

1. Medizinische Klinik und Poliklinik

Klinik für Herz- und Kreislauferkrankungen, Deutsches Herzzentrum München,

des Freistaates Bayern

Technische Universität München

Klinikum rechts der Isar

(Direktor: Univ.-Prof. Dr. A. Schömig)

Die Wirkung einer 600 mg Loading Dosis Clopidogrel und chronische  
Statintherapie bei Patienten mit geplanter Koronarintervention

Adrienne Gabriella Mocz

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

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. A. Kastrati

2. Priv.-Doz. Dr. I. Ott

Die Dissertation wurde am 13.02.2006 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät der Medizin am 17.05.2006 angenommen.

## **Inhaltsverzeichnis**

<b>Verzeichnis der Abkürzungen</b>	4
<b>1. Einleitung</b>	5
1.1 Koronare Herzerkrankung	5
1.2 Koronare Stentimplantation	5
1.3 Stentthrombose	7
1.4 Thrombozytäre ADP-Rezeptoren	11
1.5 Antithrombozytäre Therapie	12
1.6 Variabilität des Ansprechens auf Clopidogrel	15
1.7 Clopidogrel und CYP3A4-metabolisierte Statine	17
1.8 Zielsetzung und Fragestellung	19
<b>2. Materialien und Methoden</b>	21
2.1 Patientenpopulation	21
2.2 Definitionen	22
2.3 Aggregometrie	22
2.3.1 Grundlagen der Aggregometrie	22
2.3.2 Durchführung der Messungen	24
2.4 Durchflusszytometrie	25
2.4.1 Grundlagen der Durchflusszytometrie	25
2.4.2 Fluorochrommarkierte Antikörper	26
2.4.3 Durchführung der Messungen	27
2.5 Statistische Auswertung	28

<b>3. Ergebnisse</b>	29
3.1 Patienteneigenschaften	29
3.2 Statine und antithrombozytäre Wirkung von Clopidogrel	31
3.3 Atorvastatin oder Simvastatin und antithrombozytäre Wirkung von Clopidogrel	34
3.4 Fehlender Einfluss der Statindosis auf die antithrombozytäre Wirkung von Clopidogrel	35
3.5 Ca <sup>2+</sup> -Antagonisten und antithrombozytäre Wirkung von Clopidogrel	36
<b>4. Diskussion</b>	37
4.1 Statintherapie und antithrombozytäre Clopidogrelwirkung	38
4.2 Oberflächenexpression von Membranrezeptoren und Einfluss der Statine auf die Clopidogrelwirkung	42
4.3 Klinische Studien über die mögliche Interaktion zwischen Statinen und Clopidogrel	44
4.4 Ca <sup>2+</sup> -Antagonisten und antithrombozytäre Clopidogrelwirkung	45
4.5 Weitere mögliche Ursachen für die Variabilität des Ansprechens auf die Clopidogreltherapie	46
4.5.1 Absorption von Clopidogrel	46
4.5.2 Polymorphismen des P2Y <sub>12</sub> Rezeptors	46
4.6 Studienlimitation	47
<b>5. Zusammenfassung</b>	48
<b>6. Literaturverzeichnis</b>	49
<b>7. Danksagung</b>	65

**Verzeichnis der Abkürzungen**

ADP	-Adenosindiphosphat
AK	-Antikörper
AMP	-Adenosinmonophosphat
ASS	-Azetylsalizylsäure
ATP	-Adenosintriphosphat
Ca <sup>2+</sup>	-Kalzium
CABG	-Coronary Artery Bypass Grafting (aortokoronare Bypass-Operation)
GP	-Glykoprotein
IAP	-Instabile Angina Pectoris
IP3	-Inositoltriphosphat
KHK	-Koronare Herzkrankheit
MI	-Myokardinfarkt
PBS	-Phosphate Buffered Saline (mit Phosphat gepufferte Salzlösung)
PFA	-Paraformaldehyd
PPP	-Platelet Poor Plasma (thrombozytenarmes Plasma)
PRP	-Platelet Rich Plasma (thrombozytenreiches Plasma)
PTCA	-Perkutane transluminare KoronarAngioplastie
S.D.	-Standard Deviation (Standardabweichung)
S.E.	-Standard Error of the Mean (Standardfehler)
vWF	-von Willebrand Faktor

## **1. Einleitung**

### **1.1 Koronare Herzerkrankung**

Die Koronare Herzkrankheit (KHK) ist durch eine akute oder chronische Störung der Herzfunktion definiert, die auf einem Missverhältnis zwischen Sauerstoffbedarf und -angebot des Herzmuskelgewebes beruht. Ursache ist im überwiegenden Fall eine hämodynamisch relevante Verengung an einer oder mehrerer der drei Koronararterien. Gegenwärtig ist die KHK die am häufigsten zum Tode führende Erkrankung in den westlichen Industrienationen mit einem Anteil an der Gesamtmortalität von über 30%.

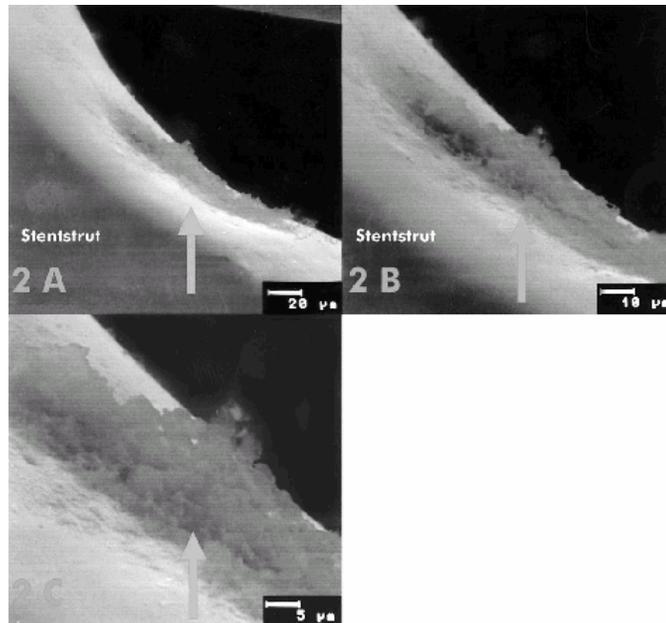
### **1.2 Koronare Stentimplantation**

Derzeit sind kardiologisch-interventionelle Verfahren wie die perkutane transluminale Koronarangioplastie (PTCA) mit oder ohne Implantation von Gefäßstützen (Stents) von immenser Bedeutung bei der Behandlung der Koronaren Herzkrankheit. Allein in Deutschland werden jährlich mehr als 100.000 Koronarinterventionen durchgeführt. Die erste Ballondilatation erfolgte im Jahre 1977 durch Andreas Gruentzig in Zürich (Gruentzig, 1981). Die Aufdehnung einer Koronararterie ist jedoch verbunden mit dem Auftreten von Dissektionen der Gefäßwand. Dieses Einreißen der Gefäßwand wird durch das Überdehnungstrauma und Plaquerupturen hergerufen und kann bei Progredienz zum akuten Gefäßverschluss führen (Lyon et al., 1987). Durch zusätzliche Einlage von Stents können progrediente Dissektionen nach erfolgter Aufdehnung der Gefäßwand vermieden werden. Nachdem in vielen Studien der positive Einfluss der Stentimplantation gezeigt werden konnte, etablierte sich dieses Verfahren in der klinischen Praxis (Fischman et al., 1994; Serruys et al., 1994; EPISTENT Investigators, 1998). In der Folge konnte die Zahl der notwendigen Bypassoperationen deutlich reduziert werden. Trotz dieser

Fortschritte entwickeln jedoch immer noch 20 – 50 % der Patienten nach Koronarintervention Komplikationen (Ferns et al., 2000), die z.T. mit hoher Morbität und Mortalität assoziiert sind. Der akute thrombotische Gefäßverschluss und die Restenose stellen die wesentlichen limitierenden Faktoren der koronaren Stentimplantation dar (Ferns et al., 2000, Moliterno et al., 1995).

### 1.3 Stentthrombose

Der thrombotische Verschluss des mit einem Stent behandelten Gefäßabschnittes, meist innerhalb der ersten 30 Tage nach Intervention (Schühlen et al., 1998), ist die bedeutendste und gefährlichste Komplikation nach koronarer Stentimplantation.



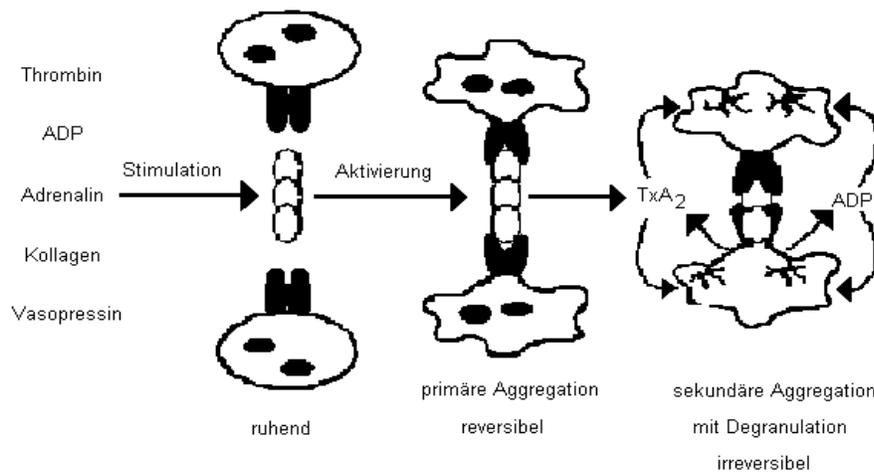
**Abbildung 1:** *Thrombotische Auflagerungen im Bereich einer Stentstrebe 48 Stunden nach Implantation. A: Ausschnittsvergrößerung (500fach) einer Stentstrebe. B: Es kann eine Schichtung des thrombotischen Materials erkannt werden (1000fache Vergrößerung). C: Das Metall ist von einer dünnen Proteinschicht überzogen. Erst in der äußeren Schicht des Thrombus finden sich Erythrozyten und Thrombozyten (3000fach, nach Grewe et al., 1997).*

Durch Endothelverletzung und Thrombogenität des Stents (Herrmann et al., 1998) bildet sich schon in der Frühphase eine Thrombusschicht auf der Stentoberfläche (Grewe et al., 1997) (Siehe Abb. 1). Bei der Entstehung von akuten thrombotischen Ereignissen nach

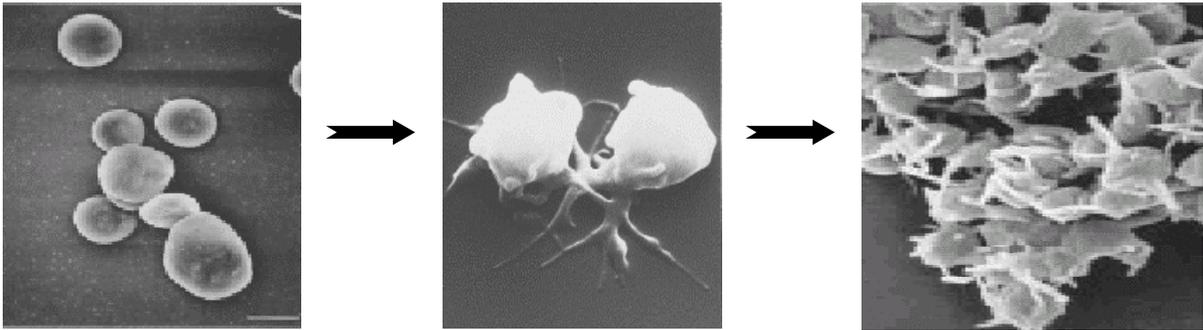
Stentimplantation wird den Thrombozyten eine wichtige Rolle zugeschrieben (Gawaz et al., 1999). Die Stenteinlage nach PTCA führt zu einer kompletten Destruktion der Endothelschicht (Grewe et al., 2001). Als Folge der Beschädigung fehlen die antithrombotischen Eigenschaften des Endothels (Ross et al., 1993), und es kommt zur Freisetzung von thrombozytenaktivierenden Substanzen wie Adenosindiphosphat (ADP), Thrombin, Serotonin und Adrenalin (Anderson et al., 1996). Zudem werden tiefer gelegene Strukturen des Subendothels, wie z.B. Kollagen, Fibronektin und von-Willebrand-Faktor (vWF) freigelegt (Kehrel B., 1995). Normalerweise sind die im Blut befindlichen Thrombozyten ruhend, und werden erst bei einer Gefäßverletzung aktiviert. Die Interaktion zwischen dem Glykoprotein(GP)-Ib-V-IX-Rezeptor (Rezeptor für vWF) der Thrombozyten und vWF in der Gefäßwand ermöglicht das Rollen der Blutplättchen auf dem Subendothel (so genanntes Thrombozytenthethering, Springer et al., 1998). Über die anderen membranständigen Rezeptoren für Kollagen-, Laminin- und Fibronektin kommt es zur Adhäsion der Thrombozyten an die Gefäßwand (Gawaz, 1999). Die Thrombozytenadhäsion bewirkt gleichzeitig eine Aktivierung der Thrombozyten. Der aktive Zustand der Thrombozyten ist durch die Expression und Konformationsänderung der Oberflächenrezeptoren gekennzeichnet, die zu Adhäsion, Aggregation und Interaktion mit anderen Blutbestandteilen führen. Gleichzeitig kommt es zur so genannten „Degranulation“, wobei der Inhalt der Granula (ADP, Thromboxan A<sub>2</sub>, PDGF, Thrombospondin-1) freigesetzt oder auf die Oberfläche der Plättchen exprimiert wird (P-Selektin, GP IIb/IIIa). Die löslichen Granulainhalte fördern wiederum die Thrombozytenaktivierung und führen zur Rekrutierung zusätzlicher Blutplättchen. (Siehe Abb. 2, Deepak et al., 2002). Außerdem unterstützen sie die Interaktion mit anderen Blutzellen. P-Selektin vermittelt beispielsweise die Adhäsion aktivierter Thrombozyten an neutrophile Granulozyten und Monozyten (Laarsen et al. 1989, Hamburger et al. 1990, Palabrica et al. 1992).

Bei Aktivierung weiterer Thrombozyten setzt die Aggregation ein, welche die Quervernetzung zwischen Blutplättchen untereinander darstellt. Die Aggregation wird ermöglicht durch die Expression (Ware und Collier, 1995) und Konformationsänderung des Fibrinogenrezeptors –GP IIb/IIIa - mit Freilegung von Fibrinogenbindungsstellen, wodurch die Bindung von löslichem Fibrinogen an diesen Rezeptor ermöglicht wird (Abb. 3, Cox et al., 1994).

Der Grad der Thrombozytenaktivierung kann durch das Ausmaß der Expression der Rezeptoren auf der Thrombozytenoberfläche und/oder deren Aktivierungszustandes mittels Durchflusszytometrie erfasst werden. Durch diese Methodik konnte z.B. gezeigt werden, dass die Oberflächenexpression von Adhäsionsrezeptoren auf aktivierten Plättchen eine bedeutende Rolle und eine Aussagekraft bezüglich der Entstehung subakuter Gefäßverschlüsse nach Koronarinterventionen hat (Tschoepe et al., 1993; Gawaz et al., 1994.).



**Abbildung 2:** Die Aggregatbildung erfolgt über Fibrinogenbrücken nach Aktivierung der Thrombozyten (reversible Phase). Durch Degranulation der Blutplättchen wird die primäre Aggregation verfestigt und irreversibel (nach Gawaz, 1999).



**Abbildung 3:** *Ruhende und aktivierte Blutplättchen in elektronenmikroskopischer Darstellung. Das linke Bild zeigt ruhende diskoidförmige Thrombozyten. Durch die Aktivierung kommt es zu einer Formänderung wodurch sich die Oberfläche der Thrombozyten vergrößert (mittleres Bild). Das rechte Bild zeigt aktivierte Thrombozyten (Echinosphärozyten) die miteinander aggregieren (Elektronenmikroskopie nach [www.platelet.page](http://www.platelet.page)).*

Neben der Thrombusformation begünstigen aktivierte Thrombozyten koronare Vasospasmen an der Stelle der thrombotischen Plaques durch Freisetzung von Serotonin und Thromboxan A<sub>2</sub> (Fichtlscherer und Zeiher, 1999).

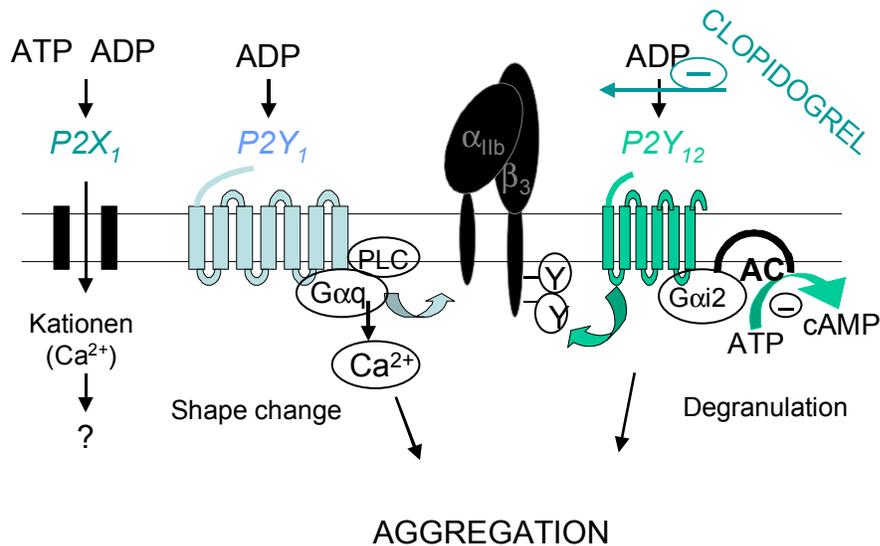
#### 1.4 Thrombozytäre ADP-Rezeptoren

Adenosindiphosphat (ADP) wurde als erste physiologische niedermolekulare proaggregatorische Substanz identifiziert (Gaarder et al., 1961). Die Bedeutung von ADP wurde auch anhand der erhöhten Blutungsneigung bei Patienten mit ADP-Poolmangel oder defekten ADP-Rezeptoren festgestellt (Holmsen und Weiss, 1970; Remijn et al., 2002; Fabre et al., 1999). ADP aktiviert Thrombozyten indem es an bestimmte Rezeptoren auf der Thrombozytenoberfläche bindet. Auf menschlichen Thrombozyten wurden drei Typen von purinergen Rezeptoren mit jeweils verschiedenen Aktivierungskaskaden beschrieben: zwei G-Protein-gekoppelte Rezeptoren P2Y<sub>1</sub> und P2Y<sub>12</sub> sowie der inotropischer Rezeptor P2X<sub>1</sub> (Hollopeter et al., 2001; Zhang et al., 2001, Daniel et al., 1998). Für die Thrombozytenaggregation sind die G-Protein-gekoppelte Rezeptoren P2Y<sub>1</sub> und P2Y<sub>12</sub> entscheidend (Abb. 4).

Der P2X<sub>1</sub>-Rezeptor stellt einen Liganden-aktivierten nicht-selektiven Ionen-Kanal dar (Clifford et al., 1998). Als Hauptligand für diesen Rezeptor dient Adenosintriphosphat (ATP); ADP als Liganden wird eine untergeordnete Rolle zugeschrieben (Rolf et al., 2001).

Bindung von ADP an den Gq-Protein-gekoppelten Rezeptor P2Y<sub>1</sub> führt zu einer intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung durch die Aktivierung der Phospholipase C, die wiederum die Bildung von Inositoltriphosphat (IP3) katalysiert (Jin et al., 1998). Thrombozyten von Mäusen mit einem P2Y<sub>1</sub>-Rezeptor-Defekt, waren weder zum Shape-Change noch zur Aggregation als Antwort auf ADP fähig (Fabre et al., 1999). Bindung von ADP an den Gi-Protein-gekoppelten P2Y<sub>12</sub> Rezeptor fördert die Thrombozytenaggregation durch u.a. Inhibierung der Adenylatzyklase und damit Senkung des Adenosinmonophosphat(AMP)-Spiegels. Bei Mäusen mit defektem P2Y<sub>12</sub>-Rezeptor konnte gezeigt werden, dass die ADP-induzierte Thrombozytenaggregation deutlich

abgeschwächt ist (Foster et al., 2001). Darüber hinaus konnte bei diesen Tieren keine weitere Hemmung der Aggregation nach der Gabe von Clopidogrel (selektiver P2Y<sub>12</sub>-Inhibitor) festgestellt werden.



**Abbildung 4:** Purinerge Rezeptoren der Thrombozyten (nach Gauchet, 2001).

### 1.5 Antithrombozytäre Therapie

Mit den Jahren sind viele antithrombozytäre Substanzen, wie Azetylsalizylsäure (ASS), Thienopyridine und GP IIb/IIIa-Antagonisten entwickelt worden, die durch verschiedene Mechanismen die Thrombozytenaggregation hemmen können. Der antithrombozytäre Effekt von ASS entsteht durch die irreversible Hemmung der Zyklooxygenase und die dadurch fehlende Thromboxansynthese in den Thrombozyten. Die Gabe von ASS bei KHK senkt nachweislich das Risiko eines thrombotischen Ereignisses (Steering Committee of the Physicians' Health Study Research Group, 1989). Einige Thienopyridinderivate (Tiklopidin und Clopidogrel) werden auch zu diesem Zweck angewendet. Diese Substanzen hemmen die Thrombozytenaggregation durch Blockierung des P2Y<sub>12</sub>-Rezeptors (Savi et al., 2000, Gauchet, 2001). In der klinischen Praxis hat

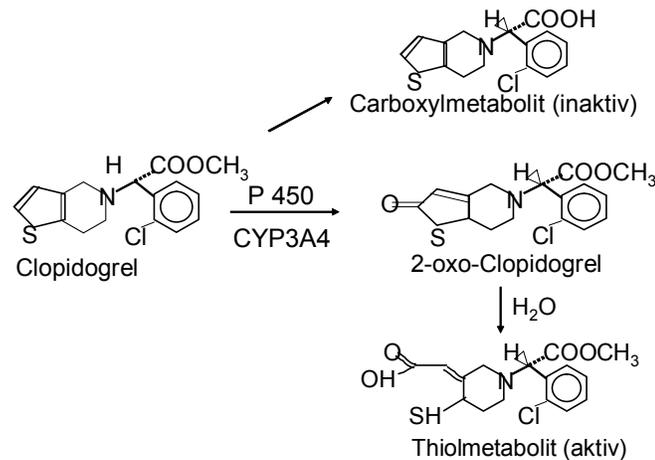
Clopidogrel Tiklopidin wegen besserer Verträglichkeit und geringerer Nebenwirkungsrate abgelöst (Classic-Studie; Bertrand et al., 2000, Elias et al., 1993). Durch die Einführung der kombinierten Therapie mit einem Thienopyridin und Aspirin konnte die Zahl der akuten thrombotischen Ereignisse nach Koronarinterventionen deutlich gesenkt werden (Gawaz et al., 1996; Schömig et al., 1996). Dabei liegt die Wahrscheinlichkeit von Stentthrombosen in den ersten 30 Tagen nach der Koronarintervention heutzutage bei 1 bis 3 % (Cutlip et al., 2001).

GP IIb/IIIa-Antagonisten blockieren die thrombozytären Fibrinogenrezeptoren, wodurch die Fibrinogenbindung und somit auch die Aggregation nicht stattfinden kann. Eine Reihe von Studien konnten eine zusätzliche Senkung der Rate thrombotischer Ereignisse nach koronarer Stentimplantation bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom nachweisen (EPISTENT, 1998, Neumann et al., 2000).

Allerdings wird das Nutzen von GP IIb/IIIa-Antagonisten heutzutage in Frage gestellt. Beispielsweise konnte in der ISAR-REACT Studie gezeigt werden, dass die zusätzliche Gabe von GP IIb/IIIa-Antagonisten bei mit 600 mg Clopidogrel vorbehandelten Patienten mit niedrigem oder intermediärem Risiko keinen zusätzlichen Vorteil bringt (Kastrati et al., 2004). So wird das Risiko eines akuten und subakuten thrombotischen Ereignisses durch die zusätzliche Gabe des GP IIb/IIIa-Antagonisten nicht weiter gesenkt, die Wahrscheinlichkeit gefährlicher Nebenwirkungen wie Blutung und Thrombozytopenie aber leicht erhöht (Kastrati et al., 2004).

Gegenwärtig wird die Therapie mit Aspirin und Clopidogrel als Standardtherapie in der Prävention der Thrombose bei Patienten mit koronarer Intervention anerkannt (Yusuf et al., 2001, Steinhubl et al. 2002, Gurbel et al. 2003). Wie bereits früher erwähnt wurde, hemmt

Clopidogrel irreversibel thrombozytäre P2Y<sub>12</sub>-Rezeptoren und verhindert dadurch die ADP-induzierte Aggregation von Thrombozyten (Herbert und Savi, 2003). Clopidogrel ist allerdings ein Prodrug. Seine Aktivierung erfolgt hauptsächlich durch das Cytochrom P450 Isoenzym 3A4 (CYP3A4) (Savi et al., 2000; Lau et al., 2003; Clarke et al., 2003). Erst der aktive Metabolit von Clopidogrel bindet an den P2Y<sub>12</sub>-ADP-Rezeptor (Abb. 5, Savi et al., 2000).



**Abbildung 5:** *Clopidogrel wird in der Leber durch das Cytochrom P450 (CYP3A4) oxidiert, wobei 2-Oxo-Clopidogrel entsteht. Weitere Hydrolyse bewirkt die Öffnung des Thiophenringes, dessen Enden eine Carboxylgruppe und eine Thiolgruppe formen. Die Thiolgruppe geht eine Bindung mit dem P2Y<sub>12</sub> ADP-Rezeptor ein (nach Savi et al., 2000).*

Die chronische Therapie mit Clopidogrel (75 mg/Tag) führt zu einer etwa 50%igen Hemmung der ADP-induzierten Aggregation wenn als ADP-Konzentration 5  $\mu\text{mol/l}$  verwendet wird (Müller et al., 2001, Kastrati et al. 2004). Dieses Niveau der Hemmung wird aber erst nach einigen Tagen erreicht. Heutzutage werden bei Patienten, die einer Koronarintervention zugeführt werden, so genannte Loading-Dosen von Clopidogrel verwendet um die gewünschte

Clopidogrelwirkung schneller zu erreichen. Mit der Gabe von 300 mg Clopidogrel wird diese Wirkung nach 6-24 Stunden erreicht (Gurbel et al., 2003, Müller et al., 2001), während eine 600 mg Loading Dosis zu der gewünschten Hemmung bereits nach 2-4 Stunden führt (Müller et al., 2001., Müller et al. 2004). Bemerkenswerter Weise führt die Gabe einer 600 mg Clopidogrel-Einzeldosis zu einer genauso starken Hemmung der Thrombozytenfunktion wie die chronische Gabe von 75 mg/Tag (Kastrati et al. 2004).

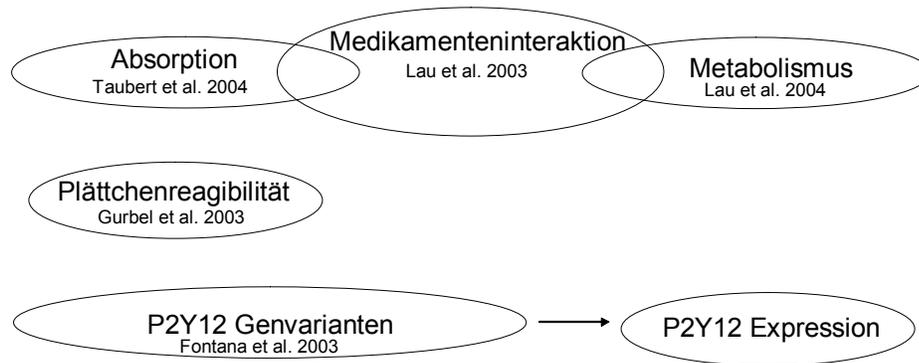
### **1.6 Variabilität des Ansprechens auf Clopidogrel**

In zahlreichen klinischen Studien konnte die Bedeutung von Clopidogrel als antithrombozytäre Substanz bei Patienten mit Koronarintervention belegt werden (Yusuf et al., 2001, Steinhubl et al. 2002, Gurbel et al. 2003). Jedoch bleibt ein Teil der Patienten, bei denen Clopidogrel nicht die erwünschte antithrombozytäre Wirkung zeigt (Gurbel et al., 2003; Müller et al, 2003). Diese Variabilität des Ansprechens auf die Clopidogrelbehandlung könnte eine wichtige klinische Bedeutung haben. So konnte in der STEMI-Studie gezeigt werden, dass die Resistenz gegenüber Clopidogrel das Risiko eines weiteren thrombotischen Ereignisses nach koronarer Stentimplantation im akuten Myokardinfarkt erhöht (Matetzky et al., 2004).

Nach oraler Einnahme wird Clopidogrel im Dünndarm resorbiert (Taubert et al., 2004). Danach folgt die Metabolisierung und Aktivierung der Substanz hauptsächlich durch das Cytochrom P 450 System (Lau et al., 2004), wobei letztlich der aktive Metabolit von Clopidogrel entsteht, der an den P2Y<sub>12</sub> Rezeptor binden kann. Dysregulation eines der mehreren Umwandlungsschritte von Clopidogrel in seinen aktiven Metaboliten und/oder des Zustandes des P2Y<sub>12</sub> Rezeptors wurden im Zusammenhang mit der individuellen Variabilität des Ansprechens auf Clopidogrel diskutiert (Abb. 6).

Der aktive Metabolit von Clopidogrel entsteht nach Umwandlung der Muttersubstanz durch das Cytochrom P 450 System (und anschließende Hydrolyse), wobei wohl dem Isoenzym CYP3A4 quantitativ die größte Bedeutung zukommt (Clarke und Waskell, 2003). Die Arbeitsgruppe um Lau und Mitarbeiter fand, dass zum einen CYP3A4 das wichtigste Isoenzym für die Aktivierung von Clopidogrel darstellt, zum anderen eine begleitende Medikation mit Atorvastatin zu einer deutlichen und dosisabhängigen Hemmung der antithrombozytären Wirkung von Clopidogrel führt (Lau et al., 2003). Atorvastatin ist ein viel verwendetes Statin, das ebenfalls als Substrat für das Cytochrom P 450 Isoenzym CYP3A4 dient, da es durch dieses abgebaut wird (Lau et al., 2003). Falls CYP3A4 für die Aktivierung von Clopidogrel tatsächlich so essentiell ist (wie in der Arbeit durch andere Modulatoren der CYP3A4-Wirkung gezeigt werden konnte, Lau et al. 2003), hätte natürlich jedes Medikament, das einen Einfluss auf die CYP3A4-Aktivität, und jede anderweitig bedingte Dysregulation von CYP3A4 einen Einfluss auf die Wirkung von Clopidogrel.

Der Aktivierungszustand der Thrombozyten erscheint als eine weitere mögliche Ursache für die Clopidogrelvariabilität. Gurbel und Mitarbeiter stellten fest, dass die Clopidogrelwirkung bei den Patienten, deren Thrombozyten bereits ein hohes Aktivierungsniveau haben, schwächer ist (Gurbel et al., 2003). Eine weitere interessante mögliche Ursache für die Variabilität der Clopidogrelwirkung stellen genetische Varianten des P2Y<sub>12</sub> Rezeptors dar. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass eine bestimmte Variante des P2Y<sub>12</sub>-Rezeptorgens, der H2-Haplotyp, mit einer verstärkten ADP-induzierten Aggregation bei gesunden Probanden assoziiert ist (Fontana et al., 2003).



**Abbildung 6:** *Mögliche Ursachen der Variabilität des Ansprechens auf Clopidogrel.*

### 1.7 Clopidogrel und CYP3A4-metabolisierte Statine

Patienten mit atherosklerotischen Erkrankungen werden wegen ihrer meist vorhandenen Hypercholesterinämie oft mit Atorvastatin oder anderen Statinen behandelt. Schon in der Zeit von 1995 bis 1999 wurden annähernd 80 % der Patienten, die mit einem koronaren Stent behandelt wurden, Statine verabreicht (Schömig et al., 2002). Mehrere Studien belegen die Sicherheit der Statintherapie (Davidson, 2001) und deren positive Auswirkung auf die Mortalität nach PTCA und Stentimplantation bei Patienten mit KHK (Chan et al., 2002; Schömig et al., 2002). Atorvastatin senkt als HMG-CoA-Hemmer den Cholesterinspiegel durch Hemmung der Cholesterinsynthese. Atorvastatin wird in der Leber abgebaut. Seine Metabolisierung erfolgt wie bei vielen anderen Statinen hauptsächlich durch CYP3A4 (Jacobsen et al., 2000). Ein weiteres Statin, das durch CYP3A4 abgebaut wird, ist Simvastatin. Die Hemmung der CYP3A4-Aktivität durch Simvastatin soll sogar noch stärker sein als die von Atorvastatin (Clarke und Waskell, 2003).

Einige  $\text{Ca}^{2+}$ -Antagonisten der Dihydropyridin-Gruppe, die hauptsächlich in der blutdrucksenkenden Therapie Verwendung finden, werden ebenfalls durch CYP3A4 oxidiert (Guengerich et al., 1991). In zahlreichen Studien wurden signifikante Medikamenteninteraktionen zwischen den  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal-Blockern und anderen durch CYP3A4-metabolisierte Substanzen nachgewiesen (Schlantz et al., 1991; Rosenthal et al., 1995; Lamberg et al., 1998). Beispielsweise wurden unerwünschte Nebenwirkungen bei gleichzeitiger Therapie mit dem  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal-Blocker Diltiazem und einigen Statinen beschrieben, die vermutlich auf einem verzögerten Abbau der entsprechenden Statine beruhten (Azie et al., 1998). Nach den Vorarbeiten der Gruppe um Lau und Mitarbeiter (Clarke und Waskell 2003, Lau et al., 2003) kann deswegen auch angenommen werden, dass die durch CYP3A4-metabolisierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal-Blocker einen Einfluss auf die antithrombozytäre Wirkung von Clopidogrel haben könnten.

Die wichtigste Studie aus der Gruppe von Lau und Mitarbeitern ist jedoch mit einer relativ kleinen Zahl von Patienten durchgeführt worden ( $n = 44$ ) und als einzige Methode zur Evaluierung der ADP-induzierten Thrombozytenaggregation wurde eine Schnelltest (point-of-care Test) verwendet. Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden auch bereits von einer anderen Arbeitsgruppe in Frage gestellt (Serebruany, 2003). Da weitere erkenntnisbringende Studien zum Thema „Interaktion zwischen CYP3A4-metabolisierten Statinen und Clopidogrel“ fehlten, hielten wir es für interessant und notwendig, den Einfluss der durch CYP3A4 metabolisierten Statine - Atorvastatin und Simvastatin - auf die antithrombozytäre Wirkung einer 600 mg Loading Dosis von Clopidogrel gründlich zu untersuchen.

## 1.8 Zielsetzung und Fragestellung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu untersuchen, ob bei Patienten mit geplanter Stentimplantation eine chronische (> 4 Wochen) Therapie mit den CYP3A4-metabolisierten Statinen Atorvastatin und Simvastatin die antithrombozytäre Wirkung einer 600 mg Loading Dosis von Clopidogrel abschwächt.

Insbesondere sollte ein Augenmerk auf die folgenden Fragestellungen gerichtet werden:

Wird die antithrombozytäre Wirkung einer 600 mg Loading Dosis Clopidogrel durch CYP3A4-metabolisierte Statine (Atorvastatin oder Simvastatin) abgeschwächt?

Ist der Effekt von CYP3A4-metabolisierten Statinen auf die antithrombozytären Wirkung der 600 mg Loading Dosis Clopidogrel von der Dosis des jeweiligen Statins abhängig?

Wird die antithrombozytäre Wirkung der 600 mg Loading Dosis Clopidogrel durch CYP3A4-metabolisierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal-Blocker beeinflusst?

Als Hauptindikator der antithrombozytärer Wirkung von Clopidogrel wurde die maximale durch 5  $\mu\text{mol/l}$  ADP induzierte Thrombozytenaggregation verwendet. Diese ADP-Konzentration führt im Aggregometer bei Patienten ohne Clopidogrel- aber mit Aspirintherapie zu einer stabilen Aggregation zwischen 80 und 90% ohne wesentliche interindividuelle Variabilität (Müller et al., 2003). Nach Gabe von Clopidogrel variiert dieser Parameter (genauso wie die durch 20  $\mu\text{mol/l}$  ADP-induzierte Aggregation, die wir ebenfalls gemessen haben) erheblich in Abhängigkeit davon, wie der einzelne Patient auf das Medikament anspricht (Müller et al., 2003).

Als Maß für die Thrombozytenaktivierung wurde die Expression der Rezeptoren für GP IIb/IIIa und P-Selektin gemessen. Diese durchflusszytometrischen Messungen wurden ohne Stimulation und nach Stimulation mit 5 und 20  $\mu\text{mol/l}$  ADP durchgeführt.

Die Studie sollte helfen eine möglicherweise sehr wichtige Medikamenteninteraktion bei der Behandlung der KHK zu identifizieren bzw. zu widerlegen.

## **2. Methoden**

### **2.1 Patientenpopulation**

In die Studie eingeschlossen wurden Patienten mit koronarer Herzerkrankung, bei denen eine koronare Stentimplantation geplant war. Von der Studie ausgeschlossen wurden alle Patienten mit akutem Myokardinfarkt (MI), MI innerhalb von 14 Tagen vor Intervention, instabiler Angina pectoris (IAP), einem vor weniger als 3 Monate erlittenem Schlaganfall, Kreislaufinstabilität, malignen Tumoren, bestehender Blutung oder Blutungsneigung, oraler Antikoagulation mit Markumar, Verabreichung von GP IIb/IIIa-Inhibitoren vor weniger als 14 Tagen oder einer Thrombozytenzahl  $<100 \times 10^9/l$  oder  $>600 \times 10^9/l$ . Nierenfunktionsstörungen mit gemessenem Serumkreatinin über 2 mg/dl, Leberfunktionsstörungen mit einhergehendem Bilirubin von über 2 mg/dl oder Medikation mit Substanzen, die CYP3A4 in jeglicher Form beeinflussen (Induktion oder Hemmung; außer Statinen und  $Ca^{2+}$ -Antagonisten) waren ebenfalls Ausschlussgrund. Allen Patienten wurde 100 mg Aspirin und 600 mg Loading Dosis Clopidogrel mindestens 2 Stunden vor der Blutentnahme und Intervention verabreicht.

Die erste Gruppe bestand aus 90 Patienten, die nicht mit Statinen behandelt wurden. Die zweite Gruppe umfasste 90 Patienten mit Atorvastatin- oder Simvastatintherapie, die mindestens 4 Wochen vor der Intervention begonnen worden war. Alle an der Studie teilnehmenden Patienten erhielten zuvor eine Aufklärung über die Medikamente und die Natur der Studie und unterschrieben ein entsprechendes Aufklärungsblatt. Das Studienprotokoll war von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der TU München genehmigt worden.

## **2.2 Definitionen**

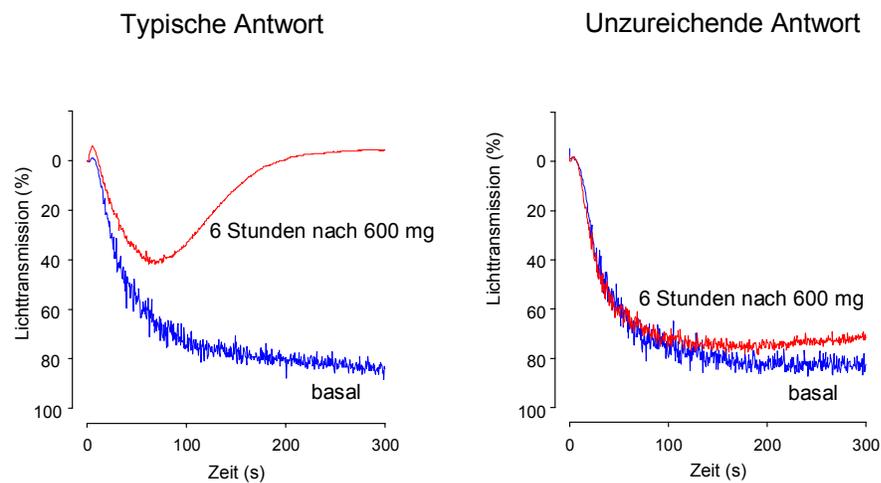
Patienten, die während der letzten 6 Monate regelmäßig rauchten, wurden als Raucher eingestuft. Befanden sich die Blutdruckwerte bei zweimaliger Messung  $> 140$  mm Hg systolisch und/oder  $>90$  mm Hg diastolisch, so lag eine Hypertonie vor (Guidelines Subcommittee, 1999). Die Diagnose Hypercholesterinämie wurde bei einem Serumcholesterinwert  $>240$  mg/dl in nüchternem Zustand gestellt. Als Diabetiker galten Patienten, die orale Antidiabetika einnahmen oder insulinpflichtig waren. Ein positiver Glucosetoleranztest und/oder ein zweimalig festgestellter erhöhter Wert für Nüchtern-Plasma-Glukose ( $\geq 126$  mg/dl) bei stressfreier Abnahme während des Klinikaufenthaltes waren nach WHO ebenfalls Gründe für die Einstufung als Diabetiker (World Health Organization Study Group, 1985). Gemäß der WHO wurde die Diagnose eines MI bei anhaltenden Brustschmerzen in Ruhe ( $> 30$  Minuten), verbunden mit einem Anstieg der Herzenzyme auf mindestens das Zweifache des oberen Normwertes und ST-Hebungen über 2 mm in zwei benachbarten EKG-Ableitungen, gestellt. Die „Zeit nach Clopidogrel Loading“ war definiert als die Zeit von der Gabe der 600 mg Dosis Clopidogrel bis zur Abnahme der Blutprobe.

## **2.3 Aggregometrie**

### **2.3.1 Grundlagen der Aggregometrie**

Die Messung der Thrombozytenaggregation nach dem turbidimetrischen Verfahren nach Born ermittelt gilt als guter Parameter für die Erfassung der Thrombozytenfunktion (Born, 1963). Dabei wird die Änderung der optischen Dichte einer Thrombozytensuspension gemessen, die vor allem von der Partikelanzahl und zu einem viel geringem Maße von der Größe der Partikel

abhängt. Nach Zugabe eines geeigneten Agonisten zum plättchenreichen Zitratplasma (PRP-platelet rich plasma) wird die Aggregation als Folge der Thrombozytenaktivierung eingeleitet. Durch die Aggregatbildung nimmt die optische Dichte der Suspension ab (Abb.7). Der Aggregationsgrad wird im Verhältnis zu einem Referenzwert, der als 100% gilt, gemessen. Als Referenzwert dient hierzu meistens thrombozytenarmes Plasma (PPP- platelet poor plasma).



**Abbildung 7:** Die Aggregationskurven zeigen die Änderung der optischen Dichte durch die Aggregation der Thrombozyten nach Zugabe von  $5\mu\text{mol/l}$  ADP. A: Die dunklen Kurven links und rechts beschreiben eine typische durch  $5\mu\text{mol/l}$  ADP induzierte Aggregation. Die helle Kurve links ist Folge der typischen Hemmung der Aggregation nach der Gabe von 600 mg Clopidogrel. Die helle Kurve rechts ist Ausdruck eines unzureichenden Ansprechens des behandelten Patienten: Keine relevante Hemmung der ADP-induzierten Thrombozytenaggregation nach der Gabe von 600 mg Clopidogrel.

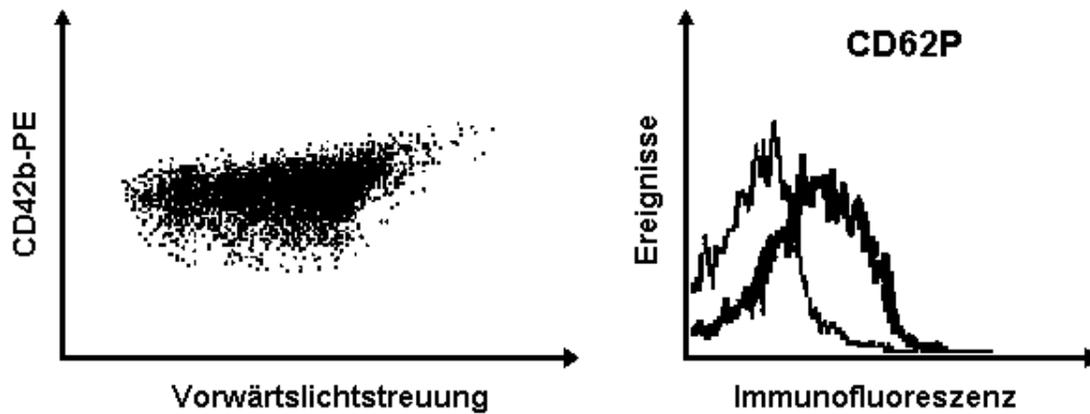
### **2.3. Durchführung der Messungen**

Das nach der Koronarangiographie und unmittelbar vor der Intervention abgenommene arterielle Zitratblut (Verwurf der ersten Milliliter) wurde 10 Minuten bei 20°C und 1000 U/min zentrifugiert, und das PRP mit einer Eppendorfpipette (Fa. Eppendorf, Hamburg, Deutschland) in Falconröhrchen (Kunststoffröhrchen; Falcon, Fa. Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland) gewonnen. Durch entsprechende Zugabe von PBS wurde die Thrombozytenzahl auf  $300 \times 10^9/l$  eingestellt und dann die Suspension in Test-Tubes zu jeweils 470  $\mu l$  gefüllt. Als Referenzwert für die Aggregationsmessung, diente 500 $\mu l$  PPP, welche durch Zentrifugation von PRP bei 13.000 U/min für 3 Minuten gewonnen wurde. Die Aggregationsmessung erfolgte am Zweikanal-Chronolog-Aggregometer (Nobis, Endingen, Deutschland). Die Aggregation wurde durch Zugabe von 5  $\mu l$  des jeweiligen Agonisten (Endkonzentration 5 $\mu mol/l$  und 20 $\mu mol/l$  ADP) eingeleitet, und der Kurvenverlauf 5 Minuten lang unter konstanter Vermischung mit einem Rührfischchen durch einen Magnetrührer (1000 U/min) bei 37 °C registriert. Die Lichttransmission der Plättchensuspension wurde nach Zugabe eines Agonisten im Verhältnis zur jeweiligen Referenzküvette gemessen. Vor jedem Gebrauch erfolgte eine Eichung des Aggregometers, wobei eine zweiminütige Vorwärmung des Plasma bei 37°C stattfand.

## **2.4 Durchflußzytometrie**

### **2.4.1 Grundlagen der Durchflußzytometrie**

Die Durchflußzytometrie mit fluorochrommarkierten monoklonalen Antikörpern (AK) ermöglicht die Charakterisierung spezifischer Veränderungen auf der Thrombozytenoberfläche. Es können die Signale von Einzellzellen, Zellaggregate, Thrombozyten oder Plasmapartikel in einem flüssigen Medium gemessen werden. Die fluorochrommarkierten monoklonalen AK binden an spezifische Antigene bzw. Rezeptoren auf der Thrombozytenoberfläche. Die Fluorochrome werden durch Laserlicht angeregt, und spezifische Photodioden registrieren das Streulicht und die Intensität der Fluoreszenz. Dadurch kann die Größe (Vorwärtsstreulicht), Granularität (Seitwärtsstreulicht), und Oberflächenexpression von Antigenen (mittlere Immunofluoreszenz) nach Bindung eines AK bestimmt werden (Abb. 8). Durch die gleichzeitige Verwendung verschiedener fluorochrom-markierter AK und die entsprechende Lichtkorrektur können gleichzeitig verschiedene funktionelle Veränderungen auf der Thrombozytenoberfläche analysiert werden.



**Abbildung 8:** Durchflusszytometrische Analyse der Blutplättchen („Zweifarbenvollblutmethode). Die Blutplättchen werden anhand der plättchenspezifischen Immunoreaktivität (CD42) und ihres charakteristischen Streulichtverhaltens identifiziert (linkes Bild). Die Thrombozytenaktivierung (rechtes Bild) wird immunologisch anhand der Bindung von aktivierungsabhängigen monoklonalen AK identifiziert (nach Gawaz, 1999).

#### 2.4.2 Fluorochrommarkierte Antikörper

Zur Messung der Thrombozytenaktivierung wurden die AK CD61-PE und CD62-FITC verwendet.

**CD61-PE** (anti- GP IIb/IIIa markiert mit Phycoerythrin; Serotec, Düsseldorf, Deutschland) richtet sich gegen die Integrin  $\beta$ 3-Untereinheit (GP IIIa) des GP IIb/IIIa-Rezeptors, die für Thrombozyten spezifisch ist. Mit Hilfe dieses AK können die Thrombozyten identifiziert werden. Die quantitative Bestimmung der GP IIb/IIIa-Rezeptoren kann eine Aussage bezüglich des Aktivierungszustandes von Thrombozyten ermöglichen.

**CD62-FITC** (Anti-P-Selektin markiert mit Fluorescein-Isothiocyanat; Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland) richtet sich gegen P-Selektin, einem Glykoprotein, welches bei Thrombozytenaktivierung aus den  $\alpha$ -Granula freigesetzt und auf die Oberfläche exprimiert wird (Schlossmann et al., 1994). P-Selektin stellt den wichtigsten Rezeptor der Thrombozyten für die Interaktion mit Leukozyten dar und ist der am häufigsten verwendete Marker für die Degranulation der Thrombozyten.

### **2.4.3 Durchführung der Messungen**

Die Antikörper wurden 20 Minuten vor Gebrauch aus dem Gefrierschrank herausgenommen und im Eiswasserbad auf ca. 0°C erwärmt. Für die durchflusszytometrische Messung wurden jeweils 10  $\mu$ l des PRP mit 490  $\mu$ l PBS verdünnt. Zu 35  $\mu$ l des nunmehr stark verdünnten PRP wurden jeweils 5  $\mu$ l beider Antikörper und jeweils 5  $\mu$ l ADP (5 oder 20  $\mu$ mol/l) oder PBS (für die Messungen ohne Stimulation) hinzugefügt, und bei Raumtemperatur 20 Minuten lang inkubiert. Nach Fixierung mit jeweils 300  $\mu$ l einer 1%igen PFA-Lösung (Paraformaldehydlösung) wurden die Proben bei Zimmertemperatur und unter Lichtabschluss bis zur durchflusszytometrischen Messung nach maximal 48 Stunden zwischengelagert.

Die Messungen der Proben erfolgte an einem Becton Dickinson FACScan Durchflusszytometer (Beckton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland). Das Durchflusszytometer wurde auf die Wellenlänge der Fluoreszenz dieser Antikörper eingestellt, und analysierte die Thrombozytenpopulationen anhand des Streulichtes, der Eigenstrahlung und der Fluoreszenz. Für jede Probe wurden mindestens 5000 Ereignisse bei einer Flussrate von 60 Ereignissen/Sekunde gemessen. Die Darstellung der Messungsergebnisse erfolgte anhand logarithmischer Verteilungskurven mit dem Mittelwert der Fluoreszenz.

## 2.5 Statistische Auswertung

Primärer Endpunkt war die maximale durch ADP (5  $\mu\text{mol/l}$ )-induzierte Aggregation unmittelbar vor der Intervention und mindestens 2 Stunden nach Verabreichung von 600 mg Clopidogrel und 100 mg Aspirin. Für die Fallzahlberechnung wurde angenommen, dass die begleitende Therapie mit Atorvastatin oder Simvastatin zu einer 25%igen Erhöhung (von  $40 \pm 20$  auf  $50 \pm 20$  [Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung]) der maximalen ADP(5  $\mu\text{mol/l}$ )-induzierte Aggregation führt. Bei einer Power von 90% und einem zweiseitigen  $\alpha$ -Wert von 0,05 wurden mindestens 86 Patienten pro Gruppe benötigt (nQuery advisor, Version 5.0). Kontinuierliche Variablen wurden als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung angegeben. Die Prüfung der Werteverteilung innerhalb der Gruppen erfolgte mit Hilfe des Kolmogorow-Tests. Entsprechend der Verteilung wurden die kontinuierlichen Variablen von zwei Gruppen mittels unpaarem t-Test oder Wilcoxon rank-sum test verglichen. Bei Vergleichen von mehr als zwei Gruppen wurde ANOVA (one-way analysis of variance) verwendet. Für den Vergleich Kategorischer Variablen diente der  $\chi^2$  Test. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Statistikprogramm S-Plus (Mathsoft Inc., Seattle WA) durchgeführt. Als signifikant wurden P Werte  $< 0,05$  akzeptiert.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Patienteneigenschaften

90 Patienten erhielten keine Statintherapie, 58 Patienten (32,2 %) wurden mindestens 4 Wochen mit Atorvastatin und 32 Patienten (18,8%) mindestens 4 Wochen mit Simvastatin behandelt. Die klinischen Eigenschaften Patienten mit und ohne Statinbehandlung unterschieden sich nicht wesentlich (Tabelle 1). Die Differenzen in Alter ( $65,5 \pm 9,1$  vs.  $64,4 \pm 9,7$ ;  $P = 0,42$ ), Frauenanteil (24,4 % vs. 20 %), Anteil von Patienten mit Diabetes (17,8 % vs. 23,3 %;  $P = 0,36$ ), Thrombozytenzahl ( $226 \pm 54$  vs.  $230 \pm 61$ ;  $P = 0,65$ ) und Zeit nach Clopidogrel Loading (4,8 [3,0-6,9] vs. 4,7 [2,6-7,3];  $P = 0,49$ ) waren zwischen den beiden Gruppen sehr gering. Der Anteil der aktiven Raucher (24,4 % vs. 13,3 %;  $P = 0,06$ ) von Patienten mit arterieller Hypertonie (71,1 % vs. 59,3 %;  $P = 0,10$ ) waren in der Gruppe ohne Statine häufiger als in der Gruppe mit Statinen, der Unterschied aber nicht groß genug um das Signifikanzniveau zu erreichen. Die Gruppe mit Statineinnahme wies mehr Patienten mit vorausgegangenem MI (21,1 % vs. 34,4 %;  $P = 0,05$ ) und aortokoronarer Bypass-OP (7,8 % vs. 14,4 %;  $P = 0,15$ ) auf, wobei auch hier das Signifikanzniveau nicht ganz erreicht wurde. Einen signifikanten Unterschied gab es wie erwartet bezüglich der Verteilung von Patienten mit Hypercholesterinämie (58,9 % vs. 88,9 %;  $P < 0,0001$ ) mit einem über 30 % höheren Anteil in der Statingruppe. In der Statingruppe wurden deutlich mehr Patienten mit  $\beta$ -Blockern therapiert als in der Gruppe ohne Statine (68,9 % vs. 82,2 %;  $P = 0,04$ ), während es keinen signifikanten Unterschied bezüglich der Therapie mit Angiotensin-Converting-Enzym(ACE)-Hemmern (47,8 % vs. 56,7 %;  $P = 0,23$ ) und  $Ca^{2+}$ -Kanal-Blockern (6,7 % vs. 10,0 %;  $P = 0,42$ ) gab.

**Tabelle 1:** *Klinische Eigenschaften der Patienten mit und ohne Statintherapie*

<i>Eigenschaften</i>	Keine Statine (n = 90)	Statine (n = 90)	P
Alter (Jahre)	65,5 ± 9,1	64,4 ± 9,7	0,42
Frauen (%)	22 (24,4)	18 (20,0)	0,35
Aktive Raucher (%)	22 (24,4)	12 (12,3)	0,06
Arterielle Hypertonie (%)	64 (71,1)	51 (59,3)	0,1
Hypercholesterinämie (%)	53 (58,9)	80 (88,9)	< 0,0001
Diabetes mellitus (%)	16 (17,8)	21 (23,3)	0,36
Vorausgegangener Myokardinfarkt (%)	19 (21,1)	31 (34,4)	0,05
Vorausgegangene ACVB-OP (%)	7 (7,8)	13 (14,4)	0,15
Thrombozytenzahl x 10 <sup>9</sup> /l	226 ± 54	230 ± 61	0,65
Zeit nach Clopidogrel Loading (Stunden)*	4,8 (3,0-6,9)	4,7 (2,6-7,3)	0,49
<i>Begleitende Medikation</i>			
ACE-Hemmer (%)	43 (47,8)	51 (56,7)	0,23
Beta-Blocker (%)	62 (68,9)	74 (82,2)	0,04
Ca <sup>2+</sup> -Kanal-Blocker (%)	6 (6,7)	9 (10,0)	0,42

*Die Variablen sind in absoluten Zahlen mit Prozentzahlen in Klammern dargestellt. Die Zeit von Clopidogrel Loading bis zur Blutentnahme ist als Median angegeben und das Alter sowie die Thrombozytenzahl als Mittelwert ± S.D. ACVB-OP dient als Abkürzung für eine aortokoronare Bypass-Operation.*

### 3.2 Statine und antithrombozytäre Wirkung von Clopidogrel

Die Gabe von 600 mg Clopidogrel führte zu einer ausgeprägten Hemmung der ADP-induzierten Thrombozytenaggregation. Tabelle 2 zeigt die maximale und residuelle ADP(5 bzw. 20 µmol/l)-induzierte Thrombozytenaggregation in den Gruppen mit und ohne Statintherapie. Die durch 600 mg Clopidogrel erreichte Hemmung der maximalen ADP(5 bzw. 20 µmol/l)-induzierten Aggregation war bei Patienten mit chronischer Statintherapie vergleichbar mit der bei Patienten ohne Statintherapie (siehe auch Abb. 9). Die residuelle durch 5 µmol/l ADP induzierte Aggregation war in der Statingruppe etwas niedriger als in der Gruppe ohne Statine ( $24,0 \pm 23,0$  gegenüber  $31,0 \pm 24,3$ ;  $P=0,05$ ).

**Tabelle 2:** *Wirkung von 600 mg Clopidogrel auf die ADP-induzierte Thrombozytenaggregation bei Patienten mit und ohne Statintherapie.*

Aggregation %	keine Statine (n = 90)	Statine (n = 90)	P
Maximale Aggregation ( 5 µmol/l ADP)	43,5 ± 20,4	40,1 ± 19,2	0,25
Residuelle Aggregation ( 5 µmol/l ADP)	31,0 ± 24,3	24,0 ± 23,0	0,05
Maximale Aggregation (20 µmol/l ADP)	52,0 ± 20,8	49,3 ± 21,8	0,40
Residuelle Aggregation (20 µmol/l ADP)	43,1 ± 27,0	37,2 ± 27,8	0,15

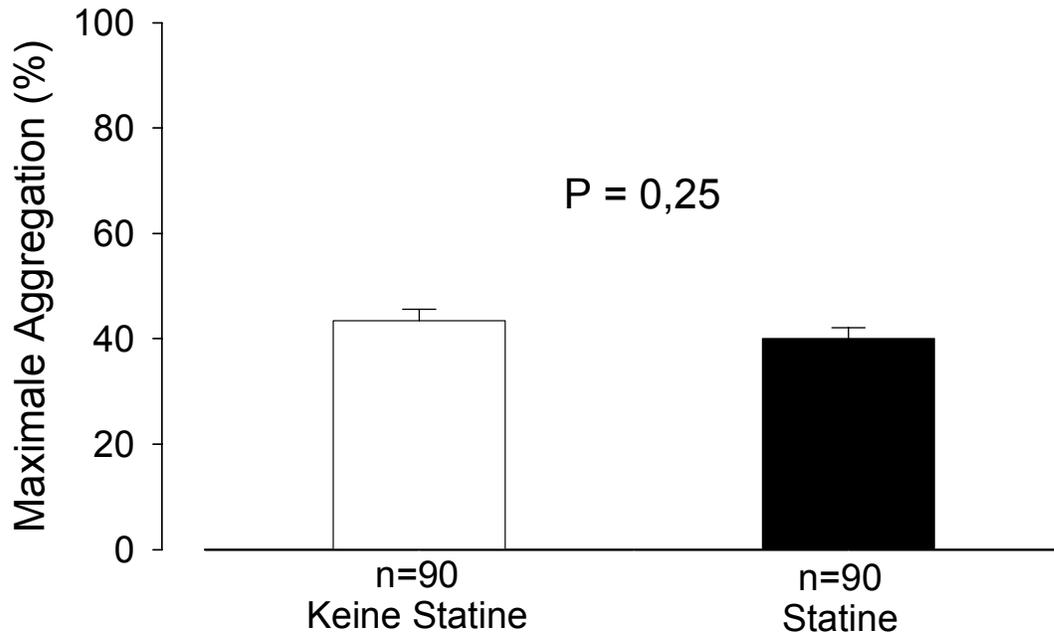
Die Angaben sind als Mittelwert der Aggregation in Prozent ± S.D. angegeben

Außerdem konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen mit und ohne Statintherapie bezüglich der Oberflächenexpressionen des Fibrinogenrezeptors (GP IIb/IIIa; CD61) und P-Selektin (CD62) gefunden werden. Dies galt sowohl in Abwesenheit einer Stimulation als auch nach Stimulation mit den beiden verschiedenen Konzentration von ADP (5 und 20  $\mu\text{mol/l}$ ). Die entsprechenden Werte sind in Tabelle 3 aufgeführt.

**Tabelle 3:** Wirkung von 600 mg Clopidogrel auf die Oberflächenexpression von Membranrezeptoren bei Patienten mit und ohne Statintherapie.

Immunofluoreszenz	keine Statine (n = 90)	Statine (n = 90)	P
CD61 basal	557,9 $\pm$ 86,1	552,9 $\pm$ 102,7	0,33
CD61 ( 5 $\mu\text{mol/l}$ ADP)	609,8 $\pm$ 82,2	605,1 $\pm$ 84,1	0,71
CD61 (20 $\mu\text{mol/l}$ ADP)	612,0 $\pm$ 82,1	607,2 $\pm$ 83,0	0,70
CD 62 basal	147,2 $\pm$ 22,2	152,7 $\pm$ 25,7	0,13
CD62 ( 5 $\mu\text{mol/l}$ ADP)	225,1 $\pm$ 45,8	227,2 $\pm$ 45,4	0,75
CD62 (20 $\mu\text{mol/l}$ ADP)	229,9 $\pm$ 49,5	232,6 $\pm$ 44,2	0,71

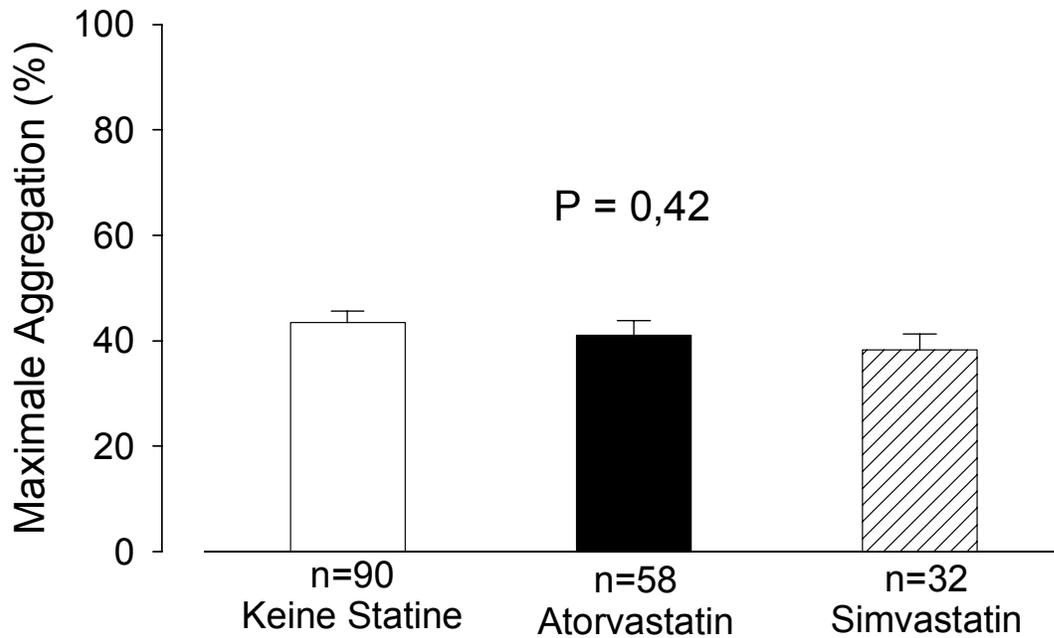
*Die Daten sind als mittlere Immunofluoreszenz  $\pm$  S.D. angegeben.*



**Abbildung 9:** *Maximale durch 5  $\mu$ mol/l ADP induzierte Aggregation in den Gruppen mit und ohne Statine. Dargestellt sind die Mittelwert  $\pm$  Standardfehler (S.E.M.).*

### 3.3. Atorvastatin oder Simvastatin und antithrombozytäre Wirkung von Clopidogrel

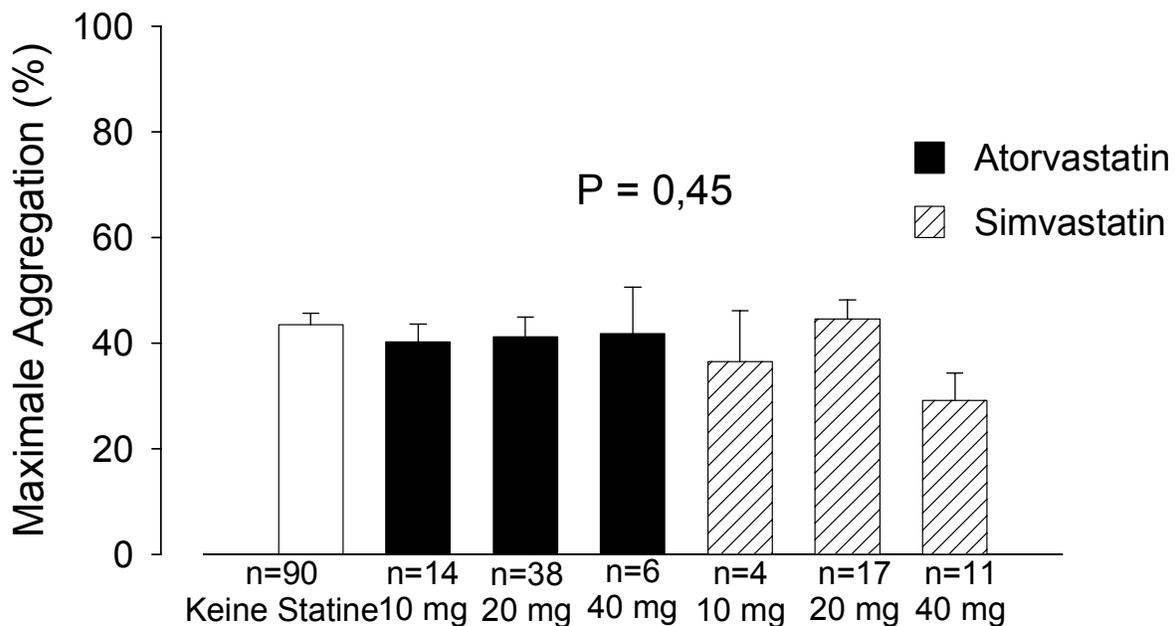
Die maximale ADP(5  $\mu\text{mol/l}$ )-induzierte Aggregation war auch nicht signifikant unterschiedlich, wenn die Patienten mit Atorvastatin-, Simvastatin- und ohne Statintherapie gegenüber gestellt wurden (Abb. 10).



**Abbildung 10:** Maximale durch 5  $\mu\text{mol/l}$  ADP induzierte Aggregation in den Patientengruppen mit Atorvastatin und Simvastatin sowie ohne Statintherapie. Dargestellt sind die Mittelwert  $\pm$  Standardfehler (S.E.M.).

### 3.4 Fehlender Einfluss der Statindosis auf die antithrombozytäre Wirkung von Clopidogrel

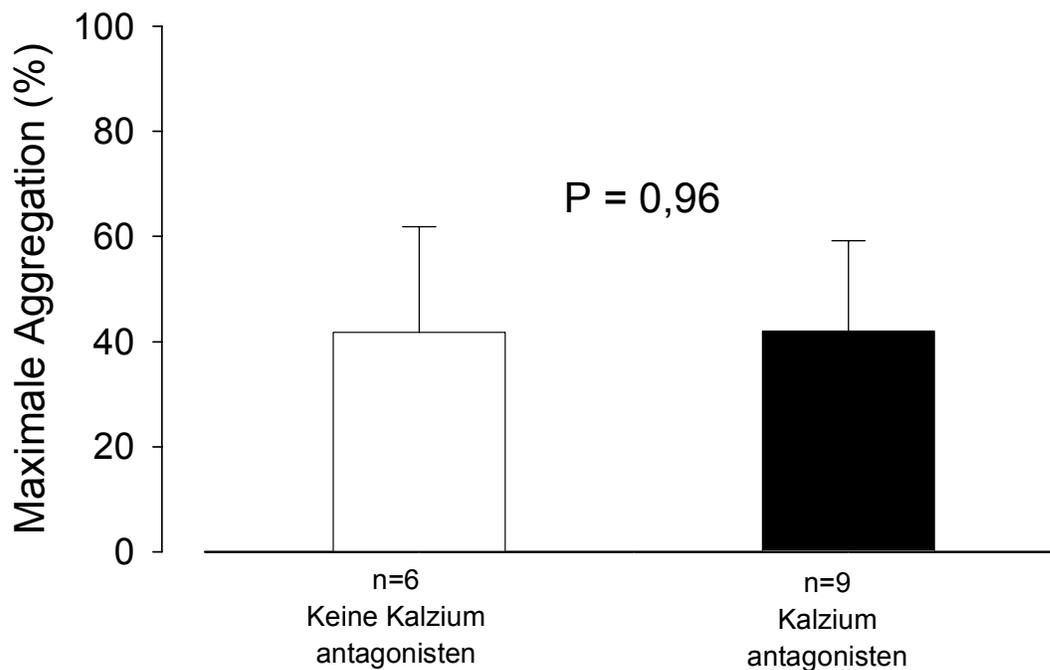
In Abb. 11 sind die Patientengruppen weiter nach Wirkstoffen und Dosis unterteilt aufgeführt. Es ist keine Abhängigkeit zwischen Dosis des Statins und der maximalen ADP(5  $\mu\text{mol/l}$ )-induzierten Aggregation ersichtlich. Da die Gruppen bei dieser Analyse kleiner waren, kam es jedoch zu einer größeren Streuung der Mittelwerte, ohne dass sich hierbei signifikante Unterschiede ergaben.



**Abbildung 11:** Maximale durch 5  $\mu\text{mol/l}$  ADP induzierte Aggregation bei Patienten mit verschiedenen Dosen von Atorvastatin und Simvastatin sowie bei Patienten ohne Statintherapie. Dargestellt sind die Mittelwert  $\pm$  Standardfehler (S.E.M.).

### 3.5 $\text{Ca}^{2+}$ -Antagonisten und antithrombozytäre Wirkung von Clopidogrel

Es konnte kein Einfluss einer gleichzeitigen Therapie mit durch CYP3A4-metabolisierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal-Blockern festgestellt werden. Wie in Abb. 12 dargestellt, war der Mittelwert der ADP (5  $\mu\text{mol/l}$ )-induzierten Aggregation bei Patienten mit und ohne  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal-Blocker Therapie nahezu identisch ( $42,9 \pm 17,2\%$  vs.  $41,8 \pm 20,1\%$ ,  $P = 0,96$ ).



**Abbildung 12:** Maximale durch 5  $\mu\text{mol/l}$  ADP induzierte Aggregation bei Patienten mit und ohne  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal-Blocker-Therapie. Dargestellt ist der Mittelwert  $\pm$  S.D.

#### 4. Diskussion

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die mögliche Medikamenteninteraktion zwischen zwei durch das Cytochrom P450 Isoenzym 3A4 (CYP3A4) metabolisierten HMG-CoA-Reduktasehemmern (Statine), nämlich Atorvastatin und Simvastatin, und des Thienopyridins Clopidogrel untersucht. Sowohl Clopidogrel als auch CYP3A4-metabolisierte Statine spielen eine überragende Rolle bei der Behandlung der KHK, insbesondere nach perkutaner Koronarintervention. Die Einnahme von Statinen führt zu einer Reduktion von Komplikationen nach koronarer Stentimplantation (Schömig et al., 2002). Nach einer kürzlich veröffentlichten Studie wurden 80% aller Patienten einer konsekutiven Serie von Patienten, die mit einer Koronarintervention behandelt wurden, mit Statinen therapiert (Schömig et al., 2002). In der vorliegenden Arbeit konnte kein Einfluss der Statintherapie auf die antithrombozytäre Wirkung einer 600 mg Loading Dosis von Clopidogrel festgestellt werden. Die maximale durch ADP 5 und 20  $\mu\text{mol/l}$  induzierte Aggregation nach Gabe der Loading Dosis Clopidogrel bei Patienten mit chronischer Statintherapie war vergleichbar mit der bei Patienten ohne Statintherapie. Ähnliche Ergebnisse wurden sowohl für Atorvastatin und Simvastatin getrennt, als auch für verschiedene Dosierungen dieser Substanzen gezeigt. Eine begleitende Therapie mit durch CYP3A4-metabolisierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal-Blocker hatte ebenfalls keinen Einfluss auf die antithrombozytäre Wirkung der 600 mg Loading Dosis Clopidogrel.

Die Stenteinlage ist das am häufigsten angewendete interventionelle Therapieverfahren bei der Behandlung der KHK. Trotz des Erfolges dieser Methode ist dieses Verfahren mit einigen Problemen, wie dem Auftreten von thrombotischen Ereignissen und Restenosen, verbunden (Ferns et al., 2000). Zur Zeit gilt die Kombination von Aspirin mit Clopidogrel als Goldstandard

zur Prophylaxe von thrombotischen Ereignissen nach erfolgreicher Koronarintervention (Steinhubl et al., 2003). Die Hypercholesterinämie gehört zu den primären Risikofaktoren der koronaren Herzerkrankung. Patienten mit atherosklerotischen Erkrankungen werden wegen ihrer meist vorhandenen Hypercholesterinämie oft mit Statinen behandelt.

Viele der verwendeten Statine werden in der Leber u.a. durch CYP3A4 metabolisiert. Das Prodrug Clopidogrel wird in der Leber zu seinem aktiven Metaboliten verstoffwechselt. Kürzlich wurde festgestellt, dass die Oxydierung von Clopidogrel zu 2-Oxo-Clopidogrel, einer Vorstufe des aktiven Metaboliten, zu einem großen Teil von dem Cytochrom P450 Isoenzym CYP3A4 katalysiert wird (Savi et al., 2000; Clarke und Waskell, 2003). Deswegen wurde postuliert, dass CYP3A4-metabolisierte Statine und Clopidogrel um dieses Cytochrom P450 Isoenzym konkurrieren, und es zu einer Medikamenteninteraktion kommen kann (Clarke und Waskell, 2003). In der Tat konnten Lau und Mitarbeitern zeigen, dass die antithrombozytäre Wirkung von Clopidogrel durch eine gleichzeitige Atorvastatintherapie abgeschwächt wird (Lau et al., 2003). Ca<sup>2+</sup>-Kanal-Blocker vom Dihydropyridintyp werden ebenfalls durch CYP3A4 metabolisiert (Guengerich et al., 1991). Demnach könnten also auch Ca<sup>2+</sup>-Kanal-Blocker die Wirkung von Clopidogrel abschwächen, wofür wir ebenfalls in der von uns durchgeführten Studie keine Hinweise fanden.

#### **4.1 Statintherapie und antithrombozytäre Clopidogrelwirkung**

Lau und Mitarbeiter untersuchten die Auswirkungen einer begleitenden Statintherapie auf die antithrombozytäre Wirkung einer 300 mg Loading Dosis von Clopidogrel (Lau et al., 2004). In den ersten Teil ihrer Studie wurden 44 Patienten (davon 16 ohne Statintherapie, 9 mit Pravastatin- und 19 mit Atorvastatintherapie) eingeschlossen. Zusätzlich zu einer Loading Dosis

von 300 mg Clopidogrel erhielten alle Patienten 325 mg Aspirin und 180 µg/kg Eptifibatide (einem Glykoprotein IIb/IIIa-Antagonist) als Bolus und anschließend als Infusion von 2,0 µg/kg/min für 12 Stunden. Die Thrombozytenaggregation wurde vor Clopidogrelgabe (und Eptifibatide) und 24 Stunden danach, sowie in einer Untergruppe der Patienten 6 – 8 Tage später bestimmt. Der 24 Stunden nach Clopidogreleinnahme gemessene Wert für die Thrombozytenaggregation war bei Patienten ohne Statintherapie und solchen mit Pravastatintherapie signifikant niedriger als vor Clopidogreleinnahme. Dagegen war der Wert für die Thrombozytenaggregation 24 Stunden nach Clopidogreleinnahme bei mit Atorvastatin behandelten Patienten im Vergleich zu dem Ausgangswert nicht signifikant unterschiedlich. In der Studie von Lau und Mitarbeitern konnte eine Dosisabhängigkeit des negativen Effektes von Atorvastatin auf die Clopidogrelwirkung festgestellt werden (Lau et al., 2003). Die höchste Dosis von Atorvastatin (40 mg pro Tag) reichte aus um die antiaggregatorische Wirkung von Clopidogrel vollständig aufzuheben. Bei Patienten mit Atorvastatintherapie war der antiaggregatorische Effekt von Clopidogrel auch nach 6 - 8 Tagen noch deutlich abgeschwächt. In dem zweiten und dem dritten Teil der oben genannten Studie konnten weitere Hinweise für die große Bedeutung von CYP3A4 bei der Metabolisierung von Clopidogrel gefunden werden.

In unserer Studie konnten wir keinen Einfluss einer chronischen Statintherapie mit Atorvastatin oder Simvastatin auf die antithrombozytäre Wirkung einer 600 mg Loading Dosis Clopidogrel finden. Im Gegensatz zur Studie von Lau und Mitarbeitern, in der Atorvastatin eine dosisabhängige Hemmung der antithrombozytären Wirkung von Clopidogrel bis zur vollständigen Aufhebung der Wirkung bei einer Tagesdosis von 40 mg zeigte, konnten wir weder für Atorvastatin noch für Simvastatin eine Dosisabhängigkeit feststellen. Der primäre Endpunkt unserer Studie war die maximale durch 5 µmol/l ADP induzierte

Thrombozytenaggregation. Die Messung der ADP-induzierten Aggregation erfolgte aber auch nach Stimulation mit 20  $\mu\text{mol/l}$  ADP. Außerdem wurde als Maß für die Thrombozytenaktivierung die Expression des GP IIb/IIIa Rezeptors und der von P-Selektin gemessen. Sowohl die Aggregometriedaten als auch die durchflusszytometrisch erhobenen Daten zeigen, dass es keinen Einfluss einer Statintherapie mit Atorvastatin und Simvastatin auf die Clopidogrelwirkung gibt.

Die Unterschiede der Studie von Lau und Mitarbeitern und unserer Studie könnten eine Erklärung für die unterschiedlich ausgefallenen Ergebnisse liefern. Lau und Mitarbeiter benutzten als Loading Dosis 300 mg Clopidogrel, wohingegen die Patienten in der von uns durchgeführten Studie mit 600 mg Clopidogrel „geloaded“ wurden. Wenn tatsächlich ein negativer Effekt von Atorvastatin bzw. Simvastatin auf die Wirkung von Clopidogrel existiert, hätte die Verwendung der hohen Loadingdosis in unserer Studie zur Unterdrückung der Medikamenteninteraktion führen können. Die verschiedene Methodik zur Erfassung der Thrombozytenfunktion könnte eine weitere Ursache für die unterschiedlichen Ergebnisse der Studien sein. Lau und Mitarbeiter haben die ADP-induzierte Aggregation in einem MICROS-Zellzähler in Vollblut gemessen (Carville et al., 1998; Lau et al., 2003). In unserer Studie wurde die ADP-induzierte Aggregation nach Born in plättchenreichem Plasma in einem optischen Aggregometer gemessen (Born, 1964). Dieses Verfahren stellt den Goldstandard für die Erfassung der Thrombozytenfunktion dar. Ein weiterer Unterschied im Studiendesign der beiden Studien stellt die Gabe des GP IIb/IIIa-Hemmers Eptifibatide in der Studie von Lau und Mitarbeitern dar (Lau et al., 2003). Lau und Mitarbeiter evaluierten die Thrombozytenfunktion 24 Stunden nach Clopidogrel- und Eptifibatidegabe unter der Annahme, dass die Wirkung von Eptifibatide zu diesem Zeitpunkt aufgehoben war. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass GP

IIB/IIIa-Antagonisten eine intrinsische thrombozytenaktivierende Wirkung haben können (Dickfeld et al., 2001), deren Folge ein verändertes Ansprechen der Thrombozyten auf Clopidogrel möglich wäre. Dies könnte eine weitere Ursache für die unterschiedlichen Ergebnisse der beiden Studien sein.

In einer Reihe von anderen Studien konnte ebenfalls keine Abschwächung der Clopidogrelwirkung durch eine gleichzeitige Therapie mit CYP3A4-metabolisierten Statinen gefunden werden. In der von Müller und Mitarbeitern durchgeführten Studie wurden 77 Patienten eingeschlossen (Müller et al., 2003). Die Patienten erhielten eine Einzelgabe von 6 verschiedenen Statinen, darunter auch Atorvastatin und Simvastatin, oder eine Plazebotablette nach dem Zufallsprinzip mindestens 24 Stunden vor Gabe einer 600 mg Loading Dosis Clopidogrel. Bei der Statindosis handelte es sich um eine mittlere Dosis (u.a. 20 mg für Atorvastatin und Simvastatin). Die Thrombozytenfunktion wurde vor Gabe der Loading Dosis, 2 und 4 Stunden danach, sowie unmittelbar vor der Koronarangiographie bestimmt. Zu diesem Zweck wurde die ADP-induzierte Thrombozytenaggregation mit optischer Aggregometrie gemessen. Die Aggregation wurde, wie in unserer Studie, mit 5 und 20  $\mu\text{mol/l}$  ADP induziert. Es zeigte sich keine Abschwächung der Clopidogrelwirkung (sowohl nach 2 als auch nach 4 Stunden) durch die untersuchten Statine, unabhängig davon ob es sich um CYP3A4-metabolisierte oder um nicht durch CYP3A4-metabolisierte Statine handelte (Müller et al., 2003).

Mitsios und Mitarbeiter führten zu der möglichen Interaktion von Statinen und Clopidogrel eine Studie durch, im Rahmen derer sowohl die Thrombozytenfunktion mittels optischer Aggregometrie (Stimulation mit 3 verschiedenen ADP-Konzentrationen) als auch eine Reihe von

Serumparametern und die Expression verschiedener Membranrezeptoren evaluiert wurden (Mitsios et al., 2003). In dieser Studie wurde die gleichzeitige chronische Gabe von Statinen und Clopidogrel über einen Zeitraum von 5 Wochen nach koronarer Stentimplantation untersucht. In die Analyse gingen 38 Patienten ein. Alle Patienten erhielten die übliche Erhaltungsdosis Clopidogrel. 13 Patienten erhielten zusätzlich Atorvastatin (10 mg/Tag), 17 Patienten Pravastatin (40 mg/Tag) und 8 Patienten keine begleitende Statintherapie. Die Therapie mit Statinen führte nicht zu einer Beeinträchtigung der Hemmung der Thrombozytenfunktion durch Clopidogrel (sowohl nach den Aggregometriedaten als auch nach den durch Durchflusszytometrie erhobenen Daten). Andererseits kam es auch nicht zu einer Hemmung der cholesterinsenkenden Wirkung der Statine durch die gleichzeitige Clopidogreltherapie. Die Aussagekraft dieser Studie ist jedoch geschwächt durch die Tatsache, dass für das einzigste CYP3A4-metabolisierte Statin (Atorvastatin) eine niedrige Dosis (10 mg/Tag) verwendet wurde. Vor dem Hintergrund der von Lau und Mitarbeitern durchgeführten Studie (Lau et al., 2003) stellt dies eine Schwäche des Studiendesigns dar.

#### **4.2 Oberflächenexpression von Membranrezeptoren und Einfluss der Statine auf die Clopidogrelwirkung**

Unter anderem untersuchten wir in unserer Studie die basale und ADP-induzierte (5 und 20  $\mu\text{mol/l}$ ) Oberflächenexpression des GP IIb/IIIa (CD61) und von P-Selektin (CD62) bei Patienten mit chronischer Statintherapie und Patienten ohne Statintherapie, und konnten keine Unterschiede zwischen den beiden Gruppen feststellen. Serebruany und Mitarbeiter untersuchten in der „Interaction“ Studie die Oberflächenexpression von 15 Membranproteinen in einer Gruppe von Patienten mit chronischer Atorvastatintherapie, einer Gruppe mit chronischer Therapie eines anderen Statins (Simvastatin, Pravastatin, Lovastatin und Fluvastatin) und einer Gruppe ohne

Statintherapie. Als einziges positives Ergebnis zeigte sich eine verminderte Expression des Protease-aktivierten Thrombin Rezeptors (PAR)-1 in den beiden Statingruppen im Vergleich zu den Patienten ohne Statintherapie (Serebruany et al., 2004). Dies lässt vermuten, dass Statine auf eine bisher nicht bekannte Weise die Thrombozyten direkt hemmen (Serebruany et al., 2004). Neubauer und Mitarbeiter untersuchten in ihrer Studie die ADP-induzierte (1, 10 und 100  $\mu\text{mol/l}$ ) Oberflächenexpression von P-Selektin bei 47 Patienten mit und ohne Statintherapie (Atorvastatin und Simvastatin) vor sowie 5 und 48 Stunden nach der Gabe einer 300 mg Loading Dosis Clopidogrel und nachfolgend 75 mg pro Tag (Neubauer et al., 2003). Es konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit Statinen den antithrombozytären Effekt von Clopidogrel beeinträchtigt. Der Unterschied zwischen den Gruppen war jedoch nur dann signifikant (relative Reduktion der P-Selektinexpression von 29%), wenn die durch 10 $\mu\text{mol/l}$  ADP induzierte P-Selektinexpression 5 Stunden nach der Gabe von 300 mg Clopidogrel verglichen wurde. Der Unterschied war weniger stark ausgeprägt (relative Reduktion der P-Selektinexpression von 16%), aber noch signifikant bei Stimulation mit der selben ADP-Konzentration (10  $\mu\text{mol/l}$ ) 48 Stunden nach Loading. Die Autoren meinen, dass möglicherweise während der Loadingphase (zum Zeitpunkt der Blutabnahme 5 Stunden nach Clopidogrelgabe) die Clopidogrelwirkung noch nicht voll zur Geltung kommt, und unter diesen Bedingungen sich die Interaktion zwischen Statinen und Clopidogrel stärker demaskiert. Außerdem wurden signifikante Unterschiede bezüglich der ADP-induzierten Expression von P-Selektin zwischen den beiden Gruppen nur für Stimulation mit 10 $\mu\text{mol/l}$ , grenzwertig für 100 $\mu\text{mol/l}$  aber nicht für 1 $\mu\text{mol/l}$  ADP beobachtet. Es wurde von den Autoren diskutiert, dass 100 $\mu\text{mol/l}$  zu hoch ist, um spezifisch zu sein, und 1 $\mu\text{mol/l}$  ADP zu niedrig ist, um eine relevante Expression von P-Selektin zu induzieren. Interessant war auch die Tatsache, dass sowohl in der Kontroll- als auch in der Statingruppe Patienten waren, bei denen Clopidogrel überhaupt keinen Effekt zeigte (1 bzw. 2 Patienten). Die

Heterogenität der Gruppen („resistente“ Patienten), eine relativ kleine Größe der Studienpopulation und Verwendung der 300 mg Loading Dosis machen es schwierig diese Ergebnisse mit den von uns erhobenen durchflusszytometrischen Daten zu vergleichen.

#### **4.3 Klinische Studien über die mögliche Interaktion zwischen Statinen und Clopidogrel.**

In einer posthoc Analyse der CREDO-Studie (Clopidogrel for the Reduction of Events During Observation) wurde die Inzidenz kardiovaskulärer Ereignisse der Patienten in Abhängigkeit von der Dauer der Clopidogreltherapie bei gleichzeitiger Statintherapie analysiert (Steinhubl et al., 2002; Saw et al., 2004). In dem Clopidogrelarm der Studie erhielten die Patienten vor der Koronarintervention eine Loading Dosis von 300 mg Clopidogrel mit darauffolgender 12-monatiger Erhaltungsdosis von 75 mg/Tag. In diesem Studienarm betrug die Inzidenz kardiovaskulärer Ereignisse nach einem Jahr 7,6% in der Gruppe der Patienten, die gleichzeitig CYP3A4-metabolisierte Statine einnahmen und 5,4% (P = 0,51) in der Gruppe, in der die Patienten mit nicht-CYP3A4-metabolisierten Statine behandelt wurden (Saw et al., 2003).

Es gibt eine weitere retrospektive Analyse, in der kein Hinweis für eine signifikante klinische Interaktion zwischen Atorvastatin und Clopidogrel gefunden wurde. Es handelt sich um Daten aus MITRA PLUS (Maximal Individual Therapy of Acute Myocardial Infarction) einem deutschen Register zur Behandlung akuter Myokardinfarkte und Koronarsyndrome. Bei den Registerpatienten führte die Einnahme von Clopidogrel zu einer signifikanten Reduktion der Langzeitmortalität. In einem zweiten Schritt wurde unter anderem der Einfluss einer begleitenden Atorvastatintherapie auf die Langzeitmortalität untersucht. In dieser Analyse zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen Patienten mit Atorvastatintherapie und solchen, die

mit einem anderen Statin (Simvastatin, Pravastatin, Cerivastatin, Lovastatin und Fluvastatin) behandelt wurden (3,2% vs. 2,7 %, P = 0,49) (Wienbergen et al., 2003). Ein Schwachpunkt dieser Studie ist natürlich, dass hier nicht systematisch Patienten mit und ohne CYP3A4-metabolisierte Statine verglichen wurde.

#### **4.4 Ca<sup>2+</sup>-Antagonisten und antithrombozytäre Clopidogrelwirkung**

Da die Ca<sup>2+</sup>-Kanal-Blocker vom Dihydropyridintyp durch CYP3A4 metabolisiert werden und das P450 System inhibieren können, wäre eine Interaktion mit Clopidogrel denkbar. Vor allem wurden bereits mehrfach Interaktionen dieser Substanzklasse mit anderen Medikamenten beschrieben (Guengerich et al., 1991). In unserer Studie wurde deswegen auch der Einfluss einer begleitenden Therapie mit Ca<sup>2+</sup>-Kanal-Blockern auf die antithrombozytäre Wirkung von Clopidogrel analysiert. Es zeigte sich, dass die begleitende Gabe von Ca<sup>2+</sup>-Kanal-Blockern keinen Einfluss auf die Clopidogrelwirkung hat. Die ADP(5µmol/l)-induzierte Aggregation nach Einnahme der 600 mg Loading Dosis war bei den Patienten mit und ohne Ca<sup>2+</sup>-Kanal-Blockern ähnlich. Aufgrund der geringen Anzahl von Patienten mit Ca<sup>2+</sup>-Kanal-Blocker Therapie in der gesamten Studienpopulation wäre es noch verfrüht dem Ergebnis eine Aussagekraft beizumessen. Weitere Studien mit größerer Patientenzahl sind nötig, um eine Interaktion zwischen Clopidogrel und Ca<sup>2+</sup>-Kanal-Blockern vom Dihydropyridintyp wirklich ausschließen zu können.

## **4.5 Weitere mögliche Ursachen für die Variabilität des Ansprechens auf die Clopidogreltherapie**

### **4.5.1 Absorption von Clopidogrel**

Vor kurzem war Taubert und Mitarbeitern gelungen, den aktiven Metabolit von Clopidogrel im Plasma zu bestimmen. Daraus konnten sie bei einem Kollektiv von 10 gesunden Probanden eine positive Korrelation zwischen der Clopidogrelabsorption und der Aggregationshemmung nachweisen (Taubert et al., 2004). Dies bedeutet, dass individuelle Unterschiede der Clopidogrelabsorption eine wichtige Rolle für das unterschiedliche Ausfallen der Clopidogrelantwort (Hemmung der Thrombozytenaggregation) spielen könnten.

### **4.5.2 Polymorphismen des P2Y<sub>12</sub> Rezeptors**

Eine wiederum andere Erklärung für die Clopidogrelvariabilität lieferten Fontana und Mitarbeiter, die bestimmte Genvarianten im P2Y<sub>12</sub>-Rezeptor fanden, welche mit unterschiedlicher ADP-Antwort vergesellschaftet sind (Fontana et al., 2003). Dabei wurde einerseits die DNA von Leukozyten aus dem peripheren Blut gesunder Individuen isoliert und auf Polymorphismen im P2Y<sub>12</sub>-Gen untersucht, und andererseits die Thrombozytenaggregation nach Agonistengabe (ADP) gemessen. Dabei wurde festgestellt, dass bestimmte Polymorphismen im P2Y<sub>12</sub>-Gen (Haplotyp H2) mit einer erhöhten ADP-induzierten Thrombozytenaggregation assoziiert sind. Demzufolge könnte bei Patienten, die den Haplotyp H2 besitzen, die Aggregationshemmung nach Clopidogrelgabe niedriger ausfallen als bei Patienten mit einem anderen Haplotyp (H1). Unsere Arbeitsgruppe konnte jedoch zeigen, dass die Haplotypen des P2Y<sub>12</sub> Rezeptors keinen Einfluss auf die Hemmung der ADP-induzierten

Thrombozytenaggregation nach Gabe einer 600 mg Loading Dosis Clopidogrel haben (von Beckerath et al., 2005).

#### **4.5 Studienlimitation**

Eine wesentliche Limitation unserer Studie war die fehlende Zuteilung der Patienten auf die beiden Studienarme nach dem Zufallsprinzip (fehlende Randomisierung). Die Thrombozytenaggregation bzw. Expression der Oberflächenrezeptoren wurde nur in einem Zeitpunkt - nach der Gabe von Clopidogrel und vor der Intervention - erfasst. Möglicherweise ist die Messung zu diesem Zeitpunkt hilfreich um die „Resistenz“ gegenüber Clopidogrel zu bestimmen. Es wäre auch denkbar, dass die zusätzliche Messung der Thrombozytenfunktion vor der Clopidogrelgabe und Vergleich der Ausgangswerte mit denen nach Loading eine zusätzliche Aussage bezüglich Clopidogrelwirkung hätte geben können. Eine andere Beschränkung unserer Studie bestand in der geringen Zahl der mit  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal-Antagonisten behandelten Patienten. Bei insgesamt 15 Patienten (9 Patienten in Statingruppe und 6 Patienten in der Gruppe ohne Statintherapie) sind Zufallsergebnisse nicht auszuschließen.

## 5. Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war zu untersuchen, ob die antithrombozytäre Wirkung von 600 mg Loading Dosis Clopidogrel durch begleitende Therapie mit Atorvastatin, Simvastatin oder  $\text{Ca}^{2+}$ -Antagonisten abgeschwächt wird. Blutproben wurden von den Patienten mindestens 2 Stunden nach der Gabe von 100 mg Aspirin und 600 mg Clopidogrel und vor der Koronarintervention abgenommen. Verglichen wurden die Patienten ohne Statintherapie (N = 90) mit den Patienten, die für mindestens 4 Wochen vor der Intervention mit Atorvastatin oder Simvastatin behandelt wurden (N = 90). Die antithrombozytäre Wirkung von Clopidogrel wurde durch die Messung der maximalen durch 5  $\mu\text{mol/l}$  und 20  $\mu\text{mol/l}$  ADP induzierten Thrombozytenaggregation bestimmt. Die Expression der Oberflächenrezeptoren IIb/IIIa (CD61) und P-Selektin (CD62) wurde durchflusszytometrisch unstimuliert und unter Stimulation mit 5  $\mu\text{mol/l}$  und 20  $\mu\text{mol/l}$  ADP gemessen. Die begleitende Behandlung mit Atorvastatin oder Simvastatin beeinflusste nicht die Hemmung der ADP-induzierten Aggregation durch 600 mg Loading Dosis Clopidogrel. Ebenfalls zeigten die Patienten mit und ohne Statintherapie keinen signifikanten Unterschied in der Expression der Oberflächenrezeptoren CD61 und CD62. Daraus lässt sich schließen, dass auch der „Aktivierungszustand“ der Thrombozyten in beiden Gruppen nicht unterschiedlich war. Ähnliche Ergebnisse wurden im Vergleich bei Patienten mit und ohne  $\text{Ca}^{2+}$ -Antagonisten-Therapie erbracht. Die Hemmung der ADP-induzierten Aggregation durch 600 mg Loading Dosis Clopidogrel wurde durch begleitende Behandlung mit  $\text{Ca}^{2+}$ -Antagonisten nicht beeinflusst.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit kein Einfluss einer chronischen Statintherapie (mindestens 4 Wochen) mit Atorvastatin oder Simvastatin auf die antithrombozytäre Wirkung von 600 mg Loading Dosis Clopidogrel gezeigt werden.

## 6. Literaturverzeichnis

### Zeitschriftenartikel

1. Anderson, H.  
Reocclusion and restenosis after PTCA are two distinct problems.  
Vessel. 2 (1996) 4-14.
2. Azie, N.E., Brater, D.C., Becker, P.A., Jones, D.R., Hall, S.D.  
The Interaction of diltiazem with lovastatin and pravastatin.  
Clin Pharmacol Ther. 64 (1998) 369-377.
3. Beckerath, von N., Taubert, D., Pogatsa-Murray, G., Wieczorek, A., Schömig, E.,  
Schömig, A., Kastrati, A.  
Case Report: a patient with stent thrombosis, clopidogrel-resistance and failure to  
metabolise clopidogrel to its active metabolite.  
Thromb Haemost 93 (2005) 789-791.
4. Bertrand, M.E., Rupprecht, H.J., Urban, P., Gershlick, A.H., Investigators, F.T.  
Double-blind study of the safety of clopidogrel with and without a loading dose in  
combination with aspirin compared with ticlopidine in combination with aspirin after  
coronary stenting: the Clopidogrel Aspirin Stent International Cooperative Study  
(CLASSICS).  
Circulation. 102 (2000) 624-629.
5. Bhatt, D.L., Topol, E.J.  
Scientific and therapeutic advances in antiplatelet therapy.  
Nature Publishing Group. 2 (2002)154-228.

6. Born, G.V.R., Cross, M.J.  
The aggregation of blood platelets.  
J Physiol. 168 (1963) 178-196.
7. Chan, A.W., Bhatt, D.L., Chew, D.P., Quinn, M.J., Moliterno, D.J., Topol, E.J., Ellis, S.G.  
Early and sustained survival benefit associated with statin therapy at the time of percutaneous coronary intervention.  
Circulation. 105 (2002) 691-696.
8. Carville, D.G., Schleckser, P.A., Guyer, K.E., Corsello, M., Walsh, M.M.  
Whole blood platelet function assay on the ICHOR point-of-care haematology analyser.  
J Extra Corpor Technol. 30 (1998)171-177.
9. Clarke, T.A., Waskell, L.A.  
The metabolism of clopidogrel is catalyzed by human cytochrome p 450 3A and is inhibited by atorvastatin.  
Drug Metab. Dispos. 31 (2003) 53-59.
10. Clifford, E.E., Parker, K., Humphries, B.D., Keresy, S.B., Dubyak, G.R.  
The P2X1 receptor, an adenosine triphosphate-gated cation channel, is expressed in human platelets but not in human blood leukocytes.  
Blood. 91 (1998) 3172-3181.
11. Cox, D., Aoki, T., Seki, J., Motoyama, Y., Yoshida, K.  
The pharmacology of the integrins.  
Med Res. Rev. 14 (1994) 195-228.

12. The CURE Trial Investigators.  
Effects of clopidogrel in addition to aspirin in patients with acute coronary syndromes without ST-Elevation.  
New Engl J Med. 345 (2001) 494-502.
13. Cutlip, D.E., Baim, D.S., Ho, K.K., Popma, J.J., Lansky, A.J., Cohen, D.J., Carozza Jr, J.P., Cauhan, M.S., Rodriguez, O., Kunz, R.E.  
Stent thrombosis in the modern era: a pooled analysis of multicenter coronary stent clinical trials.  
Circulation. 103 (2001) 1967-1971.
14. Daniel, J.L., Dangelmaier, C., Jin, J., Ashby, B., Smith, J.B., Kunapuli, S.P.  
Molecular basis for ADP-induced platelet activation I: evidence for three distinct ADP receptors on platelets.  
J Biol Chem. 273 (1998) 2024-2029.
15. Davidson, M.H.  
Safety profiles for the HMG-CoA-reductase inhibitors: treatment and trust.  
Drugs. 61 (2001) 197-206.
16. Dickfeld, T., Ruf, A., Pogatsa-Murray, G., Müller, I., Engelmann, B., Taubitz, W., Fischer, J., Meier, O., Gawaz, M.  
Differential antiplatelet effects of various glycoprotein IIb-IIIa antagonists.  
Thromb Res. 101 (2001) 53-64.
17. Elias, M., Reichman, N., Flatau, E.  
Bone marrow aplasia associated with ticlopidine therapy.  
Am J Hematol. 44 (1993) 289-290.

18. The EPISTENT Trial Investigators.  
Randomised placebo-controlled and balloon-angioplasty-controlled trial to assess safety of coronary stenting with use of platelet glycoprotein-IIb/IIIa blockade.  
*Lancet*. 352 (1998) 87-92.
19. Fabre, J.E., Nguyen, M. Latour, A.K., Keifer, J.A., Audoly, L.P., Coffman, T.M., Koller, B.H.  
Decreased platelet aggregation, increased bleeding time and resistance to thromboembolism in P2Y1-deficient mice.  
*Nat Med*. 5 (1999) 1199-1202.
20. Ferns, G.A., Avades, T.Y.  
The mechanisms of coronary restenosis: insights from experimental models.  
*Int J Exp Pathol*. 81 (2000) 63-88.
21. Fichtlscherer, S., Zeiher, A.M.  
Endotheliale Funktionsstörung bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom.  
*Herz*. 24 (1999) 534-543.
22. Fischman, D.L., Leon, M.B., Baim, D.S., Schatz, R.A., Savage, M.P., Penn, I., Detre, K., Veltri, L., Ricci, D., Nobuyoshi, M., Cleman, M., Heuser, R., Almond, D., Teirstein, P.S., Fish, R.D., Colombo, A., Brinker, J., Moses, J., Shakhovich, A., Hirshfeld, J., Bailey, S., Ellis, S., Rake, R., Goldberg, S., for the Stent Restenosis Study Investigators.  
A randomised comparison of coronary-stent placement and balloon angioplasty in the treatment of coronary artery disease. Stent Restenosis Study Investigators.  
*N Engl J Med*. 331 (1994) 496-501.
23. Fitzgerald, D.J., Roy, L., Catella, F., Fitzgerald, G.A.:  
Platelet activation in unstable coronary disease.  
*N Engl J Med*. 315 (1996) 983.

24. Fontana, P., MD, Dupont, A., MSc; Gandrille, S., PhD, Bachelot-Loza, C., PhD, Reny, J., MD, PhD, Aiach, M., PhD, Gaussem, P., PhD.  
Adenosine diphosphate- induced platelet aggregation is associated with P2Y<sub>12</sub> gene sequence variations in healthy subjects.  
*Circulation*. 108 (2003) 989-995.
25. Foster, C.J., Prosser, D.M., Agnas, J.M., Zhai, Y., Smith, M.D., Lachowicz, J.E., Zhang, F.L., Gustafson, E., Monsma, F.J. Jr, Wiekowski, M.T. et al.  
Molecular identification and characterization of the platelet ADP receptor targeted by thienopyridine antithrombotic drugs.  
*J Clin Invest*. 107 (2001) 1591-1588.
26. Gaarder, A., Jonsen, A., Laland, S., Hellem, A., Owren, P.  
Adenosine diphosphate in red cells as a factor of human platelets.  
*Nature*. (1961) 531-532.
27. Gauchet, C.  
ADP receptors of platelets and their inhibition.  
*Thrombosis and Haemostasis*. 86 (2001) 222-232.
28. Gawaz, M., Ott, I., Neumann, F.J.  
Surface expression of platelet membrane glycoproteins following coronary stenting: effect on subacute stent thrombosis?  
*Circulation*. 90 (1994) I-I-552.
29. Gawaz, M., Neumann, F.J., Ott, I., May, A., Schömig, A.  
Platelet activation and coronary stent implantation. Effect on thrombotic therapy.  
*Circulation*. 94 (1996) 279-285.

30. Gawaz, M., Neumann, F.J., Schömig, A.  
Evaluation of platelet membrane glycoproteins in coronary artery disease: consequences for diagnosis and therapy.  
Circulation. 99 (1999) E1-E11.
31. Grewe, P.H., Machraoui, A., Deneke, T., Barmeyer, J., Muller, K.M.  
Structural analysis of 16 different coronary stent systems.  
Z Kardiol. 86 (1997) 990-9.
32. Grewe, P.H., Deneke, T., Muller, K.M.  
Stent-induced changes of coronary morphology-pathologic-anatomic and experimental findings after balloon expansion.  
Z Kardiol. 90 (2001) 630-6.
33. Gruentzig, A. R.  
Percutaneous transluminal coronary angioplasty.  
Semin Roentgenol. 16 (1981) 152-153.
34. Guengerich, F.P., Brian, W.R, Iwasaki, M., Sari, M.A., Baarnhielm, C., Berntsson, P.  
Oxidation of dihydropyridine calcium channel blockers and analogues by human liver cytochrome P-450 IIIA4.  
J. Med. Chem. 34 (1991) 1838-1844.
35. Guidelines Subcommittee.  
1999 World Health Organization-International Society of Hypertension Guidelines for the Management of Hypertension.  
J Hypertens. 17 (1999) 151-183.

36. Gurbel, P.A., MD, Bliden, K. P., Hiatt, B.L., MD, O'Connor, C.M., MD: Clopidogrel for Coronary Stenting. Response variability, drug resistance, and the effect of pre-treatment platelet reactivity.  
Circulation. 107 (2003) 2908-2913.
37. Hamburger, S.A., McEver, R.P.  
GMP-140 mediates adhesion of stimulated platelets to neutrophils.  
Blood. 75 (1990) 550.
38. Herbert, J.M., Savi, P.  
P2Y<sub>12</sub>, a new platelet ADP receptor, target of clopidogrel.  
Semin Vasc Med. 3 (2003) 113-122.
39. Herrmann, R.A., Rybnikar, A., Resch, A., Märkl, B., Alt, E., Schömig, A.  
Thrombogenicity of stainless steel coronary stents with a completely gold coated surface.  
J Am Coll Cardiol. 31 (1998) 413.
40. Hollopeter, G., Jantzen, H.M., Vincent, D., Li, G., England, L., Ramakrishnan, V. Yang, R.B., Nurden, P., Nurden, A., Julius, D., Conley, P.B.  
Nature. 409 (2001) 202-207.
41. Holmsen, H., Weiss, H.J.  
Hereditary defect in the release reaction caused by a deficiency in the storage pool of platelet adenine nucleotides.  
Br J Haematol. 19 (1970) 643–649.
42. Islam M.A., Blankenship J.C, Balog C., Iliadis E.A., Lincoff A.M., Tchong J.E., Califf R.M., Topol E.J.; EPISTENT Investigators.  
Effect of abciximab on angiographic complications during percutaneous coronary stenting in the Evaluation of platelet IIb/IIIa Inhibition in Stenting Trial (EPISTENT).

- Am J Cardiol. 90 (2002) 916-921.
43. Jacobsen, W., Kuhn, B., Soldner, A., Kirchner, G., Sewing, K.-F., Kollman, P.A., Benet, L.Z., Christians, U.  
Lactonization is the critical first step in the disposition of the 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA reductase inhibitor atorvastatin.  
Drug Metabolism and Disposition. 28 (2000) 1369-1378.
44. Jin, J., Daniel, J.L., Kunapuli, S.P.  
Molecular basis for ADP-induced platelet activation II: the P2Y1 receptor mediates ADP-induced intracellular calcium mobilization and shape change in platelets.  
J Biol Chem. 273 (1998) 2030-2034.
45. Kandzari, DE., Hasselblad, V., Tcheng, J.E., Stone, G.W., Califf, R.M., Kastrati, A., Neumann, F.J., Brener, S.J., Montalescot, G., Kong, D.F., Harrington, R.A.:  
Improved clinical outcomes with abciximab therapy in acute myocardial infarction: a systematic overview of randomised clinical trials.  
Am Heart J. 147 (2004) 457-462.
46. Kastrati, A., Mehilli, J., Schuhlen, H., Dirschinger, J., Dotzer, F., Berg, J.M., Neumann, F.J., Bollwein, H., Volner, C., Gawaz, M., Berger, P.B., Schömig, A.  
Intracoronary Stenting and Antithrombotic Regimen-Rapid Early Action for Coronary Treatment Study (ISAR-REACT).  
A clinical trial of abciximab in elective percutaneous coronary intervention after pretreatment with clopidogrel.  
N Engl J Med. 15 (2004) 277-280.
47. Kastrati, A., MD; von Beckerath, N., MD; Joost, A., Pogatsa-Murray, G., MD; Gorchakova, O., MD; Schömig, A., MD.  
Loading with 600 mg clopidogrel in patients with coronary artery disease with and without chronic clopidogrel therapy.  
Circulation. 110 (2004) 1916-1919.

48. Kehrel B.  
Platelet-collagen interactions.  
*Semin Thromb Hemost.* 21 (1995) 123-129.
  
49. Laarsen, E., Celi, A., Gilbert, G.E., Furie, B.C., Erban, J.K., Bonfanti, R., Wagner, D.D.,  
Furie, B.  
PADGEM protein: A receptor that mediates the interaction of activated platelets with  
neutrophils and monocytes.  
*Cell.* 59 (1989) 305.
  
50. Lamberg, T.S., Kivisto, K.T., Neuvonen, P.J.  
Effects of verapamil and diltiazem on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of  
buspirone.  
*Clin Pharmacol Ther.* 63 (1998) 640-645.
  
51. Lau, W.C., MD; Waskell, L.A., MD, PhD; Watkins, P.B., MD; Neer, C.J., BSN, MPA;  
Horowitz, K., BS; Hopp, A.S., BS; Tait, A.R., PhD; Carville, D.G.M., PhD; Guyer, K.E.,  
BS; Bates, E.R.  
Atorvastatin reduces the ability of clopidogrel to inhibit platelet aggregation.  
A new drug-drug interaction.  
*Circulation.* 107 (2003) 32-37.
  
52. Lyon, R.T., Zarins, C.K., Lu, C.T., Yang, C.F., Glasgow, S.  
Vessels plaque and lumen morphology after transluminal ballon angioplasty.  
*Arteriosclerosis.* 49 (1987) 1284-1293.

53. Matetzky, S., MD; Shenkman, B., MD, PhD; Guetta, V., MD; Shechter, M., MD; Bienart, R., MD; Goldenberg, I., MD; Novikov, I., PhD; Pres, H., MSc; Savion, N., PhD; Varon, D., MD; Hod, H., MD.  
Clopidogrel resistance is associated with increased risk of recurrent atherothrombotic events in patients with acute myocardial infarction.  
*Circulation*. 109 (2004) 3171-3175.
54. Mitsios, J.V., MS, Papathanasiou, A.I., MD, Rodis, F.I., BSc, Elisaf, M., MD, Goudevenos, J.A., MD, Tselepis, A.D., MD, PhD.  
Atorvastatin does not affect the antiplatelet potency of clopidogrel when it is administered concomitantly for 5 weeks in patients with acute coronary syndromes.  
*Circulation*. 109 (2004) 1335-1338.
55. Moliterno, D.J., Elliot, J.M., Topol, E.J.  
Randomized Trials of Myocardial Revascularization.  
*Current Problems in Cardiology*. 20 (1995) 121-192.
56. Müller, I., MD, Besta, F., PhD, Schulz, C., MD, Li, Z., MD, Massberg, S., MD, Gawaz, M., MD.  
Effects of statins on platelet inhibition by a high loading dose of clopidogrel.  
*Circulation*. 108 (2003) 2195-2197.
57. Müller I, Besta F, Schulz C, Massberg S, Schömig A, Gawaz M.  
Prevalence of clopidogrel non-responders among patients with stable angina pectoris scheduled for elective coronary stent placement.  
*Thromb Haemost*. 89 (2003) 783-787.

58. Müller, I, Seyfarth, M., Rüdiger, S., Wolf, B., Pogatsa-Murray, G., Schömig, A., Gawaz, M.  
Effect of a high loading dose of clopidogrel on platelet function in patients undergoing coronary stent placement.  
Heart. 85 (2001) 92-93.
59. Neubauer, H., Guenesdogan, B., Hanefeld, C., Spiecker, M., Muegge, A.  
Lipophilic statins interfere with the inhibitory effects of clopidogrel on platelet function- a flow cytometry study.  
European Heart Journal. 24 (2003) 1744-1749.
60. Neumann, F.-J., MD, Kastrati, A., MD, Schmitt, C., MD, Blasini, R., MD, Hadamitzky, M., MD, Mehilli, J., MD, Gawaz, G., MD, Schleef, M., Seyfarth, M., MD, Dirschinger, J., MD, Schömig, A., MD.  
Effect of glycoprotein IIb/IIIa receptor blockade with abciximab on clinical and angiographic restenosis rate after the placement of coronary stents following acute myocardial infarction.  
Journal of the American College of Cardiology. 4 (2000) 915-921.
61. Palabrica, T., Lobb, R., Furie, B.  
Leukocyte accumulation promoting fibrin deposition is mediated in vivo by P-selectin on adherent platelets.  
Nature. 359 (1992) 848.
62. Remijn, J.A., Wu, Y.P., Jeninga, E.H., Jsseldijk, M.J.W., van Willigen, G., de Groot, P.G., Sixma, J.J., Nurden, A.T., Nurden, P.  
Role of ADP-Receptor P2Y<sub>12</sub> in Platelet Adhesion and Thrombus Formation in Flowing Blood.  
Arterioscler Throm Vasc Biol. 22 (2002) 686-691.

63. Rolf, M.G., Brearley, C.A., Mahaut-Smith, M.P.  
Platelet shape change evoked by selective activation of P2X1 purinoceptors with alpha, beta-methylene ATP.  
Thromb Haemost. 85 (2001) 303-308.
64. Rosenthal, T. Ezra, D.  
Calcium antagonists. Drug interactions of clinical significance.  
Drug Saf. 13 (1995) 157-187.
65. Ross, R.  
The Pathogenesis of arteriosclerosis- a perspective for the 1990s.  
Nature. 363 (1993) 801-809.
66. Savi, P., Pereillo, J.M., Uzabiaga, M.F., Combalbert, J., Picard, C., Maffrand, J.-P., Pascal, M., and Herbert, J.-M.  
Identification and biological activity of the active metabolite of clopidogrel.  
Thromb Haemost. 84 (2000) 891-896.
67. Saw, J., MD, Steinhubl, S.R., MD, Berger, P.B., MD, Kereiakes, D.J., MD, Serebruany, V.L., MD, Brennan, D., MS, Topol, E.J., MD.  
For the Clopidogrel for the Reduction of Events During Observation (CREDO) Investigators.  
Lack of adverse clopidogrel- atorvastatin clinical interaction from secondary analysis of a randomised placebo-controlled clopidogrel trial.  
Circulation. 108 (2003) 921-934.
68. Schlanz, K.D., Myre, S.A., Bottorff, M.B.  
Pharmacokinetic interactions with calcium channel antagonists.  
Clin. Pharmacokinet. 21 (1991) 448-460.

69. Schlossmann, S.F., Boumsell, L., Gilks, W., Harlan, J.M., Kishimoto, T., Morimoto, C., Ritz, J., Shaw, S., Silverstein, L., Springer, T.A., Tedder, T.F., Todd, R.F.  
CD antigens.  
Blood. 83 (1994) 879.
70. Schömig, A., Neumann, F.J., Kastrati, A., Schühlein, H., Blasini, R., Jadamitzky, M., Walter, H., Zitzmann, E.M., Richardt, G., Alt, E., Schmitt, C., Ulm, K.  
A randomized comparison of antiplatelet and anticoagulant therapy after the placement of coronary-artery-stents.  
N Engl J Med. 334 (1996) 1084-1089.
71. Schömig, A., MD, Mehilli J., MD, Holle, H., RN, Hösl, K., RN, Kastrati, D., Pache, J., MD, Seyfarth, M., MD, Neumann, F.-J., MD, Dirschinger, J., MD, Kastrati, A., MD.  
Statin treatment following coronary artery stenting and one-year survival.  
Journal of the American College of Cardiology. 40 (2002) 854-861.
72. Schühlen, H., Kastrati, A. ; Dirschinger, J.; Hausleiter, J.; Elezi, S.; Wehinger, A.; Pache, K.; Hadamitzky, M.; Schömig, A.  
Intracoronary stenting and risk for major adverse cardiac events during the first month.  
Circulation. 98 (1998) 104-111.
73. Serebruany, V.L., MD, PhD, Steinhubl, S.R., MD; Hennekens, C.H., MD, Dr PH.  
Are antiplatelet effects of clopidogrel inhibited by atorvastatin?  
A research question formulated but not yet adequately tested.  
Circulation. 107 (2003) 1568-1569.
74. Serebruany, V.L., Midei, M.G., Malinin, A.I., Oshrine, B.R., Lowry, D.R., Sane, D.C., Tanguay, J.F., Steinhubl, S.R., Berger, P.B., O'Connor C.M., Hennekens, C.H.  
Absence of interaction between atorvastatin or other statins and clopidogrel: results from the interaction study.

- Arch Intern Med. 164 (2004) 2051-2057.
75. Serruys, P.W., de Jaegere. P., Kiemeneij, F., Macaya, D., Rutsch, W., Heyndrick, G., Emanuelsson, H., Marco, J., Legrand, V., Materne, P., Belardi, J., Sigwart, U., Colombo, A., Goy, J.J., van den Heuvel, P., Morel. M-A., for The Benestent Study Group.  
A comparison of balloon-expandable-stent implantation with balloon angioplasty in patients with coronary artery disease.  
N Engl J Med. 331 (1994) 489-495.
76. Steering Committee of the Physicians' Health Study Research Group.  
Final report on the aspirin component of the ongoing Physicians' Health Study.  
New England Journal. 321 (1989) 129-135.
77. Steinhubl, S.R., Berger, P.B., Mann, J.T. 3<sup>rd</sup>, Fry, E.T., DeLago, A., Wilmer, C., Topol, E.J.;  
CREDO Investigators. Clopidogrel for the reduction of Events During Observation.  
Early and sustained dual oral antiplatelet therapy following percutaneous coronary intervention: a randomised controlled trial.  
JAMA. 288 (2003)2411-2420.
78. Taubert, D., Kastrati, A., Harlfinger, S., Gorchakova, O., Lazar, A., von Beckerath, N., Schömig, A., Schomig, E.  
Pharmacokinetics of clopidogrel after administration of a high loading dose.  
Thromb Haemost. 92 (2004) 311-316.
79. Tschoepe, D., Schultheiß, H.A.T., Kolarov, P., Schwippert, B., Danmehl, K., Nieuwentrius, H.K., Kehrel, B., Strauer, B., Gries, F.A.  
Platelet membrane activation markers are predictive for increased risk of acute ischemic events after PTCA.  
Circulation. 88 (1993) 37-42.

80. Von Beckerath N., von Beckerath O., Koch O., Eichinger M., Schömig A., Kastrati A. P2Y12 gene H2 haplotype is not associated with increased adenosine diphosphate-induced platelet aggregation after initiation of clopidogrel therapy with a high loading dose.  
Blood Coagul Fibrinolysis. 16 (2005) 199-204.
81. Ware, J.A., Collier, B.S.  
Platelet morphology, biochemistry and function.  
Hematology. 5 (1995) 1164-201.
82. Wienbergen, H., Gitt, A.K., Schiele, R., Juenger, C., Heer, T., Meisenzahl, C., Limbourg, P., Bossaller, C., Senges, J. MITRA PLUS Study Group.  
Comparison of clinical benefits of clopidogrel therapy in patients with acute coronary syndromes taking atorvastatin versus other statin therapies.  
Am J Cardiol. 98 (2003) 285-288.
83. World Health Organization Study Group.  
Diabetes mellitus.  
WHO Tech Rep Ser. 727 (1985) 1-104.
84. Yusuf, S., Zhao, F., Mehta, S.R., Chrolavicius, S., Tognoni, G., Fox, K.K.  
Clopidogrel in Unstable Angina to Prevent Recurrent Events Trial Investigators.  
Effects of clopidogrel in addition to aspirin in patients with acute coronary syndromes without st-segment elevation.  
N. Engl. J. Med. 345 (2001) 494-502.
85. Zhang, F.L., Luo, L., Gustafson, E., Lachowicz, J., Smith, M. Qiao, X, Liu, Y.-H., Chen, G., Pramanik, B., Laz, T.M., Palmer, K., Bayne, M., Monsma, F.J. Jr.  
ADP is the cognate ligand for the orphan G protein-coupled receptor SP1999.  
J Biol. Chem. 276 (2001) 8608-8615.

**Buchbeiträge:**

1. Gawaz., M.  
Das Blutplättchen. Physiologie, Pathophysiologie, Membranrezeptoren,  
antithrombozytäre Wirkstoffe und Therapie bei koronaren Herzerkrankungen.  
Thieme Verlag. 1999.

## **Danksagung**

Herrn Prof. Dr. Meinrad Gawaz bin ich für die freundliche Überlassung des Themas zu großem Dank verpflichtet.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Olga von Beckerath und Herrn Dr. Nicolas von Beckerath, die trotz Nachwuchs immer ein offenes Ohr für Probleme hatten, mir mit Sachverstand und sehr guten Ratschlägen beigestanden haben und entscheidend für das Gelingen der Arbeit beitrugen. Ohne ihre Unterstützung wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Frau Marianne Eichinger möchte ich für ihre Mithilfe im Labor danken, die mir nicht nur mit Tipps und Tricks Beiseite stand, sondern auch viel Geduld und Verständnis aufwies. Bei Herrn Dr. Werner Koch möchte ich mich für die Ermöglichung der Literaturrecherche bedanken. Ebenfalls danken möchte ich Herrn Wolfgang Latz, der in Laborangelegenheiten immer ein Ansprechpartner für mich war.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei Herrn Prof. Adnan Kastrati für die Ermöglichung der Fortführung der Doktorarbeit bedanken.