



I. Medizinische Klinik und Poliklinik der Technischen Universität München

Klinikum rechts der Isar und Deutsches Herzzentrum München

(Direktor: Prof. Dr. Schunkert)

Pharmakogenetische und pharmakodynamische Analysen der Clopidogrel-Wirkung bei Patienten mit koronarer Stentimplantation

Julia Christina Kappeler

Vollständiger Abdruck der von der Medizinischen Fakultät der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Ernst J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. Prof. Dr. Dirk Sibbing
2. Prof. Dr. Karl-Ludwig Laugwitz

Die Dissertation wurde am 16.02.2016 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 09.11.2016 angenommen.

Meiner Familie

Meinem Mann

INHALTSVERZEICHNIS

Tabellen- und Abbildungsverzeichnis	iv
Abkürzungsverzeichnis	v
1. Einleitung.....	1
1.1. Koronare Herzkrankheit	1
1.2. Perkutane koronare Intervention	1
1.3. Antithrombozytäre Therapie mit Clopidogrel.....	2
1.4. Stent-Thrombosen	4
1.5. CYP 2C19*2 LOF-Polymorphismus.....	5
1.6. Mögliches <i>Rebound</i> -Phänomens der Thrombozyten.....	7
2. Zielsetzung	9
2.1. CYP-Studie.....	9
2.2. <i>Rebound</i> -Studie	9
3. Patienten, Material und Methoden	10
3.1. CYP-Studie.....	10
3.1.1. Patientenkollektiv	10
3.1.2. Blutentnahme und DNA-Isolierung.....	11
3.1.3. Genotypisierung	12
3.1.4. <i>Follow-up</i> , Endpunkte und Definitionen	14
3.1.5. Statistische Auswertung.....	15
3.2. <i>Rebound</i> -Studie	16
3.2.1. Patientenkollektiv	16
3.2.2. Studienprotokoll	16
3.2.3. Probengewinnung.....	18
3.2.4. Lichttransmissions-Aggregometrie.....	19
3.2.5. <i>Multiple Electrode</i> -Aggregometrie	21
3.2.6. Endpunkte und Studiengröße	23
3.2.7. Statistische Auswertung.....	24
4. Ergebnisse.....	25
4.1. CYP-Studie.....	25
4.1.1. Patientenkollektiv und Cytochrom P450 2C19-Genotyp	25
4.1.2. Cytochrom P450 2C19-Genotyp und klinisches <i>Outcome</i>	27
4.2. <i>Rebound</i> -Studie	29
4.2.1. Patientenkollektiv	29
4.2.2. Lichttransmissions-Aggregometrie.....	31
4.2.3. <i>Multiple Electrode</i> -Aggregometrie	35

5. Diskussion	38
5.1. CYP-Studie.....	38
5.1.1. Ergebnisse der eigenen Studie.....	38
5.1.2. Nachfolgende positive Studien	38
5.1.3. Nachfolgende negative Studien	39
5.1.4. Mögliche klinische Implikationen.....	40
5.2. Rebound-Studie	43
5.2.1. Ergebnisse und Studienlimitationen.....	43
5.2.2. Nachfolgende experimentelle Studien	45
5.2.3. Klinische Studien zum Absetzen von Clopidogrel	46
6. Zusammenfassung.....	49
7. Literaturverzeichnis	IX
8. Danksagung	XXII

TABELLEN- UND ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Clopidogrel-Metabolismus.....	3
Abbildung 2: Patientenkollektiv CYP-Studie	10
Tabelle 1: DNA-Isolierung.....	11
Tabelle 2: TaqMan-Methode.....	13
Tabelle 3: Ausschleich-Regime der Tapering-Gruppe.....	17
Abbildung 3: Messzeitpunkte der Rebound-Studie	17
Tabelle 4: Blutentnahme	18
Abbildung 4: Funktionsprinzip der LTA	19
Tabelle 5: LTA	20
Abbildung 5: Funktionsprinzip der MEA	21
Tabelle 6: MEA	22
Tabelle 7: Patientencharakteristika	25
Tabelle 8: Angiographische und interventionsspezifische Charakteristika	26
Abbildung 6: Kumulative Inzidenz gesicherter früher ST	27
Tabelle 9: Klinisches <i>Outcome</i>	28
Tabelle 10: Ergebnisse der multivariaten Cox-Regressionsanalyse	28
Abbildung 7: Studienteilnehmer der <i>Rebound</i> -Studie	29
Tabelle 11: Patientencharakteristika	29
Abbildung 8: LTA-ADP (1,25 μ M)-induzierte Aggregation.....	32
Abbildung 9: LTA-ADP (2,5 μ M)-induzierte Aggregation.....	32
Abbildung 10: LTA-ADP (5 μ M)-induzierte Aggregation.....	33
Abbildung 11: LTA-ADP (20 μ M)-induzierte Aggregation.....	33
Abbildung 12: LTA-Kollagen-induzierte Aggregation.....	34
Abbildung 13: LTA-TRAP-induzierte Aggregation	34
Abbildung 14: MEA-ADP-induzierte Aggregation	35
Abbildung 15: MEA-ADPHS-induzierte Aggregation	36
Abbildung 16: MEA-Kollagen-induzierte Aggregation	36
Abbildung 17: MEA-TRAP-induzierte Aggregation.....	37

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

*2	Cytochrom P450 2C19*2
AA	<i>arachidonic acid</i> ; Arachidonsäure
ACC	<i>American College of Cardiology</i>
ACS	<i>acute coronary syndrome</i> ; akutes Koronarsyndrom
ADP	Adenosin-Diphosphat
ADP-TA	ADP-induzierte Thrombozytenaggregation
AHA	<i>American Heart Association</i>
ARC	<i>Academic Research Consortium</i>
AU	<i>aggregation unit</i> ; Aggregations-Einheit
AUC	<i>area under the curve</i>
BE	Blutentnahme
BMI	<i>body mass index</i>
BMS	<i>bare metal stent</i> ; Metallstent
CCB	<i>calcium channel blocker</i> ; Kalziumkanalblocker
CD40L	<i>cluster of differentiation 40-Ligand</i>
CI	<i>confidence interval</i> ; Konfidenzintervall
CK-MB	<i>creatine kinase type muscle brain</i> ; myokardspezifische Kreatinkinase
CRP	C-reaktives Protein
CYP	Cytochrom P450
DES	<i>drug-eluting stent</i> ; Medikamenten-beschichteter Stent
DHM	Deutsches Herzzentrum München
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> ; Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EKG	Elektrokardiogramm
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
GP	Glykoprotein
H	Wasserstoff
HR	<i>hazard ratio</i> ; Risikoquotient
HS	<i>high sensitivity</i> ; hohe Sensitivität
IQR	<i>interquartile range</i> ; Interquartilsabstand
ISAR	<i>Intracoronary Stenting and Antithrombotic Regimen</i>
KHK	koronare Herzkrankheit
LAD	<i>left anterior descending</i> ; <i>Ramus interventricularis anterior</i> der <i>A. coronaria sinistra</i>
LCx	<i>left circumflex artery</i> ; <i>Ramus circumflexus</i> der <i>A. coronaria sinistra</i>
LD	<i>loading dose</i> ; Aufsättigungsdosis
LM	<i>left main</i> ; linker Hauptstamm (<i>A. coronaria sinistra</i>)
LOF	<i>loss of function</i> , Funktionsverlust
LTA	Lichttransmissions-Aggregometrie
LVEF	linksventrikuläre Ejektionsfraktion
MACE	<i>major adverse cardiovascular events</i> ; unerwünschte kardiovaskuläre Ereignisse
MD	<i>maintenance dose</i> ; Erhaltungsdosis
MEA	<i>multiple electrode</i> -Aggregometrie
MI	Myokardinfarkt
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i> ; Boten-Ribonukleinsäure
MZP	Messzeitpunkt
NSTEMI	<i>non-ST-elevation myocardial infarction</i> ; Nicht-ST-Streckenhebungs-Infarkt
PCI	<i>percutaneous coronary intervention</i> ; perkutane koronare Intervention

PCR	<i>polymerase chain reaction</i> ; Polymerase-Kettenreaktion
PES	<i>Paclitaxel-eluting stent</i> ; Paclitaxel-beschichteter Stent
PO ₄ ³⁻	Phosphat
PPI	<i>proton pump inhibitor</i> ; Protonenpumpeninhibitor
PPP	<i>platelet poor plasma</i> ; Thrombozyten-armes Plasma
PRP	<i>platelet rich plasma</i> ; Thrombozyten-reiches Plasma
PRU	<i>P2Y₁₂ reaction unit</i> ; P2Y ₁₂ -Reaktionseinheit
PTCA	<i>percutaneous transluminal coronary angioplasty</i> ; perkutane transluminale Koronarangioplastie
RCA	<i>right coronary artery</i> ; <i>Arteria coronaria dextra</i>
RDI	Klinikum rechts der Isar
RT	Raumtemperatur
s	<i>soluble</i> ; löslich
SD	<i>standard deviation</i> ; Standardabweichung
SES	Sirolimus-beschichteter Stent
SNP	<i>single-nucleotide polymorphism</i> ; Punktmutation
ST	Stent-Thrombose
STEMI	<i>ST-elevation myocardial infarction</i> ; ST-Streckenhebungs-Infarkt
TA	Thrombozytenaggregation
TIMI	<i>Thrombolysis in Myocardial Infarction</i>
TRAP	Thrombin-Rezeptor aktivierendes Peptid
VASP	Vasodilatator-stimuliertes Phosphoprotein

1. Einleitung

1.1. Koronare Herzkrankheit

Die koronare Herzkrankheit (KHK) ist definiert als Manifestation der Atherosklerose an den Herzkranzgefäßen, die zu einem Missverhältnis zwischen Sauerstoffangebot und -bedarf im Herzmuskel führt (BÄK, KBV et al. 2014). Sie gehört zu den wichtigsten Volkskrankheiten und war 2014 laut Statistischem Bundesamt die häufigste Todesursache in Deutschland sowohl bei Männern als auch bei Frauen (Statistisches Bundesamt 2014). Im Rahmen der *Framingham Heart Study* (Lloyd-Jones, Larson et al. 1999) wurde das Lebenszeitrisiko von 40-Jährigen an KHK zu erkranken mit einem aus zwei Männern und einer aus drei Frauen beziffert.

Klinisch kann sich die KHK je nach Schweregrad und Dauer der Myokardischämie als latente (asymptomatische) KHK, stabile Angina pectoris oder akutes Koronarsyndrom (*acute coronary syndrome*, ACS) manifestieren. Das ACS umfasst die unmittelbar lebensbedrohlichen Phasen der KHK: instabile Angina pectoris, akuter Myokardinfarkt (MI; elektrokardiographisch in Nicht-ST-Streckenhebungs-Infarkt, *non-ST-elevation myocardial infarction*, NSTEMI, und ST-Streckenhebungs-Infarkt, *ST-elevation myocardial infarction*, STEMI, unterteilt) und plötzlicher Herztod. Die Therapieoptionen der KHK können als rein medikamentös, interventionell oder chirurgisch zusammengefasst werden. (BÄK, KBV et al. 2014)

1.2. Perkutane koronare Intervention

Als eine der Therapieoptionen der KHK kann im Anschluss an eine diagnostische Koronarangiographie eine perkutane koronare Intervention (*percutaneous coronary intervention*, PCI) durchgeführt werden. Diese besteht meist aus einer perkutanen transluminalen Koronarangioplastie (*percutaneous transluminal coronary angioplasty*, PTCA), die 1977 von Grüntzig eingeführt wurde und auf einer Ballondilatation beruht. Sigwart und Puel führten 1987 die erste Stentimplantation durch, heutzutage kommt diese in mehr als 90 % aller PCI zum Einsatz. (Lapp and Krakau 2010).

Nach erfolgreicher Stentimplantation stellen die Restenose und die Stent-Thrombose (ST) die wichtigsten Komplikationen dar. Um die Restenose-Neigung der ursprünglichen Metallstents (*bare metal stents*, BMS) zu verbessern, wurden Stents

entwickelt, die mit antiproliferativ wirkenden Substanzen beschichtet sind (Medikamenten-beschichtete Stents, *drug-eluting stents*, DES). (Lapp and Krakau 2010)

Die DES der ersten Generation enthalten Sirolimus oder Paclitaxel, darauf folgten Everolimus-, Zotarolimus- und Biolimus-Beschichtungen. Neben technischen Verbesserungen konnte vor allem die Einführung der dualen antithrombozytären Therapie mit Aspirin und einem Thienopyridin, anfangs Ticlopidin, später Clopidogrel, die ST-Rate von ursprünglich 24 % auf weniger als 2 % senken. (Oberhänsli, Puricel et al. 2011)

1.3. Antithrombozytäre Therapie mit Clopidogrel

Clopidogrel gehört zur Gruppe der Thienopyridine und ist unter den Handelsnamen Plavix® (Sanofi Aventis, Paris) und Iscover® (Bristol-Myers Squibb, New York City) seit 1998 auf dem deutschen Markt erhältlich. Neben anderen Indikationen hat es im Rahmen der dualen antithrombozytären Therapie durch Verminderung thrombotischer Komplikationen, z.B. ST, wesentlich zur verbesserten Sicherheit der Stentimplantation beigetragen (Mehta, Yusuf et al. 2001; Yusuf, Fox et al. 2001; Steinhubl, Berger et al. 2002). So wird zusätzlich zur Cyclooxygenase 1-Inhibition durch ASS der thrombozytäre P2Y₁₂-Rezeptor durch ein Thienopyridin gehemmt (Gachet 2015). Die zum Zeitpunkt der Studien geltenden Leitlinien empfehlen, sofern keine Kontraindikationen vorliegen, eine einmalige Aufsättigungsdosis (*loading dose*, LD) von 300 – 600 mg Clopidogrel vor der PCI, gefolgt von einer täglichen Erhaltungsdosis (*maintenance dose*, MD) von 75 mg für mindestens einen Monat nach BMS- bzw. mindestens sechs bis zwölf Monate nach DES-Implantation (Wijns and Kolh 2010; Levine, Bates et al. 2011).

Clopidogrel ist ein sogenanntes *Prodrug*, das erst in zwei aufeinanderfolgenden Schritten durch das hepatische Cytochrom P450 (CYP)-System oxidiert werden muss (Kazui, Nishiya et al. 2010), bevor sein aktiver Metabolit, ein Thiol, entsteht (Savi, Pereillo et al. 2000) (s. Abbildung 1). Der erste Schritt von Clopidogrel zu 2-oxo-Clopidogrel wird durch die CYP1A2-, CYP2B6-, und CYP2C19-Isoformen dieses Enzymkomplexes katalysiert, wobei CYP2C19 mit 44,9 % den größten Beitrag liefert. Die zweite Oxidation von 2-oxo-Clopidogrel zum pharmakologisch aktiven Metaboliten geschieht durch die Isoformen CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19 und

Einleitung

CYP3A4. Hierbei trägt CYP2C19 mit 20,6 % hinter CYP3A4 den zweitgrößten Anteil. (Kazui, Nishiya et al. 2010)

Der auf diese Weise entstandene aktive Metabolit ist ein selektiver und irreversibler Inhibitor des G_i -gekoppelten $P2Y_{12}$ -Rezeptors (Foster, Prosser et al. 2001; Savi, Zacharyus et al. 2006). Der $P2Y_{12}$ -Rezeptor ist einer von drei bekannten Adenosin-Diphosphat (ADP)-Rezeptoren auf Thrombozyten und relativ spezifisch in seiner Gewebeverteilung. Er spielt eine entscheidende Rolle in der Stabilisierung der ADP-induzierten Thrombozytenaggregation (ADP-TA), der Verstärkung der durch alle anderen bekannten Agonisten induzierten Thrombozytenaggregation (TA) sowie der Thrombozyten-Sekretion. Zusammengefasst dient der $P2Y_{12}$ -Rezeptor dem Wachstum und der Stabilisierung eines Thrombus. (Gachet 2006)

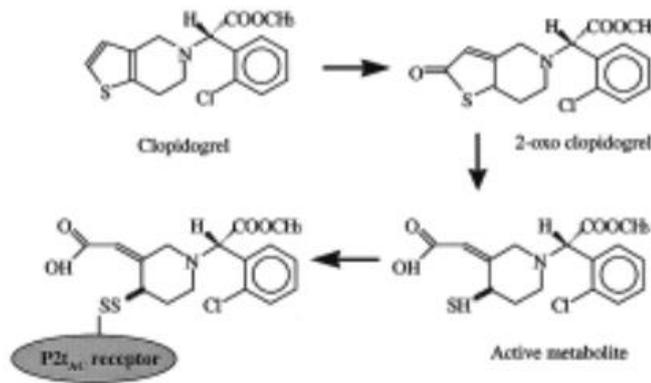


Abbildung 1: Clopidogrel-Metabolismus

Durch zwei Oxidationsschritte entsteht aus dem Prodrug der aktive Metabolit. Quelle: (Savi, Pereillo et al. 2000)

Das Ansprechen der Thrombozyten auf eine Clopidogrel-Behandlung ist allerdings interindividuell höchst variabel (Gurbel, Bliden et al. 2003; Müller, Besta et al. 2003; Serebruany, Steinhubl et al. 2005). Ursächlich hierfür werden klinische, zelluläre und genetische Faktoren in Betracht gezogen (Angiolillo, Fernandez-Ortiz et al. 2007; Sibbing, Byrne et al. 2011; Xie, Zou et al. 2011). Persistierend hohe Thrombozytenreaktivität trotz adäquater Vorbehandlung mit Clopidogrel ist jedoch mit einem erhöhten Risiko für unerwünschte kardiovaskuläre Ereignisse nach PCI, z.B. STs, assoziiert (Matetzky, Shenkman et al. 2004; Geisler, Langer et al. 2006; Hochholzer, Trenk et al. 2006; Buonamici, Marcucci et al. 2007).

1.4. Stent-Thrombosen

Eine ST ist die Neubildung eines Thrombus innerhalb des koronaren Stents. Sie ist wegen ihrer hohen Mortalität (30 % innerhalb der ersten 30 Tage nach PCI (Ong, Hoye et al. 2005) bzw. 45 % innerhalb der ersten neun Monate nach PCI (Iakovou, Schmidt et al. 2005)) und Morbidität (Aufreten als nicht-fataler MI in ca. 50 % (Ong, Hoye et al. 2005)) eine gefürchtete Komplikation nach PCI. 2007 wurde die ST durch das *Academic Research Consortium* (ARC) nach ihrem Evidenz-Grad sowie nach ihrem zeitlichen Auftreten in Bezug auf die Index-PCI klassifiziert (Cutlip, Windecker et al. 2007).

Eine gesicherte ST (*definite* ST nach ARC-Kriterien) muss demnach angiographisch oder pathologisch bestätigt sein. Die wahrscheinliche ST (*probable* ST nach ARC-Kriterien) wird dagegen klinisch definiert als jeder unerklärte Todesfall innerhalb von 30 Tagen nach der Index-PCI sowie unabhängig vom zeitlichen Auftreten jeder MI, der territorial auf das mit dem Stent versorgte Koronargefäß zurückgeführt werden kann. Von einer möglichen ST (*possible* ST nach ARC-Kriterien) kann bei jedem unerklärten Todesfall später als 30 Tage nach Index-PCI ausgegangen werden.

Die akute ST (0 – 24 h post-PCI) und subakute ST (> 24 h – 30 d post-PCI) können als frühe ST zusammengefasst werden (Cutlip, Windecker et al. 2007). Sie stellen mit 73,2 % die häufigste Untergruppe aller gesicherten ST (van Werkum, Heestermans et al. 2009) dar (Inzidenz ca. 1,5 % (Ong, Hoye et al. 2005)). Die Ursachen hierfür sind vermutlich die noch freiliegende Stent-Oberfläche und die mechanische Beanspruchung der Gefäßwand durch die Angioplastie. Unabhängige Prädiktoren für eine frühe ST sind ein suboptimales prozedurales Resultat (Aoki, Lansky et al. 2009; van Werkum, Heestermans et al. 2009), die Durchführung der PCI im Rahmen eines ACS (Park, Park et al. 2006; de la Torre-Hernández, Alfonso et al. 2008) sowie das Absetzen bzw. Fehlen einer Thienopyridin-Therapie (Iakovou, Schmidt et al. 2005; Aoki, Lansky et al. 2009; Lasala, Cox et al. 2009; van Werkum, Heestermans et al. 2009), wobei letztgenanntes innerhalb der ersten sechs Monate nach PCI der stärkste Prädiktor ist (Jeremias, Sylvia et al. 2004; Airolidi, Colombo et al. 2007; van Werkum, Heestermans et al. 2009). Auch ein schlechtes Ansprechen auf eine Clopidogrel-Therapie konnte als Prädiktor für eine frühe ST nachgewiesen werden (Sibbing, Braun et al. 2009).

Einleitung

Bei ca. 13,3 % aller gesicherten ST handelt es sich um eine späte ST (> 30 d – 1 a post-PCI) (van Werkum, Heestermans et al. 2009) (Inzidenz ca. 0,35 % (Stettler, Wandel et al. 2007)). Sie hat ähnliche Prädiktoren wie die frühe ST: vorzeitiges Absetzen einer Thienopyridin-Behandlung (Iakovou, Schmidt et al. 2005; Lasala, Cox et al. 2009), interventionsspezifische Merkmale (Iakovou, Schmidt et al. 2005; Joner, Finn et al. 2006; van Werkum, Heestermans et al. 2009) und Komorbiditäten (Iakovou, Schmidt et al. 2005; Lasala, Cox et al. 2009; van Werkum, Heestermans et al. 2009).

Die sehr späte ST (> 1 a post-PCI) ist mit 13,5 % aller gesicherten ST (van Werkum, Heestermans et al. 2009) ähnlich häufig wie die späte ST (Inzidenz ca. 0,5 % (Stettler, Wandel et al. 2007)). Sie scheint im Gegensatz zu frühen und späten ST nicht mehr so stark im Zusammenhang mit der Thrombozyteninhibition zu stehen (Kuchulakanti, Chu et al. 2006; Airoldi, Colombo et al. 2007; Lasala, Cox et al. 2009), sondern eher die Folge einer verzögerten Reendothelialisierung (Farb, Burke et al. 2003; Joner, Finn et al. 2006; Finn, Joner et al. 2007) und chronischen Entzündung bis hin zur lokalen Hypersensitivität (Virmani, Guagliumi et al. 2004; Joner, Finn et al. 2006; Cook, Ladich et al. 2009) zu sein (Oberhänsli, Puricel et al. 2011).

1.5. CYP 2C19*2 LOF-Polymorphismus

Als Ursache für die interindividuell ungleiche pharmakodynamische Wirkung von Clopidogrel werden unter anderem Varianten auf Genen, die die am Clopidogrel-Metabolismus beteiligten CYP-Isoformen kodieren, in Betracht gezogen (Angiolillo, Fernandez-Ortiz et al. 2007; Sibbing, Byrne et al. 2011; Xie, Zou et al. 2011). Dabei fallen Polymorphismen in Genen der anteilig stärker beteiligten Isoformen, wie CYP2C19, stärker ins Gewicht.

Bisher wurden über 20 Polymorphismen des CYP2C19-Gens entdeckt, wobei das Wildtyp-Allel als CYP2C19*1 bezeichnet wird (Ingelman-Sundberg, Daly et al. 2015). Die CYP2C19*2 (im Folgenden *2)-Mutation wurde 1994 von de Morais et al. (de Morais, Wilkinson et al. 1994) entdeckt. Es handelt sich hierbei um eine Punktmutation (single nucleotide polymorphism, SNP) von Guanin zu Adenin auf Exon 5 an der Position 681, welche einen kompletten Funktionsverlust des CYP2C19-Enzyms zur Folge hat (de Morais, Wilkinson et al. 1994). Das mutierte *2-Allel hat in

Einleitung

der kaukasischen Bevölkerung eine Frequenz von 14,7 % (Xie, Stein et al. 1999) und ist in anderen ethnischen Gruppen sogar noch häufiger (Xie, Kim et al. 2001).

Studien an gesunden Freiwilligen haben gezeigt, dass bei *2-Trägern im Gegensatz zu CYP2C19-Wildtyp-Homozygoten die pharmakokinetische Generierung des aktiven Clopidogrel-Metaboliten vermindert ist (Brandt, Close et al. 2007; Umemura, Furuta et al. 2008). Darüber hinaus wurde bei *2-Trägern eine schlechtere pharmakodynamische Wirkung von Clopidogrel beobachtet (Hulot, Bura et al. 2006; Brandt, Close et al. 2007; Fontana, Hulot et al. 2007; Umemura, Furuta et al. 2008).

Es folgten Untersuchungen an KHK-Patienten, die den negativen Einfluss des *2-Allels auf das Ansprechen der Thrombozyten auf Clopidogrel (Frere, Cuisset et al. 2008; Gladding, Webster et al. 2008; Trenk, Hochholzer et al. 2008) bestätigten. So zeigten Giusti et al. als Erste, dass der *2-Trägerstatus bei ACS-Patienten ein signifikanter und unabhängiger Risikofaktor für eine persistierend hohe Thrombozytenreaktivität (*residual platelet reactivity*, definiert als ADP-TA \geq 70 % trotz dualer antithrombozytärer Therapie) ist (Giusti 2007). Geisler et al. beobachteten bei PCI-Patienten eine signifikant höhere persistierende TA nach einer LD von 600 mg Clopidogrel unter *2-Trägern im Vergleich zu Nicht-Trägern (Geisler, Schaeffeler et al. 2008).

Neben Pharmakokinetik und -dynamik ist jedoch vor allem das klinische *Outcome* von praktischer Bedeutung. Von Beckerath et al. veröffentlichten 2005 eine Fallstudie über einen Patienten mit ST und Clopidogrel-Resistenz, bei dem kaum aktiver Clopidogrel-Metabolit sowie keine nachweisbare Thrombozyten-Inhibition im Sinne einer verminderten ADP-TA nach einer LD von 600 mg Clopidogrel nachweisbar waren (von Beckerath, Taubert et al. 2005). Eine nachfolgende Studie von Sibbing et al. zeigte bei sieben ST-Patienten ebenfalls eine verminderte Generierung des aktiven Clopidogrel-Metaboliten und darüber hinaus eine geringere Thrombozyten-Inhibierung durch Clopidogrel im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen (Sibbing, Taubert et al. 2008). In keiner der beiden Studien war eine Genotypisierung vorgenommen worden. Es kann jedoch spekuliert werden, ob bei den untersuchten ST-Patienten das *2-Allel durch verminderte Generierung des aktiven Metaboliten ursächlich an der verminderten Clopidogrel-Wirkung und damit letztlich am Entstehen der ST beteiligt war.

1.6. Mögliches *Rebound*-Phänomens der Thrombozyten

Nach Implantation eines koronaren Stents empfehlen die zum Zeitpunkt der Studie geltenden Leitlinien (Wijns and Kolh 2010; Levine, Bates et al. 2011) eine duale antithrombozytäre Therapie mit Aspirin und Clopidogrel für mindestens einen Monat (BMS) bzw. für sechs bis zwölf Monate (DES), gefolgt von einer lebenslangen Aspirin-Monotherapie. Für die Art des Absetzens von Clopidogrel gibt es keine Empfehlungen, sodass die Therapie in der gängigen klinischen Praxis abrupt beendet wird. Nach dem abrupten Absetzen verschiedener anderer antithrombotischer Medikamente, darunter unfraktioniertes Heparin (Theroux, Waters et al. 1992; Bahit, Topol et al. 2001), Aspirin einzeln (McFadden, Stabile et al. 2004; Ferrari, Benhamou et al. 2005) oder in Kombination mit einem Thienopyridin (Jeremias, Sylvia et al. 2004; Iakovou, Schmidt et al. 2005; Park, Park et al. 2006; Kimura, Morimoto et al. 2009), wurde jedoch eine Häufung thrombotischer Ereignisse bzw. Hinweise auf ein *Rebound*-Phänomen beschrieben.

Auch spezifisch für Thienopyridine wurden in letzter Zeit einige klinische Studien veröffentlicht, die einen Zusammenhang zwischen deren Absetzen und dem Auftreten thrombotischer Komplikationen nahelegen (Kuchulakanti, Chu et al. 2006; Airoidi, Colombo et al. 2007; van Werkum, Heestermans et al. 2009). Die 2007 von Valgimigli et al. veröffentlichte STRATEGY-Studie zeigte sowohl bei BMS- als auch bei DES-Patienten eine Häufung von Tod und MI innerhalb der ersten 30 Tage nach dem Absetzen einer Thienopyridin-Behandlung (Valgimigli, Campo et al. 2007). Ho et al. beschrieben 2008 eine Häufung von Tod und MI nach dem Absetzen von Clopidogrel (Ho, Peterson et al. 2008) und spezifizierten diese später als zweifache Risikoerhöhung für Tod und MI innerhalb der ersten 90 Tage nach dem Beenden einer Clopidogrel-Therapie verglichen mit den darauffolgenden 9 Monaten (Ho, Tsai et al. 2010). Genannte Beobachtungen führten zur Hypothese eines ursächlichen *Rebound*-Phänomens der Thrombozyten, welches möglicherweise durch ein ausschleichendes Absetzen vermieden werden könnte (Ho, Peterson et al. 2008).

Ein *Rebound*-Phänomen im Sinne eines vorübergehenden Hyperreaktivitäts-Zustands der Thrombozyten, z. B. durch eine Überexpression oder gesteigerte Aktivität des P2Y₁₂-Rezeptors auf der Thrombozytenoberfläche bzw. eine verstärkte Signaltransduktion, könnte sich in vitro als signifikante Erhöhung der ADP-TA kurz

Einleitung

nach dem vollständigen Absetzen einer Clopidogrel-Behandlung manifestieren (Lordkipanidze, Diodati et al. 2009).

2. Zielsetzung

2.1. CYP-Studie

Das Ziel der Studie „Der Cytochrom P450 2C19*2 Funktionsverlust-Polymorphismus als Risikofaktor für das Auftreten von Stent-Thrombosen“ (kurz CYP-Studie genannt) war es, einen möglichen Zusammenhang zwischen dem *2-Trägerstatus und dem Auftreten von gesicherten frühen ST bei KHK-Patienten, die nach koronarer Stentimplantation mindestens 30 Tage mit Clopidogrel behandelt wurden, nachzuweisen.

2.2. Rebound-Studie

Das Ziel der Studie „Thrombozytenfunktionsmessungen während und nach dem Absetzen einer Clopidogrel-Therapie sechs Monate nach Stentimplantation zur Untersuchung eines möglichen *Rebound*-Phänomens der Thrombozyten“ (kurz *Rebound*-Studie genannt) war es, ein mögliches Thrombozyten-*Rebound*-Phänomen nach dem Absetzen einer Langzeitbehandlung mit Clopidogrel aufzudecken. Darüber hinaus sollte untersucht werden, ob dieses hypothetische Phänomen durch ein ausschleichendes Absetzen umgangen werden kann.

3. Patienten, Material und Methoden

3.1. CYP-Studie

3.1.1. Patientenkollektiv

Im Zeitraum zwischen 05/2000 und 12/2005 wurde im Deutschen Herzzentrum München (DHM) und dem Klinikum rechts der Isar (RDI) im Rahmen von vier *Intracoronary Stenting and Antithrombotic Regimen* (ISAR)-Studien (Hausleiter, Kastrati et al. 2004; Kastrati, Mehilli et al. 2004; Mehilli, Kastrati et al. 2004; Kastrati, Mehilli et al. 2006) bei 2485 KHK-Patienten nach Stentimplantation Blut für die nachfolgende genetische Analyse entnommen und aufbewahrt (s. Abbildung 2).

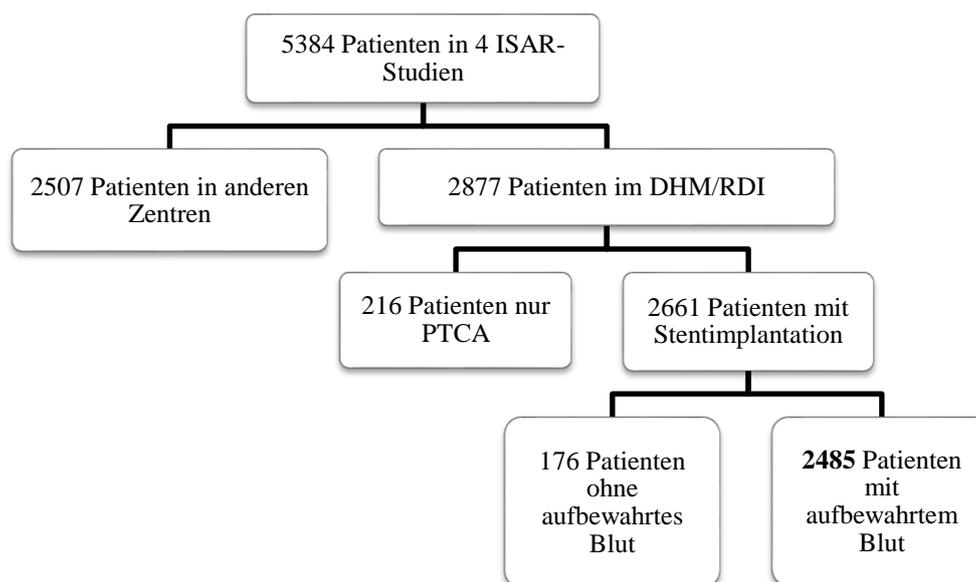


Abbildung 2: Patientenkollektiv CYP-Studie

Im Rahmen der ISAR-Studien wurde bei 2485 Stent Patienten im DHM/RDI Blut für nachfolgende genetische Untersuchungen aufbewahrt. Quelle: (Sibbing, Stegherr et al. 2009)

Alle Patienten erhielten vor der PCI eine 600 mg LD Clopidogrel. Ausschlusskriterien waren STEMI, hämodynamische Instabilität, maligne Tumoren, zerebraler Insult < drei Monate, aktive Blutung oder Blutungsneigung, frisches Trauma oder große Operation < 1 Monat, Verdacht auf Aortendissektion, orale Antikoagulation innerhalb der letzten sieben Tage, Behandlung mit Glykoprotein (GP)-IIb/IIIa-Inhibitoren innerhalb der letzten 14 Tage, Hämoglobin < 100 g/l oder Hämatokrit < 34 %, Thrombozytenzahl < 100 x 10⁹/l oder > 600 x 10⁹/l, vermutete oder nachgewiesene Gravidität sowie eine Allergie auf die Studienmedikation.

3.1.2. Blutentnahme und DNA-Isolierung

Das in eine Kalium-Ethylendiamintetraacetat (EDTA)-S-Monovette[®] entnommene Vollblut wurde bei – 25 °C aufbewahrt. Nach dem Auftauen bei Raumtemperatur (RT) wurde aus den darin enthaltenen Leukozyten genomische Desoxyribonukleinsäure (*deoxyribonucleic acid*; DNA) mittels eines kommerziell erhältlichen Kits entsprechend der Herstellersanleitung isoliert (s. Tabelle 1) (Macherey-Nagel 2014). Die im so entstandenen Eluat enthaltenen 4–6µg genomische DNA und wurden bis zur Genotypisierung bei – 25 °C gelagert.

Tabelle 1: DNA-Isolierung

Schritte	Reagenzien	Aktionen	Effekt
Lyse 1	200 µl EDTA-Blut + 25 µl Proteinkinase K + 200 µl Lyse-Puffer	vortexen (10 - 20 s)	Lyse der zellulären Bestandteile
		inkubieren (10 - 15 min, 70 °C)	
Lyse 2	+ 200 µl Ethanol	Vortexen	reversible H-Brücken zwischen den PO ₄ ³⁻ -Gruppen der DNA und der Silica-Membran
		auf Silica-Membran geben	
		zentrifugieren (1 min, 11000 g)	
Reinigung	350 µl Wasch-Puffer	auf Silica-Membran geben	Reinigen und Trocknen der DNA
		zentrifugieren (3 min, 11000 g)	
Elution	50 µl Elutions-Puffer	inkubieren (1 min, RT)	Lösen der DNA von der Silica-Membran
		zentrifugieren (1 min, 11000 g)	
Geräte	Vortex-Genie 2 [®] , Scientific Industries Inc., Bohemia, USA		
	Thermomixer 5436, Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg		
	Zentrifuge A14, Jouan GmbH, Unterhaching		
Verbrauchsmaterial	NucleoSpin [®] Blood QuickPure, Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren		

H: Wasserstoff; PO₄³⁻: Phosphat; Alle Reagenzien wurden entsprechend der Herstellerangaben rekonstituiert und gelagert.

3.1.3. Genotypisierung

Die Genotypisierung erfolgte mit der automatisierten TaqMan-Methode nach Livak (Livak 1999) (s. Tabelle 2), welche auf der Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) nach Mullis und Faloona (Mullis and Faloona 1987) beruht und der quantitativen Echtzeit-PCR (Heid, Stevens et al. 1996) ähnelt. Sie ist eine Weiterentwicklung der 5'-Nuklease-Reaktion nach Holland (Holland, Abramson et al. 1991). Statt radioaktiver Sonden binden während der Hybridisierungsphase Fluoreszenz-markierte Sonden spezifisch entweder an das Wildtyp- oder das mutierte Allel (Lee, Connell et al. 1993; Livak, Flood et al. 1995). Die Sonden sind an ihrem 5'-Ende mit je einem Reporter-Farbstoff (Fluoreszin-Derivate FAM oder TET, später VIC) und an ihrem 3'-Ende mit einem *Quencher*-Farbstoff (Rhodamin-Derivat TAMRA) markiert. Da sich die beiden Farbstoffe auf der Sonde jedoch in enger räumlicher Nähe zueinander befinden, wird ein Fluoreszieren des Reporters durch Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) (Förster 1948) zwischen den beiden unterdrückt (Livak, Flood et al. 1995). Aufgrund der 5'-Nukleaseaktivität der Taq-Polymerase (Lyamichev, Brow et al. 1993), wird die an die Einzelstrang-DNA gebundene Sonde während der Elongationsphase in Mono- oder kurze Oligonukleotide fragmentiert und abgespalten. Der Reporter- ist dadurch nicht mehr mit dem *Quencher*-Farbstoff verbunden und kann fluoreszieren, da der hemmende FRET mit zunehmendem Abstand unwirksam wird (Stryer and Haugland 1967). Mit jedem PCR-Zyklus wird somit exponentiell mehr Allel-spezifischer Reporter-Farbstoff frei.

Für die vorliegende Studie wurde ein Reaktionsmix aus 565 µl PCR-Wasser, 850 µl PCR-*MasterMix*, jeweils 25,5 µl des *forward*- und des *reverse-Primers* sowie jeweils 17 µl der FAM- und der VIC-Sonde erstellt. Eine 96-Loch-PCR-Platte wurde mit 17 µl dieses Reaktionsmix pro Loch bestückt. Dazu wurden jeweils 2 µl wie folgt pipettiert: in 90 Löcher DNA unterschiedlicher Patientenproben mit unbekanntem Genotyp, in zwei Löcher PCR-Wasser als Negativkontrolle, in zwei Löcher DNA eines Patienten mit bekanntem FAM-Genotyp und in die letzten beiden Löcher DNA eines anderen Patienten mit bekanntem VIC-Genotyp als Positivkontrolle. Zur Qualitätssicherung wurden 20 % der Patientenproben doppelt genotypisiert, wobei alle Wiederholungen mit der ursprünglichen Typisierung übereinstimmten. Die

Patienten, Material und Methoden

Genotypisierung geschah ohne Kenntnis klinischer und angiographischer Variablen der teilnehmenden Patienten.

Tabelle 2: TaqMan-Methode

Schritte	Temperatur	Zeit	Effekt
Denaturierung	92 °C	2 min	Auftrennung in 2 Einzelstränge
Hybridisierung (<i>annealing</i>)	60 °C	1 min	Spezifische Anlagerung der beiden <i>Primer</i> sowie der beiden Sonden
Elongation			Verlängerung der <i>Primer</i> durch die Taq-Polymerase Abspaltung und Aufleuchten der Reporter-Farbstoffe
Geräte	GeneAmp® PCR System 9700 Thermocyclern, Applied Biosystems Deutschland GmbH, Darmstadt		
	ABI PRISM® 7000 Sequence Detection System, Applied Biosystems Deutschland GmbH, Darmstadt		
Verbrauchsmaterial	Quali-PCR-Platten, 96 Well, Kisker Biotech GmbH & Co. KG, Steinfurt		
Primer	<i>Forward</i> 5'-GATATGCAATAATTTTCCCACTATCATTG-3'		
	<i>Reverse</i> 5'-GGTGTTCCTTTTACTTTCTCCAAAATATCAC-3'		
Sonden	G-spezifisch 5'-FAM-TTATTTCCC <u>G</u> GGAACC-3'		
	A-spezifisch 5'-VIC-ATTATTTCCC <u>A</u> GGAACC-3'		
MasterMix	ABsolute® QPCR ROX Mix, ABgene Ltd., Epsom, Großbritannien		

T: Thymin; C: Cytosin; die Allel-spezifischen Nukleotide sind unterstrichen; MasterMix, Primer und Sonden wurden über Applied Biosystems Deutschland, Darmstadt bezogen und gemäß Herstellerangaben gelagert.

3.1.4. *Follow-up*, Endpunkte und Definitionen

Nach der PCI wurde ein telefonisches *follow up* durchgeführt. Patienten, die kardiale Symptome schilderten, wurden in der Ambulanz klinisch, elektrokardiographisch und laborchemisch untersucht. Ebenso erfasst wurden Informationen von überweisenden Ärzten und Verwandten sowie über nachfolgende Krankenhaus-Aufenthalte. Die darüber verfügbare Dokumentation wurde bestmöglich überprüft um die Qualität der Daten sicherzustellen.

Die primäre Zielgröße dieser Studie war die kumulative Inzidenz gesicherter früher ST. Diese wurde entsprechend der Kriterien des ARC (Cutlip, Windecker et al. 2007) als das Auftreten eines ACS innerhalb von 30 Tagen nach Stentimplantation mit entweder angiographischem oder pathologischem Korrelat definiert (s. Einleitung 1.4.).

Außerdem wurden als sekundäre Endpunkte die Inzidenzen von Tod, nicht-fatalem ACS, Tod/MI und ischämischem zerebralen Insult untersucht. Die Diagnose eines MI wurde hierbei entsprechend der TIMI-Kriterien (Wiviott, Braunwald et al. 2007) gestellt (Auftreten neuer abnormer Q-Wellen im EKG oder Anstieg des myokardspezifischen Kreatinkinase (CK-MB)-Wertes auf das Dreifache oder mehr der oberen Norm). Die Diagnose eines ischämischen zerebralen Insults erforderte einen entsprechenden Befund in der kranialen Bildgebung.

3.1.5. Statistische Auswertung

Eine mögliche Abweichung der CYP 2C19 Genotyp-Verteilung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht wurde mit dem χ^2 -Test nach Pearson geprüft.

Die Patientencharakteristika sowie die angiographischen und interventionsspezifischen Variablen wurden entweder als Mittelwert \pm Standardabweichung (*standard deviation*, SD), absoluter Anteil mit entsprechendem Prozentsatz oder Median mit Interquartilsabstand (*interquartile range*, IQR) dargestellt. Qualitative Merkmale wurden mithilfe des χ^2 -Tests zwischen Wildtyp-Homozygoten und *2-Trägern verglichen. Normalverteilte stetige Merkmale wurden anhand des zweiseitigen t-Tests für zwei verbundene Stichproben verglichen, während für Variablen mit unbekannter Verteilungsform der zweiseitige Wilcoxon-Test für zwei verbundene Stichproben angewandt wurde.

Die Unterschiede zwischen Wildtyp-Homozygoten und *2-Trägern bezüglich des klinischen *Outcomes* wurden mit dem Cox-Proportional-Hazards-Modell bewertet. Außerdem wurde eine multivariate Cox-Regressionsanalyse durchgeführt, in die neben der gesicherten frühen ST, das Patientenalter, das Vorliegen von Diabetes mellitus oder einem ACS, die Art des implantierten Stents (DES oder BMS), die jeweilige ISAR-Studie, in die die Patienten eingeschlossen wurden, sowie die Behandlung mit Abciximab eingingen.

Für die Berechnung der Teststärke, wurde das Programm nQuery advisor Version 7.0 (Statistical Solutions, Cork, Irland) genutzt. Für alle statistischen Auswertungen wurden bei einem Signifikanzniveau von 5% p -Werte $< 0,05$ als statistisch signifikant angesehen. Alle Analysen wurden mit dem Software-Paket S-PLUS Version 4.5 (Insightful Corp., Seattle, USA) durchgeführt.

3.2. Rebound-Studie

3.2.1. Patientenkollektiv

Im Zeitraum zwischen März und Oktober 2008 wurden im DHM 76 aufeinanderfolgende Patienten in die vorliegende, prospektive Studie eingeschlossen. Es kamen hierfür KHK-Patienten in Frage, die nach DES-Implantation mindestens sechs Monate lang mit einer dualen antithrombozytären Therapie aus Aspirin (100 mg zweimal täglich) und Clopidogrel (75 mg täglich) behandelt worden waren und diese nach einer unauffälligen Kontroll-Angiographie auf eine Aspirin-Monotherapie reduzieren konnten.

Ausschlusskriterien für die vorliegende Studie waren ein Patientenalter < 18 oder > 80 Jahren, angiographisch festgestellte Läsionen, die einer Reintervention und somit fortgesetzter dualer antithrombozytärer Therapie bedurften, maligne Tumoren oder andere Komorbiditäten, die eine *Non-Compliance* des Studienprotokolls vermuten ließen, ST in der Vorgeschichte, Behandlung mit GP-IIb/IIIa-Inhibitoren innerhalb der letzten zehn Tage vor Studieneinschluss, Gravidität sowie relevante hämatologische Abweichungen (Hämoglobin < 100 g/l, Thrombozytenzahl $< 100 \times 10^9/l$ oder $> 600 \times 10^9/l$).

3.2.2. Studienprotokoll

Das Studienprotokoll bestand aus zwei Armen, ausschleichendes vs. abruptes Absetzen (im Folgenden *Tapering-* bzw. *Off-*Gruppe), die bezüglich ihrer Auswirkungen auf die Thrombozytenfunktion verglichen wurden. Die *Blister* der *Off-*Gruppe enthielten 28 Tage lang das Verum, also 75mg Clopidogrel, während die der *Tapering-*Gruppe mit Verum und Placebo nach einem festgelegten Ausschleich-Regime gefüllt waren (s. Tabelle 3). Um Beobachtungs- und Behandlungsgleichheit durch doppelte Verblindung zu gewährleisten, sahen die Verum- und Placebo-Tabletten gleich aus.

Der Studieneinschluss mit anschließender erster BE und Thrombozytenfunktionsmessung erfolgte wenige Stunden nach der Kontroll-Angiographie, die erste Einnahme der Studienmedikation am Tag darauf. Es folgten sieben weitere BE in meist wöchentlichem Abstand, sodass der Beobachtungszeitraum

insgesamt acht Wochen betrug (s. Abbildung 3). Die Teilnehmer kamen für die BE in die Klinik, dabei wurde jedes Mal der Studienmedikations-*Blister* überprüft um die *Compliance* zu erfassen.

Tabelle 3: Ausschleich-Regime der Tapering-Gruppe

Woche 1	1	2	3	4	5	6	7
Woche 2	8	9	10	11	12	13	14
Woche 3	15	16	17	18	19	20	21
Woche 4	22	23	24	25	26	27	28

*graue Felder: Verum (Clopidogrel); weiße Felder: Placebo;
Mit freundlicher Genehmigung von Dr. S. Schulz*

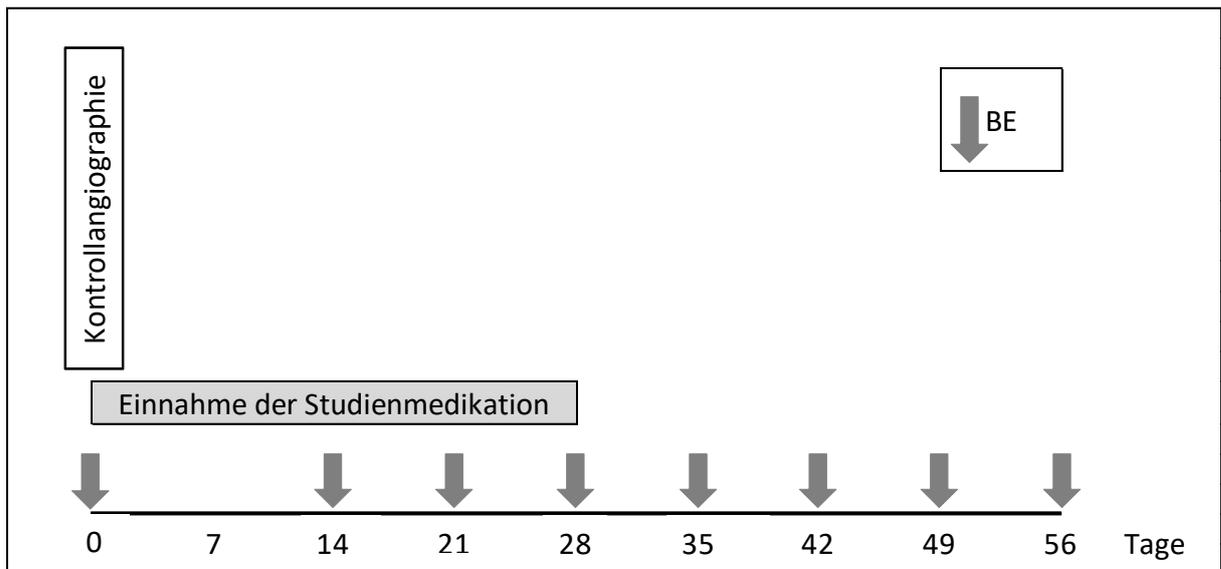


Abbildung 3: Messzeitpunkte der Rebound-Studie

am Zeitpunkt 0 Kontrollangiographie, während der Tage 0 – 18 Einnahme der Studienmedikation, während der Tage 29 – 56 keine Medikamenteneinnahme

3.2.3. Probengewinnung

Die BE erfolgte bei allen Patienten zu jedem MZP in nüchternem Zustand um eine Lipämie zu vermeiden, die die Lichttransmissions-Aggregometrie (LTA) stören könnte. Nach minimaler Stauung wurde eine periphere Unterarm- oder Handvene punktiert. Unter moderater Aspiration wurden dabei jedes Mal die in Tabelle 4 genannten S-Monovetten[®] in der angeführten Reihenfolge vollständig mit Blut gefüllt und daraufhin mehrfach vorsichtig geschwenkt.

Tabelle 4: Blutentnahme

S-Monovetten [®]	Charakteristika	Anzahl	Verwendung
Serum	weiß; mit Gerinnungsaktivator; 7,5 ml	1	Kreatinin, CrP, Fettstoffwechsel-parameter*
Kalium-EDTA	rot; Hämatologie; 2,7 ml	1	Kleines Blutbild
Hirudin	neutrale S-Monovette [®] ; 4,5 ml; mit Refludan [®] , einem rekombinanten Hirudin, in einer Endkonzentration von 25 µg/ml**	1	MEA
		3	LTA
Citrat-1:10	grün; Gerinnung; 5,0 ml	3	LTA
Kanüle	Safety-Multifly [®] -Kanüle mit Multi-Adapter (21 G x 3/4", Nr. 2)		

**durch die Abteilung für Klinische Chemie des DHM; **bezogen über Verum Diagnostica GmbH, München; Alle anderen Artikel stammten von der Firma Sarstedt AG & Co., Nümbrecht.*

Die Blutproben ruhten bei Raumtemperatur mindestens 30 Minuten bevor sie weiter bearbeitet wurden. Der maximale Zeitraum zwischen BE und Thrombozytenfunktionsmessung zwei Stunden. Dies entspricht gängigen Anforderungen zur Minimierung präanalytischer Fehler (Breddin 2005; Harrison, Mackie et al. 2011).

3.2.4. Lichttransmissions-Aggregometrie

Dieses turbidimetrische Verfahren wurde 1962 erstmals von Born (Born 1962) sowie kurz danach von O'Brien in modifizierter Form (O'Brien 1962) beschrieben und gilt seitdem als Goldstandard auf dem Gebiet der Thrombozyten-Diagnostik (Harrison, Mackie et al. 2011). Die meisten Studien, die einen Zusammenhang zwischen dem Ansprechen der Thrombozyten auf eine Clopidogrel-Therapie und ischämischen Ereignissen untersuchten, bedienten sich dieser Methode (Gurbel, Becker et al. 2007).

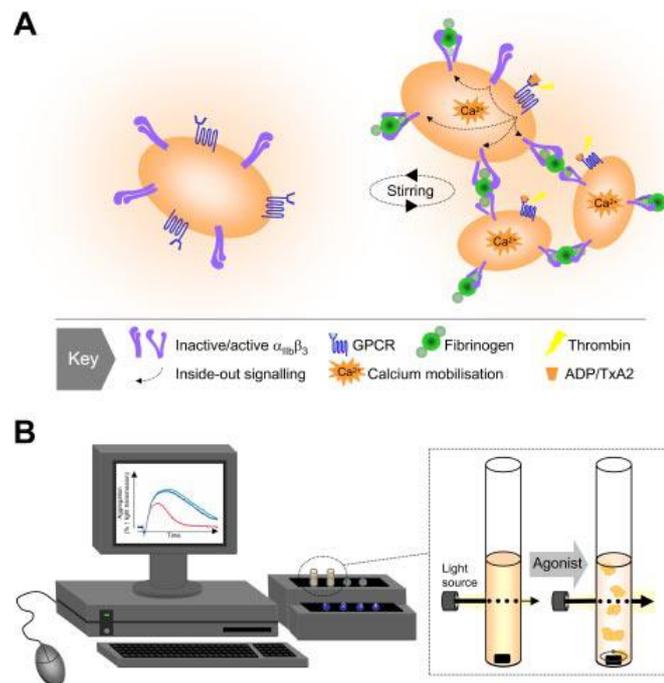


Abbildung 4: Funktionsprinzip der LTA

*Durch die TA kommt es zu einer Abnahme der Partikelzahl und damit der optischen Dichte.
Quelle:(Jackson 2007)*

Das Funktionsprinzip der LTA beruht auf der Tatsache, dass die optische Dichte einer Partikelsuspension wie Blutplasma abhängig von der Anzahl und nicht der Größe der darin befindlichen Partikel ist. Durch die Agonisten-induzierte TA kommt es zur Abnahme der Partikelzahl, wobei die photometrisch gemessene Zunahme der Lichttransmission dem Ausmaß der TA entspricht (s. Abbildung 4). Das Aggregometer wird hierfür mit PPP (klar) als 100%-Wert der Lichttransmission geeicht. PRP (trüb) stellt im Gegensatz dazu den Nullwert dar. (Gawaz 1999; Harrison 2005)

Patienten, Material und Methoden

PRP wurde als Überstand durch Zentrifugieren über zehn Minuten mit 800g ohne Bremse bei 20°C gewonnen. Das hierbei entstandene Sediment wurde zehn Minuten mit 3000g und Bremse bei 20°C zentrifugiert um als Überstand PPP zu gewinnen. Es wurde darauf verzichtet die Thrombozytenzahl im PRP zu bestimmen und anzugleichen (Van Der Stelt, Van Werkum et al. 2007; Linnemann, Schwonberg et al. 2008). Die Messungen fanden bei einer Wellenlänge von 430 nm, 37°C und unter konstantem Rühren mit 1200/min durch ein magnetisches Rührstäbchen statt. Zu je 225µl PRP wurde jeweils 25µl der Agonisten pipettiert (s. Tabelle 5). Die Abnahme der optischen Dichte durch die TA wurde über einen Zeitraum von sechs Minuten kontinuierlich aufgezeichnet. Als Messergebnis wurde die maximale Aggregation in % ausgewertet.

Tabelle 5: LTA

Agonisten	Konzentrationen	Hersteller
ADP	20 µmol/l	möLab GmbH, Langenfeld
	5 µmol/l	
	2,5 µmol/l	
	1,25 µmol/l	
Kollagen (aus Kalbshaut)	0,19 mg/ml	
Thrombin-Rezeptor-aktivierendes Peptid (TRAP)	25 µmol/l	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Geräte	Thermo Scientific Megafuge 2.0R, Heraeus Instruments, Hanau	
	platelet aggregation profiler PAP 8E, Bio/Data Corporation	
Messküvetten	Test Tubes mikro silikonisiert, 7,25 x 55 mm, Bio/Data Corporation	

Alle Reagenzien wurden gemäß den Herstellerangaben als Lyophilisat gelagert und vor Gebrauch rekonstituiert.

3.2.5. *Multiple Electrode-Aggregometrie*

Dieses Verfahren ist eine Weiterentwicklung der erstmals 1980 von Cardinal und Flower (Cardinal and Flower 1980) beschriebenen elektronischen Aggregometrie.

Das Prinzip der MEA beruht auf einer kontinuierlichen Impedanzmessung. Elektronenmikroskopische Beobachtungen zeigten, dass die Elektroden des Aggregometers bei Kontakt mit Blut zunächst von einer Einzelschicht aus Thrombozyten überzogen werden. Nach Zugabe der Agonisten aggregieren immer mehr Thrombozyten mit den an den Elektroden haftenden, sodass es zu einer Abnahme der elektrischen Leitfähigkeit zwischen den beiden Elektroden kommt, welche dem Ausmaß der TA direkt proportional ist (s. Abbildung 5). (Cardinal and Flower 1980; Toth, Calatzis et al. 2006)

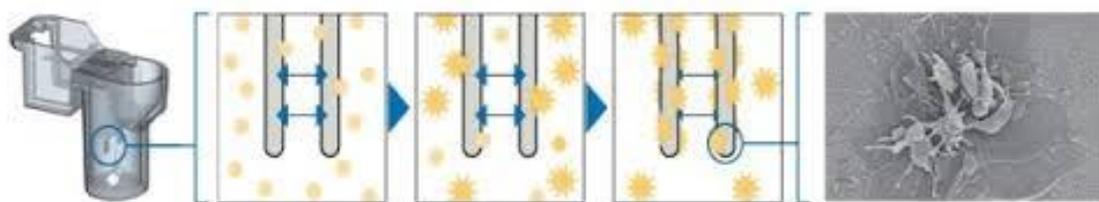


Abbildung 5: Funktionsprinzip der MEA

Durch TA an den Elektroden kommt es zu einer Zunahme der Impedanz.

Quelle: (HaemoviewDiagnostics 2015), mit freundlicher Genehmigung von Roche-Multiplate

Die beiden großen Vorteile dieser Methode sind die einfache und schnelle Benutzung ohne aufwendige und zeitraubende Präanalytik sowie die Messung in verdünntem Vollblut (Sibbing, Braun et al. 2008). In Vollblut wird die Thrombozytenaggregation sowohl von Erythrozyten (Santos, Vallés et al. 1991; Vallés, Santos et al. 1991) als auch von Leukozyten (Glenn, White et al. 2005; Koda, Banno et al. 2005) beeinflusst, die in PRP nicht mehr vorhanden sind. Durch die beim Zentrifugieren entstehenden Scherkräfte können Thrombozyten verletzt werden und hyperaktive Riesenthrombozyten im Sediment landen (Riess, Braun et al. 1986; Dyszkiewicz-Korpanty, Frenkel et al. 2005). Außerdem aggregieren die Thrombozyten bei dieser Methode an den Elektroden, also einer Oberfläche und nicht in flüssiger Phase, was insofern eher den in-vivo Bedingungen entspricht, da sich Thromben meist an verletzter oder atherosklerotisch veränderter Gefäßwand bzw. künstlichen Oberflächen wie Stents bilden (Sibbing, Braun et al. 2008; Sibbing, Braun et al. 2009).

Patienten, Material und Methoden

Nach Verdünnung von 300µl Vollblut mit 300µl 0,9%iger Kochsalzlösung und dreiminütiger Inkubation in den Testzellen unter konstantem Rühren mit einem teflonbeschichteten Rührstäbchen (800/min bei 37°C) wurde jeweils 20µl des induzierenden Agonisten dazu pipettiert (s. Tabelle 6). Die Impedanz-Steigerung wurde über einen Zeitraum von sechs Minuten kontinuierlich aufgezeichnet und in sog. Aggregations-Einheiten (*aggregation units*, AU) dargestellt. Dabei entsprechen 8 AU ungefähr 1 Ohm. Die *area under the curve* (AUC) der so entstandenen Messkurve wird in der Einheit AU*min angegeben. Da jede Testzelle vier Elektroden enthält, entstehen parallel zwei Messkurven, die zur internen Qualitätskontrolle miteinander verglichen werden. Wenn der Pearsonsche Korrelationskoeffizient für einzelne korrespondierende Messwerte innerhalb der beiden Kurvenverläufe <0,98 oder die Differenz einer der beiden AUCs zur mittleren Kurve >20% ist, wird die Messung verworfen und muss wiederholt werden. (Toth, Calatzis et al. 2006; Sibbing, Braun et al. 2008) Als Ergebnis wurden die mittlere maximale Aggregation beider Messkurven in AU sowie die mittlere AUC beider Messkurven in AU*min angegeben.

Tabelle 6: MEA

Test	Agonisten	Konzentrationen
ADPtest	ADP	6,4 µmol/l
ADPtest <i>high sensitivity</i> (HS)	ADP + Prostaglandin E1	6,4 µmol/l + 9,4 nmol/l
COLtest	Kollagen	3,2 µg/ml
TRAPtest	TRAP-6	32 µmol/l
Gerät	Multiplate® Analyzers, Verum Diagnostica GmbH, München	
Verbrauchsmaterial	Einmal-Testzellen, Verum Diagnostica GmbH, München	

Die Reagenzien wurden gemäß den Herstellerangaben als Lyophilisat gelagert und vor Gebrauch rekonstituiert.

3.2.6. Endpunkte und Studiengröße

Die primäre Zielgröße vorliegender Studie war die jeweils höchste maximale induzierte TA (in %) während der komplett Clopidogrel-freien Zeit (Wochen fünf bis acht) gemessen mittels LTA und dem Agonisten ADP in einer Konzentration von $5\mu\text{mol/l}$. Diese ADP-Konzentration wurde auch in anderen Studien zur Clopidogrel-Wirkung auf die Thrombozytenreaktivität gewählt (Müller, Besta et al. 2003; Hochholzer, Trenk et al. 2006).

Für die Berechnung des Stichprobenumfangs wurde die Hypothese aufgestellt, dass die primäre Zielgröße in der *Off*-Gruppe 80 % und in der Tapering-Gruppe 65 % beträgt. Bei einer demnach nachzuweisenden Differenz von 15 % sind mit einer üblichen Teststärke von 80% und einem doppelseitigen Signifikanzniveau α von 0,05 29 Teilnehmer pro Gruppe nötig (NQuery advisor, Version 7.0, Statistical Solutions, Cork, Irland). Um *Drop-Outs* (Teilnehmer, die Protokollverletzungen verursachen und vorzeitig aus der Studie ausscheiden) mit ein zu kalkulieren, wurde die angestrebte Teilnehmerzahl auf 34 pro Gruppe angehoben.

Als sekundärer Endpunkt wurde die jeweils höchste maximale induzierte TA (in $\text{AU}\cdot\text{min}$) während der komplett Clopidogrel-freien Zeit gemessen mittels MEA und dem Agonisten ADP in einer Konzentration von $6,4\mu\text{mol/l}$ festgelegt. Außerdem wurden in beiden Gruppen die TA-Werte im zeitlichen Verlauf der Studie erfasst um ein mögliches *Rebound*-Phänomen zu entdecken. Sie wurden darüber hinaus auf einen signifikanten Unterschied im Vergleich der Mittelwerte während der komplett Clopidogrel-freien Zeit zwischen den beiden Studiengruppen getestet.

3.2.7. Statistische Auswertung

Patientencharakteristika wie Alter, Geschlecht, BMI, Komorbiditäten und Begleitmedikation, wurden als Mittelwerte \pm SD oder als absolute Anzahl (n) mit entsprechenden Prozentsätzen dargestellt. Qualitative Merkmale wurden mit dem χ^2 -Test und kontinuierliche Variablen mit dem t-Test für zwei unverbundene Stichproben verglichen. Das vorausgehende Clopidogrel-Behandlungsintervall der beiden Studiengruppen wurde mit dem Wilcoxon-Test für zwei verbundene Stichproben verglichen.

Die Ergebnisse der Thrombozytenfunktionsmessungen mittels LTA und MEA wurden als Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwerts dargestellt und mit dem t-Test für zwei unverbundene Stichproben zwischen den beiden Studiengruppen sowie mit dem t-Test für zwei verbundene Stichproben innerhalb der jeweiligen Studiengruppen verglichen.

Die Auswertung wurde mit der Software S-PLUS Version 4.5 (Insightful Corp., Seattle, Washington, USA) durchgeführt. Bei einem Signifikanzniveau von 5% wurden p -Werte $<0,05$ als statistisch signifikant angesehen.

4. Ergebnisse

4.1. CYP-Studie

4.1.1. Patientenkollektiv und Cytochrom P450 2C19-Genotyp

Von den 2485 untersuchten Patienten waren 1805 (73%) CYP2C19-Wildtyp-homozygot (*1/*1), 633 (25%) *2-heterozygot (*1/*2) und 47 (2%)*2-homozygot (*2/*2). Diese Genotyp-Verteilung entspricht einer Allelfrequenz von 85,4% für CYP2C19*1 und 14,6% für *2. Es wurde dabei keine signifikante Abweichung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (Hardy 1908; Weinberg 1908) festgestellt ($\rho=0,32$).

Tabelle 7: Patientencharakteristika

Merkmale	Studienkollektiv (n=2485)	*1/*1 (n=1805)	*1/*2 oder *2/*2 (n=680)	ρ
Alter (Jahre)	66,5 ± 10,2	66,4 ± 10,2	66,7 ± 10,3	0,57
Anzahl der Frauen	539 (22,0)	384 (21,3)	155 (22,8)	0,41
Anzahl der Raucher	402 (16,0)	282 (15,6)	120 (17,6)	0,22
BMI (kg/m ²)	27,2 ± 3,9	27,2 ± 3,8	27,2 ± 4,3	0,86
Diabetes mellitus	881 (35,0)	637 (35,2)	244 (35,9)	0,78
Arterielle Hypertonie	1563 (63,0)	1130 (62,6)	433 (63,7)	0,62
Hypercholesterinämie	1204 (48,0)	898 (50,0)	306 (45,0)	0,03
Kreatinin (mg/dl)	1,1 ± 0,4	1,1 ± 0,4	1,1 ± 0,4	0,08
LVEF (%)	55,4 ± 13,2	55,5 ± 13,3	55,1 ± 13,1	0,39
Z. n. MI	801 (32,0)	570 (31,6)	231 (34,0)	0,26
Z. n. Bypass-OP	325 (13,0)	235 (13,0)	90 (13,2)	0,89
Mehrgefäßerkrankung	2006 (81,0)	1458 (80,8)	548 (80,6)	0,92
ACS	846 (34,0)	632 (35,0)	214 (31,5)	0,10
Thrombozyten (x10 ⁹ /l)	224 ± 60	223 ± 59	226 ± 62	0,30

Alle Daten sind als Mittelwert ± SD oder n (%) dargestellt, sofern nicht anders gekennzeichnet. BMI: body mass index; Die Zeitspanne zwischen Clopidogrel-LD und BE (h) ist als Median [IQR] aufgezeigt. Quelle:(Sibbing, Stegherr et al. 2009)

Ergebnisse

Alle erhobenen Variablen waren ausgeglichen zwischen den Wildtyp-Homozygoten und den *2-Trägern bis auf die Hypercholesterinämie, welche unter den Wildtyp-Homozygoten signifikant häufiger war (s. Tabelle 7). Es kann also weitestgehend von einer Strukturgleichheit der beiden Gruppen ausgegangen werden.

Tabelle 8: Angiographische und interventionsspezifische Charakteristika

Merkmale		Studienkollektiv (n=2485)	*1/*1 (n=1805)	*1/*2 oder *2/*2 (n=680)	ρ
Stent-Typ	DES	623 (25,0)	466 (25,8)	157 (23,1)	0,16
	BMS	1862 (75,0)	1339 (74,2)	523 (76,9)	
Lokalisation der Läsion	LM	48 (1,9)	40 (2,2)	8 (1,2)	0,21
	LAD	1042 (41,9)	766 (42,4)	276 (40,6)	
	LCx	631 (25,4)	461 (25,5)	170 (25,0)	
	RCA	707 (28,5)	495 (27,4)	212 (31,2)	
Bypass-Gefäß		57 (2,3)	43 (2,4)	14 (2,1)	
Gefäß-Durchmesser (mm)		2,8 ± 0,6	2,78 ± 0,6	2,8 ± 0,5	0,95
AHA/ACC Läsion-Typ B2/C		1809 (72,8)	1296 (71,8)	513 (75,4)	0,07
Länge der Läsion (mm)		12,8 ± 7,0	12,7 ± 6,9	13,2 ± 7,3	0,08
Behandlung mit Abciximab		1234 (50,0)	897 (50,0)	337 (50,0)	0,95

Alle Daten sind als Mittelwert ± SD oder n (%) dargestellt, sofern nicht anders gekennzeichnet. LM: left main; LAD: left anterior descending; LCx: left circumflex artery; RCA: right coronary artery; AHA: American Heart Association; ACC: American College of Cardiology; Typ B2/C beschreibt komplexe koronare Läsionen nach der AHA/ACC-Klassifikation der Stenosemorphologie; Quelle:(Sibbing, Stegherr et al. 2009)

In Tabelle 8 sind angiographische und interventionsspezifische Daten der teilnehmenden Patienten aufgeführt. Auch hier ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen. Insbesondere der Anteil der Patienten, die im Rahmen der PCI mit Abciximab behandelt wurden, eine mögliche Einflussgröße, war unter Wildtyp-Homozygoten und *2-Trägern gleich (50%).

4.1.2. Cytochrom P450 2C19-Genotyp und klinisches Outcome

Der primäre Endpunkt einer gesicherten frühen ST trat in 17 Patienten (0,7% des Studienkollektivs) auf, davon waren zehn *2-Träger und sieben Wildtyp-Homozygote. Die kumulative 30-Tages-Inzidenz einer gesicherten ST war demnach unter *2-Trägern mit 1,5% signifikant höher als unter Wildtyp-Homozygoten mit 0,4% (HR: 3,81; 95% CI: 1,45–10,02; $p=0,007$). Im Sinne eines Gendosis-Effekts hatten Patienten mit zwei mutierten CYP2C19-Allelen (*2/*2) das höchste Risiko eine gesicherte frühe ST zu erleiden ($p=0,002$; Armitage- χ^2 -Trendtest; s. Abbildung 6).

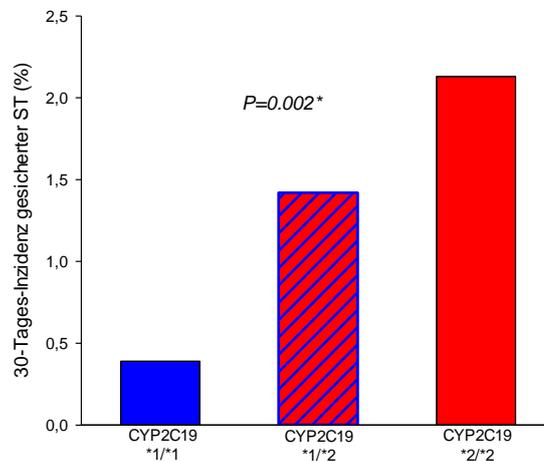


Abbildung 6: Kumulative Inzidenz gesicherter früher ST

*Homozygote *2-Träger haben das höchste Risiko eine Stentthrombose zu erleiden. Heterozygote *2-Träger haben ein intermediäres Risiko. Quelle:(Sibbing, Stegherr et al. 2009)*

Heterozygote *2-Träger trugen diesbezüglich ein intermediäres und Wildtyp-Homozygote das niedrigste Risiko. In Tabelle 9 ist das Auftreten ischämischer Ereignisse bei Wildtyp-Homozygoten und *2-Trägern dargestellt. Neben der gesicherten ST zeigte sich innerhalb des Nachbeobachtungszeitraums von 30 Tagen auch für STEMI und ischämische zerebrale Insulte eine signifikant höhere Inzidenz unter den *2-Trägern im Vergleich zu den Wildtyp-Homozygoten. Tabelle 10 zeigt die Ergebnisse der multivariaten Cox-Regressionsanalyse. Hierbei stellte sich unter allen einbezogenen Variablen nur die *2-Trägerschaft als unabhängiger Prädiktor der gesicherten frühen ST heraus (HR: 3,86; 95% CI: 1,47–10,14; $p=0,006$).

Ergebnisse

Tabelle 9: Klinisches *Outcome*

Ischämische Ereignisse	*1/*1 (n=1805)	*1/*2 oder *2/*2 (n=680)	HR (95%CI)	ρ
Gesicherte ST	7 (0,4)	10 (1,5)	3,81 (1,45–10,02)	0,007
Tod	16 (0,9)	5 (0,7)	0,83 (0,30–2,26)	0,71
STEMI	9 (0,5)	10 (1,5)	2,96 (1,20–7,28)	0,02
NSTEMI / instabile Angina pectoris	102 (5,6)	38 (5,6)	0,99 (0,68–1,44)	0,96
MI / Tod	121 (6,7)	52 (7,6)	1,14 (0,83–1,58)	0,42
Ischämischer zerebraler Insult	0 (0,0)	4 (0,6)	-	0,001

Alle Daten sind als n (%) dargestellt. Quelle: (Sibbing, Stegherr et al. 2009)

Tabelle 10: Ergebnisse der multivariaten Cox-Regressionsanalyse

Merkmal	HR (95%CI)	ρ
*2-Trägerschaft	3,86 (1,47–10,14)	0,006
Alter*	1,10 (0,69–1,77)	0,69
ACS	2,18 (0,69–6,84)	0,18
Diabetes mellitus	2,13 (0,82–5,58)	0,12
Stent-Typ	0,79 (0,23–2,76)	0,71
Behandlung mit Abciximab	0,71 (0,27–1,87)	0,49

**Berechnet für eine Erhöhung des Alters um zehn Jahre. Quelle: (Sibbing, Stegherr et al. 2009)*

4.2. Rebound-Studie

4.2.1. Patientenkollektiv

Es lagen vollständige Thrombozytenfunktionsmessungen bei insgesamt 69 Patienten vor. Davon waren 35 in der *Tapering*- und 34 in der *Off*-Gruppe (s. Abbildung 7). Die Kontrolle der Studienmedikations-*Blister* zeigte volle *Compliance*. Unter den ursprünglich eingeschlossenen 76 Patienten waren sieben *Drop-Outs*, als Grund wurde Zeitmangel angegeben. Die Patientencharakteristika waren zwischen beiden Studiengruppen ausgeglichen (s. Tabelle 11). Während der gesamten Beobachtungszeit traten bei keinem der Patienten ischämische oder Blutungskomplikationen auf.

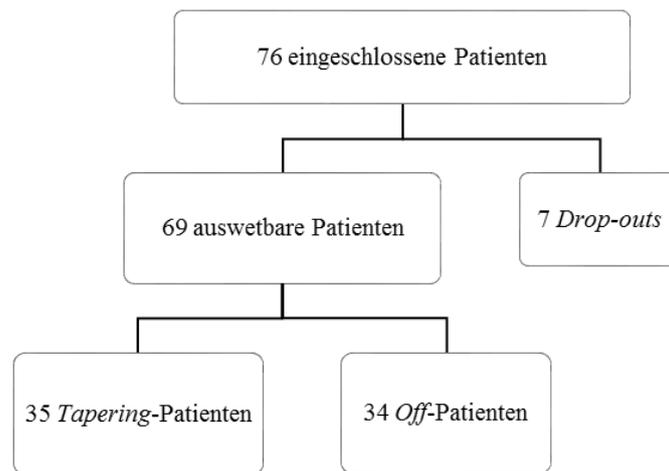


Abbildung 7: Studienteilnehmer der *Rebound*-Studie

Tabelle 11: Patientencharakteristika

Merkmale	<i>Off</i> (n=34)	<i>Tapering</i> (n=35)	p
Alter (Jahre)	67,7 ± 9,5	66,2 ± 7,6	0,48
Anzahl der Frauen (%)	5 (14,7)	9 (25,7)	0,26
Anzahl der Raucher (%)	3 (8,8)	5 (14,3)	0,48
BMI (kg/m ²)	26,1 ± 3,0	27,7 ± 4,7	0,09
Diabetes mellitus (%)	6 (17,6)	6 (17,1)	0,96

Ergebnisse

Arterielle Hypertonie		32 (94,1)	33 (94,3)	0,98
Hypercholesterinämie		25 (74,0)	24 (69,0)	0,65
Positive Familienanamnese für KHK		12 (35,0)	16 (46,0)	0,38
Mehrf Gefäßkrankung		30 (88,2)	26 (74,3)	0,14
Z. n. MI		13 (38,0)	11 (31,0)	0,55
Z. n. PCI		34 (100)	35 (100)	-
Z. n. Bypass-OP		5 (14,7)	1 (3,0)	0,08
Dauer der Clopidogrel-Einnahme (Monaten)*		12 (7-19)	7 (7-14)	0,34
Thrombozytenzahl ($\times 10^9 / l$)		215,4 \pm 50,3	218,5 \pm 49,2	0,80
Hämoglobinwert (g/dl)		14,4 \pm 1,2	14,2 \pm 1,5	0,41
Begleitmedikation	Aspirin	34 (100)	35 (100)	-
	β -Blocker	29 (85,3)	32 (91,4)	0,43
	ACE-Hemmer	22 (65,0)	24 (69,0)	0,73
	Statine	31 (91,2)	31 (88,6)	0,72
	CCB	6 (17,6)	2 (5,7)	0,12
	PPI	9 (26,0)	11 (31,0)	0,65
Charakteristika der vorangegangenen PCI				
Klinik	Stabile Angina pectoris	21 (61,8)	21 (60,0)	0,88
	ACS	13 (38,2)	14 (40,0)	
DES-Typ	Sirolimus-eluting Stent	17 (50,0)	20 (57,1)	0,87
	Everolimus-eluting Stent	11 (32,3)	11 (31,4)	
	Paclitaxel-eluting Stent	4 (11,8)	3 (8,6)	
	Zotarolimus-eluting Stent	2 (5,9)	1 (2,9)	

*Alle Daten sind als Mittelwert \pm SD oder als n (%) dargestellt, sofern nicht anderweitig benannt. Die angiographischen Charakteristika der vorangegangenen PCI beziehen sich auf die initiale Angiographie. *Dauer der Clopidogrel-Einnahme (Monate) entspricht der Zeitspanne zwischen dem Beginn der Clopidogrel-Therapie und dem Studieneinschluss und wurden als Median (IQR) dargestellt. ACE: Angiotensin-converting enzyme; Quelle:(Sibbing, Stegherr et al. 2010)*

4.2.2. Lichttransmissions-Aggregometrie

Für die primäre Zielgröße, die jeweils höchste maximale induzierte TA (in %) während der komplett Clopidogrel-freien Zeit (Wochen fünf bis acht) gemessen mittels LTA und dem Agonisten ADP in einer Konzentration von $5\mu\text{mol/l}$, wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Studiengruppen festgestellt ($73,0 \pm 2,5\%$ in der *Off*-Gruppe vs. $69,3 \pm 1,5\%$ in der *Tapering*-Gruppe; $p=0,21$).

Da alle Patienten zusätzlich zur MD von 75mg noch eine Clopidogrel-LD von 600mg vor der Kontroll-Angiographie erhalten hatten, waren alle TA-Werte des ersten MZP direkt nach Studieneinschluss signifikant niedriger als die der Woche zwei ($p<0,01$).

In den Abbildungen 8 bis 11 ist der zeitliche Verlauf der ADP-induzierten TA-Werte beider Gruppen ab dem Studieneinschluss dargestellt. Die Abbildungen 12 und 13 zeigen den zeitlichen Verlauf der Kollagen- und TRAP-induzierten TA-Werte. Es konnte kein *Rebound*-Phänomen im Sinne eines Maximums nach dem vollständigen Absetzen mit anschließendem Rückgang auf moderatere Werte beobachtet werden. Für keinen der benutzten Agonisten wurde ein signifikanter Unterschied im Vergleich der Mittelwerte während der komplett Clopidogrel-freien Zeit zwischen den beiden Studiengruppen festgestellt ($p\geq 0,39$ für $1,25\mu\text{mol/l}$ ADP; $p\geq 0,40$ für $2,5\mu\text{mol/l}$ ADP; $p\geq 0,35$ für $5\mu\text{mol/l}$ ADP; $p\geq 0,54$ für $20\mu\text{mol/l}$ ADP, $p\geq 0,15$ für TRAP und $p\geq 0,31$ für Kollagen).

Ergebnisse

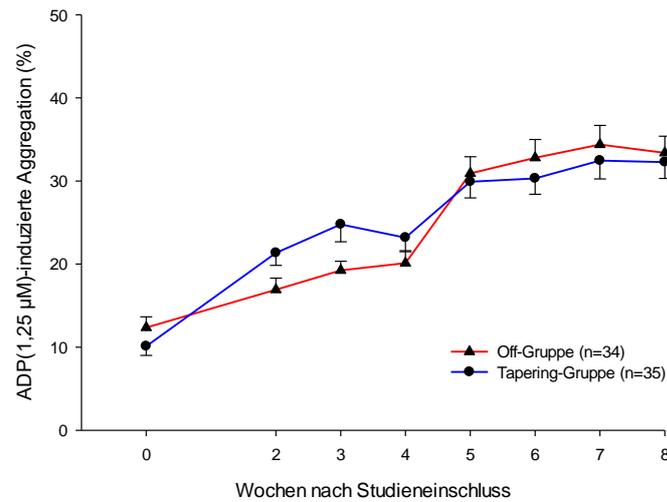


Abbildung 8: LTA-ADP (1,25 µM)-induzierte Aggregation

Zeitlicher Verlauf der mit 1,25µM ADP induzierten TA-Werte gemessen mittels LTA. Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Studiengruppen. Quelle:(Sibbing, Stegherr et al. 2010)

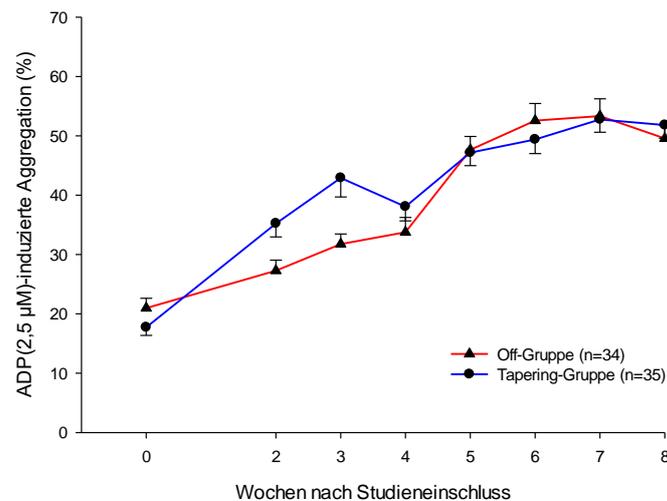


Abbildung 9: LTA-ADP (2,5 µM)-induzierte Aggregation

Zeitlicher Verlauf der mit 2,5µM ADP induzierten TA-Werte gemessen mittels LTA. Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Studiengruppen. Quelle:(Sibbing, Stegherr et al. 2010)

Ergebnisse

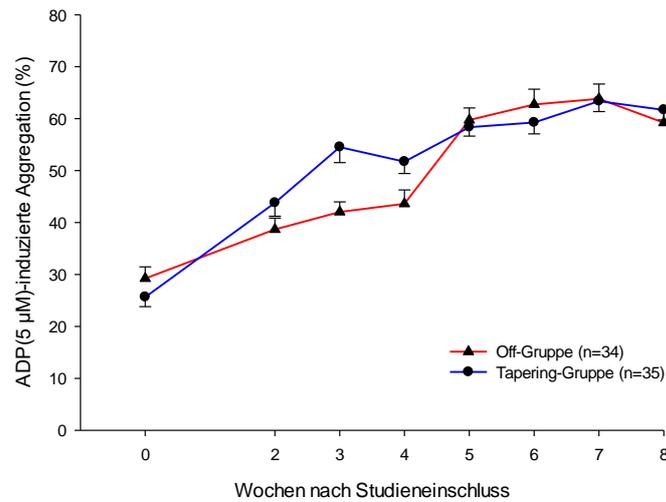


Abbildung 10: LTA-ADP (5 µM)-induzierte Aggregation

Zeitlicher Verlauf der mit 5µM ADP induzierten TA-Werte gemessen mittels LTA. Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Studiengruppen. Quelle: (Sibbing, Stegherr et al. 2010)

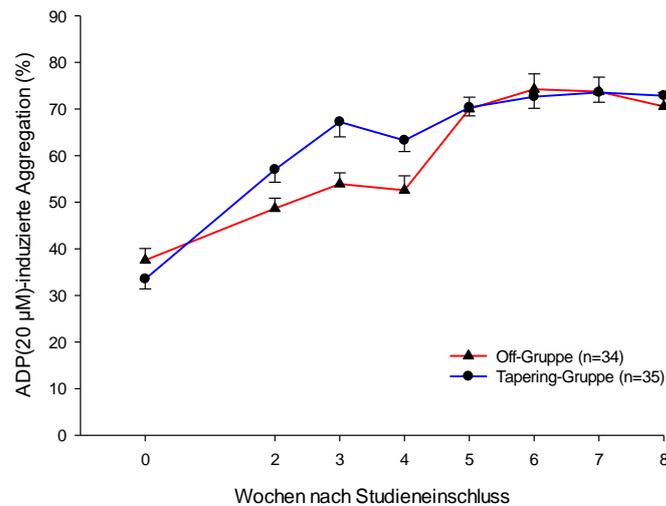


Abbildung 11: LTA-ADP (20 µM)-induzierte Aggregation

Zeitlicher Verlauf der mit 20 µM ADP induzierten TA-Werte gemessen mittels LTA. Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Studiengruppen. Quelle: (Sibbing, Stegherr et al. 2010)

Ergebnisse

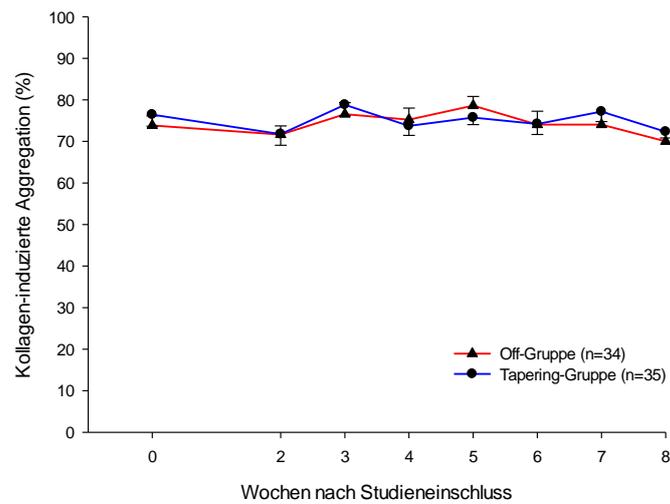


Abbildung 12: LTA-Kollagen-induzierte Aggregation

Zeitlicher Verlauf der mit Kollagen induzierten TA-Werte gemessen mittels LTA. Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Studiengruppen. Quelle:(Sibbing, Stegherr et al. 2010)

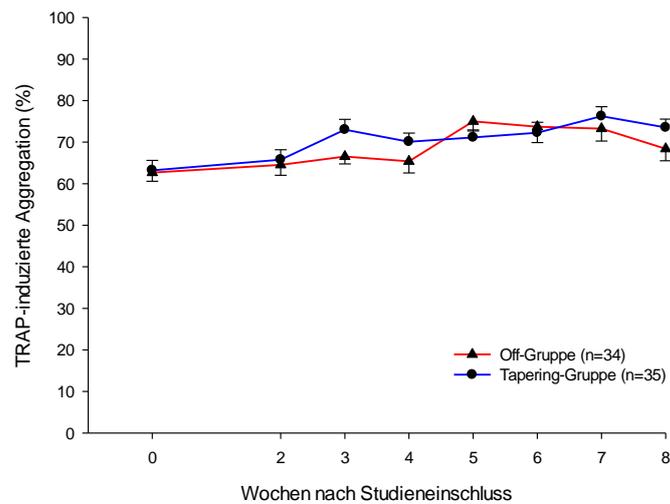


Abbildung 13: LTA-TRAP-induzierte Aggregation

Zeitlicher Verlauf der mit TRAP induzierten TA-Werte gemessen mittels LTA. Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Studiengruppen. Quelle:(Sibbing, Stegherr et al. 2010)

4.2.3. Multiple Electrode-Aggregometrie

Für den sekundären Endpunkt, die jeweils höchste maximale induzierte TA (in AU*min) während der komplett Clopidogrel-freien Zeit gemessen mittels MEA und dem Agonisten ADP in einer Konzentration von 6,4µmol/l, wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Studiengruppen festgestellt (925 ± 43 AU*min in der *Off*-Gruppe vs. 890 ± 39 AU*min in der *Tapering*-Gruppe; $\rho=0,55$).

Da alle Patienten zusätzlich zur MD von 75mg noch eine Clopidogrel-LD von 600mg vor der Kontroll-Angiographie erhalten hatten, waren die TA-Werte des ersten MZP direkt nach Studieneinschluss signifikant niedriger als die der Woche zwei ($\rho < 0,01$, genau wie bei der LTA).

Die Abbildungen 14 bis 17 zeigen den zeitlichen Verlauf der durch die verschiedenen Agonisten induzierten TA-Werte für beide Gruppen ab dem Studieneinschluss. Es konnte keine überschießende Reaktion im Sinne eines Maximums nach dem vollständigen Absetzen mit anschließendem Rückgang auf moderatere Werte beobachtet werden. Für keinen der benutzten Agonisten wurde ein signifikanter Unterschied im Vergleich der Mittelwerte während der komplett Clopidogrel-freien Zeit zwischen den beiden Studiengruppen festgestellt ($\rho \geq 0,32$ für ADP; $\rho \geq 0,18$ für ADPHS; $\rho \geq 0,48$ für TRAP-6; $\rho \geq 0,06$ für Kollagen).

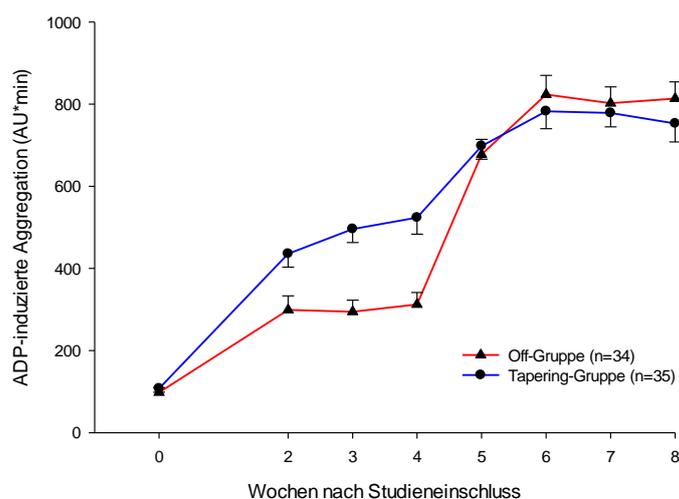


Abbildung 14: MEA-ADP-induzierte Aggregation

Zeitlicher Verlauf der mit ADP induzierten TA-Werte gemessen mittels MEA. Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den Studiengruppen. Quelle: (Sibbing, Stegherr et al. 2010)

Ergebnisse

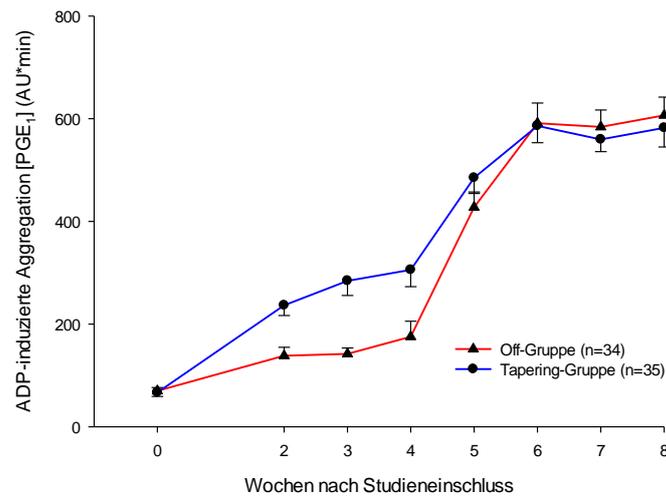


Abbildung 15: MEA-ADPHS-induzierte Aggregation

Zeitlicher Verlauf der mit ADPHS induzierten TA-Werte gemessen mittels MEA. Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den Studiengruppen Quelle: (Sibbing, Stegherr et al. 2010)

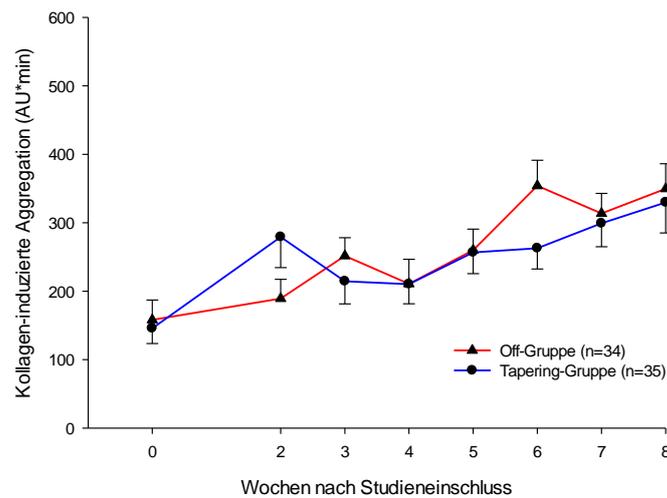


Abbildung 16: MEA-Kollagen-induzierte Aggregation

Zeitlicher Verlauf der mit Kollagen induzierten TA-Werte gemessen mittels MEA. Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den Studiengruppen Quelle: (Sibbing, Stegherr et al. 2010)

Ergebnisse

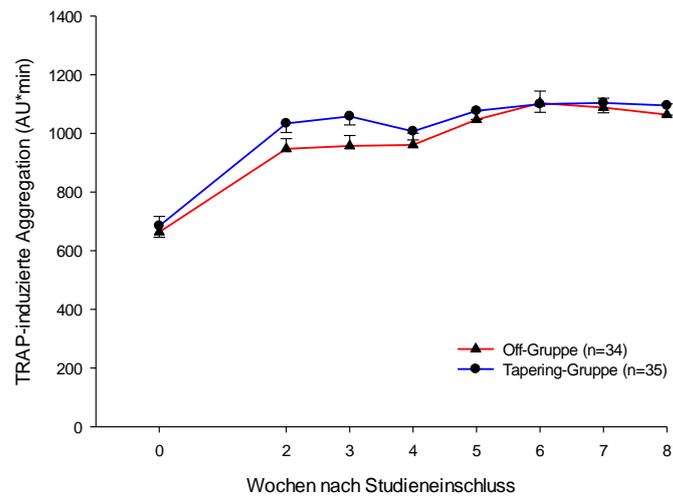


Abbildung 17: MEA-TRAP-induzierte Aggregation

Zeitlicher Verlauf der mit TRAP induzierten TA-Werte gemessen mittels MEA. Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den Studiengruppen Quelle:(Sibbing, Stegherr et al. 2010)

5. Diskussion

5.1. CYP-Studie

5.1.1. Ergebnisse der eigenen Studie

Das Hauptergebnis der CYP-Studie ist, dass Patienten, die ein oder zwei *2-Allele tragen, ein signifikant höheres Risiko einer Stentthrombose haben als Patienten, die keines tragen. Genauer gesagt, wurde eine ungefähr dreifache Risikoerhöhung für *2-Allelträger verglichen mit Wildtyp-Homozygoten beobachtet. Dieses Ergebnis wird dadurch bestärkt, dass sich ein Gendosis-Effekt des *2-Allels gezeigt hat, wonach homozygote *2-Träger das höchste und Heterozygote ein intermediäres Risiko für ST trugen. Ein weiteres wesentliches Ergebnis ist, dass es sich bei dem *2-Trägerstatus um einen unabhängigen Prädiktor für das Auftreten von ST handelt. Durch Genotypisierung können also Patienten identifiziert werden, die ein höheres ST-Risiko tragen. Außerdem konnten auch andere klinische Endpunkte wie STEMI und ischämischer zerebraler Insult mit dem *2-Trägerstatus in Zusammenhang gebracht werden.

5.1.2. Nachfolgende positive Studien

Collet et al. zeigten 2009 einen starken Zusammenhang zwischen der *2-Allelvariante und einer aus kardiovaskulär bedingtem Tod, nicht-fatalem MI und dringlicher Revaskularisierung zusammengesetzten primären Zielgröße sowie dem Auftreten von ST (Collet, Hulot et al. 2009). In dem untersuchten Hochrisikokollektiv aus jungen MI-Patienten mit einer hohen Ereignisrate von fast 10% sowie einer ST-Inzidenz von 4,6% konnte sich der negative Effekt des *2-Allels vermutlich stärker manifestieren.

Auch unter den 1477 mit Clopidogrel behandelten Teilnehmern der TRITON-TIMI 38-Studie (*Trial to Assess Improvement in Therapeutic Outcomes by Optimizing Platelet Inhibition with Prasugrel – Thrombolysis in Myocardial Infarction*) hatten Träger eines CYP2C19-Genotyps mit reduzierter Funktion (zu 95% *2) eine relative Risikoerhöhung um 53% für unerwünschte kardiovaskuläre Ereignisse (*major adverse cardiovascular events*, MACE, zusammengesetzt aus kardiovaskulär bedingtem Tod, MI und zerebralem Insult) verglichen mit Wildtyp-Trägern (Mega, Close et al. 2009). Das Studienkollektiv bestand dabei komplett aus ACS-Patienten, hatte also ebenfalls

ein höheres Ausgangsrisiko als das der vorliegenden Studie. Für ST zeigte sich wie in der vorliegenden Studie sogar eine dreifache Risikoerhöhung.

Giusti et al. fanden bei 772 DES-Patienten sowohl die *2-Trägerschaft als auch eine persistierend hohe Thrombozytenreaktivität als unabhängige Prädiktoren für das Auftreten von ST sowie für die Kombination aus ST und kardialer Mortalität heraus (Giusti, Gori et al. 2009). Das gemeinsame Vorliegen dieser beiden Risikofaktoren war dabei mit einem besonders hohen Risiko assoziiert. Auch Harmsze et al. beobachteten, allerdings anhand einer Fall-Kontroll-Studie, ein erhöhtes Risiko für ST unter *2- und *3-Trägern (Harmsze, van Werkum et al. 2010).

Zwei Metaanalysen konnten das erhöhte Risiko für MACE (zusammengesetzt aus Tod, nicht-fatalem MI, ischämischem zerebralen Insult und dringlicher koronarer Revaskularisierung) unter homo- und heterozygoten Trägern des *2 Allels bzw. eines anderen CYP2C19-Allels mit reduzierter Funktion bestätigen (Hulot, Collet et al. 2010; Mega, Simon et al. 2010). Diese Risikoerhöhung scheint bei PCI-Patienten am stärksten ausgeprägt zu sein, da diese durch eine Clopidogrel-Therapie die größte Risikoreduktion erfahren (Mega, Simon et al. 2010).

5.1.3. Nachfolgende negative Studien

Die genetische Substudie der CURE-Studie (*Clopidogrel in Unstable Angina to Prevent Recurrent Events trial*) (Pare, Mehta et al. 2010), konnte dagegen keinen Unterschied in der Risikoreduktion durch Clopidogrel verglichen mit Placebo in Abhängigkeit vom CYP2C19-Genotyp nachweisen. Dieses Ergebnis könnte daran liegen, dass nur 14,5% der untersuchten Patienten mit Stentimplantation (BMS) behandelt wurden und damit besonders auf ein Ansprechen auf Clopidogrel angewiesen waren.

Simon et al. fanden in einer Frankreich-weiten Untersuchung an 2208 ACS-Patienten, die Clopidogrel erhielten, ein im Vergleich zu Nichtträgern höheres Risiko für MACE nur unter Trägern von zwei CYP2C19-Allelen mit reduzierter Funktion (*2, *3, *4 oder*5), nicht aber für Heterozygote (Simon, Verstuyft et al. 2009). Träger eines homozygoten CYP2C19-Genotyps mit reduzierter Funktion hatten dabei ein fast vierfach erhöhtes Risiko kardiovaskulärer Komplikationen verglichen mit Nichtträgern. Dieser Zusammenhang war besonders ausgeprägt unter Patienten, die

mit PCI behandelt wurden. In besagtem Studienkollektiv wurden insgesamt knapp 70% der ACS-Patienten mit PCI behandelt. Unter denjenigen, die im Verlauf ein unerwünschtes kardiovaskuläres Ereignis erlitten, war die Rate der initial mit PCI behandelten Patienten jedoch unter 50%. Vielleicht hätte sich auch ein heterozygoter Genotyp als signifikant erwiesen, wenn alle Studienpatienten mit PCI behandelt worden wären.

5.1.4. Mögliche klinische Implikationen

Am 03.12.2010 veröffentlichte die *Food and Drug Administration* der USA ein *Boxed Warning* für Plavix®, in dem vor einer verminderten Generierung des aktiven Clopidogrel-Metaboliten bei sog. *poor metabolizern* gewarnt und über die Möglichkeit der CYP2C19-Genotypisierung informiert wird. Außerdem wird darin dazu aufgefordert, andere antithrombozytäre Präparate oder eine alternative Dosierung von Clopidogrel bei *poor metabolizern* in Betracht zu ziehen (FDA 2010). Damani und Topol forderten sogar eine routinemäßige Genotypisierung um die antithrombozytäre Therapie zu individualisieren und dadurch thrombotische Komplikationen bei PCI-Patienten zu vermeiden (Damani and Topol 2010).

Eine Möglichkeit zur Optimierung der antithrombozytären Therapie bei Trägern eines CYP2C19-Allels mit reduzierter Funktion ist die Verabreichung einer höheren Clopidogrel-Dosis. Tatsächlich zeigte sich in kleineren Studien eine doppelten MD (Gladding, White et al. 2009; Hulot, Wuerzner et al. 2010; Simon, Bhatt et al. 2011) bzw. eine höhere LD (Collet, Hulot et al. 2011) vorteilhaft für das Ansprechen auf Clopidogrel. In der großangelegten GRAVITAS (*Gauging Responsiveness with A VerifyNow assay - Impact on Thrombosis and Safety*)-Studie konnte dagegen kein Vorteil einer an die Thrombozytenreaktivität (allerdings ohne Genotypisierung) angepassten Clopidogrel-Therapie beobachtet werden (Price, Berger et al. 2011). Ein Schwachpunkt dieser Studie ist jedoch, dass 40,8% der untersuchten Patienten schlecht auf Clopidogrel ansprachen. Diese hohe Zahl spricht für eine schlechte Spezifität der angewandten Methode (VerifyNow®) bzw. der Definition eines schlechten Ansprechens auf Clopidogrel ($P2Y_{12}$ -reaction units, $PRU \geq 230$). In einer nachfolgenden Analyse der gleichen Studienpopulation konnte jedoch gezeigt werden, dass das Erreichen einer höheren Thrombozyteninhibition ($PRU < 208$) mittels

einfacher oder doppelter MD mit einem besseren klinischen *Outcome* assoziiert ist (Price, Angiolillo et al. 2011).

Aber auch der Einsatz alternativer P2Y₁₂-Inhibitoren im Rahmen einer individualisierten Therapie wurde diskutiert. Die Wirkung von Prasugrel scheint, im Gegensatz zu Clopidogrel, nicht so stark durch eine eingeschränkte Funktion einer einzelnen CYP-Isoform beeinflusst zu werden (Brandt, Close et al. 2007; Varenhorst, James et al. 2009; Alexopoulos, Xanthopoulou et al. 2011) und könnte deshalb eine Behandlungsalternative für Träger des *2-Allels darstellen. Eine genetische Substudie der PLATO (*PLATelet inhibition and patient Outcomes*)-Studie zeigte einen Vorteil von Ticagrelor gegenüber Clopidogrel innerhalb der ersten 30 Tage nach einem ACS, vor allem bei Patienten, die ein CYP2C19-Allel mit reduzierter Funktion tragen (Wallentin, James et al. 2010).

Kritiker der Forderung nach routinemäßiger Genotypisierung führen jedoch an, dass die klinische Effektivität und Sicherheit einer an den CYP2C19-Genotyp angepassten Therapie erst durch große prospektive Studien erwiesen werden müsste und die Datenlage diesbezüglich noch nicht ausreichend Evidenz-basierend sei (Gurbel, Tantry et al. 2010; Roden and Shuldiner 2010).

Außerdem ist die *2-Allelvariante nur einer von vielen Einflussfaktoren auf das Ansprechen auf Clopidogrel, sie bedingt ca. 12% der Ansprech-Variabilität (Shuldiner, O'Connell et al. 2009). Die bekannten Risikofaktoren für ein schlechtes Ansprechen (*high on-treatment platelet reactivity*) setzen sich aus genetischen, aber auch klinischen Faktoren wie Komorbiditäten, Begleitmedikation und Non-Compliance zusammen (Sibbing, Byrne et al. 2011).

Da ein Umkehrschluss von *2-Trägerstatus auf ein vermindertes Ansprechen auf Clopidogrel nur in 56% der Fälle möglich ist, scheint die Genotypisierung allein nur ein Teilaspekt zu sein auf dem Weg zu einer personalisierten antithrombozytären Therapie (Gurbel, Tantry et al. 2010). Gurbel zitiert in seinem Artikel „Genotyping – One Piece of the Puzzle to Personalize Antiplatelet Therapy“ eine eigene Untersuchung laut der Genotypisierung und Thrombozytenfunktionsmessung einzeln bei recht hoher Spezifität jeweils nur eine Sensitivität von 46% für die Identifikation von Patienten mit klinischem Ereignis aufweisen, in Kombination jedoch eine Sensitivität von 75% erreichen (Gurbel, Tantry et al. 2010). Die Anwendung beider

Diskussion

Methoden, z.B. ein Screening mittels Genotypisierung mit anschließender Thrombozytenfunktionsmessung bei Trägern eines Allels mit reduzierter Funktion (Roden and Shuldiner 2010), könnte in Zukunft Patienten mit erhöhtem Risiko nach Stentimplantation identifizieren. Hierfür wären schnell und einfach durchführbare, kostengünstige Methoden sinnvoll (Gurbel, Tantry et al. 2010). Inwiefern die antithrombozytäre Therapie daraufhin bei den so identifizierten Risikopatienten angepasst werden soll, muss allerdings erst in großen, randomisierten Studien evaluiert werden.

5.2. Rebound-Studie

5.2.1. Ergebnisse und Studienlimitationen

Die *Rebound*-Studie zeigt, dass das ausschleichende Absetzen einer Clopidogrel-Langzeittherapie verglichen mit dem abrupten Absetzen die TA-Werte nicht signifikant senkt. Die zweite Hauptidee ist, dass der zeitliche Verlauf der TA-Werte eher auf eine einfache Erholung der Thrombozytenfunktion als auf ein *Rebound*-Phänomen hinweist, da keine überschießende Reaktion im Sinne eines Maximums nach dem vollständigen Absetzen mit anschließendem Rückgang auf moderatere Werte beobachtet werden konnte.

Trotzdem kann ein möglicher klinischer Nutzen des ausschleichenden Absetzens bei KHK-Patienten nicht ausgeschlossen werden. Es wäre möglich, dass sich neben den untersuchten maximalen Werten der TA ein langsamerer Anstieg dieser Werte, wie er durch das *Tapering*-Regime erzielt wurde, vorteilhaft auf eine Minimierung thrombotischer Ereignisse auswirkt.

Die Ergebnisse dieser Studie wurden übereinstimmend mittels LTA in PRP, welche nach wie vor als Goldstandard der Thrombozytenfunktionsmessung angesehen wird (Harrison, Mackie et al. 2011), und MEA in Vollblut ermittelt. Die Oberflächenexpression aktivierungsabhängiger Rezeptoren auf der Thrombozyten-Plasmamembran wurde dabei nicht eigens untersucht. Allerdings dient bis jetzt meist die ADP-TA als Surrogat-Marker um die Thrombozytenreaktivität mit dem Risiko ischämischer Ereignisse nach PCI in Verbindung zu bringen. Sowohl für die LTA als auch für die MEA konnte ein Zusammenhang zwischen erhöhter ADP-TA nach Clopidogrel-Einnahme und dem Auftreten ischämischer Ereignisse gezeigt werden (Geisler, Langer et al. 2006; Hochholzer, Trenk et al. 2006; Buonamici, Marcucci et al. 2007; Sibbing, Braun et al. 2009). Da obengenannter Zusammenhang extensiv dargestellt wurde, kann davon ausgegangen werden, dass diese beiden Methoden geeignet sind eine verstärkte Thrombozytenreaktivität und somit ein erhöhtes Risiko für ischämische Ereignisse zu erfassen.

Neben der Stimulation des P2Y₁₂-Signalwegs durch ADP wurden auch Kollagen und TRAP als Agonisten benutzt. Da diese Agonisten Signalwege stimulieren, die durch Clopidogrel nicht beeinträchtigt werden, dienten diese Messungen als Positiv-

Diskussion

Kontrolle. Eine nahezu maximale ADP-TA, wie sie ohne Clopidogrel-Wirkung nach dem vollständigen Absetzen zu erwarten wäre, könnte ein mögliches *Rebound*-Phänomen bei der LTA maskieren. Es wurden deshalb zusätzlich zu den in anderen Studien üblichen ADP-Konzentrationen (20 und 5 µmol/l) auch niedrigere Konzentrationen (2,5 und 1,25 µmol/l) eingesetzt, die erwartungsgemäß ein geringeres Ausmaß an TA hervorriefen. Auf diese Weise konnte zwischen den hohen Aggregationswerten besser differenziert werden. Bei der MEA ist dies nicht notwendig, da es keinen maximalen Aggregationswert gibt.

Das Patientenkollektiv bestand ausschließlich aus stabilen KHK-Patienten nach DES-Implantation mit begleitender Aspirin-Therapie. Es kann deshalb nicht ausgeschlossen werden, dass bei klinisch instabilen Patienten oder Patienten ohne Aspirin-Therapie doch ein Thrombozyten-*Rebound*-Phänomen nach Absetzen von Clopidogrel auftreten könnte. Dieser Fall sollte jedoch durch leitliniengerechte Therapie und gute *Compliance* der Patienten nur in Ausnahmen vorkommen, da bei instabilen KHK-Patienten eine dualen antithrombozytäre Therapie nicht abgesetzt werden sollte.

Aufgrund des Studienprotokolls war es nicht möglich ein Ausgangsniveau der Thrombozytenfunktion vor Beginn der Clopidogrel-Therapie zu messen und dieses mit den TA-Werten nach dem Absetzen zu vergleichen, wie es eine streng wissenschaftliche Definition eines *Rebound*-Phänomens verlangt hätte (Sambu, Warner et al. 2011). Allerdings erhielten ca. 40% der Studienpatienten ihren DES im Rahmen eines ACS, welches mit erhöhter Thrombozytenreaktivität einhergeht (Harrison, Mackie et al. 2005), sodass eine Thrombozytenfunktionsmessung vor Beginn der Clopidogrel-Therapie bei diesen Patienten kein echtes Ausgangsniveau der Thrombozytenreaktivität dargestellt hätte.

Die Beobachtungszeit der vorliegenden Studie betrug acht Wochen, wovon die letzten vier Wochen in beiden Studiengruppen komplett ohne Clopidogrel-Einnahme waren. Dieser Zeitraum wurde aufgrund der durchschnittlichen Thrombozyten-Überlebenszeit von sieben bis zehn Tagen (George 2000) gewählt. Da täglich etwa 20% des gesamten Thrombozyten-Pools erneuert werden (Gawaz 1999), müsste sich die Thrombozytenfunktion ca. zwei Wochen nach dem Absetzen einer Clopidogrel-Therapie vollständig erholt haben. Studien an gesunden Freiwilligen (Weber, Braun et

al. 2001; Price, Coleman et al. 2006) sowie an KHK-Patienten unter Aspirin-Therapie (Gurbel, Bliden et al. 2009) zeigten eine vollständige Erholung der Thrombozytenfunktion sogar innerhalb von fünf bis sieben Tagen nach Absetzen einer Clopidogrel-Therapie. Wie sich die TA-Werte allerdings über den untersuchten Zeitraum von vier Wochen nach dem vollständigen Absetzen hinaus weiterentwickelt hätten, ist unklar.

5.2.2. Nachfolgende experimentelle Studien

Djukanovic et al. konnten ebenfalls kein *Rebound*-Phänomen feststellen (Djukanovic, Todorovic et al. 2011). Sie führten bei 200 Stent-Patienten MEA-Messungen am Tag des abrupten Absetzens einer einjährigen Clopidogrel-Therapie sowie nach zehn, 45 und 90 Tagen durch. Auch Frelinger et al. konnten durch die PACT (*Platelet Activity After Clopidogrel Termination*)-Studie, eine prospektive, randomisierte, doppel-blinde und Placebo-kontrollierte *Crossover*-Studie an 15 gesunden Teilnehmern, kein *Rebound*-Phänomen nachweisen (Frelinger, Barnard et al. 2010). Sie hatten die Thrombozytenfunktion mittels Durchflusszytometrie, LTA, MEA und Enzymgekoppeltem Immunadsorptionstest (*enzyme-linked immunosorbent assay*, ELISA) mit diversen Agonisten in vielfältigen Konzentrationen vor Beginn, täglich während einer zweiwöchigen Clopidogrel-Therapie und an den Tagen eins, vier, acht, elf, 15 und 45 nach deren Absetzen gemessen.

Mylotte et al. konnten bei zwei Drittel der 32 prospektiv untersuchten DES-Patienten einen Monat nach Absetzen einer einjährigen Clopidogrel-Therapie mittels einer modifizierten Form der LTA eine vorübergehend gesteigerte Thrombozytenreaktivität auf ADP und Epinephrin zeigen (Mylotte, Peace et al. 2011). Die drei Monate nach Absetzen gemessenen Werte dienten dabei als Vergleichswerte im Sinne einer wieder auf das Ausgangsniveau zurückgekehrten Thrombozytenfunktion. Diehl et al. entdeckten mittels MEA eine Hyperreaktivität der Thrombozyten zwei bis sechs Wochen nach dem Absetzen einer einjährigen Clopidogrel-Therapie bei 16 von 28 DES-Patienten (Diehl, Halscheid et al. 2011). 67 stabile KHK-Patienten unter Aspirin-Therapie dienten hierbei als Kontrollgruppe für eine Thrombozytenreaktivität ohne Clopidogrel und lieferten den Vergleichswert. Yedidya et al. veröffentlichten eine Studie mit teilweise ähnlichem Design wie die Vorliegende (Yedidya, Netzer et al. 2012). Bei insgesamt 20 BMS-Patienten wurde ein ausschleichendes mit einem

abrupten Absetzen einer dreimonatigen Clopidogrel-Therapie verglichen. Durch Thrombozytenfunktionsmessungen über einen Zeitraum von sechs Wochen nach dem Absetzen der *Off*-Gruppe bzw. zwei Wochen nach dem vollständigen Absetzen der *Tapering*-Gruppe kamen die Autoren zu dem Schluss, dass es ein *Rebound*-Phänomen nach dem abrupten Absetzen von Clopidogrel gibt und, dass ein Ausschleichen über einen Zeitraum von vier Wochen eine geeignete Strategie sei, dieses zu vermeiden. Die TA-Werte der *Off*-Gruppe stiegen direkt nach dem Absetzen zwar schnell innerhalb von zwei Wochen an, wie auch in vorliegender Studie, blieben aber danach über die gesamte restliche Studienzeit von vier Wochen auf einem konstanten Niveau, was nicht der Definition eines *Rebound*-Phänomens entspricht (Sambu, Warner et al. 2011). Der Anstieg der TA-Werte der *Tapering*-Gruppe war durch das Studienprotokoll lediglich um vier Wochen versetzt, war aber ähnlich steil und erreichte ähnlich hohe Werte wie der der *Off*-Gruppe.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Studien, die für ein mögliches *Rebound*-Phänomen sprechen, wie auch die Vorliegende allesamt nicht über adäquaten Ausgangswerte der Thrombozytenfunktion verfügen. Sie wurden darüber hinaus an kleinen Studienkollektiven durchgeführt. In diesem Punkt überzeugt die Studie von Djukanovic et al. mit 200 Patienten (Djukanovic, Todorovic et al. 2011). An der PACT-Studie sind der kurze Behandlungszeitraum und das recht kleine Kollektiv gesunder Teilnehmer zu kritisieren. Trotzdem liefert diese Untersuchung einen wertvollen Beitrag, vor allem wegen ihres überzeugenden Studiendesigns mit Ausgangswerten der Thrombozytenreaktivität vor Therapiebeginn. Eine abschließende Aussage zu einem möglichen *Rebound*-Phänomen lässt sich anhand dieser experimentellen Studien nicht bilden.

5.2.3. Klinische Studien zum Absetzen von Clopidogrel

Kimura et al. konnten 2009 bei 10778 Patienten, die zwei Jahren nach SES-Implantation nachbeobachtet wurden, einen Zusammenhang zwischen dem Absetzen einer dualen antithrombozytären Therapie und dem Auftreten definitiver ST nachweisen (Kimura, Morimoto et al. 2009). Andere Studien, die das Absetzen von Aspirin und Clopidogrel gemeinsam (Jeremias, Sylvia et al. 2004; Iakovou, Schmidt et al. 2005; Park, Park et al. 2006) oder auch das alleinige Absetzen von Clopidogrel (Airoldi, Colombo et al. 2007) untersuchten, konnten lediglich das vorzeitige

Diskussion

Absetzen, definiert durch einen Behandlungszeitraum kürzer als drei bzw. sechs Monate, nicht aber das Absetzen per se, als Risikofaktor für das Auftreten von ST nachweisen.

Kuchulakanti et al. identifizierten 2006 das Absetzen einer Clopidogrel-Therapie als signifikantes Korrelat einer ST im Zeitraum von zwölf Monaten nach Stentimplantation (Kuchulakanti, Chu et al. 2006). Der durchschnittliche Zeitraum von $6,2 \pm 4,9$ Tagen zwischen dem Absetzen von Clopidogrel und dem Auftreten einer subakuten ST bekräftigt einen kausalen Zusammenhang. Van Werkum et al. formulierten aufgrund der Thrombozyten-Zirkulationszeit die Hypothese, dass ST, die im Zusammenhang mit dem Absetzen von Clopidogrel stehen, innerhalb von 14 Tagen danach auftreten müssten (van Werkum, Heestermans et al. 2009). Dieser Zusammenhang konnte lediglich für ST innerhalb der ersten sechs Monate nach PCI gezeigt werden, nicht aber für spätere ST. In diesem Kontext ist auch die 2011 von Lemesle et al. veröffentlichte Studie zu nennen, in welcher ein erhöhtes Risiko für das Auftreten von Tod, MI und ST bei DES-Patienten, die Clopidogrel innerhalb des ersten Monats nach PCI absetzten, beschrieben wird (Lemesle, Torguson et al. 2011). Patientengruppen, die Clopidogrel zu späteren Zeitpunkten absetzten, unterschieden sich in ihrem Risiko nicht voneinander.

Eine Häufung thrombotischer Ereignisse nach dem Absetzen einer Clopidogrel-Therapie bei DES-Patienten, vor allem im ersten halben Jahr nach Stentimplantation, wird vermutlich wesentlich durch das Einwachsen des Stents und das Ausmaß der Reendothelialisierung im Verlauf der Zeit beeinflusst (Lemesle, Torguson et al. 2011). Das Auftreten späterer ST scheint mit einem verzögerten Einwachsen von DES im Gegensatz zu BMS zusammenzuhängen. Diese Hypothese wird durch pathologische (Farb, Burke et al. 2003; Joner, Finn et al. 2006; Finn, Joner et al. 2007) und angioskopische (Kotani, Awata et al. 2006; Awata, Kotani et al. 2007) Untersuchungen sowie solche mit intravasalem Ultraschall (Mintz, Hong et al. 2005) bzw. optischer Kohärenztomographie (Matsumoto, Shite et al. 2007) gestützt.

Die ISAR-CAUTION-Studie (Abrupt Versus Tapered Interruption of Chronic Clopidogrel Therapy After DES Implantation) zeigte, wie auch die vorliegende, keinen klinischen Vorteil eines ausschleichenden Absetzens von Clopidogrel (Fiedler, Mehilli et al. 2014). Hierbei wurden 782 DES-Patienten eine *Tapering*- oder *Off*-

Diskussion

Gruppe nach demselben Schema randomisiert und über einen Zeitraum von drei Monaten nach dem Absetzen klinisch nachbeobachtet. Die aus kardialen Tod, MI, Schlaganfall, ST, signifikanter Blutung und Rehospitalisierung aufgrund eines ACS zusammengesetzte primäre Zielgröße wurde sogar von mehr Patienten der *Tapering-* als der *Off-Gruppe* erreicht (2,3% vs. 1,3%). Die aus Tod und MI zusammengesetzte Zielgröße wurde gleichhäufig erreicht.

6. Zusammenfassung

Die Inzidenz von ST konnte unter anderem durch eine duale antithrombozytäre Therapie mit Aspirin und Clopidogrel drastisch gesenkt werden. Ein schlechtes Ansprechen auf eine Clopidogrel-Therapie (z.B. durch eine verminderte Generierung des aktiven Clopidogrel-Metaboliten bei Trägern mutierter CYP-Gene, am häufigsten CYP2C19*2) wie auch deren Absetzen ist mit einem höheren Risiko z.B. für ST assoziiert.

Für die CYP-Studie wurden 2485 Stent-Patienten mittels TaqMan-Verfahren bzgl. des *2-Polymorphismus (SNP 681G>A auf Exon 5) genotypisiert. Es zeigte sich eine zu erwartende Allelfrequenz von 85,4% für *1 und 14,6% für *2. 17 Patienten (0,7%) erlitten eine gesicherte frühe ST. *2-Trägern waren signifikant häufiger betroffen als Wildtyp-Homozygote, wobei ein Gendosis-Effekt beobachtet wurde. Ebenso hatten *2-Träger auch für STEMI und ischämische zerebrale Insulte ein signifikant höheres Risiko. Der *2-Trägerstatus war ein unabhängiger Prädiktor für das Auftreten gesicherter früher ST. Nachfolgende Studien bestätigten diese Ergebnisse. Da neben der *2-Trägerschaft auch andere genetische und nicht-genetische Faktoren eine ursächliche Rolle spielen für eine persistierend hohe Thrombozytenreaktivität trotz Clopidogrel-Therapie, ist die Genotypisierung vermutlich nur einer von mehreren Aspekten zur Individualisierung der antithrombozytären Therapie.

In die *Rebound*-Studie wurden 76 stabile KHK-Patienten sechs Monate nach DES-Implantation eingeschlossen. Sie wurden entweder einem abrupten oder ausschleichenden Absetzen über einen Zeitraum von vier Wochen zugeteilt. Es wurden wöchentliche Thrombozytenfunktionsmessungen mittels LTA und MEA und diversen Agonisten in verschiedenen Konzentrationen durchgeführt. Für 69 der eingeschlossenen Patienten lagen vollständige Daten vor (34 in der *Off*-Gruppe und 35 in der *Tapering*-Gruppe). Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Studiengruppen festgestellt werden. Größere klinische Studien zum Absetzen von Clopidogrel sprechen dafür, dass eine Clopidogrel-Therapie in den ersten sechs Monaten nach DES-Implantation eine wesentliche Rolle in der Vermeidung von ST spielt, spätere ST aber vermutlich nicht mehr im Zusammenhang mit dem Absetzen von Clopidogrel stehen. Die momentane Evidenz liefert keine Grundlage für ein geändertes klinisches Vorgehen beim Absetzen von Clopidogrel.

7. Literaturverzeichnis

- Airolidi, F., A. Colombo, N. Morici, A. Latib, J. Cosgrave, L. Buellfeld, E. Bonizzoni, M. Carlino, U. Gerckens, C. Godino, G. Melzi, I. Michev, M. Montorfano, G. M. Sangiorgi, A. Qasim, A. Chieffo, C. Briguori and E. Grube (2007). "Incidence and predictors of drug-eluting stent thrombosis during and after discontinuation of thienopyridine treatment." Circulation **116**(7): 745-754.
- Alexopoulos, D., I. Xanthopoulou, P. Davlourous, T. E. Plakomyti, A. Panagiotou, E. Mavronasiou and G. Hahalis (2011). "Prasugrel overcomes high on-clopidogrel platelet reactivity in chronic coronary artery disease patients more effectively than high dose (150 mg) clopidogrel." American heart journal **162**(4): 733-739.
- Angiolillo, D. J., A. Fernandez-Ortiz, E. Bernardo, F. Alfonso, C. Macaya, T. A. Bass and M. A. Costa (2007). "Variability in individual responsiveness to clopidogrel: clinical implications, management, and future perspectives." Journal of the American College of Cardiology **49**(14): 1505-1516.
- Aoki, J., A. J. Lansky, R. Mehran, J. Moses, M. E. Bertrand, B. T. McLaurin, D. A. Cox, M. Lincoff, E. M. Ohman, H. D. White, H. Parise, M. B. Leon and G. W. Stone (2009). "Early Stent Thrombosis in Patients With Acute Coronary Syndromes Treated With Drug-Eluting and Bare Metal Stents The Acute Catheterization and Urgent Intervention Triage Strategy Trial." Circulation **119**(5): 687-698.
- Awata, M., J. Kotani, M. Uematsu, T. Morozumi, T. Watanabe, T. Onishi, O. Iida, F. Sera, S. Nanto, M. Hori and S. Nagata (2007). "Serial Angioscopic Evidence of Incomplete Neointimal Coverage After Sirolimus-Eluting Stent Implantation." Circulation **116**(8): 910-916.
- Bahit, M. C., E. J. Topol, R. M. Califf, P. W. Armstrong, D. A. Criger, V. Hasselblad, A. Betriu, J. Hirsh, D. Ardissino and C. B. Granger (2001). "Reactivation of Ischemic Events in Acute Coronary Syndromes: Results From GUSTO-IIb." Journal of the American College of Cardiology **37**(4): 1001-1007.
- BÄK, KBV and AWMF. (2014). "Nationale VersorgungsLeitlinie - Chronische KHK." Retrieved 21.12.2015, from <http://www.leitlinien.de/mdb/downloads/nvl/khk/khk-3aufl-vers1-lang.pdf>.
- Born, G. V. R. (1962). "Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal." Nature **194**(4832): 927-929.
- Brandt, J. T., S. L. Close, S. J. Iturria, C. D. Payne, N. A. Farid, C. S. Ernest, 2nd, D. R. Lachno, D. Salazar and K. J. Winters (2007). "Common polymorphisms of CYP2C19 and CYP2C9 affect the pharmacokinetic and pharmacodynamic response to clopidogrel but not prasugrel." Journal of thrombosis and haemostasis : JTH **5**(12): 2429-2436.
- Breddin, H. K. (2005). "Can platelet aggregometry be standardized?" Platelets **16**(3-4): 151-158.
- Buonamici, P., R. Marcucci, A. Migliorini, G. F. Gensini, A. Santini, R. Panizza, G. Moschi, A. M. Gori, R. Abbate and D. Antoniucci (2007). "Impact of platelet reactivity after clopidogrel administration on drug-eluting stent thrombosis." Journal of the American College of Cardiology **49**(24): 2312-2317.
- Cardinal, D. C. and R. J. Flower (1980). "The Electronic Aggregometer: A Novel Device for Assessing Platelet Behavior in Blood." Journal of Pharmacological Methods **3**: 135-158.
- Collet, J. P., J. S. Hulot, G. Anzaha, A. Pena, T. Chastre, C. Caron, J. Silvain, G. Cayla, A. Bellemain-Appaix, J. B. Vignalou, S. Galier, O. Barthelemy, F. Beygui, V. Gallois, G.

- Montalescot and C.-. Investigators (2011). "High Doses of Clopidogrel to Overcome Genetic Resistance The Randomized Crossover CLOVIS-2 (Clopidogrel and Response Variability Investigation Study 2)." Jacc-Cardiovascular Interventions **4**(4): 392-402.
- Collet, J. P., J. S. Hulot, A. Pena, E. Villard, J. B. Esteve, J. Silvain, L. Payot, D. Brugier, G. Cayla, F. Beygui, G. Bensimon, C. Funck-Brentano and G. Montalescot (2009). "Cytochrome P450 2C19 polymorphism in young patients treated with clopidogrel after myocardial infarction: a cohort study." Lancet **373**(9660): 309-317.
- Cook, S., E. Ladich, G. Nakazawa, P. Eshtehardi, M. Neidhart, R. Vogel, M. Togni, P. Wenaweser, M. Billinger, C. Seiler, S. Gay, B. Meier, W. J. Pichler, P. Juni, R. Virmani and S. Windecker (2009). "Correlation of Intravascular Ultrasound Findings With Histopathological Analysis of Thrombus Aspirates in Patients With Very Late Drug-Eluting Stent Thrombosis." Circulation **120**(5): 391-399.
- Cutlip, D. E., S. Windecker, R. Mehran, A. Boam, D. J. Cohen, G. A. van Es, P. G. Steg, M. A. Morel, L. Mauri, P. Vranckx, E. McFadden, A. Lansky, M. Hamon, M. W. Krucoff and P. W. Serruys (2007). "Clinical end points in coronary stent trials: a case for standardized definitions." Circulation **115**(17): 2344-2351.
- Damani, S. B. and E. J. Topol (2010). "The Case for Routine Genotyping in Dual-Antiplatelet Therapy." Journal of the American College of Cardiology **56**(2): 109-111.
- de la Torre-Hernández, J. M., F. Alfonso, F. Hernandez, J. Elizaga, M. Sanmartin, E. Pinar, I. Lozano, J. M. Vazquez, J. Botas, A. P. De Prado, J. M. Hernandez, J. Sanchis, J. M. R. Nodar, A. Gomez-Jaume, M. Larman, J. A. Diarte, J. Rodriguez-Collado, J. R. Rumoroso, J. R. Lopez-Minguez, J. Mauri and E. S. Grp (2008). "Drug-Eluting Stent Thrombosis - Results From the Multicenter Spanish Registry ESTROFA (Estudio ESpanol sobre TRombosis de stents FArmacoactivos)." Journal of the American College of Cardiology **51**(10): 986-990.
- de Morais, S. M. F., G. R. Wilkinson, J. Blaisdell, K. Nakamura, U. A. Meyer and J. A. Goldstein (1994). "The Major Genetic Defect Responsible for the Polymorphism of S-Mephenytoin Metabolism in Humans." Journal of Biological Chemistry **269**(22): 15419-15422.
- Diehl, P., C. Halscheid, C. Olivier, T. Helbing, C. Bode and M. Moser (2011). "Discontinuation of long term clopidogrel therapy induces platelet rebound hyperaggregability between 2 and 6 weeks post cessation." Clinical research in cardiology : official journal of the German Cardiac Society **100**(9): 765-771.
- Djukanovic, N., Z. Todorovic, S. Obradovic, D. Zamaklar-Trifunovic, S. Njegomirovic, N. M. Milic, M. Prostran and M. Ostojic (2011). "Abrupt cessation of one-year clopidogrel treatment is not associated with thrombotic events." Journal of pharmacological sciences **117**(1): 12-18.
- Dyszkiewicz-Korpanty, A. M., E. P. Frenkel and R. Sarode (2005). "Approach to the assessment of platelet function: Comparison between optical-based platelet-rich plasma and impedance-based whole blood platelet aggregation methods." Clinical and Applied Thrombosis-Hemostasis **11**(1): 25-35.
- Farb, A., A. P. Burke, F. D. Kolodgie and R. Virmani (2003). "Pathological Mechanisms of Fatal Late Coronary Stent Thrombosis in Humans." Circulation **108**(14): 1701-1706.
- FDA, U. (2010). Retrieved 21.12.2015, from <http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm204253.htm>.
- Ferrari, E., M. Benhamou, P. Cerboni and B. Marcel (2005). "Coronary syndromes following aspirin withdrawal: a special risk for late stent thrombosis." Journal of the American College of Cardiology **45**(3): 456-459.
- Fiedler, K. A., J. Mehilli, S. Kufner, A. Schlichting, T. Ibrahim, D. Sibbing, I. Ott, H. Schunkert, K. L. Laugwitz, A. Kastrati and S. Schulz (2014). "Randomised, double-

- blind trial on the value of tapered discontinuation of clopidogrel maintenance therapy after drug-eluting stent implantation. Intracoronary Stenting and Antithrombotic Regimen: CAUTION in Discontinuing Clopidogrel Therapy--ISAR-CAUTION." Thrombosis and haemostasis **111**(6): 1041-1049.
- Finn, A. V., M. Joner, G. Nakazawa, F. Kolodgie, J. Newell, M. C. John, H. K. Gold and R. Virmani (2007). "Pathological Correlates of Late Drug-Eluting Stent Thrombosis: Strut Coverage as a Marker of Endothelialization." Circulation **115**(18): 2435-2441.
- Fontana, P., J. S. Hulot, P. De Moerloose and P. Gaussem (2007). "Influence of CYP2C19 and CYP3A4 gene polymorphisms on clopidogrel responsiveness in healthy subjects." Journal of Thrombosis and Haemostasis **5**(10): 2153-2155.
- Förster, T. (1948). "Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz." Annalen der Physik **2**(1-2): 55-75.
- Foster, C. J., D. M. Prosser, J. M. Agans, Y. Zhai, M. D. Smith, J. E. Lachowicz, F. L. Zhang, E. Gustafson, F. J. Monsma, M. T. Wiekowski, S. J. Abbondanzo, D. N. Cook, M. L. Bayne, S. A. Lira and M. S. Chintala (2001). "Molecular identification and characterization of the platelet ADP receptor targeted by thienopyridine antithrombotic drugs." Journal of Clinical Investigation **107**(12): 1591-1598.
- Frelinger, A. L., 3rd, M. R. Barnard, M. L. Fox and A. D. Michelson (2010). "The Platelet Activity After Clopidogrel Termination (PACT) study." Circulation. Cardiovascular interventions **3**(5): 442-449.
- Frere, C., T. Cuisset, P. E. Morange, J. Quilici, L. Camoin-Jau, N. Saut, D. Faille, M. Lambert, I. Juhan-Vague, J. L. Bonnet and M. C. Alessi (2008). "Effect of cytochrome p450 polymorphisms on platelet reactivity after treatment with clopidogrel in acute coronary syndrome." The American journal of cardiology **101**(8): 1088-1093.
- Gachet, C. (2006). Regulation of platelet functions by P2 receptors. Annual Review of Pharmacology and Toxicology. Palo Alto, Annual Reviews. **46**: 277-300.
- Gachet, C. (2015). "Antiplatelet drugs: which targets for which treatments?" Journal of thrombosis and haemostasis : JTH **13 Suppl 1**: S313-322.
- Gawaz, M. P. (1999). Das Blutplättchen - Physiologie, Pathophysiologie, Membranrezeptoren, antithrombozytäre Wirkstoffe und Therapie bei koronarer Herzerkrankung. Stuttgart - New York, Georg Thieme Verlag.
- Gawaz, M. P. (1999). Das Blutplättchen: Physiologie, Pathophysiologie, Membranrezeptoren, antithrombozytäre Wirkstoffe und antithrombozytäre Therapie bei koronarer Herzkrankheit. Stuttgart; New York, Thieme Verlag.
- Geisler, T., H. Langer, M. Wydymus, K. Gohring, C. Zurn, B. Bigalke, K. Stellos, A. E. May and M. Gawaz (2006). "Low response to clopidogrel is associated with cardiovascular outcome after coronary stent implantation." European heart journal **27**(20): 2420-2425.
- Geisler, T., E. Schaeffeler, J. Dippon, S. Winter, V. Buse, C. Bischofs, C. Zuern, K. Moerike, M. Gawaz and M. Schwab (2008). "CYP2C19 and nongenetic factors predict poor responsiveness to clopidogrel loading dose after coronary stent implantation." Pharmacogenomics **9**(9): 1251-1259.
- George, J. N. (2000). "Platelets." Lancet **355**(9214): 1531-1539.
- Giusti, B., A. M. Gori, R. Marcucci, C. Saracini, I. Sestini, R. Paniccia, P. Buonamici, D. Antonucci, R. Abbate and G. F. Gensini (2009). "Relation of Cytochrome P450 2C19 Loss-of-Function Polymorphism to Occurrence of Drug-Eluting Coronary Stent Thrombosis." American Journal of Cardiology **103**(6): 806-811.
- Giusti, B. G., A.M.; Marcucci, R.; Saracini, C.; Sestini, I.; Paniccia, R.; Valente, S.; Antonucci, D.; Abbate, R.; Gensini, G.F. (2007). "Cytochrome P450 2C19 loss-of-function polymorphism, but not CYP3A4 IVS10+12G/A and P2Y12 T744C

- polymorphisms, is associated with response variability to dual antiplatelet treatment in high-risk vascular patients." Pharmacogenetics and Genomics **17**(12): 1057-1064.
- Gladding, P., M. Webster, I. Zeng, H. Farrell, J. Stewart, P. Ruygrok, J. Ormiston, S. El-Jack, G. Armstrong, P. Kay, D. Scott, A. Gunes and M. L. Dahl (2008). "The Pharmacogenetics and Pharmacodynamics of Clopidogrel Response An Analysis From the PRINC (Plavix Response in Coronary Intervention) Trial." Jacc-Cardiovascular Interventions **1**(6): 620-627.
- Gladding, P., H. White, J. Voss, J. Ormiston, J. Stewart, P. Ruygrok, B. Bvaldivia, R. Baak, C. White and M. Webster (2009). "Pharmacogenetic Testing for Clopidogrel Using the Rapid INFINITI Analyzer - A Dose-Escalation Study." Jacc-Cardiovascular Interventions **2**(11): 1095-1101.
- Glenn, J. R., A. E. White, A. Johnson, S. C. Fox, M. W. Behan, G. Dolan and S. Heptinstall (2005). "Leukocyte count and leukocyte ecto-nucleotidase are major determinants of the effects of adenosine triphosphate and adenosine diphosphate on platelet aggregation in human blood." Platelets **16**(3-4): 159-170.
- Gurbel, P. A., R. C. Becker, K. G. Mann, S. R. Steinhubl and A. D. Michelson (2007). "Platelet function monitoring in patients with coronary artery disease." Journal of the American College of Cardiology **50**(19): 1822-1834.
- Gurbel, P. A., K. P. Bliden, K. Butler, U. S. Tantry, T. Gesheff, C. Wei, R. L. Teng, M. J. Antonino, S. B. Patil, A. Karunakaran, D. J. Kereiakes, C. Parris, D. Purdy, V. Wilson, G. S. Ledley and R. F. Storey (2009). "Randomized Double-Blind Assessment of the ONSET and OFFSET of the Antiplatelet Effects of Ticagrelor Versus Clopidogrel in Patients With Stable Coronary Artery Disease The ONSET/OFFSET Study." Circulation **120**(25): 2577-U2103.
- Gurbel, P. A., K. P. Bliden, B. L. Hiatt and C. M. O'Connor (2003). "Clopidogrel for coronary stenting - Response variability, drug resistance, and the effect of pretreatment platelet reactivity." Circulation **107**(23): 2908-2913.
- Gurbel, P. A., U. S. Tantry, A. R. Shuldiner and D. J. Kereiakes (2010). "Genotyping - One Piece of the Puzzle to Personalize Antiplatelet Therapy." Journal of the American College of Cardiology **56**(2): 112-116.
- HaemoviewDiagnostics. (2015). Retrieved 21.12.2015, from <http://www.haemoview.com.au/how-it-works.html>.
- Hardy, G. H. (1908). "Mendelian Proportions In A Mixed Population." Science (New York, N.Y.) **28**(706): 49-50.
- Harmsze, A. M., J. W. van Werkum, J. M. ten Berg, B. Zwart, H. J. Bouman, N. J. Breet, A. W. J. van't Hof, H. J. T. Ruven, C. M. Hackeng, O. H. Klungel, A. de Boer and V. H. M. Deneer (2010). "CYP2C19*2 and CYP2C9*3 alleles are associated with stent thrombosis: a case-control study." European heart journal **31**(24): 3046-3053.
- Harrison, P. (2005). "Platelet function analysis." Blood Reviews **19**(2): 111-123.
- Harrison, P., I. Mackie, A. Mathur, M. S. C. Robinson, Y. Hong, J. D. Erusalimsky, S. J. Machin and J. F. Martin (2005). "Platelet hyper-function in acute coronary syndromes." Blood Coagulation & Fibrinolysis **16**(8): 557-562.
- Harrison, P., I. Mackie, A. Mumford, C. Briggs, R. Liesner, M. Winter, S. Machin and H. British Comm Stand (2011). "Guidelines for the laboratory investigation of heritable disorders of platelet function." British journal of haematology **155**(1): 30-44.
- Hausleiter, J., A. Kastrati, J. Mehilli, H. Schühlen, J. Pache, F. Dotzer, C. Glatthor, S. Siebert, J. Dirschinger and A. Schomig (2004). "A randomized trial comparing phosphorylcholine-coated stenting with balloon angioplasty as well as abciximab with placebo for restenosis reduction in small coronary arteries." Journal of internal medicine **256**(5): 388-397.

- Heid, C. A., J. Stevens, K. J. Livak and P. M. Williams (1996). "Real Time Quantitative PCR." Genome Research **6**(10): 986-994.
- Ho, P. M., E. D. Peterson, L. Wang, D. J. Magid, S. D. Fihn, G. C. Larsen, R. A. Jesse and J. S. Rumsfeld (2008). "Incidence of death and acute myocardial infarction associated with stopping clopidogrel after acute coronary syndrome." JAMA : the journal of the American Medical Association **299**(5): 532-539.
- Ho, P. M., T. T. Tsai, T. Y. Wang, S. M. Shetterly, C. L. Clarke, A. S. Go, A. Sedrakyan, J. S. Rumsfeld, E. D. Peterson and D. J. Magid (2010). "Adverse Events After Stopping Clopidogrel in Post-Acute Coronary Syndrome Patients: Insights From a Large Integrated Healthcare Delivery System." Circulation-Cardiovascular Quality and Outcomes **3**(3): 303-308.
- Hochholzer, W., D. Trenk, H. P. Bestehorn, B. Fischer, C. M. Valina, M. Ferenc, M. Gick, A. Caputo, H. J. Buttner and F. J. Neumann (2006). "Impact of the degree of periprocedural platelet inhibition after loading with clopidogrel on early clinical outcome of elective coronary stent placement." Journal of the American College of Cardiology **48**(9): 1742-1750.
- Holland, P. M., R. D. Abramson, R. Watson and D. H. Gelfand (1991). "Detection of specific polymerase chain-reaction product by utilizing the 5'→3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA-polymerase." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **88**(16): 7276-7280.
- Hulot, J. S., A. Bura, E. Villard, M. Azizi, V. Remones, C. Goyenville, M. Aiach, P. Lechat and P. Gaussem (2006). "Cytochrome P450 2C19 loss-of-function polymorphism is a major determinant of clopidogrel responsiveness in healthy subjects." Blood **108**(7): 2244-2247.
- Hulot, J. S., J. P. Collet, J. Silvain, A. Pena, A. Bellemain-Appaix, O. Barthelemy, G. Cayla, F. Beygui and G. Montalescot (2010). "Cardiovascular Risk in Clopidogrel-Treated Patients According to Cytochrome P450 2C19*2 Loss-of-Function Allele or Proton Pump Inhibitor Coadministration A Systematic Meta-Analysis." Journal of the American College of Cardiology **56**(2): 134-143.
- Hulot, J. S., G. Wuerzner, C. Bachelot-Loza, M. Azizi, A. Blanchard, S. Peyrard, C. Funck-Brentano and P. Gaussem (2010). "Effect of an increased clopidogrel maintenance dose or lansoprazole co-administration on the antiplatelet response to clopidogrel in CYP2C19-genotyped healthy subjects." Journal of Thrombosis and Haemostasis **8**(3): 610-613.
- Iakovou, I., T. Schmidt, E. Bonizzoni, L. Ge, G. M. Sangiorgi, G. Stankovic, F. Airoldi, A. Chieffo, M. Montorfano, M. Carlino, I. Michev, N. Corvaja, C. Briguori, U. Gerckens, E. Grube and A. Colombo (2005). "Incidence, predictors, and outcome of thrombosis after successful implantation of drug-eluting stents." Jama-Journal of the American Medical Association **293**(17): 2126-2130.
- Ingelman-Sundberg, M., A. Daly and D. Nebert. (2015). Retrieved 21.12.2015, from <http://www.cypalleles.ki.se/cyp2c19.htm>.
- Jackson, S. P. (2007). "The growing complexity of platelet aggregation." Blood **109**(12): 5087-5095.
- Jeremias, A., B. Sylvia, J. Bridges, A. J. Kirtane, B. Bigelow, D. S. Pinto, K. K. L. Ho, D. J. Cohen, L. A. Garcia, D. E. Cutlip and J. P. Carrozza (2004). "Stent Thrombosis After Successful Sirolimus-Eluting Stent Implantation." Circulation **109**(16): 1930-1932.
- Joner, M., A. V. Finn, A. Farb, E. K. Mont, F. D. Kolodgie, E. Ladich, R. Kutys, K. Skorija, H. K. Gold and R. Virmani (2006). "Pathology of Drug-Eluting Stents in Humans - Delayed Healing and Late Thrombotic Risk." Journal of the American College of Cardiology **48**(1): 193-202.

- Kastrati, A., J. Mehilli, F. J. Neumann, F. Dotzer, J. ten Berg, H. Bollwein, I. Graf, M. Ibrahim, J. Pache, M. Seyfarth, H. Schuhlen, J. Dirschinger, P. B. Berger and A. Schomig (2006). "Abciximab in patients with acute coronary syndromes undergoing percutaneous coronary intervention after clopidogrel pretreatment: the ISAR-REACT 2 randomized trial." JAMA : the journal of the American Medical Association **295**(13): 1531-1538.
- Kastrati, A., J. Mehilli, H. Schuhlen, J. Dirschinger, F. Dotzer, J. M. ten Berg, F. J. Neumann, H. Bollwein, C. Volmer, M. Gawaz, P. B. Berger and A. Schomig (2004). "A clinical trial of abciximab in elective percutaneous coronary intervention after pretreatment with clopidogrel." The New England journal of medicine **350**(3): 232-238.
- Kazui, M., Y. Nishiya, T. Ishizuka, K. Hagihara, N. A. Farid, O. Okazaki, T. Ikeda and A. Kurihara (2010). "Identification of the Human Cytochrome P450 Enzymes Involved in the Two Oxidative Steps in the Bioactivation of Clopidogrel to Its Pharmacologically Active Metabolite." Drug Metabolism and Disposition **38**(1): 92-99.
- Kimura, T., T. Morimoto, Y. Nakagawa, T. Tamura, K. Kadota, H. Yasumoto, H. Nishikawa, Y. Hiasa, T. Muramatsu, T. Meguro, N. Inoue, H. Honda, Y. Hayashi, S. Miyazaki, S. Oshima, T. Honda, N. Shiode, M. Namura, T. Sone, M. Nobuyoshi, T. Kita and K. Mitsudo (2009). "Antiplatelet Therapy and Stent Thrombosis After Sirolimus-Eluting Stent Implantation." Circulation **119**(7): 987-995.
- Koda, M., Y. Banno and T. Naganawa (2005). "Effect of neutrophil adhesion on the size of aggregates formed by agonist-activated platelets." Platelets **16**(8): 482-491.
- Kotani, J., M. Awata, S. Nanto, M. Uematsu, F. Oshima, H. Minamiguchi, G. S. Mintz and S. Nagata (2006). "Incomplete Neointimal Coverage of Sirolimus-Eluting Stents - Angioscopic Findings." Journal of the American College of Cardiology **47**(10): 2108-2111.
- Kuchulakanti, P. K., W. W. Chu, R. Torguson, P. Ohlmann, S. W. Rha, L. C. Clavijo, S. W. Kim, A. Bui, N. Gevorkian, Z. Y. Xue, K. Smith, J. Fournadjieva, W. O. Suddath, L. F. Satler, A. D. Pichard, K. M. Kent and R. Waksman (2006). "Correlates and Long-Term Outcomes of Angiographically Proven Stent Thrombosis With Sirolimus- and Paclitaxel-Eluting Stents." Circulation **113**(8): 1108-1113.
- Lapp, H. and I. Krakau (2010). Das Herzkatheterbuch. Stuttgart, New York, Georg Thieme Verlag.
- Lasala, J. M., D. A. Cox, D. Dobies, K. Baran, W. B. Bachinsky, E. W. Rogers, J. A. Breall, D. H. Lewis, A. J. Song, R. M. Starzyk, S. R. Mascioli, K. D. Dawkins, D. S. Baim and A. P. Phys (2009). "Drug-Eluting Stent Thrombosis in Routine Clinical Practice Two-Year Outcomes and Predictors From the TAXUS ARRIVE Registries." Circulation-Cardiovascular Interventions **2**(4): 285-293.
- Lee, L. G., C. R. Connell and W. Bloch (1993). "Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes." Nucleic Acids Research **21**(16): 3761-3766.
- Lemesle, G., R. Torguson, L. Bonello, A. de Labriolle, G. Maluenda, I. Ben-Dor, S. D. Collins, A. I. Syed, Z. Y. Xue, L. F. Satler, A. D. Pichard and R. Waksman (2011). "Relation between clopidogrel discontinuation and early cardiovascular events after percutaneous coronary intervention with drug-eluting stents." Eurointervention **6**(9): 1053-1059.
- Levine, G. N., E. R. Bates, J. C. Blankenship, S. R. Bailey, J. A. Bittl, B. Cercek, C. E. Chambers, S. G. Ellis, R. A. Guyton, S. M. Hollenberg, U. N. Khot, R. A. Lange, L. Mauri, R. Mehran, I. D. Moussa, D. Mukherjee, B. K. Nallamothu and H. H. Ting (2011). "2011 ACCF/AHA/SCAI Guideline for Percutaneous Coronary Intervention A Report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines and the Society for Cardiovascular

- Angiography and Interventions." Journal of the American College of Cardiology **58**(24): E44-E122.
- Linnemann, B., J. Schwonberg, H. Mani, S. Prochnow and E. Lindhoff-Last (2008). "Standardization of light transmittance aggregometry for monitoring antiplatelet therapy: an adjustment for platelet count is not necessary." Journal of Thrombosis and Haemostasis **6**(4): 677-683.
- Livak, K. J. (1999). "Allelic discrimination using fluorogenic probes and the 5' nuclease assay." Genetic Analysis-Biomolecular Engineering **14**(5-6): 143-149.
- Livak, K. J., S. J. A. Flood, J. Marmaro, W. Giusti and K. Deetz (1995). "Oligonucleotides with Fluorescent Dyes at Opposite Ends Provide a Quenched Probe System Useful for Detecting PCR Product and Nucleic Acid Hybridization." PCR-Methods and Applications **4**(6): 357-362.
- Lloyd-Jones, D. M., M. G. Larson, A. Beiser and D. Levy (1999). "Lifetime risk of developing coronary heart disease." Lancet **353**(9147): 89-92.
- Lordkipanidze, M., J. G. Diodati and C. Pharand (2009). "Possibility of a rebound phenomenon following antiplatelet therapy withdrawal: A look at the clinical and pharmacological evidence." Pharmacology & Therapeutics **123**(2): 178-186.
- Lyamichev, V., M. A. D. Brow and J. E. Dahlberg (1993). "Structure-Specific Endonucleolytic Cleavage of Nucleic-Acids by Eubacterial DNA-Polymerases." Science **260**(5109): 778-783.
- Macherey-Nagel. (2014). "Genomic DNA from blood - User manual." Retrieved 21.12.2015, from http://www.mn-net.com/Portals/8/attachments/Redakteure_Bio/Protocols/Genomic_DNA/UM_gDNA_Blood.pdf.
- Matetzky, S., B. Shenkman, V. Guetta, M. Schechter, R. Bienart, I. Goldenberg, I. Novikov, H. Pres, N. Savion, D. Varon and H. Hod (2004). "Clopidogrel Resistance Is Associated With Increased Risk of Recurrent Atherothrombotic Events in Patients with Acute Myocardial Infarction." Circulation **109**(25): 3171-3175.
- Matsumoto, D., J. Shite, T. Shinke, H. Otake, Y. Tanino, D. Ogasawara, T. Sawada, O. L. Paredes, K. I. Hirata and M. Yokoyama (2007). "Neointimal coverage of sirolimus-eluting stents at 6-month follow-up: evaluated by optical coherence tomography." European heart journal **28**(8): 961-967.
- McFadden, E. P., E. Stabile, E. Regar, E. Cheneau, A. T. Ong, T. Kinnaird, W. O. Suddath, N. J. Weissman, R. Torguson, K. M. Kent, A. D. Pichard, L. F. Satler, R. Waksman and P. W. Serruys (2004). "Late thrombosis in drug-eluting coronary stents after discontinuation of antiplatelet therapy." Lancet **364**(9444): 1519-1521.
- Mega, J. L., S. L. Close, S. D. Wiviott, L. Shen, R. D. Hockett, J. T. Brandt, J. R. Walker, E. M. Antman, W. Macias, E. Braunwald and M. S. Sabatine (2009). "Cytochrome P-450 Polymorphisms and Response to Clopidogrel." New England Journal of Medicine **360**(4): 354-362.
- Mega, J. L., T. Simon, J. P. Collet, J. L. Anderson, E. M. Antman, K. Bliden, C. P. Cannon, N. Danchin, B. Giusti, P. Gurbel, B. D. Horne, J. S. Hulot, A. Kastrati, G. Montalescot, F. J. Neumann, L. Shen, D. Sibbing, P. G. Steg, D. Trenk, S. D. Wiviott and M. S. Sabatine (2010). "Reduced-Function CYP2C19 Genotype and Risk of Adverse Clinical Outcomes Among Patients Treated With Clopidogrel Predominantly for PCI A Meta-analysis." Jama-Journal of the American Medical Association **304**(16): 1821-1830.
- Mehilli, J., A. Kastrati, H. Schühlen, A. Dibra, F. Dotzer, N. von Beckerath, H. Bollwein, J. Pache, J. Dirschinger, P. P. Berger and A. Schomig (2004). "Randomized clinical trial of abciximab in diabetic patients undergoing elective percutaneous coronary

- interventions after treatment with a high loading dose of clopidogrel." Circulation **110**(24): 3627-3635.
- Mehta, S. R., S. Yusuf, R. J. G. Peters, M. E. Bertrand, B. S. Lewis, M. K. Natarajan, K. Maimberg, H. J. Rupprecht, F. Zhao, S. Chrolavicius, I. Copland, K. A. A. Fox and P. Clopidogrel Unstable Angina (2001). "Effects of pretreatment with clopidogrel and aspirin followed by long-term therapy in patients undergoing percutaneous coronary intervention: the PCI-CURE study." Lancet **358**(9281): 527-533.
- Mintz, G. S., M. K. Hong, A. E. Raizner, C. W. Lee, J. J. Kim, E. Escolar, N. E. Fearnot, S. W. Park, S. J. Park and N. J. Weissman (2005). "Intravascular Ultrasound Assessment of Neointima Distribution and the Length of Stent That Was Free of Intravascular Ultrasound-Detectable Intimal Hyperplasia in Paclitaxel-Eluting Stents." American Journal of Cardiology **95**(1): 107-109.
- Müller, I., F. Besta, C. Schulz, S. Massberg, A. Schonig and M. Gawaz (2003). "Prevalence of clopidogrel non-responders among patients with stable angina pectoris scheduled for elective coronary stent placement." Thrombosis and haemostasis **89**(5): 783-787.
- Mullis, K. B. and F. A. Falooa (1987). "Specific Synthesis of DNA *in Vitro* via a Polymerase-Catalyzed Chain Reaction." Methods in Enzymology **155**: 335-350.
- Mylotte, D., A. J. Peace, A. T. Tedesco, F. Mangiacapra, P. Dicker, D. Kenny and D. P. Foley (2011). "Clopidogrel discontinuation and platelet reactivity following coronary stenting." Journal of Thrombosis and Haemostasis **9**(1): 24-32.
- Oberhänsli, M., S. Puricel, M. Togni and S. Cook (2011). "Koronare Stent-Thrombosen - Was gibt es Neues für 2011?" Herz **36**(3): 241-252.
- O'Brien, J. R. (1962). "PLATELET AGGREGATION .2. SOME RESULTS FROM A NEW METHOD OF STUDY." Journal of Clinical Pathology **15**(5): 452-455.
- Ong, A. T., A. Hoyer, J. Aoki, C. A. van Mieghem, G. A. Rodriguez Granillo, K. Sonnenschein, E. Regar, E. P. McFadden, G. Sianos, W. J. van der Giessen, P. P. de Jaegere, P. de Feyter, R. T. van Domburg and P. W. Serruys (2005). "Thirty-day incidence and six-month clinical outcome of thrombotic stent occlusion after bare-metal, sirolimus, or paclitaxel stent implantation." Journal of the American College of Cardiology **45**(6): 947-953.
- Pare, G., S. R. Mehta, S. Yusuf, S. S. Anand, S. J. Connolly, J. Hirsh, K. Simonsen, D. L. Bhatt, K. A. A. Fox and J. W. Eikelboom (2010). "Effects of CYP2C19 Genotype on Outcomes of Clopidogrel Treatment." New England Journal of Medicine **363**(18): 1704-1714.
- Park, D. W., S. W. Park, K. H. Park, B. K. Lee, Y. H. Kim, C. W. Lee, M. K. Hong, J. J. Kim and S. J. Park (2006). "Frequency of and Risk Factors for Stent Thrombosis After Drug-Eluting Stent Implantation During Long-Term Follow-Up." American Journal of Cardiology **98**(3): 352-356.
- Price, M. J., D. J. Angiolillo, P. S. Teirstein, E. Lillie, S. V. Manoukian, P. B. Berger, J. F. Tanguay, C. P. Cannon and E. J. Topol (2011). "Platelet Reactivity and Cardiovascular Outcomes After Percutaneous Coronary Intervention A Time-Dependent Analysis of the Gauging Responsiveness With a VerifyNow P2Y12 Assay: Impact on Thrombosis and Safety (GRAVITAS) Trial." Circulation **124**(10): 1132-1137.
- Price, M. J., P. B. Berger, P. S. Teirstein, J. F. Tanguay, D. J. Angiolillo, D. Spriggs, S. Puri, M. Robbins, K. N. Garratt, O. F. Bertrand, M. E. Stillablower, J. R. Aragon, D. E. Kandzari, C. T. Stinis, M. S. Lee, S. V. Manoukian, C. P. Cannon, N. J. Schork, E. J. Topol and G. Investigators (2011). "Standard- vs High-Dose Clopidogrel Based on Platelet Function Testing After Percutaneous Coronary Intervention - The GRAVITAS Randomized Trial." Jama-Journal of the American Medical Association **305**(11): 1097-1195.

- Price, M. J., J. L. Coleman, S. R. Steinhubl, G. B. Wong, C. P. Cannon and P. S. Teirstein (2006). "Onset and offset of platelet inhibition after high-dose clopidogrel loading and standard daily therapy measured by a point-of-care assay in healthy volunteers." The American journal of cardiology **98**(5): 681-684.
- Riess, H., G. Braun, G. Brehm and E. Hiller (1986). "Critical Evaluation Of Platelet Aggregation In Whole Human Blood." American Journal of Clinical Pathology **85**(1): 50-56.
- Roden, D. M. and A. R. Shuldiner (2010). "Responding to the Clopidogrel Warning by the US Food and Drug Administration - Real Life Is Complicated." Circulation **122**(5): 445-448.
- Sambu, N., T. Warner and N. Curzen (2011). "Clopidogrel withdrawal: is there a "rebound" phenomenon?" Thrombosis and haemostasis **105**(2): 211-220.
- Santos, M. T., J. Vallés, A. J. Marcus, L. B. Safier, M. J. Broekman, N. Islam, H. L. Ullman, A. M. Eiroa and J. Aznar (1991). "Enhancement of Platelet Reactivity and Modulation of Eicosanoid Production by Intact Erythrocytes - A New Approach to Platelet Activation and Recruitment." Journal of Clinical Investigation **87**(2): 571-580.
- Savi, P., J. M. Pereillo, M. F. Uzabiaga, J. Combalbert, C. Picard, J. P. Maffrand, M. Pascal and J. M. Herbert (2000). "Identification and biological activity of the active metabolite of clopidogrel." Thrombosis and haemostasis **84**(5): 891-896.
- Savi, P., J. L. Zacharyus, N. Delesque-Touchard, C. Labouret, C. Herve, M. F. Uzabiaga, J. M. Pereillo, J. M. Culouscou, F. Bono, P. Ferrara and J. M. Herbert (2006). "The active metabolite of Clopidogrel disrupts P2Y12 receptor oligomers and partitions them out of lipid rafts." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **103**(29): 11069-11074.
- Serebruany, V. L., S. R. Steinhubl, P. B. Berger, A. I. Malinin, D. L. Bhatt and E. J. Topol (2005). "Variability in platelet responsiveness to clopidogrel among 544 individuals." Journal of the American College of Cardiology **45**(2): 246-251.
- Shuldiner, A. R., J. R. O'Connell, K. P. Bliden, A. Gandhi, K. Ryan, R. B. Horenstein, C. M. Damcott, R. Pakyz, U. S. Tantry, Q. Gibson, T. I. Pollin, W. Post, A. Parsa, B. D. Mitchell, N. Faraday, W. Herzog and P. A. Gurbel (2009). "Association of Cytochrome P450 2C19 Genotype With the Antiplatelet Effect and Clinical Efficacy of Clopidogrel Therapy." Jama-Journal of the American Medical Association **302**(8): 849-858.
- Sibbing, D., S. Braun, S. Jawansky, W. Vogt, J. Mehilli, A. Schomig, A. Kastrati and N. von Beckerath (2008). "Assessment of ADP-induced platelet aggregation with light transmission aggregometry and multiple electrode platelet aggregometry before and after clopidogrel treatment." Thrombosis and haemostasis **99**(1): 121-126.
- Sibbing, D., S. Braun, T. Morath, J. Mehilli, W. Vogt, A. Schomig, A. Kastrati and N. von Beckerath (2009). "Platelet reactivity after clopidogrel treatment assessed with point-of-care analysis and early drug-eluting stent thrombosis." Journal of the American College of Cardiology **53**(10): 849-856.
- Sibbing, D., R. A. Byrne, I. Bernlochner and A. Kastrati (2011). "High platelet reactivity and clinical outcome - Fact and fiction." Thrombosis and haemostasis **106**(2): 191-202.
- Sibbing, D., J. Stegherr, S. Braun, J. Mehilli, S. Schulz, M. Seyfarth, A. Kastrati, N. von Beckerath and A. Schomig (2010). "A double-blind, randomized study on prevention and existence of a rebound phenomenon of platelets after cessation of clopidogrel treatment." Journal of the American College of Cardiology **55**(6): 558-565.
- Sibbing, D., J. Stegherr, W. Latz, W. Koch, J. Mehilli, K. Dorrlor, T. Morath, A. Schomig, A. Kastrati and N. von Beckerath (2009). "Cytochrome P450 2C19 loss-of-function polymorphism and stent thrombosis following percutaneous coronary intervention." European heart journal **30**(8): 916-922.

- Sibbing, D., D. Taubert, A. Schomig, A. Kastrati and N. Von Beckerath (2008). "Pharmacokinetics of clopidogrel in patients with stent thrombosis." Journal of Thrombosis and Haemostasis **6**(7): 1230-1232.
- Simon, T., D. L. Bhatt, L. Bergougnan, C. Farenc, K. Pearson, L. Perrin, E. Vicaut, F. LaCreta, F. Hurbin and M. Dubar (2011). "Genetic Polymorphisms and the Impact of a Higher Clopidogrel Dose Regimen on Active Metabolite Exposure and Antiplatelet Response in Healthy Subjects." Clinical Pharmacology & Therapeutics **90**(2): 287-295.
- Simon, T., C. Verstuyft, M. Mary-Krause, L. Quteineh, E. Drouet, N. Meneveau, P. G. Steg, J. Ferrieres, N. Danchin, L. Becquemont and S. T. E. French Registry Acute (2009). "Genetic Determinants of Response to Clopidogrel and Cardiovascular Events." New England Journal of Medicine **360**(4): 363-375.
- Statistisches Bundesamt. (2014). Retrieved 21.12.2015, from <https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/SterbefaelleInsgesamt.html?nn=50808>.
- Steinhubl, S. R., P. B. Berger, J. T. Mann, E. T. A. Fry, A. DeLago, C. Wilmer, E. J. Topol and C. Investigators (2002). "Early and sustained dual oral antiplatelet therapy following percutaneous coronary intervention - A randomized controlled trial." Jama-Journal of the American Medical Association **288**(19): 2411-2420.
- Stettler, C., S. Wandel, S. Allemann, A. Kastrati, M. C. Morice, A. Schomig, M. E. Pfisterer, G. W. Stone, M. B. Leon, J. S. de Lezo, J. J. Goy, S. J. Park, M. Sabate, M. J. Suttorp, H. Kelbaek, C. Spaulding, M. Menichelli, P. Vermeersch, M. T. Dirksen, P. Cervinka, A. S. Petronio, A. J. Nordmann, P. Diem, B. Meier, M. Zwahlen, S. Reichenbach, S. Trelle, S. Windecker and P. Juni (2007). "Outcomes associated with drug-eluting and bare-metal stents: a collaborative network meta-analysis." Lancet **370**(9591): 937-948.
- Stryer, L. and R. P. Haugland (1967). "ENERGY TRANSFER - A SPECTROSCOPIC RULER." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **58**(2): 719-&.
- Theroux, P., D. Waters, J. Lam, M. Juneau and J. McCans (1992). "Reactivation of unstable angina after the discontinuation of heparin." The New England journal of medicine **327**(3): 141-145.
- Toth, O., A. Calatzis, S. Penz, H. Losonczy and W. Siess (2006). "Multiple electrode aggregometry: a new device to measure platelet aggregation in whole blood." Thrombosis and haemostasis **96**(6): 781-788.
- Trenk, D., W. Hochholzer, M. F. Fromm, L. E. Chialda, A. Pahl, C. M. Valina, C. Stratz, P. Schmiebusch, H. P. Bestehorn, H. J. Buttner and F. J. Neumann (2008). "Cytochrome P450 2C19 681G>A polymorphism and high on-clopidogrel platelet reactivity associated with adverse 1-year clinical outcome of elective percutaneous coronary intervention with drug-eluting or bare-metal stents." Journal of the American College of Cardiology **51**(20): 1925-1934.
- Umemura, K., T. Furuta and K. Kondo (2008). "The common gene variants of CYP2C19 affect pharmacokinetics and pharmacodynamics in an active metabolite of clopidogrel in healthy subjects." Journal of thrombosis and haemostasis : JTH **6**(8): 1439-1441.
- Valgimigli, M., G. Campo, C. Arcozzi, P. Malagutti, R. Carletti, F. Ferrari, D. Barbieri, G. Parrinello, G. Percoco and R. Ferrari (2007). "Two-year clinical follow-up after sirolimus-eluting versus bare-metal stent implantation assisted by systematic glycoprotein IIb/IIIa Inhibitor Infusion in patients with myocardial infarction: results from the STRATEGY study." Journal of the American College of Cardiology **50**(2): 138-145.
- Vallés, J., M. T. Santos, J. Aznar, A. J. Marcus, V. Martinezsales, M. Portoles, M. J. Broekman and L. B. Safier (1991). "Erythrocytes Metabolically Enhance Collagen-

- Induced Platelet Responsiveness Via Increased Thromboxane Production, Adenosine Diphosphate Release, and Recruitment." Blood **78**(1): 154-162.
- Van Der Stelt, C. A. K., J. W. Van Werkum, T. H. Seesing, J. M. Ten Berg and C. M. Hackeng (2007). "To adjust or not to adjust the platelet count in light transmission aggregometry in patients receiving dual aspirin/clopidogrel treatment." Platelets **18**(7): 550-553.
- van Werkum, J. W., A. A. Heestermans, A. C. Zomer, J. C. Kelder, M. J. Suttorp, B. J. Rensing, J. J. Koolen, B. R. G. Brueren, J. H. E. Dambrink, R. W. Hautvast, F. W. Verheugt and J. M. ten Berg (2009). "Predictors of Coronary Stent Thrombosis The Dutch Stent Thrombosis Registry." Journal of the American College of Cardiology **53**(16): 1399-1409.
- Varenhorst, C., S. James, D. Erlinge, J. T. Brandt, O. O. Braun, M. Man, A. Siegbahn, J. Walker, L. Wallentin, K. J. Winters and S. L. Close (2009). "Genetic variation of CYP2C19 affects both pharmacokinetic and pharmacodynamic responses to clopidogrel but not prasugrel in aspirin-treated patients with coronary artery disease." European heart journal **30**(14): 1744-1752.
- Virmani, R., G. Guagliumi, A. Farb, G. Musumeci, N. Grieco, T. Motta, L. Mihalsik, M. Tespili, O. Valsecchi and F. D. Kolodgie (2004). "Localized Hypersensitivity and Late Coronary Thrombosis Secondary to a Sirolimus-Eluting Stent: Should We Be Cautious?" Circulation **109**(6): 701-705.
- von Beckerath, N., D. Taubert, G. Pogatsa-Murray, A. Wiczorek, E. Schomig, A. Schomig and A. Kastrati (2005). "A patient with stent thrombosis, clopidogrel-resistance and failure to metabolize clopidogrel to its active metabolite." Thrombosis and haemostasis **93**(4): 789-791.
- Wallentin, L., S. James, R. F. Storey, M. Armstrong, B. J. Barratt, J. Horrow, S. Husted, H. Katus, P. G. Steg, S. H. Shah, R. C. Becker and P. Investigators (2010). "Effect of CYP2C19 and ABCB1 single nucleotide polymorphisms on outcomes of treatment with ticagrelor versus clopidogrel for acute coronary syndromes: a genetic substudy of the PLATO trial." Lancet **376**(9749): 1320-1328.
- Weber, A. A., M. Braun, T. Hohlfeld, B. Schwippert, D. Tschöpe and K. Schror (2001). "Recovery of platelet function after discontinuation of clopidogrel treatment in healthy volunteers." British journal of clinical pharmacology **52**(3): 333-336.
- Weinberg, W. (1908). "Über den Nachweis der Vererbung beim Menschen." Jahreshefte des Vereins für vaterländische Naturkunde in Württemberg **64**: 368-382.
- Wijns, W. and P. Kolh (2010). "Guidelines on myocardial revascularization The Task Force on Myocardial Revascularization of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS)." European heart journal **31**(20): 2501-2555.
- Wiviott, S. D., E. Braunwald, C. H. McCabe, G. Montalescot, W. Ruzyllo, S. Gottlieb, F. J. Neumann, D. Ardissino, S. De Servi, S. A. Murphy, J. Riesmeyer, G. Weerakkody, C. M. Gibson and E. M. Antman (2007). "Prasugrel versus clopidogrel in patients with acute coronary syndromes." The New England journal of medicine **357**(20): 2001-2015.
- Xie, H. G., R. B. Kim, A. J. J. Wood and C. M. Stein (2001). "Molecular basis of ethnic differences in drug disposition and response." Annual Review of Pharmacology and Toxicology **41**: 815-850.
- Xie, H. G., C. M. Stein, R. B. Kim, G. R. Wilkinson, D. A. Flockhart and A. J. J. Wood (1999). "Allelic, genotypic and phenotypic distributions of S-mephenytoin 4'-hydroxylase (CYP2C19) in healthy Caucasian populations of European descent throughout the world." Pharmacogenetics **9**(5): 539-549.

- Xie, H. G., J. J. Zou, Z. Y. Hu, J. J. Zhang, F. Ye and S. L. Chen (2011). "Individual variability in the disposition of and response to clopidogrel: Pharmacogenomics and beyond." *Pharmacology & Therapeutics* **129**(3): 267-289.
- Yedidya, I., A. Netzer, M. Vaduganathan, A. Solodky, R. Kornowski and E. I. Lev (2012). "Clopidogrel tapering as a strategy to attenuate platelet rebound phenomenon in patients with bare-metal stents." *Journal of Thrombosis and Thrombolysis* **33**(1): 16-21.
- Yusuf, S., K. A. A. Fox, G. Tognoni, S. R. Mehta, S. Chrolavicius, S. Anand, A. Avezum, N. Awan, M. Bertrand, A. Budaj, L. Ceremuzynski, J. Col, P. J. Commerford, R. Diaz, M. Flather, M. G. Franzosi, B. Gersh, W. Grossman, D. A. Halon, D. Hunt, C. Joyner, N. Karatzas, M. Keltai, S. Kopecky, B. S. Lewis, A. Maggioni, K. Malmberg, T. Moccetti, J. Morais, M. Natarajan, E. Paolasso, R. Peters, L. Piegas, A. Pipilis, J. Pogue, M. Ramos-Corrales, H. J. Rupprecht, E. Sitkei, V. Valentin, J. Varigos, P. Widimsky, T. Wittlinger, M. Blumenthal, J. Bouthier, C. Gaudin, T. Hess, N. Khurmi, M. Sotty, I. Copland, B. Cracknell, C. Demers, J. Eikelboom, B. Morris, J. Pasquale, V. Yacyshyn, F. Zhao, G. Wyse, J. Cairns, R. Hart, J. Hirsh, M. Gent, T. Ryan, J. Wittes, R. A. Guerrero, V. Arias, F. H. Bello, J. O. Bono, L. Bujan, A. Caccavo, A. A. Fernandez, J. J. Fuselli, A. J. Gambarte, E. G. Hasbani, E. Marzetti, G. Mon, R. Nordaby, G. Quijano, A. Salvati, E. San Martin, P. Schygiel, A. S. Liprandi, H. Torre, E. Tuero, J. Amerena, J. H. N. Bett, J. Botha, A. Buncle, D. Careless, A. Ewart, A. Fagan, D. Fitzpatrick, P. Garrahy, K. Gunawardane, A. Hamer, A. Hill, N. Jepson, G. Lane, H. LeGood, G. Nelson, M. Sallaberger, G. Tulloch, D. Owensby, J. Padley, D. Rees, K. Roberts, D. Rosen, J. Sampson, B. Singh, C. Singh, R. Taylor, A. Thomson, W. Walsh, H. De Raedt, J. Rankin, J. A. Abrantes, D. C. de Albuquerque, C. Blacher, L. C. Bodanese, A. C. Carvalho, M. Coutinho, O. Dutra, J. P. Esteves, P. Leaes, N. S. Lima, N. Lobo, J. A. M. Neto, R. L. Marino, J. C. Nicolau, R. C. Pedrosa, I. Pereira, W. Rabelo, A. Rabelo, R. F. Ramos, R. M. Rocha, E. C. Schramm, C. V. Serrano, V. P. Souza, A. Timerman, R. Vaz, S. S. Xavier, P. Auger, K. Barbin, I. Bata, L. Bergeron, R. K. Bhargava, P. Bogaty, P. Bolduc, T. Boyne, L. Boyer, B. Bozek, T. Calmusky, Y. K. Chan, D. Cole, M. D'Astous, M. David, T. Davies, L. Desjardins, P. B. Dohaney, M. Doody, F. Dumont, C. Fortin, A. Fung, G. Galdreault, P. B. Gervais, J. P. Giannoccaro, G. Gosselin, D. Grandmont, A. Grover, M. Gupta, H. Hink, J. G. Hiscock, D. Hutton, J. W. H. Hynd, A. Iless, C. Kent, A. Kitching, S. Kouz, K. Kwok, M. LaForest, H. Lee, C. Lefkowitz, B. Lubelsky, P. Ma, J. F. Marquis, A. McCallum, R. Major, B. May, M. Mercier, M. Montigny, A. Morris, S. Nawaz, J. Norris, S. Pallie, A. Panju, P. Parekh, C. Patterson, Y. Pesant, C. Pilon, A. R. J. Rajakumar, T. Rebane, J. Ricci, M. Ruel, R. Schuld, R. Starra, M. Thornley, A. S. Weeks, L. H. Winkler, G. Wisenberg, I. Witt, K. Woo, E. Yu, R. Zadra, D. Zaniol, P. Bocek, M. Branny, V. Cepelak, P. Gregor, L. Groch, P. Jansky, P. Svitil, A. Vaclavicek, S. Husted, B. Ziegler, A. Karhu, J. Mustonen, M. Nieminen, K. Nissinen, K. Peuhkurinen, P. Tuomainen, A. Ylitalo, M. Adam, G. Amat, K. Asward, G. Bessede, P. Dambrine, E. Decoux, B. D'Hautefeuille, J. Dujardin, R. Fouche, P. Fournier, Y. Haftel, J. Y. Ketelers, R. Lallemand, M. Lang, F. Leroy, M. Richard, W. Dippold, J. Gronholz, J. Harenberg, C. Hilpert, T. Horacek, A. Moritz, H. Neuss, K. Nitsche, H. R. Ochs, M. Plumer-Schmidt, B. Pollock, G. Post, M. Sauer, A. Schmidt, H. Schmitt, H. O. Schulze, P. Schuster, E. R. von Leitner, S. Christakos, K. Karidis, K. Kifnidis, K. Papadopoulos, D. Symconidis, A. Tiologos, B. Garai, T. Gesztesi, K. Heltai, B. Herczeg, A. Janosi, A. Kadar, E. Kalo, P. Karpati, B. Kiss, A. Nagy, M. Okros, F. Poor, L. Regos, J. Sebo, P. Soltesz, J. Stefan, F. Szaboki, S. Timar, Z. Varallyay, K. Veres, K. Daly, G. Cotter, A. Marmor, D. Nazzal, M. Omary, L. Reisin, T. Rosenfeld, M. Shargorodsky, S. Shasha, A. Smulovitz, Z. Vered, R. Zimlichman, G. Beria, D.

Anhang

Bernardi, E. Bonfanti, V. Ceci, R. De Caterina, S. De Servi, M. DelPinto, A. Di Chiara, G. Di Pasquale, L. Filippucci, M. Galli, E. Gardinale, M. T. Landoni, A. Martoni, F. Mauri, N. Maurea, P. Meneghetti, M. Mennuni, A. Murrone, A. Pani, E. Paolini, P. Passarelli, G. Pettinati, B. Pontillo, L. Rossi, R. Rossi, M. Santini, G. Sabino, P. Tricoci, F. M. Turazza, A. C. Diaz, A. Garcia-Sosa, I. H. Santamaria, J. L. Pons, J. N. Medecigo, F. J. R. Rojo, C. J. S. Diaz, J. T. Castro, E. V. Morales, S. Baldew, D. C. G. Basart, N. Bijsterfeld, P. Bronzwaer, A. Chardon, M. den Hartoog, H. Heijmen, J. Heijmeriks, G. Jochemsen, H. Klomps, P. Landsaat, H. Michels, A. Moons, M. Pieterse, A. Sadee, G. van Beek, M. Van Hessen, J. Verheul, E. Viergever, M. Audeau, M. Hills, H. Ikram, M. Johnstone, A. Smart, J. Erikssen, T. Morstel, J. Winther, P. Achremczyk, A. Baranowska, P. Burduk, D. Cichon, A. Czepiel, H. Danielewicz, P. Danielewicz, W. Dworzanski, J. Gessek, A. Gorecki, J. Gorny, K. Janik, A. Jedrzejowski, G. Kania, T. Kawka-Urbaneck, J. Klaudel, D. Kopicik, A. Kozlowski, W. Krasowski, A. Ladach, M. Laniec, J. Maciejewicz, P. Maciejewski, Z. Majcher, S. Malinowski, T. Marczyk, P. Miekus, T. Myczka, M. Ogorek, M. Piepiorka, K. Religa, Z. Reszka, M. Rozwodowska, W. Smielak-Korombel, D. Smiglak, J. Spyra, S. Stec, D. Susol, M. Szpajer, P. Szymanski, G. Szymczyk-Muszytowska, M. Tomzynski, M. Ujda, W. Wasek, T. Waszyrowski, P. Wojewoda, A. Wnorowska, P. Wrobel, J. Zadrozny, A. Zebrowski, Z. Zielinski, J. M. Bastos, P. Cardoso, M. Carrageta, C. Catarino, R. Ferreira, M. V. Gomes, A. Aboo, L. Bobak, B. Brown, S. Cassim, S. Harripersadh, P. Manga, F. Maritz, J. Marx, D. Myburgh, H. Nell, A. Okreglicki, H. Theron, N. A. Orcajo, F. Colomina, I. Echanove, J. G. Guerrer, E. Gomez-Martinez, I. Lekuona, L. Miralles, C. Pasaval, A. Rovira, J. San Jose, A. R. Llorian, N. Abdon, B. Bartholdson, E. Basilier, I. Johansson, B. Kristensson, K. Larsson, P. Lindell, B. Moller, G. Rasmanis, A. Stjerna, K. Tolhagen, B. Caduff, G. Nosedo, A. Rossi, D. Schmidt, J. Zerega, K. Carr, R. Detrano, R. Geer, G. Grewal, P. Hermany, N. Lakkis, W. R. Lewis, T. R. Pacheco, G. Papuchis, J. Puma, S. Runckey, U. Thadani, J. Whitaker, Y. J. A. Adgey, D. Blackman, M. Brack, A. Bridges, A. Cohen, P. Currie, S. Duffy, I. Findlay, J. Goodfellow, K. Gray, D. Hogg, D. Holdright, D. Hughes, N. Irvine, K. Jennings, P. Keeling, P. Ludman, T. Mathew, P. McIntyre, R. Oliver, N. Palmer, E. Rodrigues, L. Smyth, D. Sprigings, J. Stephens, A. Timmis, R. Vincent and P. Clopidogrel Unstable Angina (2001). "Effects of clopidogrel in addition to aspirin in patients with acute coronary syndromes without ST-segment elevation." New England Journal of Medicine **345**(7): 494-502.

8. Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Albert Schömig für die Möglichkeit diese Doktorarbeit am Deutschen Herzzentrum München durchführen zu können.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. med. Dirk Sibbing für die Überlassung des Dissertationsthemas sowie für die Betreuung und Unterstützung während der Durchführung dieser gesamten Arbeit.

Herrn Prof. Dr. med. Adnan Kastrati danke ich für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung und Herrn Dr. Werner Koch für die Nutzung des Genanalyzelabors. Herrn Dr. med. Siegmund Braun und seinen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern danke ich für die labormedizinische Untersuchung der Blutproben. Ich danke Frau Graf von der Apotheke für die Bereitstellung der Studienmedikation.

Bei Tanja Morath und Wolfgang Latz möchte ich mich besonders herzlich für die geduldige Einarbeitung in die Labormethoden bedanken. Sie standen mir stets mit Rat und Tat zur Seite. Auch Heidrun Holle und Noni Rifatov vom klinischen Studienzentrum möchte ich für die Hilfe bei der Patientenrekrutierung danken.

Ich danke allen Ärztinnen und Ärzten sowie dem Pflegepersonal im Herzkatheterlabor und auf den Stationen für die kooperative Zusammenarbeit.

Mein größter Dank gilt allen Patienten, die sich bereiterklärt haben, an der *Rebound*-Studie teilzunehmen, die häufigen Blutentnahme-Termine wahrgenommen haben und mir im Laufe der jeweils zweimonatigen Beobachtungszeit menschlich sehr viel Freude bereitet haben.