



Technische Universität München, Deutsches Herzzentrum München

Einfluss von genetischen Varianzen in der Clopidogrel-Aktivierung auf klinische Ereignisse nach interventioneller Therapie des akuten Myokardinfarktes

Tobias Jürgen Martin Roosen-Runge

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. E. J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. Priv.-Doz. Dr. K. A. Tiroch
2. Univ.-Prof. Dr. K.-L. Laugwitz

Die Dissertation wurde am 11.05.2015 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 16.12.2015 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

Tabellenverzeichnis.....	3
Abbildungsverzeichnis	4
Abkürzungen	5
1. Einleitung	6
1.1. Stellenwert des Myokardinfarktes.....	6
1.2. Restenose.....	6
1.3. Stentthrombose.....	9
1.4. Clopidogrel.....	10
2. Problemstellung.....	13
3. Material und Methodik.....	14
3.1. Studienaufbau.....	14
3.2. DNA-Isolierung.....	16
3.3. DNA-Amplifikation und Genotypisierung.....	17
3.4. Materialien und Geräte.....	19
3.5. Variablen und Definitionen.....	19
3.5. Statistische Analyse.....	21
4. Ergebnisse	25
4.1. Durchführung der Experimente.....	25
4.2. Verteilungen der Genotypen	25
4.3. Basismerkmale der Patienten	25
4.4. Abhängige Variablen.....	26
5. Diskussion	40
5.1. Zusammenfassung und Deutung der Ergebnisse	40
5.2. Einordnung in die bestehende Datenlage	41
5.2.1. CYP2C19*2	41
5.2.2. CYP2C19*17	43
5.2.3. ABCB1-3435C/T	44
5.3. Verteidigung.....	45
5.3.1. Ist das Ergebnis zufällig falsch positiv?.....	45
5.3.2. Wird das Ergebnis durch einen statistischen Störfaktor beeinflusst?.....	45
5.3.3. Limitationen	47

5.4. Klinische Konsequenzen	48
6. Zusammenfassung	50
Literaturverzeichnis	52

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1. Risikofaktoren der Restenose	8
Tabelle 2. Ein- und Ausschlusskriterien der Stichprobe	15
Tabelle 3. Auflistung der verwendeten Materialien und Geräte	20
Tabelle 4. Variablen	21
Tabelle 5. Verteilung der kardiovaskulären Merkmale auf die ABCB1-Genotypen	28
Tabelle 6. Verteilung der kardiovaskulären Merkmale auf die CYP2C19*2-Genotypen	29
Tabelle 7. Verteilung der kardiovaskulären Merkmale auf die CYP2C19*17-Genotypen	30
Tabelle 8. Verteilung der klinischen Merkmale auf die ABCB1-Genotypen	31
Tabelle 9. Verteilung der klinischen Merkmale auf die CYP2C19*2-Genotypen.....	32
Tabelle 10. Verteilung der klinischen Merkmale auf die CYP2C19*17-Genotypen	33
Tabelle 11. Verteilung der abhängigen Variablen auf die ABCB1-Genpotypen.....	34
Tabelle 12. Verteilung der abhängigen Variablen auf die CYP2C19*2-Genpotypen	35
Tabelle 13. Verteilung der abhängigen Variablen auf die CYP2C19*17-Genotypen	36

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Organisatorischer Ablauf der Studie im Überblick.....	23
Abbildung 2. Prinzip der quantitativen real-time PCR	24
Abbildung 3. Verteilung der Variablen auf die ABCB1-Genotypen.....	37
Abbildung 4. Verteilung der Variablen auf die CYP2C19*2-Genotypen.....	38
Abbildung 5. Verteilung der Variablen auf die CYP2C19*17-Genotypen.....	39

Abkürzungen

A	Adenin
ACC	American College of Cardiology
ACE	angiotensin-converting enzyme
ADP	Adenosindiphosphat
AHA	American Heart Association
AT-II	Angiotensin-II-Rezeptor
C	Cytosin
CK	Creatinkinase
CK-MB	Myokardtypische Creatinkinase
CRP	C-reaktives Protein
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EKG	Elektrokardiogramm
G	Guanin
IVUS	intravaskulärer Ultraschall
KHK	koronare Herzkrankheit
LCA	linke Koronararterie
MACE	major adverse cardiovascular events
NOS3	nitric oxide synthase 3
PAI-1	Plasminogenaktivatorinhibitor 1
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
RCA	rechte Koronararterie
RCX	Ramus circumflexus
RIVA	Ramus interventricularis anterior
T	Thymin
Taq	Thermus aquaticus
TIMI	thrombolysis in myocardial infarction
TLR	target lesion revascularization
TNF	tumor necrosis factor

1. Einleitung

1.1. Stellenwert des Myokardinfarktes

Die koronare Herzkrankheit ist mit über 7 Millionen Todesfällen pro Jahr die häufigste Todesursache weltweit. Obwohl die Inzidenz der koronaren Herzkrankheit in den letzten Jahrzehnten weltweit angestiegen ist, sank ihre Mortalität in Westeuropa von 1990 bis 2010 um 46 Prozent, was auf eine Verbesserung der Präventionsprogramme und der Therapien zurückzuführen ist.¹

Der akute Myokardinfarkt hat als Bestandteil der koronaren Herzkrankheit eine Inzidenz von 195 pro 100.000 pro Jahr bei Männern und 115 pro 100.000 pro Jahr bei Frauen.² Die Therapie des akuten Myokardinfarktes hat sich in den letzten Jahrzehnten insbesondere dahingehend verbessert, dass mithilfe der Koronarintervention eine schnelle Wiedereröffnung des verschlossenen Koronargefäßes möglich ist. Ergänzend dazu versucht man, mit einer thrombozytenhemmenden Begleittherapie die Thrombuslast im betroffenen Gefäß zu vermindern und die implantierte Gefäßstütze, den Stent, vor einem erneuten Verschluss durch die aktivierten Thrombozyten zu schützen.³

Trotz dieser optimierten Therapie haben bestimmte Patienten nach einem Myokardinfarkt weiterhin thrombotische Ereignisse, was auch an einer verminderten Wirkung der thrombozytenhemmenden Medikamente bei diesen Patienten liegen kann. Deshalb könnte eine weitere Verbesserung der Herzinfarktbehandlung über eine Individualisierung der medikamentösen Therapie erreicht werden. Wenn bestimmte genetische Risikofaktoren für erneute thrombotische Ereignisse nach einem akuten Myokardinfarkt zuerst auf Populationsebene und dann für den jeweiligen Patienten identifiziert wären, könnte die Therapie bei den betroffenen Patienten individuell angepasst werden. Damit könnte das Risiko für erneute Ereignisse gesenkt werden.

1.2. Restenose

Die Koronarintervention hat aufgrund ihrer geringen Invasivität einen großen Siegeszug erfahren. Neben dem inzwischen seltenen akuten Verschluss im Anschluss an eine Interven-

¹ Moran et al. 2014b

² Moran et al. 2014a

³ O'Gara et al. 2013

tion kann es aufgrund des Dehnungstraumas zu einer überschießenden Narbenbildung und damit Wiederverengung (Restenose) des betroffenen Gefäßabschnittes kommen. Nach einer konventionellen Ballon-Angioplastie ohne Stent-Implantation kommt es in etwa 30 bis 40 Prozent der Fälle zu einer erneuten Stenose. Nach einer Intervention mit Stent-Implantation beträgt das Risiko etwa 20 bis 30 Prozent, wobei durch die Einführung von Medikamenten-beschichteten Stents das Risiko noch weiter auf 3 bis 20 Prozent reduziert wurde.⁴

Die Restenose bildet sich innerhalb von Wochen bis Monaten und manifestiert sich in der Regel nach 3 bis 9 Monaten. Die Pathogenese der Restenose erklärt sich über eine lokal begrenzte Entzündungsreaktion der Gefäßwand, die sich infolge kleinerer Verletzungen durch die Koronarintervention entwickelt. Diese Entzündungsreaktion ist an sich physiologisch, kann jedoch bei bestimmten Patienten verstärkt ablaufen. Sie führt dann zu einem Umbau des Gefäß-Bindegewebes mit Einwanderung von Zellen aus der Media und Bildung einer Neointima, wodurch die Restenose entsteht.⁵

Medikamenten-beschichtete Stents reduzieren das Restenose-Risiko im Vergleich zu konventionellen Stents, weil sie die Zellproliferation in der Gefäßwand hemmen. Allerdings kann sich bei diesen Stents eine Restenose auch nach über einem Jahr entwickeln, weil die reaktiven Veränderungen der Gefäßwand auf die Koronarintervention gehemmt werden und deshalb langsamer ablaufen.⁶

Um die Pathophysiologie der Restenose besser zu verstehen und das Restenose-Risiko der Patienten abschätzen zu können, wurden Faktoren beschrieben, die mit dem Restenose-Risiko assoziiert sind (siehe Tabelle 1 auf Seite 8).⁷ Diese Risikofaktoren lassen sich in allgemeine Merkmale des Patienten, die Läsion betreffende Faktoren und die Intervention betreffende Faktoren einteilen.

Patienten-assoziierte Risikofaktoren können in genotypische und phänotypische Risikofaktoren eingeteilt werden. Ein gesicherter Risikofaktor ist der Diabetes mellitus. Diabetiker haben nach einer Koronarintervention mit Stent-Implantation ein um 30 bis 50 Prozent erhöhtes Risiko einer Restenose. Dieser Zusammenhang ist multifaktoriell bedingt, wobei als Ursache unter anderem eine Verstärkung der lokalen Entzündungsreaktion durch den Diabetes mellitus diskutiert wird. Ein weiterer Risikofaktor sind erhöhte CRP-Werte im Serum, die die reaktive Entzündung der Gefäßwand widerspiegeln. Darüber hinaus wurden erhöhte Blutwerte des

⁴ Dangas et al. 2010; Fischman et al. 1994; Serruys et al. 1994

⁵ Jukema et al. 2012

⁶ Jukema et al. 2012

⁷ Jukema et al. 2012; M. S. Kim & Dean 2011

Tabelle 1. Risikofaktoren der Restenose*

Allgemeine den Patienten betreffende Risikofaktoren
Diabetes mellitus
Restenose in der Anamnese
Mehr-Gefäß-KHK**
Erhöhtes Serum-CRP**
Erhöhter PAI-1**
Genpolymorphismen (NOS3, TNF)**
Die Läsion betreffende Risikofaktoren
Länge der Läsion
Gefäßdurchmesser
Chronischer Gefäßverschluss
ACC/AHA-Typ-C-Läsion**
Restenotische Läsion
Durch die Intervention bedingte Risikofaktoren
Unzureichende Expansion des Stents im Gefäß
Minimaler Lumendurchmesser nach der Intervention
Stent-Fraktur
Implantation mehrerer Stents

* nach Jukema et al. 2012 und M. S. Kim & Dean 2011

**KHK koronare Herzkrankheit, CRP C-reaktives Protein, PAI-1 Plasminogenaktivatorinhibitor 1, NOS3 nitric oxide synthase 3, TNF tumor necrosis factor, ACC American College of Cardiology, AHA American Heart Association

Plasminogenaktivatorinhibitors 1 (PAI-1), der an der Entstehung der Intima-Hyperplasie beteiligt ist, als Risikofaktor beschrieben.

Mehrere genetische Varianten haben einen Einfluss auf die Pathophysiologie der Restenose. Dabei können Mutationen der nitric oxide synthase 3 und des tumor necrosis factor als Risikofaktoren angesehen werden. Weitere allgemeine Risikofaktoren des Patienten sind die Mehr-Gefäß-KHK und die Restenose in der Anamnese. Darüber hinaus ist Rauchen ein Faktor, der sich protektiv auf die Entstehung der Restenose auswirkt.

Die Gefäß-Läsion betreffende Risikofaktoren sind zunächst die Länge der Läsion und der Gefäßdurchmesser. Je länger die Läsion ist und je schmaler das Gefäß ist, desto höher ist das Restenose-Risiko. Darüber hinaus werden eine bereits vorliegende lokale Restenose, ein

chronischer Gefäßverschluss und die Einordnung der Läsion in Typ C nach den ACC/AHA-Kriterien als Risikofaktoren angesehen. Die ACC/AHA-Typ-C-Läsion liegt vor, wenn die Läsion über 2 cm lang ist, bestimmte anatomische Kriterien erfüllt (unter anderem geschlängeltem Verlauf des zuführenden Gefäßes oder Lokalisation in einem stark abgewinkelten Gefäß-Segment) oder das Gefäß bereits seit über 3 Monaten verschlossen ist.⁸

Das Restenose-Risiko wird auch durch die Koronarintervention selbst beeinflusst. Eine unzureichende Expansion des Stents im Gefäß und der minimale Lumendurchmesser des Stents nach der Intervention sind Risikofaktoren. Das Wachstum der Neointima und damit die Lumeneinengung betragen im Mittel etwa 0,2 bis 0,4 mm bei Medikamenten-beschichteten Stents und etwa 1 mm bei unbeschichteten Stents. Je weiter der Stent expandiert wird und je größer der Lumendurchmesser nach der Intervention ist, desto geringer ist das Risiko einer erneuten Stenose. Außerdem wurden die Stent-Fraktur und die Implantation mehrerer Stents als Risikofaktoren beschrieben.

1.3. Stentthrombose

Eine weitere Komplikation der Koronarintervention ist die Stentthrombose. Dabei verschließt sich der implantierte Stent durch einen neu gebildeten Thrombus. Die Stentthrombose ist ein seltenes Ereignis mit einer Inzidenz von 1,2 bis 2,1 Prozent.⁹ Sie tritt am häufigsten innerhalb der ersten 30 Tage nach der Koronarintervention auf.¹⁰

Die Implantation von Medikamenten-beschichteten Stents kann aufgrund der verlangsamten Gefäßheilung und möglicher allergischer Reaktionen gegen das Stent-Material dazu führen, dass sich die Stentthrombose analog zur Restenose auch noch im späteren Verlauf entwickelt.¹¹

Der Thrombus im implantierten Stent bildet sich innerhalb von Minuten bis Stunden. Die Entstehung des Thrombus kann unter anderem durch eine Verletzung des Endothels initiiert werden, wenn das Endothel thrombozytenhemmende Mediatoren nicht mehr ausreichend freisetzen kann und die Thrombozyten mit dem subendothelialen Bindegewebe in Kontakt kommen. Durch den Kontakt zu Kollagen und dem von Willebrand-Faktor im subendothelialen Bindegewebe lagern sich die Thrombozyten dem verletzten Endothel an und werden aktiviert. Die aktivierten Thrombozyten setzen ADP und Thromboxan A2 frei, wodurch

⁸ Ryan et al. 1988

⁹ Lagerqvist et al. 2009; van Werkum et al. 2009

¹⁰ Palmerini et al. 2012

¹¹ Palmerini et al. 2013

weitere Thrombozyten aktiviert werden und sich die Thrombozyten-Aggregation verstärkt. Der Mediator ADP wirkt auf die Thrombozyten unter anderem über den P2Y₁₂-Rezeptor, der wiederum den Glykoprotein IIb/IIIa-Rezeptor aktiviert. Dieser Glykoprotein IIb/IIIa-Rezeptor kann die Thrombozyten miteinander vernetzen, indem er Fibrinogen aus dem Plasma bindet. Die vernetzten Thrombozyten bilden zusammen mit Fibrin, das parallel über eine Aktivierung der Gerinnungskaskade entstanden ist, den Thrombus.¹²

In abnehmender Häufigkeit sind von der akuten Stentthrombose die subakute Stentthrombose innerhalb von 24 Stunden bis 30 Tagen, die späte Stentthrombose innerhalb von 30 Tagen bis zu einem Jahr sowie die sehr späte Stentthrombose nach einem Jahr zu unterscheiden.¹³

1.4. Clopidogrel

Die weltweit am weitesten verbreitete thrombozytenhemmende Begleittherapie besteht aus Azetylsalizylsäure und Clopidogrel. Vor der Koronarintervention wird versucht, die Thrombozyten mit Azetylsalizylsäure in einer einmaligen Dosis von 160 bis 325 mg und Clopidogrel in einer einmaligen Dosis von 600 mg schnell und effektiv zu hemmen. Im Verlauf erhalten die Patienten dann eine Dauertherapie mit Azetylsalizylsäure in einer täglichen Dosis von 75 bis 100 mg und Clopidogrel in einer täglichen Dosis von 75 mg für mindestens 12 Monate.¹⁴ Das Ziel dieser Begleittherapie ist es, während der Koronarintervention die Thrombuslast zu vermindern und erneute thrombotische Ereignisse nach der Intervention zu vermeiden.

Clopidogrel wirkt über eine irreversible Hemmung des P2Y₁₂-Rezeptors. Die Wirkdauer beträgt 7 bis 10 Tage, weil die Thrombozyten aufgrund der irreversiblen Hemmung solange deaktiviert sind, bis sich neue Thrombozyten gebildet haben. Die häufigsten Nebenwirkungen von Clopidogrel sind allergische Hautreaktionen und ein erhöhtes Blutungsrisiko. Deshalb ist Clopidogrel bei gastrointestinalen und intrakraniellen Blutungen sowie einer bereits bekannten Allergie gegen Clopidogrel nur nach einer strengen Risiko-Nutzen-Abwägung einzusetzen.¹⁵

Die Aufnahme von Clopidogrel im Dünndarm wird unter anderem durch das P-Glykoprotein reguliert. Das P-Glykoprotein ist ein Transportmolekül im Dünndarm, das Substanzen, die in die Epithelzellen gelangt sind, wieder ins Dünndarmlumen zurück transportieren kann. Das P-

¹² Ruggeri 2002

¹³ Cutlip et al. 2007

¹⁴ O'Gara et al. 2013

¹⁵ UpToDate 2014

Glykoprotein wird auch als multidrug resistance protein 1 bezeichnet, weil eine Überexpression des P-Glykoproteins in Tumorzellen dazu führen kann, dass Chemotherapeutika verstärkt aus den Zellen nach draußen transportiert werden und die Tumorzellen dadurch gegenüber Chemotherapeutika resistent werden. Clopidogrel ist ein Substrat des P-Glykoproteins und kann deshalb nicht ungehindert durch das Dünndarmepithel ins Blut diffundieren.¹⁶

Clopidogrel wird zunächst in einer inaktiven Form in Tablettenform eingenommen und erst in der Leber durch die Enzyme der Biotransformation in seinen aktiven Metaboliten umgewandelt. Die inaktive Form wird durch eine Oxidation an einem Thiophenring zu 2-oxo-Clopidogrel und in einem zweiten Schritt durch eine weitere Oxidation und Bildung einer Carboxylgruppe sowie einer Thiolgruppe in den aktiven Metaboliten umgewandelt. Die Thiolgruppe des aktiven Metaboliten ist für die irreversible Hemmung des P2Y₁₂-Rezeptors auf den Thrombozyten verantwortlich. An der Umwandlung von Clopidogrel in den aktiven Metaboliten sind die Enzyme CYP1A2, CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19 und CYP3A4 beteiligt.¹⁷

Die Wirkung von Clopidogrel auf die Thrombozyten lässt sich mithilfe von Thrombozyten-Funktionstests messen. Dabei zeigte sich in mehreren Studien, dass die Wirkung von Clopidogrel auf die Thrombozyten-Funktion zwischen Probanden stark variiert. Ein Teil der Probanden hat unter der Therapie mit Clopidogrel weiterhin hohe Werte in den Thrombozyten-Funktionstests. Dieses Phänomen ist aufgrund der Vielzahl an Studien und möglichen Testverfahren jedoch nicht einheitlich definiert und wird in der Literatur auch mit verschiedenen Begriffen beschrieben (unter anderem clopidogrel nonresponsiveness, clopidogrel resistance, high on-clopidogrel platelet reactivity). Mögliche Ursachen der variablen Wirkung von Clopidogrel auf die Thrombozyten-Funktion sind allgemeine Merkmale der Patienten (zum Beispiel Alter, Diabetes mellitus, Übergewicht), Wechselwirkungen mit anderen Medikamenten, eine ungenügende Dosierung sowie genetische Ursachen. Dabei kommen insbesondere jene genetischen Veränderungen in Frage, die den Stoffwechsel von Clopidogrel betreffen.¹⁸

Das ABCB1-Gen kodiert für das P-Glykoprotein. Bei diesem Gen sind über fünfzig Mutationen bekannt, die sich auf die Funktion des P-Glykoproteins auswirken können. Der ABCB1-3435C/T-Polymorphismus kommt mit am häufigsten vor und wurde bereits mehrfach untersucht. Bei dieser Mutation ist an der Position 3435 des ABCB1-Gens eine Cytosin-Base

¹⁶ Taubert et al. 2006; Zhou 2008

¹⁷ Kazui et al. 2010; Xie et al. 2011

¹⁸ Trenk et al. 2012; Yousuf & Bhatt 2011

gegen eine Thymin-Base ausgetauscht.¹⁹ Mega et al. und Taubert et al. zeigten, dass sich diese Mutation auf den Stoffwechsel von Clopidogrel auswirkt. Homozygote Träger des ABCB1-3435T-Allels haben eine geringere Plasmakonzentration des aktiven Metaboliten von Clopidogrel und eine geringere Hemmung in den Thrombozyten-Funktionstests.²⁰

Die Enzyme der Biotransformation, die an der Umwandlung von Clopidogrel in der Leber beteiligt sind, können ebenfalls durch eine Vielzahl an Mutationen verändert sein. Für das CYP2C19-Gen wurden über dreißig Mutationen beschrieben, wobei in unserer Population die Polymorphismen CYP2C19*2 und CYP2C19*17 am häufigsten sind. Bei dem CYP2C19*2-Polymorphismus ist eine Guanin-Base an der Position 19154 durch eine Adenin-Base ersetzt, wodurch die Funktion des Enzyms abgeschwächt wird. Das CYP2C19*2-A-Allel wird deshalb auch als loss of function-Allel bezeichnet. Der CYP2C19*17-Polymorphismus wirkt sich gegenteilig aus. Bei diesem Polymorphismus sind eine Thymin-Base an der Position -806 durch eine Cytosin-Base und eine Cytosin-Base an der Position -3402 durch eine Thymin-Base ausgetauscht, wodurch die Transkription des Gens und damit die Funktion des Enzyms verstärkt werden. In mehreren Studien wurde gezeigt, dass sich diese Polymorphismen auf den Stoffwechsel von Clopidogrel auswirken. Probanden mit mindestens einem CYP2C19*2-A-Allel haben eine geringere Plasmakonzentration des aktiven Metaboliten und höhere Werte in den Thrombozyten-Funktionstests, während Probanden mit mindestens einem CYP2C19*17-T-Allel eine höhere Konzentration des aktiven Metaboliten und eine stärkere Thrombozyten-Funktionshemmung aufweisen.²¹

Mega et al. und Simon et al. untersuchten im Jahr 2009 erstmals den Einfluss dieser genetischen Veränderungen auf kardiovaskuläre Ereignisse nach einem akuten Myokardinfarkt beziehungsweise einem akuten Koronarsyndrom. In der Studie von Mega et al. hatten Patienten mit mindestens einem CYP2C19*2-A-Allel im Vergleich zu Patienten mit dem *2-GG-Genotyp ein dreifach erhöhtes Stentthrombose-Risiko und ein um 53 Prozent erhöhtes Risiko kardiovaskulärer Gesamtereignisse unter Berücksichtigung der Variablen Tod, erneuter Myokardinfarkt und Schlaganfall. Simon et al. zeigten ein erhöhtes Risiko kardiovaskulärer Gesamtereignisse bei homozygoten Trägern des ABCB1-3435T-Allels und bei Patienten mit zwei CYP2C19-loss of function-Allelen, wobei auch die seltenen Polymorphismen *3, *4 und *5 berücksichtigt wurden. Dieser Effekt war besonders bei jenen Patienten ausgeprägt, die mit einer Koronarintervention behandelt worden waren.²²

¹⁹ Hoffmeyer et al. 2000; Kimchi-Sarfaty et al. 2007

²⁰ Mega et al. 2010; Taubert et al. 2006

²¹ K. A. Kim et al. 2008; Mega et al. 2009a; Shuldiner et al. 2009

²² Mega et al. 2009a; Simon et al. 2009

2. Problemstellung

In Voruntersuchungen von Mega et al. und Simon et al. waren Polymorphismen der Gene CYP2C19 und ABCB1 mit kardiovaskulären Ereignissen nach einem Myokardinfarkt beziehungsweise einem akuten Koronarsyndrom assoziiert.²³ Dieser Effekt zeigte sich besonders bei Patienten, die mit einer Koronarintervention behandelt worden waren. Dieses Ergebnis legt den Schluss nahe, dass die untersuchten Genmutationen die Effektivität der Koronarintervention beeinflussen. Die Effektivität beziehungsweise der langfristige Therapieerfolg der Koronarintervention lassen sich neben der Häufigkeit von Stentthrombosen anhand der Häufigkeit von Restenosen des betroffenen Gefäßabschnittes, die zu einer erneuten Intervention führen (engl. target lesion revascularization, TLR), messen. Diese Komplikation wurde in den oben genannten Studien nicht untersucht.

Wir möchten in dieser Studie eine mögliche Abhängigkeit der TLR von den Genpolymorphismen ABCB1-3435C/T, CYP2C19*2 und CYP2C19*17 untersuchen. Dafür benötigen wir eine Stichprobe, bestehend aus Patienten mit einem akuten Myokardinfarkt, die erfolgreich interventionell behandelt wurden, weil die TLR nur dann auftreten kann, wenn die primäre Behandlung zunächst erfolgreich war. Neben der TLR möchten wir die Variablen Stentthrombose, Tod, Myokardinfarkt, Schlaganfall und Infarktausdehnung untersuchen, um die Ergebnisse der oben genannten Studien nachvollziehen zu können und die wissenschaftliche Grundlage für die Entwicklung individualisierter Therapieansätze zu erweitern. Bei den loss of function-Mutationen des CYP2C19-Gens beschränken wir uns auf den CYP2C19*2-Polymorphismus, weil die anderen Mutationen insgesamt selten sind.

Null-Hypothese:

Die Variablen TLR, Stentthrombose, Tod, Myokardinfarkt, Schlaganfall und Infarktausdehnung sind zwischen den Genotypen der Polymorphismen ABCB1-3435C/T, CYP2C19*2 und CYP2C19*17 gleichmäßig verteilt.

Alternativ-Hypothese:

Die Variablen TLR, Stentthrombose, Tod, Myokardinfarkt, Schlaganfall und Infarktausdehnung sind von den Genotypen der Polymorphismen ABCB1-3435C/T, CYP2C19*2 und CYP2C19*17 abhängig.

²³ Mega et al. 2009a; Simon et al. 2009

3. Material und Methodik

3.1. Studienaufbau

Wir haben in dieser Studie den Einfluss vererbter Genpolymorphismen auf die prospektiv erhobene Ereignisrate in einer Stichprobe von 928 Patienten mit einem akuten Myokardinfarkt, die in den Jahren 2005 bis 2008 im Deutschen Herzzentrum München und in der 1. Medizinischen Klinik des Klinikums Rechts der Isar in München behandelt worden waren, untersucht. Die Patienten wurden im Rahmen von Infarktstudien nach schriftlicher Einverständniserklärung prospektiv beobachtet. Die Population, über die unsere Studie Aussagen treffen soll, sind Patienten mit einem akuten Myokardinfarkt, die mit einer Koronarintervention und einer initialen Clopidogrel-Dosis behandelt werden. Darüber hinaus definiert sich die Stichprobe unserer Studie durch bestimmte Ein- und Ausschlusskriterien (siehe Tabelle 2 auf Seite 15).

Die Patienten erhielten vor der Koronarintervention eine initiale Clopidogrel-Dosis von 600 mg. Bei 98 Prozent der Patienten wurde ein Stent implantiert, wobei in über 90 Prozent der Fälle ein Medikamenten-beschichteter Stent benutzt wurde. 97 Prozent der Patienten erhielten nach der Koronarintervention eine thrombozytenhemmende Therapie mit Clopidogrel in einer Dosierung von 75 mg einmal täglich für mindestens 6 Monate und Acetylsalicylsäure in einer Dosierung von 100 mg einmal täglich auf Dauer. Ein Einschlusskriterium war ein gutes postinterventionelles Ergebnis mit einem Thrombolysis in Myocardial Infarction Flow-Grad 2 oder 3. Grad 3 bedeutet eine normale Durchblutung der Koronararterie und Grad 2 eine komplette Durchblutung der Region distal der Stenose mit einem verlangsamten Blutfluss, wobei das Kontrastmittel mehr als 3 Sekunden benötigt, um von der Injektion in die Peripherie des Myokards zu gelangen.²⁴ Eine erfolgreiche Intervention mit einem guten postinterventionellem distalen Fluss wurde als Einschlusskriterium gewählt, weil die TLR als abhängige Variable untersucht werden soll und die TLR nur dann auftreten kann, wenn die primäre Behandlung zunächst erfolgreich war. Weitere Einschlusskriterien waren die Durchführung einer angiografischen Nachsorgeuntersuchung 6 bis 8 Monate nach der Koronarintervention oder bei erneuten Beschwerden und die Durchführung einer Myokardszintigrafie 5 bis 7 Tage nach der Koronarintervention. Mit der Myokardszintigrafie wurde die endgültige Infarktausdehnung bestimmt. Darüber hinaus wurde bei allen Patienten nach einem Jahr eine Wieder-

²⁴ Chesebro et al. 1987

Tabelle 2. Ein- und Ausschlusskriterien der Stichprobe

Einschlusskriterien

Akuter Myokardinfarkt und schriftliche Einverständniserklärung zur Nachverfolgung
Koronarintervention mit TIMI* Flow 2 oder 3
600 mg Clopidogrel loading dose
Myokardszintigrafie 5-7 Tage nach der Koronarintervention
Kontroll-Angiografie 6-8 Monate nach der Koronarintervention
Schriftliche Einverständniserklärung zur Teilnahme an der genetischen Studie
Telefon-Interview oder Wiedervorstellung 1 Jahr nach der Koronarintervention
Verfügbarkeit der Patientenakte

Ausschlusskriterien

Kontraindikationen gegen
Azetylsalizylsäure
Clopidogrel
Heparin
Bivalirudin
Rostfreien Stahl
Cobalt-Chromium

*TIMI Thrombolysis in Myocardial Infarction

vorstellung veranlasst oder ein Telefon-Interview durchgeführt. Dadurch ist in unserer Studie ein Beobachtungszeitraum von 1 Jahr gewährleistet. Die klinischen Daten wurden im Rahmen der Infarktstudien entsprechend der schriftlichen Einverständniserklärung prospektiv erhoben. Alle Patienten unterschrieben während der primären Behandlung eine schriftliche Einverständniserklärung zur wissenschaftlichen Auswertung ihrer klinischen Daten und der genetischen Analyse. Dieses Vorgehen wurde von der Ethikkommission der Technischen Universität München bewilligt. Für die genetische Analyse wurde bei allen Patienten im Rahmen der primären Behandlung Blut abgenommen. Die Abbildung 1 auf Seite 23 zeigt den organisatorischen Ablauf unserer Studie im Überblick.

3.2. DNA-Isolierung

Die Blutproben der Patienten wurden nach der Blutabnahme bei -25 °C gelagert. Für die Isolierung der DNA wurde das Blut aufgetaut. Die DNA-Isolierung wurde mit dem NucleoSpin Blood QuickPure Set der Firma Macherey-Nagel, Düren, Deutschland, nach den Vorgaben durchgeführt. Das Set der Firma Macherey-Nagel enthält eine NucleoSpin Blood QuickPure Column, den Lysis Buffer BQ1, den Wash Buffer BQ2 als Konzentrat, den Elution Buffer BE, die Proteinase K in gefriergetrockneter Form, den Proteinase Buffer PB und zwei 2 ml Auffanggefäße. Vor dem Gebrauch wurden das Wash Buffer BQ2-Konzentrat mit der vierfachen Menge Ethanol und die gefriergetrocknete Proteinase K mit dem Proteinase Buffer PB vermischt. In einem ersten Arbeitsschritt wurden in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß 200 µl EDTA-Blut, 25 µl Proteinase K und 200 µl Lysis Buffer BQ1 der Firma Macherey-Nagel miteinander vermischt und in einem Thermomixer für 10 Minuten auf 70 °C erhitzt. Dabei lösen sich die Blutzellen durch die Puffersubstanz auf und die DNA wird freigegeben. Danach wurden 200 µl Ethanol dazugegeben und die Lösung wurde in eine NucleoSpin Blood QuickPure Column der Firma Macherey-Nagel umgefüllt. Die NucleoSpin Blood QuickPure Column steckt in einem 2 ml Auffanggefäß und enthält eine Silicat-Membran, an die die DNA bindet. Das Gefäß wurde mit 11.000 Umdrehungen pro Minute für 1 Minute zentrifugiert, wodurch das Blut in das Auffanggefäß abfließt und die DNA, die an der Membran gebunden ist, von der Flüssigkeit getrennt wird. Die Säule mit der Silicat-Membran wurde daraufhin in ein neues 2 ml Auffanggefäß gesteckt und 350 µl Buffer BQ2 der Firma Macherey-Nagel wurden zum Waschen der DNA hinzugegeben. Das Gefäß wurde wieder mit 11.000 Umdrehungen pro Minute für 3 Minuten zentrifugiert und die durchgelaufene Flüssigkeit wurde entsorgt. Um die DNA schließlich von der Membran auszuwaschen, wurde die Säule in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gesteckt und mit 200 µl Buffer BE der Firma Macherey-Nagel übergossen. Dabei löst sich die DNA von der Silicat-Membran und fließt in das Reaktionsgefäß ab. Das 1,5 ml Reaktionsgefäß wurde für 1 Minute bei Raumtemperatur aufbewahrt und anschließend mit 11.000 Umdrehungen pro Minute für 1 Minute zentrifugiert.²⁵

Die Reaktionsgefäße mit der isolierten DNA wurden bis zur Genotypisierung bei -25 °C gelagert.

²⁵ Macherey-Nagel 2012

3.3. DNA-Amplifikation und Genotypisierung

Die Genotypen der Patienten wurden mithilfe einer quantitativen real-time Polymerase-Kettenreaktion (PCR) bestimmt. Die quantitative real-time PCR ist eine Methode, die die Genamplifikation und die Genbestimmung in einem Arbeitsschritt ermöglicht. Wie bei einer Untersuchung mittels PCR üblich werden in einem Reaktionsgefäß DNA, Primer, Nukleotide, eine DNA-Polymerase und ein Puffer gemischt. Zusätzlich wird bei der quantitativen real-time PCR ein Oligonukleotid als Gensonde hinzugegeben, das eine Zielsequenz in der DNA besitzt. In der ersten Phase der Polymerase-Kettenreaktion wird die Probe auf 95 °C erhitzt und der DNA-Doppelstrang teilt sich in zwei Einzelstränge auf. In der zweiten Phase wird die Probe auf 60 °C abgekühlt und die Primer binden an die DNA. In der dritten Phase beginnt die DNA-Polymerase die komplementären DNA-Stränge zu synthetisieren. Nach mehreren Zyklen dieser drei Phasen wird der zwischen den Primern liegende Abschnitt der DNA amplifiziert.²⁶ Wenn in dem amplifizierten Abschnitt die Zielsequenz des hinzugegebenen Oligonukleotids liegt, bindet das Oligonukleotid in der zweiten Phase der Polymerase-Kettenreaktion an den DNA-Abschnitt. Die DNA-Polymerase wird dadurch aber nicht von der Synthese abgehalten. Als Polymerase wird die *Thermus aquaticus* (Taq)-DNA-Polymerase verwendet, die neben der Polymerase-Aktivität auch eine Aktivität als 5'-3'-Exonuklease besitzt. Das Enzym kann mit seiner 5'-3'-Exonuklease-Aktivität das an den DNA-Abschnitt gebundene Oligonukleotid spalten, während es den komplementären DNA-Strang synthetisiert.²⁷

Die Gensonde besitzt am 5'-Ende einen fluoreszierenden Farbstoff und am 3'-Ende einen Farbstoff, der die Fluoreszenz unterdrückt. Wenn die Gensonde von der Taq-DNA-Polymerase gespalten wird, verlieren der hemmende und der fluoreszierende Farbstoff den Kontakt und die Fluoreszenz wird messbar (siehe Abbildung 2 auf Seite 24). Die Gensonde wird nur dann von der Taq-DNA-Polymerase gespalten, wenn sie vorher an ihrer Zielsequenz gebunden war. Eine messbare Fluoreszenz bedeutet also, dass die Zielsequenz der Gensonde in dem amplifizierten DNA-Abschnitt enthalten war.²⁸

In unserer Studie wurden die Genotypen von bekannten Genpolymorphismen untersucht. Es sollte zwischen zwei Allelen unterschieden werden, wofür zwei Gensonden verwendet werden, deren Sequenzen den beiden Allelen entsprechen. Die Farbstoffe der beiden Gensonden fluoreszieren in verschiedenen Frequenzen. Nach der Polymerase-Kettenreaktion lässt

²⁶ Berg et al. 2012

²⁷ Holland et al. 1991

²⁸ Livak 1999

sich aus dem Frequenzspektrum der fluoreszierenden Probe der Genotyp des Patienten ablesen. Überwiegt eine der beiden Frequenzen, liegt ein homozygoter Genotyp des entsprechenden Allels vor. Sind beide Frequenzen vorhanden, liegt ein heterozygoter Genotyp vor.²⁹ Es wurde mit dem ABI PRISM 7700 Sequenz Detection System der Firma Applied Biosystems (jetzt Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) gearbeitet. Das System erkennt mit einer Kamera die Frequenzspektren der Proben und erstellt ein Diagramm, auf dem sich die untersuchten Proben nach ihrem Frequenzspektrum verteilen. Die beiden Achsen des Diagramms bezeichnen die beiden verschiedenen Frequenzen. Die untersuchten Proben verteilen sich in dem Diagramm in drei Punktwolken. Eine Punktwolke entspricht dem normalen Allel, eine zweite Punktwolke dem Risikoallel und eine dritte Punktwolke dem heterozygoten Genotyp.³⁰ Der Untersucher bestimmt den Genotyp der einzelnen Punkte. Die Genotypen wurden anschließend den Patientenproben zugeordnet und tabellarisch dokumentiert.

Die Arbeitsschritte der quantitativen real-time PCR bestanden im Einzelnen zunächst aus dem Herstellen einer Lösung in einem 2 ml Reaktionsgefäß nach folgendem Pipettierschema: 565 µl H₂O, 850 µl Master Mix der Firma Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA, 25,5 µl Primer FORWARD, 25,5 µl Primer REVERSE, 17 µl Gensonde FAM, 17 µl Gensonde VIC. Der Master Mix der Firma Thermo Fisher Scientific beinhaltet Nukleotide, die Taq-DNA-Polymerase und den Puffer. Von dieser Lösung wurden je 15 µl in die Vertiefungen einer 96-Well-PCR-Platte der Firma Kisker, Steinfurt, Deutschland, gefüllt. In 90 Wells der Platte wurden daraufhin je 2 µl der DNA-Proben von Patienten gefüllt. In 4 Wells wurden als Referenzen je 2 µl von DNA-Proben von Kontrollpersonen mit bekannten homozygoten Genotypen gefüllt. In die verbleibenden 2 Wells wurden als Referenzen ohne Fluoreszenz 2 µl H₂O gefüllt. Die 96-Well-PCR-Platte wurde mit einer Folie abgedeckt und mit 3000 Umdrehungen pro Minute für 10 Sekunden zentrifugiert. Die Polymerase-Kettenreaktion wurde anschließend über vierzig Zyklen durchgeführt. Die erste Phase dauerte 15 Sekunden bei 95 °C. Die zweite Phase und die dritte Phase dauerten zusammen 1 Minute bei 60 °C. Die Polymerase-Kettenreaktion wurde mit einem Thermal Cycler der Firma Applied Biosystems durchgeführt. Im Anschluss an die Polymerase-Kettenreaktion wurde die Platte mit 3000 Umdrehungen pro Minute für 10 Sekunden zentrifugiert und mit dem ABI PRISM 7700 Sequenz Detection System wie oben beschrieben ausgewertet.

²⁹ Livak 1999

³⁰ Livak 1999

Um ein mögliches Vertauschen der Proben und Messfehler auszuschließen, wurde jede fünfte Probe ein zweites Mal gemessen und mit dem Primärergebnis verglichen. Es zeigte sich keine Abweichung, sodass keine Messung wiederholt werden musste. Um Fehler bei der Zuordnung der Genotypen zu den Patientenproben zu vermeiden, wurden die von der Software erstellten Diagramme von zwei unabhängigen Untersuchern ausgewertet.

Bei sechs Patientenproben war die Genotypisierung mithilfe der quantitativen real-time PCR nicht möglich. Bei diesen Patientenproben wurde die DNA sequenziert, wofür das ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer capillary sequencing system und das BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit der Firma Applied Biosystems verwendet wurden.

3.4. Materialien und Geräte

In der Tabelle 3 auf Seite 20 sind alle verwendeten Materialien und Geräte aufgelistet.

3.5. Variablen und Definitionen

Die unabhängigen Variablen unserer Studie sind die Genotypen der Polymorphismen ABCB1-3435C/T, CYP2C19*2 und CYP2C19*17. Die abhängigen Variablen sind die Ereignisse TLR, Stentthrombose, Tod, Myokardinfarkt und Schlaganfall sowie die Infarktausdehnung (siehe Tabelle 4 auf Seite 21).

Die TLR ist definiert als eine erneute Koronarintervention oder Bypass-Operation aufgrund einer Restenose des betroffenen Gefäßabschnitts. Die Patienten müssen sowohl die Symptome einer Ischämie als auch eine angiografisch nachweisbare Restenose entwickelt haben. Die Restenose ist angiografisch nachgewiesen, wenn der Minimaldurchmesser im Interventionsbereich und 5 mm um ihn herum um über 50 Prozent im Vergleich zum Referenzdurchmesser verkleinert ist. Als Referenzdurchmesser wird der Mittelwert des Gefäßdurchmessers direkt proximal und distal des Interventionsbereiches definiert.³¹

Der erneute Myokardinfarkt ist definiert durch neu aufgetretene pathologische Q-Zacken im EKG oder durch eine Erhöhung der CK oder der CK-MB mindestens um das Dreifache.³² Die Kombination aus den Variablen TLR, Tod und erneuter Myokardinfarkt wird als signifikantes klinisches Ereignis, major adverse cardiovascular events (MACE), bezeichnet.

³¹ Cutlip et al. 2007

³² Thygesen et al. 2007

Tabelle 3. Auflistung der verwendeten Materialien und Geräte

DNA-Isolierung

EDTA-Blut von 928 Patienten

NucleoSpin Blood QuickPure Set der Firma Macherey-Nagel, Düren, Deutschland

Ethanol 100%

1,5 ml Reaktionsgefäße der Firma Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Pipetten und Pipetten-Spitzen der Firma Eppendorf

Thermomixer 5436 der Firma Eppendorf

Zentrifuge der Firma Jouan (jetzt Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)

Genotypisierung

DNA-Proben von 928 Patienten

DNA-Proben von Kontrollpersonen

Master Mix der Firma Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA

6 Primer der Firma Applied Biosystems (jetzt Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)

6 Gensonden der Firma Applied Biosystems

H₂O

96-Well-PCR-Platten der Firma Kisker, Steinfurt, Deutschland

Abdeckfolien der Firma Kisker

2 ml Reaktionsgefäße der Firma Eppendorf

Pipetten und Pipetten-Spitzen der Firma Eppendorf

Zentrifuge der Firma Jouan

Thermal Cycler der Firma Applied Biosystems

ABI PRISM 7700 Sequenz Detection System der Firma Applied Biosystems

Der Schlaganfall ist definiert als ein akutes neurologisches Defizit, das mindestens 24 Stunden andauert, und wird über eine zerebrale Bildgebung diagnostiziert.

Die Definition der Stentthrombose umfasst in unserer Studie die gesicherte und die wahrscheinliche Stentthrombose. Die Stentthrombose ist gesichert, wenn ein Thrombus in der Zielläsion angiografisch nachgewiesen wurde. Die wahrscheinliche Stentthrombose wird durch einen Myokardinfarkt in dem Versorgungsgebiet des betroffenen Gefäßes oder durch einen unerklärten Tod innerhalb der ersten 30 Tage nach der Koronarintervention definiert.³³

³³ Cutlip et al. 2007

Tabelle 4. Variablen

Unabhängige Variablen
ABCB1-3435CC-Genotyp
ABCB1-3435T-Allel
CYP2C19*2-GG-Genotyp
CYP2C19*2-A-Allel
CYP2C19*17-CC-Genotyp
CYP2C19*17-T-Allel
Abhängige Variablen
TLR*
Tod
Erneuter Myokardinfarkt
Tod oder Myokardinfarkt
MACE*
Schlaganfall
MACE oder Schlaganfall*
Stentthrombose
Infarktausdehnung**

*TLR target lesion revascularization, MACE major adverse cardiovascular events (TLR, Tod oder Myokardinfarkt)

**Anteil des infarzierten Myokards am gesamten Myokard

Die endgültige Infarktausdehnung ist definiert als der Anteil des infarzierten Myokards am gesamten Myokard. Die Infarktausdehnung wurde 5 bis 7 Tage nach der Koronarintervention mithilfe einer Myokardszintigrafie bestimmt.

3.5. Statistische Analyse

Die kategorialen Variablen wurden mit dem Chi-Quadrat-Test oder dem Exakten Test nach Fisher auf einen Zusammenhang mit den Genotyp-Gruppen hin getestet. Die metrischen Variablen wurden mit dem Zwei-Stichproben-t-Test oder einer Varianzanalyse ausgewertet. Dabei wurde ein p-Wert < 0,05 als Signifikanz-Level festgelegt. Zunächst wurde untersucht, ob die Basismerkmale der Patienten gleichmäßig zwischen den Genotyp-Gruppen verteilt sind. Anschließend wurde die Verteilung der abhängigen Variablen auf die Genotyp-Gruppen

untersucht. Mit dem Chi-Quadrat-Test wurde untersucht, ob die Verteilungen der Genotypen dem Hardy-Weinberg-Gleichgewicht entsprechen. Die statistische Auswertung wurde mit der S-Plus Software der Firma Insightful Corporation (jetzt TIBCO Software Inc., Palo Alto, California, USA) und der R Software durchgeführt.

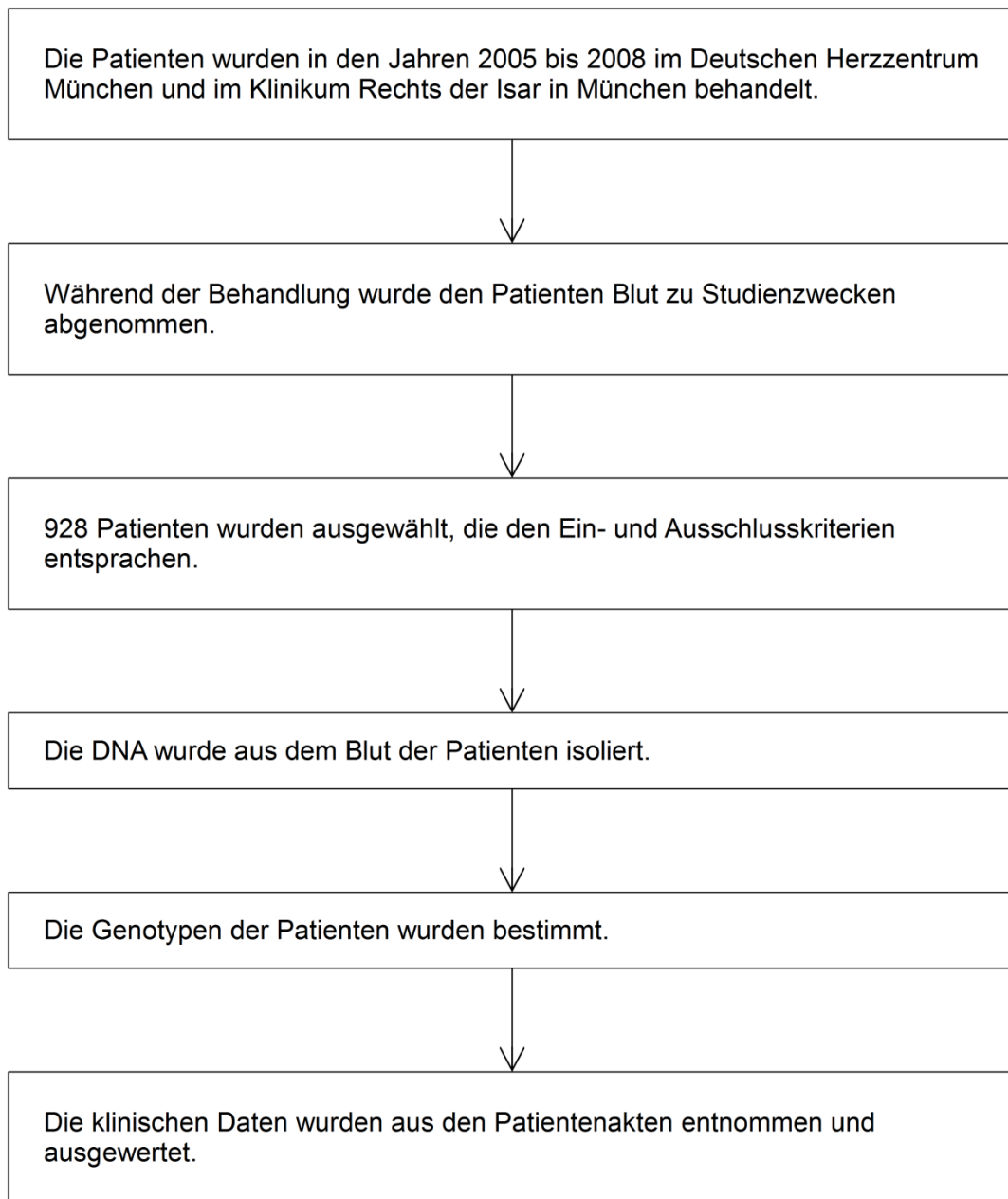


Abbildung 1. Organisatorischer Ablauf der Studie im Überblick

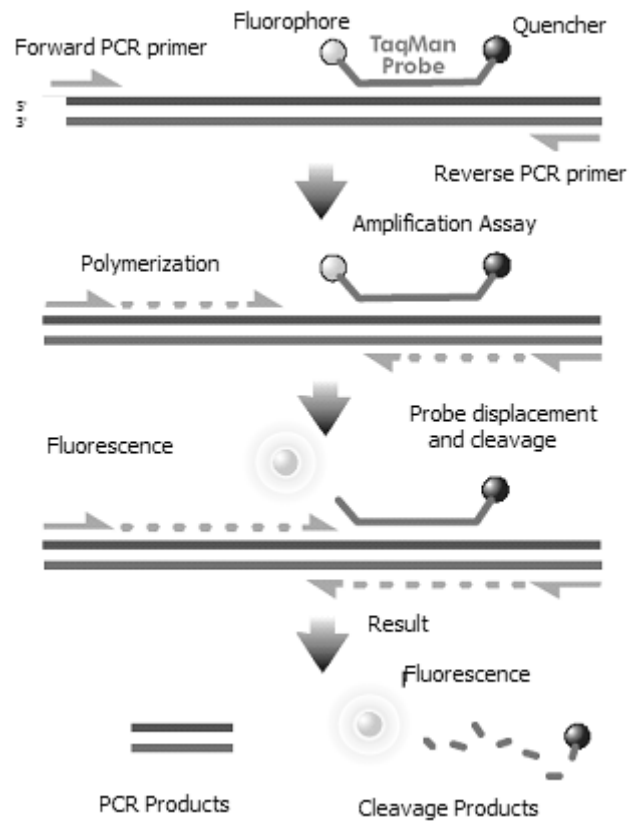


Abbildung 2. Prinzip der quantitativen real-time PCR

Die Gensonde besitzt am 5'-Ende einen fluoreszierenden Farbstoff (Fluorophore) und am 3'-Ende einen Farbstoff, der die Fluoreszenz unterdrückt (Quencher). Wenn die Gensonde von der Taq-DNA-Polymerase gespalten wird, verlieren der hemmende und der fluoreszierende Farbstoff den Kontakt und die Fluoreszenz wird messbar.³⁴

³⁴ Livak 1999

4. Ergebnisse

4.1. Durchführung der Experimente

Die Kontrollmessungen entsprachen in allen Fällen den primären Messungen, weshalb die Ergebnisse als reproduzierbar und verlässlich angesehen werden können. Auch die Auswertung der Diagramme durch einen zweiten Untersucher ergab in allen Fällen dasselbe Ergebnis. Bei sechs Patientenproben konnte der Genotyp nicht mithilfe der quantitativen real-time PCR bestimmt werden. Bei diesen Proben wurde der Genotyp über eine DNA-Sequenzierung bestimmt.

4.2. Verteilungen der Genotypen

Die Verteilungen der Genotypen zeigten für den ABCB1-C/T-Polymorphismus 203 Patienten mit CC (21,9 Prozent), 457 Patienten mit CT (49,2 Prozent) und 268 Patienten mit TT (28,9 Prozent). Für den CYP2C19*2-G/A-Polymorphismus ergab sich folgende Verteilung: 680 Patienten GG (73,3 Prozent), 227 Patienten GA (24,5 Prozent) und 21 Patienten AA (2,2 Prozent). Bei dem CYP2C19*17-C/T-Polymorphismus hatten 565 Patienten CC (60,9 Prozent), 309 Patienten CT (33,3 Prozent) und 54 Patienten TT (5,8 Prozent). Diese Verteilungen entsprachen alle jeweils dem Hardy-Weinberg-Gleichgewicht, sodass davon ausgegangen werden kann, dass in der Population keine Selektion aufgrund der untersuchten Polymorphismen stattgefunden hat ($p = 0,76$ für den ABCB1-Genotyp, $p = 0,14$ für den CYP2C19*2-Genotyp und $p = 0,18$ für den CYP2C19*17-Genotyp).

4.3. Basismerkmale der Patienten

Die Tabellen 5 bis 7 auf den Seiten 28 bis 30 zeigen die Verteilungen der kardiovaskulären Merkmale auf die Genotyp-Gruppen. Bei dem ABCB1-Polymorphismus sind alle Risikofaktoren gleichmäßig zwischen den beiden Genotyp-Gruppen verteilt. Bei dem CYP2C19*2-Polymorphismus haben in der Gruppe mit dem CYP2C19*2-GG-Genotyp mehr Patienten einen alten Myokardinfarkt in der Anamnese ($p = 0,025$). Bei dem CYP2C19*17-Polymorphismus sind drei Merkmale nicht gleichmäßig verteilt. In der Gruppe mit dem CYP2C19*17-

T-Allel sind der Diabetes mellitus ($p = 0,024$), die Mehr-Gefäß-KHK ($p = 0,009$) und der alte Myokardinfarkt in der Anamnese ($p = 0,040$) häufiger.

Die Tabellen 8 bis 10 auf den Seiten 31 bis 33 zeigen die Verteilungen der klinischen Merkmale auf die Genotyp-Gruppen. In der Gruppe mit dem ABCB1-T-Allel ist der Ramus interventricularis anterior als infarziertes Gefäß häufiger betroffen ($p = 0,009$). In dieser Gruppe wurden außerdem mehr Patienten mit einem ACE- oder AT-II-Inhibitor behandelt ($p = 0,004$). Bei dem CYP2C19*2-Polymorphismus erhielten in der Gruppe mit dem CYP2C19*2-A-Allel mehr Patienten einen Stent ($p = 0,048$). In dieser Gruppe wurden darüber hinaus nur 99 Prozent der Patienten im Vergleich zu 97 Prozent mit Clopidogrel als Dauertherapie behandelt ($p = 0,048$). Bei dem CYP2C19*17-Genotyp erhielten in der Gruppe mit dem CYP2C19*17-T-Allel weniger Patienten einen Stent ($p = 0,030$) und der Ramus interventricularis anterior war in dieser Gruppe seltener betroffen ($p = 0,013$).

4.4. Abhängige Variablen

Die Tabelle 11 auf Seite 34 und die Abbildung 3 auf Seite 37 zeigen die Verteilungen der abhängigen Variablen auf die Genotyp-Gruppen des ABCB1-3435C/T-Polymorphismus. Auf der Abbildung lässt sich eine Tendenz dahingehend erkennen, dass sich das T-Allel protektiv auf die abhängigen Variablen auswirken könnte. Die Unterschiede zwischen den Genotyp-Gruppen sind jedoch nicht statistisch signifikant. Zwischen den Genotyp-Gruppen des CYP2C19*2-Polymorphismus sind die abhängigen Variablen ebenfalls statistisch gleichmäßig verteilt (siehe Tabelle 12 auf Seite 35 und Abbildung 4 auf Seite 38).

Dagegen fanden wir bei dem CYP2C19*17-Polymorphismus mehrere statistisch signifikante Zusammenhänge. Die Tabelle 13 auf Seite 36 und die Abbildung 5 auf Seite 39 zeigen die Verteilung der klinischen Ereignisse auf die Genotyp-Gruppen des CYP2C19*17-Polymorphismus. Bei diesem Polymorphismus zeigte sich eine absolute Reduktion der TLR um 8 Prozent bei Trägern des *17-T-Allels. Die TLR reduziert sich von 22 Prozent bei Patienten mit dem CYP2C19*17-CC-Genotyp auf 14 Prozent bei Patienten mit dem *17-T-Allel. Dieser Zusammenhang ist mit einem p-Wert von 0,002 klar statistisch signifikant. Das relative Risiko dieser Assoziation beträgt 0,63 mit einem 95 Prozent-Konfidenzintervall von 0,47 bis 0,85. Das Odds-Ratio beträgt 0,57 mit einem 95 Prozent-Konfidenzintervall von 0,39 bis 0,82. Darüber hinaus fanden wir statistisch signifikante Reduktionen der Variablen MACE und der Kombination aus MACE und Schlaganfall bei Patienten mit dem *17-T-Allel. Die Variable MACE reduziert sich von 28 Prozent auf 22 Prozent ($p = 0,040$). Das relative Risiko

dieser Assoziation beträgt 0,78 mit einem 95 Prozent-Konfidenzintervall von 0,62 bis 0,99 und das Odds-Ratio 0,72 mit einem 95 Prozent-Konfidenzintervall von 0,53 bis 0,98. Die Kombination aus MACE und Schlaganfall reduziert sich von 29 Prozent auf 23 Prozent ($p = 0,042$). Die weiteren abhängigen Variablen sind zwischen den Genotyp-Gruppen des CYP2C19*17-Polymorphismus statistisch gleichmäßig verteilt.

Tabelle 5. Verteilung der kardiovaskulären Merkmale auf die ABCB1-Genotypen
Mittelwert \pm Standardabweichung oder N (%)

Merkmale	ABCB1-CC-Genotyp	ABCB1-T-Allel
N	203	725
Alter (Jahre)	65 \pm 14	65 \pm 13
Frauen	51 (25%)	183 (25%)
Arterielle Hypertonie	153 (75%)	538 (74%)
Hypercholesterinämie	104 (51%)	378 (52%)
Raucher	74 (36%)	265 (37%)
Diabetes mellitus	43 (21%)	181 (25%)
Mehr-Gefäß-KHK*	146 (72%)	523 (72%)
Alte Bypass-Operation	9 (4%)	48 (7%)
Alter Myokardinfarkt	30 (15%)	99 (14%)
Body mass index (kg/m ²)	27 \pm 4	27 \pm 4
Ejektionsfraktion (%)	48 \pm 12	48 \pm 12

*KHK koronare Herzkrankheit

**Tabelle 6. Verteilung der kardiovaskulären Merkmale auf die CYP2C19*2-Genotypen
Mittelwert \pm Standardabweichung oder N (%)**

Merkmale	CYP2C19*2-GG-Genotyp	CYP2C19*2-A-Allel
N	680	248
Alter (Jahre)	65 \pm 13	66 \pm 13
Frauen	166 (24%)	68 (27%)
Arterielle Hypertonie	510 (75%)	181 (73%)
Hypercholesterinämie	351 (52%)	131 (55%)
Raucher	259 (38%)	80 (32%)
Diabetes mellitus	170 (25%)	54 (22%)
Mehr-Gefäß-KHK**	493 (73%)	176 (71%)
Alte Bypass-Operation	44 (6%)	13 (5%)
Alter Myokardinfarkt	105 (15%)	24 (10%)*
Body mass index (kg/m ²)	27 \pm 4	27 \pm 4
Ejektionsfraktion (%)	48 \pm 12	49 \pm 11

*p < 0,05; Chi-Quadrat-Test oder Exakter Test nach Fisher

**KHK koronare Herzkrankheit

**Tabelle 7. Verteilung der kardiovaskulären Merkmale auf die CYP2C19*17-Genotypen
Mittelwert ± Standardabweichung oder N (%)**

Merkmale	CYP2C19*17-CC-Genotyp	CYP2C19*17-T-Allel
N	565	363
Alter (Jahre)	65 ± 13	65 ± 13
Frauen	141 (25%)	93 (26%)
Arterielle Hypertonie	416 (74%)	275 (76%)
Hypercholesterinämie	292 (52%)	190 (52%)
Raucher	207 (37%)	132 (36%)
Diabetes mellitus	122 (22%)	102 (28%)*
Mehr-Gefäß-KHK**	390 (69%)	279 (77%)*
Alte Bypass-Operation	29 (5%)	28 (8%)
Alter Myokardinfarkt	68 (12%)	61 (17%)*
Body mass index (kg/m ²)	27 ± 4	27 ± 4
Ejektionsfraktion (%)	48 ± 11	48 ± 12

*p < 0,05; Chi-Quadrat-Test oder Exakter Test nach Fisher

**KHK koronare Herzkrankheit

Tabelle 8. Verteilung der klinischen Merkmale auf die ABCB1-Genotypen
Mittelwert \pm Standardabweichung oder N (%)

Merkmale	ABCB1-CC-Genotyp	ABCB1-T-Allel
N	203	725
Anteriorer Myokardinfarkt	74 (36%)	284 (39%)
Gefäß		
RIVA**	73 (36%)	294 (41%)*
RCX**	53 (26%)	162 (22%)
RCA**	67 (33%)	238 (33%)
LCA**	8 (4%)	7 (1%)
Bypass-Operation	2 (2%)	24 (3%)
TIMI Flow vorher**		
0	94 (46%)	304 (42%)
1	18 (9%)	68 (9%)
2	43 (21%)	152 (21%)
3	48 (24%)	201 (28%)
Gefäßdicke (mm)	2,9 \pm 0,6	2,9 \pm 0,5
Lumendurchmesser vorher (mm)	0,5 \pm 0,5	0,5 \pm 0,5
Lumendurchmesser nachher (mm)	2,6 \pm 0,5	2,7 \pm 0,5
Stent	195 (96%)	710 (98%)
Medikation bei Entlassung		
Aspirin	196 (97%)	708 (98%)
Clopidogrel	196 (97%)	709 (98%)
Cumarine	15 (7%)	44 (6%)
Statin	187 (92%)	688 (95%)
ACE- oder AT-II-Inhibitor**	182 (90%)	690 (95%)*
Betablocker	193 (95%)	693 (96%)

*p < 0,05; Chi-Quadrat-Test oder Exakter Test nach Fisher

**RIVA Ramus interventricularis anterior, RCX Ramus circumflexus, RCA rechte Koronararterie, LCA linke Koronararterie, TIMI thrombolysis in myocardial infarction, ACE angiotensin-converting enzyme, AT-II Angiotensin-II-Rezeptor

Tabelle 9. Verteilung der klinischen Merkmale auf die CYP2C19*2-Genotypen
Mittelwert ± Standardabweichung oder N (%)

Merkmale	CYP2C19*2-GG-Genotyp	CYP2C19*2-A-Allel
N	680	248
Anteriorer Myokardinfarkt	264 (38%)	51 (21%)
Gefäß		
RIVA**	271 (40%)	96 (39%)
RCX**	164 (24%)	94 (38%)
RCA**	215 (32%)	90 (36%)
LCA**	11 (2%)	4 (2%)
Bypass-Operation	19 (3%)	7 (3%)
TIMI Flow vorher**		
0	287 (42%)	111 (45%)
1	66 (10%)	20 (8%)
2	139 (20%)	56 (23%)
3	188 (28%)	61 (25%)
Gefäßdicke (mm)	2,9 ± 0,5	2,9 ± 0,5
Lumendurchmesser vorher (mm)	0,5 ± 0,5	0,5 ± 0,5
Lumendurchmesser nachher (mm)	2,7 ± 0,5	2,7 ± 0,5
Stent	659 (97%)	246 (99%)*
Medikation bei Entlassung		
Aspirin	659 (97%)	245 (99%)
Clopidogrel	959 (97%)	246 (99%)*
Cumarine	46 (7%)	13 (5%)
Statin	637 (94%)	238 (96%)
ACE- oder AT-II-Inhibitor**	640 (94%)	232 (94%)
Betablocker	647 (95%)	239 (96%)

*p < 0,05; Chi-Quadrat-Test oder Exakter Test nach Fisher

**RIVA Ramus interventricularis anterior, RCX Ramus circumflexus, RCA rechte Koronararterie, LCA linke Koronararterie, TIMI thrombolysis in myocardial infarction, ACE angiotensin-converting enzyme, AT-II Angiotensin-II-Rezeptor

**Tabelle 10. Verteilung der klinischen Merkmale auf die CYP2C19*17-Genotypen
Mittelwert \pm Standardabweichung oder N (%)**

Merkmale	CYP2C19*17-CC-Genotyp	CYP2C19*17-T-Allel
N	565	363
Anteriorer Myokardinfarkt	231 (41%)	127 (35%)
Gefäß		
RIVA**	241 (43%)	126 (35%)*
RCX**	115 (20%)	100 (28%)
RCA**	190 (34%)	115 (32%)
LCA**	6 (1%)	9 (3%)
Bypass-Operation	13 (2%)	13 (4%)
TIMI Flow vorher**		
0	242 (43%)	156 (43%)
1	53 (9%)	33 (9%)
2	114 (20%)	81 (22%)
3	156 (28%)	93 (26%)
Gefäßdicke (mm)	2,9 \pm 0,5	2,9 \pm 0,5
Lumendurchmesser vorher (mm)	0,5 \pm 0,5	0,5 \pm 0,5
Lumendurchmesser nachher (mm)	2,7 \pm 0,5	2,6 \pm 0,5
Stent	556 (98%)	349 (96%)*
Medikation bei Entlassung		
Aspirin	552 (98%)	352 (97%)
Clopidogrel	552 (98%)	353 (97%)
Cumarine	32 (6%)	27 (7%)
Statin	536 (95%)	339 (93%)
ACE- oder AT-II-Inhibitor**	529 (94%)	343 (94%)
Betablocker	538 (95%)	348 (96%)

*p < 0,05; Chi-Quadrat-Test oder Exakter Test nach Fisher

**RIVA Ramus interventricularis anterior, RCX Ramus circumflexus, RCA rechte Koronararterie, LCA linke Koronararterie, TIMI thrombolysis in myocardial infarction, ACE angiotensin-converting enzyme, AT-II Angiotensin-II-Rezeptor

**Tabelle 11. Verteilung der abhängigen Variablen auf die ABCB1-Genpotypen
Mittelwert \pm Standardabweichung oder N (%)**

Variablen	ABCB1-CC-Genotyp	ABCB1-T-Allel
N	203	725
TLR*	42 (21%)	135 (19%)
Tod	17 (8%)	47 (6%)
Erneuter Myokardinfarkt	6 (3%)	16 (2%)
Tod oder Myokardinfarkt	21 (10%)	56 (8%)
MACE*	60 (30%)	179 (25%)
Schlaganfall	1 (0%)	7 (1%)
MACE oder Schlaganfall*	61 (30%)	183 (25%)
Stentthrombose	3 (1%)	7 (1%)
Infarktausdehnung (%)**	15 \pm 17	15 \pm 17

*TLR target lesion revascularization, MACE major adverse cardiovascular events (TLR, Tod oder Myokardinfarkt)

**Anteil des infarzierten Myokards am gesamten Myokard

**Tabelle 12. Verteilung der abhängigen Variablen auf die CYP2C19*2-Genpotypen
Mittelwert \pm Standardabweichung oder N (%)**

Variablen	CYP2C19*2-GG-Genotyp	CYP2C19*2-A-Allel
N	680	248
TLR*	128 (19%)	49 (20%)
Tod	54 (8%)	11 (4%)
Erneuter Myokardinfarkt	17 (3%)	5 (2%)
Tod oder Myokardinfarkt	63 (9%)	14 (6%)
MACE*	179 (26%)	60 (24%)
Schlaganfall	8 (1%)	0 (0%)
MACE oder Schlaganfall*	184 (27%)	60 (24%)
Stentthrombose	7 (1%)	3 (1%)
Infarktausdehnung (%)**	15 \pm 17	14 \pm 18

*TLR target lesion revascularization, MACE major adverse cardiovascular events (TLR, Tod oder Myokardinfarkt)

**Anteil des infarzierten Myokards am gesamten Myokard

**Tabelle 13. Verteilung der abhängigen Variablen auf die CYP2C19*17-Genotypen
Mittelwert \pm Standardabweichung oder N (%)**

Variablen	CYP2C19*17-CC-Genotyp	CYP2C19*17-T-Allel
N	565	363
TLR**	126 (22%)	51 (14%)*
Tod	34 (6%)	30 (8%)
Erneuter Myokardinfarkt	15 (3%)	7 (2%)
Tod oder Myokardinfarkt	42 (7%)	35 (10%)
MACE**	159 (28%)	80 (22%)*
Schlaganfall	5 (1%)	3 (1%)
MACE oder Schlaganfall**	162 (29%)	82 (23%)*
Stentthrombose	6 (1%)	4 (1%)
Infarktausdehnung (%)***	15 \pm 16	14 \pm 18

*p < 0,05; Chi-Quadrat-Test oder Exakter Test nach Fisher

**TLR target lesion revascularization, MACE major adverse cardiovascular events (TLR, Tod oder Myokardinfarkt)

***Anteil des infarzierten Myokards am gesamten Myokard

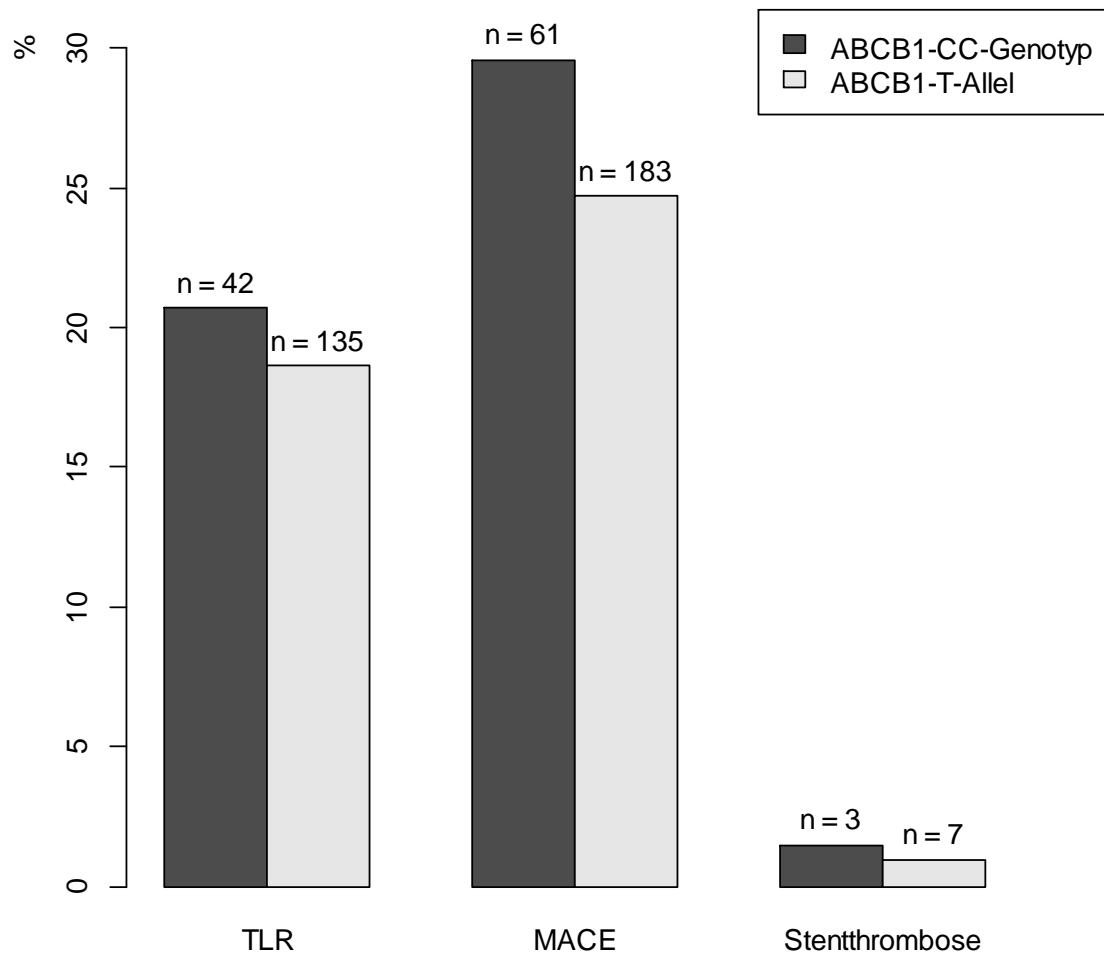


Abbildung 3. Verteilung der Variablen auf die ABCB1-Genotypen

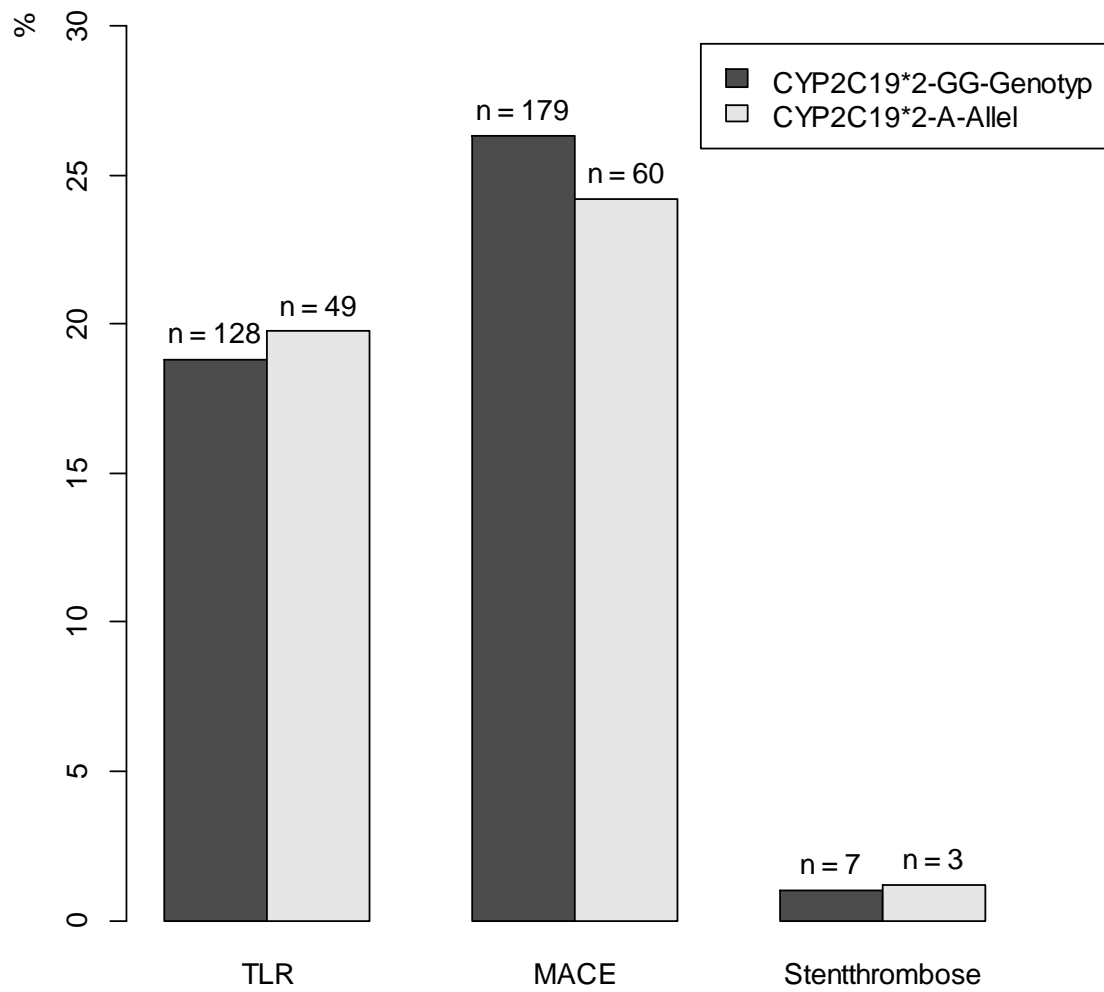


Abbildung 4. Verteilung der Variablen auf die CYP2C19*2-Genotypen

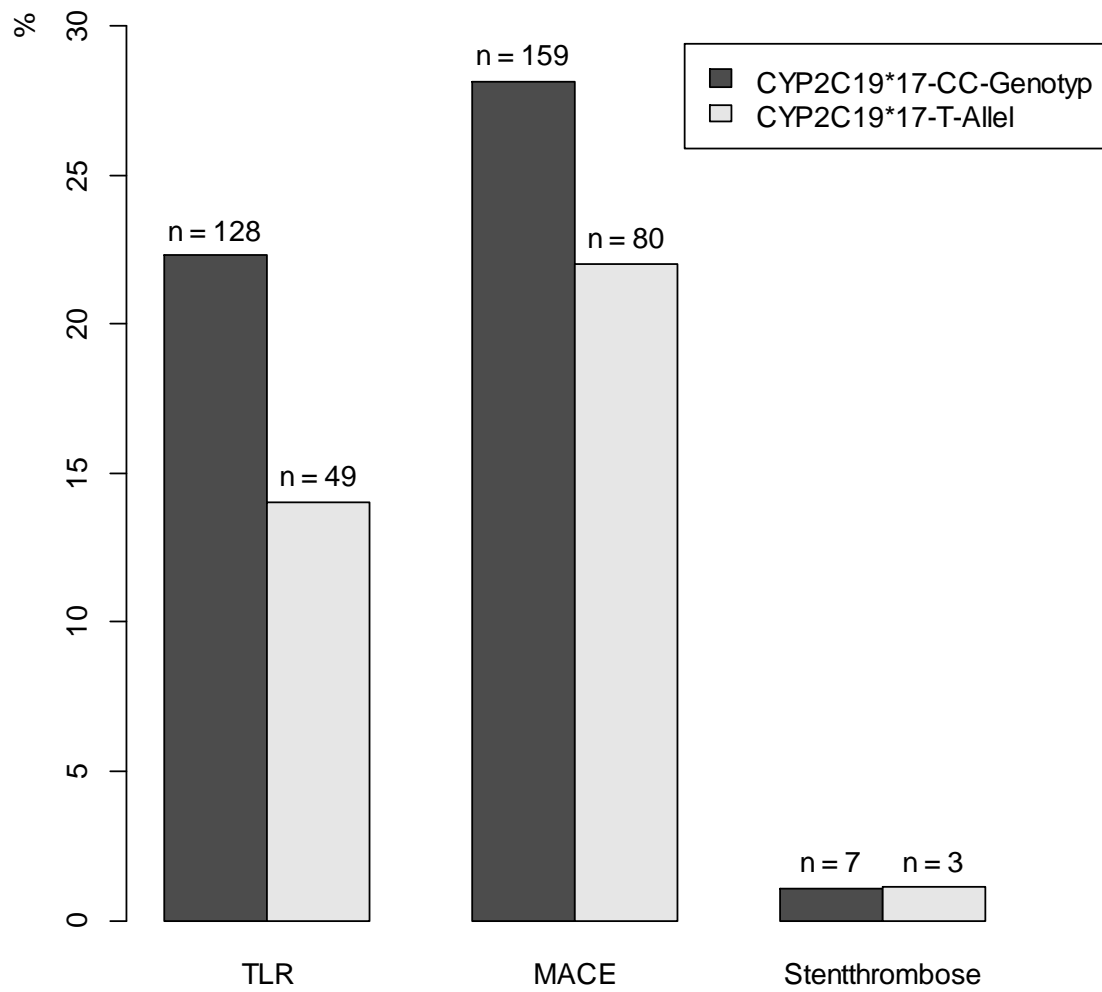


Abbildung 5. Verteilung der Variablen auf die CYP2C19*17-Genotypen

5. Diskussion

5.1. Zusammenfassung und Deutung der Ergebnisse

In dieser Studie konnten wir beobachten, dass Träger des CYP2C19*17-T-Allels ein reduziertes Revaskularisationsrisiko haben. Dieser Zusammenhang wurde bisher noch nicht beschrieben. Das Risiko der kombinierten Variablen aus TLR, Tod und erneutem Myokardinfarkt sowie TLR, Tod, erneutem Myokardinfarkt und Schlaganfall reduziert sich ebenfalls bei Trägern des *17-T-Allels. Die einzelnen Variablen Tod, erneuter Myokardinfarkt, Schlaganfall, Infarktausdehnung und Stentthrombose sind von den Genotypen des CYP2C19*17-Polymorphismus nicht abhängig. Im Hinblick auf die Polymorphismen CYP2C19*2 und ABCB1-3435C/T konnten wir keinen Zusammenhang mit den untersuchten Variablen nachweisen.

Der Zusammenhang zwischen CYP2C19*17-Genotyp und TLR könnte bedeuten, dass sich das *17-T-Allel protektiv auf die Effektivität der Koronarintervention auswirkt. Zur Beurteilung müssen die Risikofaktoren der Restenose in Betracht gezogen werden. Wenn sich ein Zusammenhang zwischen der Wirksamkeit von Clopidogrel auf die Thrombozyten-Funktion, die durch den Genotyp beeinflusst wird, und den Risikofaktoren der Restenose herstellen ließe, könnte unser Ergebnis biologisch plausibel erklärt werden.

Die erste Clopidogrel-Gabe erfolgt bei dem akuten Herzinfarkt unmittelbar vor der schnell durchzuführenden Koronarintervention. Die verstärkte Aktivierung von Clopidogrel bei Trägern des *17-T-Allels könnte sich deshalb insbesondere auf jene Risikofaktoren auswirken, die durch die Intervention bedingt sind (siehe Tabelle 1 auf Seite 8). Die unzureichende Expansion des Stents im Gefäß könnte in diesem Zusammenhang eine Rolle spielen. Wenn die erste Clopidogrel-Dosis besser wirkt, befindet sich weniger thrombotisches Material im Gefäß und der Stent lässt sich besser platzieren und expandieren. In der Folge haben diese Patienten dann weniger Restenosen und weniger erneute Interventionen.

5.2. Einordnung in die bestehende Datenlage

5.2.1. CYP2C19*2

Nachdem Mega et al. und Simon et al. im Jahr 2009 einen Zusammenhang von CYP2C19-loss of function-Allelen mit kardiovaskulären Ereignissen nach einem akuten Koronarsyndrom beziehungsweise einem akuten Myokardinfarkt beschrieben hatten, wurden von 2010 bis 2012 neben unserer Studie über dreißig weitere Studien und neun Meta-Analysen veröffentlicht, in denen dieser Zusammenhang untersucht wurde. Die Ergebnisse unserer Studie sind in fünf der Meta-Analysen enthalten.³⁵

Während in einigen Studien der Effekt bestätigt werden konnte, sahen andere Untersucher keinen Zusammenhang, wobei sich die Ergebnisse der Studien statistisch so verteilen, dass eine zufällige Entstehung dieser Unterschiede unwahrscheinlich ist.³⁶ Die unterschiedlichen Ergebnisse sind somit wahrscheinlich darin begründet, dass die Studien unterschiedlich aufgebaut sind. Wenn wir unser Ergebnis mit anderen Ergebnissen vergleichen wollen, müssen wir uns also auf die Unterschiede im Studienaufbau konzentrieren beziehungsweise jene Studien zum Vergleich heranziehen, die im Studienaufbau ähnlich sind. Entscheidend sind dabei die Einschlusskriterien der Stichprobe, die Definition und Wahl der abhängigen Variablen sowie die Einteilung der Genotypen in Gruppen.

Die Studie von Mega et al. aus dem Jahr 2009 ist unserer Studie im Aufbau sehr ähnlich. In dieser Studie wurden 1477 Patienten mit einem akuten Koronarsyndrom, die mit einer Koronarintervention behandelt wurden, untersucht. Die abhängigen Variablen beinhalteten Tod, erneuten Myokardinfarkt, Schlaganfall und Stentthrombose. Die Einteilung des CYP2C19*2-Polymorphismus in zwei Gruppen entsprach der Einteilung in unserer Studie, sodass eine Gruppe mit mindestens einem *2-A-Allel mit dem *2-GG-Genotyp verglichen wurde. Die wichtigsten Unterschiede im Studienaufbau liegen in der Wahl der Variablen. Im Gegensatz zu unserer Definition der Variable MACE definieren Mega et al. die kardiovaskulären Gesamtereignisse als Kombination aus Tod, Myokardinfarkt und Schlaganfall. Darüber hinaus wurde in unserer Studie die erneute Behandlung der Läsion (TLR) als zusätzliche Variable evaluiert. Dies war bei unserer Studie aufgrund der im Vergleich zu anderen Studien hohen angiographischen Nachverfolgungsrate möglich.

³⁵ Mega et al. 2009a; Simon et al. 2009; Sorich et al. 2013

³⁶ Sorich et al. 2013

Mega et al. fanden bei Patienten mit mindestens einem *2-A-Allel verglichen mit dem *2-GG-Genotyp ein erhöhtes Risiko kardiovaskulärer Gesamtereignisse von 11,7 Prozent im Vergleich zu 8,3 Prozent und der Stentthrombose von 2,7 Prozent im Vergleich zu 0,8 Prozent. Beide Zusammenhänge können wir in unserer Studie nicht nachvollziehen.

Dass wir den möglichen Effekt des Genotyps auf die kardiovaskulären Gesamtereignisse nicht sehen, könnte neben der unterschiedlichen Definition der Variable daran liegen, dass wir ein gutes postinterventionelles Ergebnis als Einschlusskriterium gewählt haben. Es ist möglich, dass sich der Effekt des *2-A-Allels auf die kardiovaskulären Gesamtereignisse insbesondere bei jenen Patienten manifestiert, die aufgrund eines schlechten postinterventionellen Ergebnisses ein erhöhtes Risiko erneuter Ereignisse haben. Diese Patienten werden in unserer Studie nicht berücksichtigt.

Dass wir den möglichen Zusammenhang des CYP2C19*2-A-Allels mit der Häufigkeit von Stentthrombosen nicht nachweisen können, kann an der geringeren Fallzahl in unserer Studie liegen. Bei insgesamt nur zehn Stentthrombosen in unserer Stichprobe ist die Aussagekraft der Statistik möglicherweise nicht ausreichend, um einen Unterschied in der Verteilung zwischen den Genotyp-Gruppen zu detektieren. Das im internationalen Vergleich niedrige Stentthrombose-Risiko von 1 Prozent in unserer Stichprobe könnte an der hohen initialen Clopidogrel-Dosis von 600 mg oder der konsequenten Bereitstellung der dualen antithrombozytären Therapie in den ersten Tagen nach der Koronarintervention liegen, während diese Praxis für den untersuchten Zeitraum weltweit nicht einheitlich war.

In einer Meta-Analyse von Holmes et al., die auch unsere Ergebnisse berücksichtigt, wird hervorgehoben, dass Studien mit kleinen Fallzahlen verglichen mit großen Studien tendenziell einen größeren Effekt der CYP2C19-Polymorphismen auf kardiovaskuläre Ereignisse nachweisen. Dies könnte an einer statistischen Verzerrung liegen, die dadurch entsteht, dass kleine Studien eher dann veröffentlicht werden, wenn sie einen Effekt zeigen, wohingegen größere Studien auch bei fehlenden Effekten publiziert werden. In einer Auswertung, die ausschließlich Studien mit mehr als zweihundert kardiovaskulären Ereignissen einschloss, konnten Holmes et al. keinen signifikanten Effekt des CYP2C19*2-Genotyps auf kardiovaskuläre Ereignisse nachweisen.³⁷

Nach Sorich et al. ist bei der Beurteilung von Meta-Analysen, die sich mit dem Effekt des CYP2C19-Genotyps auf kardiovaskuläre Ereignisse befassen, der unterschiedliche Aufbau der primären Studien ein grundsätzliches Problem. Wenn Studien mit unterschiedlichen Einschlusskriterien und Variablen in einer Meta-Analyse zusammen ausgewertet werden,

³⁷ M. V. Holmes et al. 2011

wird vorausgesetzt, dass der mögliche Effekt des CYP2C19-Genotyps im Hinblick auf die verschiedenen Stichproben und Variablen gleichmäßig ausgeprägt ist. Die Thrombozytenaktivierung ist jedoch bei Patienten mit einem ST-Hebungsinfarkt am höchsten. Somit ist auch die Wirkung von Clopidogrel im Hinblick auf verschiedene kardiovaskuläre Ereignisse unterschiedlich stark ausgeprägt.³⁸ Wenn sich der Effekt des CYP2C19-Genotyps nur unter Berücksichtigung bestimmter Einschlusskriterien und bei bestimmten Variablen zeigt, wird er sich zwar in den einzelnen Studien, möglicherweise aber nicht in den Meta-Analysen nachweisen lassen.

Obwohl wir in unserer Stichprobe keinen Effekt des CYP2C19*2-Polymorphismus auf die kardiovaskulären Ereignisse sehen, ist dadurch nicht bewiesen, dass tatsächlich kein Effekt besteht. Insbesondere unter Berücksichtigung der Studie von Mega et al. kann ein Zusammenhang zwischen CYP2C19*2-Genotyp und kardiovaskulären Ereignissen nicht ausgeschlossen werden.

5.2.2. CYP2C19*17

Der von uns gefundene Zusammenhang zwischen CYP2C19*17-T-Allel und Reinterventionsrate (TLR) wurde bisher noch nicht untersucht.

In einer Studie von Sibbing et al. an Patienten, die mit einer Koronarintervention behandelt worden waren, wurde ein Zusammenhang des *17-T-Allels mit einem erhöhten Risiko von Blutungen gefunden, was sich aufgrund der verstärkten Wirkung von Clopidogrel auf die Thrombozyten bei diesen Patienten biologisch plausibel erklären lässt.³⁹ Darüber hinaus konnten Sibbing et al. keinen Einfluss des *17-T-Allels auf die Häufigkeit von Stentthrombosen nachweisen. Simon et al. fanden keinen Einfluss des CYP2C19*17-Genotyps auf die kardiovaskulären Gesamtereignisse unter Berücksichtigung der Variablen Tod, Myokardinfarkt und Schlaganfall, wobei auch Patienten mit einem Myokardinfarkt, die nicht mit einer Intervention behandelt worden waren, eingeschlossen wurden.⁴⁰

In unserer Studie ist neben der TLR keine weitere abhängige Variable mit dem *17-T-Allel assoziiert. Dies lässt sich zum Teil erklären, wenn man davon ausgeht, dass die verstärkte Wirkung von Clopidogrel auf die Thrombozyten-Funktion bei Patienten mit dem *17-T-Allel vor allem bei der ersten Clopidogrel-Gabe eine Rolle spielt. Wenn die initiale Clopidogrel-Dosis besser wirkt, befindet sich weniger thrombotisches Material im Gefäß, wodurch der

³⁸ Sorich et al. 2013

³⁹ Sibbing et al. 2010

⁴⁰ Simon et al. 2009

Stent während der Intervention weiter expandiert werden kann. Dadurch sinkt das Restenose-Risiko im Verlauf.

Der fehlende Einfluss des *17-T-Allels auf die Mortalität in unserer Studie könnte damit zusammenhängen, dass bei Patienten mit dem *17-T-Allel das Blutungsrisiko höher ist und sich somit das niedrigere TLR-Risiko und das höhere Blutungsrisiko in ihrem Einfluss auf die Mortalität gegenseitig ausgleichen.

Die Aussagekraft unserer Statistik könnte dadurch beeinflusst werden, dass wir die Kontroll-Angiografie als Einschlusskriterium gewählt haben. Die Kontroll-Angiografie ist keine Routineuntersuchung, sondern wird vor allem bei erneuten Symptomen durchgeführt. Wenn Patienten erneut Symptome entwickeln, haben sie verglichen mit symptomfreien Patienten ein höheres Restenose-Risiko, sodass die Kontroll-Angiografie als Einschlusskriterium für eine insgesamt erhöhte Fallzahl von Restenosen in unserer Stichprobe verantwortlich sein könnte. Da nur etwa die Hälfte aller angiografisch nachweisbaren Restenosen symptomatisch werden, besteht auf der anderen Seite auch die Möglichkeit, dass sich symptomfreie Patienten einer Kontroll-Angiografie unterziehen und dadurch asymptotische Restenosen auffallen und behandelt werden, die ohne Nachsorge-Untersuchung nicht aufgefallen wären.⁴¹ Durch die hohe Fallzahl von Restenosen in unserer Studie verstärkt sich die statistische Aussagekraft im Hinblick auf die TLR. Somit ist denkbar, dass der Zusammenhang zwischen CYP2C19*17-T-Allel und TLR aufgrund der hohen Fallzahl statistisch signifikant wurde. Wichtig ist, dass das Einschlusskriterium nur die statistische Aussagekraft und nicht den Effekt selber beeinflussen sollte.

5.2.3. ABCB1-3435C/T

Simon et al. fanden mehr kardiovaskuläre Gesamtereignisse unter Berücksichtigung der Variablen Tod, Myokardinfarkt und Schlaganfall bei Patienten mit dem ABCB1-3435TT-Genotyp verglichen mit dem homozygoten CC-Genotyp.⁴² Mega et al. konnten mehr kardiovaskuläre Gesamtereignisse bei homozygoten Trägern des T-Allels verglichen mit allen Trägern des C-Allels nachweisen.⁴³ In diesen Studien wurden ebenfalls Patienten mit einem akuten Myokardinfarkt beziehungsweise einem akuten Koronarsyndrom untersucht, wobei die Patienten in der Studie von Simon et al. nur zum Teil mit einer Koronarintervention behandelt worden waren.

⁴¹ Cutlip et al. 2002

⁴² Simon et al. 2009

⁴³ Mega et al. 2010

Diese Ergebnisse können wir in unserer Studie nicht beobachten. Dabei ist hervorzuheben, dass sich unsere Studie in ihrem Aufbau von den genannten Studien unterscheidet. Wir haben das ABCB1-3435T-Allel als Risikoallel aufgefasst und alle Patienten mit mindestens einem T-Allel mit den homozygoten Trägern des C-Allels verglichen. Ein Vergleich mit den Studien von Simon et al. und Mega et al. ist deshalb nur eingeschränkt möglich. Obwohl wir in unserer Statistik keinen Effekt des ABCB1-3435C/T-Polymorphismus nachweisen können, kann unter Berücksichtigung der Studien von Simon et al. und Mega et al. nicht ausgeschlossen werden, dass sich ein Effekt nur bei homozygoten Trägern des T-Allels zeigt.

5.3. Verteidigung

5.3.1. Ist das Ergebnis zufällig falsch positiv?

In unserer Studie wurden insgesamt vierzig Variablen an drei Polymorphismen getestet, sodass eine hohe Wahrscheinlichkeit besteht, dass einige Assoziationen aufgrund von multiplem Testen zufällig entstanden sind. Der Zusammenhang zwischen *17-T-Allel und TLR hat einen p-Wert von 0,002. Dieser Wert hält der Bonferroni-Holm-Korrektur, die eine Beurteilung der Ergebnisse im Hinblick auf eine zufällige Abweichung ermöglicht, nicht stand. Die Bonferroni-Holm-Korrektur könnte also dahingehend gewertet werden, dass das Ergebnis zufällig entstanden ist, muss jedoch bei insgesamt einhundertzwanzig Tests kritisch gewertet werden. Damit eine Assoziation bei einhundertzwanzig Tests der Bonferroni-Holm-Korrektur standhalten kann, müsste der p-Wert 0,0004 oder weniger betragen. Darüber hinaus war die TLR die primäre abhängige Variable unserer Studie, sodass die Bonferroni-Holm-Korrektur nur eingeschränkt angewendet werden muss.

Obwohl nicht ausgeschlossen werden kann, dass der Zusammenhang zwischen *17-T-Allel und TLR zufällig entstanden ist, spricht die biologische Plausibilität des Zusammenhangs für einen echten Effekt.

5.3.2. Wird das Ergebnis durch einen statistischen Störfaktor beeinflusst?

Die Analyse der Basismerkmale ergab, dass zehn Variablen zwischen den Genotyp-Gruppen ungleich verteilt sind. Da in unserer Studie vierzig Variablen an drei Polymorphismen getestet wurden, besteht eine hohe Wahrscheinlichkeit, dass einige dieser ungleichen Verteilungen

aufgrund von multiplem Testen zufällig entstanden sind. Es ist deshalb unwahrscheinlich, dass ein echter Zusammenhang zwischen den Basismerkmalen und den Genotypen besteht.

Um zu beurteilen, ob die ungleich verteilten Basismerkmale als statistische Störfaktoren in Betracht kommen, müssen die tatsächliche Größe der ungleichen Verteilung und die biologische Plausibilität eines möglichen Zusammenhanges mit der TLR diskutiert werden. Da wir keine Assoziation der ABCB1- und CYP2C19*2-Genotypen mit den abhängigen Variablen gefunden haben, werden als mögliche Störfaktoren nur jene Variablen diskutiert, die zwischen den Genotyp-Gruppen des CYP2C19*17-Polymorphismus ungleich verteilt waren. Darüber hinaus werden gesicherte Restenose-Risikofaktoren diskutiert, die wir in unserer Analyse nicht berücksichtigt haben.

In der Genotyp-Gruppe mit dem *17-T-Allel haben 17 Prozent der Patienten einen alten Myokardinfarkt in der Anamnese im Vergleich zu 12 Prozent in der Gruppe mit dem *17-CC-Genotyp. Der Myokardinfarkt in der Anamnese ist kein gesicherter Restenose-Risikofaktor. Trotzdem lässt sich ein möglicher Zusammenhang zwischen altem Myokardinfarkt und TLR postulieren. Wenn Patienten die Symptome eines Myokardinfarktes bereits kennen, wäre denkbar, dass sich die Zeit vom Symptombeginn bis zur Therapie verkürzt, wodurch die Koronarintervention effektiver ablaufen kann. Außerdem wäre möglich, dass bei Patienten mit einem alten Myokardinfarkt die Compliance besser ist. Diese Erklärungsversuche tauchen jedoch in der wissenschaftlichen Literatur nicht auf, sodass ein Einfluss des alten Myokardinfarktes in der Anamnese als statistischer Störfaktor zwar möglich, ein klinisch signifikanter Zusammenhang aber unwahrscheinlich ist.

Die Lokalisation der Gefäß-Läsion ist zwischen den Genotyp-Gruppen ungleich verteilt. In der Gruppe mit dem *17-T-Allel ist der Ramus interventricularis anterior mit 35 Prozent im Vergleich zu 43 Prozent seltener betroffen. Hirshfeld et al. haben die Lokalisation im Ramus interventricularis anterior als Risikofaktor der Restenose beschrieben, wobei nur Patienten untersucht wurden, die mit einer Ballon-Angioplastie ohne Stent-Implantation behandelt worden waren.⁴⁴ Dieser Zusammenhang muss deshalb im Hinblick auf unsere Studie kritisch gewertet werden. Trotzdem ist es möglich, dass die Lokalisation im Ramus interventricularis anterior unser Ergebnis als statistischer Störfaktor beeinflusst.

In der Genotyp-Gruppe mit mindestens einem *17-T-Allel sind 28 Prozent der Patienten Diabetiker im Vergleich zu 22 Prozent in der Gruppe mit dem *17-CC-Genotyp. Der Diabetes mellitus erhöht das Restenose-Risiko und könnte deshalb als statistischer Störfaktor den Effekt des *17-T-Allels auf die TLR allenfalls abschwächen. Die Basismerkmale Mehr-

⁴⁴ Hirshfeld et al. 1991

Gefäß-KHK und Stent-Implantation sind ebenfalls in jener Richtung ungleich verteilt, dass sie den Effekt allenfalls abmildern könnten.⁴⁵

Der Stent-Typ ist ein möglicher statistischer Störfaktor. Die Implantation von Medikamenten-beschichteten Stents senkt im Vergleich zu konventionellen Stents das Restenose-Risiko.⁴⁶

Die Verteilung der verschiedenen Stent-Typen war in unserer Studie jedoch nicht unterschiedlich, wobei über 90 Prozent der Patientin mit einem Medikamenten-beschichteten Stent behandelt wurden. Die Implantation mehrerer Stents, die Stent-Fraktur und die Durchführung eines intravaskulären Ultraschalls (IVUS) während der Intervention sind Faktoren, die wir nicht in die Basismerkmale mit aufgenommen haben. Der IVUS kann das Risiko einer unzureichenden Expansion des Stents während der Koronarintervention senken, wurde in unserer Stichprobe aber nicht routinemäßig durchgeführt. Weitere Risikofaktoren, die als statistische Störfaktoren in Frage kommen und von uns nicht berücksichtigt wurden, sind die CRP- und PAI-1-Werte im Blut, verschiedene Genpolymorphismen, die in der Pathophysiologie der Restenose eine Rolle spielen, die ACC/AHA-Typ-C-Läsion, der chronische Gefäßverschluss und die Länge der Gefäß-Läsion.⁴⁷

Darüber hinaus haben wir die Gabe von Protonenpumpeninhibitoren nicht berücksichtigt. Die gleichzeitige Therapie mit Protonenpumpeninhibitoren und Clopidogrel könnte das Ergebnis als statistischer Störfaktor beeinflussen, weil die Medikamente zum Teil von den gleichen Enzymen in der Leber umgesetzt werden und deshalb eine Medikamenten-Interaktion möglich ist. In mehreren Studien wurde eine abgeschwächte Wirkung von Clopidogrel auf die Thrombozyten-Funktion bei der gleichzeitigen Gabe von Protonenpumpeninhibitoren nachgewiesen. In der bisher größten klinischen Studie konnte jedoch kein klinisch signifikanter Effekt der gleichzeitigen Gabe von Protonenpumpeninhibitoren und Clopidogrel auf die kardiovaskulären Ereignisse beobachtet werden.⁴⁸

5.3.3. Limitationen

Unsere Einteilung der Genotypen in zwei Gruppen je Polymorphismus limitiert die Vergleichsmöglichkeiten mit anderen Studien. Dies war aber aufgrund der Fallzahlen in unserer Studie notwendig.

⁴⁵ Jukema et al. 2012; M. S. Kim & Dean 2011

⁴⁶ Dangas et al. 2010

⁴⁷ Jukema et al. 2012; M. S. Kim & Dean 2011

⁴⁸ Abraham et al. 2010; Bhatt et al. 2010; Gilard et al. 2008; O'Donoghue et al. 2009

Die Kontroll-Angiografie als Einschlusskriterium führt in unserer Stichprobe zu einer höheren Fallzahl an Restenosen und erhöht damit die Aussagekraft der Statistik im Hinblick auf die TLR. Die Effektgröße des Zusammenhangs zwischen *17-T-Allel und TLR wird dadurch nicht beeinflusst. Allerdings lässt sich der von uns gefundene Zusammenhang aufgrund des Einschlusskriteriums nicht ohne weiteres von der Stichprobe auf eine allgemeinere Population übertragen, wenn die Population alle Myokardinfarkt-Patienten, die mit einer Koronarintervention behandelt werden, umfassen soll.

Der Beobachtungszeitraum von einem Jahr wurde gewährleistet, indem bei allen Patienten nach einem Jahr entweder ein Telefon-Interview durchgeführt oder eine Wiedervorstellung veranlasst wurde. Dabei ist möglich, dass Ereignisse, die innerhalb des Beobachtungszeitraums an anderen Kliniken behandelt wurden, von den Patienten verschwiegen wurden. Da bei allen Patienten eine Kontroll-Angiografie durchgeführt wurde, gehen wir jedoch von einer engen Bindung der Patienten an unsere Kliniken aus.

Da sich bei Medikamenten-beschichteten Stents eine Restenose auch noch im späteren Verlauf nach über einem Jahr entwickeln kann, wird dieses seltene Ereignis in unserer Studie nicht berücksichtigt.⁴⁹

5.4. Klinische Konsequenzen

Diese Studie hat das Ziel, die wissenschaftliche Grundlage für eine individualisierte Therapie des akuten Myokardinfarktes zu erweitern. Wenn die Risikofaktoren für kardiovaskuläre Ereignisse nach einem akuten Myokardinfarkt bekannt wären, könnte die Therapie bei den betroffenen Patienten individuell angepasst werden, um erneute Ereignisse zu vermeiden.

Eine individuelle Anpassung der Therapie wäre dahingehend möglich, dass die Therapie von Clopidogrel auf ein neueres Medikament umgestellt werden könnte. Dabei kommen die Nachfolge-Medikamente Prasugrel und Ticagrelor in Frage. Prasugrel hemmt ebenfalls irreversibel den P2Y₁₂-Rezeptor und erfordert ebenso wie Clopidogrel eine Aktivierung durch die Enzyme der Biotransformation in der Leber. Die Wirkung von Prasugrel ist jedoch nicht von Polymorphismen der entsprechenden Gene abhängig. Im Vergleich zu Clopidogrel reduziert Prasugrel das Risiko kardiovaskulärer Gesamtereignisse, führt jedoch auch zu mehr Blutungen.⁵⁰ Ticagrelor hemmt im Gegensatz zu Clopidogrel und Prasugrel den P2Y₁₂-Rezeptor reversibel und wird in einer aktiven Form gegeben. Verglichen mit Clopidogrel

⁴⁹ Jukema et al. 2012

⁵⁰ Mega et al. 2009b; Wiviott et al. 2007

reduziert Ticagrelor die kardiovaskulären Gesamtereignisse und die Mortalität, wobei das Blutungsrisiko leicht aber nicht signifikant steigt.⁵¹ Obwohl Prasugrel und Ticagrelor als Alternativen zu Clopidogrel empfohlen werden, wird Clopidogrel aufgrund der Kosteneffizienz und der geringeren Blutungsraten entweder initial oder durch Umstellung im ambulanten Bereich weiterhin gegeben.

Um die Patienten zu erfassen, bei denen Clopidogrel nicht ausreichend wirkt, sind zwei Strategien möglich. Zum einen kann die Thrombozyten-Funktion der Patienten im Labor gemessen werden. Die dafür am häufigsten verwendeten Testverfahren sind die ADP-induzierte Thrombozyten-Aggregometrie, der Verify Now P2Y12 assay und die VASP Phosphorylierung. Dabei können alle Patienten erfasst werden, die unter der Therapie mit Clopidogrel keine ausreichende Thrombozyten-Funktionshemmung aufweisen. Ein Nachteil dieser Strategie ist jedoch, dass aufgrund der verschiedenen Testverfahren bisher nicht einheitlich definiert werden konnte, ab wann die Thrombozyten-Funktionshemmung nicht ausreicht und ein Patient als Risikopatient eingestuft werden sollte. Eine standardisierte und evidenzbasierte Anpassung der Therapie in Abhängigkeit von der Thrombozyten-Funktion ist deshalb bisher nicht möglich.⁵²

Die zweite Strategie ist die Genotypisierung von Patienten. Diese Strategie hat gegenüber den Thrombozyten-Funktionstests den Vorteil, dass eine Einteilung der Patienten in definierte Kategorien je nach Genotyp möglich ist. Dabei werden jedoch nur jene Patienten erfasst, bei denen die variable Wirkung von Clopidogrel durch den Genotyp verursacht wird, während andere mögliche Ursachen nicht berücksichtigt werden. Die Umstellung der Therapie von Clopidogrel auf Prasugrel oder Ticagrelor in Abhängigkeit vom Genotyp wird zwar von Experten empfohlen, wurde bisher jedoch noch nicht randomisiert untersucht.⁵³

Die Einordnung unserer Ergebnisse in die bestehende Datenlage hat gezeigt, dass ein Vergleich mit anderen Studien aufgrund des unterschiedlichen Aufbaus der Studien nur eingeschränkt möglich ist und die Ergebnisse unserer Studie mit anderen Ergebnissen zum Teil im Widerspruch stehen. Obwohl unsere Ergebnisse einen Zusammenhang des CYP2C19*17-Polymorphismus mit dem klinischen Ereignis einer erneuten Koronarintervention zeigen, kann eine individuelle Anpassung der Therapie in Abhängigkeit vom Genotyp aufgrund der fehlenden Assoziation mit harten klinischen Variablen wie Tod oder Myokardinfarkt aktuell nicht allgemein empfohlen werden. Diesbezüglich sind weitere Studien notwendig.

⁵¹ Wallentin et al. 2009

⁵² D. R. Holmes, Jr. et al. 2010; Trenk et al. 2012

⁵³ Scott et al. 2013; Trenk et al. 2012

6. Zusammenfassung

Die Wirkung von Clopidogrel auf die Thrombozyten-Funktion ist von Polymorphismen der Gene CYP2C19 und ABCB1 abhängig, weil sich diese Gene auf den Stoffwechsel von Clopidogrel auswirken. In Voruntersuchungen von Mega et al. und Simon et al. waren diese Polymorphismen auch mit kardiovaskulären Ereignissen nach einem akuten Myokardinfarkt beziehungsweise einem akuten Koronarsyndrom assoziiert, was auf eine verminderte Wirkung von Clopidogrel bei den betroffenen Patienten zurückgeführt wird.⁵⁴

Wir wollten in dieser Studie eine mögliche Abhängigkeit der Variablen Reintervention der Zielläsion (target lesion revascularization, TLR), Stentthrombose, Tod, Myokardinfarkt, Schlaganfall und Infarktausdehnung von den Polymorphismen ABCB1-3435C/T, CYP2C19*2 und CYP2C19*17 untersuchen. Wenn die Risikofaktoren für kardiovaskuläre Ereignisse nach einem akuten Myokardinfarkt bekannt wären, ließe sich die medikamentöse Therapie bei den betroffenen Patienten dahingehend individuell anpassen, dass die Therapie von Clopidogrel auf die neuere Medikament Prasugrel oder Ticagrelor umgestellt werden könnte.

Wir haben eine Stichprobe, bestehend aus 928 Myokardinfarkt-Patienten, die mit einer Koronarintervention und einer initialen Clopidogrel-Gabe behandelt worden waren, untersucht. Der Beobachtungszeitraum betrug 1 Jahr. Die Genotypen der Patienten wurden mithilfe einer quantitativen real-time PCR bestimmt.

Wir haben herausgefunden, dass das TLR-Risiko vom Genotyp des CYP2C19*17-Polymorphismus abhängig ist. Bei Trägern des *17-T-Allels beträgt das Risiko 14 Prozent im Vergleich zu 22 Prozent bei Patienten mit dem *17-CC-Genotyp ($p = 0,002$). Dieser Zusammenhang wurde bisher noch nicht beschrieben. Der Effekt lässt sich über eine verstärkte Wirkung der initialen Clopidogrel-Gabe vor der Koronarintervention biologisch plausibel erklären. Wenn die erste Clopidogrel-Dosis besser wirkt, befindet sich weniger thrombotisches Material im Gefäß, wodurch der Stent während der Intervention besser platziert und expandiert werden kann. Dadurch sinkt das Restenose-Risiko.

Da wir in unserer Studie insgesamt einhundertzwanzig statistische Tests durchgeführt haben, könnte der Zusammenhang zwischen *17-T-Allel und TLR aufgrund von multiplem Testen auch zufällig entstanden sein. Die biologische Plausibilität des Zusammenhangs spricht jedoch für einen echten Effekt.

⁵⁴ Mega et al. 2009a; Simon et al. 2009

In Bezug auf die Polymorphismen CYP2C19*2 und ABCB1-3435C/T konnten wir keinen Zusammenhang mit den abhängigen Variablen nachweisen.

Die Einordnung in die bestehende Datenlage hat gezeigt, dass ein Vergleich mit anderen Studien aufgrund des unterschiedlichen Aufbaus der Studien nur eingeschränkt möglich ist und unsere Ergebnisse mit anderen Ergebnissen zum Teil im Widerspruch stehen. Die klinische Signifikanz der Ergebnisse lässt sich deshalb nicht sicher beurteilen. Die Ergebnisse unserer Studie wurden in fünf von den neun bisher publizierten Meta-Analysen berücksichtigt.

Obwohl unsere Ergebnisse einen Zusammenhang des CYP2C19*17-Polymorphismus mit dem klinischen Ereignis einer erneuten Koronarintervention zeigen, kann eine individuelle Anpassung der Therapie in Abhängigkeit vom Genotyp aufgrund der fehlenden Assoziation mit harten klinischen Variablen wie Tod oder Myokardinfarkt aktuell nicht allgemein empfohlen werden. Diesbezüglich sind weitere Studien notwendig.

Literaturverzeichnis

Abraham, N. S., Hlatky M. A., Antman E. M., Bhatt D. L., Bjorkman D. J., Clark C. B., Furberg C. D., Johnson D. A., Kahi C. J., Laine L., Mahaffey K. W., Quigley E. M., Scheiman J., Sperling L. S., Tomaselli G. F., & Acgf/Acg/Aha. ACCF/ACG/AHA 2010 Expert Consensus Document on the concomitant use of proton pump inhibitors and thienopyridines: a focused update of the ACCF/ACG/AHA 2008 expert consensus document on reducing the gastrointestinal risks of antiplatelet therapy and NSAID use: a report of the American College of Cardiology Foundation Task Force on Expert Consensus Documents. *Circulation* 122, 2619-2633 (2010).

Berg, J.M., Tymoczko J.L., Stryer L., & Gatto G.J. Jr. *Biochemistry* (7. Auflage). W.H. Freeman and Company, Houndmills, Basingstoke, 2012.

Bhatt, D. L., Cryer B. L., Contant C. F., Cohen M., Lanos A., Schnitzer T. J., Shook T. L., Lapuerta P., Goldsmith M. A., Laine L., Scirica B. M., Murphy S. A., Cannon C. P., & Investigators Cogent. Clopidogrel with or without omeprazole in coronary artery disease. *N Engl J Med* 363, 1909-1917 (2010).

Chesebro, J. H., Knatterud G., Roberts R., Borer J., Cohen L. S., Dalen J., Dodge H. T., Francis C. K., Hillis D., Ludbrook P., & et al. Thrombolysis in Myocardial Infarction (TIMI) Trial, Phase I: A comparison between intravenous tissue plasminogen activator and intravenous streptokinase. Clinical findings through hospital discharge. *Circulation* 76, 142-154 (1987).

Cutlip, D. E., Chauhan M. S., Baim D. S., Ho K. K., Popma J. J., Carrozza J. P., Cohen D. J., & Kuntz R. E. Clinical restenosis after coronary stenting: perspectives from multicenter clinical trials. *J Am Coll Cardiol* 40, 2082-2089 (2002).

Cutlip, D. E., Windecker S., Mehran R., Boam A., Cohen D. J., van Es G. A., Steg P. G., Morel M. A., Mauri L., Vranckx P., McFadden E., Lansky A., Hamon M., Krucoff M. W., Serruys P. W., & Academic Research Consortium. Clinical end points in coronary stent trials: a case for standardized definitions. *Circulation* 115, 2344-2351 (2007).

Dangas, G. D., Claessen B. E., Caixeta A., Sanidas E. A., Mintz G. S., & Mehran R. In-stent restenosis in the drug-eluting stent era. *J Am Coll Cardiol* 56, 1897-1907 (2010).

Fischman, D. L., Leon M. B., Baim D. S., Schatz R. A., Savage M. P., Penn I., Detre K., Veltri L., Ricci D., Nobuyoshi M., & 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* 331, 496-501 (1994).

Gilard, M., Arnaud B., Cornily J. C., Le Gal G., Lacut K., Le Calvez G., Mansourati J., Mottier D., Abgrall J. F., & Bosch J. Influence of omeprazole on the antiplatelet action of clopidogrel associated with aspirin: the randomized, double-blind OCLA (Omeprazole CLopidogrel Aspirin) study. *J Am Coll Cardiol* 51, 256-260 (2008).

Hirshfeld, J. W., Jr., Schwartz J. S., Jugo R., MacDonald R. G., Goldberg S., Savage M. P., Bass T. A., Vetrovec G., Cowley M., Taussig A. S., & et al. Restenosis after coronary angioplasty: a multivariate statistical model to relate lesion and procedure variables to restenosis. The M-HEART Investigators. *J Am Coll Cardiol* 18, 647-656 (1991).

Hoffmeyer, S., Burk O., von Richter O., Arnold H. P., Brockmoller J., John A., Cascorbi I., Gerloff T., Roots I., Eichelbaum M., & Brinkmann U. Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 3473-3478 (2000).

Holland, P. M., Abramson R. D., Watson R., & Gelfand D. H. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 7276-7280 (1991).

Holmes, D. R., Jr., Dehmer G. J., Kaul S., Leifer D., O'Gara P. T., & Stein C. M. ACCF/AHA Clopidogrel clinical alert: approaches to the FDA "boxed warning": a report of the American College of Cardiology Foundation Task Force on Clinical Expert Consensus Documents and the American Heart Association. *Circulation* 122, 537-557 (2010).

Holmes, M. V., Perel P., Shah T., Hingorani A. D., & Casas J. P. CYP2C19 genotype, clopidogrel metabolism, platelet function, and cardiovascular events: a systematic review and meta-analysis. *JAMA* 306, 2704-2714 (2011).

Jukema, J. W., Verschuren J. J., Ahmed T. A., & Quax P. H. Restenosis after PCI. Part 1: pathophysiology and risk factors. *Nat Rev Cardiol* 9, 53-62 (2012).

Kazui, M., Nishiya Y., Ishizuka T., Hagihara K., Farid N. A., Okazaki O., Ikeda T., & Kurihara A. 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 (2010).

Kim, K. A., Park P. W., Hong S. J., & Park J. Y. The effect of CYP2C19 polymorphism on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of clopidogrel: a possible mechanism for clopidogrel resistance. *Clin Pharmacol Ther* 84, 236-242 (2008).

Kim, M. S., & Dean L. S. In-stent restenosis. *Cardiovasc Ther* 29, 190-198 (2011).

Kimchi-Sarfaty, C., Oh J. M., Kim I. W., Sauna Z. E., Calcagno A. M., Ambudkar S. V., & Gottesman M. M. A "silent" polymorphism in the MDR1 gene changes substrate specificity. *Science* 315, 525-528 (2007).

Lagerqvist, B., Carlsson J., Frobert O., Lindback J., Schersten F., Stenestrand U., James S. K., Swedish Coronary Angiography, & Angioplasty Registry Study Group. Stent thrombosis in Sweden: a report from the Swedish Coronary Angiography and Angioplasty Registry. *Circ Cardiovasc Interv* 2, 401-408 (2009).

Livak, K. J. Allelic discrimination using fluorogenic probes and the 5' nuclease assay. *Genet Anal* 14, 143-149 (1999).

Macherey-Nagel. *Genomic DNA from blood* (12. Auflage). Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, 2012.

Mega, J. L., Close S. L., Wiviott S. D., Shen L., Hockett R. D., Brandt J. T., Walker J. R., Antman E. M., Macias W., Braunwald E., & Sabatine M. S. Cytochrome p-450 polymorphisms and response to clopidogrel. *N Engl J Med* 360, 354-362 (2009a).

Mega, J. L., Close S. L., Wiviott S. D., Shen L., Hockett R. D., Brandt J. T., Walker J. R., Antman E. M., Macias W. L., Braunwald E., & Sabatine M. S. Cytochrome P450 genetic polymorphisms and the response to prasugrel: relationship to pharmacokinetic, pharmacodynamic, and clinical outcomes. *Circulation* 119, 2553-2560 (2009b).

Mega, J. L., Close S. L., Wiviott S. D., Shen L., Walker J. R., Simon T., Antman E. M., Braunwald E., & Sabatine M. S. Genetic variants in ABCB1 and CYP2C19 and cardiovascular outcomes after treatment with clopidogrel and prasugrel in the TRITON-TIMI 38 trial: a pharmacogenetic analysis. *Lancet* 376, 1312-1319 (2010).

Moran, A. E., Forouzanfar M. H., Roth G. A., Mensah G. A., Ezzati M., Flaxman A., Murray C. J., & Naghavi M. The global burden of ischemic heart disease in 1990 and 2010: the global burden of disease 2010 study. *Circulation* 129, 1493-1501 (2014a).

Moran, A. E., Forouzanfar M. H., Roth G. A., Mensah G. A., Ezzati M., Murray C. J., & Naghavi M. Temporal trends in ischemic heart disease mortality in 21 world regions, 1980 to 2010: the global burden of disease 2010 study. *Circulation* 129, 1483-1492 (2014b).

O'Donoghue, M. L., Braunwald E., Antman E. M., Murphy S. A., Bates E. R., Rozenman Y., Michelson A. D., Hautvast R. W., Ver Lee P. N., Close S. L., Shen L., Mega J. L., Sabatine M. S., & Wiviott S. D. Pharmacodynamic effect and clinical efficacy of clopidogrel and prasugrel with or without a proton-pump inhibitor: an analysis of two randomised trials. *Lancet* 374, 989-997 (2009).

O'Gara, P. T., Kushner F. G., Ascheim D. D., Casey D. E., Jr., Chung M. K., de Lemos J. A., Ettinger S. M., Fang J. C., Fesmire F. M., Franklin B. A., Granger C. B., Krumholz H. M., Linderbaum J. A., Morrow D. A., Newby L. K., Ornato J. P., Ou N., Radford M. J., Tamis-Holland J. E., Tommaso J. E., Tracy C. M., Woo Y. J., Zhao D. X., & Force Cf Aha Task. 2013 ACCF/AHA guideline for the management of ST-elevation myocardial infarction: executive summary: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *Circulation* 127, 529-555 (2013).

Palmerini, T., Biondi-Zoccai G., Della Riva D., Mariani A., Genereux P., Branzi A., & Stone G. W. Stent thrombosis with drug-eluting stents: is the paradigm shifting? *J Am Coll Cardiol* 62, 1915-1921 (2013).

Palmerini, T., Kirtane A. J., Serruys P. W., Smits P. C., Kedhi E., Kereiakes D., Sangiorgi D., Bacchi Reggiani L., Kaiser C., Kim H. S., De Waha A., Ribichini F., & Stone G. W. Stent thrombosis with everolimus-eluting stents: meta-analysis of comparative randomized controlled trials. *Circ Cardiovasc Interv* 5, 357-364 (2012).

Ruggeri, Z. M. Platelets in atherothrombosis. *Nat Med* 8, 1227-1234 (2002).

Ryan, T. J., Faxon D. P., Gunnar R. M., Kennedy J. W., King S. B., 3rd, Loop F. D., Peterson K. L., Reeves T. J., Williams D. O., Winters W. L., Jr., & et al. Guidelines for percutaneous transluminal coronary angioplasty. A report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Assessment of Diagnostic and Therapeutic Cardiovascular Procedures (Subcommittee on Percutaneous Transluminal Coronary Angioplasty). *Circulation* 78, 486-502 (1988).

Scott, S. A., Sangkuhl K., Stein C. M., Hulot J. S., Mega J. L., Roden D. M., Klein T. E., Sabatine M. S., Johnson J. A., Shuldiner A. R., & Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium guidelines for CYP2C19 genotype and clopidogrel therapy: 2013 update. *Clin Pharmacol Ther* 94, 317-323 (2013).

Serruys, P. W., de Jaegere P., Kiemeneij F., Macaya C., Rutsch W., Heyndrickx G., Emanuelsson H., Marco J., Legrand V., Materne P., & et al. A comparison of balloon-expandable-stent implantation with balloon angioplasty in patients with coronary artery disease. Benestent Study Group. *N Engl J Med* 331, 489-495 (1994).

Shuldiner, A. R., O'Connell J. R., Bliden K. P., Gandhi A., Ryan K., Horenstein R. B., Damcott C. M., Pakyz R., Tantry U. S., Gibson Q., Pollin T. I., Post W., Parsa A., Mitchell B. D., Faraday N., Herzog W., & Gurbel P. A. Association of cytochrome P450 2C19 genotype with the antiplatelet effect and clinical efficacy of clopidogrel therapy. *JAMA* 302, 849-857 (2009).

Sibbing, D., Koch W., Gebhard D., Schuster T., Braun S., Stegherr J., Morath T., Schomig A., von Beckerath N., & Kastrati A. Cytochrome 2C19*17 allelic variant, platelet aggregation, bleeding events, and stent thrombosis in clopidogrel-treated patients with coronary stent placement. *Circulation* 121, 512-518 (2010).

Simon, T., Verstuyft C., Mary-Krause M., Quteineh L., Drouet E., Meneveau N., Steg P. G., Ferrieres J., Danchin N., Becquemont L., French Registry of Acute S. T. Elevation, & Non S. T. Elevation Myocardial Infarction Investigators. Genetic determinants of response to clopidogrel and cardiovascular events. *N Engl J Med* 360, 363-375 (2009).

Sorich, M. J., Polasek T. M., & Wiese M. D. Challenges and limitations in the interpretation of systematic reviews: making sense of clopidogrel and CYP2C19 pharmacogenetics. *Clin Pharmacol Ther* 94, 376-382 (2013).

- Taubert, D., von Beckerath N., Grimberg G., Lazar A., Jung N., Goeser T., Kastrati A., Schomig A., & Schomig E. Impact of P-glycoprotein on clopidogrel absorption. *Clin Pharmacol Ther* 80, 486-501 (2006).
- Thygesen, K., Alpert J. S., White H. D., & Joint E. S. C. Accf A. H. A. W. H. F. Task Force for the Redefinition of Myocardial Infarction. Universal definition of myocardial infarction. *Eur Heart J* 28, 2525-2538 (2007).
- Trenk, D., Zolk O., Fromm M. F., Neumann F. J., & Hochholzer W. Personalizing antiplatelet therapy with clopidogrel. *Clin Pharmacol Ther* 92, 476-485 (2012).
- UpToDate, Inc. (2014). Clopidogrel: Drug Information. www.uptodate.com, 20.06.2014.
- van Werkum, J. W., Heestermans A. A., Zomer A. C., Kelder J. C., Suttorp M. J., Rensing B. J., Koolen J. J., Brueren B. R., Dambrink J. H., Hautvast R. W., Verheugt F. W., & ten Berg J. M. Predictors of coronary stent thrombosis: the Dutch Stent Thrombosis Registry. *J Am Coll Cardiol* 53, 1399-1409 (2009).
- Wallentin, L., Becker R. C., Budaj A., Cannon C. P., Emanuelsson H., Held C., Horrow J., Husted S., James S., Katus H., Mahaffey K. W., Scirica B. M., Skene A., Steg P. G., Storey R. F., Harrington R. A., Investigators Plato, Freij A., & Thorsen M. Ticagrelor versus clopidogrel in patients with acute coronary syndromes. *N Engl J Med* 361, 1045-1057 (2009).
- Wiviott, S. D., Braunwald E., McCabe C. H., Montalescot G., Ruzyllo W., Gottlieb S., Neumann F. J., Ardissino D., De Servi S., Murphy S. A., Riesmeyer J., Weerakkody G., Gibson C. M., Antman E. M., & Investigators Triton-Timi. Prasugrel versus clopidogrel in patients with acute coronary syndromes. *N Engl J Med* 357, 2001-2015 (2007).
- Xie, H. G., Zou J. J., Hu Z. Y., Zhang J. J., Ye F., & Chen S. L. Individual variability in the disposition of and response to clopidogrel: pharmacogenomics and beyond. *Pharmacol Ther* 129, 267-289 (2011).
- Yousuf, O., & Bhatt D. L. The evolution of antiplatelet therapy in cardiovascular disease. *Nat Rev Cardiol* 8, 547-559 (2011).
- Zhou, S. F. Structure, function and regulation of P-glycoprotein and its clinical relevance in drug disposition. *Xenobiotica* 38, 802-832 (2008).