

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der  
Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität  
München

Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie  
(Lehrstuhl: Univ.-Prof. Dr. med. vet. Dr. med. vet. habil. Heidrun Potschka)

Arbeit angefertigt unter Leitung von

Prof. Dr. med. vet. Dr. med. vet. habil. Rüdiger Schulz

Angefertigt in der Abteilung für Klinische Pharmakologie

(Dr. rer. nat. Dietmar Trenk)

Herz-Zentrum Bad Krozingen

(Prof. Dr. med. Franz-Josef Neumann)

## **Die hemmende Wirkung von Clopidogrel auf die Aggregation humaner Thrombozyten**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Tiermedizinischen Doktorwürde  
der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von

Barbara Müller

aus Müllheim/Baden

München 2010

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Potschka

Korreferent: Prof. Dr. Kaltner

Tag der Promotion: 24. Juli 2010

## **1. Einleitung**

1.1. Thrombozyten.....	7
1.1.1. Bildung und Abbau.....	7
1.1.2. Morphologie.....	9
1.1.3. Physiologie.....	13
1.1.3.1. Primäre Hämostase.....	13
1.1.3.2. Sekundäre Hämostase.....	18
1.1.4. Pathophysiologie.....	20
1.2. Bedeutung der Thrombozyten in der Kardiologie.....	21
1.2.1. Kardiovaskuläre Erkrankungen.....	21
1.2.2. Katheterinterventionen.....	22
1.3. Thrombozyteninhibierende Medikamente.....	24
1.3.1. Azetylsalicylsäure.....	24
1.3.2. Thienopyridine.....	27
1.3.2.1. Ticlopidin .....	28
1.3.2.2. Clopidogrel .....	29
1.3.3. Weitere Thrombozytenfunktionshemmer.....	35
1.3.4. Interindividuelle Unterschiede der Thrombozytenaggregationshemmung....	37
1.3.5. Antithrombozytäre Therapie in der Kleintiermedizin.....	40

## **2. Hintergrund und Fragestellung**

2.1. Hintergrund.....	41
2.2. Fragestellung.....	42

## **3. Material, Patienten und Methoden**

3.1. Studienaufbau.....	43
3.2. Patienten.....	44
3.2.1. Einschlusskriterien.....	44
3.2.2. Ausschlusskriterien.....	45
3.2.3. Medikation der Studienpatienten.....	46
3.2.3.1. Azetylsalizysäure.....	46
3.2.3.2. Clopidogrel.....	46
3.2.3.3. Antikoagulantien.....	47
3.2.3.4. Begleitmedikation.....	47
3.3. Methoden.....	48
3.3.1. Probengewinnung.....	48
3.3.2. Testreagenzien.....	48
3.3.3. Optische Aggregometrie.....	50
3.3.3.1. Funktionsprinzip.....	50
3.3.3.2. Probenaufbereitung.....	53
3.3.3.3. Durchführung der aggregometrischen Messung.....	53
3.3.3.4. Auswertung der Messung.....	55
3.3.3.5. Variabilität der Thrombozytenaggregation.....	56
3.3.4. Durchflusszytometrie.....	58

3.3.4.1. Funktionsprinzip.....	58
3.3.4.2. Probenaufbereitung.....	59
3.3.4.3. Durchführung und Auswertung der Messung.....	60
3.3.4.4. Interindividuelle Variabilität der Expression von Oberflächenproteinen.....	61
3.3.5. Plasmakonzentrationen von Clopidogrel und Metaboliten.....	63
3.3.6. Statistische Auswertung.....	65

## 4. Ergebnisse

4.1. Studienpopulation .....	66
4.1.1. Patientenverteilung.....	66
4.1.2. Patientendaten.....	68
4.2. Verlauf der Thrombozytenfunktionshemmung.....	70
4.2.1. Primärer Endpunkt der EXCELSIOR-ACT Studie.....	70
4.2.2. Residuelle Thrombozytenreaktivität nach Stimulation mit 20 µM ADP.....	71
4.2.3. Vergleich der Thrombozytenreaktivität zwischen dem EXCELSIOR-ACT und dem EXCELSIOR Kollektiv.....	72
4.2.4. Expression von Oberflächenproteinen auf den Thrombozyten.....	77
4.3. Plasmakonzentrationen von Clopidogrel und Carboxy-Clopidogrel .....	78
4.4. Klinische Ereignisrate.....	81

<b>5. Diskussion.....</b>	<b>82</b>
---------------------------	-----------

## **6. Zusammenfassung**

6.1.	Zusammenfassung.....	90
6.2.	Summary.....	92

## **7. Anhang**

7.1.	Abkürzungsverzeichnis.....	94
7.2.	Tabellenverzeichnis.....	97
7.3.	Abbildungsverzeichnis.....	98
7.4.	Literaturverzeichnis.....	100

<b>8. Erklärung.....</b>	<b>112</b>
--------------------------	------------

<b>9. Danksagung.....</b>	<b>113</b>
---------------------------	------------

# **1. Einleitung**

## **1.1. Thrombozyten**

### **1.1.1. Bildung und Abbau**

Thrombozyten entwickeln sich aus myeloiden Stammzellen, die zunächst zu Megakaryozyten heranreifen. Diese verlassen das Knochenmark und zerfallen bei der Passage durch die Pulmonalarterien in etwa 1000 Plättchen pro Megakaryozyt. Die Blutplättchen sind bei den Säugetieren und Menschen kernlos und 2 bis 4  $\mu\text{m}$  groß (1). Bei Vögeln und Reptilien sind sie hingegen kernhaltig und 4 bis 8  $\mu\text{m}$  im Durchmesser (1).

Die Zahl der zirkulierenden Thrombozyten variiert stark zwischen den verschiedenen Spezies. So liegen die physiologischen Werte beim Hund zwischen 150.000 und 180.000 pro  $\mu\text{l}$  Blut, bei der Katze bei 550.000 pro  $\mu\text{l}$ , beim Pferd zwischen 90.000 und 300.000 pro  $\mu\text{l}$  (2) und bei der Ratte bei 1.000.000 pro  $\mu\text{l}$  (1). Die Thrombozytenzahl beim Menschen liegt bei 150.000 bis 400.000 pro  $\mu\text{l}$  Blut (Tabelle 1).

Die Lebensdauer der Plättchen beträgt bei den Haussäugetieren 3 bis 10 Tage und beim Menschen 8 bis 12 Tage. Während der Alterung der Plättchen kommt es zu Veränderungen der Zellmembran, so dass die Zellen des retikuloendothelialen Systems der Lunge, der Milz und im geringeren Maß auch der Leber diese erkennen und die alten Thrombozyten phagozytieren können (1,3).

	Hund	Katze	Mensch	Ratte	Pferd
Durchmesser ( $\mu\text{m}$ )	2 - 4	2 - 4	2 - 4	2 - 4	2 - 4
Höhe ( $\mu\text{m}$ )	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Anzahl pro $\mu\text{l}$ Blut	150.000 - 180.000	500.000 - 550.000	150.000 - 400.000	~1.000.000	90.000 - 300.000
Lebensdauer (Tage)	3 -10	3 -10	8 -12	3 -10	3 -10

∞

**Tabelle 1: Vergleich der physiologischen Werte von Thrombozyten verschiedener Spezies (1,2)**

### 1.1.2. Morphologie

Die Plättchenmorphologie wird nach den Funktionen der Zellstrukturen in drei Bereiche gegliedert (3,4):

- **Membrankomplex**
- **Zellplasma und Zytoskelett**
- **Granula und Organellen**

- **Membrankomplex**

Die Plasmamembran ist eine Lipiddoppelschicht, die hauptsächlich aus Cholesterin und Phospholipiden besteht. Bei der Thrombozytenaktivierung verändert sich die Phospholipidorganisation, wodurch u.a. Rezeptorbindungen ermöglicht werden. Auch kommt es zur Bildung des Plättchenfaktors 3 und dadurch mit induziert zu einer gesteigerten Thrombinsynthese. Das dabei entstehende Fibrin bildet mit Rezeptoren der Thrombozyten stabile Verbindungen zwischen den Blutplättchen (4).

Von außen wird die Plasmamembran von einer Glykokalix umhüllt, welche aus Glykoproteinen und Glykolipiden aufgebaut ist. Sie enthält eine Vielzahl von Membranproteinen, die u.a. als Rezeptoren oder Adhäsionsmoleküle der Zellinteraktion dienen (3,4,5,6,7,8). Die Plasmamembran weist Invaginationen auf, welche als offene, kanalikuläre Systeme (surface connected system, SCS) bezeichnet werden. Bei der Aktivierung und dem damit verbundenen Formwandel der Plättchen wird dieses Membranreservoir ausgestülpt und bewirkt somit eine Oberflächenvergrößerung. Dem Membrankomplex zugehörig ist außerdem das geschlossene Kanalsystem. Es kann mit dem sarkoplastischen Retikulum der Muskelzellen verglichen werden und ist ein bedeutender Speicherort für freie Kalziumionen. Diese werden bei der Thrombozytenaktivierung freigesetzt und führen zu einer Formänderung des Zytoskeletts der Thrombozyten. Zudem wird hier Thromboxan A<sub>2</sub> durch die Zyklooxygenase II produziert, welches ebenfalls die Aktivierung und Aggregation der Plättchen auslösen oder verstärken kann (3,4,8).

- **Zellplasma und Zytoskelett**

Zellplasma und Zytoskelett bilden eine strukturelle Zone, die für die Bewegung und Formänderung der Thrombozyten verantwortlich ist. Das Zytoskelett besteht aus folgenden Komponenten:

- **Mikrotubuli**

Diese submembranös gelegenen Proteinfilamente stabilisieren die bikonvexe Form des ruhenden Thrombozyten (3,9).

- **Mikrofilamente**

Die Mikrofilamente bestehen hauptsächlich aus Aktin, welches über Filamin mit dem Glykoprotein (GP) Ib der Plasmamembran verbunden ist. Sie leiten bei der Aktivierung der Blutplättchen die Strukturänderung der Mikrotubuli ein und bewirken die Ausbildung von Pseudopodien. Somit sind sie in hohem Maße an der Formänderung des aktivierten Thrombozyten beteiligt (3,9).

- **Intermediäre Filamente**

Die intermediären Filamente, bestehend aus Desmin und Vimentin, sind mit den Mikrotubuli verbunden und unterstützen diese in ihrer Funktion. Zugleich stehen sie mit den Aktinfilamenten in Verbindung und bilden mit diesen die sogenannte Sol-Gel-Zone (3,9).

- **Granula und Organellen**

Als Zellorganellen besitzen Thrombozyten u.a. Mitochondrien, den Golgi-Apparat, Ribosomen und Granula.

Die **granulären Strukturen** lassen sich in  $\alpha$ -Granula, dichte Granula (dense bodies), Lysosomen und Peroxisomen einteilen (3,10).

Die  **$\alpha$ -Granula** repräsentieren die in größter Anzahl vorliegenden Zellorganellen.

Sie umfassen 15% des Thrombozytenvolumens und beinhalten z.B.

- Enzymhemmer ( $\alpha$ 1-Antitrypsin,  $\alpha$ 2-Makroglobulin,  $\alpha$ 2-Antiplasmin)
- adhäsive Proteine (Fibrinogen, Fibronectin, von-Willebrand-Faktor (vWF), Thrombospondin, Vitronectin, Glykoprotein-IIb/IIIa-Oberflächenrezeptor (GPIIb/IIIa))
- Wachstumsfaktoren (platelet derived growth factor, transforming growth factor  $\beta$ )

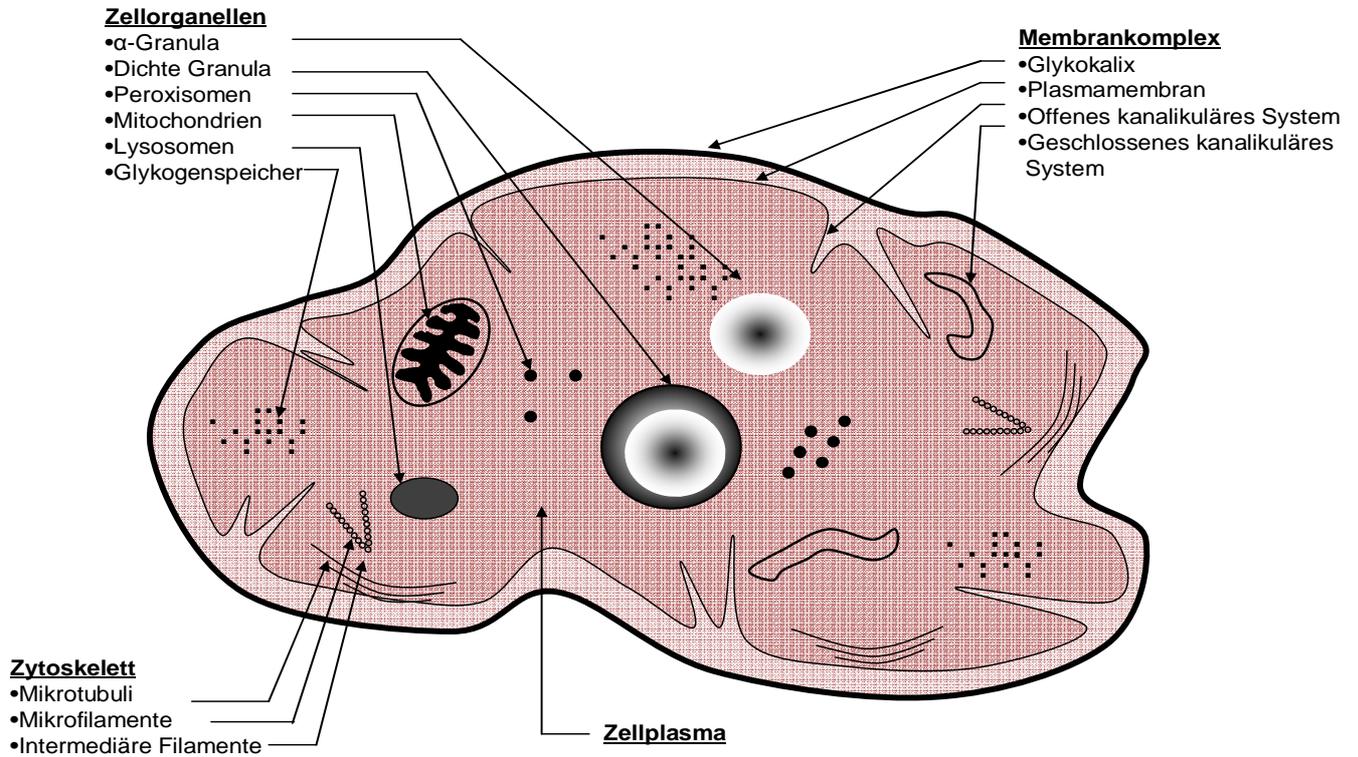
- zytokinähnliche Proteine (Interleukin1, CD40-Ligand, Plättchenfaktor 4,  $\beta$ -Thromboglobulin)
- Koagulationsfaktoren (Plasminogen, Faktor V, Faktor XI, Fibrinogen, Protein S)

Die **dichten Granula** enthalten Adenosindiphosphat (ADP), Serotonin und Kalzium. Diese Substanzen dienen vor allem der Thrombozytenaktivierung (8).

**Lysosomen** beinhalten eine Reihe hydrolytischer Enzyme wie Kollagenase, Elastase und Heparinase, die bei der Wundheilung, der Auflösung von Gerinnseln und bei Umbauvorgängen der subendothelialen Matrix der Intima eine wichtige Rolle spielen (10, 11).

Die Peroxidasen der **Peroxisomen** sind hauptsächlich für den Abbau freier Radikale zuständig (3,8,10,11).

Eine zusammenfassende Darstellung der Thrombozytenmorphologie findet sich in Abbildung 1.



**Abbildung 1: Morphologie des Thrombozyten** (modifiziert nach Gawaz et al., 6)  
 Aufteilung der Struktur des Thrombozyten in den Membrankomplex (u.a. Rezeptoren für Aktivierung und Interaktion, Speicherort für Kalziumionen), das Zytoskelett (verantwortlich für Zellstruktur und Strukturänderung bei Aktivierung), Zellplasma und Zellorganellen (u.a. Speicherort für Aktivierung und Aggregation notwendiger Substanzen).

### **1.1.3. Physiologie**

#### **1.1.3.1. Primäre Hämostase**

##### **Adhäsion**

Die primäre Adhäsion der Plättchen an die verletzte Gefäßwand ist der erste Schritt des mehrstufigen Prozesses der Hämostase (12). Im Blut zirkulierende Thrombozyten lagern sich dabei an den von-Willebrand-Faktor (vWF) und Kollagen an, welche sich in der subendothelialen Matrix befinden und bei einer Endothelverletzung freigelegt werden. Der vWF ist ein hochmolekulares, multimeres Protein, welches sich durch die Bindung an Kollagen so verändert, dass es mit hoher Affinität an den Glykoprotein-Ib/V/IX-Komplex der Plättchenoberfläche binden kann. Durch die Gefäßverletzung werden auch Substanzen freigesetzt, die zu einer Vasokonstriktion führen. Die dadurch bedingten erhöhten Scherkräfte, die auf die Blutplättchen einwirken, führen zu einer verstärkten Aktivierung der Thrombozyten und einem vermehrten Kontakt zum verletzten Endothel, was die Adhäsion der Plättchen an das Endothel begünstigt. Dabei bindet der endotheliale vWF an den GP Ib/V/IX-Rezeptor und Kollagen an den GP VI-Rezeptor der Thrombozyten. Durch die weitere Bindung der Plättchen an Proteine der subendothelialen Oberfläche, wie z. B. GP Ia/IIa an Kollagen, GP Ic/IIa an Fibronektin und GP Ic/II an Laminin, wird die Bindung stabilisiert.

##### **Aktivierung**

Durch die Bindung der Thrombozyten an das verletzte Endothel und auch durch Substanzen, die im Rahmen der Endothelverletzung freigesetzt werden, wie z.B. ADP und Thrombin, kommt es zur Aktivierung der Plättchen und nachfolgend deren Formveränderung. Durch Ausbildung von Pseudopodien (Ausstülpungen der Plasmamembran) wird die Zelloberfläche vergrößert, wodurch eine gesteigerte Rezeptorexpression und eine effektivere Interaktion der Thrombozyten ermöglicht wird (4).

Die Zellaktivierung führt auch zu einer Konformationsänderung des GP IIb/IIIa-Rezeptors, welche die Freilegung von Bindungsstellen für Fibrinogen bewirkt. Da der GP IIb/IIIa-Rezeptor an mehreren Stellen an Fibrinogen binden kann, können zwischen den Thrombozyten Fibrinogenbrücken entstehen, welche die Thrombozyten untereinander zu einem festen Thrombus verbinden. Weiterhin wird die Thromboxan A<sub>2</sub>-Synthese aktiviert. Durch Erhöhung der zytoplasmatischen Kalziumkonzentration, unter anderem durch Freisetzung aus dem geschlossenen Kanalsystem, wird die Freisetzung von Arachidonsäure aus der Phospholipidmembran durch die Phospholipase A<sub>2</sub> katalysiert. Aus der Arachidonsäure wird durch die COX I im Thrombozyten Thromboxan A<sub>2</sub> gebildet. Dieses stimuliert über den Thromboxanrezeptor des Thrombozyten unter anderem die Freisetzungsreaktion von Inhaltstoffen der Speichergranula und trägt damit zur Autoaktivierung der Thrombozyten bei.

### **Sekretion**

Die aktivierten Thrombozyten sezernieren aus den Speichergranula eine Vielzahl von Substanzen, die zu einer Verstärkung der Plättchenaktivierung und -adhäsion, der plasmatischen Gerinnung, der Gefäßkonstriktion, sowie der Aktivierung und Rekrutierung von weiteren Zellen wie Leukozyten und Fibroblasten beitragen (12). Zudem setzen Plättchen antimikrobielle Peptide, inflammatorische Zytokine und weitere Komponenten der Immunabwehr frei. So wird durch Thrombozyten mittels Interaktion mit Leukozyten und vaskulären Zellen auch die zellvermittelte (T-Lymphozyten) und humorale (Immunglobulin-vermittelte, B-Lymphozyten) Immunantwort induziert (13). Den Blutplättchen kommt somit neben ihrer zentralen Rolle bei der Hämostase auch in der Immunfunktion eine besondere Bedeutung zu.

Im Nachfolgenden sind einige granuläre Inhaltsstoffe aufgeführt, die während der Freisetzungsreaktion aus verschiedenen Komponenten sezerniert werden (8):

- dichte Granula: ADP, Adenosintriphosphat (ATP), Serotonin, Kalzium
- $\alpha$ -Granula:  $\beta$ -Thromboglobulin, Plättchenfaktor 4, Wachstumsfaktoren (z.B. platelet-derived growth factor), transmembranöse Proteine, P-Selektin, vWF, Fibrinogen, Gerinnungsfaktor V
- Lysosomen: Hydrolasen (z.B. Kollagenase, Elastase)

Die freigesetzten Stoffe verstärken autokrin die eigene Stimulation und führen parakrin zur Aktivierung ruhender Blättchen (Thrombozytenrekrutierung).

Insbesondere dem ADP kommt hierbei eine wichtige Funktion für die Verstärkung der Thrombozytenaktivierung zu (14).

ADP bewirkt zum einen eine Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration über zwei verschiedene Wege: Durch Bindung an den P2X1-Rezeptor, der einen membranständigen Kalziumkanal darstellt, kommt es zum Einstrom von extrazellulärem Kalzium und durch Aktivierung des P2Y1-Rezeptors führt ein über ein G-Protein (Gq) vermittelter Mechanismus zur Freisetzung von Kalzium aus intrazellulären Speichern. Zum anderen aktiviert ADP den P2Y<sub>12</sub>-Rezeptor, der über ein inhibitorisches G-Protein (Gi) vermittelten Mechanismus unter anderem die Adenylatzyklase hemmt und damit zu einem Abfall der intrazellulären Konzentration von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) führt (8). Dieser Abfall löst eine Reihe von Folgeprozessen aus, die zusammen mit den kalziumvermittelten Prozessen zur Formveränderung und Thrombozytenaktivierung führen.

Da der P2Y<sub>12</sub>-Rezeptor thrombozytenspezifisch ist und ohne diesen Rezeptor die purinerg vermittelte Thrombozytenaktivierung nicht stattfinden kann, ist dieser ein geeigneter Ansatzpunkt für antithrombotische Wirkstoffe.

## **Aggregation**

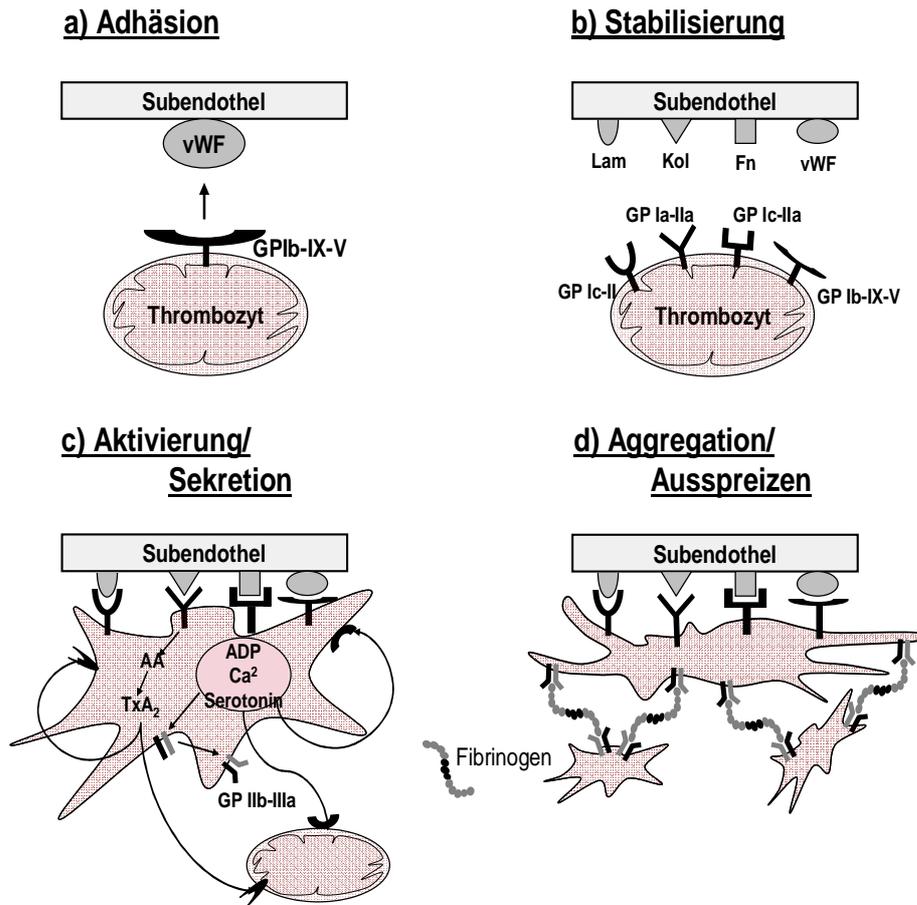
Die Aggregation der Blutplättchen lässt sich in eine primäre und eine sekundäre Phase unterteilen:

- Bei der **Primären Aggregation** kommt es zu einer lockeren, reversiblen Fibrinogenbrückenbildung zwischen den Thrombozyten. Dabei wird das freie Fibrinogen von den GPIIb/IIIa-Rezeptoren auf der Thrombozytenoberfläche gebunden. Die GPIIb/IIIa-Rezeptoren erfahren bei der Thrombozytenaktivierung durch Thrombin, Kollagen, ADP und andere Aktivatoren eine Konformationsänderung, die eine Fibrinogenbindung erst ermöglicht (4,12). Außer Fibrinogen können auch vWF, Fibronectin, Vitronectin und Thrombospondin an die GPIIb/IIIa-Rezeptoren binden. Die zentrale Rolle dieses Rezeptors zeigt sich beim genetisch bedingten Funktionsverlust des GPIIb/IIIa-Rezeptors (Morbus Glanzmann-Naegeli). Menschen mit dieser Erkrankung leiden unter einer erhöhten Blutungsneigung (15,16).

- Die **Sekundäre Aggregation** tritt zeitverzögert nach einigen Minuten auf, nachdem die aktivierenden Inhaltstoffe der  $\alpha$ -Granula und der dichten Granula freigesetzt worden sind. Dabei handelt es sich u.a. um ADP, ATP, Kalzium und Serotonin.

Diese Stoffe bewirken u.a. durch Bindung an die jeweiligen Rezeptoren auf der Thrombozytenoberfläche eine Verstärkung der Eigenaktivierung des Thrombozyten und zusätzlich die Aktivierung anderer Blutplättchen. Durch Folgeprozesse werden die Fibrinogenverbindungen zwischen den Plättchen irreversibel. Die Endothelläsion wird schließlich durch das „Ausspreizen“ der adhäsierten Thrombozyten und durch die Fibrinbildung als Endprodukt der humoralen Gerinnungskaskade gänzlich abgedichtet (4,12).

Die Abbildung 2 fasst die beschriebenen Schritte der primären Hämostase zusammen.



**Abbildung 2: Verlauf der primären Hämostase** (modifiziert nach Gawaz et al., 6)

- Adhäsion des Thrombozyten an das Subendothel über die Bindung des Glykoproteinrezeptor GP Ib/IX/V mit dem von-Willebrand-Faktor (vWF).
- Stabilisierung der Adhäsion des Thrombozyten an das Subendothel über weitere Glykoproteinrezeptor vermittelte Bindungen.
- Aktivierung des Thrombozyten und Sekretion einer Vielzahl von aggregationsfördernden Substanzen.
- Vollständiges Abdichten der Endothelläsion durch „Ausspreizen“ (Vergrößerung der Oberfläche) des Thrombozyten.

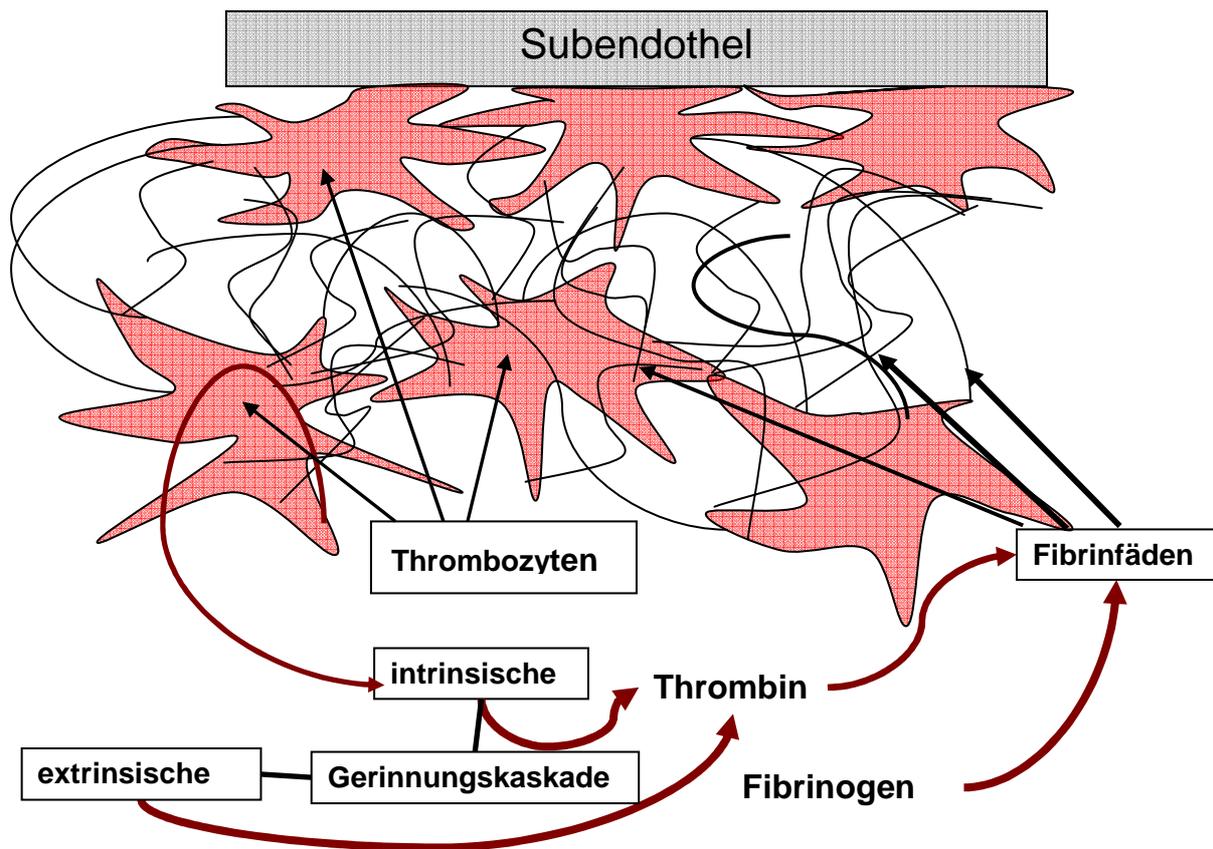
### **1.1.3.1. Sekundäre Hämostase**

Als sekundäre Hämostase bezeichnet man die Konsolidierung des primären Plättchenthrombus, welche mit Hilfe des plasmatischen Gerinnungssystems und der daraus hervorgehenden Fibrinbildung erfolgt (10). Eine Übersicht gibt Abbildung 3. Das plasmatische Gerinnungssystem lässt sich in einen intrinsischen und extrinsischen Weg der Aktivierung untergliedern.

Bei kleinen Endothelschädigungen wird neben den Thrombozyten das intrinsische System aktiviert. Ausgelöst wird die Aktivierung dadurch, dass der im Blut zirkulierende Plasmafaktor XII mit anderen Strukturen der Gefäßwand als dem Endothel in Kontakt kommt. Dieser aktivierte Faktor XII löst die kaskadenartige Aktivierung weiterer Plasmafaktoren (XI,IX) aus und führt schließlich über die Aktivierung des Faktors X zusammen mit dem Thrombozytemfaktor III, dem Plasmafaktor V und Kalzium zur Thrombin- und damit zur Fibrinbildung. Mit Hilfe des Faktors XIIIa wird aus den Fibrinfäden ein Fibrinnetz gebildet, welches das Blutplättchenaggregat konsolidiert (8).

Bei größeren Gewebedefekten kommt es durch Beteiligung des Gewebefaktors („tissue factor“) zur Aktivierung des extrinsischen Systems. Dabei bewirken Gewebefaktor, Plasmafaktor VII und Kalzium eine Aktivierung des Faktors X. Die nachfolgenden Schritte der Kaskade sind identisch mit dem intrinsischen Weg.

Die Thrombozyten sind an der Aktivierung der plasmatischen Gerinnung entscheidend beteiligt. Sie sezernieren Faktoren und Stimulanzen, die den Ablauf der Gerinnungskaskade ermöglichen und katalysieren (8).



**Abbildung 3: Die sekundäre Hämostase**

Auf der Oberfläche von aktivierten Plättchen lagern sich über Phospholipide und spezifische Rezeptoren Gerinnungsfaktoren an. Als Endprodukt der humoralen Gerinnung entstehen Fibrinfäden, die den Thrombus stabilisieren.

#### **1.1.4. Pathophysiologie**

Thrombozytopenien, die in angeborene und erworbene Formen unterteilt werden, stellen die häufigsten Thrombozytopathien dar.

Die angeborenen Thrombozytopenien gehen meist aus einer Erkrankung des Knochenmarks hervor, so dass eine Knochenmarkstransplantation oder die Behandlung mit Wachstumsfaktoren bei symptomatischen Formen Therapieoptionen sind. Bei den erworbenen Thrombozytopenien differenzieren sich diese der Ursache nach in eine verminderte Thrombozytenbildung, in einen gesteigerten Abbau und in Verteilungsstörungen.

Die verminderte Bildung der Blutplättchen kann durch Medikamente, Noxen oder ionisierende Strahlen hervorgerufen werden. Der gesteigerte Abbau von Thrombozyten kann durch Infektionserkrankungen, durch die disseminierte intravasale Gerinnung, durch Medikamente oder autoimmun bedingt sein. Eine Verteilungsstörung erfolgt meist infolge einer Splenomegalie. Bei den meisten dieser Erkrankungen kommt es nach Heilung der Grunderkrankung wieder zu einer Normalisierung der Zellzahl (17).

Weitere Thrombozytopathien lassen sich ebenfalls in angeborene und erworbene Erkrankungen unterscheiden, wobei die angeborenen Funktionsstörungen selten sind. Die erworbenen Defizite der Funktionsfähigkeit können bei Niereninsuffizienz, Lebererkrankungen, Tumoren, disseminierter intravasaler Gerinnung, Amyloidose, antithrombozytären Antikörpern, Myelodysplasien, Leukämien und Behandlung mit Medikamenten auftreten. Auch hier können sich die Zellzahlen nach Behandlung der Grunderkrankung wieder normalisieren (16).

## **1.2. Bedeutung der Thrombozyten in der Kardiologie**

### **1.2.1. Kardiovaskuläre Erkrankungen**

Herz-Kreislaufkrankungen des Menschen sind die häufigste Todesursache in Deutschland. Nahezu jeder zweite Bundesbürger, starb 2008 an einer Erkrankung des Herz-Kreislauf-Systems (18).

Thrombozyten spielen bei den Herz-Kreislaufkrankungen, insbesondere bei den artherosklerotischen Erkrankungen, eine zentrale Rolle (19,20,21). Dies ist beispielsweise beim akuten Myokardinfarkt der Fall, bei dem es aufgrund einer Plaqueruptur der inneren Gefäßwand zu einer überschießenden Aktivierung, Adhäsion und Aggregation der Thrombozyten kommt (22). Die von aktivierten Thrombozyten sezernierten vasoaktiven Substanzen begünstigen durch lokale Vasokonstriktion die Thrombusbildung zusätzlich, so dass es zu einem thrombotischen Gefäßverschluss kommen kann (19).

Die Blutplättchen sind auch bei der Entstehung der Artherosklerose entscheidend beteiligt (23,24,25). Sie triggern die initiale Ablagerung von Lipiden, von komplexen Kohlenhydraten und von Kalzium in das Endothel ebenso wie inflammatorische Prozesse, welche die Migration von Entzündungszellen unterstützen.

Die Monozyteneinwanderung in die Gefäßwand, die oxydierten „low density lipoprotein“ (LDL) -Partikel und die durch Phagozytose von lipidreichem Material aus Makrophagen entstandenen Schaumzellen bilden die ersten sichtbaren artherosklerotischen Veränderungen der Intima. Je nach Vorliegen von kardiovaskulären Risikofaktoren wie Hypertonie, Hypercholesterinämie, Diabetes mellitus oder Nikotinabusus schreiten diese Veränderungen unterschiedlich schnell voran und führen auch zu einer erhöhten Thrombozytenaktivität. Insbesondere Gefäßabschnitte, die unter der Einwirkung großer Scherkräfte stehen, z.B. Gefäßaufzweigungen, sind für artherosklerotische Veränderungen prädestiniert.

Die aktivierten Thrombozyten sind in der Lage, über die Sekretion von Zytokinen, Interleukinen und über Rezeptor-Interaktionen sogar in einer intakten Intima inflammatorische Veränderungen hervorzurufen (22). Diese Veränderungen des Endothels führen wiederum zu einem Anstieg der aktivierten Thrombozyten und somit zu einem *circulus vitiosus*.

### **1.2.2. Katheterinterventionen**

Bei der koronaren Herzerkrankung des Menschen hat sich die perkutane Koronarintervention mit Implantation von Gefäßstützen (Stents) als Standardtherapie des akuten Koronarsyndroms aber auch der stabilen Angina pectoris (sofern der Patient trotz konservativer Therapie nicht beschwerdefrei wird) etabliert (26,27). Bei der Implantation des Stents wird dieser mittels eines Katheters lediglich unter leichter Sedierung über die A. femoralis oder die A. brachialis unter angiographischer Sichtkontrolle bis in die Koronararterien eingeführt und dort nach Ballondilatation der Stenose oder direkter Stentimplantation abgesetzt. Dabei hängt die kurz- und langfristige Erfolgsrate entscheidend von der Wahl des Stents (28), der Komplexität der Stenosen (Gefäßgröße, Anzahl und Ausdehnung der Läsionen) (29), von der antithrombozytären Begleitmedikation (30,31,32,33) und von der Erfahrung des intervenierenden Kardiologen ab (34,35).

Bei der perkutanen transluminalen Koronarintervention (PTCA) wird durch mechanische Verletzungen und der damit verbundenen Exposition subendothelialer thrombogener Substanzen eine verstärkte Plättchenaktivierung induziert (36). Somit besteht eine erhöhte Gerinnungsneigung in den betroffenen Gefäßabschnitten. Obwohl die Restenoserate mittels Stentimplantation gegenüber der alleinigen Ballonangioplastie deutlich reduziert werden konnte (37,38,39,40), treten bei dieser Technik auch Komplikationen wie z. B. die subakute Stentthrombose auf (41). Hierbei spielt die Thrombozytenaktivierung eine zentrale Rolle, wie Studien, welche die Korrelation des Auftretens von subakuten Stentthrombosen mit dem Ausmaß der Plättchenaktivierung untersuchten, gezeigt haben (42,43). Die Oberfläche des Stents bewirkt als Fremdkörper einen großen Aktivierungsreiz, der zur Adhäsion und Aggregation von Thrombozyten bis hin zum thrombotischen Verschluss des Stents führen kann. Aktuell werden aufgrund der geringeren Restenoseraten anstatt der reinen Metallstents (bare metal stents, BMS) immer mehr medikamentenbeschichtete Stents (drug eluting stents, DES) eingesetzt (44,45). Bei den zur Beschichtung verwendeten Substanzen handelt es sich um Immunsuppressiva wie Sirolimus (z.B. im Cypher® Stent verwendet) oder Zytostatika wie Paclitaxel (z.B. im Taxus® Stent verwendet), welche eine Intimahyperproliferation, die eine erneute Lumenverengung bewirken kann, verhindern sollen. Da diese Stents den jeweiligen Wirkstoff über längere Zeit abgeben und damit eine verzögerte Endothelialisierung bewirken, ist auch der Zeitraum, in der durch diese Stents eine pathologisch gesteigerte Gerinnung

getriggert werden kann, verlängert (45). Trotz ständiger Verbesserung der Interventionsstechnik und des Materials bleibt gerade in der frühen postinterventionellen Phase noch ein beachtliches Risiko für In-Stent-Thrombosen und frühe Restenosen bestehen (26,46). Eine die Thrombozytenfunktion hemmende Therapie hat daher bei der Behandlung artherosklerotischer Erkrankungen und bei Patienten nach Gefäßinterventionen einen zentralen Stellenwert.

In der Kleintiermedizin wurden in den letzten Jahren zunehmend kardiovaskuläre Erkrankungen diagnostiziert und therapiert. Hierbei handelt es sich vor allem um Kardiomyopathien (z.B. hypertrophe und dilatative Kardiomyopathie) sowie Herzklappenfehlfunktionen (z.B. Mitralklappenendokardiose), aber auch angeborene Herzfehler, die klinisch als Herzinsuffizienz in Erscheinung treten (47).

Sowohl die diagnostischen als auch die therapeutischen Möglichkeiten zeigen in der Veterinärmedizin eine rapide Weiterentwicklung. So wurden u.a. interventionelle Techniken aus der Humanmedizin in die Tiermedizin übertragen (48). Kardiologische Katheterinterventionen werden inzwischen vor allem bei Hunden angewendet. Als Indikationen hierfür kommen aktuell der Verschluss eines persistierenden Ductus arteriosus (49), die Dilatation von schweren Pulmonalstenosen (50) oder von fibrösen, ringförmigen Subaortenstenosen (48) und die therapeutische Ablation bei Tachyarrhythmien (51) in Frage.

Die Pulmonalstenose gehört mit einer Inzidenz von 1/1000 zu den häufigsten angeborenen Herzerkrankungen beim Hund (52). Bei hochgradigen Stenosen wird die Katheterintervention beim Hund inzwischen als Mittel der Wahl mit einer Erfolgsrate von 80% durchgeführt (53). Dabei wird der Katheter über die rechte V. jugularis und die rechte Herzkammer in die Pulmonalarterie eingeführt (54). Durch die Aufweitung der Gefäßengstelle wird der Druckgradient zwischen rechtem Herz und Pulmonalarterie auf physiologische Werte reduziert (53).

In diesem Zusammenhang wird die zentrale Rolle der Thrombozyten oft nur ungenügend berücksichtigt. Prospektive Studien sind daher nötig, um die Vorteile einer adäquaten Begleit- bzw. Prämedikation zur Minimierung thromboembolischer Komplikationen insbesondere auch in der Kleintiermedizin zu untersuchen.

## 1.3. Thrombozyteninhibierende Medikamente

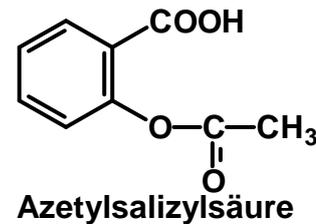
Als orale Thrombozytenaggregationshemmer finden beim Menschen vor allem die Azetylsalizylsäure (ASS) und Thienopyridine Verwendung.

### 1.3.1. Azetylsalizylsäure

2-Azetoxybenzoesäure

Summenformel:  $C_9H_8O_4$

Molekulargewicht: 180,16



Azetylsalizylsäure (ASS) wurde 1897 erstmals von dem deutschen Chemiker und Apotheker Felix Hoffmann synthetisiert und dann am 6. März 1899 unter dem Namen Aspirin als Arzneimittel zugelassen. Die ASS fand zunächst hauptsächlich Verwendung als nicht-steroidales Antiphlogistikum und Antipyretikum. Der antiaggregatorische Effekt auf Thrombozyten wurde zu Beginn der 50er Jahre des letzten Jahrhunderts beschrieben, und bereits im Jahr 1956 veröffentlichte Craven eine erste Untersuchung zur Prävention des Myokardinfarkts und des Schlaganfalls (55). ASS hat sich danach in einer Vielzahl von großen klinischen Studien als Standard in der Therapie und der Prophylaxe atherothrombotischer Krankheitsbilder etabliert (56). Die Behandlung mit ASS senkt signifikant die Inzidenz von akuten und subakuten Komplikationen bei Patienten, die sich einer perkutanen transluminalen Koronarintervention (PTCA) unterziehen (57). Bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom konnte durch die Therapie mit ASS eine deutliche Reduktion der Mortalität und ischämischer Ereignisse erreicht werden (58,59,60).

Der Eingriff in den Arachidonsäurestoffwechsel als zugrunde liegender Wirkungsmechanismus konnte 1971 durch Vane nachgewiesen werden (61). ASS vermittelt die antiaggregatorische Wirkung über die Azetylierung und folglich irreversible Hemmung der ubiquitär vorkommenden Zyklooxygenase (COX) I in den Thrombozyten. Dabei dringt die ASS in den hydrophoben Kanal des Enzyms ein und azetyliert einen Serinrest in Position 530 (56).

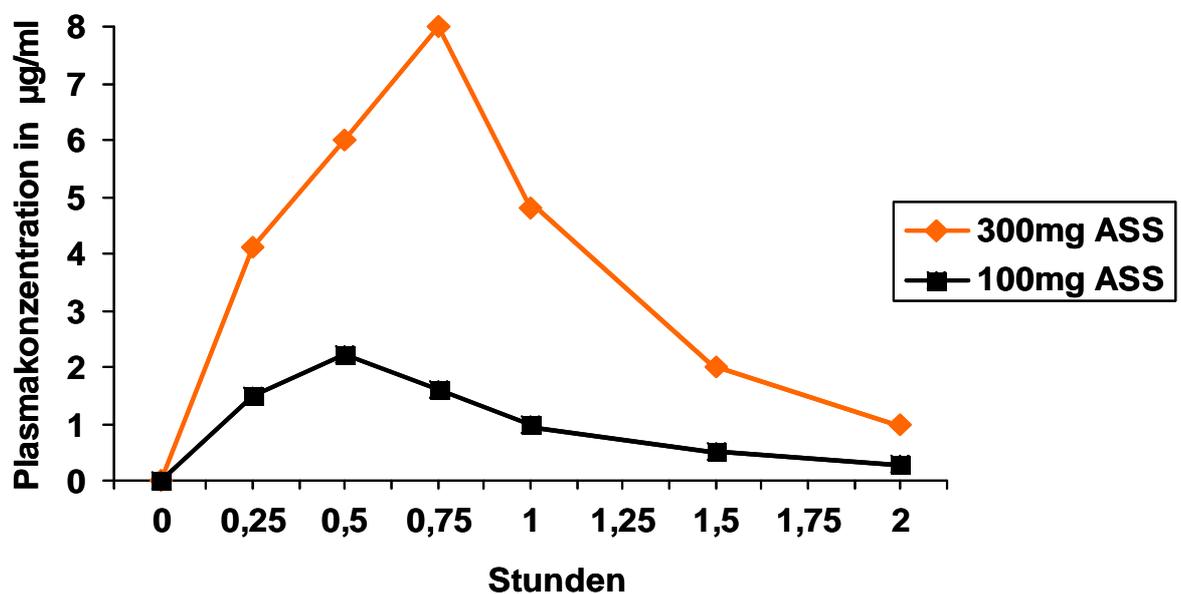
Dieser ist selbst nicht Bestandteil des aktiven Zentrums, sondern lediglich dem katalytisch aktiven Tyr385 am Ende eines hydrophoben Kanals im Inneren der COX-1 benachbart. Als Folge der Azetylierung von Ser530 kommt es zu einer sterischen Blockade, die das Vordringen des endogenen Substrates Arachidonsäure zum katalytischen Zentrum verhindert und damit das Enzym irreversibel hemmt, das die Bildung von proaggregatorischem Thromboxan A<sub>2</sub> katalysiert. Dieses steht unter physiologischen Bedingungen im Gleichgewicht mit seinem Gegenspieler Prostazyklin (synonym Prostaglandin I<sub>2</sub>), dessen Synthese in den Endothelzellen ebenfalls durch COX-1 vermittelt ist. Da Thrombozyten keinen Zellkern besitzen, können sie COX-1 im Gegensatz zu den Endothelzellen nicht nachsynthetisieren. Somit hält die Hemmung für die gesamte Lebensdauer der Thrombozyten (8 bis 12 Tage) an und das Gleichgewicht verschiebt sich zugunsten des antiaggregatorischen Prostazyklins (56). Nach Einnahme antithrombotisch wirksamer Dosierungen von ASS (100 bis 300 mg/Tag) findet die Azetylierung der Thrombozyten bereits im Pfortadersystem statt, während in der systemischen Zirkulation praktisch keine unveränderte ASS nachweisbar ist. Erst in höheren Dosierungen wird die durch Entzündungsmediatoren induzierbare COX II inhibiert, die jedoch in einigen Geweben ebenfalls konstitutiv exprimiert wird.

Die plättchenhemmende Wirkung von ASS ist limitiert. Zwar kommt es nach Einnahme von höheren Einzeldosen aufgrund der Hemmung der durch Kollagen und Arachidonsäure induzierten Aggregation und Freisetzungsreaktion zu einer Verlängerung der Blutungszeit, die durch potentere Agonisten (z.B. Thrombin) induzierte Thrombozytenaggregation wird aber kaum beeinflusst (62). Dies bildet die Rationale für die Kombination von ASS mit anderen thrombozyteninhibierenden Substanzen bei bestimmten Indikation wie z. B. mit Thienopyridinen in der interventionellen Kardiologie nach Angioplastie bzw. Stentimplantation, wo durch die synergistische Wirkung der Kombination die antiaggregatorische Wirkung von ASS verstärkt wird.

ASS wird nach oraler Gabe bereits im Magen beginnend resorbiert, weshalb maximale Plasmakonzentrationen bereits 15-30 Minuten nach Einnahme schnell freisetzender Darreichungsformen erreicht werden. Dies erklärt auch teilweise die hohe Inzidenz von gastralen Nebenwirkungen (Blutungsneigung der Magenschleimhaut, Ulkusbildung). ASS unterliegt einer präsystemischen Metabolisierung sowohl im Gastrointestinaltrakt als auch in der Leber, wobei nach Einnahme analgetischer Dosierungen ca. 30% zu Salizylat und Azetat hydrolysiert werden. Die

Bioverfügbarkeit beträgt somit ca. 70%. Die Plasmaproteinbindung von ASS liegt bei 60% (63).

Die Plasmahalbwertszeit der Salizylsäure ist dosisabhängig. Es existiert ein Übergang der Eliminationskinetik erster Ordnung in die Kinetik nullter Ordnung (hepatische Sättigungskinetik) durch Sättigung der metabolisierenden Enzyme. Damit erklärt sich die Kumulation von Salizylsäure nach hohen Dosen. Die Metaboliten werden renal eliminiert. Der Anteil an Salizylsäure, der über die Nieren ausgeschieden wird, liegt pH-abhängig zwischen 5% im sauren und 85% im alkalischen Urin (63).



**Abbildung 4: Plasmakonzentration von ASS in Abhängigkeit von Zeit und der Dosis** (modifiziert nach Gawaz et al.,64)

Die orange Linie zeigt die Konzentration im Blutplasma nach Einnahme von 300 mg ASS p.o., die schwarze Linie die Plasmakonzentration nach 100 mg ASS p.o.

In der Tiermedizin ist der Einsatz von ASS begrenzt. ASS ist für Tiere nur als Kombinationspräparat mit Sulfadimidin und Sulfamerazin zugelassen.

Bei Kleintieren verwendet man ASS zur Behandlung von Muskel- und Gelenkschmerzen, bei Katzen zusätzlich als Thromboseprophylaxe bei bestehender Herzerkrankung (65). Dabei ist die verminderte Glucuronidierungsfähigkeit von ASS der Katze zu berücksichtigen. Die Maximaldosis für Hunde beträgt 25mg/kg alle 8 Stunden, bei Katzen 25mg/kg jedoch nur alle 24 Stunden (66).

Zu den häufigsten Nebenwirkungen bei den Haussäugetieren zählen hämorrhagische Ulcera der Magen- und Darmschleimhaut, die respiratorische Alkalose durch verstärkte Aktivierung des Atemzentrums und die dadurch erhöhte Kohlendioxidabatemung (66).

### **1.3.2. Thienopyridine**

Die Thienopyridine Ticlopidin, Clopidogrel und Prasugrel sind Inhibitoren der ADP-vermittelten Plättchenaktivierung. Sie führen zu einer Aggregationshemmung, indem sie irreversibel den purinergen P2Y<sub>12</sub> Rezeptor an der Plättchenoberfläche blockieren. Wie weiter oben bereits beschrieben, reguliert dieser Rezeptor über einen G-Protein vermittelten Weg die Aktivität der Adenylatzyklase und damit die intrazelluläre cAMP Konzentration (8).

Thienopyridine werden klinisch meist zusammen mit der Azetylsalizylsäure verwendet. Doch auch als Monotherapie können Thienopyridine effektiv eingesetzt werden. In der „Ticlopidin Aspirin Stroke Study“ (TASS) (67) beispielsweise erhielten Patienten mit hohem Schlaganfallrisiko entweder Ticlopidin oder Aspirin. Dabei konnte das Risiko für Schlaganfall und Tod bei den Ticlopidin-Patienten innerhalb von zwei bis sechs Jahren signifikant reduziert werden.

Die duale thrombozytenhemmende Therapie (Thienopyridin und ASS) wird vor allem nach perkutanen koronaren Interventionen mit Stentimplantationen eingesetzt. Hier wurden mehrere Studien (30,31,32,33) durchgeführt, welche die Kombinationstherapie von ASS und oraler Antikoagulation mit ASS plus Ticlopidin verglichen. In der ISAR-Studie (30) konnte eine signifikante Reduktion schwerwiegender kardio-vasculärer Ereignisse (Myokardinfarkt, Reintervention, Bypassoperation) innerhalb der ersten vier Wochen nach Intervention bei der ASS plus Ticlopidin-Gruppe im Vergleich zur ASS plus Antikoagulation-Gruppe gezeigt werden. Blutungskomplikationen traten nur bei mit ASS und Antikoagulation behandelten Patienten auf. Diese Ergebnisse wurden später in drei weiteren großen Studien (FANTASTIC (32), MATTIS (31) und STARS (33)) bestätigt, in die Patienten nach perkutaner Koronarintervention und Implantation von reinen Metall-Stents eingeschlossen wurden. Verglichen wurde ASS allein oder ASS plus Antikoagulationstherapie mit ASS plus Ticlopidin, wobei unter ASS plus Ticlopidin-Therapie jeweils eine deutlich geringere klinische Ereignisrate verzeichnet wurde.

Die in diesen Studien nachgewiesene Überlegenheit der dualen plättchenhemmenden Therapie im Vergleich zur Kombination aus initial Heparin gefolgt von oraler Antikoagulation mit ASS sowohl in der Reduktion ischämischer Ereignisse als auch in der Reduktion von Blutungskomplikationen hat der perkutanen Koronarintervention mit Stentimplantation den Weg für eine breite klinische Anwendung gebahnt.

Thienopyridine selbst sind pharmakologisch unwirksam (sogenannte „pro-drugs“). Sie müssen erst durch Metabolismus im Körper des Patienten in die wirksamen Metabolite umgewandelt werden, die dann den P2Y<sub>12</sub>-Rezeptor der Thrombozyten irreversibel inhibieren. Ticlopidin und Clopidogrel unterscheiden sich in ihrer Pharmakokinetik und insbesondere im Spektrum und der Häufigkeit von unerwünschten Wirkungen (68). Da der Metabolismus des Clopidogrel in den letzten Jahren intensiv untersucht wurde, wird die metabolische Bioaktivierung beispielhaft im Kapitel 1.3.2.2. Clopidogrel dargestellt.

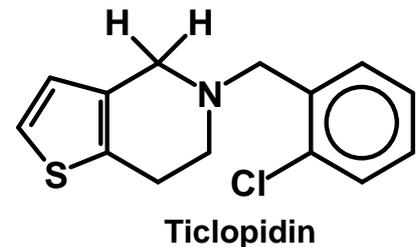
### 1.3.2.1. Ticlopidin

Thienopyridin: Ticlopidin

5-(2-Chlorbenzyl)- 4,5,6,7-tetrahydrothieno [3,2-c] pyridin

Summenformel: C<sub>14</sub>H<sub>14</sub>ClNS

Molekulargewicht: 263,79



Ticlopidin ist das erste klinisch verwendete Thienopyridin (64). Es unterscheidet sich in der Molekularstruktur nur durch das Fehlen einer COOH-Gruppe von Clopidogrel. Die Metabolisierung zur pharmakologisch aktiven Substanz erfolgt, wie bei Clopidogrel, über mehrere Schritte, an denen vor allem das Cytochrom-P-450-System der Leber beteiligt ist.

Nach oraler Verabreichung wird Ticlopidin nahezu vollständig resorbiert. Die Elimination erfolgt praktisch vollständig nach Metabolisierung in der Leber, wobei ca. 50-60% der Dosis in Form der gebildeten Metabolite renal und 23-30% intestinal ausgeschieden werden. Ticlopidin ist reversibel (zu 98%) an Plasmaproteine vorwiegend Serumalbumin und Lipoproteine gebunden. Die Eliminationshalbwertszeit beträgt nach Erreichen des Steady State etwa 30-50 Stunden. Bei Ticlopidin lassen sich zahlreiche Interaktionen mit anderen Pharmaka nachweisen (69).

So reduziert die gleichzeitige Anwendung von Antazida den Ticlopidinplasmaspiegel um 20-30%, während dessen dieser beispielsweise durch Cimetidin angehoben wird. Ticlopidin verlängert zudem die Halbwertszeit von Theophyllin im Plasma (69).

Die klinische Anwendung von Ticlopidin ist von zahlreichen zum Teil schwerwiegenden unerwünschten Wirkungen begleitet. So treten bei mit Ticlopidin behandelten Patienten lebensbedrohliche Blutbildveränderungen wie Neutropenien in 2,4% der Patienten auf. In seltenen Fällen wurden auch von der gefürchteten, potenziell letal verlaufenden Thrombotisch-Thrombozytopenischen Purpura (TTP, Moschcowitz-Syndrom) berichtet (69). Aufgrund der eingeschränkten hämatologischen Verträglichkeit müssen zu Beginn der Therapie alle 2 Wochen Blutbildkontrollen durchgeführt werden. Daneben treten auch häufiger gastrointestinale Beschwerden (abdominaler Schmerz, Diarrhoe, Vomitus, Refluxösophagitis, Obstipationen), Kopfschmerzen und Hautauschläge auf (69).

Eine Hemmung der Plättchenaggregation ist innerhalb von zwei Tagen nach Verabreichung von 2x 250 mg Ticlopidin täglich nachweisbar. Das Maximum der Wirkung tritt erst nach 5- bis 8-tägiger Behandlung mit zweimal täglich 250 mg ein. Um die Zeit bis zur maximalen Wirkung zu verkürzen, können prinzipiell zu Beginn der Therapie höhere Bolusdosen verabreicht werden (Abbildung 6). Wegen der eingeschränkten Verträglichkeit kann von Ticlopidin allerdings maximal eine Bolusdosierung von nur 1000 mg einmalig gegeben werden.

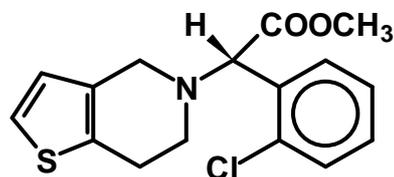
### 1.3.2.2. Clopidogrel

Thienopyridin: Clopidogrel

(Methyl-(RS) $\alpha$ -(Chlorphenyl)-6,7-dihydrothieno[3,2-c]pyridin-5(4H)-acetat )

Summenformel: C<sub>16</sub>H<sub>16</sub>ClNO<sub>2</sub>S

Molekulargewicht: 321,83



**Clopidogrel**

Clopidogrel wurde 1998 in Deutschland zugelassen und hat aufgrund der besseren Verträglichkeit im Vergleich zu Ticlopidin dieses in der Therapie praktisch vollständig ersetzt.

So konnte in der CLASSICS -Studie (Clopidogrel Aspirin Stent International Cooperative Studie, 70) eine deutliche Reduktion der Nebenwirkungen wie Blutungen, Blutbildveränderungen um 50% bei Patienten nach PCI unter Clopidogrel im Vergleich zu Ticlopidin beobachtet werden ( $p=0,005$ ). Die CAPRIE-Studie (Clopidogrel vs. Aspirin in Patients at Risk of Ischemic Events, 71) verglich Clopidogrel mit ASS bei Patienten mit bereits erlittenem Myokardinfarkt, Schlaganfall oder symptomatischer peripherer arterieller Verschlusskrankheit (pAVK) als Therapie zur Sekundärprophylaxe. In dieser Studie mit 19185 Patienten konnte der klinische Vorteil von Clopidogrel gegenüber ASS in Form einer signifikanten Risikoreduktion des Auftretens kardio-vaskulärer Ereignisse insbesondere für spezielle Risikogruppen, wie Diabetes mellitus Patienten oder Patienten, die sich zuvor einer Bypassoperation unterzogen hatten, gezeigt werden.

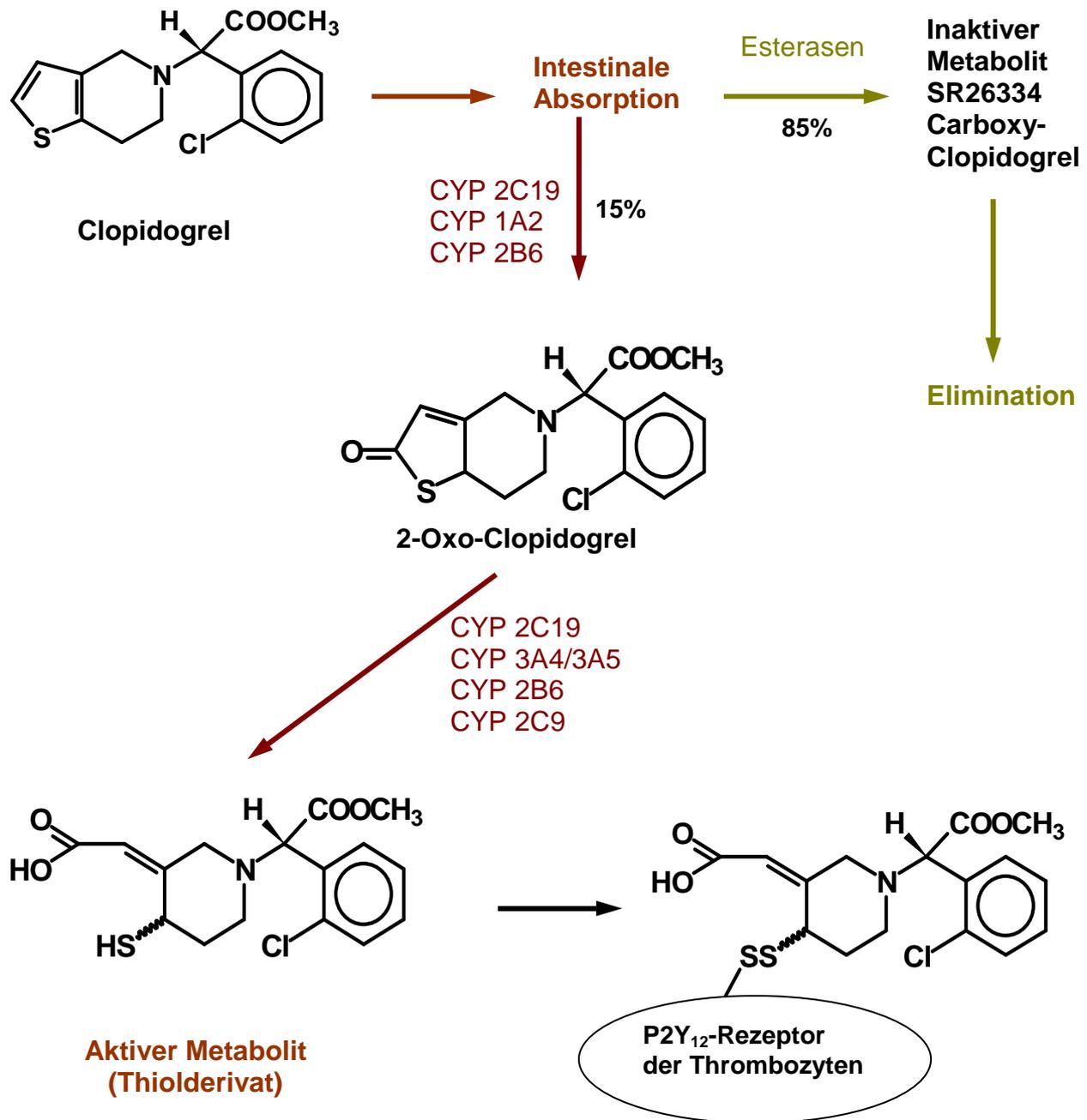
Patienten, mit akutem Koronarsyndrom wurden im Rahmen der CURE-Studie (Clopidogrel in Unstable Angina to Prevent Recurrent Ischemic Events, 72) entweder mit ASS plus Clopidogrel oder mit ASS plus Placebo behandelt. Der primäre Endpunkt (Myokardinfarkt, Schlaganfall oder kardio-vaskulärer Tod) wurde in der ASS plus Clopidogrel-Gruppe während der drei bis zwölf monatigen Behandlungsdauer signifikant ( $p<0,001$ ) weniger häufig notiert. Die PCI-CURE-Studie (73) umfasste aus der CURE-Studie die Subgruppe von Patienten mit akutem Koronarsyndrom, bei denen eine Koronarintervention durchgeführt wurde. Diese Gruppe profitierte besonders von der ASS plus Clopidogrel-Kombinationstherapie. Es wurde eine Reduktion des Endpunktes (s.o.) um 30% erzielt.

In diesen Studien wurde die Überlegenheit der Kombinationstherapie aus ASS und Clopidogrel in der Prävention ischämischer Komplikationen nach perkutaner Koronarintervention mit Stent-Implantation gegenüber der Monotherapie mit ASS gezeigt. Aufgrund der Ergebnisse wurde die so genannte duale Plättchenhemmertherapie als Standard in die Leitlinien aller großen kardiologischen Fachgesellschaften übernommen. Die empfohlene Therapiedauer beträgt bei Verwendung eines reinen Metallstents (bare metal stent - BMS) vier Wochen nach der Intervention, bei Verwendung eines arzneimittelfreisetzenden Stents (drug eluting stent - DES) 6 bis 12 Monate nach Intervention (74).

Wie alle Thienopyridine steht Clopidogrel ausschließlich zur peroralen Anwendung zur Verfügung. Nach Einnahme einer Einzeldosis von 75 mg werden im Mittel Spitzenkonzentrationen der freien unveränderten Substanz von etwa 2,2- 2,5 ng/ml ungefähr 45 Minuten nach der Einnahme erreicht. Ausgehend vom Nachweis im Urin ausgeschiedener Clopidogrel-Metabolite beträgt die Resorptionsquote mindestens 50%. Clopidogrel und der hauptsächlich zirkulierende (inaktive) Metabolit binden *in vitro* reversibel an menschliche Plasmaproteine (jeweils zu 98% und 94%) (75).

Die Elimination erfolgt durch Metabolismus in der Leber, wobei auch der wirksame Metabolit entsteht. Nach erfolgter Resorption werden 85% des Clopidogrels von relativ unspezifischen Karboxylesterasen durch Hydrolyse des Esters in das pharmakologisch unwirksame Karboxylsäurederivat SR 26334 umgewandelt. SR 26334 ist der zirkulierende Hauptmetabolit. Nur 15% des Arzneistoffs werden in der Leber durch das Cytochrom-P450-System zu einem ersten intermediären Metaboliten umgewandelt. Durch Oxidation am Thiophenring entsteht dabei 2-Oxo-Clopidogrel (76). In einem zweiten, ebenfalls durch Enzyme des Cytochrom P450-Systems katalysierten Schritt, wird aus 2-Oxo-Clopidogrel der sehr reaktive aber instabile aktive Metabolit gebildet, der von Savi et al. chemisch als 2-{1-[(1S)-1-(2-Chlorophenyl)-2-Methoxy-2-Oxoethyl]-4-Sulfanyl-3-piperidinyli-diene}-Essigsäure identifiziert werden konnte (76). Der aktive Metabolit reagiert mit seiner freien Sulfhydryl-Gruppe mit einem Cysteinylrestes des P2Y<sub>12</sub>-Rezeptors, wodurch dieser irreversibel inhibiert wird (Abbildung 5). Die Eliminationshalbwertszeiten von Clopidogrel, Carboxy-Clopidogrel und des aktiven Metaboliten wurden von Taubert und Mitarbeitern nach Verabreichung von Bolusdosen von 600 mg Clopidogrel mit im Mittel 1,0, 1,9 bzw. 0,7 Stunden bestimmt (77).

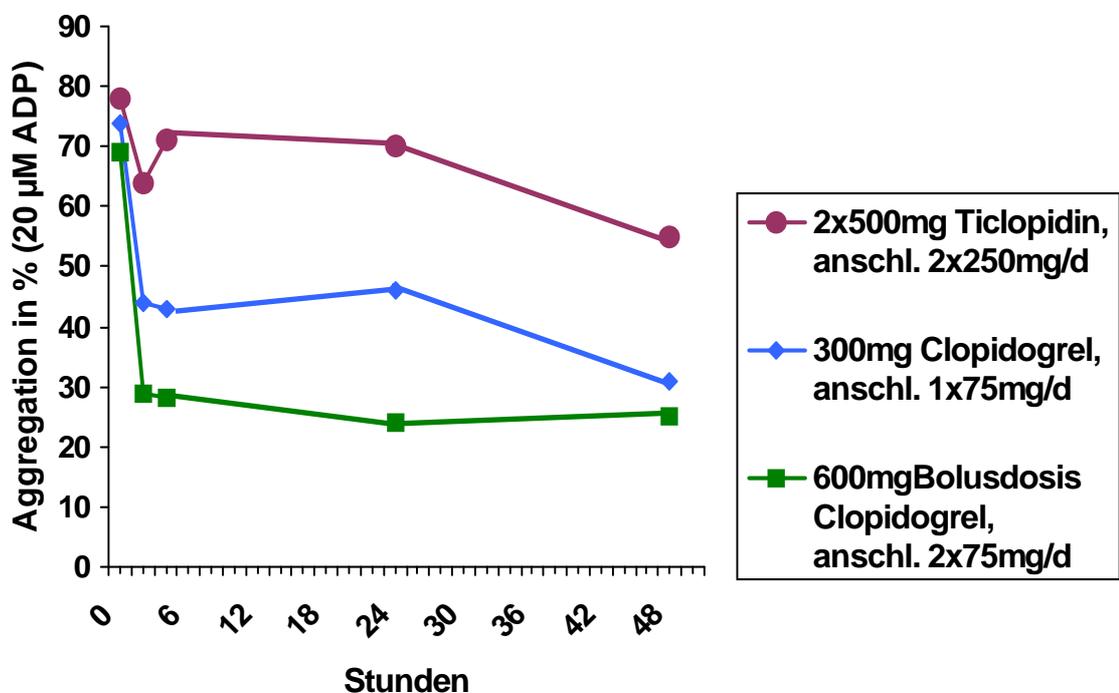
In den letzten Jahren konnte der Beitrag verschiedener Cytochrom P450-Enzyme, die alle polymorph exprimiert werden, an der Bioaktivierung von Clopidogrel aufgeklärt werden. So katalysieren in *in vitro* Untersuchungen CYP1A2, CYP2B6 and CYP2C19 die Bildung von 2-Oxo-Clopidogrel wobei der relative Beitrag 35,8, 19,4 and 44,9% beträgt. Wird im gleichen System 2-Oxo-Clopidogrel als Substrat in Gegenwart von Glutathion eingesetzt, sind CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19 und CYP3A4 an der Umwandlung in den aktiven Metaboliten beteiligt. Zu diesem Stoffwechselschritt tragen CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19 und CYP3A4 32,9, 6,76, 20,6 und 39,8% bei (78).



### Abbildung 5: Metabolismus von Clopidogrel

Clopidogrel wird mehrheitlich durch Esterasen in einen inaktiven Metaboliten (Carboxy-Clopidogrel SR26334) umgewandelt. In der Leber wird zunächst 2-Oxo-Clopidogrel gebildet, aus dem anschließend durch Öffnung des Thiolactonrings der aktive Metabolit entsteht. An beiden Stoffwechselschritten sind verschiedene Cytochrom P450 Isoenzyme beteiligt. Der aktive Thiolmetabolit bildet Disulfidbrücken mit SH-Gruppen des P2Y<sub>12</sub>-Rezeptors der Thrombozyten und inhibiert diesen für die Lebensdauer des Plättchens (modifiziert nach 79,80).

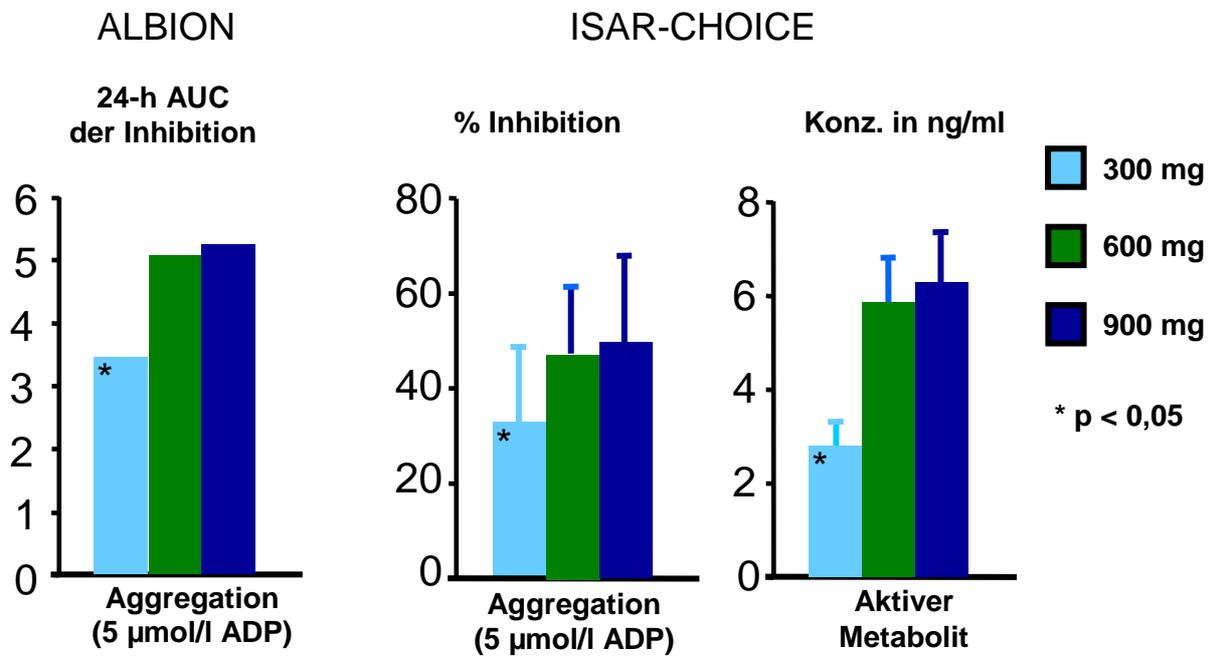
Um einen schnellen Wirkungseintritt zu erzielen, wird die Clopidogrel-Behandlung in der Kardiologie in der Regel durch die Gabe einer Bolusdosis eingeleitet. Nach einer Dosis von 300 mg Clopidogrel wird im Vergleich zu einer Bolusdosis von 1000 mg Ticlopidin ein schnellerer Wirkungseintritt beobachtet (Abbildung 6), wobei der Wirkungseintritt durch Steigerung der Bolusdosis auf 600 mg Clopidogrel noch weiter beschleunigt werden kann (81). Hochholzer und Mitarbeiter konnten in einem großen Patientenkollektiv zeigen, dass 2 Stunden nach einer Dosis von 600 mg Clopidogrel im Mittel das Maximum der thrombozyteninhibierenden Wirkung erreicht ist (82).



**Abbildung 6: Wirkungseintritt von Ticlopidin vs. Clopidogrel**

gemessen mittels optischer Aggregometrie nach Stimulation mit 20 µmol/l ADP. Für beide Clopidogreldosierungen zeigte sich für alle Messzeitpunkte ein signifikanter Unterschied zum Ausgangswert ( $p < 0.05$ ). Dies wurde nach Ticlopidingabe erst am letzten Messzeitpunkt nach 48 Stunden erreicht, modifiziert nach Müller et al. (81).

Eine weitere Steigerung der Bolusdosierung auf 900 mg Clopidogrel zeigt keine weitere Zunahme der plättchenhemmenden Wirksamkeit (83,84). Nach Untersuchungen von von Beckerath und Mitarbeitern (84) beruht dies auf der fehlenden Dosisproportionalität in der systemischen Verfügbarkeit des aktiven Metaboliten von Clopidogrel (Abbildung 7)



**Abbildung 7: Dosisabhängigkeit der Inhibition der ADP-induzierten Thrombozytenaggregation und Plasmakonzentration des aktiven Metaboliten von Clopidogrel nach Gabe einer Bolusdosis von 300mg, 600mg und 900mg Clopidogrel (modifiziert nach 83, 84).**  
AUC - Fläche unter der Aggregations-Zeit-Kurve.

Nebenwirkungen können bei Clopidogrel in Form von gastrointestinalen Störungen wie Vomitus, Diarrhoe, Nausea und epigastralen Schmerzen auftreten. Vereinzelt werden Leukozytopenien beobachtet (75).

Unter Behandlung mit Clopidogrel treten erheblich interindividuelle Unterschiede in der Wirkstärke auf. Diese werden in Kapitel 1.3.4. näher dargestellt.

Im Jahr 2009 wurde das neue Thienopyridin Prasugrel zugelassen, das eine konstantere und potentere Hemmung der Thrombozytenfunktion bewirkt und damit die klinische Ereignisrate bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom weiter reduzieren kann, was allerdings auch mit einer höheren Blutungsrate assoziiert ist (85). Es ist denkbar, dass Prasugrel oder weitere aktuell in der Entwicklung oder Zulassung befindliche Präparate Clopidogrel als das Standard-Thienopyridin in Zukunft ablösen könnten.

### **1.3.3. Weitere Thrombozytenfunktionshemmer**

#### **Glykoprotein-IIb/IIIa-Rezeptor-Antagonisten**

Die Glykoprotein-IIb/IIIa-Rezeptor-Antagonisten blockieren direkt den Glykoprotein-IIb/IIIa-Rezeptor, wodurch eine schnelle und effektive antiaggregatorische Wirkung erzielt wird. Sie blockieren damit die Endstrecke der Thrombozytenaktivierung, verhindern aber die vorausgehende Zellaktivierung nicht. Die drei aktuell klinisch verwendeten Substanzen sind:

1. Abciximab (ReoPro®), ein chimäres Derivat des monoklonalen Mausantikörpers (Fab-Fragment) 7E3. Um unerwünschten immunologischen Abwehrreaktionen vorzubeugen, wurde er so humanisiert, dass nur noch die Bindungsregion an den GPIIb/IIIa-Rezeptor dem ursprünglichen Antikörper entspricht. Abciximab bindet irreversibel an den Rezeptor (86).
2. Eptifibatid (Integrelin®), ein zyklisches Peptid, das reversibel an die KGD-Sequenz des GPIIb/IIIa-Rezeptors bindet (87)
3. Tirofiban (Aggrastat®), das an die RGD-Sequenz des GPIIb/IIIa-Rezeptors ebenfalls reversibel bindet (88).

Klinisch werden diese Substanzen aufgrund ihrer intravenösen Applikation mit anschließend unmittelbarem Wirkungseintritt vor allem bei Patienten, die einer Akut-PCI bei akutem Myokardinfarkt unterzogen werden, verwendet. Hier zeigte sich eine signifikant niedrigere klinische Ereignisrate unter GPIIb/IIIa-Rezeptorblockergabe (89).

## **Dipyridamol**

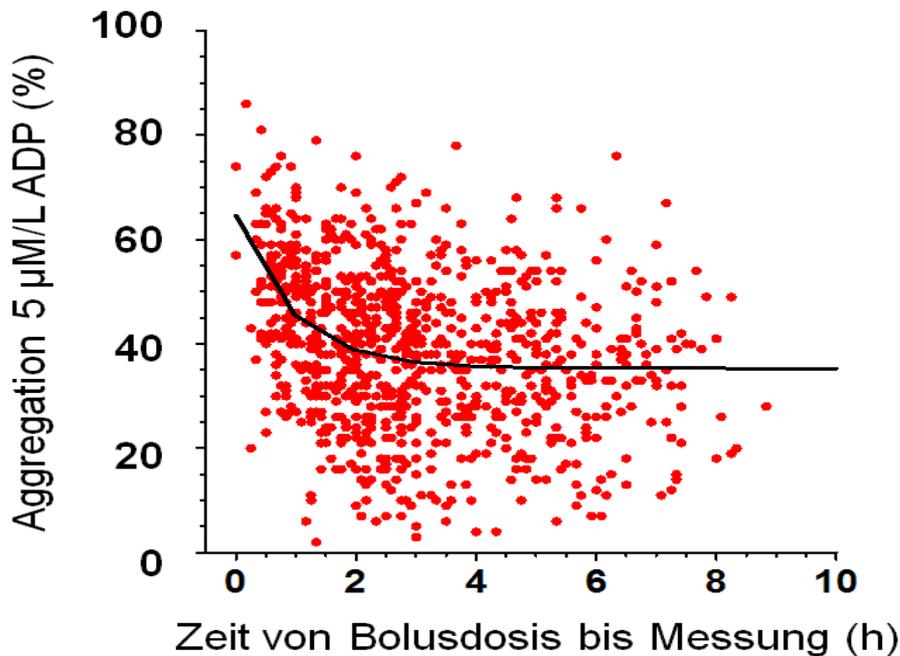
Dieser Arzneistoff wird als Fixkombination mit Azetylsalizylsäure (Aggrenox®) vertrieben. Die Wirkung von Dipyridamol erfolgt über eine Hemmung der Phosphodiesterase, die einen Anstieg von cAMP zur Folge hat, wodurch wiederum die Konzentration von freien  $\text{Ca}^{++}$ -Ionen im Cytosol der Thrombozyten gesenkt wird. Dieser Mechanismus erklärt die Inhibition der Thrombozytenaggregation (90). Des Weiteren wird die Wiederaufnahme von Adenosin in die Präsynapse durch Inhibition des Adenosintransporters blockiert, was zu einer Relaxation der glatten Muskelzelle führt. Das Kombipräparat wird zur Rezidivprophylaxe nach einem aufgetretenen Schlaganfall verwendet, auch wenn der Nutzen im Vergleich zur Monotherapie mit ASS umstritten ist (91).

Weitere Medikamente zur Inhibition der Thrombozytenfunktion, die sich aktuell noch in der Erprobung oder Zulassung befinden, sind neuartige, reversible  $\text{P2Y}_{12}$ -Rezeptorblocker wie z.B. Ticagrelor (92) und PAR-1 Rezeptorblocker, die einen bestimmten Thrombinrezeptor des Thrombozyten blockieren (93).

Die Abbildung 8 veranschaulicht nochmals die Angriffspunkte der verschiedenen antithrombozytären Substanzen. Die Thrombozyten exprimieren auf ihrer Oberfläche Rezeptoren, über welche die Zellaktivierung möglich ist (4,8). Es handelt sich hierbei um ADP-bindende Rezeptoren ( $\text{P2Y}_{12}$ ,  $\text{P2Y}_1$  und  $\text{P2X}_1$ ) sowie um Rezeptoren für Kollagen-, Serotonin-, Thrombin-, Vasopressin-, Adrenalin-, Plättchen aktivierender Faktor (PAF)-, Thromboxan A<sub>2</sub> und Fibrinogen (GPIIb/IIIa).



Die folgende Abbildung zeigt die Variabilität der ADP-induzierten Thrombozytenaggregation nach Gabe einer Bolusdosis von 600 mg Clopidogrel bei Patienten vor elektiver Koronarangiographie (82).



**Abbildung 9: Variabilität der Thrombozytenaggregation nach Clopidogrelbolusgabe.**

Jeder einzelne Punkt repräsentiert einen von 1001 gemessenen Patienten. Die schwarze Linie entspricht der Mediankurve. Die Variabilität in der Zeit ergab sich daher, dass die Thrombozytenreaktivität vor Koronarangiographie gemessen wurden, die nicht zu einer standardisierten einheitlichen Zeit nach Gabe der Bolusdosis von 600 mg Clopidogrel erfolgte (82).

Die Abbildung 9 zeigt die erhebliche interindividuelle Variabilität in der Wirkung von Clopidogrel auf die Thrombozyten bei Einnahme der gleichen Dosis. Zwei Stunden nach Einnahme der Bolusdosis von 600 mg Clopidogrel ist im Mittel keine weitere Abnahme der Thrombozytenreaktivität mehr zu verzeichnen.

Die klinische Bedeutung dieser Variabilität konnte unter anderem in der EXCELSIOR (Extent of Clopidogrel-Induced Platelet Inhibition During Elective Stent Implantation on Clinical Event Rate)-Studie (104), die 802 Patienten mit geplanter koronarer Stentimplantation einschloss, gezeigt werden. In dieser Untersuchung erhielten alle Patienten vor Koronarintervention eine Bolusdosis von 600 mg Clopidogrel, gefolgt

von einer täglichen Erhaltungsdosis von 75 mg. Zudem wurden alle Patienten mit ASS in einer Dosis zwischen 100 und 300 mg täglich behandelt.

Die Thrombozytenfunktion wurde mittels optischer Aggregometrie (Stimulation mit 5 µM ADP) zum Zeitpunkt der Koronarintervention gemessen. Eine Aggregation oberhalb des Medians der Kohorte (End-Aggregation 14%) war mit einem 6,5-fach erhöhten Risiko für das Auftreten schwerwiegender kardiovaskulärer Komplikationen (Tod, Myokardinfarkt, dringende Zielläsionsreintervention) innerhalb von 30 Tagen nach Intervention assoziiert (104). Die auf einen Kontrollzeitraum von einem Jahr erweiterte nachfolgende Analyse zeigte, dass eine erhöhte Thrombozytenreaktivität (End-Aggregation >14%) gemessen am Tag nach der Intervention nach Gabe einer Bolusdosis von 600 mg Clopidogrel und der ersten Erhaltungsdosis von 75 mg eine 3-fach erhöhte 1-Jahresinzidenz von Tod oder Myokardinfarkt zur Folge hatte (105).

Zuvor wurde diese Korrelation von Thrombozytenfunktion unter Clopidogreltherapie und klinischer Ereignisrate nach Katheterintervention bereits beschrieben (106). Je nach Arbeitsgruppe und verwendeter Definition werden bei 4 bis 50% der Patienten unter Therapie mit Clopidogrel eine unzureichende Hemmung der Thrombozytenaggregation berichtet (98).

Als Ursache für die Variabilität im Ansprechen auf Clopidogrel werden neben Unterschieden in der intestinalen Resorption (77) Unterschiede in der hepatischen Metabolisierung aufgrund von Arzneimittelinteraktionen (107) diskutiert. Zahlreiche andere Medikamente sind ebenfalls Substrate der an der Bioaktivierung von Clopidogrel beteiligten Isoenzyme CYP1A2, CYP2B6, CYP3A4/5 bzw. CYP2C19 des Cytochrom P450-Systems (108). Einzelne Studien deuteten auf Interaktionen mit Statinen (Inhibitoren der Cholesterinsynthese, Substrate von CYP3A4 und CYP3A5) und Protonenpumpeninhibitoren (Inhibitoren der Magensäuresynthese, Substrate von CYP2C19) hin.

Umfangreiche klinische Studien zeigen jedoch, dass die Therapie mit Statinen keinen Einfluss auf die thrombozyteninhibierende Wirkung von Clopidogrel hat (109,110). Eine aktuelle Untersuchung konnte keinen Unterschied in der klinischen Ereignisrate bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom und Clopidogrelmedikation mit und ohne Protonenpumpeninhibitoren als Begleittherapie nachweisen (111).

Für etliche der an der Bildung des aktiven Metaboliten von Clopidogrel beteiligten Cytochrome sind Polymorphismen beschrieben. So konnte gezeigt werden, dass der \*2-Polymorphismus des CYP2C19 mit einer verminderten

Thrombozytenfunktionshemmung nach Clopidogrelgabe assoziiert ist (105). Die klinische Relevanz dieses Polymorphismus zeigten z.B. Mega et. al. (112).

### **1.3.5. Antithrombozytäre Therapie in der Kleintiermedizin**

Ein Indikationsgebiet für aggregationshemmende Substanzen liegt in der Kleintiermedizin bei der Prävention von Thromboembolien (62).

Der dies bezüglich meist eingesetzte Wirkstoff ist die ASS. Insgesamt gibt die Literatur jedoch wenig Hinweise. Bei Katzen mit hypertropher Kardiomyopathie und bei solchen, die bereits einen thromboembolischen Gefäßverschluss erlitten haben, wird eine antithrombozytäre Therapie mit ASS angewandt. Bei dieser Spezies wird eine Verabreichung in dreitägigem Abstand zur optimalen COX-I-Hemmung in den Thrombozyten empfohlen.

Somit wird die Aktivität der endothelialen COX-I, welche über die Prostazyklinsynthese eine antiaggregatorische Wirkung ausübt, möglichst wenig reduziert. Die empfohlene Dosis für Katzen zur Prophylaxe thromboembolischer Ereignisse liegt bei 25 mg/kg jeden dritten Tag (113).

Die Reverschlussraten nach einem bereits erfolgten thrombotischen Verschluss liegen trotz ASS-Gabe nach klinischen Erfahrungsberichten bei Katzen mit 75% inakzeptabel hoch (114). Auch die Anwendung von Antikoagulanzen, wie Heparin und Warfarin, verhindert das erneute Auftreten thromboembolischer Verschlüsse nicht effektiv (115,116).

In der Großtiermedizin ist der Einsatz von Antithrombotika derzeit nicht relevant.

## **2. Hintergrund und Fragestellung**

### **2.1. Hintergrund**

Kardiovaskuläre Erkrankungen sind in der Humanmedizin von großer und in der Tiermedizin von ständig wachsender Bedeutung (117,118). Dabei spielen Thrombozyten bei der Entstehung und Progression atherosklerotischer Erkrankungen, wie der koronaren Herzerkrankung und der Entwicklung akuter ischämischer Syndrome, wie dem akuten Myokardinfarkt, eine zentrale Rolle. Auch ist eine sichere Durchführung perkutaner koronarer Gefäßinterventionen erst seit der Verfügbarkeit effektiver thrombozyteninhibierender Strategien möglich, die eine deutliche Reduktion ischämischer peri- und postinterventioneller Komplikationen, wie der subakuten Stentthrombose, bewirken. Daher wird zur Prophylaxe von thromboembolischen und anderen ischämischen Komplikationen nach koronarer Stentimplantation eine kombinierte thrombozyteninhibierende Therapie, bestehend aus ASS und einem Thienopyridinderivat, bevorzugt Clopidogrel, verwendet. Diese Kombination gilt gegenwärtig als Standardtherapie bei diesen Indikationen (73,119,120).

Allerdings haben vorangegangene Untersuchungen gezeigt, dass der thrombozyteninhibierende Effekt unter der Therapie mit Clopidogrel, trotz der nachgewiesenen klinischen Wirksamkeit, nicht bei jedem Patienten in gleichem Maße vorhanden ist, sondern vielmehr eine erhebliche interindividuelle Variabilität besteht (95,101). Das Auftreten von bedeutsamen peri- und postinterventionellen Komplikationen korreliert sowohl nach elektiver koronarer Stentimplantation (104) als auch bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom (121-124) mit dem Ausmaß der Plättcheninhibition unter Therapie mit Clopidogrel. In der EXCELSIOR Studie konnte gezeigt werden, dass eine residuelle Plättchenaggregation nach Stimulation mit 5  $\mu$ M ADP von >14% nach Gabe einer Bolusdosis von 600 mg Clopidogrel mit einer erhöhten Inzidenz von Tod, Myokardinfarkt oder dringender Reintervention an der Zielläsion innerhalb von 30 Tagen nach Intervention assoziiert war (104).

## **2.2. Fragestellung**

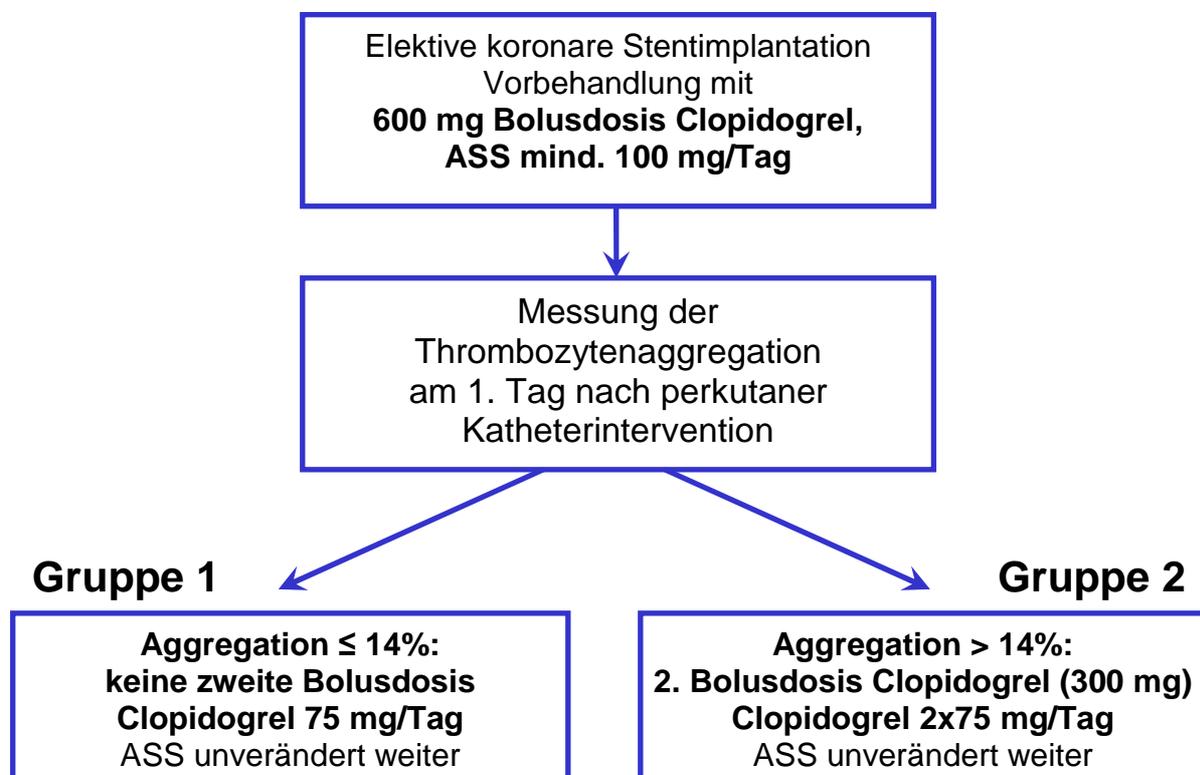
Unter der üblichen Standarddosierung von Clopidogrel beim Menschen kommt es, wie bereits beschrieben, zu erheblichen interindividuellen Differenzen in der Thrombozyteninhibition (95,101). Damit scheint ein gewisser Patiententeil nicht ausreichend vor peri- und postinterventionellen Ereignissen geschützt zu sein (104,105). Daher stellt sich die Frage, in wie weit sich durch eine optimierte antithrombozytäre Therapie, in Form einer individualisierten Dosisanpassung von Clopidogrel, eine Verbesserung der Inhibition der Plättchenaggregation bei den Patienten erzielen lässt.

Daraus geht die Zielsetzung der hier durchgeführten EXCELSIOR-ACT (EXCELSIOR-Advanced Clopidogrel Therapy)-Studie hervor, die als Grundlage der vorliegenden Dissertation dient. Es soll die Fragestellung geprüft werden, ob bei Patienten mit initial unzureichendem Ansprechen auf Clopidogrel mittels einer Verdoppelung der Erhaltungsdosis auf 150 mg über einen Zeitraum von vier Wochen nach Koronarintervention eine signifikant verbesserte Thrombozytenfunktionshemmung erzielt werden kann. Unzureichendes Ansprechen auf Clopidogrel wird dabei gemäß dem klinisch validierten Grenzwert der EXCELSIOR-Studie (End-Aggregation >14% nach Stimulation mit 5 µM ADP) einen Tag nach Erhalt der Bolusdosis bzw. PCI definiert (105).

## 3. Studienaufbau, Patienten und Methoden

### 3.1. Studienaufbau

Die EXCELSIOR-ACT Studie ist eine prospektive, observative Kohortenstudie, die Patienten mit elektiver koronarer Stentimplantation nach Gabe einer Bolusdosis von 600mg Clopidogrel einschloss. Die Patienten wurden je nach Ansprechen auf Clopidogrel am Tag nach Intervention in zwei Gruppen mit unterschiedlicher Behandlung eingeteilt, wie in der folgenden Abbildung dargestellt.



#### **Abbildung 10: EXCELSIOR-ACT-Studienmedikation.**

Die Patienten der Gruppe 1, deren Thrombozytenendaggregation am 1.Tag nach Verabreichung der Bolusdosis von 600 mg Clopidogrel p.o. und nach Einnahme der ersten Erhaltungsdosis von 75 mg bei der Messung mittels optischer Aggregometrie (Stimulation mit 5 µM ADP) bei ≤14% lag, erhielten weiterhin die Erhaltungsdosis von 75 mg/Tag Clopidogrel.

Den Patienten der Gruppe 2, deren Messergebnisse über 14% lagen, wurde einmalig eine weitere Bolusdosis von 300 mg Clopidogrel verabreicht. Anschließend wurden sie für die ersten vier Wochen nach der Intervention mit einer Erhaltungsdosis von 150 mg/Tag Clopidogrel behandelt.

Alle Patienten wurden an Tag 14 und 28 nach Intervention zu Nachkontrollen einbestellt und die Thrombozytenfunktion wurde zu diesen Zeitpunkten bestimmt. Eine weitere Dosisanpassung erfolgte nicht. Nach der letzten Visite (Tag 28) wurde die Therapie mit Clopidogrel beendet bzw. bei Patienten, die eine Indikation für eine längere Behandlung mit Clopidogrel hatten (z.B. Implantation eines medikamentenfreisetzenden Stents), mit 75 mg täglich fortgeführt. Für die Auswertung wurden die Ergebnisse mit 57 Patienten der EXCELSIOR-Studie, welche die gleichen Ein- und Ausschlusskriterien wie die vorliegende Studie hatte, und für die ebenfalls Thrombozytenfunktionswerte nach 14 und 28 Tagen vorlagen, verglichen. Diese Patienten hatten keine Dosisanpassung erhalten und waren mit 75 mg Clopidogrel täglich behandelt worden.

Die EXCELSIOR-ACT Studie wurde gemäß den Richtlinien der Deklaration von Helsinki durchgeführt und von der Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät der Albert-Ludwig-Universität Freiburg (Antrags-Nr. 122/05) genehmigt. Alle Patienten erklärten schriftlich ihr Einverständnis zur Teilnahme, nachdem sie schriftlich und mündlich über mögliche Vorteile und Risiken der Studienteilnahme aufgeklärt wurden.

## **3.2. Patienten**

### **3.2.1. Einschlusskriterien**

Die Patienten hatten für die Teilnahme an der Studie folgende Kriterien zu erfüllen:

- durchgeführte koronare Stentimplantation
- Bolusdosis von 600 mg Clopidogrel (p.o.) vor Koronarintervention
- Vorbehandlung mit ASS ( $\geq 100$ mg/d oral) für mindestens sieben Tage vor Koronarintervention
- Mindestalter 18 Jahre
- schriftliche Einverständniserklärung zur Studienteilnahme

### 3.2.2. Ausschlusskriterien

Von den folgenden Kriterien durfte keines zum Zeitpunkt des Einschlusses in die Studie vorliegen:

- akuter Myokardinfarkt innerhalb der letzten 14 Tage oder aktuell vor Einschluss Troponin T\* > 0,03 ng/ml Blut
- Fibrinolyse innerhalb der letzten 14 Tage
- bestehender kardiogener Schock
- Kontraindikationen für ASS oder Clopidogrel (Überempfindlichkeit gegen den Wirkstoff oder andere Bestandteile des Präparats)
- Behandlung mit oralen Antikoagulantien vom Kumarin-Typ, Heparin (ausgenommen präinterventionelle intraarterielle Gabe zur Thromboseprophylaxe) oder mit Thienopyridinen innerhalb der letzten 7 Tage
- Behandlung mit einem GPIIb/IIIa-Antagonisten während der perkutanen Koronarintervention
- Thrombozytenzahl < 100.000/µl Blut
- bekannte Koagulopathie
- schwerwiegende Erkrankung der Eliminationsorgane (Leber, Niere)
- bedeutsame hämatologische Erkrankung

\*Kardiales Troponin I oder T ist ein Blutmarker für eine Myokardnekrose jeglicher Art. Aufgrund seiner fast 100%igen Myokardspezifität, ist es der Marker der Wahl für diese Fragestellung. Der verwendete Grenzwert von >0.03 ng/ml entspricht für Troponin T der 99% Prozent der Normalbevölkerung, der adaptiert wurde, um einen Variationskoeffizienten von <10% zu erreichen. Ein Verlauf der gemessenen Troponinwerte mit Anstieg über diesen Grenzwert mit anschließendem Abfall stellt eines der drei klinischen Diagnosekriterien für den akuten Myokardinfarkt dar.

### **3.2.3. Medikation der Studienpatienten**

#### **3.2.3.1. Azetylsalizylsäure**

Alle Patienten der EXCELSIOR-ACT-Studie erhielten bereits vor Einschluss in die Studie ASS in einer Dosierung von  $\geq 100$  mg pro Tag (p.o.) als Dauermedikation. Dabei handelte es sich um Präparate unterschiedlicher pharmazeutischer Unternehmen (u.a. Bayer Vital GmbH, Leverkusen; Hexal AG, Holzkirchen; Ratiopharm GmbH, Ulm).

Die Therapieempfehlung bei Entlassung sah bei allen Patienten 100 mg ASS pro Tag als Dauermedikation vor.

#### **3.2.3.2. Clopidogrel**

Alle Patienten der EXCELSIOR-ACT-Studie erhielten vor der geplanten Intervention eine Bolusdosis von 600 mg Clopidogrel p.o. und am nachfolgenden Tag morgens eine erste Erhaltungsdosis von 75 mg. Die weitere Dosierung gliederte sich nach dem Grad der Thrombozytenreaktivität, gemessen mittels optischer Aggregometrie (End-Aggregation, 5  $\mu$ M ADP) am ersten Tag nach der Katheterintervention. Wie bereits in Abbildung 10 dargestellt, erhielten Patienten mit einer Aggregation  $\leq 14\%$  für den Studienzeitraum von 4 Wochen weiterhin Clopidogrel in einer Dosis von 75 mg täglich. Patienten mit einer Aggregation oberhalb dieses Wertes erhielten am Tag nach Koronarintervention eine zweite Bolusdosis von 300 mg Clopidogrel und anschließend für den Studienzeitraum eine tägliche Dosis von 2x75 mg aufgeteilt auf eine morgendliche und abendliche Gabe. Nach Studienende erhielten die Patienten, die eine weiterbestehende Indikation für Clopidogrel hatten, wieder die übliche Dosierung von 75 mg täglich.

Clopidogrel wird unter zwei verschiedenen Handelsnamen angeboten (Plavix® - Sanofi Pharma Bristol-Myers Squibb SNC, Frankreich oder Iscover® - Bristol-Myers Squibb Pharma EEIG, UK), wobei beide Präparate die identische galenische Formulierung darstellen. In der EXCELSIOR-ACT-Studie konnten deshalb beide Präparate verwendet werden.

### **3.2.3.3. Antikoagulantien**

Allen teilnehmenden Patienten wurde im Rahmen der Koronarintervention gemäß dem krankenhausinternen Standard Heparin in einer Dosis von 100-140 Einheiten/kg intraarteriell verabreicht.

### **3.2.3.4. Begleitmedikation**

Die Studie nahm keinen Einfluss auf die sonstige Medikation (z.B. Insulin, Magen-Darm-Medikamente, Antihypertensiva, Diuretika, Lipidsenker, Analgetika, Antidepressiva) der Patienten.

## **3.3. Methoden**

### **3.3.1. Probengewinnung**

Den Patienten wurden für die Untersuchungen drei Blutproben entnommen. Die erste Blutabnahme erfolgte am Folgetag nach Einnahme der Bolusdosis von 600 mg Clopidogrel und perkutaner Koronarintervention (PCI), am Vormittag 2 bis 4 Stunden nach Gabe der ersten Erhaltungsdosis von 75 mg. Nach 14 Tagen wurde die zweite Blutentnahme durchgeführt, nach 28 Tagen die dritte. Die Blutproben wurden in eine 9 ml Natrium-Citrat Monovette® und eine 9 ml Heparin-Natrium-Monovette® (Sarstedt AG, Nürnberg, Deutschland) entnommen. Die Abnahmen erfolgten aus einer der Venae brachiales mit einer 21 Gauche-Kanüle® (Sarstedt AG, Nürnberg, Deutschland). Zu diesem Zweck wurde die Oberarmvene nur mäßig gestaut und versucht, eine iatrogene Aktivierung der Thrombozyten zu vermeiden. Die Aufarbeitung der Citratblutproben erfolgte innerhalb von zwei Stunden nach der Abnahme (Probenaufbewahrung bei Zimmertemperatur).

Aus der Heparin-Natrium-Monovette® wurde das Plasma für die Messungen der Clopidogrel- und Carboxy-Clopidogrelkonzentrationen gewonnen. Dafür wurde die Probe für 10 Minuten bei 3000 g zentrifugiert, der Plasmaüberstand abpipettiert und direkt im Anschluss tiefgefroren und bei -70°C aufbewahrt.

### **3.3.2. Testreagenzien**

Dulbecco's Phosphate buffered Saline (PBS)

PBS wurde von der Firma Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München, Deutschland) in 500 ml Flaschen gebrauchsfertig bezogen.

### Paraformaldehyd 1%

Die 1% ige Lösung wurde aus 95% igem Paraformaldehydpulver (PFA) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland) hergestellt. 2 g PFA wurden in 200 ml PBS gelöst. Die Lösung wurde unter Rühren für etwa 10 min bei 200°C erhitzt, bis die Mischung klar und frei von Aggregaten war. Die fertige Lösung konnte für bis zu 3 Wochen verwendet werden.

### Adenosindiphosphat

Adenosin 5'-Diphosphat (ADP) wurde von der Firma Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München, Deutschland) bezogen. Die Stammlösung wurde wie folgt hergestellt: 17,09 mg ADP wurden in einem 2 ml Eppendorf-Röhrchen mit 2 ml NaCl-Lösung (0,9%) aufgelöst. Die ADP-Stammlösung wurde mit 0,9%iger NaCl-Lösung auf die jeweils benötigten Konzentrationen (Gebrauchslösungen) verdünnt.

### Kollagen

Kollagen wurde ebenfalls als fertige Lösung bezogen (Kollagenreagens Horm<sup>®</sup>, Nycomed Pharma, Unterschleißheim). Die Stammlösung (1 g/L) wurde mit der mitgelieferten Pufferlösung auf die benötigten Konzentrationen verdünnt.

### Thrombin-Rezeptor aktivierendes Peptid

Für die vorliegende Studie wurde ein Thrombin-Rezeptor-Activating-Peptide (TRAP) der Firma Bachem verwendet (H-2234, Aminosäuresequenz, H-Ser-Phe-Leu-Leu-Arg-Asn-Pro-OH, Molekulargewicht: 846,0 d). Dabei wurden 5 mg TRAP mit 5910 µl PBS aufgelöst um eine 1 mmol/l Stammlösung zu erhalten. Diese wurde mittels PBS auf die Gebrauchslösungen weiter verdünnt.

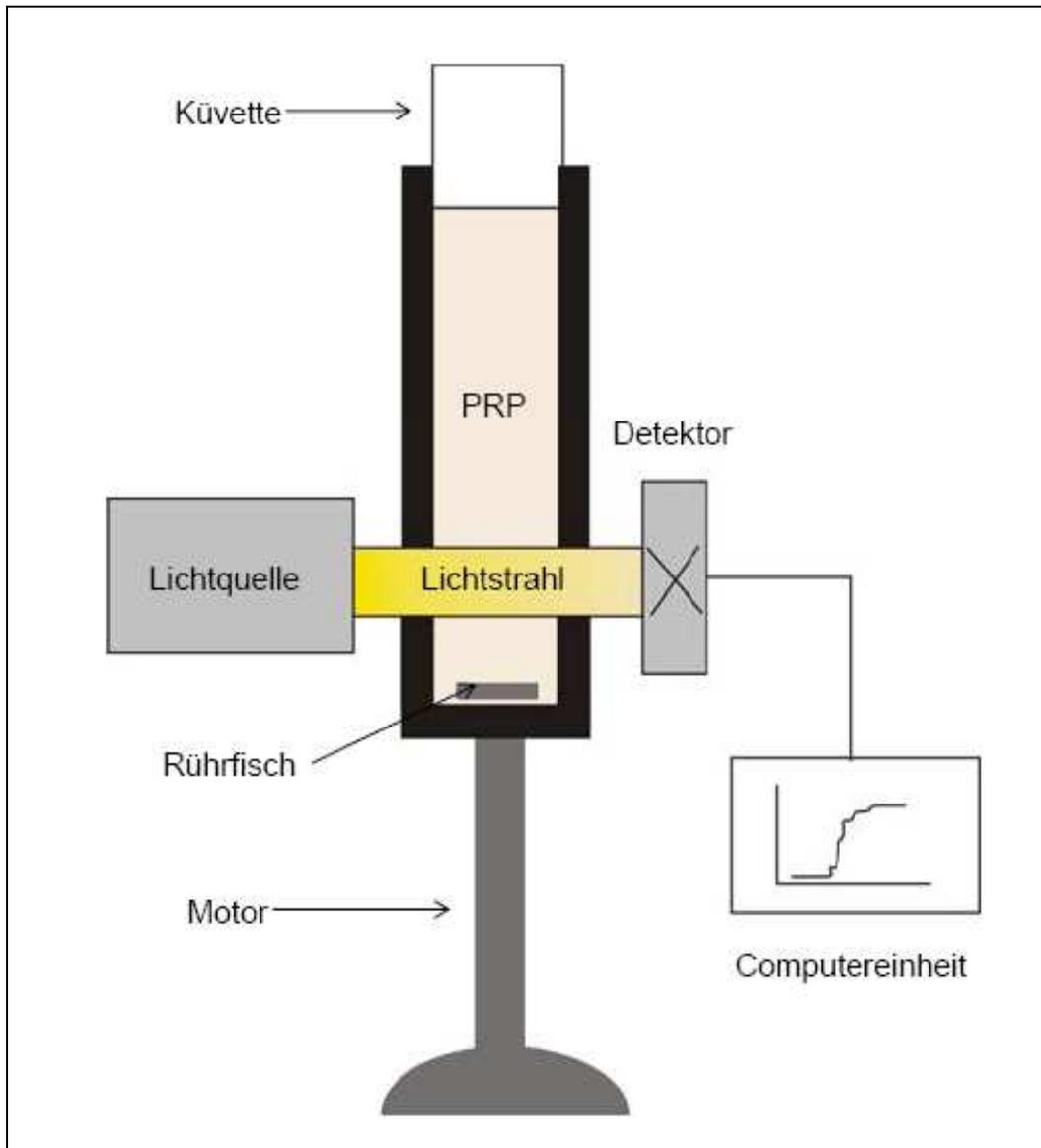
### **3.3.3. Optische Aggregometrie**

#### **3.3.3.1. Funktionsprinzip**

Die Methode der Lichttransmissionsaggregometrie nach Born (125) beruht auf der Tatsache, dass die Streuung von Lichtstrahlen, welche durch eine Partikelsuspension geschickt werden, nicht von der Teilchengröße, sondern von der Anzahl der Teilchen abhängig ist. Somit nimmt mit abnehmender Teilchenzahl (z.B. der Thrombozytenzahl) die Lichtdurchlässigkeit der Suspension zu.

Bei der Lichttransmissionsaggregometrie wird eine gleichbleibende Strahlung durch die Messküvette mit der zu untersuchenden Suspension geschickt. Zur Eichung wird plättchenarmes Plasma (PPP) mit einer niedrigen Anzahl an gelösten Teilchen und somit der höchsten Lichtdurchlässigkeit verwendet. Dieser Wert entspricht der maximal möglichen Aggregation (100%) und dient dem Aggregometer als Referenzwert. Für die Messungen wird plättchenreiches Blutplasma (PRP) verwendet, welches zunächst durch die hohe Anzahl der suspendierten Thrombozyten eine hohe Streustrahlung aufweist. Das bedeutet, dass nur ein geringer Teil der Strahlen die Flüssigkeit passiert. Dieser Wert wird im aufgezeichneten Diagramm als Nulllinie dargestellt wird.

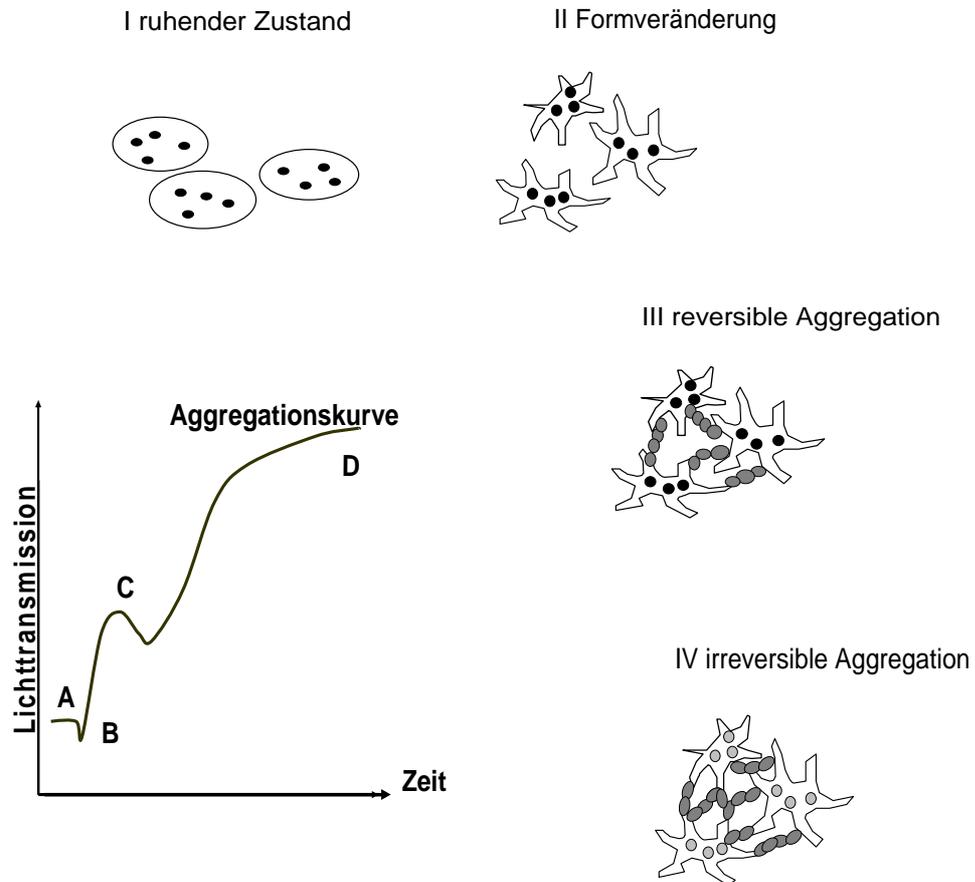
Durch Zugabe verschiedener plättchenaktivierender Substanzen kommt es zur Aggregation der Thrombozyten und somit wegen der abnehmenden Anzahl an separaten Partikeln zu einer gesteigerten Lichttransmission. Je weniger Teilchen (freie Thrombozytenaggregate) sich in der Flüssigkeit befinden, umso höher ist die Strahlendurchlässigkeit. Das Funktionsprinzip eines Aggregometers ist in Abbildung 11 dargestellt.



### Abbildung 11: Aufbau eines Aggregometers

Mittels einer konstanten Lichtquelle (Leuchtdioden beim PAP4-Aggregometer) wird eine zu Beginn der Messung mit einer Referenzlösung (plättchenarmes Plasma entspricht 100% Aggregation) geeichte Strahlung (Wellenlänge 697 nm) durch eine Suspension geschickt, deren Teilchen mittels Magnetrührer ständig in Bewegung gehalten werden. Der Detektor misst die durch die Probe transmittierte Strahlung. Die Ergebnisse werden mittels der angeschlossenen Computersoftware ausgewertet. Die Lichtdurchlässigkeit des PRP nimmt nach Aktivierung der Thrombozyten (z.B. mittels ADP) und einsetzender Aggregation zu.

Die Abbildung 12 demonstriert den Verlauf (siehe Grafik) der Thrombozytenaggregation nach Stimulation des PRP mit ADP.



**Abbildung 12: Messung der Thrombozytenaggregation** (modifiziert nach Gawaz,6)

- I** Die Thrombozyten des Plasmas befinden sich im Ruhezustand, die Lichtdurchlässigkeit ist gering. Es besteht aufgrund der hohen Teilchenzahl eine starke Streustrahlung, die in der Basislinie A dargestellt wird.
- II** Durch die Zugabe von ADP kommt es zur Aktivierung und Formveränderung der Thrombozyten, die auch eine Vergrößerung der Oberfläche der Zellen bewirkt, zu einem negativen Kurvenausschlag (B), d.h. zu einer Abnahme der Lichttransmission.
- III** Die aktivierten Thrombozyten binden aneinander (reversible Aggregation), die Streustrahlung wird reduziert, die Lichtdurchlässigkeit nimmt zu (C).
- IV** Durch Folgeprozesse stabilisieren sich die Thrombozytenbindungen und weitere Thrombozyten werden aktiviert. Die Lichtdurchlässigkeit nimmt weiter zu (D).

### **3.3.3.2. Probenaufbereitung**

Etwa 15 min nach Blutentnahme wurde das Citratblut für 2 min zentrifugiert (20°C, 750 g). Der Überstand, der das PRP darstellt, wurde abpipettiert und ein Teil davon für weitere 5 min (20°C und 2300 g) zentrifugiert. Der resultierende Überstand stellte das plättchenarme Blutplasma (PPP) dar, welches als Referenz zur Messung der Plättchenaggregation diente.

### **3.3.3.3. Durchführung der aggregometrischen Messung**

Für diese Studie wurde ein optisches Aggregometer vom Typ Bio/Data PAP4 (Mölab, Hilden, Deutschland) eingesetzt.

Die Thrombozytenzahl des Plasmas wurde bei allen Patienten auf  $300.000 \pm 75.000$  Thrombozyten/ $\mu\text{l}$  standardisiert. Hierfür wurde die Thrombozytenzahl im PRP mit Hilfe eines automatischen Zellzählgerätes (Cellcounter, Baker Instruments, System 9000, USA) ermittelt, wozu 40  $\mu\text{l}$  des PRPs benötigt wurden. Bei Ergebnissen außerhalb des Referenzbereichs wurde das PRP entsprechend mit plättchenarmen Plasma desselben Patienten verdünnt. Bei zu niedriger Thrombozytenzahl wurde die Messung nicht durchgeführt.

Vom PRP wurden jeweils 285  $\mu\text{l}$  in die Messküvetten (Fa. Mölab GmbH, Langenfeld, Deutschland) des Aggregometers pipettiert. In diesen wurde das PRP mittels Magnetstäbchen ständig in Bewegung gehalten. Als Referenzwert für die maximal mögliche Aggregation dienten 300  $\mu\text{l}$  des PPPs.

Die Küvetten wurden mit dem zu testenden Plasma vor der Messung 5 Minuten im Wärmefach des Aggregometers auf 37°C erwärmt. Die Messkanäle wurden einzeln mit dem PPP geeicht. Die Messung wurde bei 37°C unter konstantem Rühren (1000 U/min) mit einer gleichbleibenden Strahlung der Wellenlänge 697 nm durchgeführt. Die Zugabe der Substanzen (ADP, TRAP, Collagen) erfolgte in einem Abstand von 30 Sekunden. Jeweils 15  $\mu\text{l}$  der unterschiedlichen Stimulantien (ADP, TRAP, Kollagen) wurden dem PRP (285  $\mu\text{l}$ ) in den einzelnen Küvetten zugegeben, um die Messung zu starten.

Folgende Reihenfolge wurde dabei eingehalten:

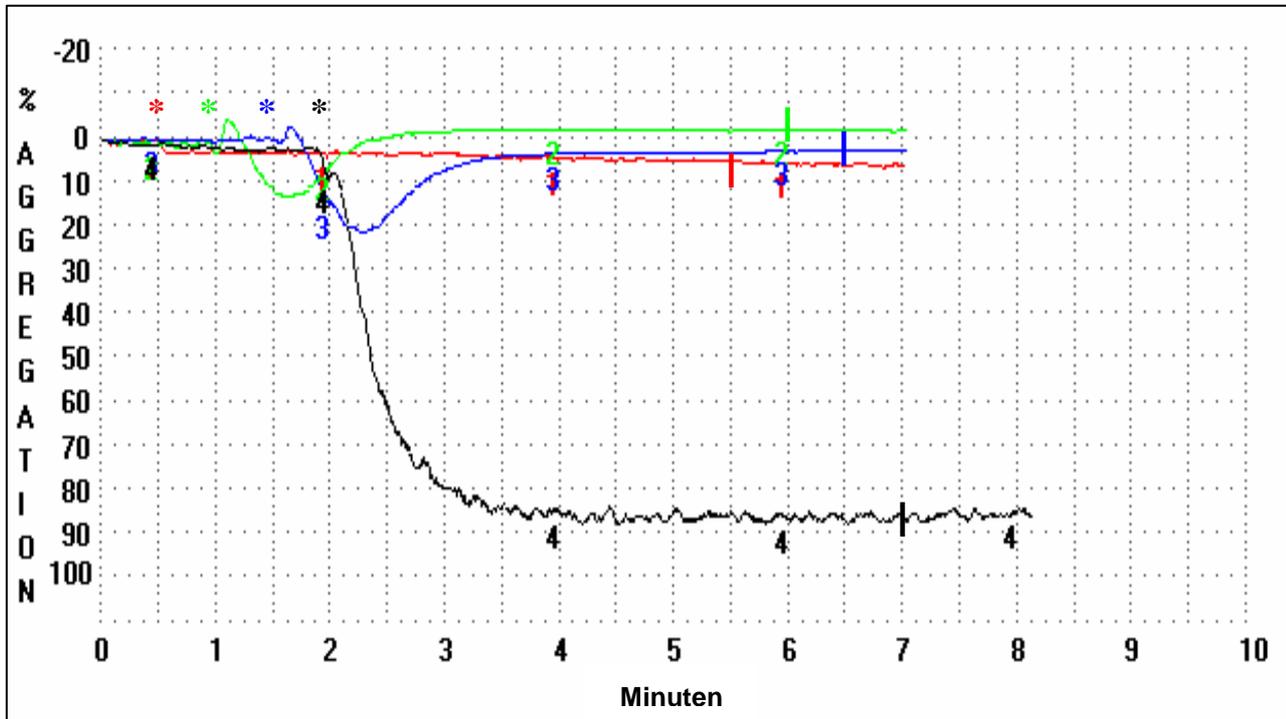
Kanal	Konzentration Stimulanz	Endkonzentration
1	50 mg/l Kollagen	2,5 mg/l Kollagen
2	0,1 mM ADP	5 $\mu$ M ADP
3	0,4 mM ADP	20 $\mu$ M ADP
4	0,5 mM TRAP	25 $\mu$ M TRAP

Kollagen und TRAP dienen bei der Messung als Positivkontrolle, um die Aggregationsfähigkeit der Thrombozyten zu überprüfen (Qualitätskontrolle).

Die Messungen der Thrombozytenaggregation unter ADP-Stimulation dienen der Bestimmung der Clopidogrelwirkung. Der Aggregationsverlauf der Thrombozyten wurde nach Stimulanzzugabe fünf Minuten aufgezeichnet.

### 3.3.3.4. Auswertung der aggregometrischen Messung

Die folgende Abbildung 13 zeigt typische Messkurven und deren Auswertung:



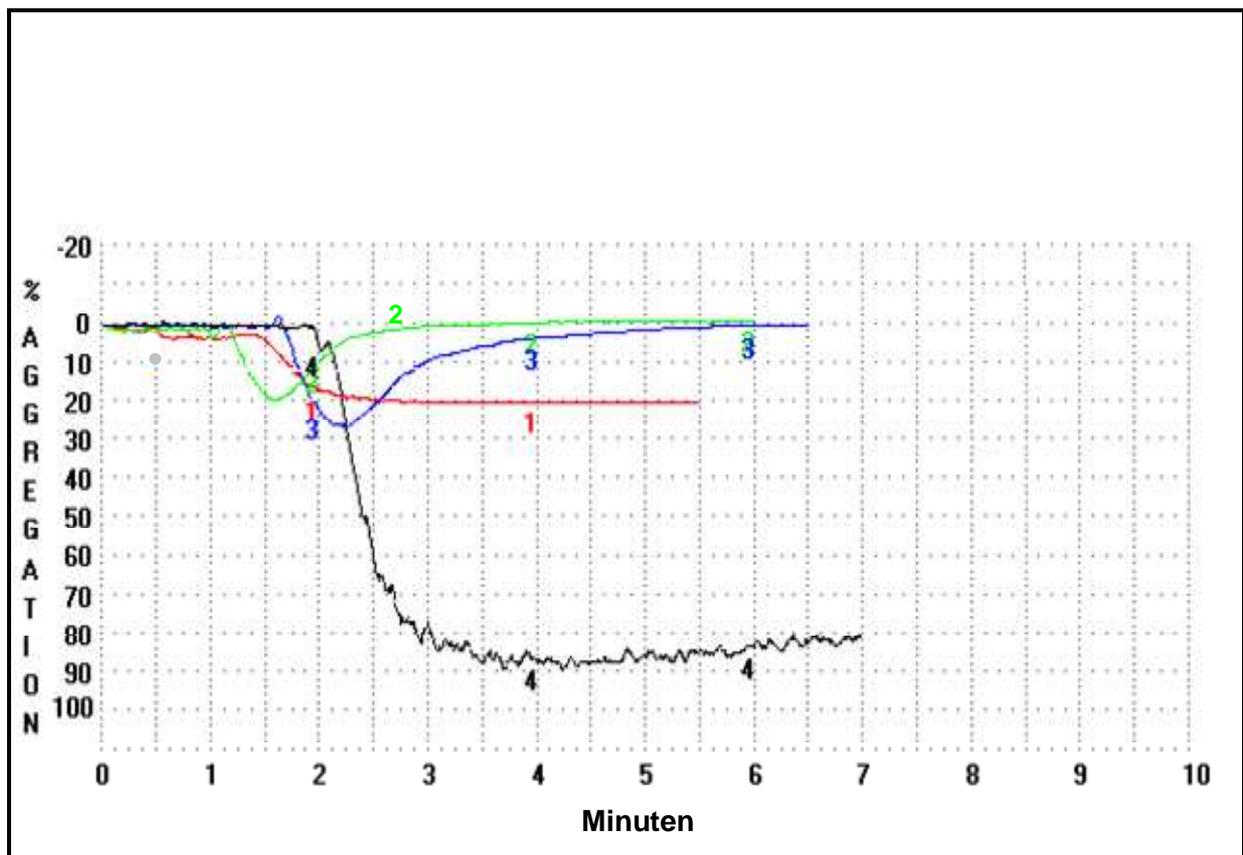
#### Abbildung 13: Beispielkurven einer aggregometrischen Messung

Die y-Achse entspricht der Lichttransmission durch das Blutplättchenplasma. Die x-Achse steht für die zeitliche Abfolge in min. Durch Eichung mit blutplättchenarmen Plasma (PPP) wird der Nullabgleich erreicht. In das plättchenreiche Plasma werden Stimulanzien (Rote Kurve (1): Kollagen (2,5 mg/l) - Grüne Kurve (2): ADP (5 µM) - Blaue Kurve (3): ADP (20 µM) - Schwarze Kurve (4): TRAP (25 µM)) zugegeben, welche eine Thrombozytenaggregation induzieren (Zeitpunkt der Stimulanzzugabe mit Sternsymbol \* markiert). Die Aggregation zeigt sich in der Abbildung durch einen Anstieg der Kurve. Je stärker die Aggregation ausfällt, umso höher ist der Kurvenausschlag. Die Messung erfolgt über einen Zeitraum von 5 min. Die Endaggregation (I), wie für diese Studie verwendet, entspricht dem Ausschlag nach 5 min.

### 3.3.3.5. Variabilität der Thrombozytenaggregation

Wie bereits erwähnt (Kapitel 1.3.5.) zeigt sich unter Clopidogrelmedikation eine erhebliche interindividuelle Variabilität der Thrombozytenaggregationshemmung.

Die Abbildungen 14 und 15 verdeutlichen, wie diese Variabilität mit Hilfe der optischen Aggregometrie gemessen und dargestellt werden kann. Dabei repräsentiert die Abbildung 14 gut gehemmte und Abbildung 15 weniger gut gehemmte Thrombozyten von zwei verschiedenen Patienten.



#### Abbildung 14: Verlauf von Aggregationskurven

Die Graphik stellt die Thrombozytenaggregation eines Patienten einen Tag nach Gabe einer Bolusdosis von 600 mg Clopidogrel dar. Die einzelnen Stimulanzen wurden im 0,5 Minutenabstand zugegeben.

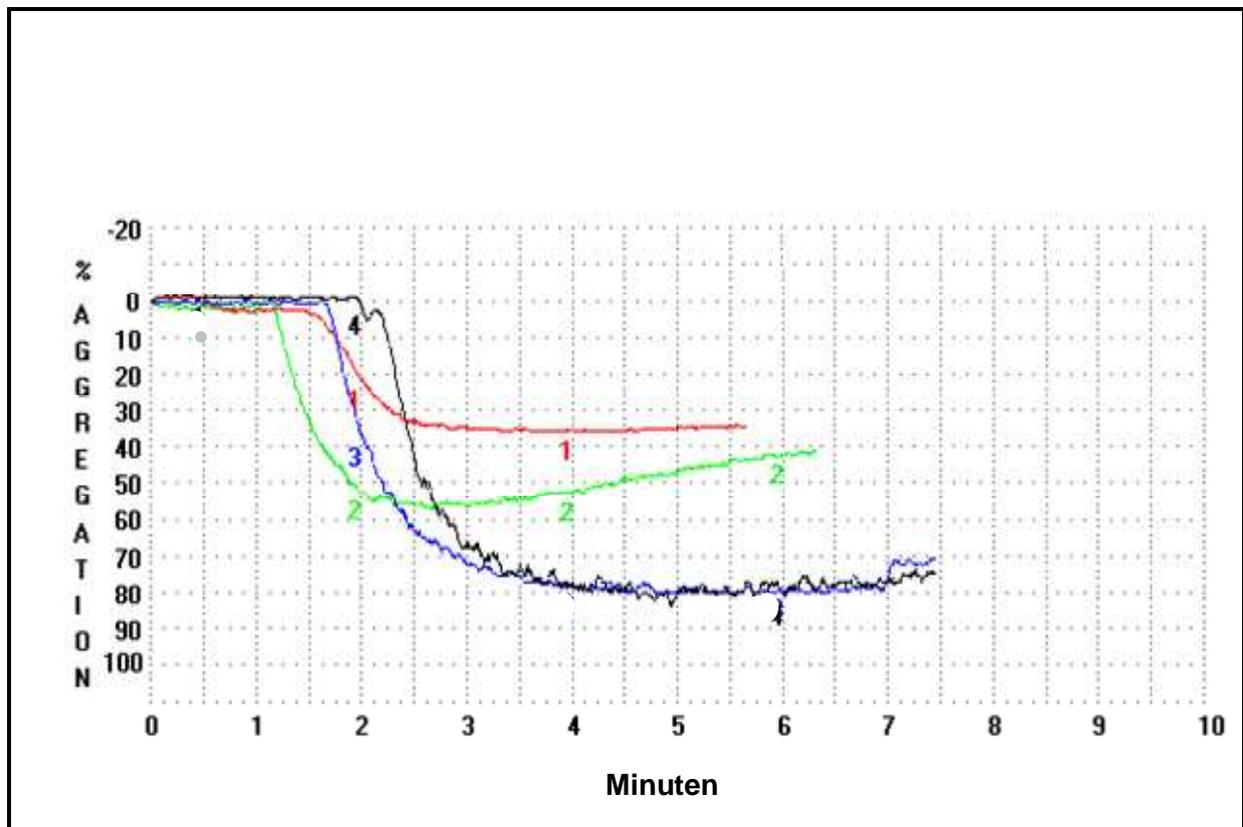
**Rote Kurve (1):** Kollagen (2,5 mg/l) - dient v.a. zur Qualitätskontrolle der Messung.

**Grüne Kurve (2):** ADP (5 µM) - es zeigt sich nur eine reversible, schwache Thrombozytenaggregation, wie man es bei gutem Ansprechen auf Clopidogrel erwarten würde.

**Blaue Kurve (3):** ADP (20 µM) - es zeigt sich ebenfalls nur eine reversible, relativ schwache Aggregation.

**Schwarze Kurve (4):** TRAP (25 µM) - dient v.a. zur Qualitätskontrolle der Messung. Da die Wirkung dieses Stimulanz nur minimal durch ASS oder Clopidogrel beeinflusst wird, zeigt sich eine fast vollständige und irreversible Aggregation.

Die Endaggregation 5 Minuten nach ADP-Zugabe (5  $\mu$ M) des Patienten in Abbildung 14 ist unter 14%. Unter dieser Bedingung würde der Patient eine Clopidogreldosis von 75 mg/d für die Studienperiode erhalten.



#### Abbildung 15: Verlauf von Aggregationskurven

Diese Graphik zeigt ebenfalls die Thrombozytenaggregation eines Patienten, der am Tag nach Gabe einer Bolusdosis von 600 mg Clopidogrel Bolusdosis gemessen wurde. Die Farben der einzelnen Kurven entsprechen der Einteilung, wie in Abbildung 14. Die ADP-induzierten Messungen (ADP 5 $\mu$ M in grün und ADP 20 $\mu$ M in blau) zeigen eine kaum gehemmte Aggregation nach Stimulation mit ADP.

Im Gegensatz zur Endaggregation (5  $\mu$ M ADP) in Abbildung 14 zeigt sich in Abbildung 15 eine Endaggregation von 41% (grüne Kurve). Dieser Patient hätte in der vorliegenden Studie einmalig eine weitere 300 mg Bolusdosis Clopidogrel gefolgt von einer Erhaltungsdosis von 150 mg Clopidogrel pro Tag über 4 Wochen erhalten.

### **3.3.4. Durchflusszytometrie**

#### **3.3.4.1. Funktionsprinzip**

Die Durchflusszytometrie (FACS= Fluorescence Activated Cell Sorting) ist eine Methode mit der z.B. Zellgröße und -granularität oder auch die Oberflächenproteinexpression von Zellen bestimmt werden kann. Zur Anwendung kam ein 4-Farben-Benchtop Durchflusszytometer vom Typ „FACSCalibur“ der Firma Becton-Dickinson (Heidelberg, Deutschland). Das Gerät besitzt einen Argonlaser ( $\lambda=488$  nm/0,5 Watt). Die Ergebniserfassung wird mittels der Auswertungssoftware „FACScan“ (Firma Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland) durchgeführt.

Die Durchflusszytometrie ermöglicht die Analyse einzelner Blutzellen. Es lassen sich Größe und Anzahl der Zellen, aber auch die Expression bestimmter Oberflächenrezeptoren untersuchen. Zu diesem Zweck wird ein Laserstrahl durch den konstanten Zellfluss gesendet. Die zu untersuchenden Oberflächenproteine werden zuvor mit fluoreszierenden Antikörpern markiert. Die durch die Zellen entstehende Streustrahlung sowie das durch die markierten Antikörper induzierte Fluoreszenzlicht der einzelnen Zellen werden mittels Photodioden registriert, in elektronische Signale umgewandelt und von der Software ausgewertet (126). Das Vorwärtsstreulicht (forward scatter, FSC) ist hierbei proportional zur Größe der Zelle, das Seitwärtsstreulicht (side scatter, SSC) gibt Auskunft über die Oberfläche und Inhalt der Zellen (Membran/Granularität). Um ein Vermischen der Informationen von verschiedenen Zellen zu vermeiden, werden diese einzeln am Laser vorbeigeführt. Um dies zu erreichen, wird die zu untersuchende Probe von einer Trägerflüssigkeit (sheath fluid) umgeben. Durch besondere Führung dieser Flüssigkeit wird ein sogenannter Hüllstrom erzeugt, der den Probenstrom vollständig umgibt und sich nicht mit ihm vermischt. Durch Querschnittsverringering der Messküvette erreicht man eine hydrodynamische Fokussierung, die es ermöglicht die Zellen einzeln zu erfassen.

Durch die Bindung fluorochrommarkierter Antikörper an spezifische Oberflächenrezeptoren kann man aufgrund der Fluoreszenzintensität auf die jeweilige Rezeptorexpression schließen (126). Unter Verwendung verschiedener Fluorochrome mit unterschiedlichen Absorptionsmaxima, die an unterschiedliche Antikörper gebunden sind, lassen sich mehrere Oberflächenproteine gleichzeitig untersuchen.

In der Studie fanden die folgenden Antikörper Verwendung:

Antikörper	Oberflächenantigen	Färbung
CD 41 (thrombozytenspezifischer Antikörper)	GPIIb/IIIa-Rezeptor	PC5 (Phycoerythrin mit kovalent gebundenem Cyanin5 )
PAC-1	aktivierte GPIIb/IIIa-Rezeptoren	FITC (Fluoreszin-Isothiocyanat)
CD 62 P	P-Selectin	PE (Phycoerythrin)

**Tabelle 2: In der Studie angewandte Antikörper und ihre Oberflächenantigene**

Die mit Fluoreszenzfarbstoffen markierten monoklonalen Antikörper (mAK) CD41 und CD62 wurden von Beckman Coulter, Immunotech (Marseille, Frankreich), und PAC-1 von Becton-Dickinson Immunocytometry Systems (San Jose, Kalifornien, USA) bezogen.

Zur durchflusszytometrischen Messung wurden die mAK den Proben im vielfachen Überschuss zugesetzt, um eine Sättigung zu erreichen.

Die monoklonalen Antikörper (mAK) PAC-1, die gegen die aktivierten GPIIb/IIIa-Rezeptoren gerichtet sind und der mAK CD62P, welcher gegen die granulären Membranproteine gerichtet ist, dienen der Unterscheidung zwischen ruhenden und aktivierten Thrombozyten.

**3.3.4.2. Probenaufbereitung**

Für die durchflusszytometrische Untersuchung wurde Citratblut verwendet, das sofort nach der Abnahme verarbeitet wurde. Als Stimulanzen dienten ADP (20 µM) und das Thrombin-Rezeptor-aktivierende Peptid (TRAP, 25 µM) zur Positivkontrolle.

Zuerst wurden die Antikörper nach folgendem Pipettierschema in BD Falcon®-Röhrchen (BD Biosciences Europe, Belgien) gegeben: 2,5 µl CD41-PC5, 5 µl CD62P-PE und 5 µl PAC1-FITC. Zu diesen Antikörperansätzen wurden jeweils 5 µl Citratblut pipettiert.

Von jeder Messreihe blieb eine Probe unstimuliert (Tube1), je eine wurde mit 5 µl ADP (20 µM, Tube 2) und die Dritte mit 5 µl TRAP (25 µM, Tube 3) versetzt.

Die Proben wurden mit PBS auf 45 µl Endvolumen aufgefüllt, kurz durchmischt und anschließend für 30 Minuten bei Raumtemperatur (20°C) in Dunkelheit inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Reaktion mit 300 µl 1,0%igem Paraformaldehyd gestoppt. Die Proben wurden bis zur Messung lichtgeschützt bei + 4°C aufbewahrt.

### 3.3.4.3. Durchführung und Auswertung der Messung

Da das primäre Interesse bei der Durchflusszytometrie den Thrombozyten galt, wurde diese Zellgruppe anhand der Zellgröße (FSC) und mittels eines geeigneten Antikörpers (CD41) identifiziert (Abbildungen 16,17). Hierfür wurde eine Zweiparameterdarstellung, in Form einer Punktwolkendarstellung (dot plot) gewählt.

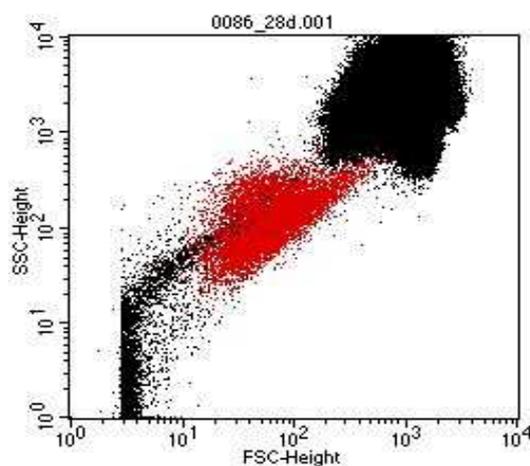


Abbildung 16: SSC/FSC

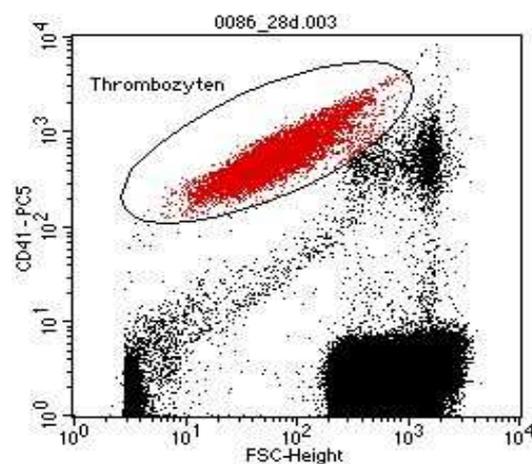


Abbildung 17: CD41-AK/FSC

Die Abbildungen 16 und 17 zeigen Thrombozytenpopulationen (rote Punktwolken). In Abbildung 16 werden die Thrombozyten durch die Größe der Zellen (X-Achse= FSC) und die Granularität (Y-Achse=SSC) von den restlichen Plasmabestandteilen differenziert. In Abbildung 17 werden die Blutplättchen anhand von Größe (X-Achse=FSC) und von thrombozytenspezifischen Antikörpern CD 41 (y-Achse) als Population identifiziert.

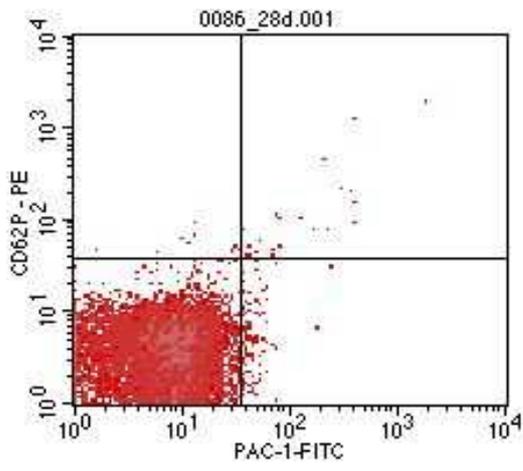
Für jede Probe wurden je 10.000 events der ausgewählten Thrombozytenpopulation gemessen. Mittels der Software des Durchflusszytometers wurde jeweils die mittlere Fluoreszenzintensität der zur Untersuchung angewandten Antikörper berechnet.

#### **3.3.4.4. Interindividuelle Variabilität der Expression von Oberflächenproteinen**

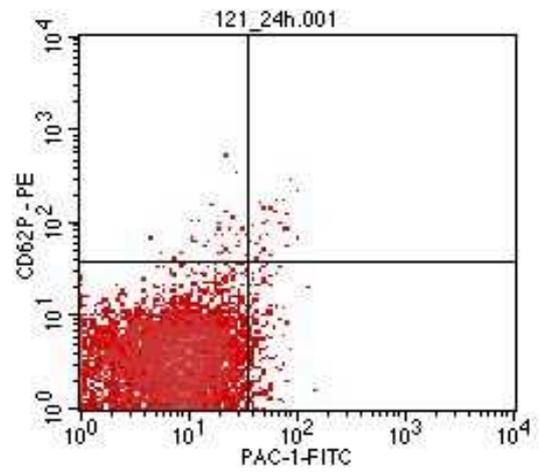
Auch mittels Durchflusszytometrie lässt sich die Thrombozytenfunktion quantitativ beurteilen. Die Abbildungen 18a-c und 19a-c zeigen Darstellungen der Tests mit dem PAC-1-AK (x-Achse) zusammen mit dem CD62P- Antikörper (y-Achse) in Form eines „density-plot“. Die Abbildungen 18 und 19 repräsentieren jeweils einen Patienten, der am Tag nach Gabe einer Bolusdosis von 600 mg Clopidogrel gemessen wurde.

Abbildung 18a und 19a zeigen jeweils das Ergebnis einer unstimulierten Probe. Die „dots“ befinden sich links unten in der Grafik, das entspricht einer geringen Fluoreszenz beider Antikörpertypen. Die geringe Fluoreszenz beider Antikörpertypen steht in Korrelation zur Rezeptorexpression bei inaktivierten Thrombozyten. Nach ADP-Stimulation (20  $\mu$ M Endkonzentration) der Probe nimmt die PAC-1-Fluoreszenz und die CD62P-Fluoreszenz an Intensität zu (Abbildung 18b und 19b). Dabei fallen die Unterschiede zwischen beiden Abbildungen auf. Während es in Abbildung 18 unter ADP nur zu einer geringen Verschiebung der Zellwolke kommt, verschiebt sich diese in Abbildung 19 deutlich nach rechts oben, was bedeutet, dass es zu einer erheblichen Zellaktivierung unter ADP kommt, da die ADP-induzierte Zellaktivierung nicht oder kaum gehemmt ist, d.h. hier liegt ein geringes Ansprechen auf Clopidogrel vor. Abbildung 18c und 19c zeigen die mit thrombinaktivierendem Peptid (25  $\mu$ M TRAP Endkonzentration) stimulierte Probe. Diese dient als Positivkontrolle. Der Vergleich mit Abbildung 18c zu 18b verdeutlicht, wie stark die Hemmung der ADP-induzierten Zellaktivierung bei diesem Patienten ist.

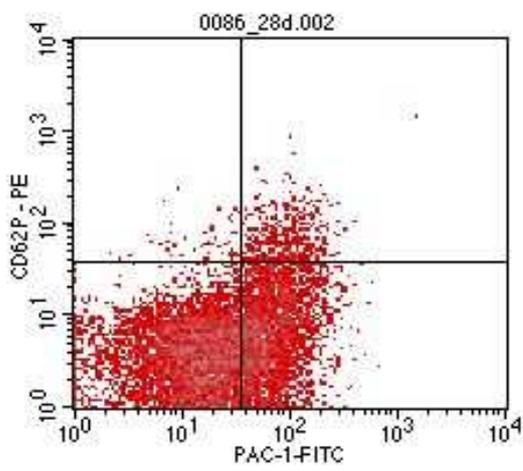
Diese Beispiele demonstrieren, dass der erste Patient (Abb.18a-c) eine gute Hemmung der ADP-induzierten Thrombozytenfunktion aufweist, während der zweite Patient (Abb.19a-c) eine schlechte Hemmung der Thrombozytenaktivierung unter identischer Clopidogrelmedikation zeigt.



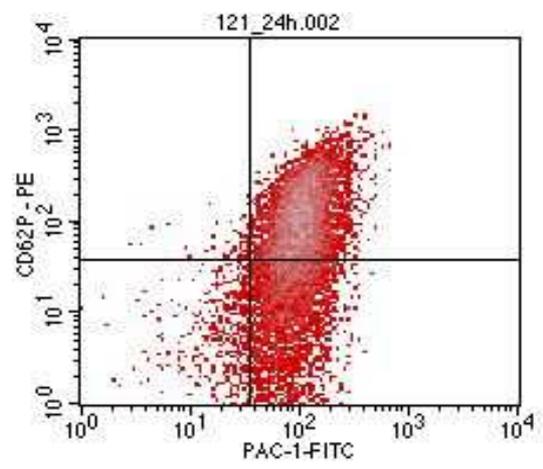
**a**



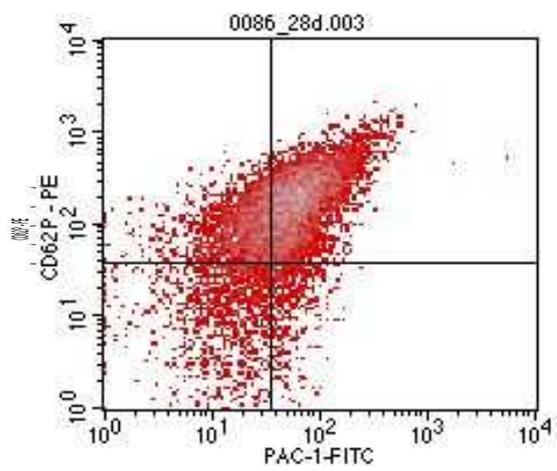
**a**



**b**

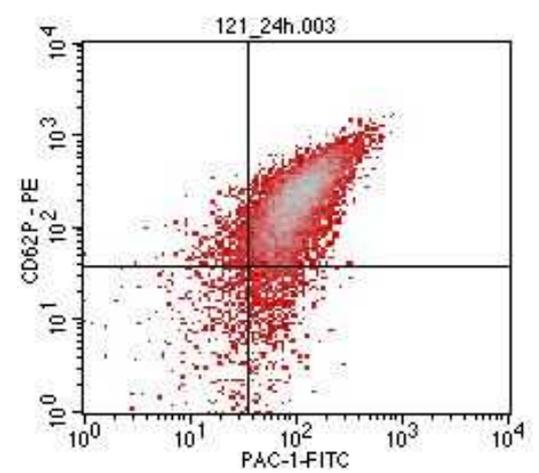


**b**



**c**

**Abbildung 18**



**c**

**Abbildung 19**

### **Abbildung 18a-c und 19a-c: Darstellung der Ergebnisse von durchflusszytometrischen Untersuchungen in Form von „dot plots“**

Jeder Punkt entspricht einem Thrombozyten. Es handelt sich um zwei Patientenproben (Patient A: 18a-c und Patient B 19a-c). Die Blutproben wurden einen Tag nach p.o. Gabe von 600 mg Clopidogrel entnommen und untersucht. Die Proben wurden mit zwei unterschiedlich fluoreszierenden Antikörpern, PAC-1 (x-Achse) und CD62P (y-Achse) markiert. Mit steigender Intensität der Fluoreszenz verschiebt sich der „dot plot“ nach rechts (PAC-1) oder nach oben (CD62P). 18a/19a entsprechen den unstimulierten Proben. Als Stimulans wurde ADP (20 µM Endkonzentration) bei Abbildung 18b, 19b und TRAP (25 µM Endkonzentration) bei Abbildung 18c, 19c verwendet.

### **3.3.5. Plasmakonzentrationen von Clopidogrel und Metaboliten**

Die Bestimmung der Konzentrationen von Clopidogrel und Metaboliten im Blutplasma erfolgte durch die Fa. ACC GmbH Analytical Clinical Concepts, Schöntalweg 9 in 63849 Leidersbach entsprechend den Good Laboratory Practice Richtlinien (127).

Die Analytik wurde mit Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie mit MS/MS (Tandem-Massenspektrometrie)-Detektion nach flüssig-flüssig Extraktion und mit Diltiazem als internem Standard durchgeführt. Hierzu wurden 500 µl Plasma mit 50 µl einer Lösung von Clopidogrel in Methanol, 50 µl einer Lösung Diltiazem in Methanol (0,25 µg/ml), 50 µl Essigsäure (5 %) und 3000 µl Diäthyläther vermischt. Der Ansatz wurde 5 Sekunden auf einem Labormischer bei 2000 U/Min gemischt, und im Anschluß über 10 Minuten bei 200 U/min extrahiert. Danach wurde die Probe über 10 min bei 4000 U/min zentrifugiert. Die organische Phase wurde in Spitzgläser überführt und unter Stickstoffstrom bei 40°C eingedampft. Der Rückstand wurde in 250 µl Rekonstitutionslösung (Acetonitril: 2mM Ammoniumacetat (v:v; 1:1)) wieder aufgenommen. Diese Lösung wurde dann für 5 Sekunden bei 2000 U/min (Minishaker) gemischt und in ein weiteres Spitzglas überführt. Nach Zentrifugation bei 4000 U/min für 5 Minuten wurde der Überstand in ein Probengläschen des HPLC-Autosamplers überführt und 10,0 µl in das LC-MS/MS-System injiziert. Zur Analyse der Plasmaproben der Patienten wurden 500 µl Plasma mit 50 µl Methanol, 50 µl einer Lösung des internen Standards in Methanol (0,25 µg/ml), 50 µl Essigsäure (5 %) und 3000 µl Diethylether vermischt und wie zuvor beschrieben aufgearbeitet.

Die Eichkurve von Clopidogrel umfasste 10 Eichwerte über den Bereich von 0,25 bis 250 ng/ml.

Die Plasmakonzentrationen von Clopidogrel konnten direkt quantifiziert werden, wobei die Nachweisgrenze bei 0,025 ng/ml lag. Aufgrund patentrechtlicher Aspekte standen leider keine Referenzsubstanzen von Carboxy-Clopidogrel (R26334) bzw. des aktiven Metaboliten zur Verfügung. Carboxy-Clopidogrel (R26334) konnte deshalb nur als Quotient des Messsignals relativ zum internen Standard quantifiziert werden. Aufgrund der zum Zeitpunkt der Untersuchung nicht bekannten Erfordernisse der präanalytischen Stabilisierung des aktiven Metaboliten von Clopidogrel konnten die Ergebnisse dieses Analyten leider nicht verwertet werden.

Die Methodvalidierung und die Akzeptanz der gemessenen Werte erfolgten entsprechend den Vorschriften der Food and Drug Administration (FDA, 128) bzw. unter Zugrundelegung der International Conference on Harmonisation (ICH) Consensus Guidelines (129,130).

### 3.3.6. Statistische Auswertung

Die Studie sollte insbesondere die Hemmung der Thrombozytenaggregation vier Wochen nach Intervention und nach Dosisanpassung von Clopidogrel untersuchen. Der primäre Endpunkt war somit die Abnahme der Thrombozytenendaggregation (5  $\mu$ M ADP) nach Dosisanpassung von Clopidogrel von 75 auf 150 mg täglich. Sie wurde in der Weise konzipiert, dass mit einer Teststärke von 80% eine Abnahme der Thrombozytenendaggregation (5  $\mu$ M ADP) von 20% bei einem Signifikanzniveau von  $p < 0,05$  nachgewiesen werden kann. Ausgehend von den Daten der EXCELSIOR Studie (60) war anzunehmen, dass in der Gruppe mit Thrombozytenaggregation  $>14\%$  nach Clopidogrelbolusgabe die ADP-induzierte Thrombozytenendaggregation 35% ( $\pm 15\%$ ) betragen wird. Aufgrund dieser Annahme ergab sich eine berechnete Gruppengröße von 39 Patienten in der Kohorte mit Dosisanpassung (Software: nQuery advisor, version 5.0, Cork, Irland). Da von einem Anteil der Patienten mit einer Aggregation  $>14\%$  von etwa 1/3 der Gesamtkohorte ausgegangen wurde, sollten etwa 120 Patienten in diese Studie eingeschlossen werden.

In dieser Arbeit werden diskrete Variablen als Zahl (Prozente) angegeben, kontinuierliche Variablen als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung. Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen wurden, wenn nicht anders angegeben, mit dem  $\chi^2$ -Test oder mit dem „Fisher’s Exact-Test“ (bei Gruppengröße  $\leq 5$ ) berechnet, sofern es sich um diskrete Variablen handelte. Kontinuierliche Variablen wurden mittels one-way ANOVA verglichen. Da die Verteilung der Thrombozytenaggregation und der Plasmakonzentrationen keiner Normalverteilung entsprach, wie die Testung mit dem Kolmogorov-Smirnov Test ergab, wurden diese Daten als Median (25% und 75% Quartile) dargestellt und mittels Wilcoxon Test verglichen. Der Mann-Whitney-U-Test wurde verwendet, um die Plättchenfunktion der EXCELSIOR-ACT Kohorte mit der EXCELSIOR Kohorte zu vergleichen. Die Veränderungen der Thrombozytenaggregation in den beiden Studiengruppen mit und ohne Dosisanpassung wurden weiterhin mittels einer univariaten und einer multivariaten linearen Regressionsanalyse, die alle Patientencharakteristika mit einem p-Wert  $< 0,1$  einschloss, untersucht.

Alle statistischen Analysen wurden mit der SPSS-Software (SPSS Inc. Version 14, Chicago, USA) durchgeführt. Ein p-Wert  $< 0,05$  wurde als signifikant angesehen.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Studienpopulation

#### 4.1.1. Patientenverteilung

In die EXCELSIOR-ACT Studie wurden 117 Patienten eingeschlossen. Das Vergleichskollektiv ohne Dosisanpassung von Clopidogrel der EXCELSIOR Studie bestand aus 57 Patienten. Die Aufteilung der Patientengruppen gemäß ihrer Thrombozytenaggregation zeigt Abbildung 20.

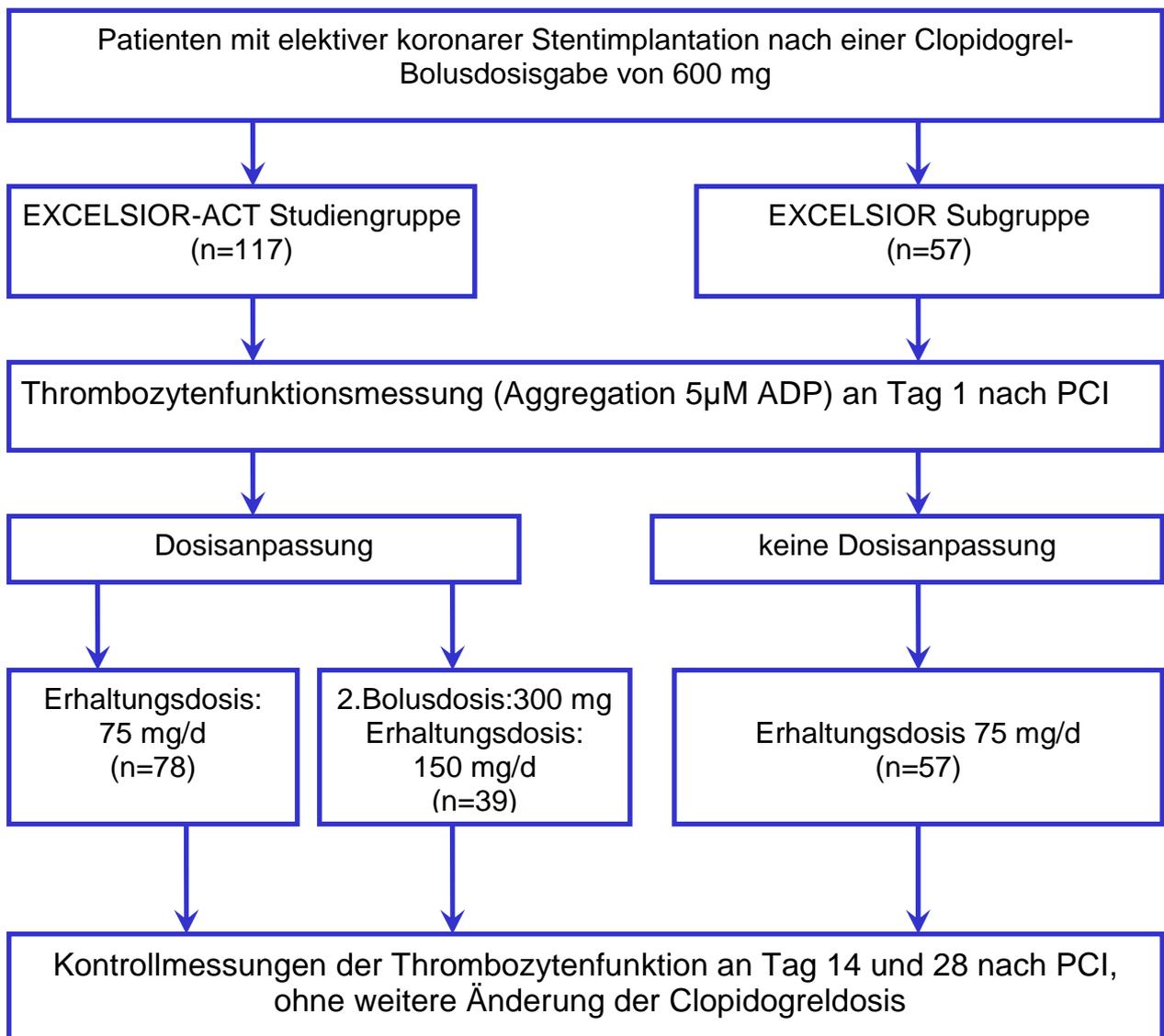


Abbildung 20: Übersicht über die Aufteilung der Studienpatienten

Die Abbildung zeigt den Studienaufbau und gibt eine Übersicht über die Verteilung der Studienpatienten. Aggregation ist definiert als Thrombozytenendaggregation nach Stimulation mit 5  $\mu$ M ADP.

Bei den Patienten wurde eine elektive Koronarintervention mit Stentimplantation durchgeführt. Alle Patienten waren mit ASS (100-300 mg/d) vorbehandelt und erhielten vor der Intervention eine Dosis von 600 mg Clopidogrel. Am Folgetag erfolgte die erste Messung der Thrombozytenaggregation in einer Blutprobe, die 2 bis 4 Stunden nach Einnahme der ersten Erhaltungsdosis von Clopidogrel (75 mg) abgenommen wurde. Danach teilte sich das EXCELSIOR-ACT Kollektiv in 78 Patienten, welche eine Aggregation  $\leq 14\%$  aufwiesen und demzufolge 75 mg/Tag Clopidogrel über die nächsten vier Wochen einnahmen, und 39 Patienten, die eine Aggregation  $>14\%$  zeigten und eine zweite Bolusdosis von 300 mg Clopidogrel erhielten. Diese Gruppe wurde die folgenden vier Wochen täglich mit 150 mg Clopidogrel behandelt.

Die 57 EXCELSIOR Patienten bekamen unabhängig von ihren Thrombozytenaggregationsergebnissen über vier Wochen eine tägliche Dosis von 75 mg Clopidogrel.

Weitere Messungen der Thrombozytenaggregation erfolgten jeweils an Tag 14 und Tag 28.

### **4.1.2. Patientendaten**

Die Patientencharakteristika der einzelnen Kohorten sind in Tabelle 3 dargestellt.

Das mittlere Alter der Patienten in der EXCELSIOR-ACT Studie lag bei 64,8 Jahren, der Anteil an weiblichen Patienten bei 13,7%. Im Vergleichskollektiv der EXCELSIOR Studie lag das mittlere Alter bei 66,5 Jahren und 21,1% der Patienten waren Frauen. Insgesamt zeigten sich kaum signifikante Unterschiede zwischen den Patienten der zwei Studien bzw. zwischen den Subgruppen der EXCELSIOR-ACT Studie. Lediglich das Durchschnittsalter war im EXCELSIOR-ACT Kollektiv bei Patienten mit einer residuellen Plättchenendaggregation (RPA) > 14% nach Stimulation mit 5  $\mu$ M ADP höher als bei Patienten mit einer Aggregation  $\leq$ 14% (67,8 vs. 63,2). Des Weiteren wurde in der EXCELSIOR-ACT Studie im Vergleich zum EXCELSIOR Kollektiv ein signifikant höherer Anteil der Patienten mit einem drug-eluting stent (DES) behandelt (73,5% vs. 26,3%). Dies ist mit der späteren Durchführung der EXCELSIOR-ACT Studie und zahlreichen in der Zwischenzeit publizierten Studien, welche eine klinische Überlegenheit der DES zeigen, zu erklären.

	EXCELSIOR-ACT Patienten			EXCELSIOR Subgruppe gesamte Subgruppe n=57	p <sup>1</sup>	p <sup>2</sup>
	Gesamtes Patienten-Kollektiv (n=117)	Patienten mit RPA ≤ 14% n=78	Patienten mit RPA >14% n=39			
Alter (Jahre)	64,8± 9,0	63,2± 9,8	67,8± 6,2	66,5± 8,7	0,24	0,009
Frauen	16 (13,7)	13 (16,7)	3 (7,7)	12 (21,1)	0,21	0,26
Aktiver Raucher	23 (19,7)	19 (24,4)	4 (10,3)	10 (17,5)	0,74	0,09
Arterielle Hypertonie	95 (81,2)	63 (80,8)	32 (82,1)	48 (84,2)	0,63	1,00
Diabetes mellitus	26 (22,2)	13 (16,7)	13 (33,3)	15 (26,3)	0,55	0,06
Hypercholesterinämie	92 (78,6)	61 (78,2)	31 (79,5)	46 (80,7)	0,75	1,00
Body mass index (kg/m <sup>2</sup> )	27,2± 3,9	27,6± 4,1	26,6± 3,3	26,7± 2,7	0,40	0,20
Kreatinin (µmol/l)	88,5 (22,1)	79,6 (26,5)	88,5 (26,5)	79,6 (26,5)	0,49	0,16
Reduzierte LV-Funktion <sup>3</sup>	28 (23,9)	19 (24,4)	9 (23,1)	16 (28,1)	0,56	1,00
Z. n. Myokardinfarkt	24 (20,5)	16 (20,5)	8 (20,5)	10 (17,5)	0,64	1,00
CCS Angina Klasse III/IV <sup>4</sup>	36 (30,8)	24 (30,8)	12 (30,8)	12 (21,1)	0,18	1,00
Aktuelle Medikation						
ASS	117 (100,0)	78 (100,0)	39 (100,0)	57 (100,0)	1,00	1,00
Betablocker	100 (85,5)	69 (88,5)	31 (79,5)	50 (87,7)	0,69	0,27
ACE-Hemmer	75 (64,1)	49 (62,8)	26 (66,7)	29 (50,9)	0,10	0,84
AT1-Blocker	8 (6,8)	3 (3,8)	5 (12,8)	9 (15,8)	0,06	0,12
Diuretika	42 (35,9)	26 (33,3)	16 (41,0)	13 (22,8)	0,08	0,54
Nitrate	3 (2,6)	3 (3,8)	0 (0,0)	6 (10,5)	0,07	0,55
Statine	107 (91,5)	70 (89,7)	37 (94,9)	50 (87,7)	0,44	0,49
Aktuelle Koronarintervention						
Mehrgefäßintervention	34 (29,1)	22 (28,2)	12 (30,8)	15 (26,3)	0,71	0,83
DES verwendet	86 (73,5)	56 (71,8)	30 (76,9)	15 (26,3)	<0,001	0,66
Stentimplantation in						
Linker Hauptstamm	6 (5,1)	3 (3,8)	3 (7,7)	0 (0,0)	0,08	0,40
Ramus intervent. ant.	57 (48,7)	42 (53,8)	15 (38,5)	25 (43,9)	0,55	0,17
Ramus circumflexus	41 (35,0)	26 (33,3)	15 (38,5)	24 (42,1)	0,37	0,68
A. coronaria dextra	46 (39,3)	30 (38,5)	16 (41,0)	20 (35,1)	0,59	0,84
Aorto-koronare Bypass-OP	5 (4,3)	2 (2,6)	3 (7,7)	3 (5,3)	0,77	0,33

**Tabelle 3: Demographische, klinische und angiographische Charakteristika der Studienpatienten**

Die Werte sind als Absolutzahlen (prozentualer Anteil in Klammern) oder als Mittelwerte ± Standardabweichungen angegeben. Verglichen wurden die Gruppen mittels  $\chi^2$  Test oder unifaktorieller ANOVA. Kreatinin wurde wegen der nicht-parametrischen Verteilung als Median (Interquartiler Abstand) angegeben und die Werte mittels des Mann-Whitney-U Testes verglichen.

P<sup>1</sup> gibt die Ergebnisse des Vergleiches zwischen der EXCELSIOR-ACT und der EXCELSIOR Kohorte an, P<sup>2</sup> den Vergleich der EXCELSIOR-ACT Subgruppen.

<sup>3</sup>Reduzierte LV-Funktion definiert als linksventrikuläre Ejektionsfraktion <55%.

<sup>4</sup>CCS Angina -Klasse III: Starke Einschränkung der körperlichen Aktivität durch Angina pectoris. CCS-Klasse IV: Unmöglichkeit der körperlichen Belastung ohne Beschwerden. Symptome können auch in Ruhe auftreten. RPA= residuelle Plättchenaggregation (Endaggregation nach Stimulation mit 5µM ADP); Z.n.= Zustand nach; LV= linksventrikulär; CCS= Canadian Cardiovascular Society; DES= drug eluting stent.

## 4.2. Verlauf der Thrombozytenfunktion

### 4.2.1. Primärer Endpunkt der EXCELSIOR-ACT Studie

Der primäre Endpunkt der EXCELSIOR-ACT Studie war die residuelle Plättchenaggregation (RPA) nach Stimulation mit 5  $\mu$ M ADP nach Dosisanpassung von 75 auf 150 mg bei Patienten mit einer RPA von >14% am Tag 1 nach Gabe der Bolusdosis von 600mg Clopidogrel. Bei diesen Patienten nahm die Thrombozytenaggregation im Median von 24% (25%-75% Quartile: 18-32%) am Tag 1 nach Bolusdosis signifikant auf 14% (8-20%) am Tag 14 nach der Intervention ab ( $p < 0,001$ ). Die Thrombozytenaggregation nahm am Tag 28 mit 14% (6-22%) nicht weiter ab (Abbildung 21). In der Subgruppe der Patienten mit einer RPA  $\leq 14\%$ , die keine Dosisanpassung erhielten, nahm die RPA zu Tag 14 von initial im Median 4% (1-7%) auf 8% (2-20%) zu ( $p < 0,001$ ). Im weiteren Verlauf kam es zu keinem weiteren Anstieg am Tag 28 mit einer RPA von 8% (3-15%). Der Vergleich zwischen beiden Gruppen am Tag 14 und 28 zeigte aber eine in der Gruppe der Patienten mit hoher Ausgangsaggregation immer noch höhere RPA ( $p=0,04$ ).

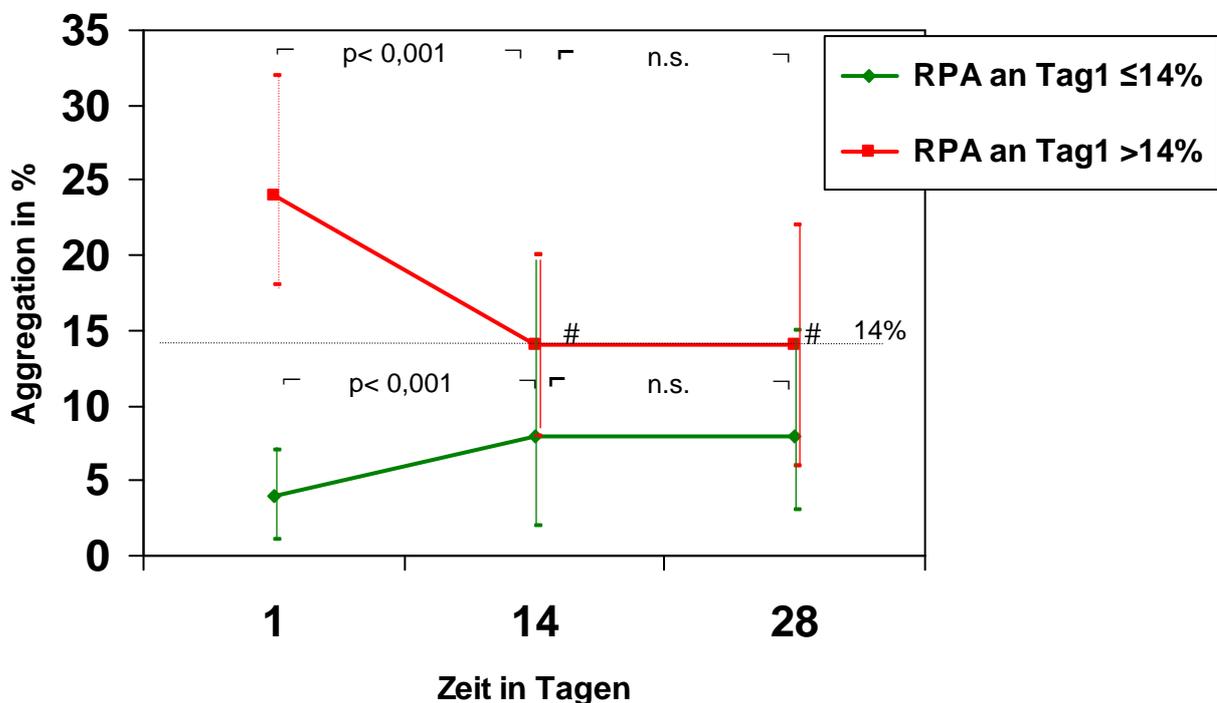


Abbildung 21: Verlauf der RPA (5  $\mu$ M ADP) im EXCELSIOR-ACT Kollektiv

Die Kurven in Abbildung 21 stellen jeweils den Median mit 25%- und 75% Quartilen dar. Die in der Abbildung angegebenen p-Werte geben den Vergleich zwischen zwei Zeitpunkten mittels Wilcoxon Test an. Mit # ist der Vergleich zwischen den zwei Gruppen nach 14 und 28 Tagen mittels Mann-Whitney-U Test markiert (p-Wert jeweils 0,04). Die hellgraue Linie stellt den Grenzwert (14%) zwischen adäquater und inadäquater Thrombozytenreaktivität dar. Die RPA ist die residuelle Plättchenaggregation (Endaggregation nach Stimulation mit 5 µM ADP); n.s. = nicht signifikant.

#### 4.2.2. Residuelle Thrombozytenreaktivität nach Stimulation mit 20 µM ADP

Der Verlauf der Thrombozytenfunktion nach Stimulation mit 20 µM ADP in der EXCELSIOR-ACT Studie ist in der folgenden Tabelle 4 dargestellt. Wie durch die Definition der Patientengruppen zu erwarten, unterschieden sich die Gruppen an Tag 1 in der verbleibenden Thrombozytenaggregation signifikant. Nach Dosisanpassung wurde hingegen an Tag 14 und 28 kein signifikanter Unterschied mehr zwischen den Gruppen beobachtet. Auch zeigte sich analog zu den Ergebnissen der RPA nach Stimulation mit 5 µM ADP für die Stimulation mit 20 µM ADP eine signifikante Änderung von Tag 1 zu Tag 14, nicht aber von Tag 14 zu Tag 28.

	RPA ≤14% (n=78)	RPA >14% (n=39)	p-Wert <sup>1</sup>	p-Wert <sup>2</sup> RPA ≤14%	p-Wert <sup>2</sup> RPA >14%
RPA (20 µM ADP)					
Tag 1	20 (7-30)	55 (42-63)	<0,001	-	-
Tag 14	34 (14-47)	33 (24-43)	0,42	<0,001	<0,001
Tag 28	28 (14-45)	34 (22-43)	0,21	0,45	0,97

#### Tabelle 4: Residuelle Thrombozytenaggregation der EXCELSIOR- ACT Patienten nach Stimulation mit 20µM ADP

Die Werte sind als Median (25%-75% Quartile) angegeben. p<sup>1</sup> gibt den Vergleich zwischen den zwei Kohorten zum jeweiligen Zeitpunkt mittels Mann-Whitney-U Test an. p<sup>2</sup> gibt den Vergleich an Tag 14 zu Tag 1 und an Tag 28 zu Tag 14 mittels Wilcoxon Test an. RPA= residuelle Plättchenaggregation.

### 4.2.3. Vergleich der Thrombozytenreaktivität zwischen dem EXCELSIOR-ACT und dem EXCELSIOR Kollektiv

Ein Vergleich der Thrombozytenreaktivität zwischen der EXCELSIOR-ACT Studie und dem Vergleichskollektiv der EXCELSIOR Studie zeigt eine vergleichbare RPA am Tag 1 nach der Intervention in beiden Kollektiven.

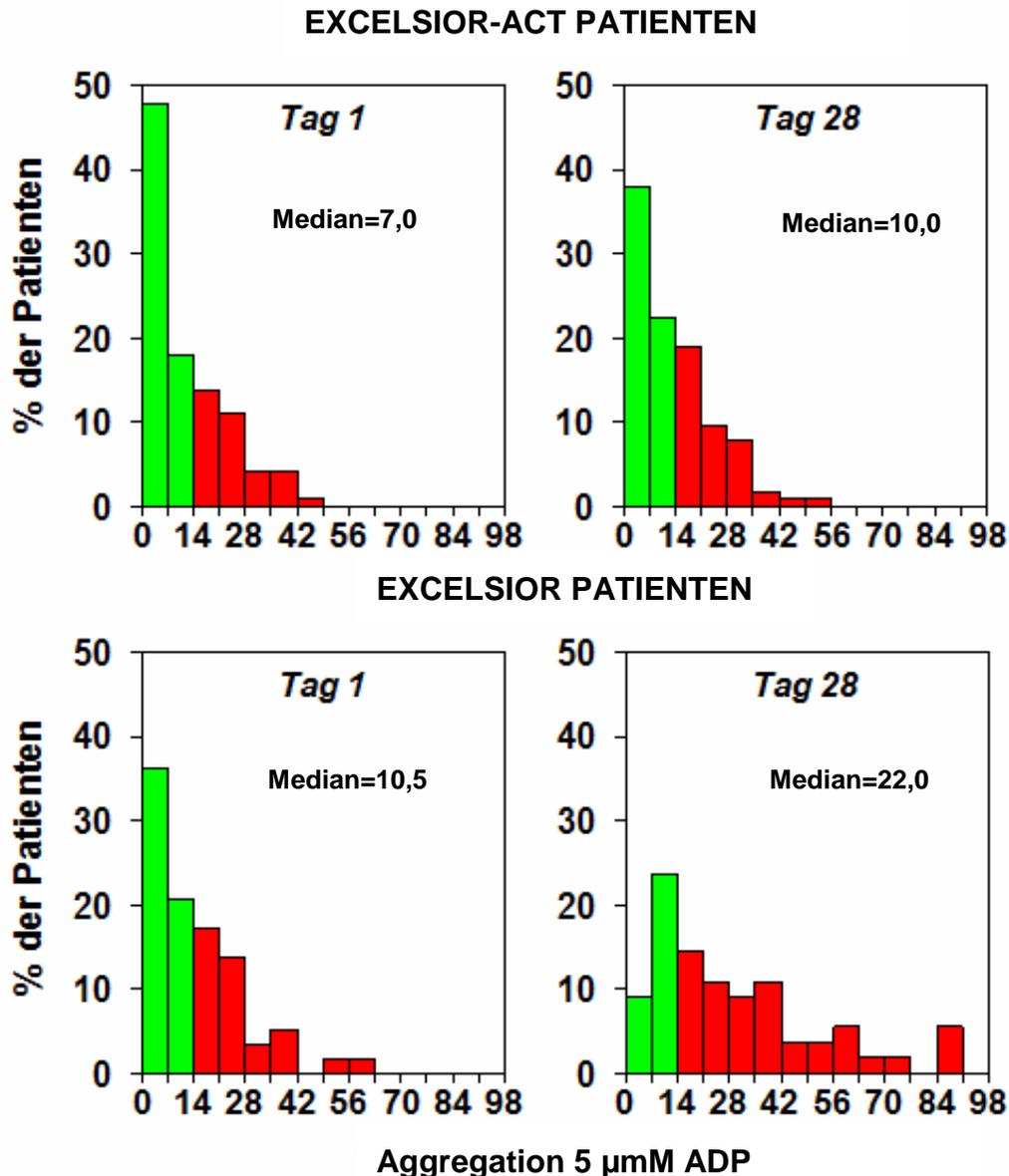
An den Tagen 14 und 28 zeigt die RPA im EXCELSIOR-Kollektiv, bei dem keine Dosiserhöhung bei Patienten mit erhöhter residueller Thrombozytenreaktivität am Tag 1 durchgeführt wurde, mit beiden Konzentrationen von ADP signifikant höhere Werte als bei den Patienten der EXCELSIOR-ACT Studie (Tabelle 5). Bei Betrachtung des Zeitverlaufs der Aggregation in beiden Kollektiven über den Beobachtungszeitraum fällt auf, dass die RPA von Tag 1 zu Tag 14 im EXCELSIOR-Kollektiv deutlich stärker ansteigt als im EXCELSIOR-ACT Gesamtkollektiv ( $p < 0,001$ ). In beiden Kollektiven bleibt die RPA von Tag 14 zu Tag 28 weitgehend stabil.

	EXCELSIOR ACT (n=117)	EXCELSIOR (n=57)	p-Wert
RPA (5 $\mu$ M ADP)			
Tag 1	7 (2-18)	10 (4-20)	0,23
Tag 14	10 (4-20)	17 (9-32)	0,001
Tag 28	10 (4-18)	20 (9-22)	<0,001
RPA (20 $\mu$ M ADP)			
Tag 1	30 (10-46)	39 (23-46)	0,38
Tag 14	34 (20-45)	43 (32-55)	<0,001
Tag 28	32 (18-44)	44 (33-60)	<0,001

**Tabelle 5: Vergleich der Thrombozytenfunktionsparameter zwischen EXCELSIOR- ACT und EXCELSIOR**

Werte als Median (25%-75% Quartile) angegeben. P gibt den Vergleich zwischen den zwei Kohorten zum jeweiligen Zeitpunkt mittels Mann-Whitney-U Test an.

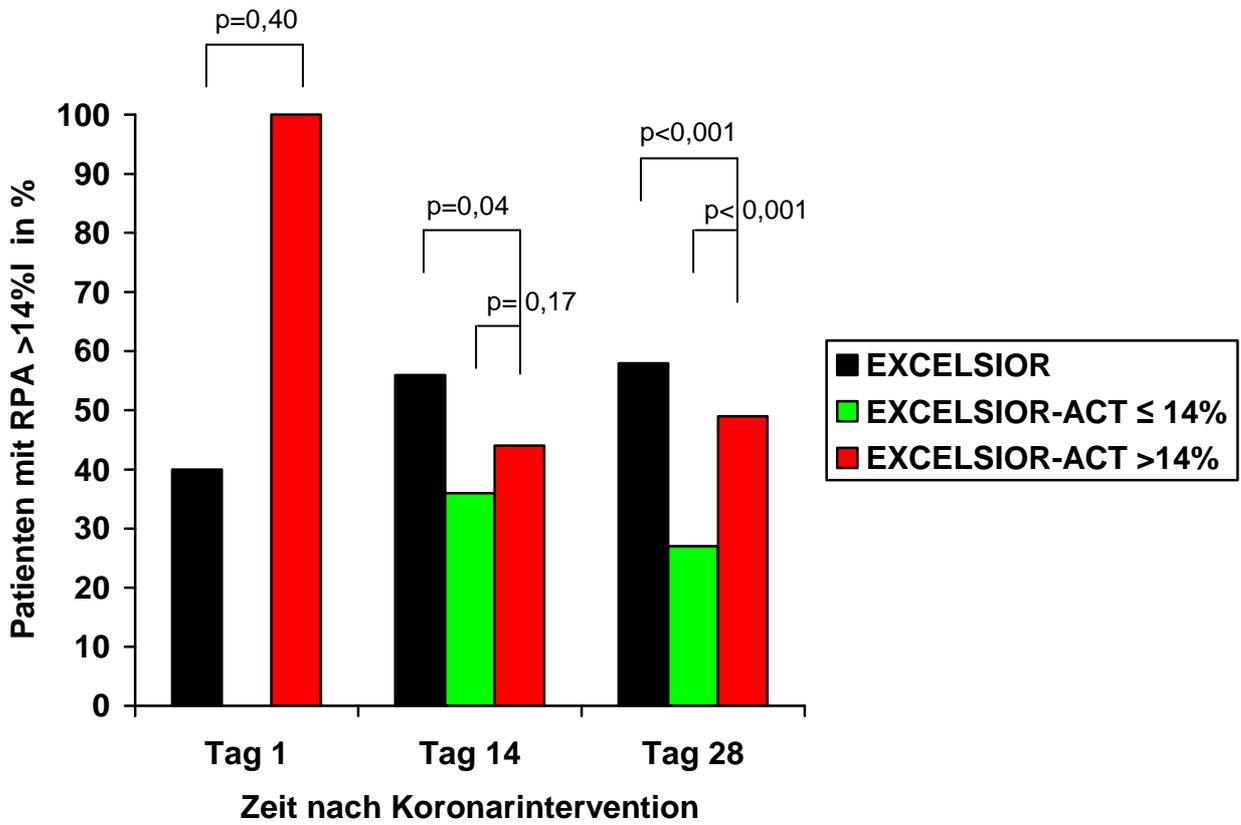
Zur Illustration der Verteilung der RPA (5  $\mu$ M ADP), die durch Median und Quartile nur begrenzt darstellbar ist, sind die gemessenen Einzelwerte nach Stimulation mit ADP 5  $\mu$ M als Histogramm in der Abbildung 22 für Tag 1 und Tag 28 dargestellt. Während die Aggregation in beiden Kohorten am Tag 1 vergleichbar war ( $p=0,23$ ) zeigten sich an Tag 28 im Median deutlich niedrigere Werte in der EXCELSIOR-ACT Kohorte ( $p < 0,001$ ) und auch eine im Vergleich deutlich geringere Streuung.



**Abbildung 22: Histogramm der RPA (5  $\mu$ M ADP) in EXCELSIOR-ACT und EXCELSIOR**

Die Abbildung zeigt die Verteilung der Patienten nach Thrombozytenaggregation jeweils gemessen an Tag 1 und Tag 28 nach durchgeführter Koronarintervention. Die grünen Balken stellen die Patienten mit einer RPA  $\leq 14\%$ , die roten Balken die Patienten mit einer RPA  $> 14\%$  dar (Vergleich mittels Mann-Whitney-U-Test).

Der Anteil der Patienten mit einer RPA (5  $\mu$ M ADP)  $> 14\%$  zeigte ebenfalls deutliche Unterschiede zwischen beiden Studien (Abbildung 23). Während dieser an Tag 1 nach Bolusdosis in der EXCELSIOR-ACT Studie bei 33% und in der EXCELSIOR Kohorte bei 40% lag ( $p=0,40$ ), zeigten sich an Tag 14 (39 vs. 56%,  $p=0,04$ ) und Tag 28 (34 vs. 58%,  $p<0,001$ ) deutliche Unterschiede. Für die EXCELSIOR-ACT Kohorte ist die Verteilung in die Untergruppen ohne bzw. mit Dosisanpassung dargestellt.



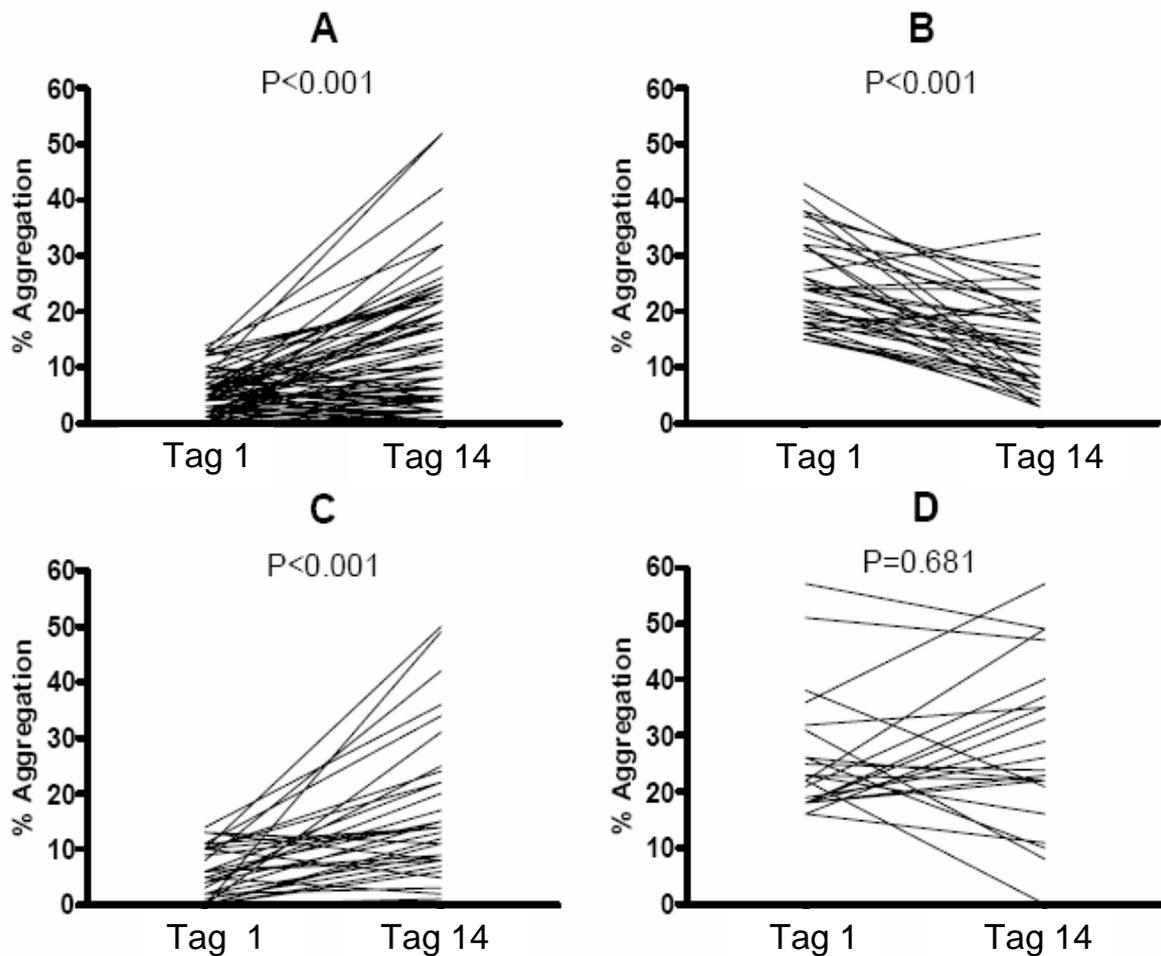
**Abbildung 23: Anteil der Patienten mit RPA >14% (5  $\mu$ M ADP)**

- EXCELSIOR-Vergleichskohorte.**  
 Diese Patienten erhielten unabhängig von der an Tag 1 nach Intervention gemessenen RPA eine Dosis von 75 mg Clopidogrel pro Tag.
- EXCELSIOR-ACT Gruppe mit RPA  $\leq$ 14% an Tag 1 nach Intervention.**  
 Diese Patienten erhielten für die Studiendauer von 4 Wochen 75 mg Clopidogrel pro Tag.
- EXCELSIOR-ACT Gruppe mit RPA >14% an Tag 1 nach Intervention.**  
 Diese Patienten erhielten eine zweite Bolusdosis von 300 mg Clopidogrel gefolgt von einer täglichen Erhaltungsdosis von 150 mg Clopidogrel für die Studiendauer.

Der Vergleich zwischen den EXCELSIOR-ACT Gruppen erfolgte mittels  $\chi^2$  Test. Daraus ergab sich an Tag 14 kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen (p=0,17). An Tag 28 hingegen lässt sich ein signifikanter Unterschied (p<0,001) feststellen.

Die Einzelwerte der Thrombozytenaggregation bei den Patienten der EXCELSIOR- und EXCELSIOR-ACT-Kohorten von Tag 1 zu Tag 14 ist in Abbildung 24 dargestellt. Es zeigt sich, dass es in der EXCELSIOR-ACT-Population bei der Patientengruppe mit 75 mg Clopidogrel täglich (A) zu einem signifikanten Anstieg ( $p < 0,001$ ) der Thrombozytenaggregation kommt. Bei der Patientengruppe mit 150 mg Clopidogrel (B) hingegen kommt es zu einer signifikanten Abnahme ( $p < 0,001$ ) der Thrombozytenaggregation (Wilcoxon-Test).

Der Aggregationsverlauf des EXCELSIOR-Population zeigt bei den Patienten mit initial (Tag 1) einer Thrombozytenaggregation  $\leq 14\%$  (C) einen signifikanten ( $p = 0,001$ ) Anstieg zum Tag 14. Die Patientengruppe, die an Tag 1 eine Thrombozytenaggregation  $> 14\%$  aufwies und unverändert mit 75 mg Clopidogrel pro Tag weiterbehandelt wurde, bleibt die Thrombozytenaggregation auch an Tag 14 erhöht ( $p = 0,681$  vs. Tag 1).



**Abbildung 24: Einzeldarstellung der Thrombozytenaggregation an Tag 1 und Tag 14 der EXCELSIOR-ACT und der EXCELSIOR Patienten.**

A und B reflektieren die Ergebnisse der EXCELSIOR-ACT Patienten, C und D die Ergebnisse der EXCELSIOR Patienten.

**A:** Patientengruppe der EXCELSIOR-ACT-Studie, welche an Tag 1 eine Thrombozytenaggregation  $< 14\%$  aufwies und 75mg Clopidogrel/d erhielten (28 Tage).

**B:** EXCELSIOR-ACT Patientengruppe, welche initial eine Thrombozytenaggregation von  $\geq 14\%$  zeigten und daraufhin 150 mg Clopidogrel/d erhielten (28 Tage).

**C:** EXCELSIOR Patientengruppe mit einer initialen Thrombozytenaggregation von  $< 14\%$  und einer Medikation von 75 mg Clopidogrel/d.

**D:** EXCELSIOR Patientengruppe mit einer Thrombozytenaggregation von  $\geq 14\%$  an Tag 1 und einer davon unabhängigen anschließenden Clopidogrelmedikation von 75 mg/d über 28 Tage.

Die p-Werte vergleichen die Ergebnisse von Tag 1 und Tag 14 innerhalb der jeweiligen Gruppe mittels Wilcoxon-Test.

#### 4.2.4. Expression von Oberflächenproteinen auf den Thrombozyten

Der Zeitverlauf der Expression spezifischer Oberflächenproteine (P-Selektin, GP-IIb/IIIa) auf den Thrombozyten nach Stimulation mit ADP 20 µM bei den EXCELSIOR-ACT Patienten ist in der folgenden Tabelle 6 zusammengefasst. Wie durch die Definition der Subgruppen zu erwarten, unterschieden sich die Kohorten an Tag 1 in allen Parametern signifikant. Nach Dosisanpassung bei den Patienten mit initialer Thrombozytenaggregation >14% kommt es dann an Tag 14 und 28 zum Angleich der Expressionswert zwischen den Gruppen.

	RPA ≤14% (n=78)	RPA >14% (n=39)	p-Wert <sup>1</sup>	p-Wert <sup>2</sup> RPA ≤14%	p-Wert <sup>2</sup> RPA >14%
Expression von P-Selektin nach Stimulation mit 20 µM ADP					
Tag 1	10 (7-16)	25 (15-35)	<0,001	-	-
Tag 14	13 (8-17)	12 (10-19)	0,37	0,005	<0,001
Tag 28	13 (8-18)	13 (10-16)	0,85	0,37	0,46
Expression von aktiviertem GP-IIb/IIIa nach Stimulation mit 20 µM ADP					
Tag 1	44 (30-61)	68 (53-82)	<0,001	-	-
Tag 14	38 (26-57)	40 (28-55)	0,86	0,01	<0,001
Tag 28	40 (30-56)	42 (33-53)	0,79	0,63	0,79

**Tabelle 6: Übersicht über die Expression von Oberflächenproteinen bei den EXCELSIOR- ACT Patienten**

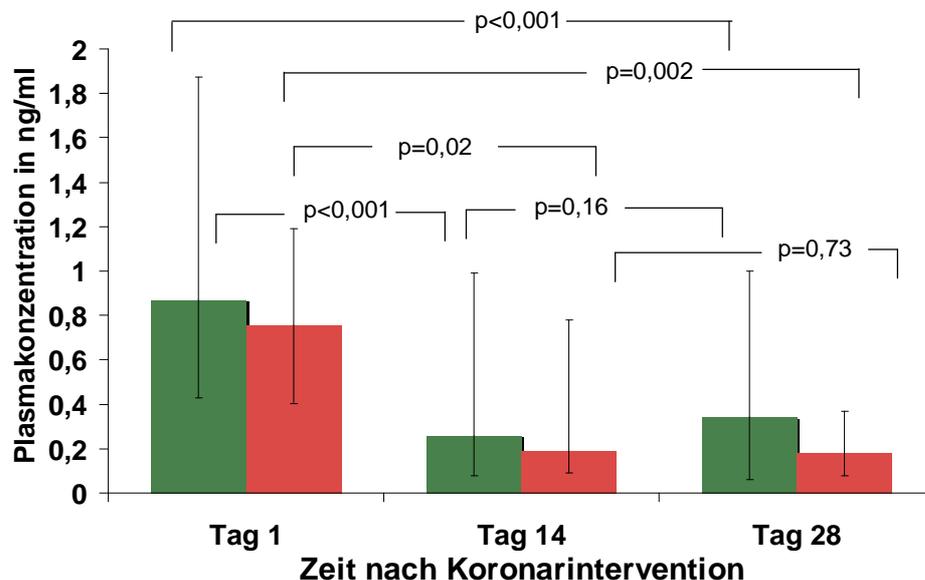
Die Werte sind als Median (25%-75% Quartile) angegeben. p<sup>1</sup> gibt den Vergleich zwischen den zwei Kohorten zum jeweiligen Zeitpunkt mittel Mann-Whitney-U Test an. p<sup>2</sup> gibt den Vergleich an Tag 14 zu Tag 1 und an Tag 28 zu Tag 14 mittels Wilcoxon Test an. Die Ergebnisse der Durchflusszytometrie sind ohne Einheit angegeben (arbitrary units) und stellen die mittlere relative Fluoreszenzintensität dar.

### **4.3. Plasmakonzentration von Clopidogrel und Carboxy-**

#### **Clopidogrel**

Die Bestimmung des aktiven Metaboliten war nicht möglich, da zum Zeitpunkt der Blutentnahme keine Information über die Erfordernisse zur präanalytischen Stabilisierung des aktiven Metaboliten vorlag. Im Folgenden werden daher nur die absoluten Konzentrationen von Clopidogrel und relative Konzentrationen (berichtet als Einheiten/ml) des mengenmäßig dominanten pharmakologisch aber unwirksamen Metaboliten Carboxy-Clopidogrel (SR26334) angegeben.

Die Plasmakonzentration von Clopidogrel lag bei den Patienten der EXCELSIOR-ACT Studie ohne Dosisanpassung (RPA  $\leq$  14%) bei 0,87 ng/ml (25%-75% Quartile:0,43-1,87 ng/ml) am Tag 1 nach Gabe der Bolusdosis von 600 mg Clopidogrel. Am Tag 14 lagen die Plasmakonzentrationen bei 0,26 (0,08-0,99) ng/ml und am Tag 28 bei 0,34 (0,06-1,00) ng/ml (Abbildung 25). Bei Patienten, die eine Dosisanpassung auf 150 mg Clopidogrel täglich erhielten, lag die Clopidogrel- Plasmakonzentration an Tag 1 bei 0,76 (0,40-1,19) ng/ml, am Tag 14 bei 0,19 (0,09-0,78) ng/ml und am Tag 28 bei 0,18 (0,08-0,37) ng/ml. Der Vergleich zwischen den beiden Gruppen ohne bzw. mit Dosiserhöhung zeigte zu keinem Zeitpunkt einen signifikanten Unterschied.

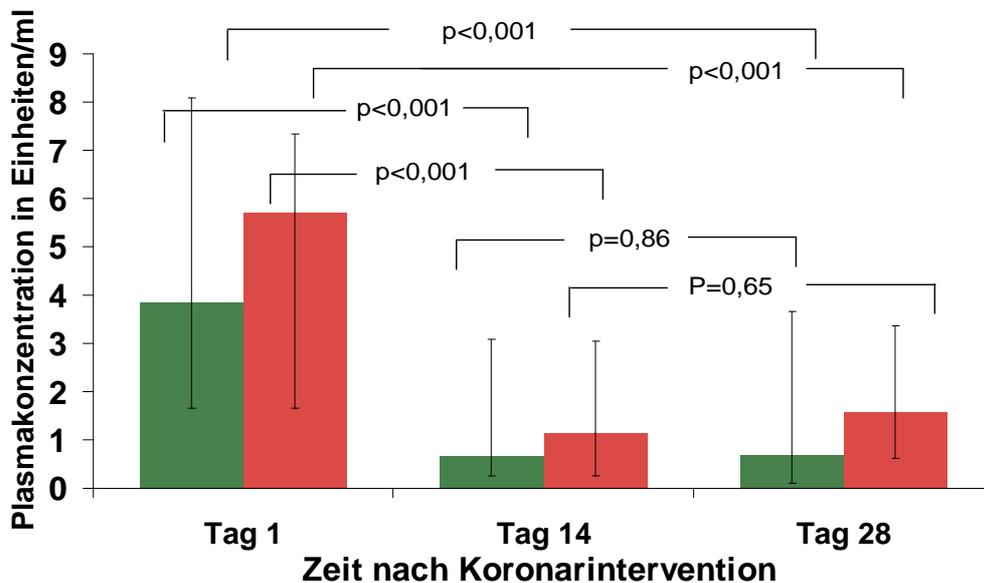


#### Abbildung 25: Clopidogrel-Plasmakonzentrationen

Die Werte sind als Median mit 25%- und 75% Quartile angegeben. Der Vergleich zwischen den einzelnen Zeitpunkten erfolgte mittels Wilcoxon Test. Der Vergleich zwischen den Gruppen zu den einzelnen Zeitpunkten mittels Mann-Whitney U Test.

Die **grünen Balken** stellen die Werte der Patientengruppe mit anfänglicher RPA ≤14%, (5 µM ADP), die tägliche Clopidogreldosis von 75 mg erhielten, dar. Die **roten Balken** zeigen die Plasmakonzentrationen der Patientengruppe, deren anfängliche RPA >14% betrug, und die 150 mg Clopidogrel pro Tag erhielten. Zwischen den beiden Gruppen zeigte sich zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied.

An Tag 1 lag die Carboxy-Clopidogrelplasmakonzentration der mit 75 mg Clopidogrel behandelten EXCELSIOR-ACT Gruppe bei 3,86 (1,67-8,08) Einheiten/ml. Die Carboxy-Clopidogrelplasmakonzentration der 150 mg Gruppe bei 5,72 (1,66-7,34) Einheiten/ml. Die Konzentrationen nahmen zum Tag 14 sowohl in der 75 mg Gruppe auf 0,67 (0,25-3,08) Einheiten/ml als auch in der 150 mg Gruppe auf 1,16 (0,26-3,05) Einheiten/ml signifikant ab. An Tag 28 lagen die Werte bei 0,69 (0,11-3,66) Einheiten/ml in der 75 mg Gruppe und bei 1,58 (0,61-3,36) Einheiten/ml in der 150 mg Gruppe (Abbildung 26).



**Abbildung 26: Plasmakonzentrationen von Carboxy-Clopidogrel (SR26334)**

Die Werte sind als Median mit 25%- und 75% Quartile angegeben. Der Vergleich zwischen den einzelnen Zeitpunkten erfolgte mittels Wilcoxon Test. Der Vergleich zwischen den Gruppen zu den einzelnen Zeitpunkten mittels Mann-Whitney U Test. Die **grünen Balken** stellen die Werte der Patientengruppe mit anfänglicher RPA ≤14% (5 µM ADP), die tägliche Clopidogreldosis von 75 mg erhielten, dar. Die **roten Balken** zeigen die Plasmakonzentrationen der Patientengruppe, deren anfängliche RPA >14% betrug, und die 150 mg Clopidogrel pro Tag erhielten. Zwischen den beiden Gruppen zeigte sich zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied.

#### **4.4. Klinische Ereignisrate**

Auch wenn diese Studie sicherlich keine ausreichende Fallzahl aufweist, um den Einfluss auf die klinische Ereignisrate zu untersuchen, wurde das Auftreten von klinischen Endpunkten innerhalb von 30 Tagen dennoch erfasst, um Hinweise auf eine mögliche Gefährdung der Patienten durch die Erhöhung der Clopidogreldosis erkennen zu können. Wie in Tabelle 7 aufgeführt, kam es nur zu wenigen bedeutsamen Ereignissen (2 Myokardinfarkte). Zwei weitere Patienten entwickelten nach Angiographie ein Aneurysma falsum an der Punktionsstelle, das allerdings in beiden Fällen konservativ behandelt werden konnte.

	EXCELSIOR-ACT		EXCELSIOR
	75 mg	150 mg	75 mg
	(n=78)	(n=39)	(n=57)
Tod	0	0	0
Myokardinfarkt	1	1	0
Schwerwiegende Blutung nach den TIMI Kriterien	0	0	0
Aneurysma falsum	2	0	0

**Tabelle 7: Klinische Ereignisrate der behandelten Patienten**

TIMI (Thrombolysis in myocardial infarction) schwerwiegende Blutung definiert als Blutung assoziiert mit einem Hb-Abfall >5 g/l oder intrazerebrale Blutung oder tödliche Blutung. Wegen der geringen Anzahl an Ereignissen wurde auf einen statistischen Vergleich verzichtet.

Die Daten der Tabelle 7 zeigen, dass es in der EXCELSIOR-ACT-Studie keinen Hinweis darauf gab, dass eine Erhöhung der Clopidogreldosis auf 150 mg mit einer Zunahme von Blutungskomplikationen oder anderer schwerer kardiovaskulärer Ereignisse oder mit einer erhöhten Inzidenz von Aneurysmae falsa assoziiert war.

## **5. Diskussion**

Die Thrombozyten spielen bei der physiologischen Reaktion auf Gefäßverletzungen eine entscheidende Rolle. Durch ihre Aktivierung mit nachfolgender Thrombozytenaggregation an die geschädigte Gefäßwand kommt es zu einem Verschluss der Verletzung, der primären und Einleitung der nachfolgenden sekundären Hämostase. Im Rahmen artherosklerotischer Veränderungen trägt die dadurch bedingte Thrombozytenaktivierung und -aggregation entscheidend zum Fortschreiten des Krankheitsgeschehens bei und kann letztlich zum thrombotischen Verschluss der veränderten Gefäßabschnitte führen (131). Die Aktivierung der Thrombozyten und deren Folgen lassen sich auch bei Gefäßinterventionen nicht vollständig unterbinden. In der Humanmedizin hat daher die Hemmung der Thrombozytenfunktion in der Therapie von artherosklerotischen Erkrankungen und bei perkutanen Koronargefäßinterventionen einen zentralen Stellenwert. Die Komplikationsrate nach derartigen Interventionen, insbesondere die Häufigkeit von postinterventionellen subakuten Stenosen, konnte durch den Einsatz von Therapieschemata auf der Grundlage von Thrombozytenaggregationshemmern entscheidend reduziert werden (27,30,132,133).

Die aktuelle Standardtherapie besteht aus der Kombination von ASS ( $\geq 100$  mg/d) und einem Thienopyridin, meist Clopidogrel (75 mg/d). Dabei wird ASS in der Regel als lebenslange Dauertherapie verabreicht. Clopidogrel wird in Abhängigkeit von der Art der verwendeten Stents über einen Zeitraum von 4 Wochen bis zu 12 Monaten gegeben. Um einen schnellen Wirkungseintritt von Clopidogrel vor der Koronarintervention zu erreichen, wird gegenwärtig eine Bolusdosis von 600 mg verabreicht. Allerdings findet sich auch nach Gabe einer solchen Bolusdosis eine erhebliche interindividuelle Variabilität im Ansprechen auf Clopidogrel (104). Die EXCELSIOR-Studie zeigte, dass diese Variabilität von großer klinischer Bedeutung ist (104). Patienten, die eine Thrombozytenaggregation ( $5 \mu\text{mol/l ADP}$ ) über dem Median der Kohorte (14%) hatten, wiesen eine signifikant höhere klinische Ereignisrate innerhalb der ersten 30 Tage (104) und auch im Langzeitverlauf über ein Jahr nach Koronarintervention auf (105).

Die Beziehung zwischen hoher Thrombozytenreaktivität unter der Behandlung mit Clopidogrel und erhöhtem Risiko für klinische Ereignisse nach durchgeführter Stentimplantation wurde auch von anderen Arbeitsgruppen nachgewiesen. Diese Assoziation besteht unabhängig davon, ob bei den Patienten eine elektive Koronarintervention bei Belastungskoronarinsuffizienz durchgeführt wurde, oder die Intervention bei Patientenkohorten mit akutem Koronarsyndrom oder akutem Myokardinfarkt erfolgte (121-124,134). Dabei treten klinische Ereignisse häufiger bei Patienten auf, welche trotz Clopidogrel und ASS eine erhöhte Reaktivität der Thrombozyten nach Stimulation mit ADP aufweisen. Insbesondere das Auftreten von frühen postinterventionellen Stentthrombosen ist mit einer erhöhten Thrombozytenreaktivität assoziiert (122,134).

Es ergibt sich daraus die Fragestellung der vorliegenden Arbeit, ob durch eine selektive Dosiserhöhung von Clopidogrel nur bei Patienten mit unzureichender plättchenhemmender Wirkung die erhöhte Thrombozytenreaktivität besser unterdrückt werden kann. Eine unzureichende Wirkung von Clopidogrel wurde als Thrombozytenreaktivität  $>14\%$  in der Lichttransmissionsaggregometrie, gemessen nach Stimulation mit ADP  $5 \mu\text{M}$ , definiert. Für diesen Grenzwert konnte in der EXCELSIOR-Studie gezeigt werden, dass für die Patienten sowohl hinsichtlich der 30-Tages-Ereignisrate von Tod, nicht-tödlichem Myokardinfarkt und dringlicher Revaskularisierung der Zielläsion (104) als auch hinsichtlich der 12-Monats-Inzidenz von Tod oder nicht-tödlichem Myokardinfarkt (105) ein statistisch signifikantes und therapeutisch relevantes erhöhtes Risiko besteht.

Tatsächlich zeigen die Ergebnisse der EXCELSIOR-ACT-Studie, dass durch Verdoppelung der Clopidogrelerhaltungsdosis eine Verbesserung der Thrombozytenfunktionshemmung bei Patienten, die anfänglich eine schwache Inhibition der Aggregation aufwiesen, erzielt werden konnte. Somit erreicht durch die Dosisanpassung insgesamt ein größerer Patientenanteil die gewünschte Hemmung der Thrombozytenfunktion.

Bei der Patientengruppe, welche initial ein unzureichendes Ansprechen auf Clopidogrel ( $\text{RPA} > 14\%$ ) zeigte und die doppelte Clopidogreldosis erhielt, konnte nach 14 Tagen eine signifikante Reduktion der Thrombozytenaggregation ( $p < 0,001$ , Abb.21) nachgewiesen werden. Die RPA steigt bei der Gruppe mit anfänglich adäquater Aggregationshemmung ( $\text{RPA} \leq 14\%$ ) an Tag 14 im Vergleich zu Tag 1 an, liegt im Median aber immer noch unter  $14\%$  ( $p < 0,001$ , Abb.21).

Trotz der Verbesserung der Thrombozytenfunktionshemmung der 150 mg Gruppe von Tag 1 zu Tag 14 liegt die gemessene RPA am Tag 14 signifikant höher als in der Gruppe mit initial gutem Ansprechen. Die Thrombozytenaggregation ist bei beiden Gruppen am Tag 28 vergleichbar mit den am Tag 14 gemessenen Werten. Durch die Dosissteigerung werden bei 90% (35 von 39) der Patienten, welche initial suboptimal auf Clopidogrel ansprachen, eine RPA  $\leq$  14% erreicht. Dennoch zeigt diese Gruppe im Mittel immer noch eine höhere Thrombozytenaggregation als die 75 mg Gruppe mit einer initialen RPA  $\leq$  14%. Insgesamt liegen 60% der EXCELSIOR-ACT-Patienten mit einer RPA  $\leq$  14% im angestrebten Bereich der Thrombozytenreaktivität.

Sowohl die Ergebnisse der Thrombozytenaggregometrie (mit ADP 20  $\mu$ M stimuliert) als auch die durchflusszytometrischen Ergebnisse bestätigen die Resultate der Aggregometrie mit 5  $\mu$ M ADP. Die Daten der mit 5  $\mu$ M ADP induzierten Thrombozytenaggregation wurden jedoch in der EXCELSIOR-Studie mit der klinischen Ereignisrate validiert und sind somit von höherer Wertigkeit in Bezug auf die Bewertung der Clopidogrel-Wirkung.

In der vorliegenden Arbeit wurden auch Plasmakonzentrationen von Clopidogrel und des in großen Mengen gebildeten unwirksamen Metaboliten Carboxy-Clopidogrel gemessen. Aufgrund einer unzureichenden präanalytischen Stabilisierung des sehr labilen aktiven Metaboliten konnte dieser in den asservierten Proben nicht quantifiziert werden.

Die Plasmakonzentrationen von Clopidogrel sind am Tag 1 in beiden Gruppen nicht verschieden. Die an den Tagen 14 und 28 gemessenen Plasmakonzentrationen von Clopidogrel sind sowohl in der Gruppe mit der Standarddosierung von Clopidogrel (75 mg/Tag) als auch in der Gruppe mit erhöhter Erhaltungsdosis (150 mg/Tag) signifikant niedriger als am Tag 1, was im Wesentlichen auf die Gabe der 600 mg Dosis am Tag vor der ersten Messung zurückzuführen ist. Die Erhöhung der Erhaltungsdosis führt zu keiner signifikanten Zunahme der Plasmakonzentration von Clopidogrel am Tag 14 bzw. am Tag 28 im Vergleich zur Standarddosierung, wobei bei der Bewertung der Plasmakonzentrationen die bekannten sehr ausgeprägten interindividuellen Unterschiede in den gemessenen Werten zu berücksichtigen sind (Abbildung 25).

Ähnliche Relationen gelten auch für die Betrachtung der Plasmakonzentrationen des unwirksamen Metaboliten Carboxy-Clopidogrel. Auch dessen Plasmakonzentrationen sind aufgrund des am Vortag verabreichten 600 mg Bolus von Clopidogrel um den Faktor 3-4 höher als unter der Erhaltungstherapie, worunter es zu einer signifikanten

Abnahme der Plasmakonzentration von Carboxy-Clopidogrel kommt (Abbildung 26). Offensichtlich ist weder die Messung der Muttersubstanz noch die des unwirksamen Metaboliten geeignet, als Parameter für die Steuerung der Clopidogreltherapie zu dienen. Ob dies unter klinischen Bedingungen durch die Bestimmung der Plasmakonzentrationen des aktiven Metaboliten möglich ist, wurde bisher in der Literatur nicht belegt. Die erheblichen Anforderungen an die Präanalytik und die Analytik lassen erwarten, dass dies - wenn überhaupt - dann nur in spezialisierten Kliniken möglich sein dürfte.

Die hier dokumentierten Ergebnisse favorisieren eindeutig Funktionsanalysen wie die Thrombozytenaggregometrie zur Individualisierung und Steuerung der Behandlung mit Thrombozytenaggregationshemmern wie z. B. Clopidogrel im Vergleich zur Konzentrationsbestimmung der wirksamen Bestandteile (Muttersubstanz bzw. aktiver Metabolit) im Blutplasma. Der offensichtliche Vorteil des Funktionstests begründet sich auch darin, dass mit diesem simultan durch Variation der Stimulantien die Wirkung anderer Aggregationshemmer (ASS, GPIIb/IIIa-Rezeptorantagonisten) mit erfasst werden kann.

Auch andere Arbeitsgruppen haben das Konzept einer Intensivierung der Clopidogreltherapie verfolgt. So wurden in der OPTIMUS-Studie 40 Patienten mit koronarer Herzkrankheit und Diabetes mellitus Typ 2, die keine adäquate Wirkung von Clopidogrel zeigten, randomisiert über 30 Tage entweder mit der Standarddosierung von Clopidogrel (75 mg/Tag) oder mit erhöhter Clopidogrel-Dosis (150 mg/Tag) behandelt (135). Die Autoren definierten eine inadäquate Wirkung von Clopidogrel als maximale Plättchenreaktivität >50% in der Lichttransmissionsaggregometrie nach Stimulation mit 20 µM ADP. Aufgrund der bekannten erhöhten Plättchenreaktivität von Diabetikern (136,137) mussten lediglich 64 Patienten untersucht werden, um das Studienkollektiv von 40 Patienten zu erhalten. Bei den mit der höheren Clopidogrel-Dosis behandelten Patienten kam es nach 30 Tagen zu einer signifikanten ( $p < 0,002$ ) Abnahme der maximalen Plättchenaggregation, wobei allerdings bei 60% der Patienten die Clopidogrel-Wirkung nach den erwähnten Kriterien noch immer suboptimal (Aggregation >50% mit 20 µM ADP) war.

Von Beckerath und Mitarbeiter (138) verglichen die plättchenhemmende Wirkung von 75 mg Clopidogrel/Tag mit 150 mg/Tag bei 60 Patienten mit Lichttransmissionsaggregometrie (5 µM ADP).

Die Patienten erhielten vor der Koronarintervention eine Bolusdosis von 600 mg Clopidogrel und wurden 12 Stunden nach der PCI ohne vorherige Messung des initialen Ansprechens in einen der beiden Behandlungsschemata randomisiert. Nach Behandlung über 30 Tage lagen die Aggregationswerte bei den mit 150 mg Clopidogrel-behandelten Patienten mit  $45,1 \pm 20,9\%$  signifikant niedriger als bei den Patienten unter der Standarddosierung ( $65,3 \pm 12,1\%$ ;  $p < 0,001$ ).

Beide Studien konnten aufgrund der niedrigen Fallzahlen keine Aussage zur klinischen Wertigkeit der intensivierten Plättchenhemmung machen. Bonello und Mitarbeiter (139,140) haben in zwei Studien nach identischem Design untersucht, ob Patienten klinisch von der Individualisierung der Bolusdosis profitieren. Andere Arbeitsgruppen hatten zuvor gezeigt, dass eine Steigerung der Dosis von 600 auf 900 mg Clopidogrel als einzelne Bolusdosis verabreicht zu keiner weiteren Zunahme der plättchenhemmenden Wirkung führt (83,84). Bonello und Mitarbeiter (139,140) randomisierten in beiden Studien die Patienten vor einer durchzuführenden Koronarintervention 24 Stunden nach Einnahme einer Standardaufsättigungsdosis von 600 mg Clopidogrel nach Bestimmung des VASP-(vasodilator stimulated phosphoprotein)-Index. Dieser Test gilt als zurzeit spezifischster Nachweis der Inhibition des P2Y<sub>12</sub>-Rezeptors. Ein Index  $>50\%$  war als nicht ausreichende Wirkung von Clopidogrel definiert, und nur Patienten mit einem Index  $>50\%$  konnten entweder zur konventionellen Therapie oder zur individualisierten Therapie in Bezug auf die Aufsättigungsdosis randomisiert werden. Bei den Patienten mit Standardtherapie wurde die PCI danach durchgeführt. Bei den Patienten mit individualisierter Therapie wurde versucht, den VASP-Index durch weitere Dosen von 600 mg Clopidogrel unter  $50\%$  zu senken, und erst danach wurde die PCI durchgeführt. Es konnten bis zu drei weitere Aufsättigungsdosen jeweils im Abstand von einem Tag verabreicht werden. Bei 8% der Patienten führte eine kumulierte Dosis von 2400 mg Clopidogrel nicht zu einem VASP-Index  $<50\%$ . Der primäre Endpunkt war die 30-Tage-Inzidenz von schwerwiegenden kardiovaskulären Ereignissen (MACE) zusammengesetzt aus kardiovaskulärem Tod, angiografisch bestätigter Stent-Thrombose oder erneut aufgetretenem akuten Koronarsyndrom.

Nach einem Monat war die Inzidenz des primären Endpunkts mit 8,9% in der Standardtherapie-Gruppe signifikant ( $p < 0,001$ ) höher als in der Gruppe von Patienten mit individualisierter Therapie, wo der Endpunkt nur bei 0,5% der Patienten auftrat (140).

Es fanden sich keine Unterschiede in der Häufigkeit von Blutungskomplikationen (2,8 % vs. 3,7%,  $p=0,8$ ).

Diese Untersuchungen konnten erstmals den klinischen Nutzen einer individualisierten Therapie mit Clopidogrel nachweisen. Allerdings ist die Umsetzung des Ansatzes mit Auftitration der Clopidogrel-Dosis über 4 konsekutive Tage im klinischen Alltag praktisch nicht umsetzbar.

Nachdem die hier vorgelegte Untersuchung gezeigt hat, dass eine individualisierte Dosisanpassung mit einem insgesamt besseren Ansprechen auf Clopidogrel im Langzeitverlauf über 4 Wochen assoziiert ist, stellen sich die entscheidenden Fragen, ob diese Dosissteigerung sicher ist und ob sich insbesondere damit auch klinische Ereignisse verhindern lassen. Die Erhöhung der täglichen Erhaltungsdosis hatte, soweit die limitierte Patientenzahl eine Beurteilung zulässt, kein vermehrtes Auftreten von Blutungskomplikationen zur Folge.

Der klinische Nutzen einer individualisierten Anpassung der Erhaltungstherapie von Clopidogrel ähnlich dem Ansatz der EXCELSIOR-ACT Studie wird derzeit in USA in der GRAVITAS-Studie bei 2800 Patienten überprüft (141). Patienten mit nachgewiesener unzureichender Clopidogrel Wirkung werden doppel-blind und randomisiert entweder mit der zugelassenen Standarddosis von Clopidogrel (75 mg/Tag) oder mit einer erhöhten Tagesdosis von 150 mg nach elektiver Koronarintervention behandelt. Als primärer kombinierter Endpunkt wird über 6 Monate nach Einschluss die Häufigkeit von kardiovaskulärem Tod, nicht-tödlichem Myokardinfarkt oder definitive/wahrscheinliche Stent-Thrombose verglichen.

### **Limitationen der Untersuchung**

Bei der Bewertung der EXCELSIOR-ACT-Studie müssen auch die Limitationen der Untersuchung beachtet werden. Es handelt sich um eine Untersuchung mit einer überschaubaren, im klinischen Kontext vergleichsweise niedrigen Patientenzahl, deren Endpunkt sich ausschließlich auf die Thrombozytenaggregation bezieht. Deshalb lassen sich Aussagen über die klinische Bedeutung bzw. die Reduktion von schweren kardiovaskulären Ereignissen nicht treffen. Obwohl es keinen Hinweis auf vermehrte Nebenwirkungen wie Blutungen gibt, kann auch die Frage zur Sicherheit dieser Dosiserhöhung nicht endgültig beantwortet werden. Dazu bedarf es weiterer Studien mit größeren Fallzahlen.

Zu berücksichtigen ist auch, dass es sich beim Vergleich zwischen EXCELSIOR und EXCELSIOR-ACT um zwei unterschiedliche Patientenkollektive handelt, welche nicht randomisiert eingeschlossen wurden. Jedoch unterscheiden sich die Patientenkollektive nur in wenigen Merkmalen (Tabelle 3). So wurden bei den Patienten der EXCELSIOR-ACT Studie signifikant mehr DES eingesetzt, was sich durch die zeitliche Differenz der Studien erklären lässt.

Außerdem sind Unterschiede in der Häufigkeit der Verordnung von organischen Nitraten, AT1-Blockern und Diuretika zu nennen. Allerdings konnte mittels multivariabler Analyse kein Einfluss der Unterschiede in den Patientencharakteristika auf die Thrombozytenfunktion festgestellt werden.

Obwohl einige der Patienten auch unter der Dosiserhöhung nach 14 Tagen weiter eine RPA >14% zeigten, wurde die Dosis nicht über 150 mg gesteigert. Es bleibt daher die Frage, ob bei diesen Patienten mit einer weiteren Dosissteigerung von Clopidogrel die angestrebte Reduktion der Thrombozytenreaktivität erreicht worden wäre.

In der Kleintiermedizin erlangen kardiovaskuläre Erkrankungen ständig wachsende Bedeutung (118). Hierbei handelt es sich vor allem um angeborene oder erworbene Herzerkrankungen, welche sich in Form von Kardiomyopathien oder Herzklappenfehlfunktionen (z.B. Mitralklappenstenose) manifestieren und schließlich klinisch als Herzinsuffizienz in Erscheinung treten (47). Kardiologische Maßnahmen mittels Katheter werden heute vor allem bei Hunden angewandt.

Als Indikationen hierfür kommen der Verschluss eines persistierenden Ductus arteriosus (48), die Ballondilatation von schweren Pulmonalstenosen (50), fibrösen, ringförmigen Subaortenstenosen (48) und Maßnahmen bei Tachyarrhythmien (51) in Frage. Die Funktion der Thrombozyten wird hierbei in geringem Maße berücksichtigt. Die Begleitmedikation bei den genannten Eingriffen sollte durch eine antithrombozytäre Zusatzbehandlung erweitert werden, insbesondere bei älteren Hunden, bei Diabetes mellitus Patienten oder bei an Artherosklerose leidenden Tieren. Bei diesen Patienten muss von einer erhöhten basalen Thrombozytenaggregationsneigung ausgegangen werden. Gleiche Überlegungen gelten für ähnliche Behandlungen bei der Katze, zumal feline Thrombozyten, im Vergleich zu anderen Spezies, verstärkt zur Aggregation neigen (142) und unter Serotoninstimulation eine gesteigerte Aggregationsneigung zeigen (143).

Insbesondere zur Prophylaxe von thrombotischen Verschlüssen bei bestehender hypertropher Kardiomyopathie bei der Katze könnte Clopidogrel eine neue Therapieoption darstellen. Experimentiell wurde es bereits bei Katzen eingesetzt (144).

Die einfache orale Applikation und die bisher selten aufgetretenen Nebenwirkungen bei der Anwendung am Menschen (145) könnten dieses Pharmakon zu einem praktikablen tiermedizinischen Therapeutikum werden lassen.

Die EXCELSIOR-ACT Studie zeigt, dass bei einem großen Teil der Patienten, bei welchen eine Koronarintervention durchgeführt wird und die eine konventionelle thrombozyteninhibierende Therapie erhalten, eine erhöhte, über den P2Y<sub>12</sub>-Rezeptor vermittelte, Thrombozytenreaktivität festzustellen ist. Die frühe postinterventionelle aggregometrische Messung ist hier eine verlässliche Methode, um diese Patienten zu identifizieren. Die Erhöhung der Clopidogrelerhaltungsdosis auf 150 mg/d nur bei Patienten, die unter der zugelassenen Standarddosierung von Clopidogrel eine ungenügende Wirkung zeigen, könnte einen auch unter pharmakoökonomischen Gesichtspunkten sinnvollen Ansatz darstellen, die Therapie mit diesem Medikament zu optimieren. Der Nachweis einer Verbesserung des klinischen Verlaufs nach Koronarintervention durch diese Maßnahmen wird in umfangreichen Studien derzeit untersucht.

## **6.1. Zusammenfassung**

Thrombozyten spielen in der Human- wie auch der Tiermedizin eine zentrale Rolle in der Pathophysiologie vieler Herz-Kreislaufkrankungen. Daraus erklärt sich der hohe klinische Stellenwert von thrombozyteninhibierenden Therapieansätzen in der Humanmedizin, wie sie z.B. zur Prophylaxe thrombotischer Verschlüsse nach Gefäßinterventionen verwendet werden. Die aktuellen Richtlinien der Fachgesellschaften empfehlen für die Dauertherapie nach elektiver perkutaner Koronarintervention mit Stentimplantation niedrig dosierte Azetylsalizylsäure plus 75 mg Clopidogrel pro Tag. Jedoch zeigten mehrere Studien, dass unter der Standarddosierung von 75 mg Clopidogrel eine erhebliche interindividuelle Variabilität in der Thrombozytenfunktionshemmung besteht. Dabei haben Patienten mit erhöhter Thrombozytenreaktivität unter der Behandlung mit Clopidogrel ein erhöhtes Risiko für schwerwiegende kardiovaskuläre Ereignisse in der Folgezeit. So konnte unter anderem in der EXCELSIOR-Studie gezeigt werden, dass Patienten mit einer inadäquaten Wirkung (definiert als >14% Aggregation nach Stimulation mit 5 µM ADP) nach Einnahme von 600 mg Clopidogrel ein 3-fach erhöhtes Risiko für Tod oder nicht-tödlichem Myokardinfarkt innerhalb eines Jahres nach einer elektiver koronarer Stentimplantation aufweisen.

Die Fragestellung dieser prospektiven Untersuchung war daher, ob eine Dosiserhöhung von Clopidogrel bei Patienten mit nachgewiesenem unzureichendem initialen Ansprechen auf dieses Medikament unter Standarddosierung die erhöhte Thrombozytenreaktivität stärker inhibieren kann.

Die plättchenhemmende Wirkung von Clopidogrel wurde deshalb mittels Lichttransmissionsaggregometrie am Tag 1 nach elektiver koronarer Stentimplantation und vorheriger Gabe einer Aufsättigungsdosis von 600 mg Clopidogrel gemessen. Von den eingeschlossenen 117 Patienten wiesen 39 Patienten eine residuelle Plättchenaggregation von >14% nach Stimulation mit 5µM ADP auf. Diese Patienten erhielten eine zusätzliche Dosis von 300 mg Clopidogrel und wurden im Weiteren für 4 Wochen mit einer täglichen Dosis von 150 mg Clopidogrel behandelt. Patienten mit einer adäquaten Thrombozytenreaktivität definiert als residuelle Aggregation von ≤14% wurden entsprechend der Zulassung von Clopidogrel mit einer Dosis von 75 mg pro Tag behandelt.

Die Thrombozytenreaktivität wurde am Tag 14 und am Tag 28 nach der Intervention überprüft. Die Daten von 57 Patienten ohne Dosisadjustierung wurden als Kontrolle verwendet.

Die Intensivierung der Behandlung mit Clopidogrel senkte die residuelle Plättchenaggregation signifikant im Vergleich zum Ausgangswert ab, wobei erhebliche interindividuelle Unterschiede bestehen blieben. Der Median der Thrombozytenreaktivität war am Tag 14 und am Tag 28 noch gering aber statistisch signifikant höher als die Werte der Patienten mit adäquater Wirkung von Clopidogrel bereits unter Standarddosierung. Diese Befunde wurden durch Untersuchungen mit höherer ADP-Konzentration (20  $\mu$ M) und die Analyse der Expression von thrombozytären Oberflächenproteinen bestätigt. Die Steigerung der Erhaltungsdosis von Clopidogrel führte zu keiner entsprechenden Zunahme der systemischen Exposition gegenüber dem Arzneistoff oder dem unwirksamen Metaboliten Carboxy-Clopidogrel, was im Wesentlichen auf der bekannten Variabilität der Pharmakokinetik von Clopidogrel beruhen dürfte. Die Steigerung der täglichen Dosis von Clopidogrel hatte keine Zunahme von Blutungskomplikationen zur Folge, wobei die Fallzahl der Untersuchung für eine definitive Beurteilung der Sicherheit und Verträglichkeit dieses Dosierungsschemas nicht ausreicht.

Zusammenfassend zeigte sich, dass durch eine selektive Dosisanpassung von Clopidogrel eine bessere Hemmung der Thrombozytenreaktivität bei Patienten, die initial unzureichend auf dieses Medikament angesprochen haben, erreicht werden kann. Die Befunde der vorliegenden Arbeit können die Grundlage für die Durchführung großer klinischer Studien zum therapeutischen Nutzen einer individualisierten Dosierung von Clopidogrel bei Patienten nach perkutaner koronarer Intervention bilden.

## **6.2. Summary**

Platelets are major players in pathophysiology of cardiovascular diseases in man and animals. Therefore, antiplatelet strategies are an important element in human medicine (e.g., for prevention of thrombotic events after vascular interventions). Current guidelines recommend dual antiplatelet therapy with clopidogrel 75 mg qd and acetylsalicylic acid 100mg qd in patients undergoing elective coronary stent implantation. However, several studies demonstrated a high interindividual variability in antiplatelet response to clopidogrel with a significant impact on clinical outcome. For instance, the EXCELSIOR study showed that patients with an insufficient response to clopidogrel (defined as >14% aggregation after stimulation with ADP 5  $\mu$ M) after loading with clopidogrel 600 mg had a 3-fold higher incidence of death and non-fatal myocardial infarction within one year after elective coronary stenting.

Therefore, the current prospective study aimed to investigate if high on-treatment platelet reactivity with a standard dosing of clopidogrel can be overcome by an increased dosing regimen.

Antiplatelet effects of clopidogrel were assessed by light transmission aggregometry (stimulation with ADP 5  $\mu$ mol/L) at day 1 after loading with clopidogrel 600 mg and subsequent elective coronary stenting. Out of the 117 patients enrolled, 39 were identified having a residual platelet reactivity >14%. These patients received an additional bolus of clopidogrel 300 mg and an intensified maintenance dosing regimen of clopidogrel 150 mg per day. Patients with residual platelet reactivity  $\leq$ 14% were treated according to the labelled standard dosing regimen of clopidogrel (75 mg qd).

Platelet reactivity was assessed 2 and 4 weeks after PCI. Data from 57 patients without any adjustment of clopidogrel dose served as control.

The intensified dosing regimen of clopidogrel decreased residual platelet reactivity significantly compared to baseline assessments despite a persisting substantial inter-individual variability. Median platelet reactivity in the group of patients with dose adaption was slightly but significantly higher compared to patients with adequate initial response and treatment with clopidogrel 75 mg qd throughout. These results were confirmed by additional tests such as aggregometry with higher concentrations of ADP (20  $\mu$ M) and analysis of surface protein expression of platelets.

After increasing the dose of clopidogrel, no dose-related increase in systemic exposure to parent clopidogrel or the inactive metabolite carboxy-clopidogrel could be determined which most likely can be attributed to the large variability in pharmacokinetics of clopidogrel. The higher dose of clopidogrel 150 mg qd was not associated with any evidence of an increased incidence of bleeding. However, the present study was not sufficiently powered to detect differences with regards to safety. In conclusion, selective dose adaptation of clopidogrel is a feasible way to achieve a better platelet inhibition in patients with insufficient response to clopidogrel. These findings open the field for large scale clinical studies investigating the impact of tailored and individualized antiplatelet therapy on clinical outcome in patients undergoing percutaneous coronary interventions.

## **7. Anhang**

### **7.1. Abkürzungsverzeichnis**

ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintri-phosphat
ASA	acetyl salicylic acid
ASS	Azetylsalizylsäure
aPTT	aktivierte partielle Thromboplastinzeit
ATP	Adenosintri-phosphat
BMS	bare metal stents
cAMP	cyklisches Adenosidmonophosphat
CCS	Canadian Cardiovascular Society
CK	Creatininkinase
COX 1	Cyklooxygenase 1
COX 2	Cyklooxygenase 2
CYP	Cytochrom P450 Enzymmechanismus
CYP3A5	Isoenzym des Cytochrom P450
CYP3A4	Isoenzym des Cytochrom P450
d	Tag (e)
DCM	Dilatative Kardiomyopathie
DES	drug eluting stents
EXCELSIOR	Extent of Clopidogrel-Induced Platelet Inhibition During Elective Stent Implantation on Clinical Event Rate
EXCELSIOR-ACT	EXCELSIOR-Adjusted Clopidogrel Therapy
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting (Durchflusszytometer)
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
FSC	Forward Scatter (Vorwärtsstreulicht)
GMP	Granulamembranprotein
GP	Glykoproteinrezeptor
GP IIb-IIIa	Glykoproteinrezeptor zur Fibrinogenbindung
h	Stunde (n)
HCM	hypertrophe Kardiomyopathie

KHK	koronare Herzerkrankung
LDL	Low Density Lipoprotein
LV	linksventrikulär
MACE	Major Adverse Cardiac Event
mAK	monoklonale Antikörper
mg	Milligramm
min	Minute (n)
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
µmol	mikromol
nm	Nanometer
PAC-1	First Procaspase Activating Compound
PAR-1	Protease Activated Receptor
PBS	Phosphat Buffered Saline
PCI	perkutane Koronarintervention
PF	Plättchenfaktor
PFA	Paraformaldehyd
p.o.	per os
PPP	Platelet Poor Plasma (Plättchenarmes Plasma)
PRP	Platelet Rich Plasma (Plättchenreiches Plasma)
PTCA	perkutane transluminale Koronarintervention
qd	quaque die (1x täglich)
RPA	residuelle (restliche, verbleibende) Plättchenaggregation
SCCS	Surface-connected canicular system
SSC	Side Scatter (Seitwärtsstreulicht)
SPSS	Statistiksoftware: Statistical Package for the Social Sciences
SPSS Inc.	Firmenbezeichnung des Statistik- und Analyse-Softwareherstellers
TG	Thromboglobulin
TGF	Transforming Growth Factor
TRAP	Thrombin Receptor Activating Peptide
TxA2	Thromboxan A2
u.a.	unter anderem (-n)
vWF	von-Willebrand-Faktor

W

Watt

z.B.

zum Beispiel

Z.n.

Zustand nach

---

Tabelle 1: Vergleich der physiologischen Werte von Thrombozyten verschiedener Spezies.....	8
Tabelle 2: In der Studie angewandte Antikörper und ihre Oberflächenantigene .....	59
Tabelle 3: Demographische, klinische und angiographische Charakteristika der Studienpatienten.....	69
Tabelle 4: Residuelle Thrombozytenaggregation der EXCELSIOR- ACT Patienten nach Stimulation mit 20µM ADP .....	71
Tabelle 5: Vergleich der Thrombozytenfunktionsparameter zwischen EXCELSIOR-ACT und EXCELSIOR.....	72
Tabelle 6: Übersicht über die Expression von Oberflächenproteinen bei den EXCELSIOR- ACT Patienten.....	77
Tabelle 7: Klinische Ereignisrate der behandelten Patienten .....	81

Abbildung 1: Morphologie des Thrombozyten .....	12
Abbildung 2: Verlauf der primären Hämostase .....	17
Abbildung 3: Die sekundäre Hämostase.....	19
Abbildung 4: Plasmakonzentration von ASS in Abhängigkeit von Zeit und der Dosis.....	26
Abbildung 5: Metabolismus von Clopidogrel.....	32
Abbildung 6: Wirkungseintritt von Ticlopidin vs. Clopidogrel .....	33
Abbildung 7: Dosisabhängigkeit der Inhibition ADP-induzierten Thrombozytenaggregation und Plasmakonzentration des aktiven Metaboliten von Clopidogrel nach Gabe einer Bolusdosis von 300mg, 600mg und 900mg Clopidogrel .....	34
Abbildung 8: Angriffspunkte der antithrombozytären Pharmaka .....	37
Abbildung 9: Variabilität der Thrombozytenaggregation nach Clopidogrelbolusgabe.....	38
Abbildung 10: EXCELSIOR-ACT- Studienmedikation.....	43
Abbildung 11: Aufbau eines Aggregometers.....	51
Abbildung 12: Messung derThrombozytenaggregation.....	52
Abbildung 13: Beispielkurven einer aggregometrischen Messung.....	55
Abbildung 14: Verlauf von Aggregationskurven .....	56
Abbildung 15: Verlauf von Aggregationskurven .....	57
Abbildung 16: SSC/ FSC.....	60
Abbildung 17: CD 41/ FSC.....	60
Abbildung 18: Darstellung der Ergebnisse von durchflusszytometrischen Untersuchungen in Form von „dot plots“.....	62
Abbildung 19: Darstellung der Ergebnisse von durchflusszytometrischen Untersuchungen in Form von „dot plots“.....	62
Abbildung 20: Übersicht über die Aufteilung der Studienpatienten.....	66
Abbildung 21: Verlauf der RPA (5µM ADP) im EXCELSIOR-ACT Kollektiv.....	70
Abbildung 22: Histogramm der RPA (5µM ADP) in EXCELSIOR-ACT und EXCELSIOR.....	73

Abbildung 23: Anteil der Patienten mit RPA >14% (5 $\mu$ M ADP).....	74
Abbildung 24: Einzeldarstellung der Thrombozytenaggregation an Tag 1 und Tag 14 der EXCELSIOR-ACT und der EXCELSIOR Patienten.....	76
Abbildung 25: Clopidogrel-Plasmakonzentrationen .....	79
Abbildung 26: Plasmakonzentrationen von Carboxy-Clopidogrel (SR26334).....	80

## **7.4. Literaturverzeichnis**

1. Engelhardt W, Breves G: Physiologie der Haustiere, Enke-Verlag 2000; 10: 198-199
2. Dietz O, Huskamp B: Handbuch Pferdepraxis, Enke-Verlag 1999; 1: 1-2
3. Cramer EM: Platelets and megakaryocytes: Anatomy and structural organisation. In: Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice. Colman RW, et al (Ed.), Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia 2001; 4<sup>th</sup> ed: 411-428
4. Bick RL: Physiology of Hemostasis. In: Disorders of Thrombosis and Hemostasis: Clinical and laboratory practice. Bick RL (Ed.), ASCP Press, Chicago 1992: 1-26
5. White JG: Anatomy and structural organization of the platelet. In: Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice. 2<sup>nd</sup> Ed. Edited by RW Colman J, Hirsh, VJ Marder, EW Salzman. JB Lippincott Co., Philadelphia 1994: 397- 413
6. Gawaz M: Kapitel 2 Thrombozyten und Hämostase. In: Das Blutplättchen; Thieme-Verlag 1999: 5-12
7. Gawaz M, Neumann FJ, Ott I, et al.: Changes in membrane glycoproteins of circulating platelets after coronary stent implantation. Heart 1996; 76: 166-172
8. Kehrel BE: Blutplättchen-Biochemie und Physiologie. Hämostaseologie 2003; 23: 149-158
9. Fox JEB: Platelet Cytoskeleton. In: Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice. Colman RW, et al. (Ed.), Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia 2001; 4<sup>th</sup>ed: 429-446
10. George JN, Colman RW: Overview of platelet structure and function. In: Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice. Colman RW, et al. (Ed), Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia 2001; 4<sup>th</sup> ed: 382-386
11. Fukami MH, Holmsen H, Kowaska MA et al.: Platelet secretion. In: Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice. Colman RW, et al. (Ed), Lippincott Williams& Wilkins, Philadelphia 2001 4<sup>th</sup> ed: 561-573
12. Colman RW: Overview of hemostasis. In: Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice. Colman RW, et al. (Ed). Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia 2001; 4<sup>th</sup>ed: 3-16
13. Kehrel BE, Jurk K: Platelets at the interface between hemostasis and immunity. Transfus Med Hemother 2004; 31: 379-386

14. Gachet C: ADP receptors of platelets and their inhibition. *Thromb. Haemost* 2001; 86: 222-232
15. Budde U: Diagnose von Funktionsstörungen der Thrombozyten mit Hilfe der Aggregometrie. *J Lab Med* 2002; 26: 564-571
16. Scharf RE: Angeborene und erworbene Thrombozytenfunktionsstörungen. *Hämostaseologie* 2003; 23: 170-180
17. Scharf RE: Angeborene und erworbene Thrombozytopenien. *Hämostasiologie* 2003; 23:159-169
18. Statistisches Bundesamt: Todesursachen 2008 in Deutschland. Pressemitteilung vom 15.09.2009
19. Fuster V, Badimon L, Badimon JJ, et al.: The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes. *N Engl J Med* 1992; 326: 242-250
20. Fuster V, Badimon L, Badimon JJ, et al.: The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes. *N Engl J Med* 1992; 326: 310-318
21. Becker RC: Antiplatelet therapy in coronary heart disease. *Arch Pathol Lab Med* 1993; 117: 89-96
22. Willerson JT, Golino P, Eidt J, et al.: Specific platelet mediators and unstable coronary artery lesions:experimental evidence and potential clinical implications. *Circulation* 1989; 80: 198-205
23. Badimon JJ, Fuster V, Chesebro JH, et al.: Coronary atherosclerosis, a multifactorial disease. *Circulation* 1993; 87: II-3-II-16
24. Ross R: The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990's. *Nature* 1993; 362: 801-809
25. White JG: Platelets and Atherosclerosis. *Eur J Clin Invest* 1994; Suppl.1: 25-29
26. Eeckout E, Kappenberger L, Goy JL, et al.: Stents for intracoronary placement: Current status and future directions. *J Am Coll Cardiol* 1996; 27: 757-765
27. Kastrati A, Neumann FJ, Mehilli J, et al.: Intracoronary stenting and antithrombotic regimen in rapid early action of coronary treatment (ISAR-REACT2). *JAMA* 2006; 295: 1531-38
28. Kastrati A, Mehilli J, Dirschinger J, et al.: Restenosis after coronary stent placement of various stent types. *Am J Cardiol* 2001; 87: 34-39
29. Kastrati A, Schömig A, Elezi S, et al.: Interlesion dependence of the risk for restenosis in patients with coronary stent placement in multiple lesions. *Circulation* 1998, 97: 2396-2401

30. Schömig A, Neumann FJ, Kastrati A, et al.: A randomized comparison of antiplatelet and anticoagulant therapy after the placement of coronary artery stents. *N Engl J Med* 1996; 334: 1084-1089
31. Urban P, Macaya C, Rupprecht HJ, et al.: Randomized evaluation of anticoagulation vs. antiplatelet therapy after coronary stent implantation in high risk patients: The multicenter aspirin and ticlopidine trial after intracoronary stenting (MATTIS). *Circulation* 1998; 98: 2126-2136
32. Bertrand ME, Legrand V, Boland J, et al.: Randomized multicenter comparison of conventional anticoagulation versus antiplatelet therapy in unplanned and elective coronary stenting. *Circulation* 1998; 98: 1597-1603
33. Leon MB, Baim DS, Popma JJ, et al.: A clinical trial comparing three antithrombotic-drug regimens after coronary stenting. *N Engl J Med* 1998; 339: 1665-1671
34. McGrath PD, Wennberg DE, Dickems JD, et al.: Relation between operator and hospital volume and outcomes following percutaneous coronary interventions in the era of the coronary stent. *JAMA* 2000; 284: 3139-3144
35. Kastrati A, Neumann FJ, Schömig A, et al.: Operator volume and outcome of patients undergoing coronary stent placement. *J Am Coll Cardiol* 1998; 32: 970-976
36. Neumann FJ, Ott I, Gawaz M, et al.: Neutrophil and platelet activation at balloon-injured coronary artery plaque in patients undergoing angioplasty. *J Am Coll Cardiol* 1996; 27: 819-824
37. Kimmel SE, Localio AR, Krone RJ, et al.: The effect of contemporary use of coronary stents on in-hospital mortality. Registry committee of the Society for Cardiac Angiography and interventions. *J Am Coll Cardiol*. 2001; 37: 499-504
38. Hannan EL, Racz MJ, Arani DT, et al.: A comparison of short- and long-term outcomes for balloon angioplasty and coronary stent placement. *J Am Coll Cardiol*. 2000; 36: 395-403
39. Williams DO, Holubkov R, Yeh W, et al.: Percutaneous coronary intervention in the current era compared with 1985-1986: The National Heart, Lung and Blood Institute Registries. *Circulation* 2000; 102: 2945-2951
40. Fischmann DL, Leon MB, Baim DS, et al.: A randomized comparison of coronary-stent placement and balloon angioplasty in the treatment of coronary artery disease. Stent Restenosis Study Investigators. *N Engl J Med*. 1994; 331: 496-501

41. Dirschinger J, Kastrati A, Neumann FJ, et al.: Influence of balloon pressure during stent placement in native coronary arteries on early and late angiographic and clinical outcome: A randomized evaluation of high-pressure inflation. *Circulation*. 1999; 100: 918-923
42. Neumann FJ, Gawaz M, Ott I, et al.: Prospective evaluation of hemostatic predictors of subacute stent thrombosis after coronary Palmaz-Schatz stenting. *J Am Coll Cardiol* 1996; 27: 15-27
43. Gawaz M, Neumann FJ, Ott I, et al.: Role of activation-dependent platelet membrane glycoproteins in development of subacute occlusive coronary stent thrombosis. *Coron Artery Dis* 1997; 8: 121-128
44. Lemos PA, Serruys PW, van Domburg RT, et al.: The impact of drug-eluting stents on the clinical practice of surgical and percutaneous treatment of coronary artery disease. *Eur Heart J* 2005; 26: 675-681
45. Iakovou I, Schmidt T, Bonizzi E, et al.: Incidence, predictors and outcome of thrombosis after successful implantation of drug-eluting stents. *JAMA* 2005; 293: 2126-2130
46. De Servi S, Repetto S, Klugmann S, et al.: Stent thrombosis: Incidence and related factors in the R.I.S.E. Registry (Registro Impianto Stent Endocoronarico). *Catheter Cardiovasc Interv* 1999; 46: 13-18
47. Kittleson MD: The approach to the patient with cardiac disease. Prevalence. In: Kittleson MD, Kienle RD: *small animal cardiovascular medicine*; (Ed). mosby; Chapter 11: 196
48. Schneider M: Aktueller Stand der interventionellen Therapie angeborener Herzerkrankungen. *Praktischer Tierarzt* 2002; 83:12, 1042-1046
49. Hogan DF, Green HW, Gordon S et al.: Transarterial coil embolization of patent ductus arteriosus in small dogs with 0.025-inch vascular occlusion coils: 10 cases. *J Vet Intern Med* 2004; 18(3): 325-329
50. Glaus TM, Unterer S, Tomsa K, et al.: Possibilities of minimal invasive cardiac catheter interventions in the dog. *Schweiz Arch Tierheilkd* 2003; 145(9): 407-414
51. Wright KN: Interventional catheterization for tachyarrhythmias. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2004; 34(5): 1171-1185
52. website: Provet healthcare information
53. Johnson MS, Martin M: Results of balloon valvuloplasty in 40 dogs with pulmonic Stenosis. *J Small Anim Pract*. 2004; 45(3): 148-153

54. Kienle RD: cardiac catheterization; In: Kittleson MD, Kienle RD: small animal cardiovascular medicine; (Ed). Mosby, 1998; 7: 118-132
55. Craven LL. Prevention of coronary and cerebral thrombosis. *Miss Valley Med J* 1956; 78: 213-215
56. Schrör K, ed. *Acetylsalicylic Acid: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co, Weinheim, 2009.*
57. Schwartz L, Bourassa MG, Lesperance J, et al.: Aspirin and dipyridamole in the prevention of restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty. *N Engl J Med* 1988; 318:1714-1719
58. Lewis HD, Jr., Davis JW, Archibald DG, et al.: Protective effects of aspirin against acute myocardial infarction and death in men with unstable angina. Results of a Veterans Administration Cooperative Study. *N Engl J Med* 1983; 309: 396-403
59. ISIS-2 I. Randomised trial of intravenous streptokinase, oral aspirin, both, or neither among 17,187 cases of suspected acute myocardial infarction. *Lancet* 1988; 2: 349-360
60. Cairns JA, Gent M, Singer J, et al.: Aspirin, sulfinpyrazone, or both in unstable angina. Results of a Canadian multicenter trial. *N Engl J Med* 1985; 313: 1369-1375
61. Vane JR: Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nat New Biol* 1971; 231: 232-235
62. Patrono C: Aspirin as an antiplatelet drug. *N Engl J Med* 1994; 330:1287-1294
63. Aktories K, Förstermann U, Hofmann F, et al.: *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie: Urban & Fischer, München, 2009; 70*
64. Gawaz M: Kapitel 6 Antithrombozytäre Substanzen. In: *Das Blutplättchen; Thieme-Verlag 1999: 54-79*
65. Kittelson MD, Kienle RD: *Small animal cardiovascular medicine. (Ed). Mosby 1998. Chapter: 31; 545-547*
66. Löscher W, Ungemach F: *Pharmakologie der Haussäugetiere 2006:105-106*
67. Hass WK, Easton DJ, Adams HP, et al.: A randomized trial comparing ticlopidine hydrochloride with aspirin for the prevention of stroke in high-risk patients. *N Engl J Med* 1989; 321: 501-507
68. Quinn MJ, Fitzgerald DJ: Ticlopidine and clopidogrel. *Circulation* 1999;100: 1667-1672

69. Fachinformation Tiklyd. Sanofi-Aventis Deutschland GmbH, 65926 Frankfurt am Main, 2008.
70. Bertrand ME, Rupprecht HJ, Urban P, et al.: Double blind study of the safety of clopidogrel with and without a loading dose in combination with aspirin compared with ticlopidine in combination with aspirin after coronary stenting. CLASSICS-study. *Circulation* 2000; 102: 624-629
71. CAPRIE Steering Committee. A randomised, blinded, trial of clopidogrel versus aspirin in patients at risk of ischaemic events (CAPRIE). *Lancet* 1996; 348: 1329-1339
72. Yusuf S, Zhao F, Mehta SR, et al.: Effects of clopidogrel in addition to aspirin in patients with acute coronary syndromes without ST-segment elevation, *N Engl J Med* 2001; 345; 494-502
73. Mehta SR, Yusuf S, Peters RJ, et al.: Effects of pretreatment with clopidogrel and aspirin followed by long-term therapy in patients undergoing percutaneous coronary intervention: the PCI-CURE study. *Lancet* 2001; 358: 527-533
74. Silber S, Albertsson P, Aviles FF, et al. Guidelines for percutaneous coronary interventions. The Task Force for Percutaneous Coronary Interventions of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J* 2005; 26: 804-847
75. Fachinformation Plavix/Iscover: Sanofi-Aventis Deutschland GmbH, 65926 Frankfurt am Main, 2009.
76. Savi P, Pereillo JM, Uzabiaga MF, et al.: Identification and biological activity of the active metabolite of clopidogrel. *Thromb Haemost* 2000; 84: 891-896
77. Taubert D, Kastrati A, Harlfinger S, et al.: Pharmacokinetics of clopidogrel after administration of a high loading dose. *Thromb Haemost* 2004; 92: 311-316
78. Kazui M, Nishiya Y, Ishizuka T, et al. Identification of the human cytochrome P450 enzymes involved in the two oxidative steps in the bioactivation of clopidogrel to its pharmacologically active metabolite. *Drug Metab Dispos*; 38: 92-99
79. Clarke TA, Waskell LA. The metabolism of clopidogrel is catalyzed by human cytochrome P450 3A and is inhibited by atorvastatin. *Drug Metab Dispos* 2003; 31: 53-59

80. Farid NA, Payne CD, Small DS, et al. Cytochrome P450 3A inhibition by ketoconazole affects prasugrel and clopidogrel pharmacokinetics and pharmacodynamics differently. *Clin Pharmacol Ther* 2007; 81: 735-41
81. Müller I, Seyfarth M, Rüdiger S, et al.: Effect of a high loading dose of clopidogrel on platelet function in patients undergoing coronary stent placement. *Heart* 2001; 85: 92-93
82. Hochholzer W, Trenk D, Frundi D, et al: 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: 2560-2564
83. Montalescot G, Sideris G, Meuleman C, et al. A Randomized Comparison of High Clopidogrel Loading Doses in Patients With Non-ST-Segment Elevation Acute Coronary Syndromes: The ALBION (Assessment of the Best Loading Dose of Clopidogrel to Blunt Platelet Activation, Inflammation and Ongoing Necrosis) Trial. *J Am Coll Cardiol* 2006; 48: 931-938
84. von Beckerath N, Taubert D, Pogatsa-Murray G, et al.: 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 Oral Doses for Immediate Clopidogrel Effect) Trial. *Circulation* 2005; 112: 2946-2950
85. Wiviott S D, Braunwald E, McCabe C H, et al.: Prasugrel versus clopidogrel in patients with acute coronary syndrome. *N Engl J Med* 2007; 357: 2001-2015
86. Collier BS: Blockade of platelet GPIIa-IIIb-receptors as an antithrombotic strategy. *Circulation* 1995; 92: 2373-2380
87. Kidane AG, Salacinski H, Tiwari A et al.: Anticoagulant and Antiplatelet Agents: Their Clinical and Device Application(s) Together with Usages to Engineer Surfaces. *Biomacromolecules* 2004; 5: 798-813
88. Hashemzadeh M, Furukawa M, Goldsberry S, et al.: Chemical structures and mode of action of intravenous glycoprotein IIb/IIIa receptor blockers: A review. *Exp Clin Cardiol* 2008; 13: 192–197
89. Renz, Hartmut: GP-IIb/IIIa-Rezeptor-Antagonisten: Behandlung akuter Koronarsyndrome. *Dtsch Ärztebl* 1999; 96: A-3058 / B-2587 / C-2296

90. Aktas B, Utz A, Hoenig-Liedl P, Walter U, Geiger J. Dipyridamole enhances NO/cGMP-mediated vasodilator-stimulated phosphoprotein phosphorylation and signaling in human platelets: in vitro and in vivo/ex vivo studies. *Stroke* 2003; 34: 764 -769
91. [http://www.arzneitelegamm.de/html/2006\\_06/0606055\\_01.html](http://www.arzneitelegamm.de/html/2006_06/0606055_01.html)
92. Wallentin L, Becker RC, Budaj A, et al.: Ticagrelor versus clopidogrel in patients with acute coronary syndromes. *N Engl J Med* 2009; 361:1045-1057
93. Morrow DA, Scirica BM, Fox KA, et al.: Evaluation of a novel antiplatelet agent for secondary prevention in patients with a history of atherosclerotic disease: design and rationale for the Thrombin-Receptor Antagonist in Secondary Prevention of Atherothrombotic Ischemic Events (TRA 2 degrees P)-TIMI 50 trial. *Am Heart J* 2009; 158: 335-341
94. Bates ER, Lau WC, Bleske BE, et al.: Loading pre-treatment and interindividual variability issues with clopidogrel dosing. *Circulation* 2005; 111: 2557-2559
95. Järemo P, Lindahl TL, Fransson SG, et al.: Individual variations of platelet inhibition after loading doses of clopidogrel. *J Intern Med* 2002; 252: 233-238
96. Müller I, Besta F, Schulz C, et al.: Prevalence of clopidogrel non-responders among patients with stable angina pectoris scheduled for elective coronary stent placement. *Thromb Haemost* 2003; 89: 783-787
97. Wiviott SD, Antman EM: Clopidogrel Resistance. *Circulation* 2004; 109: 3064-3067
98. Nguyen TA, Diodati JG, Pharand C, et al.: Resistance to clopidogrel: a review of the evidence. *J Am Coll Cardiol* 2005; 45: 1157-1164
99. Schrör K, Weber AA, Hohlfeld T, et al.: Clopidogrel ‚resistance‘. *Thromb Haemost* 2004; 92: 229-231
100. Schafer AJ: Genetic and aquired determinants of individual variability of response to antiplatelet drugs. *Circulation* 2003; 108: 910-911
101. Angiolillo DJ, Fernandez-Ortiz A, Bernardo E, et al.: High clopidogrel loading dose during coronary stenting: Effects on drug response and interindividual variability. *Eur Heart J* 2004; 25: 1903-1910
102. Grossmann R, Sokolova O, Schnurr A, et al.: Variable extent of clopidogrel responsiveness in patients after coronary stenting. *Thromb Haemost* 2004; 92:1201-1206
103. Jefferson BK, Foster JH, Mc Carthy JJ, et al.: Aspirin resistance and a single gene. *Am J Cardiol* 2005; 95: 805-808

104. Hochholzer W, Trenk D, Bestehorn H-P, et al.: Impact of the degree of peri-interventional platelet inhibition after loading with clopidogrel on early clinical outcome of elective coronary stent placement. *J Am Coll Cardiol* 2006; 48: 1742-1750
105. Trenk D, Hochholzer W, Fromm MF, et al: Cytochrome P450 2C19 681G>A polymorphism and high on-clopidogrel platelet reactivity associated with 1-year clinical outcome of elective percutaneous coronary intervention with drug eluting or bare-metal stents. *J Am Coll Cardiol*. 2008; 51: 1925-1934
106. Gurbel PA, Bliden KP, Guyer K, et al.: Platelet reactivity in patients and recurrent events post-stenting. Results of the PREPARE poststenting study. *J Am Coll Cardiol* 2005; 46:1820-1826
107. Lau WC, Waskell LA, Watkins PB, et al: Atorvastatin reduces the ability of clopidogrel to inhibit platelet aggregation: a new drug-drug interaction. *Circulation* 2003; 107: 32-37
108. Thummel KE: Does the CYP3A5 polymorphism affect in vivo drug elimination. *Pharmacogenetics* 2003; 13: 585-587
109. Trenk D, Hochholzer W, Frundi D, et al.: Impact of cytochrome P450 3A4-metabolized statins on the antiplatelet effect of a 600-mg loading dose clopidogrel and on clinical outcome in patients undergoing elective coronary stent placement. *Thromb. Haemost.* 2008; 99: 174-181
110. Mitsios JV, Papathanasiou AI, Rodis FJ, et al.: Atorvastatin does not affect the antiplatelet potency of clopidogrel when it is administered concomitantly for 5 weeks in patients with acute coronary syndromes. *Circulation* 2004; 109: 1335-1338
111. O'Donoghue ML, Braunwald E, Antman EM, et al.: Pharmacodynamic effect and clinical efficacy of clopidogrel and prasugrel with or without a proton-pump inhibitor: an analysis of two randomised trials. *Lancet*. 2009; 374: 989-997
112. Mega JL, Close SL, Wiviott SD, et al.: Cytochrome p-450 polymorphisms and response to clopidogrel. *N Engl J Med* 2009; 22; 360: 411-413
113. Nelson RW, Couto CG. Myokarderkrankungen der Katze. In: *Innere Medizin der Kleintiere*. 2006; 135
114. Pion PD, Kittelson MD: Therapy for feline aortic thromboembolism. In Kirk R W: *Kirk's current veterinary therapy X: small animal practice*, W B Saunders, 1989: 295–302

115. Harpster NK, Baty CJ: Warfarin therapy of the cat at risk of thromboembolism. Kirk's Veterinary Therapy XII, W B Saunders, 1995: 868- 872
116. Laste NJ, Harpster NK: A retrospective study of 100 Cases of Feline Distal Aortic Thromboembolism 1977-1993. J Am Anim Hosp Assoc 1995: 492-500
117. Center for disease control and prevention: Prevalence of heart disease United states 2005. JAMA 2007; 297: 1308-1309
118. Sammarco CD: Breed specific variations of cardiomyopathy in dogs 2008. veterinary newsmagazine DVM; Feb.1
119. Leopold JA, Antman EM: Dual antiplatelet therapy for coronary stenting. Circulation 2005; 111: 1097-1099
120. Steinhubl SR, Berger PB, Mann JT, et al.: Early and sustained dual oral antiplatelet therapy following percutaneous coronary intervention. JAMA 2002; 288: 2411-2420
121. Matetzky S, Shenkman B, Guetta V, et al.: Clopidogrel resistance is associated with increased risk of recurrent atherothrombotic events in patients with acute myocardial infarction. Circulation 2004; 109: 3171-3175
122. Buonamici P, Marcucci R, Migliorini A, et al.: Impact of platelet reactivity after clopidogrel administration on drug-eluting stent thrombosis. J Am Coll Cardiol 2007; 49: 2312-2317
123. Geisler T, Langer H, Wydymus M, et al.: Low response to clopidogrel is associated with cardiovascular outcome after coronary stent implantation. Eur Heart J 2006; 27: 2420-2425
124. Price MJ, Endemann S, Gollapudi RR, et al.: Prognostic significance of post-clopidogrel platelet reactivity assessed by a point-of-care assay on thrombotic events after drug-eluting stent implantation. Eur Heart J 2008; 29: 992-1000
125. Born GVR: Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. Nature 1962; 194, 927
126. Michelson A: Flow cytometry: a clinical test of platelet function. Blood 1996; 87: 4925-4936
127. GLP, Principles of Good Laboratory Practices specified by national (German Chemicals Law, Annex 1, 8 May 2001) and international (OECD, Paris, 1998, EC Directive 2004/10/EC, 11 February 2004) legislation.

128. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CVM) Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation. Internet at <http://www.fda.gov/cder/guidance/index.htm> (2001).
129. ICH Harmonised Tripartite Guideline: Text on Validation of Analytical Procedures Q2A, 1997.
130. ICH Harmonised Tripartite Guideline: Validation of Analytical Procedures: Methodology Q2B, 1997.
131. Massberg S, Brand K, Gruner S, et al.: Die Rolle der Thrombozyten- und Leukozyten- Endothel-Interaktion in der Atherogenese. *Semin Vasc Med* 2003; 113-122
132. Steinhubl SR, Talley D, Braden GA, et al.: Point-of-care measured platelet inhibition correlated with a reduced risk on an adverse cardiac event after percutaneous coronary intervention. *Circulation* 2001; 103: 2572-2578
133. Neumann FJ, Schömig A: Stents: Anticoagulation and technique. In: Topol EJ: *Textbook of interventional cardiology*. 2003 (Ed). Saunders; Chapter: 27
134. Sibbing D, Braun S, Morath T, et al.: Platelet Reactivity After Clopidogrel Treatment Assessed With Point-of-Care Analysis and Early Drug-Eluting Stent Thrombosis. *J Am Coll Cardiol* 2009; 53: 849-856
135. Angiolillo DJ, Shoemaker SB, Desai B, et al.: Randomized comparison of a high clopidogrel maintenance dose in patients with diabetes mellitus and coronary artery disease: results of the Optimizing Antiplatelet Therapy in Diabetes Mellitus (OPTIMUS) study. *Circulation* 2007; 115: 708-716
136. Angiolillo DJ, Fernandez-Ortiz A, Bernardo E, et al.: Platelet function profiles in patients with type 2 diabetes and coronary artery disease on combined aspirin and clopidogrel treatment. *Diabetes* 2005; 54: 2430-2435
137. Angiolillo DJ, Bernardo E, Ramirez C, et al.: Insulin therapy is associated with platelet dysfunction in patients with type 2 diabetes mellitus on dual oral antiplatelet treatment. *J Am Coll Cardiol* 2006; 48: 298-304
138. von Beckerath N, Kastrati A, Wiecek A, et al.: A double-blind, randomized study on platelet aggregation in patients treated with a daily dose of 150 or 75 mg of clopidogrel for 30 days. *Eur Heart J* 2007; 28: 1814-1819

139. Bonello L, Camoin-Jau L, Arques S, et al.: Adjusted Clopidogrel Loading Doses According to Vasodilator-Stimulated Phosphoprotein Phosphorylation Index Decrease Rate of Major Adverse Cardiovascular Events in Patients With Clopidogrel Resistance: A Multicenter Randomized Prospective Study. *J Am Coll Cardiol* 2008; 51: 1404-1411
140. Bonello L, Camoin-Jau L, Armero S, et al.: Tailored Clopidogrel Loading Dose According to Platelet Reactivity Monitoring to Prevent Acute and Subacute Stent Thrombosis. *Am J Coll Cardiol* 2009; 103: 5-10
141. Price MJ, Berger PB, Angiolillo DJ, et al.: Evaluation of individualized clopidogrel therapy after drug-eluting stent implantation in patients with high residual platelet reactivity: Design and rationale of the GRAVITAS trial. *Am Heart J* 2009; 157: 818-824
142. Weiser MG, Kociba GJ: Platelet concentration and platelet volume distribution in healthy cats. *Am J Vet Res* 1984; 45: 518
143. Tschopp TB: Aggregation of cat platelets in vitro. *Thromb Diath Haemorrh* 1970; 23: 601
144. Hogan DF, Andrews DA, Green HW, et al.: Antiplatelet effects and pharmacodynamics of clopidogrel in cats. *J Am Vet Med Assoc* 2004; 225: 1406-1411
145. Müller C, Büttner HJ, Peterson J, et al.: A randomized comparison of clopidogrel and aspirin vs. ticlopidine and aspirin after the placement of coronary-artery stents. *Circulation* 2000; 101: 590-593

## **8. Erklärung**

Hiermit versichere ich an Eides Statt, dass ich die Dissertation mit dem Titel „Die hemmende Wirkung von Clopidogrel auf die Aggregation humaner Thrombozyten“ selbstständig angefertigt habe.

Außer den angegebenen habe ich mich keiner weiteren Hilfsmittel bedient, und jene Stellen, die aus dem Schriftum ganz oder annähernd übernommen wurden, sind als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle aufgelistet.

Die vorliegende Dissertation oder Teile davon wurden in gleicher oder ähnlicher Form bei keiner anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht.

Obereggenen, den 07. 04. 2010

Barbara Müller

## **9. Danksagung**

Mein Dank gilt an erster Stelle Herrn Prof. Dr. Schulz für das Ermöglichen des Vorlegens der Dissertation an der Ludwigs-Maximilians-Universität und für die jederzeit gewährte Unterstützung bei der Durchführung und Abfassung der Arbeit.

Herzlichen Dank an Herrn Prof. Dr. Neumann, Herrn Dr. Trenk und Herrn Dr. Hochholzer für die Bereitstellung des Themas, sowie die Betreuung der Arbeit im Herz-Zentrum Bad Krozingen und die intensive Betreuung bei der Erstellung der Arbeit mit vielen hilfreichen Korrekturmaßnahmen.

Der gesamten Abteilung für Klinische Pharmakologie sowie allen Schwestern, Pflegern und Ärzten der Station 1 des Herzzentrums möchte ich vielmals für die tatkräftige, geduldige Einarbeitung und Mithilfe für das Gelingen der Studie, von der Aufklärung der Patienten bis zum Probenversand, danken.

Einmal mehr möchte ich mich bei meinen lieben Eltern für die beständige Unterstützung bei der Ausführung der Dissertation bedanken.