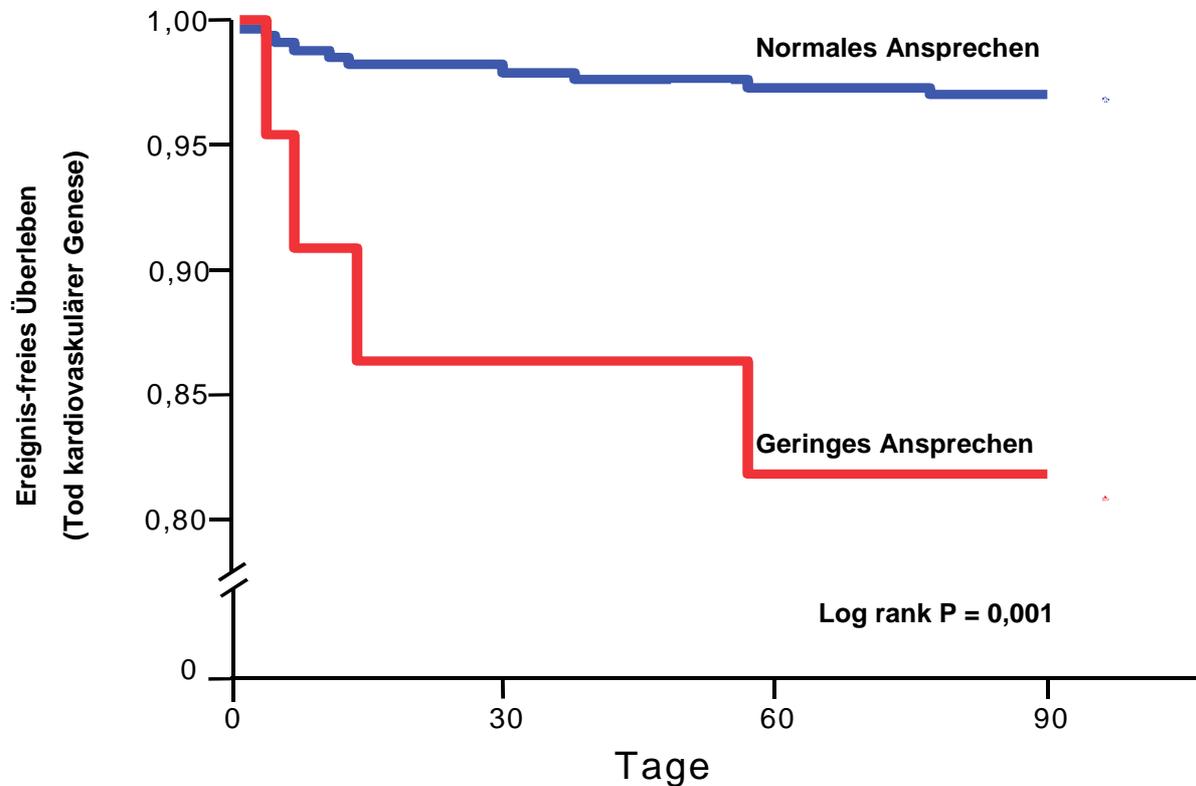
Ereignis	Gesamt n=363	Ansprechen auf Clopidogrel		P-Wert
		adäquat n=341	gering n=22	
Tode kardiovaskulärer Genese – Anzahl (%)	14 (3,9)	10 (2,9)	4 (18,2)	0,006
Myokardinfarkt – Anzahl (%)	5 (1,4)	4 (1,2)	1 (4,5)	0,29
Schlaganfall – Anzahl (%)	5 (1,4)	5 (1,5)	0 (0)	0,43
Kombinierte kardiovaskuläre Ereignisse - Anzahl (%)	24 (6,6)	19 (5,6)	5 (22,7)	0,01
Tode gesamt - Anzahl (%)	19 (5,2)	14 (4,1)	5 (22,7)	0,003
Kumulative Ereignisse - Anzahl (%)	29 (8,0)	23 (6,7)	6 (27,3)	0,005

3.3. „Clopidogrel low-response“ und klinische Prognosen

Tabelle 4: Risiko für kombinierte kardiovaskuläre Endpunkte

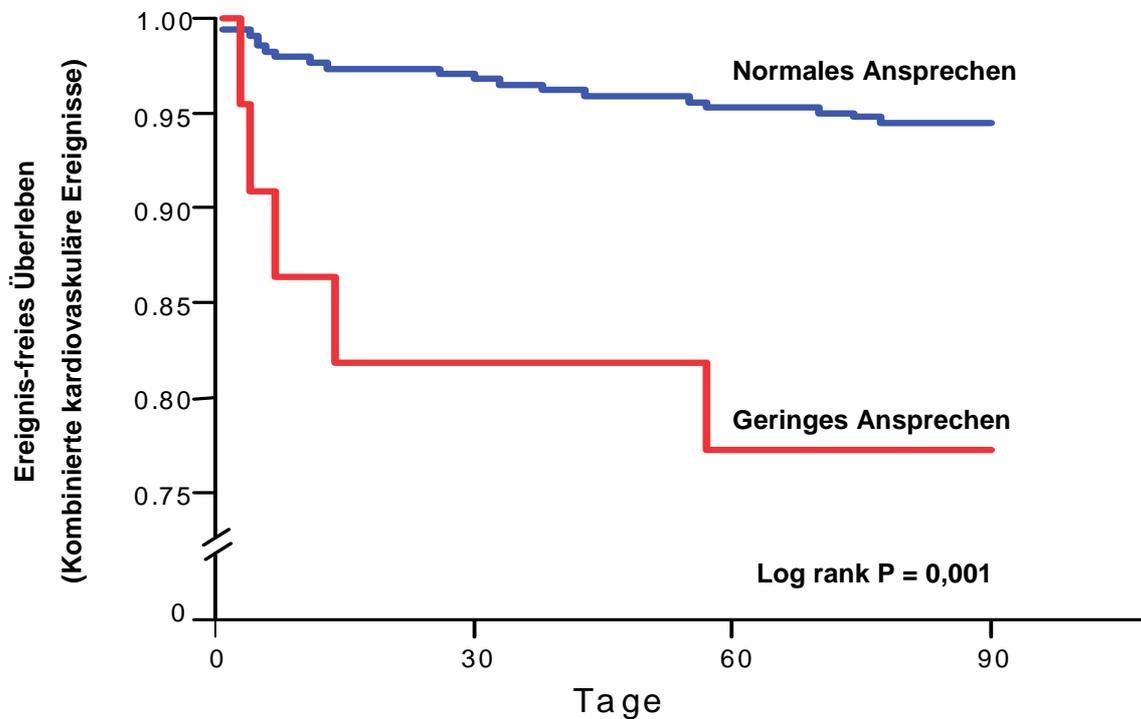
Einflussfaktor	Hazard Ratio (95,0% Konfidenz Intervall)	p-Wert
Geringes Ansprechen auf Clopidogrel	3,71 (1,08-12,69)	0,04
LV-Funktion (Auswurfraction ≤ 30%)	3,81 (1,38-10,53)	0,01
Diabetes	1,39 (0,54-3,54)	0,50
Raucher	0,71 (0,21-2,43)	0,59
Hypertonus	0,62 (0,23-1,68)	0,35
Geschlecht (weiblich)	1,17 (0,42-3,24)	0,77
Alter (>65 Jahre)	2,07 (0,54-7,87)	0,29
Vorhergehendes Akutes Koronarsyndrom	1,28 (0,49-3,35)	0,61
Begleitmedikation		
Beta Blocker	1,26 (0,33-4,76)	0,74
ACE-Hemmer	1,84 (0,67-5,03)	0,24
Statine	2,40 (0,90-6,44)	0,08

Nach 3 Monaten waren ein vermindertes Ansprechen auf Clopidogrel und eine hochgradig reduzierte linksventrikuläre Funktion unabhängige Einflussfaktoren für die Inzidenz eines Todes kardiovaskulärer Ursache und kombinierter kardiovaskulärer Ereignisse (Hazard Ratio 3,6, 95% Konfidenzintervall 1,1 bis 8,5, $p < 0,05$).



Ansprechen	Anzahl ohne Ereignis			
Adäquat	341	333	332	331
Gering	22	19	18	18
Gesamt	363	352	350	349

Abbildung 10: Kaplan-Meier Kurve mit Darstellung des kumulativen Überlebens eines Todes kardiovaskulärer Ursache. Patienten mit geringem Ansprechen auf Clopidogrel zeigen eine höhere Wahrscheinlichkeit, an einem kardiovaskulären Tod innerhalb von 3 Monaten zu versterben.



Ansprechen	Anzahl ohne Ereignis			
Adäquat	341	330	325	322
Gering	22	18	17	17
Gesamt	363	348	342	339

Abbildung 11: Kaplan-Meier Kurve mit Darstellung des kumulativen Überlebens eines kardiovaskulären Ereignisses. Patienten mit geringem Ansprechen auf Clopidogrel zeigen eine signifikant höhere Wahrscheinlichkeit für die Inzidenz eines Myokardinfarktes, ischämischen Insultes oder Todes kardiovaskulärer Genese innerhalb von 3 Monaten.

4. Diskussion

Die koronare Herzkrankheit (KHK) ist eine der dominierenden Erkrankungen in den Industrieländern. Durch ihre hohe Prävalenz und Mortalität ist sie von wesentlicher epidemiologischer Bedeutung.

In den letzten 15 Jahren hat die perkutane transluminale Koronarangioplastie zunehmend an Bedeutung gewonnen. Sie gehört heute zu den wichtigsten Therapieformen bei der Behandlung von symptomatischen Koronarstenosen. Der Einsatz koronarer Stents hat zu einer deutlichen Reduktion von Wiederverschlüssen und damit zu einer verbesserten Prognose geführt. Thrombozyten spielen eine wichtige Rolle in der Pathophysiologie der Atherosklerose und bei der Entstehung von arteriothrombotischen Komplikationen.

Während einer arteriellen Ischämie sowie bei PTCA und Stentimplantation zeigen Thrombozyten eine erhöhte Aktivierbarkeit, wodurch das Risiko einer arteriellen Thrombose erhöht wird. Die effektive antithrombozytäre Therapie ist deshalb eines der wesentlichen Ziele der modernen Kardiologie.

Clopidogrel blockiert die ADP-vermittelte Thrombozytenaktivierung, wodurch das Auftreten einer Stentthrombose effektiv reduziert werden kann.

Jedoch zeigen sich zunehmende Hinweise auf ein interindividuell unterschiedliches Ansprechen auf die Therapie mit Clopidogrel.^{37,38,39,40,41,42}

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Untersuchung der klinischen Bedeutsamkeit des Ansprechens auf Clopidogrel.

Die wesentliche Erkenntnis dieser Studie ist, dass ein geringes Ansprechen auf Clopidogrel zu einer Risikoerhöhung von ischämischen Ereignissen bei Patienten nach koronarer Stentimplantation führt. In der Studie wurde gezeigt, dass durch eine *ex vivo* Analyse der ADP-induzierten Thrombozytenaggregation nach koronarer Stentimplantation Patienten mit erhöhtem Risiko für ein schwerwiegendes kardiovaskuläres Ereignis (Myokardinfarkt, ischämischer Insult, Tod) innerhalb einer 3-monatigen Nachbeobachtungszeit identifiziert werden können. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie implizieren, dass eine Subpopulation von Patienten mit

symptomatischer koronarer Herzerkrankung und perkutaner Stentimplantation (ungefähr 6%) nicht adäquat auf die Therapie mit Clopidogrel anspricht und daher von einer intensivierten dualen antithrombozytären Therapie profitieren könnte.

In bisherigen klinischen Studien konnte ein deutlicher Vorteil einer kombinierten antithrombozytären Therapie (ASS plus Clopidogrel) gegenüber einer ASS Monotherapie nach PTCA bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung demonstriert werden. Dennoch treten schwerwiegende kardiovaskuläre Ereignisse bei etwa 9% der Patienten trotz konventioneller antithrombozytärer Therapie auf. Vorläufige Ergebnisse deuten darauf hin, dass ein geringer antithrombozytärer Effekt von Clopidogrel zu einem höheren Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse führen kann. Es wurde daher in einer prospektiven Studie die klinische Signifikanz des geringen Ansprechens auf Clopidogrel untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass ein geringes Ansprechen gemessen mit der konventionellen Lichttransmissionsaggregometrie bei etwa 6% der Patienten mit koronarer Stentimplantation in einem konsekutiv erfassten Kollektiv (379 Patienten) vorliegt.

In einem 3-monatigen Beobachtungszeitraum konnte ein geringes Ansprechen auf Clopidogrel als prognostisch ungünstiger Faktor für die Inzidenz kardiovaskulärer Ereignisse charakterisiert werden.

Die Thrombozytenfunktion wird in den meisten Fällen *ex vivo* durch die Lichttransmissionsaggregometrie bestimmt. Obwohl diese Methode Nachteile durch die komplexe Probenvorbereitung mit sich führt, ist sie momentan die am meisten angewandte Methode, um den Effekt von antithrombozytären Substanzen zu messen.⁴³ Aus diesem Grund wurde diese Methode in der vorliegenden Studie genutzt, um Patienten mit geringem Ansprechen auf Clopidogrel zu definieren. Bisher gibt es keinen einheitlichen „Cut-off“ Wert, um Patienten mit geringem Ansprechen auf Clopidogrel zu identifizieren. In der Literatur wurden empirisch definierte Werte für die Thrombozytenhemmung mit einer Schwankungsbreite zwischen 10% bis 40% zugrunde gelegt, um zwischen „responder“ und „low-responder“ zu unterscheiden. In dieser Studie

wurde ein „Cut-off“ Wert für die Clopidogrel abhängige Thrombozytenhemmung von <30% festgelegt.

Etwa 6% der Patienten konnten so als „low-responder“ in dieser Patientenkohorte definiert werden. Bisherige publizierte Daten haben gezeigt, dass 4% bis 30% der Patienten, die mit konventionellen Dosen von Clopidogrel behandelt wurden, nicht adäquat ansprechen. Daher korreliert die hier verwendete Definition von „clopidogrel low-response“ gut mit den bisher publizierten Daten. Bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt ist der Anteil der „low-responder“ sogar höher beschrieben worden (bis zu 25%). In dieser Studie zeigte sich in einer zahlenmäßig großen Subgruppe bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom eine signifikant höhere Prävalenz (um etwa 6%) im Vergleich zu Patienten mit stabiler Angina pectoris. Ein höheres Risiko in der weiteren Behandlung in dieser a priori gefährdeten Patientengruppe ist daher naheliegend. Dieser Zusammenhang sollte in weiteren Studien untersucht werden.

Der gewählte Zeitpunkt für die Messung der Thrombozytenaggregation ist von Bedeutung für die Beurteilung eines geringen Ansprechens auf Clopidogrel. Die maximale Plättchenhemmung zeigte sich 24h nach einer Initialdosis von 300mg Clopidogrel, wohingegen der maximale Effekt bereits 2h nach einer Initialdosis von 600mg zu erwarten ist. Der Zeitpunkt der Aggregometrie wurde frühestens 6h nach Erstverabreichung von Clopidogrel gewählt, um sicherzustellen, dass die Plättchenfunktionsmessung zum Zeitpunkt der maximalen Hemmung stattfand.

Die Ergebnisse legen nahe, dass eine einzige Messung der ADP-induzierten Thrombozytenaggregation bei Patienten, die eine koronare Stentimplantation erhalten, verwendet werden kann, um Patienten zu identifizieren, die ein erhöhtes Risiko für schwerwiegende kardiovaskuläre Ereignisse haben. Aus den vorliegenden Daten ergibt sich die Vermutung, dass in einer Subgruppe von Patienten mit koronarer Intervention das konventionelle postinterventionelle antithrombozytäre Regime mit einer Erhaltungsdosis von 75mg Clopidogrel pro Tag nicht die optimale Dosierung ist, um schwerwiegende kardiovaskuläre Ereignisse zu verhindern.

Erst kürzlich wurde gezeigt, dass die Initialgabe einer Dosis von 600mg Clopidogrel bei Patienten, die bereits dauerhaft mit Clopidogrel behandelt wurden, zu einer Steigerung der Plättchenhemmung gemessen durch die ADP-induzierte Thrombozytenaggregation führen kann.⁴⁴ Dementsprechend kann der Grad der Thrombozytenhemmung durch höhere Dosen zumindest vorübergehend gesteigert werden. Es ist momentan unklar, ob eine höhere Erhaltungsdosis innerhalb der kritischen Hochrisiko-Phase (z.B. 1 Monat nach PTCA) zu einer Steigerung der Plättchenhemmung verbunden mit einer Verbesserung der klinischen Prognose führen kann. Ob eine Erhöhung der Erhaltungsdosis das Ansprechen auf Clopidogrel steigern kann, oder eine alternative antithrombozytäre Strategie (z.B. Prasugrel) die klinische Prognose bei Patienten mit koronarer Stentimplantation verbessert, sollte in zukünftigen Studien gezeigt werden.

5. Zusammenfassung

Die kombinierte antithrombozytäre Therapie mit Clopidogrel und ASS ist die Standardtherapie nach PTCA mit Stentimplantation. Jedoch ist bekannt, dass 4% bis 30% der Patienten nicht adäquat auf diese Behandlung ansprechen. Das Ziel dieser Arbeit ist es zu beurteilen, ob ein geringes Ansprechen auf Clopidogrel den klinischen Verlauf nach koronarer Stentimplantation beeinflussen kann.

Insgesamt wurden 379 Patienten mit symptomatischer koronarer Herzerkrankung, die mit Stentimplantation behandelt wurden, konsekutiv untersucht. Die Ansprechbarkeit auf Clopidogrel wurde durch optische Aggregometrie mit ADP (20 µmol/L) bewertet. Eine Thrombozytenhemmung von weniger als 30 % wurde als ein geringes Ansprechen auf Clopidogrel definiert („low response“). In dem 3-monatigen Follow-Up wurden schwerwiegende kardiovaskuläre Ereignisse bei 95,8% erfasst. Hierzu gehörten: Tod kardiovaskulärer Ursache, Myokardinfarkt und Schlaganfall.

Zweiundzwanzig Patienten (5,8 %) wurden als „low-responder“ klassifiziert. Im Vergleich zu Patienten, die entsprechend auf Clopidogrel reagieren, bestand bei einem „low-responder“ eine deutlich höhere Risiko von schwerwiegenden kardiovaskulären Ereignissen (22,7 % gegen 5,6 %, $p < 0.005$) innerhalb von 3 Monaten. Das nicht adäquate Ansprechen auf Clopidogrel bei Patienten mit symptomatischer KHK, die durch eine Stentimplantation behandelt werden, erhöht bedeutsam die Mortalität und das Risiko von kardiovaskulären Ereignissen.

Durch Messung der Clopidogrel-abhängigen Thrombozytenhemmung lassen sich somit Patienten mit erhöhtem kardiovaskulären Risiko identifizieren, die von einer intensivierten antitrombozytären Therapie profitieren könnten. Patienten sollten routinemäßig auf das Ansprechen auf Clopidogrel nach Stentimplantation untersucht werden.

6. Curriculum vitae

Name: Wydymus
Vorname: Magdalena Marta

Geburtsdatum: 29.09.1978
Geburtsort: Katowice
Familienstand: ledig

Schule:
1984 – 1993 Grundschule
1993 – 1997 Oberschule
1997 Abitur

Studium:
1997 – 2003 Studium der Humanmedizin Collegium Medicum
Jagiellonien Universität in Krakau
2003 – 2004 Praktisches Jahr -Military Krankenhaus in Krakau
2005 – 04/2006 Promotion / Forschungsjahr zum Thema Clopidogrel-
Resistenz bei Herrn Prof. Dr. med. M. Gawaz an der
Universitätsklinik Tübingen

Facharztausbildung:
05/2006 – 04/2007 Assistenzärztin: Asklepios Klinik Triberg
Schwerpunkt Hämatologie/Onkologie
seit 05/2007 Assistenzärztin: Krankenhaus Oberndorf am Neckar
Schwerpunkt Innere Medizin

7. Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Professor Gawaz bedanken, der das interessante Thema bereitgestellt und mich sehr zur Bearbeitung motiviert hat. Der Dank gilt auch der kontinuierlichen Unterstützung und dem Vertrauen, welches er mir mit der Vergabe der Arbeit entgegengebracht hat.

Für die große Hilfe bei der Erstellung der statistischen Bearbeitung, Beratung und Korrekturen und die immer kollegiale Zusammenarbeit bin ich Herrn Dr. Tobias Geisler sehr dankbar, ferner auch Frau Heike Runge und Frau Kalouda Kathrilaka für die hilfsbereite Unterstützung meiner Laborarbeit.

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mir das Studium ermöglicht und mich immer unterstützt haben.

Bei meinem Freund Thorsten Holl möchte ich mich nicht nur für ständige technische Hilfe im EDV-Bereich bedanken, sondern auch dass er meine Launen in schwierigen Phasen mit Geduld ertragen hat.

Vielen anderen Personen, die nicht alle erwähnt sind, aber mir ebenfalls bei dieser Arbeit geholfen haben, sei an dieser Stelle Dank gesagt.

8. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Stentimplantation	8
Abbildung 2: Elektronenmikroskopische Aufnahme von Thrombozyten	10
Abbildung 3: ADP Rezeptoren auf der Thrombozyten Oberfläche	13
Abbildung 4: Chemische Struktur der Acetylsalicylsäure	16
Abbildung 5: Chemische Struktur von Clopidogrel	19
Abbildung 6: Kurvenverlauf mit Aggregationsparameter	28
Abbildung 7: Aggregationskurve.....	29
Abbildung 8: Clopidogrel "responder"	30
Abbildung 9: Clopidogrel "low-responder"	30
Abbildung 10: Kaplan-Meier Kurve mit Darstellung des kumulativen Überlebens eines Todes kardiovaskulärer Ursache. Patienten mit geringem Ansprechen auf Clopidogrel zeigen eine höhere Wahrscheinlichkeit, an einem kardiovaskulären Tod innerhalb von 3 Monaten zu versterben.	37
Abbildung 11: Kaplan-Meier Kurve mit Darstellung des kumulativen Überlebens eines kardiovaskulären Ereignisses. Patienten mit geringem Ansprechen auf Clopidogrel zeigen eine signifikant höhere Wahrscheinlichkeit für die Inzidenz eines Myokardinfarktes, ischämischen Insultes oder Todes kardiovaskulärer Genese innerhalb von 3 Monaten.	38

9. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zusammenfassung von ausgewählten klinischen Studien, die die Variabilität des Ansprechens auf Clopidogrel untersuchen.	22
Tabelle 2: Demographische Daten der nachverfolgten Patienten bei Studienbeginn	33
Tabelle 3: Inzidenz von kardiovaskulären Ereignissen.....	34
Tabelle 4: Risiko für kombinierte kardiovaskuläre Endpunkte	35

10. Literaturverzeichnis

- 1 Gerhard Herold und Mitarbeiter. Innere Medizin 2004:195-204
- 2 Assmann G, Schulte H, Cullen P. New and classical risk factors-the Munster heart study (PROCAM). Eur J Med Res. 1997;2(6):237-42.
- 3 Massberg S, Schulz C, Gawaz M. Role of platelets in the pathophysiology of acute coronary syndrome. Semin Vasc Med 2003;3(2):147-62.
- 4 Gurbel PA, Bliden KP, Hiatt BL, O'Connor CM. Clopidogrel for coronary stenting: response variability, drug resistance, and the effect of pretreatment platelet reactivity. Circulation 2003;107(23):2908-13.
- 5 Gurbel PA, Bliden KP, Samara W, Yoho JA, Hayes K, Fissaha MZ, Tantry US. Clopidogrel effect on platelet reactivity in patients with stent thrombosis: results of the CREST Study. J Am Coll Cardiol 2005;46(10):1827-32.
- 6 Gawaz M, Ruf A, Neumann FJ, Pogatsa-Murray G, Dickfeld T, Zohlnhofer D, Schomig A. Effect of glycoprotein IIb-IIIa receptor antagonism on platelet membrane glycoproteins after coronary stent placement. Thromb Haemost 1998;80(6):994-1001.
- 7 Mackie IJ, Neal CR. The Platelet. Platelet-vessel wall interactions (The Bloomsbury series in clinical science). Springer Verlag Berlin, Heidelberg;1988:1-32.
- 8 Ruggeri ZM, Ruggeri ZM. Platelet and von Willebrand factors interactions at the vessel wall. Hamostaseologie. 2004;24(1):1-11.
- 9 Andrews RK, Lopez JA, Bendt MC. Molecular mechanisms of platelet adhesion and activation. Int J Biochem Cell Biol.1997;29(1):91-105.
- 10 DeGroot, PG and Sixma, JJ Platelet Adhesion. Br J Haematol 75 (1990) 581-9.
- 11 Ruggeri ZM New insights into the mechanisms of platelet adhesion and aggregation. Semin Hematol.1994;31 229-39.
- 12 Valera S, Hussy N, Evans RJ, Adami N, North RA, Surprenant A, Buell G. A new class of ligand-gated ion channel defined by P2x receptor for extracellular ATP. Nature 1994;371(6497):516-9.
- 13 Valera S, Talabot F, Evans RJ, Gos A, Antonarakis SE, Morris MA, Buell GN. Characterization and chromosomal localization of a human P2X receptor from the urinary bladder. Receptors Channels 1995;3(4):283-9.

-
- 14 Gachet C, Hechler B, Leon C, Vial C, Leray C, Ohlmann P, Cazenave JP. Activation of ADP Receptors and Platelet Function. *Thromb Haemost.* 1997;78(1):271-5.
- 15 Brass LF, Manning DR, Cichowski K, Abrams CS. Signaling through G Proteins in Platelets: to the Integrins and Beyond. *Thromb Haemost.* 1997;78(1):581-9.
- 16 Ayyanathan K, Webbs TE, Sandhu AK, Athwal RS, Barnard EA, Kunapuli SP. Cloning and chromosomal localization of the human P2Y1 purinoceptor. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;218(3):783-8.
- 17 Hollopeter G, Jantzen HM, Vincent D, Li G, England L, Ramakrishnan V, Yang RB, Nurden P, Nurden A, Julius D, Conley PB. Identification of the platelet ADP receptor targeted by antithrombotic drugs. *Nature* 2001;409(6817):202-7.
- 18 Gawaz M. *Blood Platelets 2001* Georg Theme Verlag.
- 19 Gorennoi V, Kulp W, Greiner W, von der Schulenburg. Thrombozytenaggregationshemmer zur Primär- und Sekundärprävention des Ischämischen Schlaganfalls *GMS Health Technol Assess* 2006;2:Doc09.
- 20 Gawaz M, Neumann FJ, Ott I, May A, Rudiger S, Schomig A. Changes in membrane glycoproteins of circulating platelets after coronary stent implantation. *Heart* 1996;76(2):166-72.
- 21 Gawaz M, Neumann FJ, Ott I, May A, Rudiger S, Schomig A. A Role of activation-dependent platelet membrane glycoproteins in development of subacute occlusive coronary stent thrombosis. *Coron Artery Dis.* 1997;8(3-4):121-8.
- 22 Gawaz M, Neumann FJ, Ott I, Schiessler A, Schomig A. A Platelet function in acute myocardial infarction treated with direct angioplasty. *Circulation* 1996;93(2):229-37.
- 23 Weber AA, Braun M, Hohlfeld T, Schwippert B, Tschöpe D, Schror K. Recovery of platelet function after discontinuation of clopidogrel treatment in healthy volunteers. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 2001;52(3):333-6.
- 24 Muller I, Seyfarth M, Rudiger S, Wolf B, Pogatsa-Murray G, Schomig A, Gawaz M. Effect of a high loading dose of clopidogrel on platelet function in patients undergoing coronary stent placement. *Heart* 2001;85(1):92-3.
- 25 Fox KA, Metha SR, Peters R, Zhao F, Lakkis N, Gersh BJ, Yusuf S; Clopidogrel in Unstable angina to prevent Recurrent ischemic Events Trial. *Circulation* 2004;110(10):1202-8.

-
- 26 A randomised, blinded, trial of clopidogrel versus aspirin in patients at risk of ischaemic events (CAPRIE). CAPRIE Steering Committee. *Lancet* 1996;348(9038):1329-39.
- 27 Serebruany VL, Steinhubl SR, Berger PB, Malinin AI, Bhatt DL, Topol EJ. Variability in platelet responsiveness to clopidogrel among 544 individuals. *J Am Coll Cardiol* 2005;45(2):246-51.
- 28 Aleil B, Ravanat C, Cazenave JP, Rochoux G, Heitz A, Gachet C. Flow cytometric analysis of intraplatelet VASP phosphorylation for the detection of clopidogrel resistance in patients with ischemic cardiovascular diseases. *Thromb Haemost.* 2005;3:85–92.
- 29 Matetzky S, Shenkman B, Guetta V, Shechter M, Bienart R, Goldenberg I, Novikov I, Pres H, Savion N, Varon D, Hod H. Clopidogrel resistance is associated with increased risk of recurrent atherothrombotic events in patients with acute myocardial infarction. *Circulation* 2004;109(25):3171-5.
- 30 Lau W C, Waskell L A, Watkins P B, Neer C J, Horowitz K, Hopp A S, Tait A R, Carville D G, Guyer K E, Bates E R. Atorvastatin reduces the ability of clopidogrel to inhibit platelet aggregation: a new drug-drug interaction. *Circulation* 2003;107:32–37.
- 31 Muller I, Besta F, Schulz C, Massberg S, Schonig A, Gawaz M. Prevalence of clopidogrel non-responders among patients with stable angina pectoris scheduled for elective coronary stent placement. *Thromb Haemost.* 2003;89:783–787.
- 32 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;107:2908–2913.
- 33 Jaremo P, Lindahl T L, Fransson S G, Richter A. Individual variations of platelet inhibition after loading doses of clopidogrel. *J Intern. Med.* 2002;252:233–238.
- 34 Aleil B, Ravanat C, Cazenave J P, Rochoux G, Heitz A, Gachet C. 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.
- 35 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. *Thromb Haemost.* 2004;92(6):1201-6.

-
- 36 Mobley JE, Bresee SJ, Wortham DC, Craft RM, Snider CC, Carroll RC. Frequency of nonresponse antiplatelet activity of clopidogrel during pretreatment for cardiac catheterization. *Am J Cardiol.* 2004;93(4):456-8.
- 37 Gurbel PA, Cummings CC, Bell CR, Alford AB, Meister AF, Serebruany VL. Onset and extent of platelet inhibition by clopidogrel loading in patients undergoing elective coronary stenting: the Plavix Reduction Of New Thrombus Occurrence (PRONTO) trial. *Am Heart J* 2003;145(2):239-47.
- 38 van der Heijden DJ, Westendorp IC, Riezebos RK, Kiemeneij F, Slagboom T, van der Wieken LR, Laarman GJ. Lack of efficacy of clopidogrel pre-treatment in the prevention of myocardial damage after elective stent implantation. *J Am Coll Cardiol* 2004;44(1):20-4.
- 39 Matetzky S, Shenkman B, Guetta V, Shechter M, Bienart R, Goldenberg I, Novikov I, Pres H, Savion N, Varon D, Hod H. Clopidogrel resistance is associated with increased risk of recurrent atherothrombotic events in patients with acute myocardial infarction. *Circulation* 2004;109(25):3171-5.
- 40 Serebruany VL, Steinhubl SR, Berger PB, Malinin AI, Bhatt DL, Topol EJ. Variability in platelet responsiveness to clopidogrel among 544 individuals. *J Am Coll Cardiol* 2005;45(2):246-51.
- 41 Hochholzer W, Trenk D, Frundi D, Blanke P, Fischer B, Andris K, Bestehorn HP, Buttner HJ, Neumann FJ. Time dependence of platelet inhibition after a 600-mg loading dose of clopidogrel in a large, unselected cohort of candidates for percutaneous coronary intervention. *Circulation* 2005;111(20):2560-4.
- 42 Schwarz UR, Geiger J, Walter U, Eigenthaler M. 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;82:1145–52.
- 43 Geiger J, Teichmann L, Grossmann R, Aktas B, Steigerwald U, Walter U, Schinzel R. Monitoring of Clopidogrel Action: Comparison of Methods. *Clinical Chemistry* 2005; 51(6):957–965.
- 44 Kastrati A, von Beckerath N, Joost A, Pogatsa-Murray G, Gorchakova O, Schomig A. Loading with 600 mg clopidogrel in patients with coronary artery disease with and without chronic clopidogrel therapy. *Circulation* 2004;110(14):1916-9.