



Technische Universität München

Fakultät für Medizin

**Messungen der ADP-induzierten Thrombozytenaggregation
mittels optischer Aggregometrie nach Born und
mittels Multiplate Analyter aus Vollblut
nach Gabe einer 600 mg Loadingdosis Clopidogrel**

Stefan Jawansky

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

Vorsitz: Prof. Dr. Ernst J. Rummeny

Prüfer*innen der Dissertation: 1. Prof. Dr. Dirk Sibbing
2. Prof. Dr. Peter Ewert

Die Dissertation wurde am 31.08.2022 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 23.05.2023 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Bedeutung der koronaren Herzerkrankung	1
1.2 Koronarangiographie und koronare Stentimplantation	2
1.3 Komplikationen und Verhinderung einer Stentthrombose.....	4
1.4 Thrombozyten und Stentimplantation	6
1.4.1 ADP-Rezeptoren.....	9
1.4.2 ADP-Rezeptor P2X ₁	10
1.4.3 ADP-Rezeptoren P2Y	11
1.4.4 ADP-Rezeptor P2Y ₁	12
1.4.5 ADP-Rezeptor P2Y ₁₂	13
1.5 Duale Antithrombozytäre Therapie	14
1.5.1 Thienopyridine.....	15
1.6 Variabilität der Clopidogrelwirkung	21
1.6.1 Ursachen für unterschiedliches Clopidogrelansprechverhalten.....	22
1.6.2 Nikotinkonsum	23
1.6.3 Diabetes Mellitus.....	23
1.6.4 Begleitmedikation mit Protonenpumpeninhibitoren (PPI).....	24
1.6.5 Body-mass-index (BMI).....	25
1.6.6 Genetische Faktoren	25
1.7 Zielsetzung.....	26
1.8 Fragestellungen.....	28

2. Methoden	29
2.1 Studienpopulation.....	29
2.2 Studienprotokoll	30
2.3 Optische Aggregometrie nach Born (LTA).....	30
2.3.1 Materialien.....	30
2.3.2 Blutplasmagewinnung	31
2.3.3 ADP Herstellung.....	31
2.3.4 Durchführung der Messungen	32
2.4 Vollblutaggregometrie Multiplate (MEA)	34
2.4.1 Materialien.....	34
2.4.2 Vollblutgewinnung	35
2.4.3 Durchführung der Messungen	35
3. Ergebnisse.....	39
3.1 Statistische Analysen.....	39
3.1.1 Mittelwert	39
3.1.2 Varianz.....	39
3.1.3 Standardabweichung.....	39
3.1.4 Wilcoxon Test.....	40
3.1.5 Spearmans Rangkorrelationskoeffizient.....	40
3.2 Studienpopulation.....	41
3.2.1 Bewertung der Clopidogrelantwort	42
3.2.2 Korrelation der Messergebnisse von LTA und MEA	43
3.2.3 Bewertung eines Low-Response auf Clopidogreltherapie mit LTA und MEA	44
3.2.4 Klinisches Outcome.....	45

4. Diskussion	46
5. Weitere wissenschaftliche Arbeit	54
5.1 Beschreibung	54
5.2 Ergebnis der Studie.....	55
6. Zusammenfassung	56
7. Literaturverzeichnis.....	58
8. Anhang.....	71
8.1 Verzeichnis verwendeter Abkürzungen	71
8.2 Abbildungsverzeichnis	73
8.3 Tabellenverzeichnis	73
8.4 Danksagung	74
8.5 Publikationen.....	75

1 Einleitung

1.1 Bedeutung der koronaren Herzerkrankung

Bei einem Blick auf die Statistik der häufigsten Todesursachen finden sich in Industrieländern wie der Bundesrepublik Deutschland die kardiovaskulären Erkrankungen auf dem ersten Platz. Über 43% aller Verstorbenen gehen auf diese Krankheiten zurück. Das entspricht 38,2% bei Männern und 47,4% bei Frauen. Im Hinblick auf das Alter sind 91% der Verstorbenen älter als 65 Jahre. Werden die Todeszahlen eines Herzinfarktes im Speziellen betrachtet, sind das 7,4% aller Verstorbenen, wobei 54% Männer und 46% Frauen betroffen sind [1].

Definitionsgemäß handelt es sich bei der koronaren Herzerkrankung um die Manifestation der Atherosklerose an den Herzkranzarterien. Die dadurch bedingten Koronarstenosen führen zu einer Blutflussminderung mit daraus resultierender Koronarinsuffizienz, welche ein Missverhältnis von Sauerstoffangebot und Sauerstoffbedarf im Herzmuskel darstellt. Die Folge ist eine Myokardischämie.

Untersuchungen wie zum Beispiel die deutsche PROCAM-Studie haben gezeigt, dass es epidemiologische Risikofaktoren für die KHK gibt [2]. Zu ihnen gehören nicht beeinflussbare wie Lebensalter, Geschlecht und positive Familienanamnese, sowie eine ganze Reihe von beeinflussbaren wie Zigarettenkonsum, Diabetes mellitus, arterielle Hypertonie, erhöhtes LDL-Cholesterin und erniedrigtes HDL-Cholesterin.

1.2 Koronarangiographie und koronare Stentimplantation

Die Geschichte des Herzkatheters begann vor über 90 Jahren im Frühjahr 1929, als der damals 25jährige Assistenzarzt der Auguste-Victoria-Klinik in Eberswalde Werner Forßmann sich in einem Selbstversuch den ersten Rechtsherzkatheter legte [3]. Er führte den Katheter am linken Arm in die Vena basilica ein und schob diesen bis zum rechten Vorhof vor. Zur Dokumentation begab er sich mit liegendem Katheter in die Röntgenabteilung und ließ ein Röntgenbild mit Kontrastmittel anfertigen. Somit hatte er auch noch gleichzeitig bewiesen, dass das menschliche Herz ohne Gefahren mit Kontrastmittel gefüllt werden konnte [4].

Die Weiterentwicklung wurde in den 50er und 60er Jahren durch Melvin Judkins angeführt, der den bis heute noch üblichen transfemorale Zugang sowie die Katheterisierung des linken Herzens erforschte [5]. Die erste Ballondilatation einer peripheren Arterie mit Arteriosklerose gelang Melvin Judkins zusammen mit Charles Dotter 1964 [6]. Danach waren 13 Jahre Materialentwicklung und Forschung notwendig, bis es 1977 Andreas Gruntzig in Zürich gelang eine Stenose im Ramus interventricularis anterior eines 37-jährigen Patienten aufzudilatieren [7]. Somit war diese Intervention die erste perkutane transluminale Koronarangioplastie (PTCA).

Seit dieser Zeit hat sich die Linksherzkatheteruntersuchung weltweit bei einem akuten Koronarsyndrom oder einer stabilen/instabilen Angina Pectoris weiterentwickelt und ist aktuell zum Diagnose- und Therapiestandard Nummer eins in Deutschland und vielen anderen Ländern geworden. Waren es im Jahr 1980 in der BRD noch 35.680 Katheteruntersuchungen, ist die Zahl im Jahr 2005 auf 772.137 angewachsen [8]. Diese Tendenz ist bis auf den heutigen Tag weiter steigend, so dass in Deutschland ein immer flächendeckenderes Netz mit stetig zunehmenden Untersuchungszahlen entsteht.

Dadurch wird Patienten auch in ländlichen Regionen eine schnellere Zuführung zu einem Herzkatheterlabor ermöglicht.

Mit dieser Untersuchungstechnik ist es möglich, Engstellen und Verschlüsse in den Koronararterien zu finden, diese dann im Anschluss mit einem Ballon aufzudilatieren (Abbildung 1) und somit wieder frei durchgängig zu machen.

Da sich jedoch gezeigt hat, dass die Langzeitergebnisse nach einer solchen Ballondilatation nicht optimal waren und es häufig zu Restenosen gekommen ist, wurden in der Folge Gefäßstützen entwickelt.

Um ein längerfristiges Offenhalten des dilatierten Gefäßes zu gewährleisten, wurden 2005 in 85% der PTCA's eine solche Gefäßstütze, der so genannte „Stent“, eingesetzt (Abbildung 2) [8].

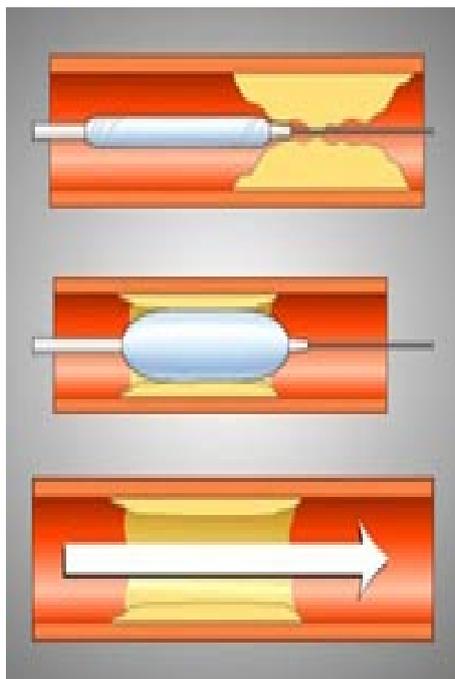


Abbildung 1: Schematische Darstellung einer Ballondilatation
(Quelle: www.herz-praxis.ch)

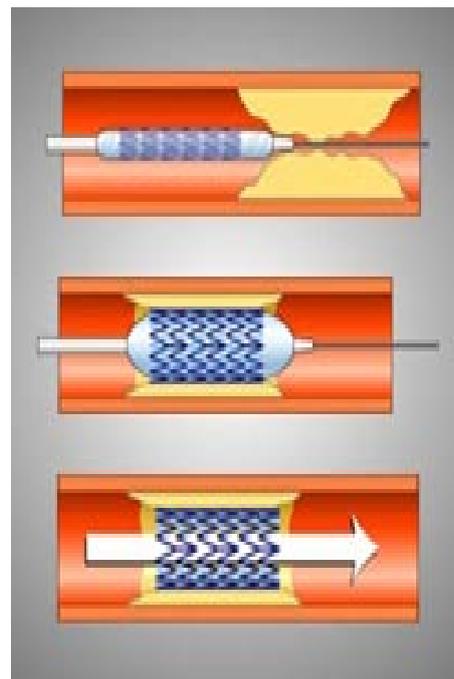


Abbildung 2: Schematische Darstellung einer Stentimplantation
(Quelle: www.herz-praxis.ch)

Zur Auswahl stehen heute zum Einen „bare-metal stents“ und zum Anderen „drug-eluting stents“, welche mit Medikamenten beschichtet sind [8].

1.3 Komplikationen und Verhinderung einer Stentthrombose

Da es sich bei der Herzkatheteruntersuchung um eine invasive Untersuchung/Behandlung handelt, können Komplikationen auftreten. Hier stellt die akute Stentthrombose während der Intervention oder in der Folgezeit die am meisten gefürchtete Komplikation dar [9].

Um diesem Problem entgegen zu wirken, hat es die Forschung vor allem in der Pharmakologie aber auch in der Klinik in den letzten Jahrzehnten geschafft, eine Abnahme der Komplikationsrate bei und nach der Herzkatheteruntersuchung zu erreichen. Von Beginn an galt Acetylsalicylsäure (ASS) als Basistherapeutikum welches zuerst als Monotherapie Verwendung fand und später dann mit Heparin oder Marcumar kombiniert wurde. Jedoch erwies sich die Wirkung als nicht ausreichend [10, 11]

Erst die duale Plättchenhemmung bestehend aus ASS und einem Thienopyridin hat den Durchbruch geschafft, sodass eine deutliche Senkung der Zahl der akuten Ereignisse nach Koronarintervention beobachtet werden konnte [12, 13]. Gerade im Bereich der Thienopyridine findet eine enorme Entwicklung statt. Die erste Generation, das Ticlopidin, wurde so gut wie vollständig vom Clopidogrel, ein Präparat der zweiten Generation, abgelöst. Dieses ist auch heute noch Hauptbestandteil der antithrombozytären Therapie nach Stentimplantation. Inzwischen existieren aber auch schon Thienopyridine der dritten Generation wie Prasugrel, Cangrelor, Ticagrelor oder Elinogrel [14].

Die duale Plättchenhemmung wird vor einer Koronarintervention mit einer Loadingdosis begonnen und danach mit einer Erhaltungsdosis fortgesetzt.

Während der Intervention kommen zudem unfraktioniertes Heparin, Enoxaparin oder Bivalirudin zum Einsatz. In zahlreichen Studien wurden Bivalirudin und Heparin mit Bezug auf ihre Wirkung verglichen [15-20].

Nührenberg und Kollegen beschäftigten sich beispielsweise mit der Wirksamkeit und Sicherheit von Bivalirudin während Herzkatheteruntersuchungen bei Patienten mit einem akuten Koronarsyndrom [21].

Aufgrund der Studienlage wurde allerdings das Bivalirudin von Klasse I in den ESC-Leitlinien von 2015 auf Klasse IIb in den ESC-Leitlinien von 2020 zurückgestuft [14].

Durch die Entwicklung neuer und potenter Antikoagulanzen konnte zwar eine Reduktion von thrombotischen Ereignissen erzielt werden, allerdings darf dabei das Risiko von Blutungskomplikationen nicht außer Acht gelassen werden.

Seit der Etablierung der Koronarintervention beschäftigen sich Forschungsgruppen damit, sowohl das Thromboserisiko als auch das Blutungsrisiko für Patienten so gering wie möglich zu halten [20, 22-25].

1.4 Thrombozyten und Stentimplantation

Bei den Thrombozyten handelt es sich um kernlose korpuskuläre Blutbestandteile, die aus Megakaryozyten im Knochenmark gebildet werden. Physiologisch befinden sich zwischen 150.000 und 380.000 Thrombozyten in einem Mikroliter Blut und zirkulieren durchschnittlich 9-10 Tage im Blutkreislauf, bis sie dann im retikuloendothelialen System von Leber und Milz abgebaut werden [26].

Diese kleinsten korpuskulären Blutbestandteile weisen im inaktiven Zustand, wenn sie im Blut zirkulieren, eine discoide Form auf und haben einen Durchmesser von 2-4 μm , sowie eine Dicke von 0,75 μm . Sobald die Plättchen mit subendotheliale Gewebe in Kontakt kommen, werden sie aktiviert. Zu dieser Adhäsion am Subendothel kommt es, indem Adhäsivproteine wie Vitronectin, Thrombospondin oder Fibronectin an Rezeptoren der Thrombozyten und an subendotheliale Strukturen binden. Die Wechselwirkung zwischen dem „von-Willebrand-Faktor“ und den Glykoproteinen Ib/IX der Plättchenmembran ist für die initiale Haftung der Thrombozyten von besonderer Bedeutung [27].

Aktivatoren wie beispielsweise ADP, Thrombin und Kollagen führen zu einer Änderung der Thrombozytenform („shape change“). Die Folge sind Ausstülpungen von Pseudopodien, die mit einer Oberflächenvergrößerung von 8 auf 13 μm^2 einhergehen und es den Blutplättchen ermöglichen, sich am Subendothel und an künstlichen Oberflächen anzuhafte und zu Aggregaten zusammenzulagern (Abbildung 3).

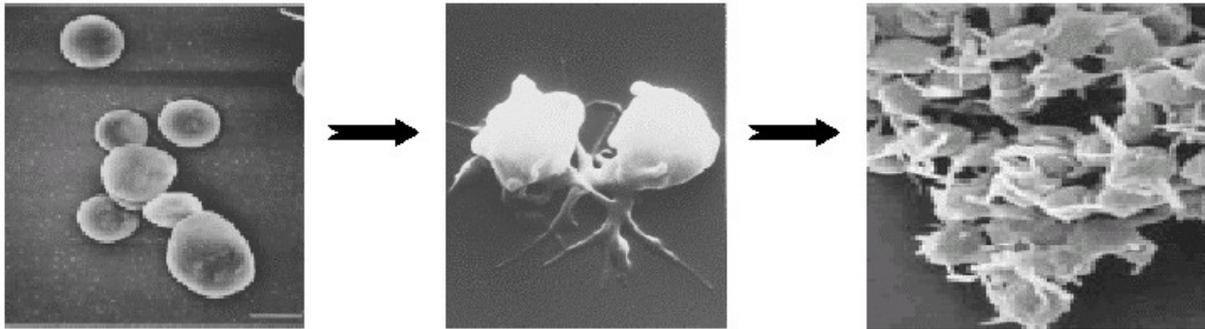


Abbildung 3: Elektronenmikroskopische Darstellung ruhender, formveränderte Thrombozyten mit vergrößerter Oberfläche und Pseudopodien sowie aggregierte Thrombozyten (Quelle: Elektronenmikroskopie nach www.platelet.page).

Fibrinogen und Ca^{2+} binden an Glycoprotein IIb/IIIa- Rezeptoren der Thrombozytenmembran und sorgen somit für die Aggregation der Plättchen untereinander. Diese Bindung ist nur beim aktivierten Plättchen möglich und wird als primäre Aggregation bezeichnet. Unter der sekundären Aggregation wird die Spaltung von Fibrinogen zu Fibrin verstanden. Bei diesem irreversiblen Vorgang sezernieren die Plättchen Inhaltsstoffe ihrer Granula sowie Produkte des Arachidonsäurestoffwechsels [26].

Die Thrombozytenmembran weist spezifische Rezeptoren für eine Vielzahl von plättchenaktivierenden Agonisten auf, wobei diese meist zu Familie der G-Protein gekoppelten gehören. Als stärkster Agonist hat sich Thrombin erwiesen. Die durch Signaltransduktion rezeptorvermittelte Thrombozytenaktivierung führt zur Aktivierung der Phospholipase C, der Bildung von DAG und IP_3 .

Viele Substanzen können zu einer Thrombozytenaktivierung und somit zur Auslösung intrazellulärer Reaktionen führen. Diese Substanzen werden entweder von den Blutplättchen selbst synthetisiert oder vom umliegenden Gewebe und Plasma bereitgestellt. Ein wichtiger Vorgang bei diesem Prozess ist die Sekretion von ADP.

Aktivierte Thrombozyten setzen den Plättchenaktivator ADP frei und führen so zu einer weiterführenden Aktivierung und Aggregation. Geschädigtes Gefäßwandgewebe sowie Erythrozyten und Endothelzellen sezernieren ebenfalls ADP.

Es wird deutlich, dass ADP eine zentrale Rolle bei der Thrombozytenaggregation spielt und somit einen wichtigen pharmakologischen Ansatz bei der Reduzierung dieser Aggregation bietet.

1.4.1 ADP-Rezeptoren

Adenosindiphosphat wurde bereits Anfang der 1960iger Jahre als erste physiologische niedermolekulare Substanz mit aggregationsfördernder Wirkung entdeckt [28]. Welchen Einfluss dieses ADP hat, wurde anhand der verstärkten Blutungsneigung bei Patienten mit ADP-Poolmangel oder defekten ADP-Rezeptoren festgestellt [29-31].

Es existieren auf menschlichen Blutplättchen drei verschiedene Typen von purinergen Rezeptoren, die unterschiedliche Aktivierungskaskaden aufweisen. Zwei davon sind G-Protein gekoppelt ($P2Y_1$ und $P2Y_{12}$), der Dritte ist ein inotropischer Rezeptor ($P2X_1$) [32-34]. Entscheidend für die Thrombozytenaggregation sind jedoch die beiden G-Protein gekoppelten Rezeptoren (Abbildung 4).

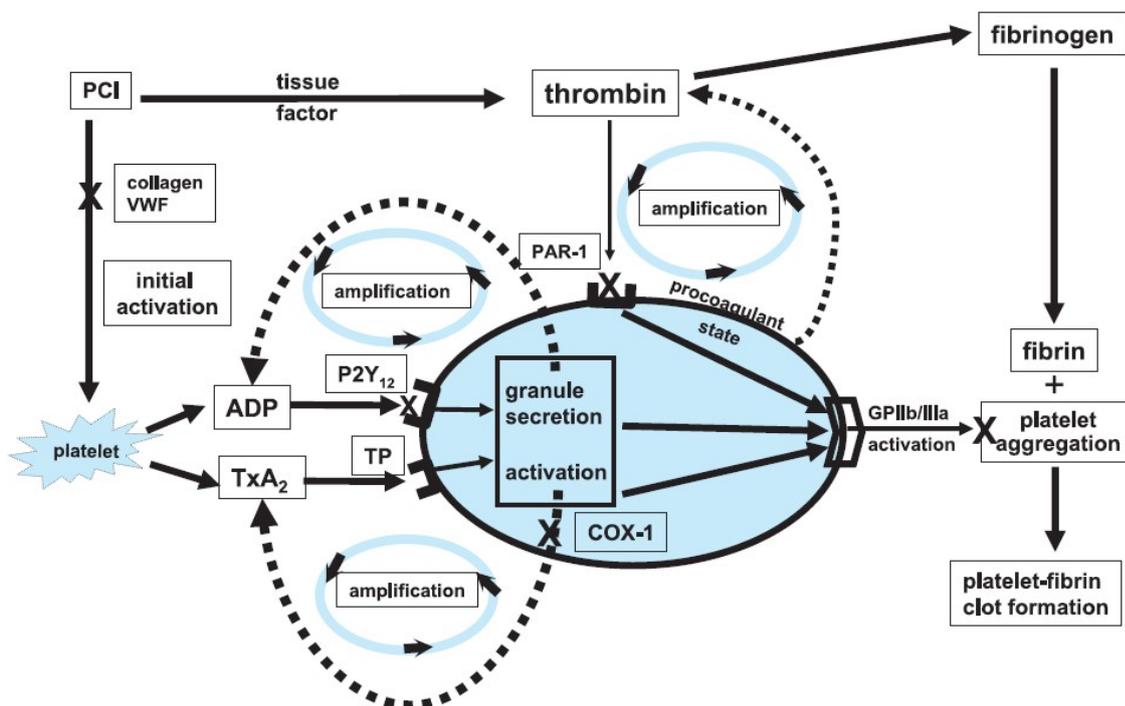


Abbildung 4: $P2Y_{12}$ -Rezeptor mit zentraler Rolle bei der Entstehung eines Thrombus.

(Quelle: Tantry US, Gurbel PA.; Platelet monitoring for PCI: is it really necessary; Haemostaseologie. 2009 Nov;29(4):368-75)

1.4.2 ADP-Rezeptor P2X₁

Der P2X₁-Rezeptor ist ein ligandengesteuerter, nichtselektiver Kationenkanal, der zum sofortigen Einstrom von Kalzium aus dem Extrazellularraum führt [35, 36] (Abbildung 5).

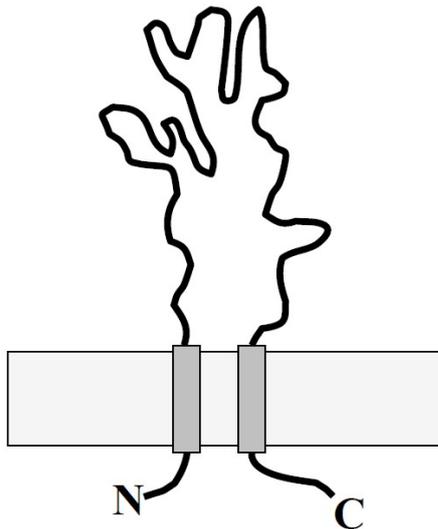


Abbildung 5: Topologie eines P2X-Rezeptors.

(Quelle: Markus Glänzel; *Synthese von P2-Rezeptor-Antagonisten in der Reihe der Reaktivblau 2 Farbstoffe und deren Struktur-Wirkungs-Beziehungen*; Dissertation Albert-Ludwigs-Universität zu Freiburg im Breisgau; 2003)

Als Ligand am P2X₁-Rezeptor hat ADP allerdings eine untergeordnete Funktion, die Hauptfunktion wird von ATP übernommen [37].

Da eine Aggregation der Thrombozyten auch im Refraktärzustand des Rezeptors zu beobachten ist, muss davon ausgegangen werden, dass dieser ADP-Rezeptor keinen wesentlichen Einfluss auf die Plättchenaggregation nimmt. Somit kann erklärt werden, warum Medikamente der Substanzgruppe der Thienopyridine, Ticlopidin und Clopidogrel ihre Wirkung über den P2X₁-Rezeptor nicht entfalten können, was auch an einem intrazellulären Kalziumanstieg und „shape change“ der Thrombozyten bei Behandlung mit Ticlopidin oder Clopidogrel zu erkennen ist [38].

1.4.3 ADP-Rezeptoren P2Y

Die P2Y-Rezeptoren bestehen aus 7 transmembranösen Domänen, an denen sich auf der Intrazellulärseite G-Proteine befinden (Abbildung 6).

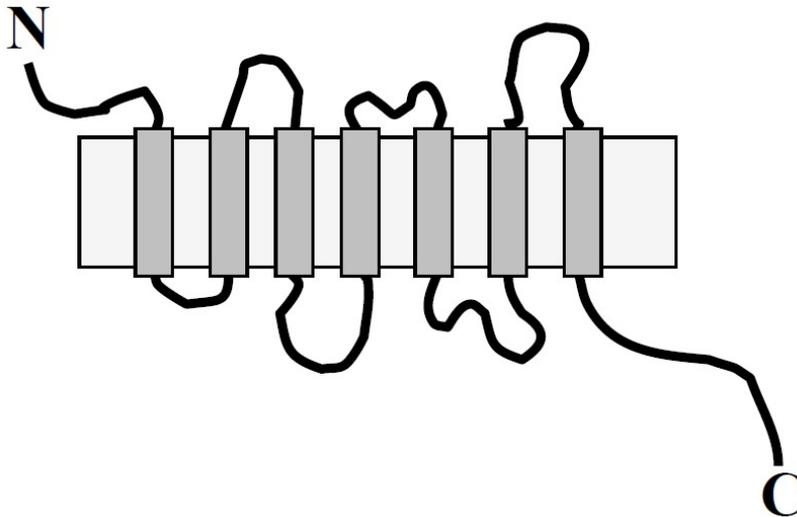


Abbildung 6: Topologie eines P2Y-Rezeptors.

(Quelle: Markus Glänzel; Synthese von P2-Rezeptor-Antagonisten in der Reihe der Reaktivblau 2 Farbstoffe und deren Struktur-Wirkungs-Beziehungen; Dissertation Albert-Ludwigs-Universität zu Freiburg im Breisgau; 2003)

Im Ruhezustand sind die G-Proteine mit einem Guanin-Dinukleotid verbunden. Nach der Bindung von ADP auf der Extrazellulärseite des P2Y-Rezeptors kommt es zu einem Austausch von GDP durch GTP im Zellinneren. Dies führt zu einer Konformationsänderung des G-Proteins mit der Folge, dass sich dessen aktive α -Untereinheit abkoppelt und so die Wirkung über Signalmoleküle, sogenannte „second messenger“ wie zum Beispiel Inositoltriphosphat (IP3) oder zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP), ins Zellinnere weitergeleitet wird. Die Inaktivierung des Rezeptors wird durch das Hydrolysieren des GTP zu GDP bewerkstelligt und somit der Ausgangszustand wiederhergestellt. Die Klassifizierung der P2Y-Rezeptoren und der G-Proteine wird durch die „second messenger“ festgelegt [39].

1.4.4 ADP-Rezeptor P2Y₁

Aus 373 Aminosäureresten bestehend hat er die klassische Struktur eines G-Protein gekoppelten Rezeptors mit 7 transmembranösen Domänen (siehe Abbildung 7). Er wird von einer Reihe von Geweben exprimiert, zu denen auch das Herz, Blutgefäße, Nervengewebe, glatte Muskelzellen, Prostata, Hoden sowie Ovarien zählen [40]. Im Falle des G-Protein P2Y₁-Rezeptors führt eine ADP-Bindung, insbesondere selektiv durch die ADP-Derivate d-ADP und 1-Me-ADP, über das G_q-Protein zur Aktivierung der Phospholipase C. Eine Aktivierung durch ATP wird kontrovers diskutiert [41, 42]. Die Phospholipase C katalysiert dann die Bildung von Inositoltriphosphat (IP₃). Das Ergebnis dieser Signalkette ist eine Calcium-Freisetzung aus intrazellulären Speichern.

Als Folge entsteht eine Formveränderung der Thrombozyten („shape change“) [43]. Eine Aggregation der Blutplättchen findet allerdings nur in Verbindung mit der Aktivierung des P2Y₁₂-Rezeptors statt (Abbildung 7).

1.4.5 ADP-Rezeptor P2Y₁₂

Er besteht aus 342 Aminosäureresten und hat auch diese klassische Struktur eines G-Protein gekoppelten Rezeptors mit 7 transmembranösen Domänen. Die intrazelluläre Koppelung findet an G_i statt.

Die ausschließliche Expressierung dieser ADP-Rezeptoren vollzieht sich auf einigen Subregionen des Gehirns und auf Thrombozyten [33]. Im Falle des P2Y₁₂-Rezeptors führt eine ADP-Bindung - und dabei speziell das ADP-Derivat 2-MeSADP - über das G_i-Protein zur Inhibierung der Adenylatzyklase und damit zur Senkung des Adenosinmonophosphat-Spiegels in der Zelle [44]. In Kombination mit dem „shape change“, welcher durch die Aktivierung des P2Y₁-Rezeptors zustande kommt, entsteht eine Aktivierung von GPIIb/IIIa. Erst diese Aktivierung führt zur Plättchenaggregation (Abbildung 7).

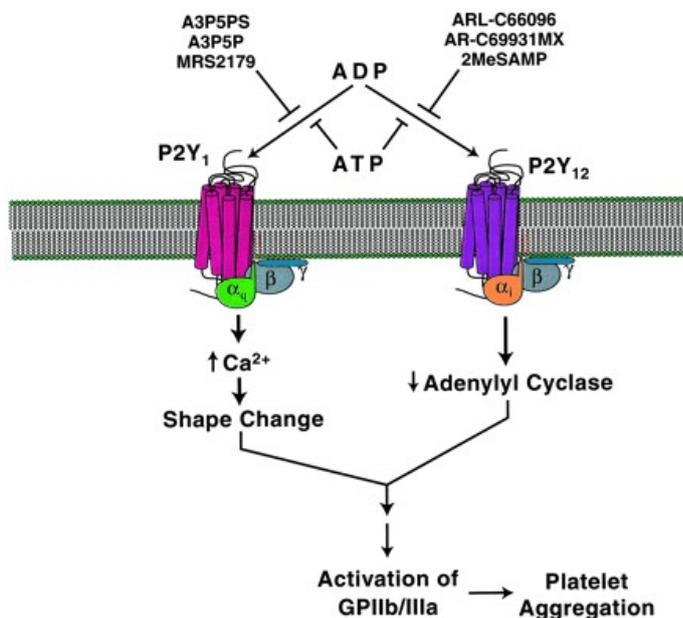


Abbildung 7: Rolle des P2Y₁- und P2Y₁₂-Rezeptors bei der ADP-induzierten Plättchenaggregation.

(Quelle: <http://molpharm.aspetjournals.org/content/60/3/416/F1.large.jpg>)

Nur durch die kombinierte Aktivierung des P2Y₁- und des P2Y₁₂-Rezeptors ist eine Aktivierung von GPIIb/IIIa möglich. Erst diese führt zur Plättchenaggregation.

1.5 Duale Antithrombozytäre Therapie

Die Blutplättchen spielen bei der Pathogenese der Komplikationen, die nach einer Koronarintervention auftreten, eine entscheidende Rolle [45, 46]. Nach der Einführung der dualen Therapie, bestehend aus einem Thienopyridin wie Clopidogrel und einem Cyclooxygenase-Hemmer wie Aspirin, konnte ein deutlicher Rückgang der akuten thrombotischen Ereignisrate nach Koronarintervention beobachtet werden [12, 13, 47, 48]. Somit beträgt das Stentthromboserisiko in den ersten 30 Tagen nach Koronarintervention 1-3% [49]. Diese duale Therapie mit Aspirin und Clopidogrel hat sich als Therapie der Wahl über viele Jahre etabliert um Patienten während einer perkutanen Koronarintervention vor thrombotischen Komplikationen zu schützen [11, 12, 50-55].

Aufgrund neuer Erkenntnisse von unterschiedlichem Ansprechverhalten auf Clopidogrel, sowie der Möglichkeit einer Phänotypisierung und Genotypisierung, besteht heute die Möglichkeit, die duale Antithrombozytäre Therapie auf den Patienten anzupassen, sodass vor allem nach einem akuten Koronarsyndrom auch die duale Plättchenhemmung mit Aspirin und einem potenteren Thienopyridin wie Prasugrel oder Ticagrelor Verwendung findet. Dadurch kann individuell das thrombotische Risiko nach einer Koronarintervention weiter minimiert werden [56].

Zudem etablierten sich Scores, über die sich das Blutungs- und Thromboserisiko bei Koronarinterventionen bestimmen lässt [57-60].

1.5.1 Thienopyridine

Seit mehr als 15 Jahren ist bekannt, dass die Substanzgruppe der Thienopyridine arterielle thrombotische Ereignisse unterdrücken können. Als Präparat der ersten Generation dieser Gruppe fand das Ticlopidin breite Anwendung. Die Weiterentwicklung führte dann zum Clopidogrel, einem Präparat der zweiten Generation, welches bis auf den heutigen Tag Hauptbestandteil der antithrombotischen Therapie bei Koronarangiographien und Koronarinterventionen ist. Aufgrund des hohen Stellenwertes der Thienopyridine war die Forschungen auf diesem Gebiet weiter tätig, sodass inzwischen die dritte Generation, das Prasugrel oder Ticagrelor, im Einsatz ist. Es darf davon ausgegangen werden, dass auch in Zukunft noch neue Präparate dieser Substanzgruppe auf den Markt kommen. Bei allen Thienopyridinen handelt es sich um „prodrugs“ die nicht in vitro wirken, sondern über den Dünndarm resorbiert und in der Leber in die aktiven Metaboliten umgewandelt werden [61].

Im Folgenden wird näher auf die 3 Generationen der Thienopyridine eingegangen.

Ticlopidin wurde ursprünglich in den achtziger Jahren in der Apoplexietherapie eingesetzt. Der Einsatz dieses Medikaments stellte eine wirkungsvolle Alternative zu ASS in der Sekundärprophylaxe atherothrombotischer Krankheitsbilder dar, wie in der „Ticlopidin Aspirin Stroke Study“ (TASS) und in anderen Studien gezeigt werden konnte [62, 63].

Der Nutzen von Ticlopidin wurde auch für die Kardiologie interessant, allerdings hier in Kombination mit ASS. Diese duale Therapie führte zu einer höheren antithrombozytären Wirkung als die Monotherapie mit ASS, sodass ein effektiverer Schutz vor thrombotischen Ereignissen bei Koronarinterventionen gegeben war [12, 13, 64, 65].

Nach Beginn der Therapie wird die maximale antithrombotische Wirkung nach vier bis sieben Tagen erzielt. Wegen der irreversiblen Hemmung der Blutplättchen ist eine normale Thrombozytenfunktion nach Absetzen des Medikaments erst nach fünf bis zehn Tagen wiederhergestellt.

Als Nebenwirkungen zeigten sich gelegentlich Blutbildveränderungen (Neutropenie, Agranulozytose), Nausea, Emesis, Schwindel, Kopfschmerzen, Schlaflosigkeit, depressive Verstimmung und weitere seltener wie Diarrhö, allergische Reaktionen, allergische Vaskulitis, Lupus erythematodes oder Leberfunktionsstörungen [61].

Aufgrund besserer Verträglichkeit und eines besseren Nebenwirkungsprofils wurde das Ticlopidin durch die zweite Generation der Thienopyridine, dem Clopidogrel, abgelöst [66, 67].

Zugelassen wurde das neue Präparat im Jahre 1986. Clopidogrel wird zu 90% enteral resorbiert, kann aber auch parenteral appliziert werden und erreicht eine Plasmaproteinbindung von über 90%. Da Clopidogrel ebenfalls ein „Prodrug“ ist, unterliegt es einem First-pass-Effekt und wird in der Leber sehr schnell metabolisiert. Das führt dazu, dass im Plasma nur sehr geringe Mengen in unveränderter Form zu finden sind [68].

Lange Zeit wurde davon ausgegangen, dass die Aktivierung und Metabolisierung dieses Wirkstoffes hauptsächlich durch das Cytochrom P-450 in der Leber stattfindet [69-71].

Neuere Studien haben allerdings gezeigt, dass CYP2C19, CYP1A2 und CYP2B6 für den ersten Schritt verantwortlich sind und CYP2C19, CYP2C9, CYP2B6 und CYP3A für den Zweiten [72, 73].

Gut die Hälfte des Clopidogrels wird über die Niere ausgeschieden, der Rest über den Stuhl [68]. Studien haben gezeigt, dass eine chronische Therapie mit täglich 75 mg Clopidogrel zu einer etwa 50%igen Hemmung der Aggregation führt. Allerdings wird diese Hemmung erst nach einer mehrtägigen Einnahme erreicht [74, 75]. Um einen schnelleren Wirkungseintritt bei Patienten, denen eine Koronarintervention bevorsteht zu erreichen, wird ihnen das Medikament einmalig hochdosiert in einer sogenannten „Loading-Dosis“ verabreicht. So tritt mit einer Gabe von 300 mg Clopidogrel die Wirkung nach 6-24 Stunden ein und mit 600 mg sogar nach 2-4 Stunden [54, 74]. Erstaunlicherweise wird mit einer täglichen Gabe von 75 mg die gleiche Thrombozytenhemmung wie mit der einmaligen Gabe von 600 mg erreicht [75].

Als Nebenwirkungen finden sich vor allem Blutungen (z.B.: Nasenbluten, Magen-Darmblutungen, Blut im Urin), Hämatome, Magen-Darmbeschwerden (viel seltener als bei ASS), Kopfschmerzen, Schwindel, Hautausschlag und in seltenen Fällen eine Thrombotisch-thrombozytopenische Purpura (TTP, Moschcowitz-Syndrom) [61].

Trotz der Entwicklung neuer Präparate ist Clopidogrel nach wie vor das am meisten angewendete Medikament bei Herzkatheteruntersuchungen und Koronarinterventionen.

Der verzögerte Wirkeintritt und das unterschiedliche Ansprechverhalten auf Clopidogrel haben zur Suche nach neuen P2Y₁₂-ADP-Rezeptorantagonisten geführt. Das Ergebnis ist Prasugrel, ein dritte Generation Thienopyridin, welches seit 2009 in Europa zugelassen ist. Genau wie bei Ticlopidin und Clopidogrel wird das Medikament als „prodrug“ oral aufgenommen und anschließend in einen aktiven Metaboliten umgewandelt. Im ersten Schritt findet die Bildung der Thiolactone R-95913 statt. Dies geschieht durch die schnelle Hydrolyse von Prasugrel durch Esterasen in Darm, Leber und Plasma. Im zweiten Schritt erfolgt dann die Oxidation durch Cytochrom P-450 in Darm und Leber. Durch Ringöffnung entsteht so der aktive Metabolit R-138727 [76].

Der aktive Metabolit bindet dann an den P2Y₁₂ ADP-Rezeptor der Thrombozyten, in dessen Folge die Thrombozytenaktivierung durch den Glykoprotein-IIb/IIIa Rezeptorkomplex verhindert wird. Die Blockierung des P2Y₁₂-Rezeptors ist irreversibel und bleibt für die Lebensdauer der Thrombozyten bestehen. Eine normale Gerinnungsfähigkeit stellt sich nach Absetzen des Prasugrel erst mit der Neubildung von Thrombozyten im Laufe von fünf bis sieben Tagen ein.

Diese beiden Schritte laufen schneller und zu einem größeren Anteil ab als es bei anderen Stoffen dieser Gruppe der Fall ist. So ist der aktive Metabolit schon 15 Minuten nach einer Loadingdosis von 60 mg im Plasma zu finden und steigt nach 30 Minuten zu einer maximalen Plasmakonzentration an. Der therapeutische Effekt der Plättcheninhibierung wird somit innerhalb einer Stunde nach Gabe einer Loadingdosis von 60 mg Prasugrel erreicht [77].

In der TRITON TIMI 38-Studie wurden Patienten mit einem akuten Koronarsyndrom, die einer Koronarintervention unterzogen wurden, mit Prasugrel behandelt. Das Ergebnis war eine signifikant niedrigere Rate an ischämischen Komplikationen wie zum Beispiel Stentthrombosen. Allerdings fand sich auch ein erhöhtes Risiko an massiven Blutungen bis hin zu tödlich verlaufenden Blutungen [78].

Dieses um 2,2 Prozent erhöhte Risiko für schwere Blutungskomplikationen tritt am deutlichsten in den folgenden drei Gruppen auf: Patienten die weniger wie 60 kg wiegen, Patienten die 75 Jahre oder älter sind und Patienten die bereits eine TIA oder einen Apoplex erlitten haben.

Ansonsten können Anämien, Hämatome, Nasenbluten, gastrointestinale Blutungen, Ausschlag, Hämaturie sowie Blutungen und Hämatome im Bereich von Nadeleinstichstellen auftreten.

Montalescot et al verglichen in einer Studie beispielsweise die Gabe von Prasugrel bei Patienten mit nicht-ST-Hebungsinfarkten bei Diagnosestellung und unmittelbar vor der Koronarintervention.

Dabei zeigte sich, dass die Vorabgabe von Prasugrel nicht zu einer Reduktion von thrombotischen Komplikationen innerhalb von 30 Tagen geführt hat.

Dafür nahmen aber die Blutungskomplikationen zu [79].

Andere Forschungsgruppen wie Schupke et al stellten die Gabe von Ticagrelor und Prasugrel bei Patienten mit einem akuten Koronarsyndrom gegenüber.

Hierbei fand sich ein signifikant niedrigeres Auftreten von thrombotischen Komplikationen bei Patienten die mit Prasugrel behandelt wurden. Für das Auftreten von Blutungskomplikationen zeigten sich dagegen keine signifikanten Unterschiede [80].

1.6 Variabilität der Clopidogrelwirkung

Einige ex-vivo Studien haben gezeigt, dass Patienten sehr unterschiedlich auf die Clopidogrelgabe reagieren [55, 69, 72]. Somit ist bei Patienten mit schlechtem Clopidogrelansprechverhalten von Lowrespondern und bei fehlendem Ansprechen auf Clopidogrel von Nonrespondern die Rede.

Bei Patienten die sehr gut auf Clopidogrel ansprechen, wird ein erhöhtes Blutungsrisiko diskutiert, wohingegen prospektive und retrospektive Studien gezeigt haben, dass Low- und vor allem die Nonresponder ein erhöhtes Thromboserisiko während der perkutanen Koronarintervention haben [68, 70, 71, 74, 81].

Als Nonresponder beziehungsweise Clopidogrelresistent gelten Patienten, bei denen die Plättchenfunktionshemmung nach Clopidogrelgabe weniger als 10% ausmacht.

Ursächlich werden zelluläre Faktoren, genetische Faktoren und klinische Faktoren in Betracht gezogen (Tabelle 1).

1.6.1 Ursachen für unterschiedliches Clopidogrelansprechverhalten

Zelluläre Faktoren	Genetische Faktoren	Klinische Faktoren
Hochregulierung des P2Y ₁ Signalweges	Polymorphismen P2Y ₁₂	Unterdosierung
Hochregulierung des P2Y ₁₂ Signalweges	Polymorphismen CYP3A4 und CYP3A5	Non-Compliance
Hochregulierung P2Y-unabhängiger Signalwege (Kollagen, Thrombin, Thromboxan A ₂ , Epinephrin)	Polymorphismen GPIa	Begleitmedikation (Protonenpumpenhemmer, Calciumkanalblocker, Cumarinderivate, Statine)
Verringerte CYP3A Aktivität	Polymorphismen GP IIIa	Akutes Koronarsyndrom/ Kardiogener Schock
Erhöhter Plättchenumsatz	Polymorphismen CYP2C19	Ejektionsfraktion
	Polymorphismen MDR1	Diabetes mellitus
	Polymorphismen ITGB3	Niereninsuffizienz
	Polymorphismen PON-1	Systemische Entzündung
		Adipositas (BMI)
		Alter
		Geschlecht
		Nikotinkonsum

Tabelle 1: Ursachen für unterschiedliches Clopidogrelansprechverhalten
(Quelle: Angiolillo et al., Nguyen et al., Sibbing et al. und Bernlochner et al. [82-86].)

In der Folge wird auf die wichtigsten klinischen und genetischen Faktoren eingegangen.

1.6.2 Nikotinkonsum

Bliden et al. fanden heraus, dass Raucher unter chronischer Clopidogreltherapie eine signifikant niedrigere Plättchenaggregation aufwiesen. Diese wurde durch 5 $\mu\text{mol/L}$ und 20 $\mu\text{mol/L}$ ADP induziert. Auch die ADP induzierte Bildung von aktivem GPIIb/IIIa ist gegenüber Nichtrauchern reduziert ($P \leq 0.0008$) [87]. Bei Behandlung mit 600 mg Clopidogrel zeigte sich ein ähnliches Bild. Die durch ADP induzierte Plättchenaggregation sowie die Bildung von aktivem GPIIb/IIIa waren im Vergleich zu Nichtrauchern vermindert ($P \leq 0.05$). Es ist bekannt, dass Zigarettenrauch mit CYP1A2 interagiert. Dieses ist wiederum Bestandteil der hepatischen CYP450 Isoenzymfamilie, welches an der metabolischen Aktivierung von Clopidogrel beteiligt ist.

1.6.3 Diabetes Mellitus

Einen weiteren Aspekt beleuchteten Serebruany et al. – das Ansprechverhalten von Clopidogrel bei Diabetikern. Sie führten eine Studie durch, in der 70 Diabetiker ohne koronare Intervention eingeschlossen waren. Gegenstand der Studie war der Vergleich der antithrombozytären Wirkung von Aspirin alleine und der Kombination von Aspirin plus Clopidogrel. Es zeigte sich ein erhöhtes Risiko für eine Thrombozytenaggregation bei den Diabetikern [88].

Eine reduzierte Sensitivität der Thrombozyten bei Diabetikern (Typ II) auf antithrombozytäre Substanzen könnte die Ursache sein.

Angiolillo et al. fanden in einer Studie heraus, dass die Plättchenaggregation nach Gabe einer Clopidogrelloading Dosis von 300 mg bei Diabetikern verglichen mit Nicht-Diabetikern über 24 Stunden signifikant erhöht war. Desweiteren fand sich ein höherer Anteil unter den Diabetikern, der schlechter auf Clopidogrel angesprochen hat als unter den Nicht-Diabetikern [89]. Eine mögliche Ursache der erhöhten Plättchenaggregation könnte im Vorhandensein eines prothrombotischen Zustandes bei Diabetikern sein.

Dieser ergibt sich aus einer gestörten Interaktion und Fehlfunktion von Thrombozyten, Endothel und Gerinnungssystem. In der Literatur werden als Hauptursachen dieser komplexen Dysfunktion Insulinresistenz mit Hyperinsulinämie, Hyperglycämie sowie Hyperlipidämie beschrieben [90].

1.6.4 Begleitmedikation mit Protoneninhibitoren (PPI)

Ebenso belegen einige Studien ein schlechteres Ansprechverhalten auf Clopidogrel bei einer zusätzlichen Therapie mit PPI. Dunn und Mitarbeiter haben in der CREDO-Doppelblindstudie Patienten nach einer Koronarintervention untersucht. Die beiden Patientenkohorten wurden über bis zu 12 Monate entweder nur mit ASS oder kombiniert mit ASS und Clopidogrel behandelt. In beiden Patientengruppen trat der kombinierte Endpunkt aus Myokardinfarkt, Schlaganfall und Tod bei Patienten mit einer zusätzlichen PPI-Medikation im Beobachtungszeitraum von einem Jahr häufiger auf [91]. Clopidogrel wird über Cytochrom-P450 zu seinem aktiven Metaboliten umgewandelt. Dabei spielt neusten Studien zufolge das Isoenzym CYP2C19 eine große Rolle [73, 92-94]. Da auch PPI's eine mögliche Hemmung von CYP2C19 hervorrufen können, ist eine gehemmte Aktivierung von Clopidogrel möglich.

1.6.5 Body-mass-index (BMI)

Einige Studien konnten belegen, dass bei adipösen Patienten (erhöhter BMI) die durch ASS und Clopidogrel gewollte Thrombozytenaggregationshemmung reduziert war. Tamminen et al. konnten eine verringerte Thrombozytenaggregationshemmung nach Gabe von ASS bei adipösen Patienten nachweisen [95]. Zu einem ähnlichen Ergebnis, allerdings nach Gabe von Clopidogrel, ist Sibbing et al. gekommen [96].

Hier konnte, im Vergleich zu normalgewichtigen Patienten, eine schlechtere Thrombozytenaggregationshemmung nach Gabe von 600 mg Clopidogrel bei übergewichtigen Menschen gefunden werden.

1.6.6 Genetische Faktoren

Zuletzt muss noch erwähnt werden, dass CYP2C19 polymorph exprimiert wird, was dazu führt, dass dieses Enzym genetisch bedingt bei manchen Menschen, zum Beispiel 30% aller Kaukasier, fehlt beziehungsweise eine reduzierte Aktivität zeigt [93]. Diese Tatsache führt bei betroffenen Patienten zu einer möglicherweise verminderten Clopidogrelwirkung.

1.7 Zielsetzung

Das Verfahren der optischen Aggregometrie wurde von Born entwickelt und 1962 erstmals beschrieben [97]. Es handelt sich dabei um die Messung der optischen Dichteänderung in plättchenreichem Plasma. Zuerst muss das plättchenreiche Plasma (PRP) durch Zentrifugation aus Vollblut mit Citratzusatz gewonnen werden. Nach dem Abpipettieren des PRP wird der Rest der Vollblutprobe, bestehend aus Erythrozyten und Leukozyten erneut zentrifugiert, wodurch das plättchenarme Plasma (PPP) gewonnen werden kann. Dieses ist für die Kontrolle der 100%igen Lichttransmission notwendig. Für die eigentliche Messung muss dem PRP ein Aggregationsinduktor, wie zum Beispiel ADP, zugesetzt werden, um die Thrombozytenaggregation in vitro in Gang zu setzen. Durch die aktivierte Aggregation kommt es zu einer Abnahme der Dichte des PRP, die dann mit einem Dekoder wahrgenommen und als prozentuale Aggregation dargestellt werden kann.

Dieses Verfahren hat sich über viele Jahre als Goldstandard bei der Messung der Thrombozytenaktivität etabliert und wurde am Anfang in Studien zur Dosisfindung von Clopidogrel verwendet [68, 70, 98].

Die optische Aggregometrie hat jedoch den Nachteil sehr zeitaufwendig zu sein und macht daher den Einsatz in der täglichen klinischen Routine sehr schwierig [99]. Ursache für diesen enormen Zeitaufwand ist, wie oben beschrieben, die Herstellung von PRP und PPP.

Dafür sind zwei Zentrifugations- sowie einige Pipettiervorgänge notwendig. Mit der Herstellung der Induktoren und letztlich der Durchführung der eigentlichen Messung vergeht schnell eine Stunde bis das Ergebnis vorliegt.

Aus diesem Grund wäre ein einfaches, schnelles und standardisiertes Verfahren um die Clopidogrelwirkung auf die Plättchenfunktion zu messen, von enormem Vorteil. Derzeit kommen neben der optischen Aggregometrie auch andere Verfahren zum Einsatz, die Parameter der Thrombozytenfunktion in Vollblut messen [100-105].

Kurz vor Studienbeginn wurde eine neue Methode entwickelt, die MEA genannt wird und die eine schnelle Messung der Plättchenaggregation in Vollblut möglich macht [106]. Um die Thrombozytenfunktion in Vollblut zu bestimmen, arbeitet MEA nach dem Prinzip der Impedanzaggregometrie [107].

Der größte Vorteil des neuen Verfahrens MEA gegenüber der optischen Aggregometrie (LTA) besteht in dem Wegfall der Zentrifugationsschritte was zur Folge hat, dass das Ergebnis der Thrombozytenaggregation innerhalb von 10 Minuten vorliegt. Ein zweiter Vorteil ist, dass die zellulären Bestandteile im Blut unverändert bleiben. Allerdings war bisher nicht bekannt ob und wie gut die mit MEA erzielten Messergebnisse mit denen der LTA korrelieren.

1.8 Fragestellungen

1. Korrelieren die Messergebnisse des neuen Verfahrens „mehrfach Elektroden Aggregometrie“ (MEA) mit denen des Goldstandardverfahrens „optische Aggregometrie“ nach Born (LTA)?
2. Gibt es ein unterschiedliches Ansprechverhalten auf eine Loadingdosis von 600 mg Clopidogrel?

2 Methoden

2.1 Studienpopulation

Die Auswahl der Studienpopulation fand im Deutschen Herzzentrum der Technischen Universität in München im Zeitraum von August 2006 bis März 2007 statt. Sie bestand aus 149 Patienten (n=149) im Alter von 38-85 Jahren.

Davon waren 41% Frauen und 59% Männer. Bei 89 (n=89) von 149 (n=149) Patienten erfolgte nur eine Messung nach Clopidogrel-Loading, so dass eine vor Loading Messung und eine nach Loading Messung bei 60 Probanden (n=60) umgesetzt werden konnte. Bei allen 149 Patienten (n=149) wurde das Blut in Citratröhrchen abgenommen, bei der Population n=60 zusätzlich noch in Hirudinröhrchen.

Einschlusskriterien waren Patienten vor geplanter Herzkatheteruntersuchung, die eine 600 mg Clopidogrel „Loading-Dosis“ 2 Stunden vor dem Herzkatheter erhielten.

Ausschlusskriterien waren Blutbildveränderungen (besonders Thrombozytenzahlen $<100.000/\mu\text{l}$), Vorliegen einer hämatologischen und/oder malignen Erkrankung, orale Antikoagulation mit Cumarinderivaten, Therapie mit Glykoprotein IIb/IIIa-Antagonisten während der letzten 28 Tage vor Intervention, Therapie mit Clopidogrel während der letzten 28 Tage vor Intervention, Patienten mit akutem Koronarsyndrom und Patienten mit akutem Myokardinfarkt.

2.2 Studienprotokoll

Das Studienprotokoll wurde durch die Ethikkommission der Technischen Universität München genehmigt. Alle Teilnehmer haben eine Einverständniserklärung zur Teilnahme an der Studie unterschrieben.

2.3 Optische Aggregometrie nach Born (LTA)

2.3.1 Materialien

Vollblut/Blutplasma, Citratröhrchen (Sarstedt Monovette), Hirudinröhrchen (Sarstedt Monovette), Sammelröhrchen, Glaströhrchen, Eppendorf-Tubes, Rührmagnete, Pipetten (Eppendorf) mit passenden Spitzen, Zentrifuge, Vortex Mischer, ADP 2×10^{-4} Molar der Firma möLab, optisches 8-Kanal Aggregometer PAP8 der Firma möLab (Abbildung 8).



***Abbildung 8: Optisches 8-Kanal Aggregometer PAP8 der Firma möLab
(Quelle: Homepage der Firma möLab)***

2.3.2 Blutplasmagewinnung

Für die Blutplasmagewinnung wurden den Probanden jeweils 3 Citrat- und 2 Hirudinröhrchen Blut abgenommen. Die erste Blutentnahme (n=60) für die Messung vor Clopidogrelgabe wurde mittels Venenpunktion durchgeführt, die Zweite (n=149) erfolgte aus der Schleuse unmittelbar vor der Herzkatheteruntersuchung. Bei allen Blutentnahmen wurde das zuerst abgenommene Röhrchen verworfen und nicht für die Messung der Plättchenfunktion verwendet.

Da für die Messungen im 8- Kanal Aggregometer plättchenreiches (PRP) und plättchenarmes Plasma (PPP) benötigt wurden, mussten diese nacheinander hergestellt werden. Zuerst wurden die Vollblutproben (in den Citrat- und Hirudinröhrchen) für 10 Minuten bei Raumtemperatur und 750 U/min zentrifugiert (ohne Bremse). In den Röhrchen befanden sich unten die Erythrozyten, darüber eine dünne weiße Schicht mit Leukozyten (auch „Buffi Coat“ genannt) und als Oberstes das plättchenreiche Plasma. Das PRP aus den Citratröhrchen wurde in ein Sammelröhrchen abpipettiert, das der Hirudinröhrchen in ein Zweites.

Danach wurden die 3 Citrat- und 2 Hirudinröhrchen mit dem restlichen Inhalt erneut 10 Minuten mit 3000 U/min zentrifugiert. Bei diesem Durchgang mit aktivierter Bremse. Jetzt befanden sich in den Röhrchen unten die Erythrozyten, darüber der „Buffi Coat“ und als oberste Schicht das plättchenarme Plasma (PPP).

2.3.3 ADP-Herstellung

Als Agonist zur Stimulation der Thrombozytenaggregation kam Adenosin-5-diphosphat (ADP) der Firma möLab zum Einsatz, welches in Form einer Trockensubstanz mit einer Konzentration von 2×10^{-4} Molar in Fläschchen ausgeliefert wurden.

In die Trockensubstanz wurden zuerst 1000 µl PCR-Wasser pipettiert und gut durchmischt. So konnte die fertige Ausgangslösung mit 200 µM hergestellt werden. Nachdem die Messungen auch noch mit zwei weiteren Konzentrationen (20 µM und 5 µM) durchgeführt wurden, musste die Ausgangslösung noch weiter verdünnt werden. Um die 20 µMolare Lösung herzustellen, wurden 200 µl PCR-Wasser in einen Eppendorf-Tube vorgelegt und anschließend 200 µl der Ausgangslösung (200 µM) dazupipettiert. Die 5 µM Lösung wurde durch weiteres zugeben von 400 µl PCR-Wasser erhalten.

2.3.4 Durchführung der Messungen

Nach der Eingabe der Patientendaten wurde ein Testtube mit 250 µl plättchenarmem Plasma (PPP) für mindestens 2 Minuten in den auf 37°C vorgewärmten Testblock gestellt. Während dieser Zeit wurden die 6 Testtubes (3 für Plasma aus den Citratröhrchen und 3 für das Plasma aus den Hirudinröhrchen) für die eigentliche Messung vorbereitet, indem zuerst in jeden Tube ein Magnetrührer (1200 U/min im Testblock) vorgelegt und danach 225 µl plättchenreiches Plasma (PRP) hineinpipettiert wurden. Diese 6 Tubes kamen dann ebenfalls für 5 Minuten zum Vorwärmen in den Inkubationsblock.

Nach Ablauf der 2 Minuten wurde der Tube mit dem PPP nacheinander in die Öffnungen der 6 Messkanäle eingesetzt und der Wert für die 100% Lichtdurchlass ermittelt.

Nach Ablauf der 5 Minuten wurden die 6 Testtubes in die vorbereiteten Messkanäle eingesetzt und die Aufzeichnung der 0% Basislinie (0% Lichtdurchlass) gestartet. Nach Ablauf von 30 Sekunden, die abgewartet werden mussten um eine Spontanaggregation auszuschließen, wurden 5 µM oder 20 µM Induktor (ADP) in die Testtubes pipettiert [81, 98, 108-110].

Nach 6 Minuten stoppte die Messung automatisch. Die Messergebnisse wurden vom Gerät automatisch gespeichert und zur Dokumentation ausgedruckt (Abbildung 9).

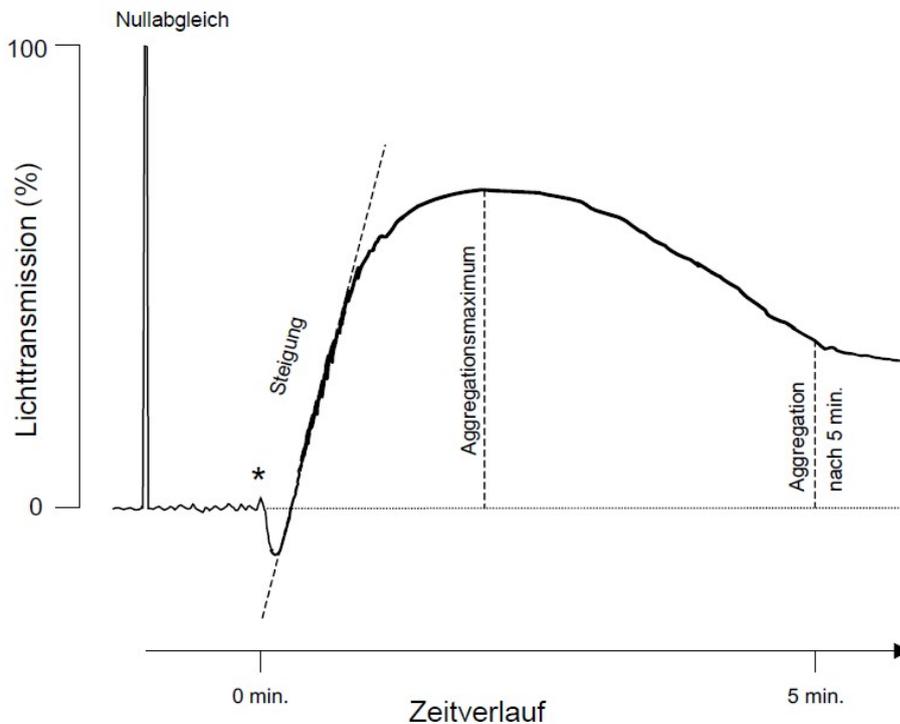


Abbildung 9: Aggregationsverlauf über die Zeit

(Quelle: Beate Coppola; Thrombozytenfunktion unter Einfluss der antithrombozytären Substanzen Ticlopidin und Clopidogrel; Dissertation 1. Medizinische Klinik und Poliklinik der Technischen Universität München Klinikum rechts der Isar; 2005)

Die Variationskoeffizienten (CV) für die mit LTA ermittelten Messergebnisse betragen 9,2%, 12,8%, 14,8% und 5,9%. Jeder dieser CV wurde aus 10 Messungen unterschiedlicher Proben eines Blutspenders errechnet. Bei den Spendern handelte es sich um zwei gesunde Freiwillige und zwei Patienten mit chronischer Clopidogreltherapie seit mehr als 10 Tagen.

2.4 Vollblutaggregometrie Multiplate (MEA)

2.4.1 Materialien

Vollblut, Blutentnahmeröhrchen (Tube von Dynabyte) die Hirudin als Antikoagulans enthalten, ADP 6,4 μ M, Multiplate Testzellen der Firma Dynabyte (Abbildung 11), Vollblutaggregometer Multiplate der Firma Dynabyte in München (Abbildung 10).



Abbildung 10: Vollblutaggregometer Multiplate der Firma Dynabyte (Quelle: Homepage der Firma Dynabyte München)



Abbildung 11: Multiplate Testzellen der Firma Dynabyte (Quelle: Homepage der Firma Dynabyte München)

2.4.2 Vollblutgewinnung

Bei der Vollblutgewinnung wurde den Probanden 2 Hirudinröhrchen Blut für die Messungen abgenommen. Die erste Blutentnahme (n=60) für die basale ADP-induzierte Aggregation vor Clopidogrelgabe wurde mittels Venenpunktion durchgeführt, die Zweite (n=149) erfolgte aus der Schleuse unmittelbar nach dem Legen. Bei allen Blutentnahmen wurde das zuerst abgenommene Röhrchen verworfen und nicht für die Messung der Plättchenfunktion verwendet.

2.4.3 Durchführung der Messungen

Parallel zu den Messungen mit der optischen Aggregometrie (LTA) wurden alle Teilnehmer der Studienpopulation (n=149) mit dem neuen Vollblutaggregometer gemessen [111-114].

Das Gerät mit dem Namen „Multiplate Analyzer“ wird von der Firma Dynabyte hergestellt und stellt 5 Kanäle für 5 gleichzeitige Messungen zur Verfügung. Die für die Messungen notwendigen Multiplate Testzellen, welche Einmalartikel sind, bestehen aus zwei unabhängigen Sensoreinheiten (Abbildung 12). Diese Sensoreinheiten wiederum bestehen aus zwei hoch leitfähigen versilberten Kupferkabeln mit einer Länge von 3,2 mm. Durch das Vorhandensein von zwei Sensoreinheiten erhält das Gerät pro Messvorgang zwei unabhängige Messergebnisse, sodass automatisch eine hohe Genauigkeit gewährleistet ist.

Der „Multiplate Analyzer“ basiert auf einer Weiterentwicklung der Impedanzaggregometrie, die erstmals 1979 von Cardinal et. al. beschrieben wurde. Es handelt sich dabei um ein Verfahren zur Thrombozytenfunktionsdiagnostik in Vollblut und basiert auf dem Prinzip der Messung von elektrischen Widerstandsänderungen zwischen zwei Elektroden [107]. Zu diesen Änderungen des elektrischen Widerstandes kommt es durch die Anlagerung von Thrombozyten an die Elektroden bei Stromfluss.

Zu Beginn der Messung befindet sich eine dünne Schicht aus Thrombozyten auf den Elektroden. Wird eine Aggregation induziert, lagern sich weitere Thrombozyten an die Elektroden an, was zu einer Widerstandszunahme und zu einer Reduzierung des Stromflusses zwischen den Elektroden führt. Diese Widerstandszunahme wird gemessen und gilt als Maß für die Aggregation. Es können sowohl plättchenreiches Plasma als auch Vollblut als Proben verwendet werden, wobei Vollblut einige Vorteile mit sich bringt.

Zum einen muss der Zeitvorteil angesprochen werden, da das Vollblut nicht zentrifugiert werden muss. Zum anderen gehen bei der Zentrifugation zelluläre Bestandteile des Blutes wie Leukozyten, Erythrozyten und auch große Thrombozyten verloren, sodass die Bedingungen nicht mehr mit denen in vivo vergleichbar sind. Als letzter Punkt muss die Beschädigung der Thrombozyten bei der Zentrifugation angesprochen werden. Dadurch kommt es zum Freisetzen von prokoagulatorischen Substanzen, was ebenfalls nicht den Bedingungen in vivo entspricht.

Nach der Verdünnung des mit Hirudin antikoagulierten Vollblutes (25µg/ml Refludan) im Verhältnis 1:2 mit 0,9% NaCl-Lösung, wurden die Proben in den Testküvetten bei 37°C für 3 Minuten im Testblock automatisch gerührt.

Im Anschluss daran konnte das ADP der Konzentration 6,4 µM dazu pipettiert, die Messung gestartet und konstant über 5 Minuten aufgezeichnet werden. Der Impedanzanstieg wird für jede Sensoreinheit getrennt gemessen.

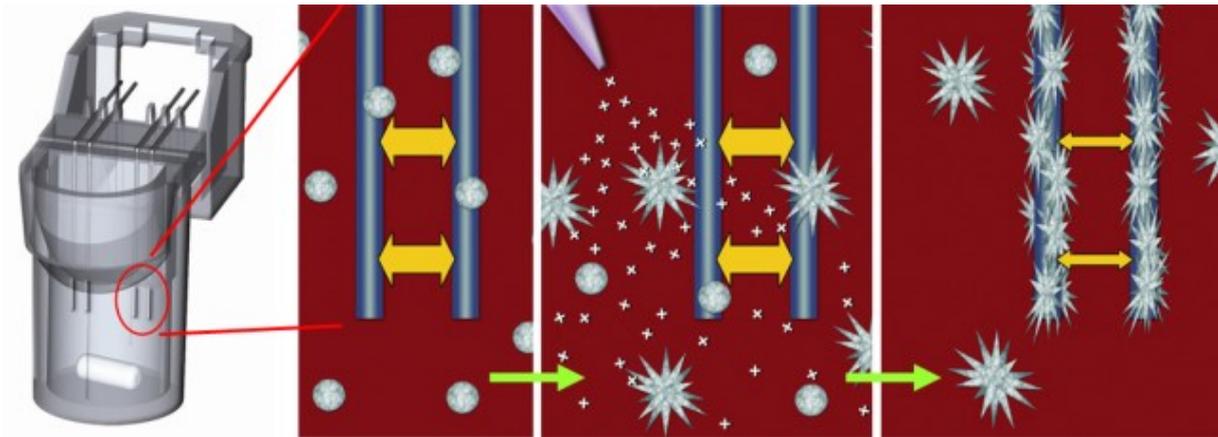


Abbildung 12: Meßzelle, schematische Darstellung der Thrombozytenanlagerung an die Sensoreinheit

(Quelle: Homepage der Firma Dynabyte München)

Die Abbildung 12 zeigt links eine Einmalmeßzelle mit den beiden unabhängigen Sensoreinheiten. Auf den 3 schematischen Zeichnungen rechts ist die Funktionsweise der Testzelle zu sehen. Das linke der drei Bilder zeigt die Thrombozyten, die sich im Ruhezustand nicht zusammenlagern. Auf dem mittleren Bild der Abfolge wird die Aktivierung der Thrombozyten durch Zugabe eines Agonisten gezeigt. Die Aktivierung erfolgt über die Rezeptoren auf der Oberfläche der Thrombozyten. Durch das Anlegen einer Spannung an die Elektroden kann jetzt die Anlagerung der Thrombozyten erfolgen, wie in dem rechten der 3 Bilder dargestellt ist.

Durch dieses Anlagern der Thrombozyten an den Elektroden kommt es zu einer Impedanzänderung, die von dem Gerät in „arbitrary Units“ (AU) umgerechnet wird und eine exakte, gegen die Zeit aufgetragene, graphische Darstellung ermöglicht, die dann auch ausgedruckt werden kann. Dabei entsprechen 8 AU in etwa 1 Ohm. Die mit dem Verfahren MEA gemessenen Ergebnisse werden immer in AU oder AUC (area under the curve) angegeben.

Alle zur Messung mit MEA benötigten Materialien wurden von der Firma Dynabyte in München bezogen, auch das 6,4 μM ADP. Diese Konzentration wurde als ideal vom Hersteller des Multiplate ermittelt und ist somit vorgegeben. Ein Vorteil dieser Konzentrationsvorgabe besteht in der besseren Vergleichbarkeit der Messergebnisse. Dadurch wird eine Standardisierung dieser Methode für den Benutzer erzielt.

Die Variationskoeffizienten (CV) für die mit MEA ermittelten Messergebnisse betragen 11,4%, 14,9%, 9,7% und 8,4%. Jeder dieser CV wurde aus 10 Messungen unterschiedlicher Proben eines Blutspenders errechnet. Bei den Spendern handelte es sich um zwei gesunde Freiwillige und zwei Patienten mit chronischer, länger als 10 Tage andauernder Clopidogreltherapie.

3 Ergebnisse

3.1 Statistische Analysen

Bei der Auswertung dieser Dissertation kommen einige Methoden der statistischen Analysen zum Einsatz auf die in der Folge kurz eingegangen wird.

3.1.1 Mittelwert

Die hier erhobenen Proben sind Vollerhebungen, alle Messwerte zählen zur Grundgesamtheit der Werte über welche argumentiert wird (im Gegensatz zu einer Stichprobe wie z.B. bei einer Wählerbefragung, wo nur ein kleiner Teil der Grundgesamtheit in die Betrachtungen eingeht).

Der „Mittelwert“ oder „mean“ errechnet sich indem die Summe der Einzelwerte durch die Anzahl der Einzelwerte geteilt wird:

$$\mu = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N x_i$$

3.1.2 Varianz

Die Streuung der Messwerte um den Mittelwert wird als Varianz (σ^2) der Messung bezeichnet:

$$\sigma^2 = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (x_i - \mu)^2$$

3.1.3 Standardabweichung

In diesem Zusammenhang wird in der Statistik häufig die Standardabweichung (σ) mit angegeben. Diese ist als Quadratwurzel aus der Varianz definiert:

$$\sigma = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (x_i - \mu)^2}$$

Die „Varianz“ einer Zufallsvariable X entspricht dem Streuungsmaß von X . Es handelt sich somit um ein Maß für die Abweichung einer Zufallsvariable X von ihrem Erwartungswert $E(X)$. Die Varianz ist stets ≥ 0 [115].

Im Gegensatz zur Varianz ist der „Variationskoeffizient“ (CV) ein relatives Streuungsmaß, was bedeutet, dass er nicht von der Maßeinheit der statistischen Variablen bzw. Zufallsvariablen abhängt. Hintergrund für dieses relative Streuungsmaß Variationskoeffizient ist, dass eine statistische Variable mit großem Mittelwert beziehungsweise eine Zufallsvariable mit großem Erwartungswert in der Regel eine größere Varianz aufweist als eine statistische Variable mit einem kleinen Mittelwert beziehungsweise mit einem kleinen Erwartungswert. Somit handelt es sich bei dem Variationskoeffizient um eine Normierung der Varianz. Sind die Werte für die Standardabweichung größer als der Mittelwert beziehungsweise größer als der Erwartungswert, entspricht dies einem Variationskoeffizient größer 1 [116].

3.1.4 Wilcoxon Test

Der „Wilcoxon-Test“ ist ein parameterfreier statistischer Test und dient der Signifikanzüberprüfung von Übereinstimmungen von zwei Verteilungen. Also ob zwei unabhängige Verteilungen A und B (z.B. eine unbeeinflusste und eine beeinflusste Verteilung) derselben Grundgesamtheit angehören [117].

3.1.5 Spearmans Rangkorrelationskoeffizient

Der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman ist ein parameterfreies Maß für Korrelationen. Er misst, wie gut eine beliebige monotone Funktion den Zusammenhang zwischen zwei Variablen beschreiben kann, ohne irgendwelche Annahmen über die Wahrscheinlichkeitsverteilung der Variablen zu machen. Die Daten werden in Ränge konvertiert, bevor der Korrelationskoeffizient berechnet werden kann. Somit geht der Spearmans Rangkorrelationskoeffizient von einer Gleichabständigkeit (= Äquidistanz) der Skalenwerte/Ränge aus [118].

3.2 Studienpopulation

Details der Studienkohorte	Anzahl/Mittelwert \pm Standardabweichung/%
Durchschnittsalter in Jahren \pm SD	66,0 \pm 10,0
Frauen (%)	41 (27,5)
Ejektionsfraktion (EF) in % \pm SD	59,7 \pm 4,6
Diabetes mellitus (%)	50 (33,6)
aktive Raucher (%)	25 (16,8)
arterielle Hypertonie (%)	133 (89,3)
Hypercholesterinämie (%)	115 (77,2)
KHK in der Familienanamnese (%)	64 (43,0)
Koronarintervention in der Vergangenheit (%)	72 (48,3)
Patienten mit Bypässen (%)	17 (11,4)
Patienten mit zurückliegendem Herzinfarkt (%)	38 (25,5)
Thrombozytenzahl x 100/L	204 \pm 60,3
Hb (g/dl)	13,1 \pm 1,5
Zeit nach Clopidogrel-Loading (h)	3,3 [2,0 - 6,0]
Medikation	
Aspirin (%)	106 (71,1)
Statine (%)	96 (64,4)
Betablocker (%)	95 (63,8)
ACE-Hemmer (%)	85 (57,0)
Diuretika (%)	54 (36,2)

Tabelle 2: Charakteristika der Patienten

(Alle Daten sind als Mittelwert \pm Standardabweichung in % dargestellt)

3.2.1 Bewertung der Clopidogrelantwort

Die Charakteristika der in der Studie eingeschlossenen Patienten sind in Tabelle 2 dargestellt. In der Untergruppe der Studienpopulation mit beiden Messungen (vor und nach Clopidogrelgabe) n=60 hat sich eine signifikante Hemmung der maximalen ADP-induzierten Plättchenaggregation mit LTA von 85,0% [70,0-97,0] auf 47,0% [35,0-56,5]; $P < 0,0001$ mit 5 μM ADP gezeigt. Analog dazu ergab sich bei der Plättchenaktivierung mit 20 μM ADP eine signifikante Hemmung von 88,0% [81,5-101,5] auf 50,5% [40,5-66,0]; $P < 0,0001$.

Dementsprechend resultierte bei MEA eine signifikante Reduktion der „arbitrary units“ (AU) von 650,5 AU*min [523,0-807,0] Ausgangswert auf 235,5 AU*min [145,0-429,5]; $P < 0,0001$ nach Clopidogrelgabe.

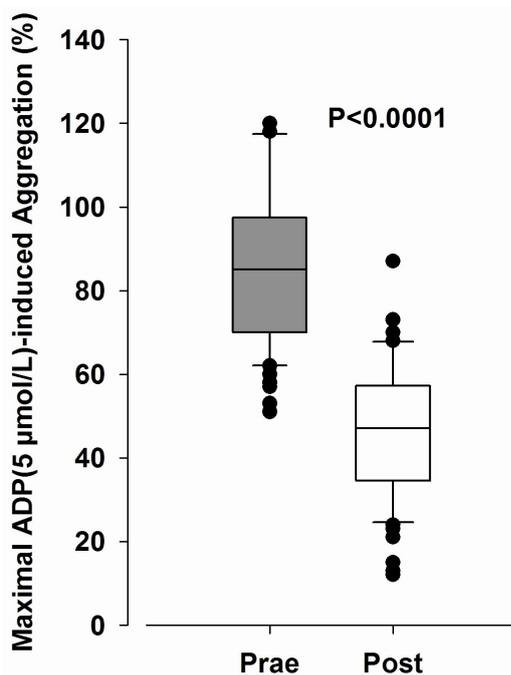


Abbildung 13: optische Aggregometrie nach Born (LTA)

(Quelle: Assessment of ADP-induced platelet aggregation with light transmission aggregometry and multiple electrode platelet aggregometry before and after clopidogrel treatment. *Thromb Haemost.* 2008 Jan; 99 (1): 121-126)

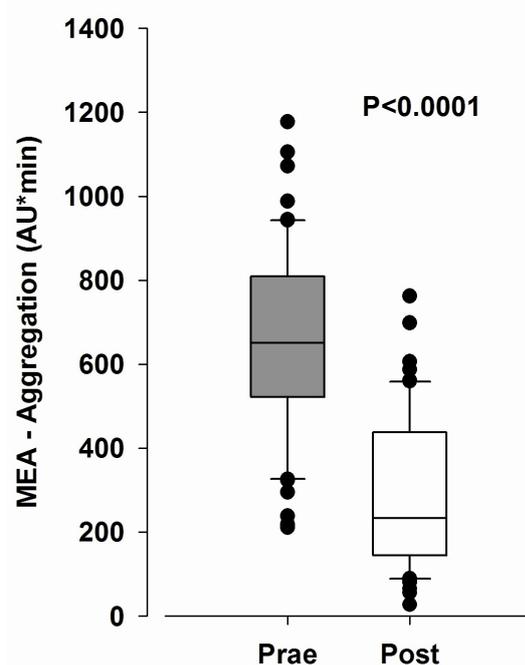


Abbildung 14: Vollblutaggregometrie Multiplate (MEA)

Die Abbildungen 13 und 14 zeigen jeweils eine Boxplot Analyse (n=60 Patienten) der optischen Aggregometrie (LTA) und der Vollblutaggregometrie (MEA). Die Boxen zeigen die 25. und 75. Perzentile; die Striche kennzeichnen die 10. und 90. Perzentile und die außerhalb liegenden Ergebnisse sind als Punkte dargestellt.

Die grauen Boxen zeigen die Messergebnisse vor der Clopidogrelgabe an, die weißen Boxen dagegen die Werte nach Clopidogrelgabe.

3.2.2 Korrelation der Messergebnisse von LTA und MEA

Die Abbildung 15 zeigt die Korrelation der Messergebnisse aller Patienten (n=149) die mit LTA (5 μ M und 20 μ M ADP) und mit MEA (AUC von arbitrary units) ermittelt wurden. Der daraus errechnete „Spearman rank correlation coefficient“ beträgt 0,71 und $P < 0,0001$. In der Untergruppe der Studien-population mit Messergebnissen vor und nach Clopidogrelgabe (n=60), ergibt sich ein „Spearman rank correlation coefficient“ von 0,66 und $P < 0,0001$. Zuletzt wurde noch der „Spearman rank correlation coefficient“ für gehemmte Plättchenaggregation (IPA) berechnet, welcher 0,46 und $P < 0,0001$ ist. Dieser IPA-Wert errechnet sich wie folgt:

$$\text{IPA} = (\text{Plättchenaggregation vor Clopidogrelgabe} - \text{Plättchenaggregation nach Clopidogrelgabe}) / \text{Plättchenaggregation vor Clopidogrelgabe} * 100.$$

Für diese Berechnungen fanden ebenfalls nur die mit 5 μ M ADP erzielten Ergebnisse bei LTA verwendung.

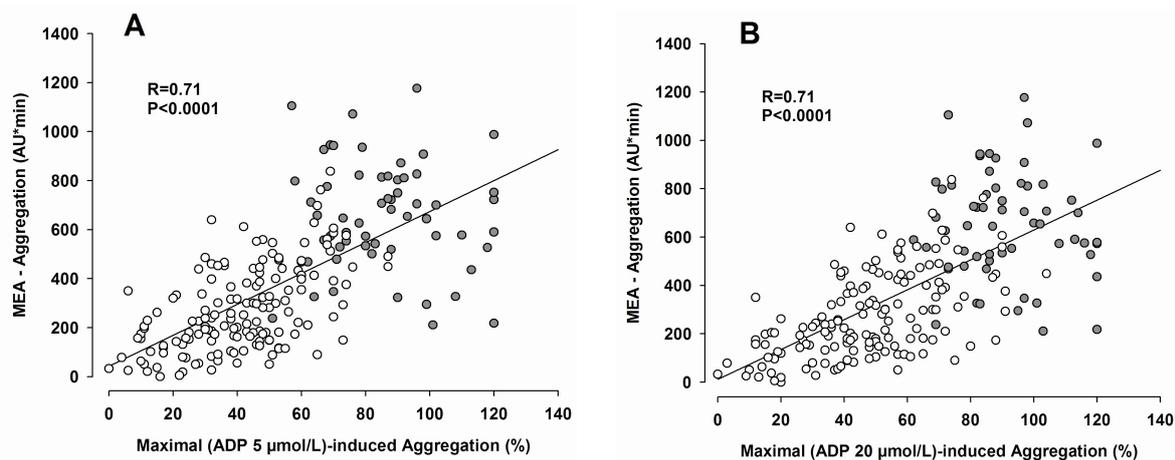


Abbildung 15: Messergebnisse

(Quelle: Assessment of ADP-induced platelet aggregation with light transmission aggregometry and multiple electrode platelet aggregometry before and after clopidogrel treatment. Thromb Haemost. 2008 Jan; 99 (1): 121-126)

Die Abbildung 15 zeigt die Punktwolke (n=149 Patienten) der mit ADP (5 µM und 20 µM) induzierten maximalen Aggregation für die Vollblutaggregometrie (MEA). Messergebnisse, die vor der Clopidogrelgabe gewonnen wurden, sind als graue Punkte dargestellt (n=60). Die weißen Punkte zeigen die Ergebnisse nach der Clopidogrelgabe (n=149).

3.2.3 Bewertung eines Low-Response auf Clopidogreltherapie mit LTA und MEA

In der Studienpopulation mit Messergebnissen vor und nach Clopidogrelgabe (n=60) wurde die Übereinstimmung zwischen LTA und MEA auf das Ansprechen auf Clopidogrel berechnet. Die Ergebnisbandbreite vom niedrigsten zum höchsten Wert wurde in 4 Quartilen unterteilt.

Für LTA ergaben sich somit Werte von 29,5% IPA, 40,9% IPA und 56,6% IPA, für MEA dagegen 41,9% IPA, 58,9% IPA und 72,5% IPA. Bei LTA waren es somit 15 Patienten, die dem untersten Viertel zuzuordnen sind.

Von diesen 15 Patienten waren 7 (47%) dabei, die auch bei MEA in dieses unterste Viertel fallen. Entsprechend den Messergebnissen mit LTA lassen sich die übrigen 45 Patienten dem 2. bis 4. Viertel zuordnen. Von diesen 45 Patienten waren es wiederum 37 (82%) die sich auch bei MEA im 2. bis 4. Viertel befinden.

Es hat sich gezeigt, dass mit der Messung der Plättchenaggregation nach Clopidogrelgabe die beste Voraussage über das klinische Endergebnis getroffen werden kann [101, 102, 119]. Deshalb wurde die Übereinstimmung im obersten Viertel der Messergebnisse, die mit LTA (mit 5 μ M ADP aktivierte Plättchenaggregation) und MEA ermittelt wurden, bei allen Patienten (n=149) nach Clopidogrelgabe berechnet. So ergaben sich Grenzwerte vom Niedrigsten zum Höchsten von 28,8%, 42,0% und 53,0% bei LTA und 145,5 AU*min, 229,0 AU*min und 398,5 AU*min bei MEA.

Bei LTA befanden sich 38 Patienten im obersten Viertel. Von diesen 38 waren 21 (55%) auch bei MEA im obersten Viertel. Die restlichen 111 Patienten konnten entsprechend der Messergebnisse mit LTA dem 1. bis 3. Viertel zugeordnet werden. Von diesen 111 Patienten befanden sich wiederum 94 (85%) auch bei MEA im 1. bis 3. Viertel.

3.2.4 Klinisches Outcome

Bei allen in der Studie beteiligten Patienten (n=149) kam es innerhalb der ersten 30 Tage nach Intervention nur zu einem größeren kardialen Zwischenfall. Dabei handelte es sich um einen Myokardinfarkt als Folge eines Verschlusses im Diagonalast. Eine Rekanalisation des Gefäßes war weder während der Koronarintervention noch zu einem späteren Zeitpunkt möglich. Dabei ist die Kreatinkinase auf 611U/l innerhalb von 24 Stunden nach Intervention angestiegen. Das MB-Isoenzym betrug 13%. Danach waren beide Werte wieder rückläufig. Bei diesem Patienten betrug die durch 5 μ M ADP induzierte Plättchenaggregation bei LTA 43%, bei MEA konnte ein Wert von 215 AUC gemessen werden.

4 Diskussion

Es handelt sich bei dieser wissenschaftlichen Arbeit um die erste Studie, bei der die Hemmung der Plättchenfunktion mittels Clopidogrel mit der als Goldstandard geltenden optischen Aggregometrie (LTA) und parallel dazu mit der damals neu auf dem Markt befindlichen Vollblutaggregometrie (MEA) gemessen wurde. Auch ein Vergleich dieser Messergebnisse und eine Korrelation wurde vorher noch nicht durchgeführt. Bisher war die optische Aggregometrie nach Born (LTA) das am häufigsten und zuverlässigste Verfahren, das in großangelegten prospektiven Studien zu Risikoabschätzung von thrombotischen Komplikationen nach Koronarintervention Anwendung fand [71, 81, 101, 102].

Das erste Hauptresultat besteht im Nachweis, dass das Verfahren mit MEA den Clopidogreleffekt erkennt.

Das zweite Hauptresultat ist der Nachweis, dass die mit MEA in Vollblut ermittelten Ergebnisse mit denen der LTA in plättchenreichem Plasma (PRP) korrelieren. Der berechnete Korrelationskoeffizient beträgt 0,71 und ist damit vergleichbar mit Korrelationskoeffizienten, die mit LTA und anderen alternativen Messverfahren errechnet wurden [120].

Zu diesen alternativen Verfahren gehört zum einen die Durchflusszytometrie, bei der die Phosphorylierung von durch Vasodilatoren stimulierten Phosphoprotein (VASP) gemessen wird (PLT VASP / P2Y12 der Firma Biocytex). Hier beträgt der Korrelationskoeffizient 0,66 [103].

Zum anderen der Bedsidetest „Verify Now“ (P2Y12 Kassetten der Firma Accumetrics), der die ADP- induzierte Aggregation in Vollblut misst. Der Korrelationskoeffizient dabei beträgt 0,73 [104].

Der Korrelationskoeffizient beider Methoden ist in der Untergruppe der Studienpopulation mit Messergebnissen vor- und nach Clopidogrelgabe (n=60) niedriger als in der gesamten Studienpopulation (n=149).

Bei der neuen Methode der Vollblutaggregometrie (MEA) führt die Adhäsion und Aggregation der Blutplättchen zu einem Impedanzanstieg. Das heißt, umso mehr Plättchen sich an die Elektroden anlagern, desto höher ist die Impedanz. Es gibt bei dieser Methode auch keine vom Hersteller festgelegte Obergrenze für die Messwerte.

Die Berechnung der relativen Plättchenhemmung ergab beim Methodenvergleich (MEA und LTA) einen Unterschied bei den Messergebnissen vor Clopidogrelgabe.

In einer anderen Studie haben Hochholzer et al verschiedene Vollblutverfahren miteinander verglichen.

Unter Anderem fand ein 4-Kanal Impedanzaggregometer (Chronolog Series 590) Verwendung [121]. Die Studienpopulation bestand dabei aus 27 Patienten. Wie auch in dieser Studie, wurde bei Hochholzer et al die Thrombozytenfunktion vor und nach einer einmaligen hochdosierten Clopidogrelgabe (loading Dosis) gemessen. Hochholzer et al kamen zu dem Ergebnis, dass die relative Plättchenhemmung (%) bei dem Vergleich beider Methoden (LTA und Impedanzaggregometer) nicht signifikant miteinander korrelieren. Der „Spearman rank correlation coefficient“ betrug bei der Impedanzaggregometrie 0,257, bei der LTA dagegen 0,196.

Bei einem weiteren Verfahren (ULTEGRA) ergab sich ein Korrelationskoeffizient von 0,135, im Vergleich dazu 0,504 mit LTA.

Die beiden vollblutaggregometrischen Verfahren Multiplate und Chronolog unterscheiden sich jedoch, was sich auch in den unterschiedlichen Studienergebnissen wieder spiegelt. Wie vom Hersteller empfohlen, wurde bei MEA mit Hirudin antikoaguliertes Vollblut verwendet. Hirudin bildet keine Kalziumkomplexe aus und hat somit einen enormen Vorteil gegenüber Citrat als Antikoagulans [106, 122, 123].

Erstens ist die durch Agonisten induzierte Plättchenaggregation in plättchenreichem Plasma (PRP), welches mit Citrat antikoaguliert wurde, abgeschwächt. Desweiteren ist das Fehlen von zweiwertigen Ionen bei citriertem Vollblut für einige Aspekte der Plättchenfunktion von enormer Bedeutung [122, 124].

Zweitens ist die zweite Welle der agonisteninduzierten Aggregation speziell in geringer Kalziumumgebung infolge vermehrter Thromboxanverbindungen gesteigert [125, 126].

In dieser Studie wurde Hirudin auch als Antikoagulans für die LTA verwendet. Das führte zu einer identischen Ionenkonzentration und somit zu einer idealen Voraussetzung für den Methodenvergleich von MEA und LTA.

Darüber hinaus arbeitet MEA mit Einwegtestzellen, die über doppelt angeordnete Impedanzsensoren verfügen [106]. Diese doppelt angeordneten Sensoren verschaffen dem System eine niedrige Fehlerrate und eine automatische Qualitätskontrolle bei jeder Messung. So werden von beiden Sensoren getrennt die Impedanz gemessen, der Korrelationskoeffizient ermittelt und die Flächen unter den Aggregationskurven (AUC) miteinander verglichen [111].

Messergebnisse, die außerhalb der Toleranz liegen, werden vom Gerät angezeigt. Dazu zählt ein Korrelationskoeffizient von $<0,98$ und eine Abweichung von $>20\%$ zu einer durchschnittlichen Kurve. Üblicherweise sind Einwegmesszellen im Vergleich zu wieder verwendbaren Messzellen, so wie sie meistens bei dem Chronolog-Aggregometer Verwendung finden, von Vorteil. Diese Aussage ist auch nahe liegend, da das mehrfache Auswaschen und Reinigen der Testzellen die Oberflächeneigenschaften der Elektroden verändern kann.

Eine elektronenmikroskopische Aufnahme zeigt in 2.000-facher Vergrößerung, wie die zusammengelagerten Blutplättchen nach einer Vollblutaggregation auf der Elektrodenoberfläche einer Multiplate Einwegtestzelle haften (Abbildung 16).

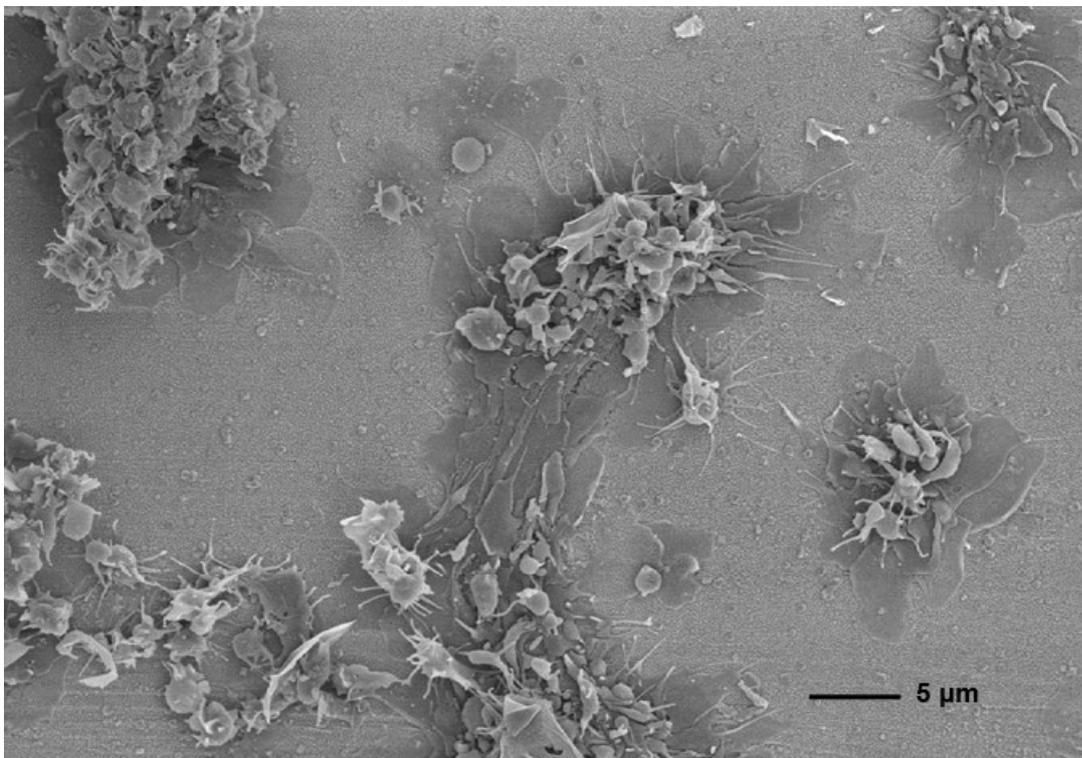


Abbildung 16: Elektronenmikroskopisches Bild von zusammengelagerten Blutplättchen nach einer Vollblutaggregation in 2.000-facher Vergrößerung (Quelle: freundlicherweise von PD Dr. Armin Reiningger zu Verfügung gestellt. Klinikum der Universität München, Abteilung für Hämostaseologie und Transfusionsmedizin)

Es ist durchaus möglich, dass auch eine gründliche Reinigung der Testzellen nicht zum vollständigen Entfernen der Blutplättchen von den Elektroden führen kann. Folglich können wieder verwendbare Messzellen das Testergebnis beeinflussen. Inzwischen werden aber auch Einwegmesszellen für das Chronolog-Aggregometer angeboten [119]. Trotzdem finden sie weitestgehend keine Anwendung.

Bei MEA werden die Messergebnisse als Fläche unter der Kurve (AUC) angegeben. Diese Fläche ergibt sich aus der maximalen Aggregation in Abhängigkeit von der Zeit. Im Allgemeinen hat die Messung der Plättchenfunktion in Vollblut mehrere Vorteile gegenüber der konventionellen optischen Aggregometrie (LTA) in plättchenreichem Plasma (PRP).

Der größte Vorteil ist sicher die Zeitersparnis bis zum Vorliegen des Messergebnisses. Diese wird durch den Wegfall der zeitaufwendigen Zentrifugationsschritte erreicht, die nötig sind, um plättchenarmes Plasma (PPP) und plättchenreiches Plasma (PRP) zu erhalten. Darüberhinaus ist plättchenreiches Plasma (PRP) im Vergleich zu der physiologischen Umgebung ein unnatürliches Milieu, in dem Erythrozyten, Leukozyten und größere Thrombozytenuntergruppen fehlen. Diese beeinflussen jedoch die Messung der Thrombozytenaggregation [127].

Bei MEA findet die Aggregation an der Oberfläche der Elektroden statt, im Unterschied dazu in einer flüssigen Lösung bei LTA. Physiologischer Weise findet die Koagulation der Thrombozyten im Organismus an Oberflächen wie Plaques oder Gefäßwanddefekten statt. Nur unter besonderen Umständen findet die Koagulation in flüssiger Lösung statt. Als Beispiele sind hier die „disseminierte intravaskuläre Koagulopathie“ (DIC) und die „Heparin induzierte Thrombozytopenie“ (HIT) vom Typ II zu nennen.

Aufgrund dieser elementaren Unterschiede zwischen MEA und LTA können die Messergebnisse zwar miteinander verglichen werden, sind aber nicht als gleichwertig anzusehen. Unklar ist jedoch, ob die mit MEA erhaltenen Messergebnisse eine größere Relevanz für das Outcome der Patienten nach perkutaner Koronarintervention (PCI) haben.

Abschließend kann gesagt werden, dass MEA eine standardisierte und schnelle Methode ist, um die individuelle Thrombozytenfunktion vor- und nach einer Clopidogrelgabe zu messen.

MEA kann auch dazu dienen, Patienten mit bevorstehender elektiver Koronarintervention (PCI) oder einem akuten Koronarsyndrom einem antithrombozytären Therapieschema zuzuordnen.

Überzeugende Daten, die prognostische Aussagen in Bezug auf die Messung der Thrombozytenfunktion bei Clopidogrelbehandlung zulassen, existierten jedoch lange Zeit nur für die optische Aggregometrie nach Born (LTA) in plättchenreichem Plasma (PRP) [68, 70, 71, 74, 81, 108].

Bei neueren wissenschaftlichen Arbeiten wie beispielsweise der Nebenstudie der TROPICAL-ACS Studie bewerteten Aradi et al das Blutungs- und Thromboserisiko bei Patienten in Bezug auf eine hohe oder niedrige Plättchenreaktivität (HPR/LPR) durch ADP. Verglichen wurde eine Gruppe, bei der alle Patienten mit Prasugrel behandelt wurden mit einer zweiten Gruppe, die entsprechend des Ergebnisses nach einer Plättchenfunktionsmessung mit MEA entweder Clopidogrel oder Prasugrel erhalten haben. Es zeigte sich, dass Patienten mit einer hohen Plättchenreaktivität (HPR) ein erhöhtes Risiko für thrombotische Ereignisse und Patienten mit einer niedrigen Plättchenaktivität (LPR) ein erhöhtes Blutungsrisiko hatten. Zusammenfassend ergab die Eskalation der Clopidogreltherapie bei ACS-Patienten mit dem potenteren Thienopyridin Prasugrel ein ähnliches Ergebnis wie bei Patienten ohne HPR unter Clopidogreltherapie.

Umgekehrt zeigte sich ein erhöhtes Blutungsrisiko bei Patienten mit einer niedrigen Plättchenreaktivität (LPR) unabhängig davon, ob sie mit Clopidogrel oder Prasugrel behandelt wurden [128].

Durch diesen wissenschaftlichen Stellenwert der MEA ergeben sich neue Therapieansätze um sowohl das Thromboserisiko als auch das Blutungsrisiko nach Koronarinterventionen zu minimieren.

Neben der Phänotypisierung mit Messung der Plättchenreaktivität (HPR/LPR) ist auch die Genotypisierung durch Feststellung der Funktion des CYP2C19 Allel von Bedeutung.

In Studien konnte gezeigt werden, dass die Verwendung von potenteren Thienopyridinen wie beispielsweise Prasugrel im Vergleich zu Clopidogrel zu einem besseren Outcome hinsichtlich thrombotischer Ereignisse bei Patienten mit hoher Plättchenreaktivität (HPR) oder funktionslosem CYP2C19 Allel geführt hat.

Entsprechend zeigte sich ein niedriges Risiko für thrombotische Ereignisse und Blutungskomplikationen nach Clopidogrelbehandlung bei Patienten ohne eine hohe Plättchenreaktivität (HPR) oder funktionslosem CYP2C19 Allel [25, 86, 129].

Die Erlangung der Gültigkeit im klinischen Alltag war nicht die Zielsetzung der vorliegenden Studie. Die Größe der Studienpopulation dieser wissenschaftlichen Arbeit ist viel zu klein um ausreichend zu analysieren, ob die Messergebnisse, die mit MEA und LTA zum Zeitpunkt der Koronarintervention (PCI) erzielt wurden, eine Voraussage auf mögliche thrombotische Zwischenfälle nach der Intervention (PCI) zulassen.

Ob die Information über den Nutzen von Clopidogrel, die mit Hilfe von MEA erzielt wurde, genauso- oder sogar mehr Aussagekraft als die mit LTA gewonnene in Bezug auf das Vorkommen von thrombotischen Zwischenfällen nach einer Koronarintervention (PCI) hat, muss in einer speziellen groß-angelegten Studie geklärt werden.

Auch andere Forschungsgruppen wie zum Beispiel Aradi et al oder Bernlochner et al beschäftigten sich mit der Rolle der Plättchenfunktionstestung bei Patienten die eine Koronarintervention erhalten [130, 131].

5 Weitere wissenschaftliche Arbeit

5.1 Beschreibung

Neben der vorliegenden Studie wurde noch eine weitere wissenschaftliche Arbeit mit dem Titel „Auswirkungen von Bivalirudin oder unfraktioniertem Heparin auf die Thrombozytenaggregation während einer elektiven Koronarintervention bei mit 600 mg Clopidogrel vorbehandelten Patienten“ realisiert, bei der ebenfalls das neue vollblutaggregometrische Verfahren „MEA“ zum Einsatz kam.

Untersucht wurde der Einfluß von Bivalirudin und unfraktioniertem Heparin auf die Plättchenaggregation während einer geplanten Koronarintervention (PCI) bei Patienten, die eine einmalige vorherige Gabe von 600 mg Clopidogrel erhalten hatten. Die Studienpopulation dieser als doppelblind angelegten Arbeit umfasste 100 (n=100) Patienten. Die erste Blutentnahme fand unmittelbar vor der Koronarintervention (PCI) statt. Während des Eingriffs erhielten die Probanden, dann entweder Bivalirudin oder unfraktioniertes Heparin.

Nach Beendigung der Intervention fand die zweite Blutentnahme statt, eine Dritte dann nach 24 Stunden. Auch bei dieser Studie wurde die mit ADP aktivierte Thrombozytenaggregation sowohl mit der herkömmlichen optischen Aggregometrie nach Born (LTA) als auch mit der neuartigen Vollblutaggregometrie (MEA) gemessen.

Bei der Messung vor der Koronarintervention (PCI) ergaben sich für die ADP-induzierte Plättchenaggregation ähnliche Werte in der gesamten Studienpopulation (P=0,99 mit LTA; P=0,28 mit MEA).

Die Subpopulation, die mit Bivalirudin während der Intervention behandelt wurden, zeigten eine signifikante Hemmung der Thrombozytenaggregation bei der zweiten Blutentnahme ($P=0,012$ mit LTA; $P=0,008$ mit MEA).

Keinen signifikanten Einfluss auf die Aggregation der Blutplättchen hatte dagegen die Gabe des unfraktionierten Heparins während der Koronarintervention (PCI) ($P=0,42$ mit LTA; $P=0,78$ mit MEA).

Bei der dritten Messung 24 Stunden nach der Intervention war die Thrombozytenaggregation in beiden Populationen wieder ähnlich ($P>0,05$ mit LTA und MEA).

5.2 Ergebnis der Studie

Die Gabe von Bivalirudin während einer Koronarintervention bei Patienten, die mit 600mg Clopidogrel vorbehandelt sind, führt zu einer verstärkten Hemmung der Thrombozytenaggregation. Eine Anwendung von unfraktioniertem Heparin erbringt dagegen zu den 600 mg Clopidogrel keine zusätzliche Hemmung der Plättchenaggregation.

6 Zusammenfassung

Wissenschaftliche Studien haben gezeigt, dass das Maß der Thrombozytenaggregation eine Vorhersage über das klinische Outcome zulässt.

Für Messungen dieser Art fand bisher das Goldstandardverfahren optische Aggregometrie nach Born (LTA) in plättchenreichem Plasma Verwendung. Dieses Verfahren (LTA) ist allerdings sehr zeitaufwendig und wenig standardisiert.

Daher wäre ein schnelles und standardisiertes Verfahren zur Messung der Plättchenfunktion nach einer Clopidogrelgabe für den klinischen Gebrauch von enormem Vorteil.

Vor Studienbeginn kam ein damals neu entwickeltes Verfahren namens „mehrfach Elektroden Aggregometrie“ (MEA) zur Messung der Thrombozytenaggregation in Vollblut auf den Markt.

Das Ziel dieser Studie lag in der Bewertung und im Vergleich der Thrombozytenfunktion nach Gabe einer 600 mg Loadingdosis Clopidogrel gemessen mit LTA und MEA.

Bei dieser Studie wurden Blutproben von 149 Patienten untersucht, die einer elektiven Koronarangiographie zugeführt und mit 600 mg Clopidogrel-Loading vorbehandelt wurden. Bei 60 dieser Patienten erfolgte zusätzliche noch eine weitere Messung vor dem Loading.

In Vitro wurde die Thrombozytenaggregation mit Adenosindiphosphat (ADP) ausgelöst und mit LTA und MEA gemessen.

Es zeigte sich bei dem neuen Verfahren MEA eine signifikante Reduktion der Plättchenhemmung nach der Clopidogrelbehandlung ($P < 0,0001$).

Bei dem Vergleich von LTA und MEA ergab sich eine deutliche Korrelation der beiden Verfahren bei der Messung der ADP-induzierten Thrombozytenaggregation („Spearman rank correlation coefficient“ von 0,71 und $P < 0,0001$).

Es konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass das neue Verfahren MEA den Clopidogreleffekt erkennt und dass die mit dem schnellen und standardisierten Verfahren MEA gemessenen Werte der Thrombozytenaggregation vor und nach Clopidogrelgabe mit den durch LTA gemessenen Werten korrelieren.

7 Literaturverzeichnis

1. *Pressemitteilung Nr. 344*, in *Statistisches Bundesamt Deutschland*. 2009.
2. Assmann, G., Schulte, H. and Cullen, P., *New and classical risk factors--the Munster heart study (PROCAM)*. *Eur J Med Res*, 1997. 2(6): p. 237-42.
3. Forßmann, W., *Die Sondierung des rechten Herzens*. *Klinische Wochenschrift* 8. Jahrgang Nr. 45, 1929: p. 2085-2087.
4. www2.hu-berlin.de.
5. Judkins, M.P., *Selective coronary arteriography. I. A percutaneous transfemoral technic*. *Radiology*, 1967. 89(5): p. 815-24.
6. Dotter, C.T., Judkins, M.P., *Transluminal Treatment of Arteriosclerotic Obstruction. Description of a New Technic and a Preliminary Report of Its Application*. *Circulation*, 1964. 30: p. 654-70.
7. Gruntzig, A., *Transluminal dilatation of coronary-artery stenosis*. *Lancet*, 1978. 1(8058): p. 263.
8. www.herz-cardiovascular-diseases.de.
9. Tavakol, M., Ashraf, S., Brener, S.J., *Risks and complications of coronary angiography: a comprehensive review*. *Glob J Health Sci*, 2012. 4(1): p. 65-93.
10. Leon, M.B., Baim, D.S., Popma, J.J., Gordon, P.C., Cutlip, D.E., Ho, K.K., Giambartolomei, A., Diver, D.J., Lasorda, D.M., Williams, D.O., Pocock, S.J., Kuntz, R.E., *A clinical trial comparing three antithrombotic-drug regimens after coronary-artery stenting. Stent Anticoagulation Restenosis Study Investigators*. *N Engl J Med*, 1998. 339(23): p. 1665-71.
11. Steinhubl, S.R., Berger, P.B., Mann, J.T. 3rd, Fry, E.T., DeLago, A., Wilmer, C., Topol, E.J., *Early and sustained dual oral antiplatelet therapy following percutaneous coronary intervention: a randomized controlled trial*. *JAMA*, 2002. 288(19): p. 2411-20.
12. Schömig, A., Neumann, F.J., Kastrati, A., Schühlen, H., Blasini, R., Hadamitzky, M., Walter, H., Zitzmann-Roth, 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*, 1996. 334(17): p. 1084-9.
13. Gawaz, M., Neumann, F.J., Ott, I., May, A., Schömig, A., *Platelet activation and coronary stent implantation. Effect of antithrombotic therapy*. *Circulation*, 1996. 94(3): p. 279-85.

14. Collet, J.P., Thiele, H., Barbato, E., Barthélémy, O., Bauersachs, J., Bhatt, D.L., Dendale, P., Dorobantu, M., Edvardsen, T., Folliguet, T., Gale, C.P., Gilard, M., Jobs, A., Jüni, P., Lambrinou, E., Lewis, B.S., Mehilli, J., Meliga, E., Merkely, B., Mueller, C., Roffi, M., Rutten, F.H., Sibbing, D., Siontis, G.C.M., *2020 ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation*. Eur Heart J, 2021. 42(14): p. 1289-1367.
15. Kastrati, A., Neumann, F.J., Schulz, S., Massberg, S., Byrne, R.A., Ferenc, M., Laugwitz, K.L., Pache, J., Ott, I., Hausleiter, J., Seyfarth, M., Gick, M., Antoniucci, D., Schömig, A., Berger, P.B., Mehilli, J., *Abciximab and heparin versus bivalirudin for non-ST-elevation myocardial infarction*. N Engl J Med, 2011. 365(21): p. 1980-9.
16. Kastrati, A., Neumann, F.J., Mehilli, J., Byrne, R.A., Iijima, R., Büttner, H.J., Khatlab, A.A., Schulz, S., Blankenship, J.C., Pache, J., Minners, J., Seyfarth, M., Graf, I., Skelding, K.A., Dirschinger, J., Richardt, G., Berger, P.B., Schömig, A., *Bivalirudin versus unfractionated heparin during percutaneous coronary intervention*. N Engl J Med, 2008. 359(7): p. 688-96.
17. Cassese, S., Byrne, R.A., Laugwitz, K.L., Schunkert, H., Berger, P.B., Kastrati, A., *Bivalirudin versus heparin in patients treated with percutaneous coronary intervention: a meta-analysis of randomised trials*. EuroIntervention, 2015. 11(2): p. 196-203.
18. Erlinge, D., Omerovic, E., Fröbert, O., Linder, R., Danielewicz, M., Hamid, M., Swahn, E., Henareh, L., Wagner, H., Hårdhammar, P., Sjögren, I., Stewart, J., Grimfjärd, P., Jensen, J., Aasa, M., Robertsson, L., Lindroos, P., Haupt, J., Wikström, H., Ulvenstam, A., Bhiladvala, P., Lindvall, B., Lundin, A., Tödt, T., Ioanes, D., Råmunddal, T., Kellerth, T., Zagozdzon, L., Götberg, M., Andersson, J., Angerås, O., Östlund, O., Lagerqvist, B., Held, C., Wallentin, L., Scherstén, F., Eriksson, P., Koul, S., James, S., *Bivalirudin versus Heparin Monotherapy in Myocardial Infarction*. N Engl J Med, 2017. 377(12): p. 1132-1142.
19. Valgimigli, M., Frigoli E, Leonardi, S., Rothenbühler, M., Gagnor, A., Calabrò, P., Garducci, S., Rubartelli, P., Briguori, C., Andò, G., Repetto, A., Limbruno, U., Garbo, R., Sganzerla, P., Russo, F., Lupi, A., Cortese, B., Ausiello, A., Ierna, S., Esposito, G., Presbitero, P., Santarelli, A., Sardella, G., Varbella, F., Tresoldi, S., de Cesare, N., Rigattieri, S., Zingarelli, A., Tosi, P., van 't Hof, A., Boccuzzi, G., Omerovic, E., Sabaté, M., Heg, D., Jüni, P., Vranckx, P., *Bivalirudin or Unfractionated Heparin in Acute Coronary Syndromes*. N Engl J Med, 2015. 373(11): p. 997-1009.

20. Zhang, S., Gao, W., Li, H., Zou, M., Sun, S., Ba, Y., Liu, Y., Cheng, G., *Efficacy and safety of bivalirudin versus heparin in patients undergoing percutaneous coronary intervention: A meta-analysis of randomized controlled trials*. Int J Cardiol, 2016. 209: p. 87-95.
21. Nührenberg, T.G., Hochholzer, W., Mashayekhi, K., Ferenc, M., Neumann, F.J., *Efficacy and safety of bivalirudin for percutaneous coronary intervention in acute coronary syndromes: a meta-analysis of randomized-controlled trials*. Clin Res Cardiol, 2018. 107(9): p. 807-815.
22. Ducrocq, G., Schulte, P.J., Budaj, A., Cornel, J.H., Held, C., Himmelmann, A., Husted, S., Storey, R.F., Cannon, C.P., Becker, R.C., James, S.K., Katus, H.A., Lopes, R.D., Sorbets, E., Wallentin, L., Steg, P.G., *Balancing the risk of spontaneous ischemic and major bleeding events in acute coronary syndromes*. Am Heart J, 2017. 186: p. 91-99.
23. Aradi, D., Kirtane, A., Bonello, L., Gurbel, P.A., Tantry, U.S., Huber, K., Freynhofer, M.K., ten Berg, J., Janssen, P., Angiolillo, D.J., Siller-Matula, J.M., Marcucci, R., Patti, G., Mangiacapra, F., Valgimigli, M., Morel, O., Palmerini, T., Price, M.J., Cuisset, T., Kastrati, A., Stone, G.W., Sibbing, D., *Bleeding and stent thrombosis on P2Y12-inhibitors: collaborative analysis on the role of platelet reactivity for risk stratification after percutaneous coronary intervention*. Eur Heart J, 2015. 36(27): p. 1762-71.
24. Sibbing, D., Kastrati, A., Berger, P.B., *Pre-treatment with P2Y12 inhibitors in ACS patients: who, when, why, and which agent?* Eur Heart J, 2016. 37(16): p. 1284-95.
25. Galli, M., Benenati, S., Capodanno, D., Franchi, F., Rollini, F., D'Amario, D., Porto, I., Angiolillo, D.J., *Guided versus standard antiplatelet therapy in patients undergoing percutaneous coronary intervention: a systematic review and meta-analysis*. Lancet, 2021. 397(10283): p. 1470-1483.
26. Ruggeri, Z.M., *New insights into the mechanisms of platelet adhesion and aggregation*. Semin Hematol, 1994. 31(3): p. 229-39.
27. Ruggeri, Z.M., *Platelet and von Willebrand factor interactions at the vessel wall*. Hamostaseologie, 2004. 24(1): p. 1-11.
28. Gaarder, A., Jonsen, J., Laland, S., Hellem, A., Owren, P.A., *Adenosine diphosphate in red cells as a factor in the adhesiveness of human blood platelets*. Nature, 1961. 192: p. 531-2.
29. Holmsen, H., Weiss, H.J., *Hereditary defect in the platelet release reaction caused by a deficiency in the storage pool of platelet adenine nucleotides*. Br J Haematol, 1970. 19(5): p. 643-9.
30. Fabre, J.E., Nguyen, M., Latour, A., 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, 1999. 5(10): p. 1199-202.

31. Remijn, J.A., Wu, Y.P., Jeninga, E.H., IJsseldijk, M.J.W., van Willigen, G., de Groot, P.G., Sixma, J.J., Nurden, A.T., Nurden, P., *Role of ADP receptor P2Y(12) in platelet adhesion and thrombus formation in flowing blood*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2002. 22(4): p. 686-91.
32. 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 human platelets*. *J Biol Chem*, 1998. 273(4): p. 2024-9.
33. 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., *Identification of the platelet ADP receptor targeted by antithrombotic drugs*. *Nature*, 2001. 409(6817): p. 202-7.
34. 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 Jr, F.J., *ADP is the cognate ligand for the orphan G protein-coupled receptor SP1999*. *J Biol Chem*, 2001. 276(11): p. 8608-15.
35. Valera, S., Hussy, N., Evans, R.J., Adami, N., North, R.A., Surprenant, A., Buell, G., *A new class of ligand-gated ion channel defined by P2x receptor for extracellular ATP*. *Nature*, 1994. 371(6497): p. 516-9.
36. Clifford, E.E., Parker, K., Humphreys, B.D., Kertesy, 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*, 1998. 91(9): p. 3172-81.
37. 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*, 2001. 85(2): p. 303-8.
38. Gachet, C., Hechler, B., Léon, C., Vial, C., Leray, C., Ohlmann, P., Cazenave, J.P., *Activation of ADP receptors and platelet function*. *Thromb Haemost*, 1997. 78(1): p. 271-5.
39. Brass, L.F., Manning, D.R., Cichowski, K., Abrams, C.S., *Signaling through G proteins in platelets: to the integrins and beyond*. *Thromb Haemost*, 1997. 78(1): p. 581-9.
40. Ralevic, V., Burnstock, G., *Receptors for purines and pyrimidines*. *Pharmacol Rev*, 1998. 50(3): p. 413-92.
41. Leon, C., Hechler, B., Vial, C., Leray, C., Cazenave, J.P., Gachet, C., *The P2Y1 receptor is an ADP receptor antagonized by ATP and expressed in platelets and megakaryoblastic cells*. *FEBS Lett*, 1997. 403(1): p. 26-30.
42. Palmer, R.K., Boyer, J.L., Schachter, J.B., Nicholas, R.A., Harden, T.K., *Agonist action of adenosine triphosphates at the human P2Y1 receptor*. *Mol Pharmacol*, 1998. 54(6): p. 1118-23.
43. 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*, 1998. 273(4): p. 2030-4.

44. Mills, D.C., *ADP receptors on platelets*. Thromb Haemost, 1996. 76(6): p. 835-56.
45. Fuster, V., Badimon, L., Badimon, J.J., Chesebro, J.H., *The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes (1)*. N Engl J Med, 1992. 326(4): p. 242-50.
46. Massberg, S., Schulz, C., Gawaz, M., *Role of platelets in the pathophysiology of acute coronary syndrome*. Semin Vasc Med, 2003. 3(2): p. 147-62.
47. Gawaz, M., Neumann, F.J., Ott, I., May, A., Rüdiger, S., Schömig, A., *Changes in membrane glycoproteins of circulating platelets after coronary stent implantation*. Heart, 1996. 76(2): p. 166-72.
48. Gawaz, M., Neumann, F.J., Ott, I., May, A., Rüdiger, S., Schömig, A., *Role of activation-dependent platelet membrane glycoproteins in development of subacute occlusive coronary stent thrombosis*. Coron Artery Dis, 1997. 8(3-4): p. 121-8.
49. Cutlip, D.E., Baim, D.S., Ho, K.K., Popma, J.J., Lansky, A.J., Cohen, D.J., Carrozza Jr, J.P., Chauhan, M.S., Rodriguez, O., Kuntz, R.E., *Stent thrombosis in the modern era: a pooled analysis of multicenter coronary stent clinical trials*. Circulation, 2001. 103(15): p. 1967-71.
50. Kushner, F.G., Hand, M., Smith Jr, S.C., King 3rd, S.B., Anderson, J.L., Antman, E.M., Bailey, S.R., Bates, E.R., Blankenship, J.C., Casey Jr, D.E., Green, L.A., Hochman, J.S., Jacobs, A.K., Krumholz, H.M., Morrison, D.A., Ornato, J.P., Pearle, D.L., Peterson, E.D., Sloan, M.A., Whitlow, P.L., Williams, D.O., *2009 Focused Updates: ACC/AHA Guidelines for the Management of Patients With ST-Elevation Myocardial Infarction (updating the 2004 Guideline and 2007 Focused Update) and ACC/AHA/SCAI Guidelines on Percutaneous Coronary Intervention (updating the 2005 Guideline and 2007 Focused Update): a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines*. Circulation, 2009. 120(22): p. 2271-306.
51. Yusuf, S., Zhao, F., Mehta, S.R., Chrolavicius, S., Tognoni, G., Fox, K.K., *Effects of clopidogrel in addition to aspirin in patients with acute coronary syndromes without ST-segment elevation*. N Engl J Med, 2001. 345(7): p. 494-502.
52. Steinhubl, S.R., Charnigo, R., *Clopidogrel treatment prior to percutaneous coronary intervention: when enough isn't enough*. JAMA, 2006. 295(13): p. 1581-2.
53. Mackie, I.J., Neal, C.R., *The Platelet. Platelet-vessel wall interactions (The Bloomsbury Series in clinical science)*. 1988, Springer Verlag: Berlin. p. 1-32.

54. Bertrand, M.E., Rupprecht, H.J., Urban, P., Gershlick, A.H., *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*, 2000. 102(6): p. 624-9.
55. Gurbel, P.A., Bliden, K.P., Hiatt, B.L., O'Connor, C.M., *Clopidogrel for coronary stenting: response variability, drug resistance, and the effect of pretreatment platelet reactivity*. *Circulation*, 2003. 107(23): p. 2908-13.
56. Sibbing, D., Aradi, D., Alexopoulos, D., Ten Berg, J., Bhatt, D.L., Bonello, L., Collet, J.P., Cuisset, T., Franchi, F., Gross, L., Gurbel, P., Jeong, Y.H., Mehran, R., Moliterno, D.J., Neumann, F.J., Pereira, N.L., Price, M.J., Sabatine, M.S., So, D.Y.F., Stone, G.W., Storey, R.F., Tantry, U., Trenk, D., Valgimigli, M., Waksman, R., Angiolillo, D.J., *Updated Expert Consensus Statement on Platelet Function and Genetic Testing for Guiding P2Y12 Receptor Inhibitor Treatment in Percutaneous Coronary Intervention*. *JACC Cardiovasc Interv*, 2019. 12(16): p. 1521-1537.
57. Costa, F., van Klaveren, D., James, S., Heg, D., Räber, L., Feres, F., Pilgrim, T., Hong, M., Kim, H., Colombo, A., Steg, P.G., Zanchin, T., Palmerini, T., Wallentin, L., Bhatt, D.L., Stone, G.W., Windecker, S., Steyerberg, E.W., Valgimigli, M., *Derivation and validation of the predicting bleeding complications in patients undergoing stent implantation and subsequent dual antiplatelet therapy (PRECISE-DAPT) score: a pooled analysis of individual-patient datasets from clinical trials*. *Lancet*, 2017. 389(10073): p. 1025-1034.
58. Abu-Assi, E., Raposeiras-Roubin, S., Lear, P., Cabanas-Grandío, P., Gironde, M., Rodríguez-Cordero, M., Pereira-López, E., Romani, S.G., González-Cambeiro, C., Alvarez-Alvarez, B., García-Acuña, J.M., González-Juanatey, J.R., *Comparing the predictive validity of three contemporary bleeding risk scores in acute coronary syndrome*. *Eur Heart J Acute Cardiovasc Care*, 2012. 1(3): p. 222-31.
59. Piccolo, R., Gargiulo, G., Franzone, A., Santucci, A., Ariotti, S., Baldo, A., Tumscitz, C., Moschovitis, A., Windecker, S., Valgimigli, M., *Use of the Dual-Antiplatelet Therapy Score to Guide Treatment Duration After Percutaneous Coronary Intervention*. *Ann Intern Med*, 2017. 167(1): p. 17-25.

60. Bianco, M., D'ascenzo, F., Raposeiras Roubin, S., Kinnaird, T., Peyracchia, M., Ariza-Solé, A., Cerrato, E., Manzano-Fernández, S., Gravinese, C., Templin, C., Destefanis, P., Velicki, L., Luciano, A., Xanthopoulou, I., Rinaldi, M., Rognoni, A., Varbella, F., Boccuzzi, G., Omedè, P., Montabone, A., Bernardi, A., Taha, S., Rossini, R., Durante, A., Gili, S., Magnani, G., Autelli, M., Grosso, A., Blanco, P.F., Giustetto, C., Garay, A., Quadri, G., Queija, B.C., Srdanovic, I., Paz, R.C., Fernández, M.C., Pousa, I.M., Gallo, D., Morbiducci, U., Dominguez-Rodriguez, A., Lopez-Cuenca, Á., Cequier, A., Alexopoulos, D., Iñiguez-Romo, A., Pozzi, R., Assi, E.A., Valgimigli, M., *Comparative external validation of the PRECISE-DAPT and PARIS risk scores in 4424 acute coronary syndrome patients treated with prasugrel or ticagrelor*. Int J Cardiol, 2020. 301: p. 200-206.
61. Aktories, Hofmann, Starke, *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. 9. Auflage ed. 2005: Urban&Fischer. 237 und 356.
62. Hass, W.K., Easton, J.D., Adams Jr, H.P., Pryse-Phillips, W., Molony, B.A., Anderson, S., Kamm, B., *A randomized trial comparing ticlopidine hydrochloride with aspirin for the prevention of stroke in high-risk patients. Ticlopidine Aspirin Stroke Study Group*. N Engl J Med, 1989. 321(8): p. 501-7.
63. Hershey, L.A., *Stroke prevention in women: role of aspirin versus ticlopidine*. Am J Med, 1991. 91(3): p. 288-92.
64. Neumann, F.J., Gawaz, M., Dickfeld, T., Wehinger, A., Walter, H., Blasini, R., Schömig, A., *Antiplatelet effect of ticlopidine after coronary stenting*. J Am Coll Cardiol, 1997. 29(7): p. 1515-9.
65. Schühlen, H., Kastrati, A., Pache, J., Dirschinger, J., Schömig, A., *Sustained benefit over four years from an initial combined antiplatelet regimen after coronary stent placement in the ISAR trial. Intracoronary Stenting and Antithrombotic Regimen*. Am J Cardiol, 2001. 87(4): p. 397-400.
66. 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, 2001. 85(1): p. 92-3.
67. Kastrati, A., von Beckerath, N., Joost, A., Pogatsa-Murray, G., Gorchakova, O., Schömig, A., *Loading with 600 mg clopidogrel in patients with coronary artery disease with and without chronic clopidogrel therapy*. Circulation, 2004. 110(14): p. 1916-9.
68. Angiolillo, D.J., Fernandez-Ortiz, A., Bernardo, E., Alfonso, F., Macaya, C., Bass, T.A., Costa, M.A., *Variability in individual responsiveness to clopidogrel: clinical implications, management, and future perspectives*. J Am Coll Cardiol, 2007. 49(14): p. 1505-16.

69. Serebruany, V.L., Steinhubl, S.R., Berger, P.B., Malinin, A.I., Bhatt, D.L., Topol, E.J., *Variability in platelet responsiveness to clopidogrel among 544 individuals*. J Am Coll Cardiol, 2005. 45(2): p. 246-51.
70. O'Donoghue, M., Wiviott, S.D., *Clopidogrel response variability and future therapies: clopidogrel: does one size fit all?* Circulation, 2006. 114(22): p. e600-6.
71. Buonamici, P., Marcucci, R., Migliorini, A., Gensini, G.F., Santini, A., Panicia, R., Moschi, G., Gori, A.M., Abbate, R., Antoniucci, D., *Impact of platelet reactivity after clopidogrel administration on drug-eluting stent thrombosis*. J Am Coll Cardiol, 2007. 49(24): p. 2312-7.
72. Gurbel, P.A., Mahla, E., Antonino, M.J., Tantry, U.S., *Response variability and the role of platelet function testing*. J Invasive Cardiol, 2009. 21(4): p. 172-8.
73. Mega, J.L., Close, S.L., Wiviott, S.D., Shen, L., Hockett, R.D., Brandt, J.T., Walker, J.R., Antman, E.M., Macias, W., Braunwald, E., Sabatine, M.S., *Cytochrome p-450 polymorphisms and response to clopidogrel*. N Engl J Med, 2009. 360(4): p. 354-62.
74. Geisler, T., Langer, H., Wydymus, M., Göhring, K., Zürn, C., Bigalke, B., Stellos, K., May, A.E., Gawaz, M., *Low response to clopidogrel is associated with cardiovascular outcome after coronary stent implantation*. Eur Heart J, 2006. 27(20): p. 2420-5.
75. Born, G.V., Cross, M.J., *Effect of adenosine diphosphate on the concentration of platelets in circulating blood*. Nature, 1963. 197: p. 974-6.
76. Zurn, C.S., Geisler, T., Gawaz, M., *ADP-receptor blockade: A case for personalised pharmacotherapy?* Thromb Haemost, 2010. 103(3): p. 496-506.
77. Jernberg, T., Payne, C.D., Winters, K.J., Darstein, C., Brandt, J.T., Jakubowski, J.A., Naganuma, H., Siegbahn, A., Wallentin, L., *Prasugrel achieves greater inhibition of platelet aggregation and a lower rate of non-responders compared with clopidogrel in aspirin-treated patients with stable coronary artery disease*. Eur Heart J, 2006. 27(10): p. 1166-73.
78. Wiviott, S.D., Braunwald, E., McCabe, C.H., Montalescot, G., Ruzyllo, W., Gottlieb, S., Neumann, F.J., Ardissino, D., De Servi, S., Murphy, S.A., Riesmeyer, J., Weerakkody, G., Gibson, C.M., Antman, E.M., *Prasugrel versus clopidogrel in patients with acute coronary syndromes*. N Engl J Med, 2007. 357(20): p. 2001-15.
79. Montalescot, G., Bolognese, L., Dudek, D., Goldstein, P., Hamm, C., Tanguay, J.F., ten Berg, J.M., Miller, D.L., Costigan, T.M., Goedicke, J., Silvain, J., Angioli, P., Legutko, J., Niethammer, M., Motovska, Z., Jakubowski, J.A., Cayla, G., Visconti, L.O., Vicaut, E., Widimsky, P., *Pretreatment with prasugrel in non-ST-segment elevation acute coronary syndromes*. N Engl J Med, 2013. 369(11): p. 999-1010.

80. Schüpke, S., Neumann, F.J., Menichelli, M., Mayer, K., Bernlochner, I., Wöhrle, J., Richardt, G., Liebetrau, C., Witzembichler, B., Antoniucci, D., Akin, I., Bott-Flügel, L., Fischer, M., Landmesser, U., Katus, H.A., Sibbing, D., Seyfarth, M., Janisch, M., Boncompagni, D., Hilz, R., Rottbauer, W., Okrojek, R., Möllmann, H., Hochholzer, W., Migliorini, A., Cassese, S., Mollo, P., Xhepa, E., Kufner, S., Strehle, A., Leggewie, S., Allali, A., Ndrepepa, G., Schühlen, H., Angiolillo, D.J., Hamm, C.W., Hapfelmeier, A., Tölg, R., Trenk, D., Schunkert, H., Laugwitz, K.L., Kastrati, A., *Ticagrelor or Prasugrel in Patients with Acute Coronary Syndromes*. *N Engl J Med*, 2019. 381(16): p. 1524-1534.
81. Hochholzer, W., Trenk, D., Bestehorn, H.P., Fischer, B., Valina, C.M., Ferenc, M., Gick, M., Caputo, A., Büttner, H.J., Neumann, F.J., *Impact of the degree of peri-interventional platelet inhibition after loading with clopidogrel on early clinical outcome of elective coronary stent placement*. *J Am Coll Cardiol*, 2006. 48(9): p. 1742-50.
82. Angiolillo, D.J., Suryadevara, S., Capranzano, P., Zenni, M.Z., Guzman, L.A., Bass, T.A., *Antiplatelet drug response variability and the role of platelet function testing: a practical guide for interventional cardiologists*. *Catheter Cardiovasc Interv*, 2009. 73(1): p. 1-14.
83. Nguyen, T.A., Diodati, J.G., Pharand, C., *Resistance to clopidogrel: a review of the evidence*. *J Am Coll Cardiol*, 2005. 45(8): p. 1157-64.
84. Sibbing, D., Byrne, R.A., Kastrati, A., *Role of platelet function testing in clinical practice: current concepts and future perspectives*. *Curr Drug Targets*, 2011. 12(12): p. 1836-47.
85. Sibbing, D., Byrne, R.A., Bernlochner, I., Kastrati, A., *High platelet reactivity and clinical outcome - fact and fiction*. *Thromb Haemost*, 2011. 106(2): p. 191-202.
86. Bernlochner, I., Sibbing, D., *Thienopyridines and other ADP-receptor antagonists*. *Handb Exp Pharmacol*, 2012(210): p. 165-98.
87. Bliden, K.P., Dichiara, J., Lawal, L., Singla, A., Antonino, M.J., Baker, B.A., Bailey, W.L., Tantry, U.S., Gurbel, P.A., *The association of cigarette smoking with enhanced platelet inhibition by clopidogrel*. *J Am Coll Cardiol*, 2008. 52(7): p. 531-3.
88. Serebruany, V.L., Malinin, A.I., Pokov, A., Barsness, G., Hanley, D.F., *Effects of clopidogrel and aspirin in combination versus aspirin alone on platelet activation and major receptor expression in diabetic patients: the PLavix Use for Treatment Of Diabetes (PLUTO-Diabetes) trial*. *Am Heart J*, 2008. 155(1): p. 93 e1-7.
89. Angiolillo, D.J., Fernandez-Ortiz, A., Bernardo, E., Ramírez, C., Sabaté, M., Jimenez-Quevedo, P., Hernández, R., Moreno, R., Escaned, J., Alfonso, F., Bañuelos, C., Costa, M.A., Bass, T.A., Macaya, C., *Platelet function profiles in patients with type 2 diabetes and coronary artery disease on combined aspirin and clopidogrel treatment*. *Diabetes*, 2005. 54(8): p. 2430-5.

90. Ferroni, P., Basili, S., Falco, A., Davì, G., *Platelet activation in type 2 diabetes mellitus*. *J Thromb Haemost*, 2004. 2(8): p. 1282-91.
91. Dunn, S.P., Macaulay, T.E., Brennan, D.M., *Baseline Proton Pump Inhibitor (PPI) Use is Associated with Increased Cardiovascular Events with and without the Use of Clopidogrel in the CREDO Trial*. *Circulation*, 2008(118): p. 815.
92. Simon, T., Verstuyft, C., Mary-Krause, M., Quteineh, L., Drouet, E., Méneveau, N., Steg, P.G., Ferrières, J., Danchin, N., Becquemont, L., *Genetic determinants of response to clopidogrel and cardiovascular events*. *N Engl J Med*, 2009. 360(4): p. 363-75.
93. Trenk, D., Hochholzer, W., Fromm, M.F., Chialda, L.E., Pahl, A., Valina, C.M., Stratz, C., Schmiebusch, P., Bestehorn, H.P., Büttner, H.J., Neumann, F.J., *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*. *J Am Coll Cardiol*, 2008. 51(20): p. 1925-34.
94. Collet, J.P., Hulot, J.S., Pena, A., Villard, E., Esteve, J.B., Silvain, J., Payot, L., Brugier, D., Cayla, G., Beygui, F., Bensimon, G., Funck-Brentano, C., Montalescot, G., *Cytochrome P450 2C19 polymorphism in young patients treated with clopidogrel after myocardial infarction: a cohort study*. *Lancet*, 2009. 373(9660): p. 309-17.
95. Tamminen, M., Lassila, R., Westerbacka, J., Vehkavaara, S., Yki-Järvinen, H., *Obesity is associated with impaired platelet-inhibitory effect of acetylsalicylic acid in nondiabetic subjects*. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 2003. 27(8): p. 907-11.
96. Sibbing, D., von Beckerath, O., Schömig, A., Kastrati, A., von Beckerath, N., *Impact of body mass index on platelet aggregation after administration of a high loading dose of 600 mg of clopidogrel before percutaneous coronary intervention*. *Am J Cardiol*, 2007. 100(2): p. 203-5.
97. Born, G.V., *Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal*. *Nature*, 1962. 194: p. 927-9.
98. Thebault, J.J., Kieffer, G., Lowe, G.D., Nimmo, W.S., Cariou, R., *Repeated-dose pharmacodynamics of clopidogrel in healthy subjects*. *Semin Thromb Hemost*, 1999. 25 Suppl 2: p. 9-14.
99. Eikelboom, J.W., Hankey, G.J., *Aspirin resistance: a new independent predictor of vascular events?* *J Am Coll Cardiol*, 2003. 41(6): p. 966-8.
100. Michelson, A.D., Frelinger 3rd, A.L., Furman, M.I., *Current options in platelet function testing*. *Am J Cardiol*, 2006. 98(10A): p. 4N-10N.
101. Ivandic, B.T., Schlick, P., Staritz, P., Kurz, K., Katus, H.A., Giannitsis, E., *Determination of clopidogrel resistance by whole blood platelet aggregometry and inhibitors of the P2Y12 receptor*. *Clin Chem*, 2006. 52(3): p. 383-8.

102. von Beckerath, N., Pogatsa-Murray, G., Wieczorek, A., Sibbing, D., Schömig, A., Kastrati, A., *Correlation of a new point-of-care test with conventional optical aggregometry for the assessment of clopidogrel responsiveness*. *Thromb Haemost*, 2006. 95(5): p. 910-1.
103. Gurbel, P.A., Bliden, K.P., Etherington, A., Tantry, U.S., *Assessment of clopidogrel responsiveness: measurements of maximum platelet aggregation, final platelet aggregation and their correlation with vasodilator-stimulated phosphoprotein in resistant patients*. *Thromb Res*, 2007. 121(1): p. 107-15.
104. van Werkum, J.W., van der Stelt, C.A.K., Seesing, T.H., Hackeng, C.M., ten Berg, J.M., *A head-to-head comparison between the VerifyNow P2Y12 assay and light transmittance aggregometry for monitoring the individual platelet response to clopidogrel in patients undergoing elective percutaneous coronary intervention*. *J Thromb Haemost*, 2006. 4(11): p. 2516-8.
105. Pampuch, A., Cerletti, C., de Gaetano, G., *Comparison of VASP-phosphorylation assay to light-transmission aggregometry in assessing inhibition of the platelet ADP P2Y12 receptor*. *Thromb Haemost*, 2006. 96(6): p. 767-73.
106. Toth, O., Calatzis, A., Penz, S., Losonczy, H., Siess, W., *Multiple electrode aggregometry: a new device to measure platelet aggregation in whole blood*. *Thromb Haemost*, 2006. 96(6): p. 781-8.
107. Cardinal, D.C., Flower, R.J., *The electronic aggregometer: a novel device for assessing platelet behavior in blood*. *J Pharmacol Methods*, 1980. 3(2): p. 135-58.
108. Gurbel, P.A., Bliden, K.P., Samara, W., Yoho, J.A., Hayes, K., Fissaha, M.Z., Tantry, U.S., *Clopidogrel effect on platelet reactivity in patients with stent thrombosis: results of the CREST Study*. *J Am Coll Cardiol*, 2005. 46(10): p. 1827-32.
109. Muller, 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*, 2003. 89(5): p. 783-7.
110. Thebault, J.J., Kieffer, G., Cariou, R., *Single-dose pharmacodynamics of clopidogrel*. *Semin Thromb Hemost*, 1999. 25 Suppl 2: p. 3-8.
111. www.multiplate.net, *Dynabyte Informationssysteme GmbH*. 2007.
112. Seyfert, U.T., Haubelt, H., Vogt, A., Hellstern, P., *Variables influencing Multiplate(TM) whole blood impedance platelet aggregometry and turbidimetric platelet aggregation in healthy individuals*. *Platelets*, 2007. 18(3): p. 199-206.
113. Penz, S.M., Reininger, A.J., Toth, O., Deckmyn, H., Brandl, R., Siess, W., *Glycoprotein Ibalphalpha inhibition and ADP receptor antagonists, but not aspirin, reduce platelet thrombus formation in flowing blood exposed to atherosclerotic plaques*. *Thromb Haemost*, 2007. 97(3): p. 435-43.

114. Mueller, T., Dieplinger, B., Poelz, W., Calatzis, A., Haltmayer, M., *Utility of whole blood impedance aggregometry for the assessment of clopidogrel action using the novel Multiplate analyzer--comparison with two flow cytometric methods*. Thromb Res, 2007. 121(2): p. 249-58.
115. [http://de.wikipedia.org/wiki/Varianz_\(Stochastik\)](http://de.wikipedia.org/wiki/Varianz_(Stochastik)).
116. <http://de.wikipedia.org/wiki/Variationskoeffizient>.
117. <http://de.wikipedia.org/wiki/Wilcoxon-Mann-Whitney-Test>.
118. <http://de.wikipedia.org/wiki/Rangkorrelationskoeffizient>.
119. www.chronolog.com/disprb.htm, Chrono-log Corporation. 2007.
120. Sibbing, D., Braun, S., Jawansky, S., Vogt, W., Mehilli, J., Schömig, A., Kastrati, A., von Beckerath, N., *Assessment of ADP-induced platelet aggregation with light transmission aggregometry and multiple electrode platelet aggregometry before and after clopidogrel treatment*. Thromb Haemost, 2008. 99(1): p. 121-6.
121. Hochholzer, W., Trenk, D., Frundi, D., Neumann, F.J., *Whole blood aggregometry for evaluation of the antiplatelet effects of clopidogrel*. Thromb Res, 2007. 119(3): p. 285-91.
122. Wallen, N.H., Ladjevardi, M., Albert, J., Bröijersén, A., *Influence of different anticoagulants on platelet aggregation in whole blood; a comparison between citrate, low molecular mass heparin and hirudin*. Thromb Res, 1997. 87(1): p. 151-7.
123. Labarthe, B., Thérout, P., Angioï, M., Ghitescu, M., *Matching the evaluation of the clinical efficacy of clopidogrel to platelet function tests relevant to the biological properties of the drug*. J Am Coll Cardiol, 2005. 46(4): p. 638-45.
124. Packham, M.A., Bryant, N.L., Guccione, M.A., Kinlough-Rathbone, R.L., Mustard, J.F., *Effect of the concentration of Ca²⁺ in the suspending medium on the responses of human and rabbit platelets to aggregating agents*. Thromb Haemost, 1989. 62(3): p. 968-76.
125. Packham, M.A., Kinlough-Rathbone, R.L., Mustard, J.F., *Thromboxane A₂ causes feedback amplification involving extensive thromboxane A₂ formation on close contact of human platelets in media with a low concentration of ionized calcium*. Blood, 1987. 70(3): p. 647-51.
126. Weber, A., Hohlfeld, T., Schror, K., *ADP-induced second wave aggregation in platelet rich plasma from hypercholesterolemic rabbits*. Thromb Res, 1991. 64(6): p. 703-12.
127. Bouchard, B.A., Tracy, P.B., *Platelets, leukocytes, and coagulation*. Curr Opin Hematol, 2001. 8(5): p. 263-9.

128. Aradi, D., Gross, L., Trenk, D., Geisler, T., Merkely, B., Kiss, R.G., Komócsi, A., Dézsi, C.A., Ruzsa, Z., Ungi, I., Rizas, K.D., May, A.E., Mügge, A., Zeiher, A.M., Holdt, L., Huber, K., Neumann, F.J., Koltowski, L., Huczek, Z., Hadamitzky, M., Massberg, S., Sibbing, D., *Platelet reactivity and clinical outcomes in acute coronary syndrome patients treated with prasugrel and clopidogrel: a pre-specified exploratory analysis from the TROPICAL-ACS trial*. Eur Heart J, 2019. 40(24): p. 1942-1951.
129. Sibbing, D., Kastrati, A., *Guided P2Y12 inhibitor therapy after percutaneous coronary intervention*. Lancet, 2021. 397(10283): p. 1423-1425.
130. Aradi, D., Storey, R.F., Komócsi, A., Trenk, D., Gulba, D., Kiss, R.G., Husted, S., Bonello, L., Sibbing, D., Collet, J.P., Huber, K., *Expert position paper on the role of platelet function testing in patients undergoing percutaneous coronary intervention*. Eur Heart J, 2014. 35(4): p. 209-15.
131. Bernlochner, I., Byrne, R.A., Kastrati, A., Sibbing, D., *The future of platelet function testing to guide therapy in clopidogrel low and enhanced responders*. Expert Rev Cardiovasc Ther, 2011. 9(8): p. 999-1014.

8 Anhang

8.1 Verzeichnis verwendeter Abkürzungen

AC	Adenylatcyclase
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
ASS	Acetylsalicylsäure
AU	arbitrary units
AUC	area under the curve
BMI	Body-mass-index
BMS	bare metal stent
BRD	Bundesrepublik Deutschland
°C	Grad Celsius
Ca	Calcium
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CV	Variationskoeffizient
CYP3A	Cytochrom P450 3A4
CYP450	Cytochrom P450
DAG	Diacylglycerole
DES	drug eluting stent
DIC	disseminierte intravaskuläre Koagulopathie
EF	Ejektionsfraktion
GDP	Guanosindiphosphat
GP Ia	Glykoprotein Ia
GP IIb-IIIa	Glykoprotein IIb-IIIa
GP IIIa	Glykoprotein IIIa
GTP	Guanosintriphosphat
Hb	Hämoglobin
HDL	high density lipoproteins
HIT	Heparin induzierte Thrombozytopenie

HPR	high platelet reactivity
IPA	inhibited platelet aggregation
IP3	Inositoltriphosphat
KHK	koronare Herzkrankheit
LCA	left coronary artery
LDL	low density lipoproteins
LPR	low platelet reactivity
LTA	light transmission aggregometrie
MEA	mehrfach Elektroden Aggregometrie
mg	Milligramm
mm	Millimeter
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromol
n	Stichprobenumfang
NaCl	Natriumchlorid
PCI	percutaneous coronary intervention
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PKA	Protein Kinase Aktivation (aktivierte Proteinkinase)
PLC	Phospholipase C
PPI	Protonenpumpeninhibitor
PPP	platelet poor plasma
PRP	platelet rich plasma
PTCA	percutaneous transluminal coronary angioplasty
SD	Standardabweichung
U/l	Units pro Liter
U/min	Umdrehungen pro Minute
VASP	Vasodilator stimuliertes Phosphoprotein

8.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung einer Ballondilatation	3
Abbildung 2: Schematische Darstellung einer Stentimplantation	3
Abbildung 3: Elektronenmikroskopische Darstellung ruhender formveränderter Thrombozyten mit vergrößerter Oberfläche und Pseudopodien sowie aggregierte Thrombozyten_.....	7
Abbildung 4: P2Y ₁₂ -Rezeptor mit zentraler Rolle bei der Entstehung eines Thrombus.	9
Abbildung 5: Topologie eines P2X-Rezeptors.....	10
Abbildung 6: Topologie eines P2Y-Rezeptors.....	11
Abbildung 7: Rolle des P2Y ₁ - und P2Y ₁₂ -Rezeptors bei der ADP-induzierten Plättchenaggregation.	13
Abbildung 8: Optisches 8-Kanal Aggregometer PAP8 der Firma möLab	30
Abbildung 9: Aggregationsverlauf über die Zeit	33
Abbildung 10: Vollblutaggregometer Multiplate der Firma Dynabyte	34
Abbildung 11: Multiplate Testzellen der Firma Dynabyte	34
Abbildung 12: Meßzelle, schematische Darstellung der Thrombozyten- anlagerung an die Sensoreinheit.....	37
Abbildung 13: optische Aggregometrie nach Born (LTA).....	42
Abbildung 14: Vollblutaggregometrie Multiplate (MEA).....	42
Abbildung 15: Messergebnisse	44
Abbildung 16: Elektronenmikroskopisches Bild von zusammengelagerten Blutplättchen nach einer Vollblutaggregation in 2.000-facher Vergrößerung	49

8.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Ursachen für unterschiedliches Clopidogrelansprechverhalten.....	22
Tabelle 2: Charakteristika der Patienten	41

8.4 Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem primären Doktorvater Herrn Prof. Dr. Nicolas von Beckerath für die Überlassung des interessanten Themas dieser Dissertation, die hervorragende konstruktive und nette Betreuung und die Zusammenarbeit während und nach der eigentlichen Tätigkeit im Labor recht herzlich bedanken.

Meinem persönlichen Betreuer und späteren Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Dirk Sibbing, danke ich herzlichst für die enge Zusammenarbeit und das Gelingen meiner Doktorarbeit. Neben seiner klinischen Arbeit hatte er als erster Ansprechpartner für meine Fragen und Probleme im Labor immer ein offenes Ohr. Auch für die Korrektur und die konstruktive Kritik an der Arbeit gilt mein Dank.

Danken möchte ich auch Herrn Dr. Siegmund Braun und seinen Mitarbeiterinnen in der klinischen Chemie des Deutschen Herzzentrums in München, die einen Teil der Messungen dieser Forschungsarbeit in ihrem Labor durchgeführt haben.

Den Krankenschwestern sowie den Ärztinnen und Ärzten im Herzkatheterlabor, der Chest-pain-unit und auf den Stationen danke ich für die freundliche und kooperative Zusammenarbeit bei der Rekrutierung der Studienteilnehmer und der Organisation der Blutentnahmen.

Ein herzliches Dankeschön auch an die Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter im Labor für experimentelle Kardiologie im Deutschen Herzzentrum München, die mir immer bei Fragen zur Seite standen und mich bei Problemen aller Art unterstützt haben.

Besonders danken möchte ich auch meinen Eltern, Karin und Otto Jawansky, die mir das Studium der Humanmedizin ermöglicht haben, sowie meinem Bruder Norbert Jawansky und meiner Ehefrau Stefanie Jawansky.

Meine Familie war mir immer in vielerlei Hinsicht eine große Hilfe und wichtige Unterstützung.

8.5 Publikationen

- Sibbing D., Braun S., Jawansky S., Vogt W., Mehilli J., Schömig A., Kastrati A., von Beckerath N.
Assessment of ADP-induced platelet aggregation with light transmission aggregometry and multiple electrode platelet aggregometry before and after clopidogrel treatment.
Thromb Haemost. 2008 Jan; 99 (1): 121-126.
- Sibbing D., Busch G., Braun S., Jawansky S., Schömig A., Kastrati A., Ott I., von Beckerath N.
Impact of bivalirudin or unfractionated heparin on platelet aggregation in patients pretreated with 600 mg clopidogrel undergoing elective percutaneous coronary intervention.
Eur Heart J. 2008 Jun; 29 (12): 1504-1509.
- von Beckerath N., Sibbing D., Jawansky S., Braun S., Morath T., Vogt W., Schömig A., Kastrati A.
Assessment of platelet response to clopidogrel with multiple electrode aggregometry, the VerifyNow P2Y12 analyzer and platelet Vasodilator-Stimulated Phosphoprotein flow cytometry.
Blood Coagul Fibrinolysis. 2010 Jan; 21(1): 46-52.