

1. Medizinische Klinik und Poliklinik der Technischen Universität  
München  
Klinikum rechts der Isar  
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. A. Schömig)

# Thrombozytenfunktion unter Einfluß der antithrombozytären Substanzen Ticlopidin und Clopidogrel

Beate Coppola

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

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

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

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. M. P. Gawaz,

Eberhard-Karls-Universität Tübingen

2. Univ.-Prof. A. Kastrati

Die Dissertation wurde am 14.01.2005 bei der Technischen Universität  
München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 11.05.2005  
angenommen.

*Meinen Eltern*

# Inhaltsverzeichnis:

<b>1. Einleitung</b>	<b>5</b>
<b>1.1 Rolle des Thrombozyten für die Hämostase</b>	<b>5</b>
<b>1.2 Morphologie des Thrombozyten</b>	<b>6</b>
<b>1.3 Physiologie des Thrombozyten</b>	<b>7</b>
1.3.1 Adhäsion und Phase der Aktivierung	7
1.3.2 Aggregation	11
1.3.3 Sekundäre Hämostase	11
<b>1.4 Thrombozytäre Membranrezeptoren</b>	<b>12</b>
1.4.1 GPIIb-IIIa	14
1.4.2 GPIb-V-IX	15
1.4.3 ADP-Rezeptoren	16
<b>1.5 Rolle des Thrombozyten in der Pathophysiologie der koronaren Herzkrankheit</b>	<b>19</b>
1.5.1 Atherogenese und Progression der Atherosklerose	19
1.5.2 Akutes Koronarsyndrom	20
1.5.3 Fibrinolyse im akuten Myokardinfarkt	21
<b>1.6 Antithrombozytäre Substanzen</b>	<b>22</b>
1.6.1 Acetylsalicylsäure	22
1.6.2 GPIIb-IIIa-Antagonisten	22
1.6.3 Thienopyridine	23
<b>2. Zielsetzung</b>	<b>28</b>
<b>3. Patienten und Methodik</b>	<b>29</b>
<b>3.1 Studienpopulation und Studiendesign</b>	<b>29</b>
<b>3.2 Antithrombozytäre Therapie</b>	<b>30</b>
<b>3.3 Gewinnung und Verarbeitung der Proben</b>	<b>32</b>
<b>3.4 Aggregometrie</b>	<b>34</b>
3.4.1 Messung am Aggregometer	34
3.4.2 Auswertung der Aggregationskurven	35
<b>3.5 Durchflußzytometrie</b>	<b>37</b>
3.5.1 Durchflußzytometrische Analyse von Thrombozyten	37
3.5.2 Interpretation der durchflußzytometrischen Ergebnisse	39
<b>3.6 Statistische Auswertung</b>	<b>40</b>
<b>4. Ergebnisse</b>	<b>41</b>
<b>4.1 Aggregationsverhalten unter Therapie mit Ticlopidin bzw. Clopidogrel</b>	<b>41</b>
4.1.1 Aggregationsverlauf	41
4.1.2 Aggregationsmaximum	44
4.1.3 Deaggregation	47
4.1.4 Aggregationsgeschwindigkeit	50
4.1.5 Degranulation	51

<b>4.2 Oberflächenexpression thrombozytärer Membranglykoproteine unter Einfluß von Ticlopidin bzw. Clopidogrel</b>	<b>54</b>
4.2.1 Dichte der Fibrinogenrezeptoren (CD41-Antikörper)	54
4.2.2 Expression aktivierter Fibrinogenrezeptoren (PAC-1-Antikörper)	54
4.2.3 Expression von P-Selektin (CD62P-Antikörper)	58
4.2.4 Expression von von-Willebrand-Faktor-Rezeptor (CD42b-Antigen)	60
<b>4.3 Thrombozytenzahl im Routineblutbild</b>	<b>61</b>
<b>5. Diskussion</b>	<b>62</b>
5.1 Bedeutung der Thienopyridine für die interventionelle Kardiologie	62
5.2 Thrombozytäre Aggregation unter Thienopyridinen	63
5.3 Freisetzungsreaktion	63
5.4 Effekte der Ladungsdosen von Clopidogrel	64
5.5 Interindividuelle Wirkung der Thienopyridine	65
5.6 Studienbeschränkung	68
5.7 Aussichten	69
<b>6. Zusammenfassung</b>	<b>71</b>
<i>Abkürzungsverzeichnis</i>	<b>72</b>
<i>Tabellenverzeichnis</i>	<b>74</b>
<i>Curriculum Vitae</i>	<b>75</b>
<i>Danksagung</i>	<b>76</b>
<i>Literaturverzeichnis</i>	<b>77</b>
<i>Anhang</i>	<b>87</b>

# 1. Einleitung

## 1.1 Rolle des Thrombozyten für die Hämostase

Das Blut hat durch seine Gerinnbarkeit die Fähigkeit, einem unkontrollierten Durchtritt durch eine Gefäßwandläsion entgegenzuwirken. Die Bildung eines Gefäßwandthrombus, welcher zur Blutstillung führt, wird Hämostase genannt.

Diese Funktion erfüllen plasmatische sowie zelluläre Bestandteile des Blutes und der Gefäßwand. Der Thrombozyt interagiert mit den einzelnen Komponenten und stellt somit das zentrale Bindeglied dar. Im Falle einer Gefäßverletzung kommt es zu einer Interaktion des Thrombozyten mit subendothelialen Strukturen der Gefäßwand und zu einer primären Defektabdichtung. Gleichzeitig setzt er weitere Gerinnungsmechanismen in Gang, welche schließlich eine Wiederherstellung der Gefäßwandintegrität bewirken. Aktivierung und Hemmung der Gerinnung sind physiologischerweise im Gleichgewicht. Um eine überschießende Gerinnungsbildung und deren schädigende Folgen zu verhindern, wird die Gerinnungskaskade durch antikoagulatorische und fibrinolytische Faktoren reguliert.

Ein intaktes Gefäßendothel verhindert den Kontakt der Thrombozyten mit den adhäsiven Bestandteilen des Subendothels. Damit stellt es eine wesentliche Barriere auf dem Weg zur Atherogenese dar (97). Eine krankhaft veränderte Gefäßwand ruft andererseits eine gesteigerte Aktivität von Blutplättchen hervor (75). Die Erforschung der Rolle des Thrombozyten in diesem Pathomechanismus ist deshalb von großem Interesse.

## 1.2 Morphologie des Thrombozyten

Thrombozyten, die kleinsten Zellen des Blutes, entstammen dem Knochenmark. Sie entstehen dort aus Abschnürungen der Megakaryozyten und sind kernlos. In einem Mikroliter Blut finden sich zwischen 150 000 und 300 000 Thrombozyten (37). Sie werden physiologischerweise nach ca. einer Woche durch Leber und Milz abgebaut. Im ruhenden, nicht-aktivierten Zustand hat die Zelle eine diskoide Form mit einem Durchmesser von 2 - 4µm.

Die morphologische Struktur eines Thrombozyten läßt sich in vier Zonen gliedern:

Im **Bereich der Zellmembran**, periphere Zone genannt, kommen Proteine, Mukopolysaccharide und v. a. Glykoproteine als Oberflächenrezeptoren vor.

Die **Zone des Zytoplasmas** und Zytoskeletts, bestehend aus verschiedenen Filamenten und Mikrotubuli, benötigt der Thrombozyt, um seine Form zu verändern und Pseudopodien auszubilden.

Im Zellinneren befindet sich die **Zone der Organellen** mit Mitochondrien, Golgiapparaten, Ribosomen und verschiedenen Arten von Granula. Letztere dienen als Speicherorganellen und enthalten entweder thrombozyten-spezifische Proteine ( $\alpha$ -Granula), hydrolytische Enzyme (lysosomale Granula) oder niedermolekulare Verbindungen wie ADP, ATP, Calcium und Serotonin, welche ihnen elektronenmikroskopisch eine optisch höhere Dichte verleihen (dichte Granula oder „dense bodies“) (59).

Die vierte Zone bilden zwei **Membransysteme**: Das „surface connected system“ (SCS) besteht aus den Thrombozyten durchziehenden Kanälen, die mit der Plasmamembran verbunden und durch Poren von extrazellulär zugänglich sind. Das „dense tubular system“ (DTS) bildet einen Hauptspeicherort für Calcium, welches eine zentrale Rolle im Stoffwechsel des Thrombozyten einnimmt. Das kanalikuläre System bildet transzelluläre Membranstapel, welche mit der Plättchenoberfläche und mit dem Zellinneren verbunden sind und so dem Stoffaustausch dienen. Die Membranstapel

können nach Aktivierung des Thrombozyten mit der Zellmembran verschmelzen, wodurch Glykoproteine, die als Membranrezeptoren fungieren, an die Zelloberfläche gelangen (22).

## 1.3 Physiologie des Thrombozyten

### 1.3.1 Adhäsion und Phase der Aktivierung

Der Zusammenlagerung von Thrombozyten zu einem abdichtenden Thrombus, der sogenannten Aggregation, geht die Adhäsion voraus.

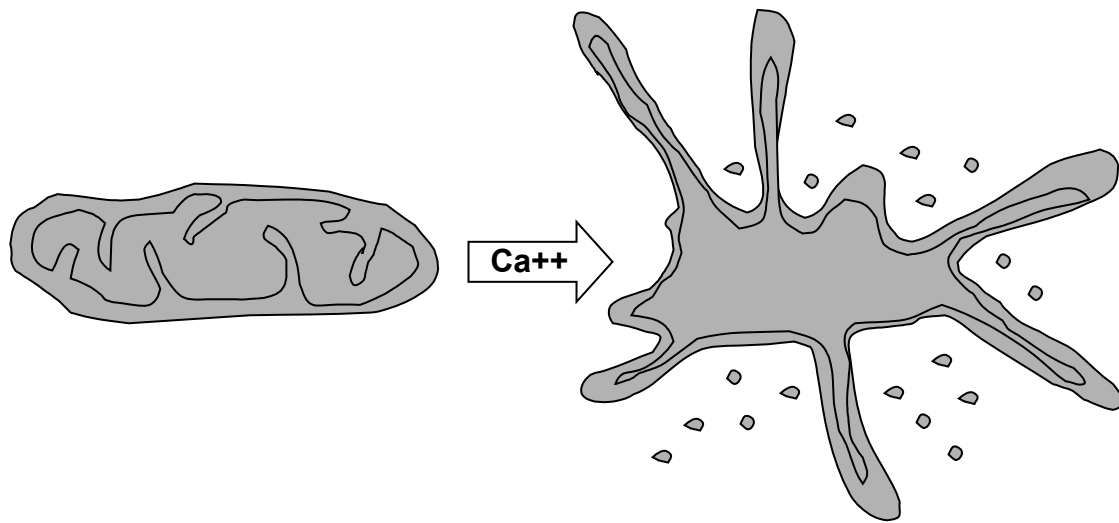
Bei einer Beschädigung der Gefäßinnenwand wird das darunterliegende Subendothel mit seinen Struktur- und Adhäsionsproteinen, v. a. Kollagen und von-Willebrand-Faktor (vWF), freigelegt (88). Die spezifischen Rezeptoren, die der Thrombozyt auf seiner Oberfläche trägt, ermöglichen – auch unter hohen Scherkräften im arteriellen Stromgebiet – Kontakt mit diesen Proteinen (so z. B. der vWF-Rezeptor, das GPIIb-V-III) und gewährleisten die erste Bindung des Blutplättchens an die Gefäßwand. Sie wird **primäre Adhäsion** genannt, wenn sich der Thrombozyt dabei in ruhendem Zustand befindet, und **sekundäre Adhäsion**, wenn er bereits aktiviert war (1; 28). Während dieser Kontaktphase erfolgt über Bindung weiterer membranständiger Rezeptoren für Kollagen, Fibronectin und Laminin eine Stabilisierung der Plättchenanlagerung (75; 97).

Der Adhäsionsprozess führt zur Aktivierung des Thrombozyten:

- Er vollzieht eine Formveränderung („**shape change**“), womit er seine Oberfläche von 8 auf 13  $\mu\text{m}^2$  vergrößert.
- Er bildet Pseudopodien aus und spreizt sich („**spreading**“), um eine effektive Abdichtung der Gefäßwandläsion zu erzielen.
- Die thrombozytären Granula sezernieren ihre Inhaltsstoffe (**Degranulation**). Hierzu verschmelzen sie entweder mit der Plasmamembran (**Exozytose**) oder mit dem „surface connected system“ des Thrombozyten und geben so ihre gerinnungswirksamen Substanzen frei („**release**“) (37), (Abb. 1.1).

Die granulären Inhaltsstoffe verstärken sowohl autokrin den Aktivierungsvorgang als auch parakrin die Stimulation noch ruhender Thrombozyten, die aus der Zirkulation rekrutiert und zur Aggregation mit schon adhärennten Plättchen angeregt werden (96).

Diese Prozesse sind abhängig von einem aktivierungsbedingten Anstieg der intrazellulären Konzentration an Calciumionen. Es besteht eine direkte Korrelation zwischen der Menge an intrazellulärem Calcium und dem Aktivierungsgrad des Thrombozyten.



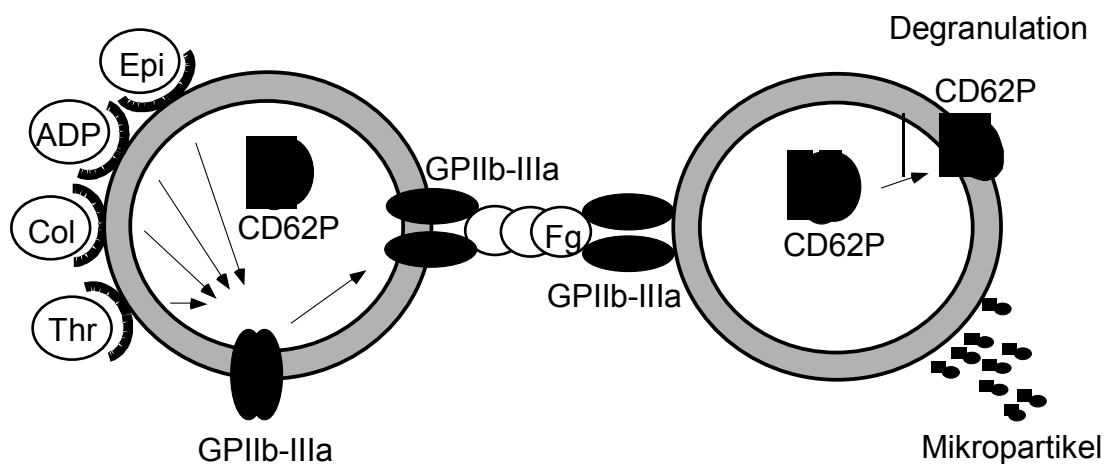
**Abb. 1.1: Aktivierungsphase eines Thrombozyten:**

Der Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration löst die Formveränderung, Pseudopodienbildung und Degranulation der Zelle aus.

Eine Vielzahl von Substanzen kann den Thrombozyten aktivieren und intrazelluläre Reaktionen auslösen. Teils werden sie vom Thrombozyten selbst synthetisiert, teils vom umliegenden Gewebe oder Plasma bereitgestellt. Ein zentraler Stellenwert kommt hierbei der Sekretion von Adenosindiphosphat (ADP) zu. Es wird ebenso vom geschädigten Gefäßwandgewebe wie auch von Endothelzellen und Erythrozyten freigesetzt. Für ADP besitzt der Thrombozyt Rezeptoren, deren Bindung zum raschen Calcium-Einstrom und zur Formveränderung der Zelle führt. Schließlich kommt es zur Aktivierung des Fibrinogenrezeptors GPIIb-IIIa. Dieser vollzieht eine Konformationsänderung und ermöglicht dadurch die Bindung von Fibrinogen, die Voraussetzung für eine stabile Thrombusbildung.



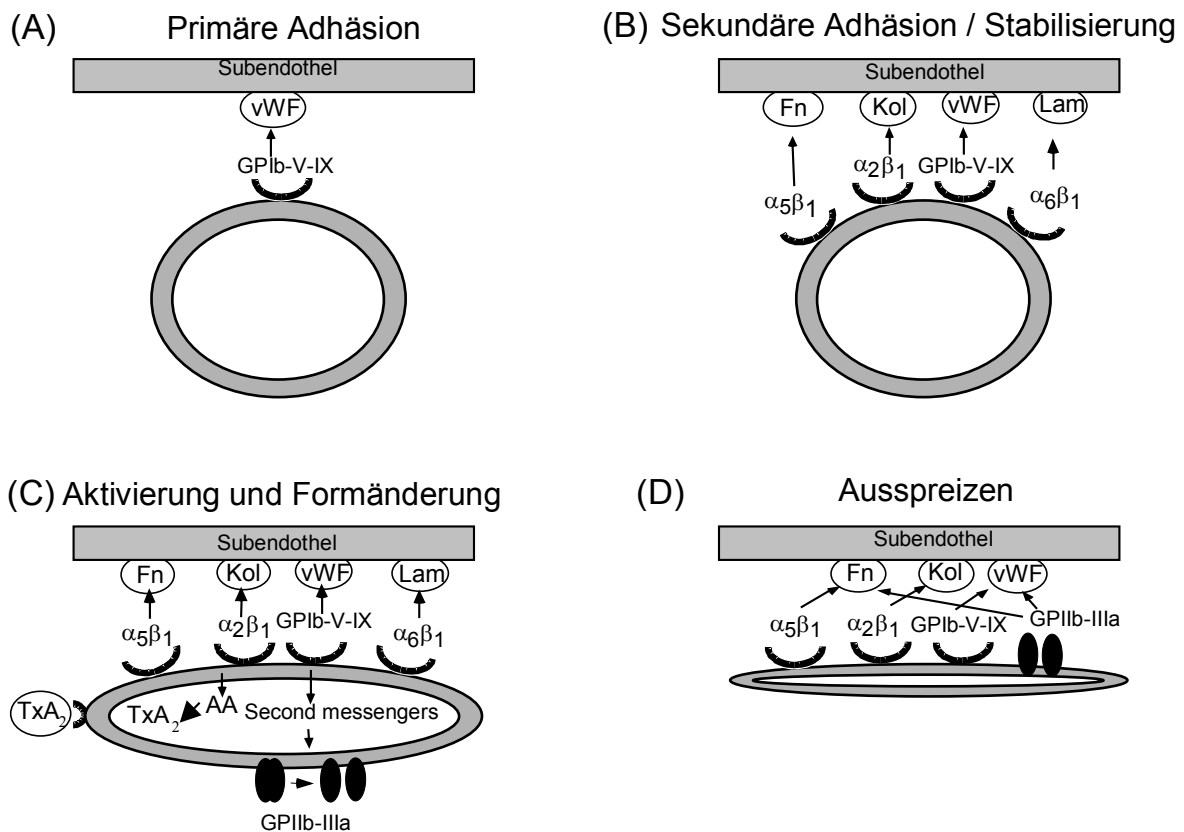
Das Glykoprotein GPIIb-IIIa erkennt im aktivierten Zustand bestimmte Aminosäuresequenzen, die im Fibrinogenmolekül vorkommen, und bindet diese. Die Fibrinogenbrücken ermöglichen eine Aggregatbildung der Thrombozyten. Die Bindung von Fibrinogen erfordert eine Konformationsänderung des GPIIb-IIIa, die durch ADP, Thrombin, Adrenalin oder andere Stoffe ausgelöst wird (43; 44; 47; 82; 96), (Abb.1.2).



**Abb. 1.2: Schematische Darstellung der Thrombozytenaggregation:**

Die Stimulierung der Thrombozyten bewirkt eine Konformationsänderung des GPIIb-IIIa. Dies ermöglicht die Bindung von löslichem Fibrinogen an das GPIIb-IIIa und die Bildung von Plättchenaggregaten über Fibrinogenbrücken. Außerdem kommt es durch die Aktivierung des Thrombozyten zur Freisetzung von Inhaltsstoffen aus den Granula: Epi: Epinephrin; Col: Kollagen; Thr: Thrombin; ADP: Adenosindiphosphat; Fg: Fibrinogen.

Chemotaktisch angelockt lagern sich noch zirkulierende Thrombozyten an und unterstützen diese Prozesse. Desweiteren sezerniert der Thrombozyt aus freigesetzter Arachidonsäure synthetisiertes Thromboxan  $A_2$ , welches die Aktivierung weiterer Thrombozyten veranlaßt, vasokonstriktorisch wirkt und durch die Verlangsamung des Blutstromes eine Thrombusbildung begünstigt. Das Endstadium ist erreicht, wenn der Thrombozyt vollkommen über dem Subendothel ausgespreizt und die Endothelläsion gegenüber dem Blutstrom abgedichtet ist (75), (Abb.1.3).



**Abb. 1.3: Schematische Darstellung der Thrombozytenadhäsion am Subendothel:**

- (A) Zu Beginn erfolgt die Bindung von GPIb-V-IX an den von-Willebrand-Faktor der Endothelzellen.
- (B) Dieser Kontakt löst eine weitere Aktivierung von Membranglykoproteinen aus und bewirkt damit die Stabilisierung der Bindung.
- (C) Es kommt zur Aktivierung und Formveränderung des Thrombozyten mit Aktivierung des GPIIb-IIIa-Rezeptors und der Freisetzung von granulären Inhaltsstoffen.
- (D) Der Thrombozyt bildet Pseudopodien und spreizt sich über dem Subendothel aus.

Fn: Fibronectin; Kol: Kollagen; Lam: Laminin;

vWF: von-Willebrand-Faktor; TxA<sub>2</sub>: Thromboxan A<sub>2</sub>; AA: Arachidonsäure

### 1.3.2 Aggregation

Die der Gefäßläsion anhaftenden Thrombozyten werden über Brücken aus Fibrinogen zunächst locker untereinander verbunden (Koadhäsion). Diesen Vorgang nennt man **primäre Aggregation**, er ist reversibel. Verzögert kommt es zur **sekundären Aggregation**. Dabei werden die granulären Inhaltsstoffe freigesetzt, Fibrinogen wird zu Fibrin gespalten. Die sekundäre Aggregation ist irreversibel (87).

Fibrinogen liegt in gesundem Plasma in ausreichender Menge vor. Thrombozyten von Patienten mit einer Hypo- bzw. Afibrinogenämie dagegen haben zwar eine normale Funktion, können jedoch nur eingeschränkt oder gar nicht aggregieren. Bei der Thrombasthenie Glanzmann-Naegeli mangelt es dagegen nicht am Fibrinogen, sondern an dessen thrombozytärer Bindungsstelle, dem Fibrinogenrezeptor. Beide Erkrankungen haben eine verlängerte Blutungszeit der Betroffenen zur Folge (37).

### 1.3.3 Sekundäre Hämostase

Um eine effektive Blutstillung zu erzielen, ist eine Konsolidierung des instabilen Plättchenaggregates erforderlich. Diese wird durch die Aktivierung der Gerinnungskaskade eingeleitet, deren Einteilung in ein intrinsisches und ein extrinsisches System erfolgte. Beiden Systemen gleich ist die gemeinsame Endstrecke, in welcher die Serinprotease Prothrombin in ihre aktive Form, Thrombin, gespalten wird, welches Fibrinogen zu Fibrin spaltet. Damit wird eine Verfestigung des Gerinnsels erreicht, welches sich anschließend retrahiert (37).

## 1.4 Thrombozytäre Membranrezeptoren

Um zu einer effektiven Blutgerinnung beizutragen, muß der Thrombozyt mit allen beteiligten Komponenten (Thrombozyten, Endothel, Gerinnungsfaktoren, extrazelluläre Matrix) interagieren. Dies geschieht durch ein komplexes System an Rezeptoren, die überwiegend auf der Oberfläche der Zelle lokalisiert sind bzw. exponiert werden, sobald eine Aktivierung stattfindet. Ein Rezeptor kann je nach Funktionszustand beschrieben werden als ruhend, liganden-gebunden oder aktiviert (37).

Eine Markierung dieser Oberflächenrezeptoren mit spezifischen fluoreszierenden Antikörpern ermöglicht ihre durchflußzytometrische Untersuchung. Das von Shattil und Mitarbeitern 1987 entwickelte Verfahren ist derzeit die Methode der Wahl, aktivierungsabhängige Veränderungen auf der thrombozytären Oberfläche festzustellen (65).

Die elektrophoretischen Eigenschaften klassifizieren die Rezeptortypen in Glykoproteine und Nicht-Glykoproteine.

Ihrer Molekülstruktur nach werden die thrombozytären Adhäsionsrezeptoren unterteilt in vier Gruppen: Integrine, Leuzin-reiche Glykoproteine, Selektine und immunglobulin-ähnliche Adhäsionsrezeptoren.

**Integrine** fungieren als Adhäsionsrezeptoren, die Strukturen des Zytoskeletts mit der extrazellulären Matrix verbinden. Sie besitzen ubiquitär eine bedeutende Rolle (53). Auf der thrombozytären Oberfläche steht ein bestimmtes Integrin im Vordergrund: das Glykoprotein IIb-IIIa, die Bindungsstelle des Fibrinogens. Seine besondere Rolle wird in 1.3.1 beschrieben.

Zu den **Leuzinreichen Glykoproteinen** gehört der Membranglykoprotein-komplex Ib-V-IX, der Rezeptor für von-Willebrand-Faktor.

**Selektine** sind vaskuläre Adhäsionsrezeptoren, welche auf Endothelzellen, Leukozyten und Plättchen zu finden sind und je nach Vorkommen E-, L- oder P-Selektin genannt werden. P-Selektin wird in den thrombozytären  $\alpha$ -Granula und in den Weibel-Palade-Körperchen der Endothelzellen gespeichert. Sobald es von aktivierten Thrombozyten exprimiert oder in löslicher Form freigesetzt wird, fördert es inflammatorische Reaktionen und die Beteiligung von neutrophilen Leukozyten bei vaskulären Reparaturvorgängen. Die Expressierung von P-Selektin kann durchfluß-

zytometrisch mit anti-P-Selektin-Antikörpern (CD62P) erfasst werden (75). P-Selektin ist daher ein Degranulationsmarker (63).

Das „platelet-endothelial-cell-adhesion-molecule-1“ (PECAM-1) sowie das „intercellular-adhesion-molecule-2“ (ICAM-2) sind **Rezeptoren vom Immunglobulin-Typ**. Sie spielen eine Rolle bei der Plättchenadhäsion an das Subendothel bzw. bei der Interaktion mit Endothelzellen, neutrophilen Granulozyten und Monozyten, und sind mitverantwortlich für durch Thrombozyten vermittelte entzündliche Gefäßveränderungen (37; 38).

Eine Klassifizierung der thrombozytären Membranrezeptoren zeigt **Tab. 1.1**:

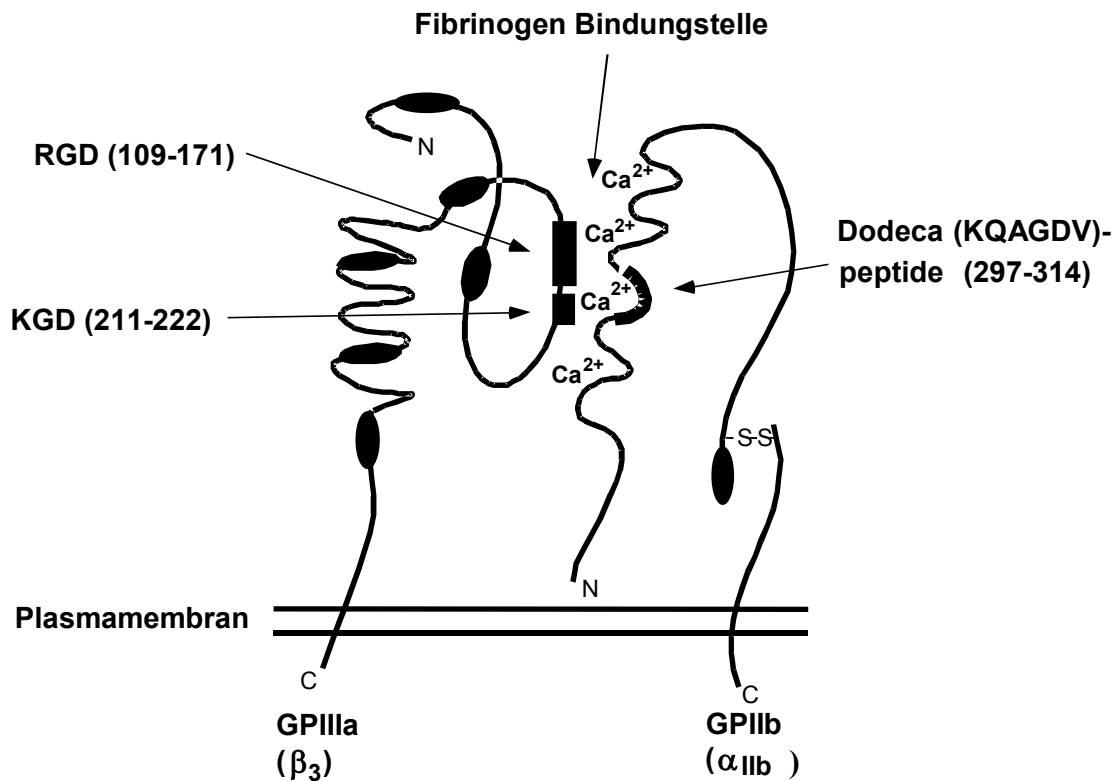
<b>Strukturelle Klassifizierung</b>	<b>Elektrophoretische Klassifizierung</b>	<b>CD-Nomenklatur</b>	<b>Anzahl Rezeptoren pro Thrombozyt</b>
<b>Integrine</b>			
$\alpha_2\beta_1$	GPIa-IIa	CD49b	1 000
$\alpha_5\beta_1$	GPIc-IIa	CD49c	1 000
$\alpha_6\beta_1$	GPIc'-IIa	CD49f	1 000
$\alpha_{II}\beta_3$	GPIIb-IIIa	CD41-CD61	60 000 – 100 000
$\alpha_v\beta_3$	GPav-IIIa	CD51-CD61	100
<b>Leuzinreiche Glykoproteine</b>			
-	GPIb-V-IX	CD42a-b-c	25 000
-	GPIV (GPIIIb)	CD36	15 000 – 25 000
<b>Selektine</b>			
-	P-Selektin	CD62P	12 000
<b>Immunglobulinähnliche</b>			
-	ICAM-2	CD102	5 000
-	PCAM-1	CD31	3 000
<b>Lysosomale Proteine</b>			
-	GP53	CD63	3 000

### 1.4.1 GPIIb-IIIa

Der Fibrinogenrezeptor ist das am häufigsten vorkommende Membranglykoprotein mit einer durchschnittlichen Oberflächenexpression von 60 000 bis 100 000 Rezeptoren pro Thrombozyt und macht 1-2% des zellulären Gesamtproteingehaltes aus (47). Unter physiologischen Bedingungen tragen zirkulierende Blutplättchen 70% ihrer Fibrinogenrezeptoren konstitutiv im nicht-aktivierten Zustand auf ihrer Oberfläche, die restlichen 30% werden erst nach Aktivierung aus ihren intrazellulären Speichern (offenes kanalikuläres System und  $\alpha$ -Granula) exponiert.

Der GPIIb-IIIa-Rezeptor ist ein Heterodimer, bestehend aus einer  $\alpha$ -Untereinheit (GPIIb) und einer  $\beta$ -Untereinheit (GPIIIa) (81). Der Antikörper anti-CD41 bindet von extrazellulär das GPIIb, der Antikörper anti-CD61 das GPIIIa (43).

Aktiviertes GPIIb-IIIa kann durch Markierung mit PAC-1 Antikörpern durchflußzytometrisch nachgewiesen werden (103). Durch die aktivierungsabhängige Konformationsänderung wird der Rezeptor in einen hochaffinen Funktionszustand überführt, in welchem er die Signalsequenzen des Fibrinogens (RGD und KQAGDV) erkennen und binden kann. Weitere RGD und KQAGDV enthaltende Peptide konkurrieren dabei mit Fibrinogen um eine gemeinsame Bindungsstelle (58; 82), (Abb.1.4). Durch Blockierung des GPIIb-IIIa ist eine effektive Hemmung der Ausbildung von Plättchenthromben möglich.



**Abb. 1.4: Struktur des GPIIb-IIIa:**

Der Fibrinogenrezeptor besteht aus einer  $\alpha$ -Untereinheit (GPIIb) und einer  $\beta$ -Untereinheit (GPIIIa).

### 1.4.2 GPIb-V-IX

Der von-Willebrand-Faktor kommt im physiologischen Zustand im sub-endothelialen Kollagen, in den Weibel-Palade-Körperchen der Endothelzellen sowie im Plasma vor, wo er an den Gerinnungsfaktor VIII gebunden ist. Seine Struktur gewährleistet bei einer Läsion der Gefäßintima eine rasche Anheftung von Thrombozyten an die subendothelialen Gefäßwandkomponenten (89). Der Glykoprotein-Ib-V-IX-Komplex fungiert als thrombozytärer Rezeptor für den von-Willebrand-Faktor und spielt eine zentrale Rolle in der primären Hämostase. Er kann durch einen der spezi-

fischen Antikörper anti-CD42a, -b oder -c gebunden werden. Ist der Antikörper mit einem Fluoreszenzfarbstoff natüriert, so kann diese Markierung als Erkennungsmerkmal für Thrombozyten in der durchflußzytometrischen Erfassung herangezogen werden (35).

### 1.4.3 ADP-Rezeptoren

Die für die Fibrinogenbindung notwendige Aktivierung des GPIIb-IIIa erfolgt über eine Reihe von Agonisten, welche an spezifische Rezeptoren auf der Oberfläche des Thrombozyten binden. Die Substanzen werden hauptsächlich von den Plättchen selbst synthetisiert. Neben Serotonin und Thromboxan ist dies v. a. Adenosindiphosphat. ADP triggert „shape change“, Degranulation, Aggregation und Mobilisation von Calciumionen des Thrombozyten. Es wird ebenso von beschädigten Erythrozyten sowie verletztem Endothel freigesetzt (45).

Rezeptoren, welche von extrazellulären Adeninnukleotiden gebunden werden, heißen **Purinozeptoren** (P2). Es wurden bislang mehrere Subtypen gefunden, die nach ihrem Signaltransduktionsmodus in ionotrophe (**P2X**) und metabotrophe (**P2Y**) Rezeptoren eingeteilt werden. Auf menschlichen Blutplättchen wurden bisher drei Purinozeptor-Arten näher identifiziert (55).

Als erstes beschrieben wurde die Funktion des P2X<sub>1</sub>-Rezeptors. Es handelt sich dabei um einen Ionenkanal, der durch Bindung von ADP einen raschen Einstrom von Calciumionen in die Zelle und die Formveränderung des Thrombozyten ermöglicht. Auch die Bindung von ATP, welches von aktivierten Thrombozyten bzw. im Bereich des verletzten Endothels freigesetzt wird, kann eine direkte Stimulation der Plättchen bewirken (85). P2X<sub>1</sub>-Rezeptoren scheinen für die thrombozytäre Aggregation nicht unabdingbar zu sein, denn diese funktioniert auch, wenn der Rezeptor im Refraktärzustand ist (102).

Die ionotropen Purinozeptoren stellen keinen Angriffspunkt für die Substanzklasse der Thienopyridine dar. Dies könnte eine Ursache dafür sein, daß trotz Behandlung mit Ticlopidin oder Clopidogrel ein intrazellulärer Calciumanstieg sowie eine Formveränderung der Plättchen nicht zu verhindern sind (34).



P2Y-Rezeptoren bestehen aus sieben transmembranösen Domänen, die an G-Proteine gekoppelt die ADP-induzierte Aktivierung amplifizieren: Im Ruhezustand ist ein G-Protein auf der Zellinnenseite mit einem Guanin-Dinukleotid verbunden. Die Bindung des Rezeptors durch ADP von außen bewirkt, daß im Zellinneren das GDP durch ein GTP ersetzt wird. Es erfolgt eine Konformationsänderung des G-Proteins, worauf sich dessen aktive  $\alpha$ -Untereinheit abspaltet und im Zellinneren über ein Signalmolekül („second messenger“, z. B.  $IP_3$ , cAMP) die Wirkung weiterleitet. Gleichzeitig wird das gebundene GTP zu GDP hydrolysiert und das G-Protein wieder inaktiviert. Nach den verschiedenen Signalmolekülen werden die G-Proteine sowie die P2Y-Rezeptoren klassifiziert (16).

Die  $\alpha$ -Untereinheit des Rezeptorsubtyps P2Y<sub>1</sub> ermöglicht bei Aktivierung  $IP_3$ -vermittelt die Mobilisation von Calcium aus den intrazellulären Speichern und initiiert auf diese Weise die Plättchenaggregation. Das Funktionieren dieses Rezeptors scheint unverzichtbar für eine vollständige Formation von Plättchenaggregaten zu sein. Bei Individuen, deren P2Y<sub>1</sub>-Rezeptoren blockiert werden, z. B. aufgrund eines hereditären Defekts, wird eine thrombozytäre Aggregation und somit eine effektive Blutstillung verhindert (76). Jedoch scheint ebenso die alleinige Aktivierung von P2Y<sub>1</sub>-Rezeptoren nicht ausreichend für eine vollständige Thrombozytenaggregation zu sein. Auch P2Y<sub>1</sub> ist nicht Zielrezeptor für Ticlopidin bzw. Clopidogrel (49).

Eine vollständige ADP-induzierte Plättchenaggregation erfordert die Koaktivierung der Rezeptoren P2Y<sub>1</sub> und P2Y<sub>12</sub> (4):

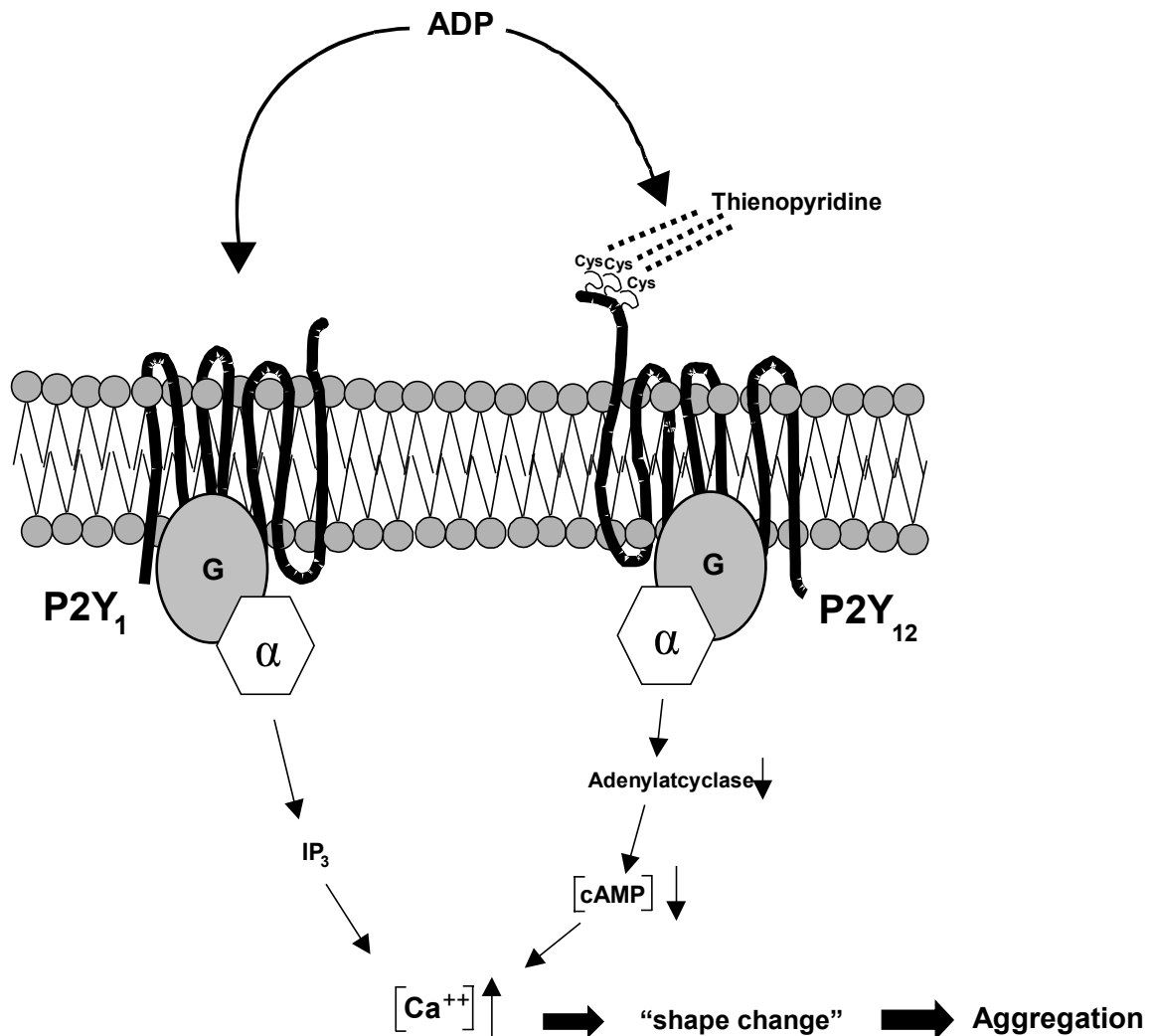
Der Subtyp P2Y<sub>12</sub> veranlaßt G-Protein-vermittelt eine Inhibition der thrombozytären Adenylatcyclase, wodurch die Synthese von intrazellulärem cAMP supprimiert wird. Auch dies löst in der Zelle die Ausschüttung von gespeichertem Calcium aus und ist schließlich essentiell für die Stabilisierung des Plättchenaggregates (36).

In der Nomenklatur wurde P2Y<sub>12</sub> in den letzten Jahren uneinheitlich P2Y<sub>ADP</sub>, P2Y<sub>AC</sub>, P2Y<sub>cyc</sub> oder P2T<sub>AC</sub> bezeichnet. P2Y<sub>12</sub> wurde eindeutig als Zielrezeptor der Thienopyridinderivate identifiziert. Da er ausschließlich auf Blutplättchen nachgewiesen wurde, ist gerade dieser Rezeptor ein interessantes Objekt für die Erforschung anti-thrombozytärer Substanzen.

Auch ein kongenital defekter P2Y<sub>12</sub>-Rezeptor kann Ursache einer mangelhaften Aggregationsfähigkeit der Plättchen sein (35).

Auf seiner extrazellulären Domäne trägt dieser Purinozeptor Cystein-enthaltende Aminosäureketten, die von thiolhaltigen Reagenzien wie den Thienopyridi-

nen verändert werden. Dadurch wird die G-Protein-gekoppelte Antwort des P2Y<sub>12</sub>-Rezeptors verhindert (51) (Abb.1.5).



**Abb. 1.5: Metabotrophe ADP-Bindungsstellen:**

ADP löst durch Bindung an die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren P2Y<sub>1</sub> und P2Y<sub>12</sub> über einen „second messenger“ die Erhöhung der intrazellulären Konzentration an Calciumionen und damit die Formveränderung und Aggregation des Thrombozyten aus. Die ADP-Wirkung am P2Y<sub>12</sub> wird unter Einfluß von Thienopyridinen blockiert.

Neben den Purinozeptoren wurde noch eine weitere ADP-Bindungsstelle beschrieben, das Aggregin. Dieses Protein scheint im Ruhezustand des Plättchens eine Aktivierung des Fibrinogenrezeptors zu verhindern. Wird er von ADP besetzt, verliert er seine inhibitorische Eigenschaft. Ein Zusammenschluß der beiden Untereinheiten GPIIb und GPIIIa zu einem Fibrinogen-bindungsfähigen Rezeptor wird ermöglicht (67).

Adenosin sowie dessen Mono- und Triphosphate AMP und ATP sind die natürlichen Antagonisten der ADP-induzierten Plättchenaggregation. Die antithrombozytäre Substanz Dipyridamol verhindert den zellulären Abbau von Adenosin und unterstützt dadurch dessen inhibitorische Wirkung auf die Aggregation. Künstliche Triphosphat-Analoga sind in Entwicklung und könnten künftig als antithrombozytäre Therapeutika dienen (101).

## **1.5 Rolle des Thrombozyten in der Pathophysiologie der koronaren Herzkrankheit**

### **1.5.1 Atherogenese und Progression der Atherosklerose**

Zahlreiche Studien belegen, daß Thrombozyten eine zentrale Rolle in der Pathogenese der ischämischen Herzerkrankung spielen (5; 32; 33; 112). Aufgrund ihrer Fähigkeit zur Exkretion zahlreicher biologisch aktiver Substanzen sind Thrombozyten zunächst vor allem in der Lage, einen fördernden Effekt auf die Atherogenese auszuüben (3; 110). Die  $\alpha$ -Granula der Blutplättchen enthalten eine Vielzahl von mitogenen Wachstumsfaktoren, wie z. B. „platelet-derived growth factor“ (PDGF) und „transforming growth factor“ (TGF) (96). Diese Wachstumsfaktoren bewirken eine Einwanderung und Proliferation von glatten Muskelzellen und eine Intima-Proliferation der Blutgefäße an Stellen mit erhöhter Aktivität der Blutplättchen (86). Darüber hinaus können koronare Risikofaktoren über eine Beeinflussung der Thrombozytenfunktion zur Atherogenese beitragen. Z. B. ist eine Hypercholesterinämie verbunden mit einem Anstieg der Fibrinogen-Bindung an aktivierte Blutplättchen und einer ver-

mehrten Freisetzung des P-Selektins (2; 80). Die genannten Risikofaktoren könnten so durch eine erhöhte systemische Aktivierung und Degranulation von zirkulierenden Blutplättchen frühe Mechanismen der Atherogenese induzieren (43).

### **1.5.2 Akutes Koronarsyndrom**

Der Begriff des akuten Koronarsyndroms umfasst ein klinisches Spektrum akuter oder rasch fortschreitender Symptome einer myokardialen Ischämie, das von der instabilen Angina pectoris über den nicht-transmuralem Myokardinfarkt (Nicht-Q-Zacken-Infarkt) bis zum akuten transmuralen Myokardinfarkt (Q-Zacken-Infarkt) reicht (105). Die Übergänge hierbei sind fließend. Im Gegensatz zur stabilen Angina pectoris, die im Allgemeinen durch eine verringerte Sauerstoffversorgung des myokardialen Gewebes, bedingt durch eine stabile atherosklerotische Gefäßeinengung hervorgerufen wird, kann es nach unterschiedlich langer Latenzzeit durch akute Veränderungen im atherosklerotisch veränderten Blutgefäß (z. B. durch Einrisse eines atheromatösen Plaques) zur Freilegung subendothelialer, thrombogener Strukturen kommen (111). Die dadurch bedingte Plättchenaktivierung kann zur plötzlichen Stenose oder zu Gefäßverschlüssen durch intravasale Thrombosierung führen. Dies bildet die pathophysiologische Grundlage des akuten Koronarsyndroms (91; 111). Die Bildung des intravasalen Thrombus im Bereich des rupturierten Plaques ist ein komplexer Vorgang des Ineinandergreifens von verschiedensten thrombozytären und koagulatorischen Prozessen. Thrombozyten spielen dabei eine zentrale Rolle und regulieren durch Interaktion mit Gerinnungsvorgängen die Thrombusbildung (32). Neben der Bildung des thrombotischen Gefäßverschlusses sind Blutplättchen auch an Mikroembolisation und Vasokonstriktion, Plaqueprogression und systemischer Entzündungsreaktion beteiligt. Dies sind Mechanismen, welche die Prognose bei akutem Koronarsyndrom entscheidend beeinflussen (32).

### 1.5.3 Fibrinolyse im akuten Myokardinfarkt

Die intravenöse Thrombolyse ist eine weitverbreitete Standardtherapie des akuten Myokardinfarktes und führt zur signifikanten Reduktion der Sterblichkeit nach akutem Myokardinfarkt.

Bei bis zu 50% der Patienten kommt es jedoch nicht zu einer befriedigenden Reperfusion des Infarktgefäßes (18; 54). Eine weitere Limitation der Effektivität der Thrombolyse besteht darin, daß es bei 5 bis 15% der Fälle trotz initial erfolgreicher Wiedereröffnung des Infarktgefäßes zum Wiederverschluss kommt, was mit einer hohen Mortalitätsrate verbunden ist (18). Eine erhöhte intravasale Plättchenaktivierung scheint den Erfolg der fibrinolytischen Reperfusion und das Auftreten von Reokklusionen entscheidend zu beeinflussen (13; 107). In ihren Arbeiten konnten Fitzgerald und Mitarbeiter zeigen, daß es während und nach der Thrombolyse zur gesteigerten Bildung von Thromboxan A<sub>2</sub> und zur Freisetzung aus aktivierten Thrombozyten kommt (30). Während der Fibrinolyse kommt es zur Auflösung der Fibrinquerternetzungen des Koronarthrombus mit Freisetzung von Thrombin (24; 46). Freies Thrombin wiederum führt zur verstärkten Plättchenaktivierung in der Umgebung eines lysierten Thrombus. Fibrinolytika wie Streptokinase oder rekombinanter „tissue plasminogen activator“ (rtPA) führen auch direkt zur Aktivierung von Blutplättchen (8).

Diese Untersuchungen machen wahrscheinlich, daß eine adjuvante antithrombozytäre Therapie innerhalb der ersten 24 Stunden den Erfolg der Thrombolyse unterstützen kann. Seit langem ist bekannt, daß Acetylsalicylsäure (ASS) den Erfolg der Thrombolysebehandlung entscheidend verbessert und deshalb auch derzeit die antithrombozytäre Standardtherapie bei der Thrombolyse darstellt. ASS besitzt jedoch eine verhältnismäßig schwache antiaggregatorische Wirkung und beeinflusst die Freisetzung und Fibrinogenrezeptoraktivierung der Blutplättchen nur wenig (17; 79). Neuere antithrombozytäre Substanzen wie die GPIIb-IIIa-Antagonisten und Clopidogrel weisen eine deutlich stärkere Hemmung der Thrombozytenaggregation auf als ASS.

## **1.6 Antithrombozytäre Substanzen**

In der Vergangenheit wurde eine Vielzahl von Medikamenten entwickelt, die Mechanismen der Thrombozyten gezielt beeinflussen. Die Substanzen blockieren unterschiedliche intrazelluläre Aktivierungsschritte (Erhöhung der zyklischen Nukleotide, Inhibierung der Cyclooxygenase) und haben dadurch eine Hemmwirkung. Andere Substanzen greifen direkt im Bereich der Thrombozytenoberfläche an und verhindern so Aktivierungswege (z. B. ADP-Aktivierung) oder die Aggregation (GPIIb-IIIa-Antagonisten) (19; 25; 27; 93).

Es lassen sich die folgenden drei Gruppen antithrombozytärer Substanzen unterscheiden:

### **1.6.1 Acetylsalicylsäure**

1954 wurde von Bounameaux die Wirkung der Acetylsalicylsäure auf die Thrombozyten beschrieben. 1971 wurde der inhibitorische Effekt auf die Thromboxan-Synthese erkannt. Seither wurde die antithrombotische Wirksamkeit bei kardiovaskulären Erkrankungen in einer Vielzahl klinischer Studien unter Einschluß von insgesamt mehr als 30 000 Patienten belegt. Der Einsatz von ASS gilt als „Goldstandard“ in der Therapie und Prophylaxe atherothrombotischer Krankheitsbilder (23; 79).

### **1.6.2 GPIIb-IIIa-Antagonisten**

Durch die Blockierung des GPIIb-IIIa-Rezeptors besteht die Möglichkeit, die Aggregation der Thrombozyten selektiv zu hemmen und damit der Bildung von plättchenreichen Thromben in einem frühen Stadium entgegenzuwirken. Die Blockade der Fibrinogenbindungsstelle durch GPIIb-IIIa-Antagonisten führt, unabhängig von der Art der Aktivierung, zur effektiven Hemmung der Fibrinogenbindung am GPIIb-IIIa-Rezeptor und dadurch zur Aggregationshemmung. Das Wirkprinzip aller derzeit verfügbaren GPIIb-IIIa-Antagonisten ist identisch, jedoch unterscheiden sich die

strukturellen und pharmakologischen Eigenschaften und die Spezifität der einzelnen Antagonisten (25; 60; 70).

**Abciximab** ist ein chimäres Derivat des monoklonalen Antikörpers 7E3, welcher gegen den Fibrinogenrezeptor gerichtet ist und eine Fibrinogenbindung irreversibel inhibiert. Das Fc-Fragment wurde vom kompletten Antikörper abgespalten, so daß Abciximab nur aus dem Fab-Anteil besteht. Zusätzlich wurde der größte Teil des unspezifischen murinen Fab-Anteils durch einen menschlichen Fab-Anteil ersetzt.

**Integrelin** ist ein über Disulfidbrücken verbundenes zyklisches Peptid mit sieben Aminosäuren (Heptapeptid) und weist die Aminosäuresequenz KGD auf. Integrelin bindet im Bereich der RGD-Bindungsregion des GPIIb-IIIa-Rezeptors.

**Lamifiban** und **Tirofiban** (MK383) sind nicht-peptische Moleküle. Im Gegensatz zu Integrelin, welches durch seine RGD-ähnliche Molekülstruktur mit der Fibrinogenbindungsstelle interagiert, imitieren die nicht-peptischen Antagonisten die geometrischen, stereotaktischen und Oberflächenladungseigenschaften der RGD-Sequenz und hemmen dadurch die Fibrinogenbindung (25; 70).

Die Effektivität dieser Substanzen für den interventionellen Einsatz wurde durch Studien mit in-vivo Bestimmungen der Plättchenfunktion belegt (73). Anhand eines großen klinischen Vergleichs von Abciximab und Tirofiban konnten Topol und Mitarbeiter zeigen, daß sich am primären Endpunkt sowohl 30 Tage als auch ein Jahr nach Implantation eines Koronarstents ein signifikanter Vorteil zugunsten von Abciximab ergab (108).

### 1.6.3 Thienopyridine

Experimentelle und klinische Studien belegen die Bedeutung der ADP-induzierten Thrombozytenaggregation für die arterielle Thrombose, besonders unter hohen Strömungsbedingungen (arterielle Zirkulation) und bei gestörter Endothelfunktion (Atherosklerose). Es wurde außerdem gezeigt, daß interventionelle Eingriffe an Blutgefäßen zu einer erhöhten Thrombozytenaktivität beitragen (39; 40; 42).

Thienopyridine inhibieren die ADP-induzierte Thrombozytenaktivierung, indem sie selektiv und irreversibel die Antwort am P2Y<sub>12</sub>-Rezeptor verhindern (109).

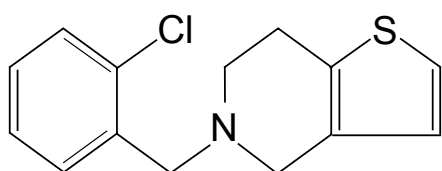
Als „prodrugs“ wirken Ticlopidin und Clopidogrel nicht in-vitro, sondern werden nach Resorption im Dünndarm durch die Leber in die aktiven Metaboliten verwandelt. Nach einer Einnahmedauer von drei bis vier Tagen ist ein sog. „steady state“ der

Wirkstoffkonzentration erreicht. Nach Absetzen der Thienopyridine hält die anti-thrombozytäre Wirkung für etwa fünf bis sieben Tage an (27; 94).

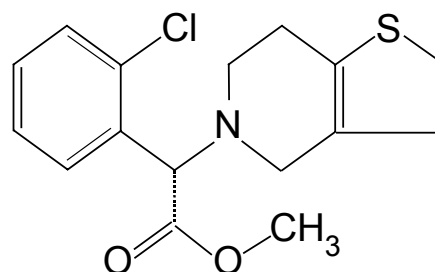
Ticlopidin wurde in den Achtziger Jahren zunächst im Rahmen der Schlaganfall-Therapie entdeckt. Der Einsatz der Substanz stellte eine wirkungsvolle Alternative zu ASS in der Sekundärprophylaxe atherothrombotischer Krankheitsbilder dar, wie in der „Ticlopidin Aspirin Stroke Study“ (TASS) und in weiteren Studien gezeigt werden konnte (50; 61; 83).

Der kombinierte Einsatz von Ticlopidin und ASS potenziert die antithrombozytäre Wirkung und schützt bei koronaren Interventionen wie der Stent-Implantation effektiver vor intrakoronaren thrombembolischen Ereignissen als eine Monotherapie mit ASS (15; 41; 74; 92; 95).

Clopidogrel wurde 1986 zugelassen. Strukturell unterscheidet es sich vom Ticlopidin wie Abbildung 1.6 zeigt.



Ticlopidin



Clopidogrel

**Abb. 1.6: Strukturformeln der Moleküle Ticlopidin und Clopidogrel**

Clopidogrel wird in der Leber durch Cytochrom P 450 3A4 metabolisiert. Der aktive Metabolit wurde als 2-{1-[(1S)-1-(2-chlorophenyl)-2-methoxy-2-oxoethyl]-4-sulfanyl-3-piperidinyli-diene}acetonsäure identifiziert (57; 90).



Nach etwa zwei Stunden ist bereits ein signifikanter Abfall der Thrombozytenfunktion meßbar. Unter Ticlopidin ist dies vergleichsweise erst nach zwei bis vier Tagen der Fall.

Seit Einführung der neueren Substanz beweist eine Vielzahl von Studien die Überlegenheit von Clopidogrel gegenüber Ticlopidin. So wurden die beiden Substanzen 1998 in der CLASSICS-Studie (Clopidogrel Aspirin Stent International Cooperative Study) verglichen. An mehreren europäischen Zentren wurde anhand von insgesamt 1 021 Patienten, bei denen eine koronare Stent-Implantation erfolgte, gezeigt, daß unter Clopidogrel-Therapie Symptome wie Blutungskomplikationen, Neutropenie, Thrombozytopenie signifikant seltener auftraten als unter Ticlopidin-Therapie; es kam seltener zum Abbruch der Therapie wegen nicht-kardialer Komplikationen. Dabei hatten Patienten, welche am ersten Tag der Therapie eine Ladungsdosis von 300mg Clopidogrel erhielten, wiederum einen signifikanten Vorteil gegenüber Patienten, die von Beginn an mit einer Standarddosis von 75mg Clopidogrel behandelt wurden (9).

Bei cerebralen Gefäßerkrankungen haben die Thienopyridine in der Prophylaxe und Sekundärprävention ischämischer Schlaganfälle gegenüber einer Aspirin-Monotherapie einen wachsenden Stellenwert erlangt. In einem internationalen Vergleich beider Substanzen wurde die deutlich effektivere antithrombozytäre Wirkung von Clopidogrel bei atherosklerotischen Gefäßerkrankungen kardialer, cerebraler und peripherer Art nachgewiesen (21).

Weitere Studien, welche die Effektivität der beiden Substanzen im Rahmen von koronaren Stent-Implantationen untersuchten, bestätigten die gleichwertige (71) bzw. stärkere (7) antithrombozytäre Wirkung der jüngeren Substanz und deren geringeres Nebenwirkungsspektrum. Eine Meta-Analyse aller Vergleichsstudien zu Ticlopidin versus Clopidogrel ergab nur halb so viele kardiale Ereignisse während der ersten 30 Tage nach Stent-Implantation unter Clopidogrel als unter Ticlopidin (2% vs. 3,9%). Die Verfasser kommen zu dem Schluß, daß Clopidogrel eine zumindest gleichwertige antithrombozytäre Wirkung zeigt wie Ticlopidin und aufgrund der besseren Verträglichkeit und geringeren Nebenwirkungsrate dem älteren Derivat vorzuziehen sei (11).

In der internationalen Studie zu „Clopidogrel in Unstable angina to prevent Recurrent Events“ (CURE) wurden 12 562 Patienten untersucht, welche ein akutes Koronarsyndrom hatten. Die Studienteilnehmer wurden nach doppelblinder Vertei-

lung sofort mit Clopidogrel (initial 300mg und dann täglich 75mg) oder mit Placebo zusätzlich zu Acetylsalicylsäure über drei bis zwölf Monate behandelt. Es zeigte sich, daß es bei mit Clopidogrel therapierten Patienten signifikant seltener (9,3%) zum Tod durch kardiovaskuläre Ursachen, nicht tödlichem Myokardinfarkt oder Schlaganfall kam als bei Patienten der Placebogruppe (11,4%). Der protektive Effekt war bereits während der ersten Tage nach Therapiebeginn sowie auch vom 30. Tag bis zum Ende der Studie nachweisbar. Allerdings traten in der Clopidogrel-Gruppe signifikant häufiger schwere Blutungen auf (3,7% vs. 2,7% in der Placebogruppe) (69; 104; 112).

Es wird demnach der Beginn einer antithrombozytären Therapie mit einer Ladungsdosis („loading dose“) empfohlen, um den Eintritt der Thrombozyten-inhibierenden Wirkung zu beschleunigen. Insbesondere zur antithrombotischen Prävention bei kurzfristigen kardialen Interventionen ist dies von großem Interesse.

Die Verfasser der CURE-Studie kamen analog im Rahmen einer prospektiven Begleitstudie (CURE-PCI) an 2 658 Patienten, welche sich einer Koronarstent-Implantation unterzogen, zu dem Ergebnis, daß eine sechs Stunden vor der Intervention gestartete Einnahme von Clopidogrel im Sinne einer Prämedikation zudem eine signifikante Reduktion von kardiovaskulären Todesfällen und Myokardinfarkten ergab (64).

Auch die CREDO-Studie untersuchte die Fragestellung, welchen Nutzen Clopidogrel in Kombination mit ASS für Patienten mit Indikation zur koronaren Angioplastie hat. Im Vergleich erhielten die Hälfte der Patienten drei bis 24 Stunden vor dem Eingriff die Ladungsdosis von 300mg. Weiterhin bekamen alle Patienten, auch die der Placebogruppe, 75mg täglich über vier Wochen. Während der folgenden zwölf Monate erhielten wiederum die Patienten der Verumgruppe weiterhin 75mg Clopidogrel pro Tag. Hierin konnte zum einen der Benefit der Vorbehandlung, zum anderen der Langzeittherapie bestätigt werden: Es ergab sich eine Reduktion des relativen Risikos um 27%.

Die häufigsten Nebenwirkungen der Thienopyridine sind Durchfälle, die in bis zu 20% (Ticlopidin) der behandelten Patienten auftreten und in bis zu 2,1% der Fälle zum Absetzen des Medikaments führen.

Daneben finden sich in bis zu 10% der Fälle Hautausschläge, womit v. a. unter Ticlopidin-Behandlung zu rechnen ist (68).

Blutungen traten in der CAPRIE-Studie an 19 185 Patienten unter Behandlung mit Thienopyridinen etwa gleich häufig auf wie unter Acetylsalicylsäure. Bei 9,27% der mit Clopidogrel therapierten Patienten wurden hämorrhagische Nebenwirkungen diagnostiziert, unter ASS bei 9,28%. Unter Clopidogrel traten diese bei 2% im Gastrointestinaltrakt und bei 0,35% intracranial auf; unter ASS hatten 2,66% der Patienten gastrointestinale und 0,49% intracraniale Hämorrhagien (21).

Eine schwerwiegende Nebenwirkung von Ticlopidin ist die Neutropenie, die in etwa 2,5% der Patienten auftritt und in 0,9% der Fälle sehr ausgeprägt ist (< 450/ $\mu$ l). Die schweren Neutropenien werden üblicherweise während der ersten drei Behandlungsmonate, sehr selten jedoch innerhalb der ersten vier Behandlungswochen beobachtet und sind im allgemeinen nach Absetzen des Medikaments reversibel. Ebenso kommt es in Einzelfällen unter Behandlung mit Ticlopidin zu signifikanten Thrombopenien, weshalb engmaschige Blutbildkontrollen während der ersten Behandlungszeit notwendig sind (37).

Sehr selten, aber potentiell lebensbedrohlich, kommt es unter Ticlopidin zu einer thrombotisch-thrombozytopenischen Purpura (TTP), dem Moschcowitz-Syndrom. Es handelt sich um eine Multisystemerkrankung, die mit einer Thrombozytopenie, einer hämolytischen Anämie, Fieber, neurologischen Ausfällen und Nierenversagen einhergeht. Sie wurde auch unter Clopidogrel beobachtet, wenn auch bedeutend seltener (1/3 000 000 Menschen pro Jahr vs. 4/1 000 000 unter Ticlopidin). Dieses Risiko sollte vor allem während der ersten Therapiewoche mit Thienopyridinen beachtet werden (6; 29; 84; 99).

Eine zirrhotische Erkrankung der Leber im Stadium Child A oder B macht den Ergebnissen einer Untersuchung zufolge eine Dosis-Anpassung von Clopidogrel nicht erforderlich – weder Metabolisierung noch Wirkung der Substanz waren eingeschränkt (98). Auch konnte gezeigt werden, daß die Metabolisierung von Clopidogrel, welches über drei Monate in konstanter Dosierung verabreicht wurde, linear blieb (20).

## 2. Zielsetzung

Es wurde ausreichend bewiesen, daß die orale Einnahme des Thrombozytenaggregationshemmers Ticlopidin im Rahmen einer Stent-Implantation bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung thrombembolischen Ereignissen entgegenwirkt. In-vitro-Versuche zeigten allerdings eine aggregationshemmende Wirkung erst zwei bis vier Tage nach Einnahme in vollem Ausmaß.

Das Thienopyridinderivat Clopidogrel entfaltet dagegen schneller seine anti-thrombozytären Eigenschaften. Da es ein deutlich geringeres Spektrum an Nebenwirkungen besitzt, jedoch mindestens die gleiche antithrombozytäre Wirkstärke zeigt, ist der Einsatz von Clopidogrel dem von Ticlopidin vorzuziehen (9).

Ziel dieser Arbeit war es einerseits, die thrombozyteninhibierende Wirkung von Clopidogrel und Ticlopidin bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung und elektiver intrakoronarer Stentimplantation experimentell zu vergleichen. Andererseits sollte ein optimales Regime zur Dosierung von Clopidogrel vor Durchführung einer koronaren Gefäßintervention evaluiert werden. Zu diesem Zweck wurden fünf Therapie-schemata verglichen:

Ticlopidin 2 x 500mg Ladungsdosis, 2 x 250mg Erhaltungsdosis

Clopidogrel 1 x 600mg Ladungsdosis, 2 x 75mg Erhaltungsdosis

Clopidogrel 1 x 450mg Ladungsdosis, 1 x 75mg Erhaltungsdosis

Clopidogrel 1 x 300mg Ladungsdosis, 1 x 75mg Erhaltungsdosis

Clopidogrel 1 x 75mg Erhaltungsdosis (ohne Ladungsdosis)

## 3. Patienten und Methodik

### 3.1 Studienpopulation und Studiendesign

Bei 50 Patienten wurde im Rahmen einer prospektiv und randomisiert durchgeführten Studie die Aktivität der Thrombozyten unter dem Einfluß von Ticlopidin bzw. Clopidogrel in verschiedenen Dosierungen untersucht. Die Patienten hatten sich aufgrund einer koronarischämischen Symptomatik einer Koronarangiographie und bei gegebener Indikation einer PTCA mit Implantation eines Stent unterzogen bzw. sich sechs Monate nach Stentimplantation zur Rekoronarangiographie vorgestellt.

Nicht in die Studie aufgenommen wurden Patienten mit

- erhöhtem Blutungsrisiko
- bekannten Blutgerinnungsstörungen
- Thrombozytopenie bzw. Thrombozytose
- bekannter Unverträglichkeit von Thienopyridinen
- cerebralen Erkrankungen, insbesondere mit Blutungsquelle
- eingeschränkter Leberfunktion
- anderen klinisch bedeutsamen Erkrankungen

Ebenfalls ausgeschlossen wurden Patienten, die während der letzten vier Wochen Ticlopidin oder Clopidogrel eingenommen hatten.

Die Patienten wurden vom diensthabenden Arzt aufgenommen und untersucht und erklärten sich schriftlich damit einverstanden, an der Studie teilzunehmen.

Die Genehmigung durch die Ethikkommission der Technischen Universität München lag vor (Bearbeitungsnummer 191/99).

### 3.2 Antithrombozytäre Therapie

Während der intrakoronaren Intervention wurde allen Patienten ein Bolus von 500mg Aspirin intravenös sowie unfraktioniertes Heparin (70 IE/kg KG) verabreicht.

Alle Patienten erhielten im Folgenden zwei mal täglich 100mg Aspirin oral. In die fünf Studienarme wurden jeweils zehn Patienten eingeschlossen:

Studienarm	Behandlungstag	Dosis (mg)
Ticlopidin	1.	500 - 0 - 500
	2.	500 - 0 - 250
	ab 3.	250 - 0 - 250
Clopidogrel 75mg	ab 1.	75 - 0 - 0
Clopidogrel 300mg	1.	300 - 0 - 0
	ab 2.	75 - 0 - 0
Clopidogrel 450mg	1.	450 - 0 - 0
	ab 2.	75 - 0 - 0
Clopidogrel 600mg	1.	600 - 0 - 0
	ab 2.	75 - 0 - 75

250mg Ticlopidin sind enthalten in einer Filmtablette *Tiklyd*<sup>®</sup>.

75mg Clopidogrel sind enthalten in einer Filmtablette *Plavix*<sup>®</sup> bzw. *Iscover*<sup>®</sup>.

Im Verlauf der Studie wurde die Thrombozytenfunktion vor Einnahme des Medikaments untersucht sowie zwei, vier, 24, 48 Stunden danach.

Die demographischen Daten der Studienpopulation zeigt Tabelle 3.1.

	<b>Ticlopidin</b>	<b>Clopidogrel</b>			
<b>Initiale Dosis (mg)</b>	<b>2 x 500</b> n = 10	<b>600</b> n = 10	<b>450</b> n = 10	<b>300</b> n = 10	<b>75</b> n = 10
<b>Geschlecht (M/W)</b>	9/1	6/4	10/0	9/1	7/3
<b>Alter(J), Mittelwert ± SD</b>	66 ± 10	63 ± 9	59 ± 7	67 ± 11	74 ± 8
<b>Koronare Herzkrankheit, n</b>					
1-Gefäß	3	4	3	1	4
2-Gefäße	3	4	3	4	4
3-Gefäße	4	2	4	5	2
<b>Myokardinfarkt, n in der Vorgeschichte</b>	7	3	5	6	9
<b>Z. n. PTCA mit Stent-Implantation, n</b>	2	6	3	7	4
<b>Z. n. Bypass-Operation(en), n</b>	1	3	1	3	4
<b>Kardiovaskuläres Risikoprofil, n</b>					
Hypercholesterinämie	10	9	9	9	9
Hypertonus	8	8	7	9	7
Nikotinabusus	3	4	4	0	2
Diabetes mellitus	0	1	1	0	1
<b>BMI, Mittelwert und SD</b>	26,5 ± 2,6	28,4 ± 3,4	26,9 ± 4,4	27,1 ± 3,4	26,6 ± 4,5

**Tab. 3.1: Demographische Daten der Studienpopulation**

Zwei Patienten unter Ticlopidin- sowie ein Patient unter Clopidogrel-Therapie klagten zu Beginn des Beobachtungszeitraumes über Übelkeit bzw. leichte Diarrhoe; ein Abbruch der Therapie war jedoch nicht erforderlich. Arzneimittelexantheme wurden nicht beobachtet.

Es traten – insbesondere an der Kathetereinstichstelle in die Femoralarterie – keine Blutungskomplikationen auf.

### **3.3 Gewinnung und Verarbeitung der Proben**

Die Thrombozytenfunktion wurde nach jeder Blutentnahme anhand der Thrombozytenaggregation und der Thrombozytendegranulation sowie der Expression von GPIIb-IIIa untersucht.

Aus einer Oberarmvene des Patienten wurden bei mäßiger Stauung zwei 5ml Citrat-Röhrchen und ein 2,7ml EDTA-Röhrchen mit Blut befüllt. Aus letzterem wurde in der Abteilung für Klinische Chemie unserer Klinik ein kleines Blutbild bestimmt, um den Verlauf von Thrombozytenzahl, Hämatokrit und Hämoglobin zu kontrollieren.

Das mit Citrat antikoagulierte Blut wurde innerhalb von 30 Minuten weiterverarbeitet.

Zunächst wurden mittels Pipette aus einem der Röhrchen 10µl Blut für die durchflußzytometrische Messung entnommen und in einem 1,5ml Eppendorf-Gefäß mit 490µl einer Phosphatsalzlösung (PBS) gepuffert (Verhältnis 1:50).

Anschließend wurde aus den beiden Citratblut-Röhrchen durch zehninütiges Zentrifugieren (1 000 Umdrehungen pro Minute bei Raumtemperatur) das plättchenreiche Plasma für die aggregometrische Messung gewonnen. Dieses wurde vorsichtig vom Bodensatz aus den Röhrchen abpipettiert und in einem 15ml Kunststoffgefäß (Falcon, Fa. Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland) gesammelt. Sämtliche Pipettierungen wurden mit Pipetten der Firma Eppendorf (Hamburg, Deutschland) durchgeführt.



Für die durchflußzytometrische Messung wurden jeweils 5µl zweier unterschiedlich fluoreszierender monoklonaler Antikörper in FACScan-Röhrchen (Firma Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland) pipettiert: Der durch Konjugation mit Phycoerythrin (PE) rot fluoreszierende Antikörper gegen den thrombozytenspezifischen CD42b-Rezeptor (Immunotech, Marseille, Frankreich; PN IM 1417) wurde in jeweils drei Röhrchen mit einem der durch Fluoreszein-Isothiocyanat (FITC) grün fluoreszierenden Antikörper gegen CD41 (Immunotech, Marseille, Frankreich; PN IM 0649), CD62P (Immunotech, Marseille, Frankreich; Cat. No. 1164) bzw. PAC-1 (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland; Cat. No. 340507) kombiniert. Die verwendeten Antikörper lagen in einer Endkonzentration von 2µg/ml vor.

In je ein Röhrchen der drei Antikörperreihen wurden 5µl des nicht-aktivierenden PBS für die Referenzmessung bzw. zur Thrombozytenaktivierung 5µl ADP (0,2mM)- bzw. 5µl TRAP (Thrombin Related Activating Peptid, 0,25mM)-Lösung gegeben. Die Agonisten ADP und TRAP lagen so in einer Endkonzentration von 20 bzw. 25µM vor (Tab. 3.2).

Mit Zugabe von 35µl des in PBS gepufferten plättchenreichen Plasmas in jedes Röhrchen ergab sich ein Gesamtreagenz volumen von 50µl. Die Reaktionslösungen wurden 20 Minuten unter Lichtabschluß bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend durch Zupipettieren von 300µl 0,5%-igem Paraformaldehyd-PBS, pH 7,4, (Fa. Sigma, Deisenhofen, Deutschland) fixiert.

Die Proben wurden bis zur Messung bei 4°C unter Lichtabschluß aufbewahrt.

CD42b PE + CD41 FITC + PBS	CD42b PE + PAC-1 + PBS	CD42b PE + CD62P + PBS
CD42b PE + CD41 FITC + ADP (0,2mM)	CD42b PE + PAC-1 + ADP (0,2mM)	CD42b PE + CD62 P + ADP (0,2mM)
CD42b PE + CD41 FITC + TRAP (0,25mM)	CD42b PE + PAC-1 + TRAP (0,25mM)	CD42b PE + CD62 P + TRAP (0,25mM)

**Tab. 3.2: Pipettierschema für die Durchflußzytometrie** (1 Kästchen = 1 Falcon-Röhrchen)

Bei mit 300 und 600mg Ladungsdosis Clopidogrel behandelten Patienten wurde noch eine zusätzliche durchflußzytometrische Bestimmung mit 5µM Endkonzentration ADP vorbereitet.

### **3.4 Aggregometrie**

Die Thrombozytenaggregation wurde anhand der turbidimetrischen Methode nach Born bestimmt (14). Es handelt sich hierbei um ein photometrisches Messverfahren, bei dem mittels eines Schreibers die Änderung der optischen Dichte im zu bestimmenden Medium in Form einer Kurve aufgezeichnet wird. Je stärker die Thrombozyten aggregieren, desto mehr erhöht sich die Lichtdurchlässigkeit des zunächst trüben, partikelreichen Plasmas, wodurch die Amplitude der entstehenden Meßkurve umso größer wird (s. 3.4.2). Ebenfalls im Strahlengang des Photometers befindet sich die Referenzküvette mit plättchenarmem Plasma, welches den 100%-Wert der Lichttransmission wiedergibt.

Im selben Messgang läßt sich durch Zugabe einer Luziferase-Reagenz-Lösung, welche ATP luminometrisch erfassbar macht, die Menge des aus den Thrombozyten freigesetzten ATPs bestimmen, die ebenfalls anhand einer Kurve über einen weiteren Schreiber aufgezeichnet wird. Die absolute Menge des freigesetzten ATPs wird mit Hilfe einer Standardmeßkurve, bei welcher eine definierte ATP-Menge freigesetzt wurde, ermittelt.

#### **3.4.1 Messung am Aggregometer**

Die Luziferase-Lösung (Chrono-Lume-Reagenz #315, Fa. Nobis, Endingen, Deutschland) und die ATP-Standard-Lösung (Chrono-Lume ATP, Fa. Sigma, Deisenhofen, Deutschland) wurden lichtgeschützt und auf Eis gelagert bereit gestellt. Es handelt sich hierbei um gefriergetrocknete Lyophilisate, welche durch Zugabe von 1,25 bzw. 5ml PBS und anschließendem Aufschütteln in Lösung gebracht und im Gefrierfach aufbewahrt wurden. Ebenfalls mit PBS hergestellt wurden die Agonisten

ADP und TRAP (SIGMA-TRAP® #7152) in einer Konzentration von 2mM bzw. 2,5mM.

Je 445µl PRP wurden zusammen mit einem Magnetrührstäbchen in vier silikonbeschichtete Glasküvetten (Fa. Bio-Data, Horsham, USA) gegeben und diese in den Wärmekammern des Aggregometers auf 37°C vorgewärmt. Aus 800µl PRP wurden durch dreiminütiges Zentrifugieren (13 000 Umdrehungen pro Minute) in einem 1,5ml Eppendorf-Gefäß 500µl PPP für die Referenzküvette gewonnen, vom Bodensatz abpipettiert und ebenfalls in einer Glasküvette in einer Wärmekammer des Aggregometers vorgewärmt.

Die Referenz- und die Messküvette wurden anschließend in die dafür vorgesehenen Kammern des Strahlenganges gebracht, und in die Messküvette unter konstanter Rührung (1 000 Umdrehungen pro Minute) 50µl Chronolume-Reagenz gegeben. Die beiden Schreiber wurden auf die jeweiligen Nulllinien justiert und der Papiervorschub auf zwei cm/Min. eingestellt.

Anschließend wurde jeweils in der ersten Messung durch Zupipettieren von 5µl ATP-Standard-Lösung in die Meßküvette die Freisetzung von exakt 2mMol ATP ausgelöst, womit die ATP-Standard-Kurve vorlag. In den folgenden Messungen wurde nach Zugabe von 5µl eines Agonisten die Aggregationskurve über einen Zeitraum von fünf Minuten aufgezeichnet. Es wurde mit den Endkonzentrationen von ADP 20µM und 5µM (Zugabe von 5µl ADP 20mM und 5mM) und TRAP 25µM (Zugabe von 5µl TRAP 25mM) aktiviert. Nach jedem Messvorgang wurde die verbrauchte Meßküvette verworfen und eine neue verwendet.

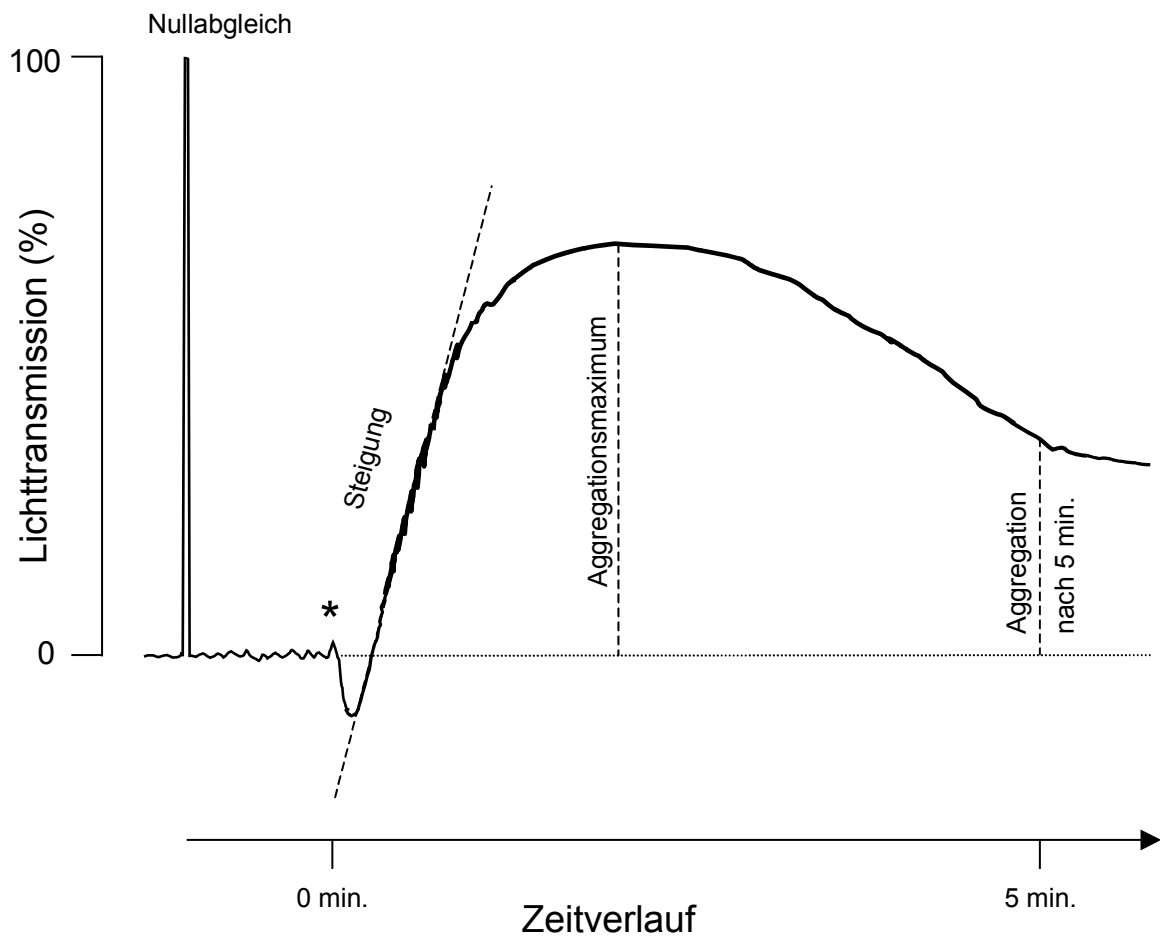
### **3.4.2 Auswertung der Aggregationskurven**

Aus den aufgezeichneten Kurven wurden die Werte der Aggregation und der ATP-Freisetzung errechnet. Die Aggregation wird in Prozent Lichttransmission angegeben, deren maximal möglicher Wert (100%) vorher mittels einem Nullabgleich bestimmt wird (Abb.3.1).

Aus dem Kurvenverlauf lassen sich mittels Dreisatzrechnung folgende Aggregationsparameter feststellen:

- Aggregation nach 5 Minuten
- Aggregationsmaximum

- Aggregationssteigung: „slope“ bzw. Steilheit der Aggregationskurve dient als Maß für die Schnelligkeit, mit der sich Plättchenaggregate bilden. Sie wird aus dem Steigungsdreieck errechnet.
- Deaggregation: Hierunter versteht man eine Wiederauflösung entstandener Plättchenaggregate, d. h. die Reversibilität der Thrombozytenaggregation. Sie errechnet sich durch die Formel  $100 - (Aggr. n. 5 \text{ min} / \text{Max. Aggr.} / 100)$ .



\* Zugabe von 5 µl ADP bzw. TRAP

**Abb. 3.1: Aggregationskurve:**

Aus dem Nullabgleich zu Beginn der Aufzeichnung ermittelt man 100% Lichtdurchlässigkeit, was einer 100%igen Aggregation entspräche.

Simultan zur Aggregation wurde in einer zweiten Kurve die ATP-Freisetzung aufgezeichnet. Aus dem Verhältnis zur ATP-Standardkurve, welche durch Freisetzung von 2mMol ATP erzeugt wird, konnte die Menge des freigesetzten ATP ermittelt werden.

## **3.5 Durchflußzytometrie**

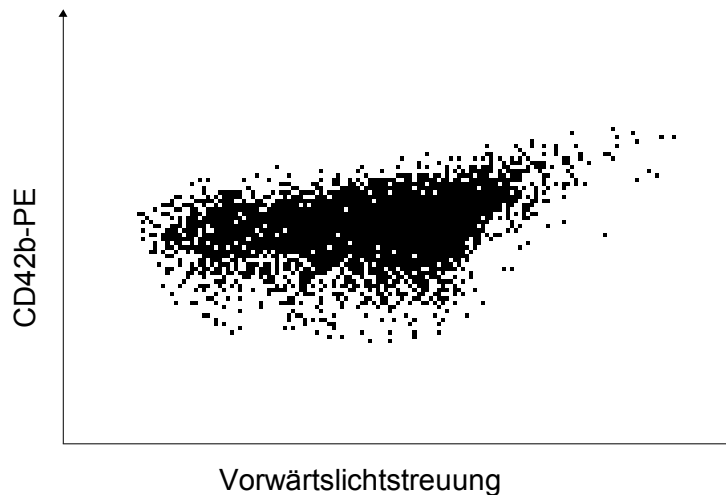
### **3.5.1 Durchflußzytometrische Analyse von Thrombozyten**

Während durch die Aggregometrie herausgefunden werden kann, wie stark die Blutplättchen nach Zugabe eines Stimulus aggregieren, d. h. wie funktionstüchtig sie sind, können in der Durchflußzytometrie spezifische Eigenschaften der Plättchenoberfläche festgestellt werden. So können in der Durchflußzytometrie qualitative Aussagen über den Funktionszustand der thrombozytären Oberflächenrezeptoren gemacht und z. B. hereditäre Defekte wie das Bernard-Soulier-Syndrom oder der Morbus Glanzmann-Naegeli erkannt werden.

Die Expression von Antigenen auf der Oberfläche des Thrombozyten gibt Aufschluß über seinen Aktivierungsgrad. Die verschiedenen Glykoproteine wie der Fibrinogenrezeptorkomplex können je nach Funktionszustand im Durchflußzytometer dargestellt werden, wenn sie in gesättigten Konzentrationen mit fluoreszierenden monoklonalen Antikörpern inkubiert wurden. Spezifische Photodioden registrieren das von den einzelnen Zellen ausgesendete Streulicht und die Intensität der Fluoreszenz. Dabei kann durch das vorwärts gestreute Licht („forward scatter“) auf die Größe und durch das seitwärts gestreute Licht („side scatter“) auf die Granularität der gemessenen Partikel geschlossen werden (37).

Anhand ihres charakteristischen Vorwärtsstreulichts und der Anfärbarkeit des vWF-Rezeptors mit anti-CD42b PE können aus den insgesamt registrierten Partikeln speziell die Thrombozyten fokussiert werden, so daß andere zelluläre Bestandteile in der Probe wie Erythrozyten, Leukozyten oder Zelldetritus nicht mitbestimmt werden. Dazu werden nach einer ersten Messung diese beiden Parameter in einem Diagramm dargestellt und der Meßbereich auf die Thrombozytenpopulation zentriert. In diesem werden dann die Immunfluoreszenzen der FITC-markierten Antikörper regi-

striert und aus einer bestimmten Anzahl registrierter Ereignisse (in vorliegender Studie 2 500 Ereignisse) je Probe der Mittelwert bestimmt (Abb. 3.2).

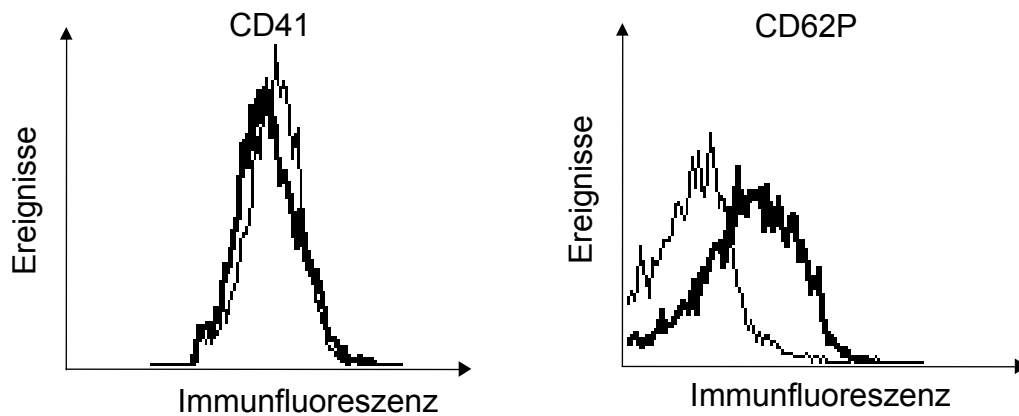


**Abb. 3.2: Die Zwei-Parameter-Darstellung in der Durchflußzytometrie:**

Jeder Punkt im Diagramm entspricht einer Zelle mit der entsprechenden CD42b-PE-Fluoreszenz und Vorwärtslichtstreuung. Der aus den einzelnen Punkten entstehende Streubereich ist charakteristisch für die Thrombozytenpopulation.

Im einmal eingestellten Bereich wurde eine Probenreihe konstant gemessen.

Die gemessene FITC-Fluoreszenz der Plättchenpopulation wird ebenfalls in Diagrammen dargestellt, wobei die Intensitäten der Ereignisse ähnlich einer Gauß'schen Verteilungskurve abgebildet werden, und so die mittlere Immunfluoreszenz abgelesen werden kann (Abb. 3.3).



**Abb. 3.3: Die Darstellung als Histogramm in der Durchflußzytometrie:**

Abgebildet sind jeweils die Intensitätsverteilungen von zwei Messproben mit je 2 500 registrierten Fluoreszenz-Ereignissen. Die fett dargestellten Kurven stammen von Proben mit stimulierten Thrombozyten und somit veränderter Gesamtintensität, erkennbar an der Verschiebung der Kurve in Richtung höherer bzw. niedrigerer Fluoreszenzintensitätsbereiche.

Die Proben in unserer Studie wurden mit dem 2-Watt-Argonlaser-Durchflußzytometer „FACScan“ (Fa. Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland) gemessen und die Ergebnisse durch das angeschlossene Datenverarbeitungsprogramm ausgewertet. Das Gerät war mit Standard-Fluoreszenz-Mikrobeads (Calibrite®, Fa. Becton-Dickinson, Heidelberg, Deutschland) geeicht worden. Die Parametereinstellung des Durchflußzytometers findet sich auf S. 87 im Anhang.

### 3.5.2 Interpretation der durchflußzytometrischen Ergebnisse

Die Intensität der Immunfluoreszenz schwankt je nach Expression aktivierungsabhängiger Oberflächenrezeptoren. Die mittlere Immunfluoreszenz von Antikörpern wie anti-CD62P oder anti-PAC-1 steigt, nachdem die Plättchen durch ADP oder TRAP stimuliert wurden. Diese exprimieren nach Aktivierung vermehrt aggregierungsspezifische Glykoproteine auf ihrer Oberfläche, an welche die fluoreszierenden Immunmarker binden. Nach Einnahme von Aggregationshemmern, welche speziell den thrombozytären ADP-Rezeptor blockieren, exprimieren die Plättchen weniger

GPIIb-IIIa, wodurch die spezifische Immunfluoreszenz weniger ansteigt. Die Intensitäten der verschiedenen Antikörper liegen dabei auf unterschiedlichen Niveaus.

Durch die Markierung mit dem monoklonalen Antikörper anti-CD41 läßt sich die gesamte Oberflächendichte an Fibrinogenrezeptoren - unabhängig von deren Aktivierungszustand - feststellen. PAC-1-Antikörper binden hingegen nur an den aktivierten Komplex (60). Daher bleibt die mittlere Immunfluoreszenz für CD41 im Therapieverlauf relativ konstant, während die von anti-PAC-1-markierten Zellen erwartungsgemäß abnimmt. Ebenso kommt es zur Abnahme der thrombozytären Degranulation von  $\alpha$ -Granula, was sich durch eine verminderte Expression von P-Selektin zeigt, an welches anti-CD62P bindet. Die Oberflächendichte von Glykoprotein Ib-V-IX verringert sich nach Aktivierung der Blutplättchen durch Rezeptorinternalisierung, weshalb die anti-CD42b Fluoreszenz im stimulierten Zustand sinkt (37).

### **3.6 Statistische Auswertung**

Die statistische Datenanalyse erfolgte mittels nicht-parametrischer Testverfahren, da aus dem Test nach Kolmogorov-Smirnov hervorging, daß die Ergebnisse der Untersuchung nicht der Gauß'schen Normalverteilung entsprachen.

Die Signifikanzniveaus wurden durch den Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben ermittelt. Alle p-Werte kleiner 0,05 wurden als signifikant, kleiner 0,01 als hochsignifikant gewertet.



## 4. Ergebnisse

Im folgenden werden die Ergebnisse aus Aggregationsmessung und Durchflußzytometrie erläutert.

### 4.1 Aggregationsverhalten unter Therapie mit Ticlopidin bzw. Clopidogrel

#### 4.1.1 Aggregationsverlauf

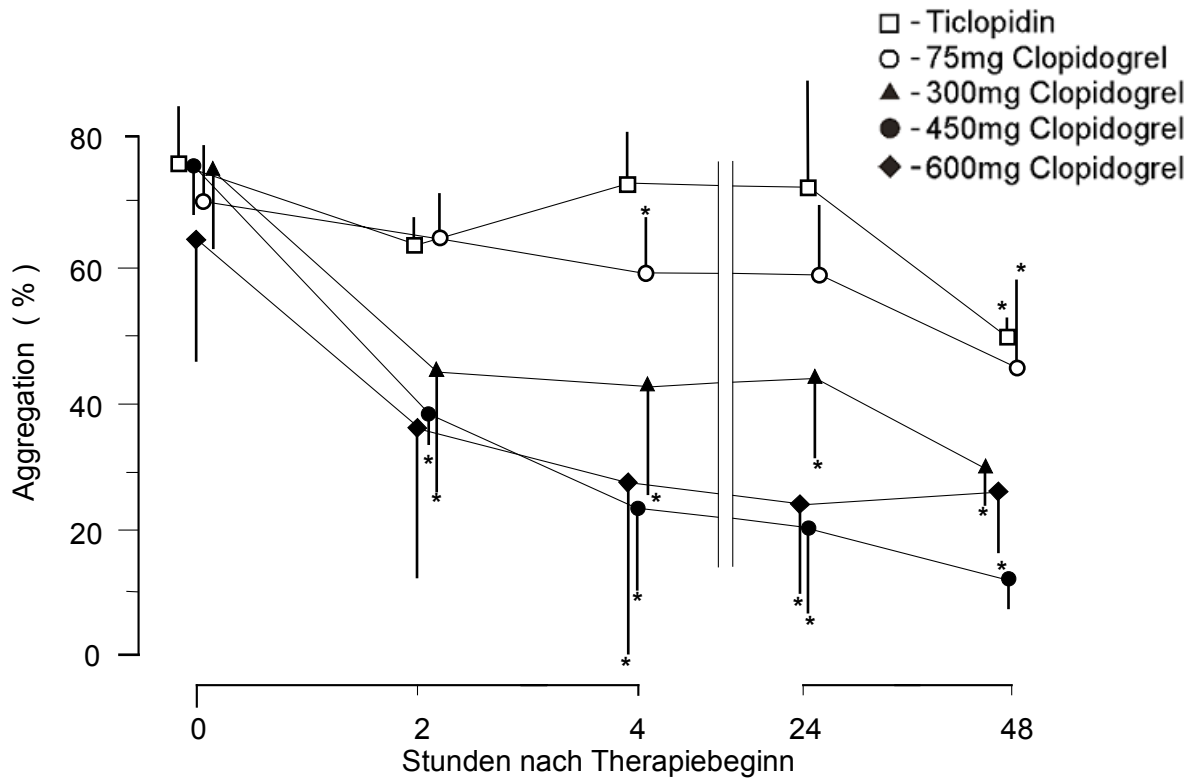
Anhand der Aggregationskurven wurde wie in Abbildung 3.1 erläutert die Aggregation fünf Minuten nach Aktivierung, das Aggregationsmaximum, die Deaggregation sowie die Steigung der Aggregationskurve jeweils nach Zugabe von ADP in 5 und 20 $\mu$ M und TRAP in 25 $\mu$ M Konzentration festgestellt.

Die Ergebnisse der Aggregation fünf Minuten nach Aktivierung zeigt Tabelle I im Anhang.

Die ADP-induzierte Aggregation nahm in den einzelnen Studienarmen in unterschiedlichem Ausmaß ab: Unter Aktivierung mit 20 $\mu$ M ADP sank die Aggregation in der Ticlopidin-Gruppe innerhalb von 48 Stunden von 78,0% auf 50,3%; die Abnahme der Aggregation war nach 48 Stunden signifikant ( $p = 0,046$ ).

Unter 75mg Clopidogrel zeigte sich die Aggregation nach vier ( $p = 0,021$ ) und 48 Stunden ( $p = 0,008$ ) signifikant niedriger, unter 300 bzw. 450mg bereits ab der zweiten Stunde ( $p = 0,005$  bzw.  $0,009$ ). Unter 450mg Clopidogrel sank die Aggregation von 77,2% auf 12,9% nach 48 Stunden. Hier näherten sich die Messergebnisse, die zusätzlich eine Stunde nach Einnahme erhoben wurden, bereits der Signifikanzgrenze ( $p = 0,068$ ).

Unter 600mg Clopidogrel fiel die Aggregation ab der vierten Stunde nach Einnahme signifikant geringer aus ( $p = 0,015$ ) und lag nach 48 Stunden bei 26,3% (Abb. 4.1).



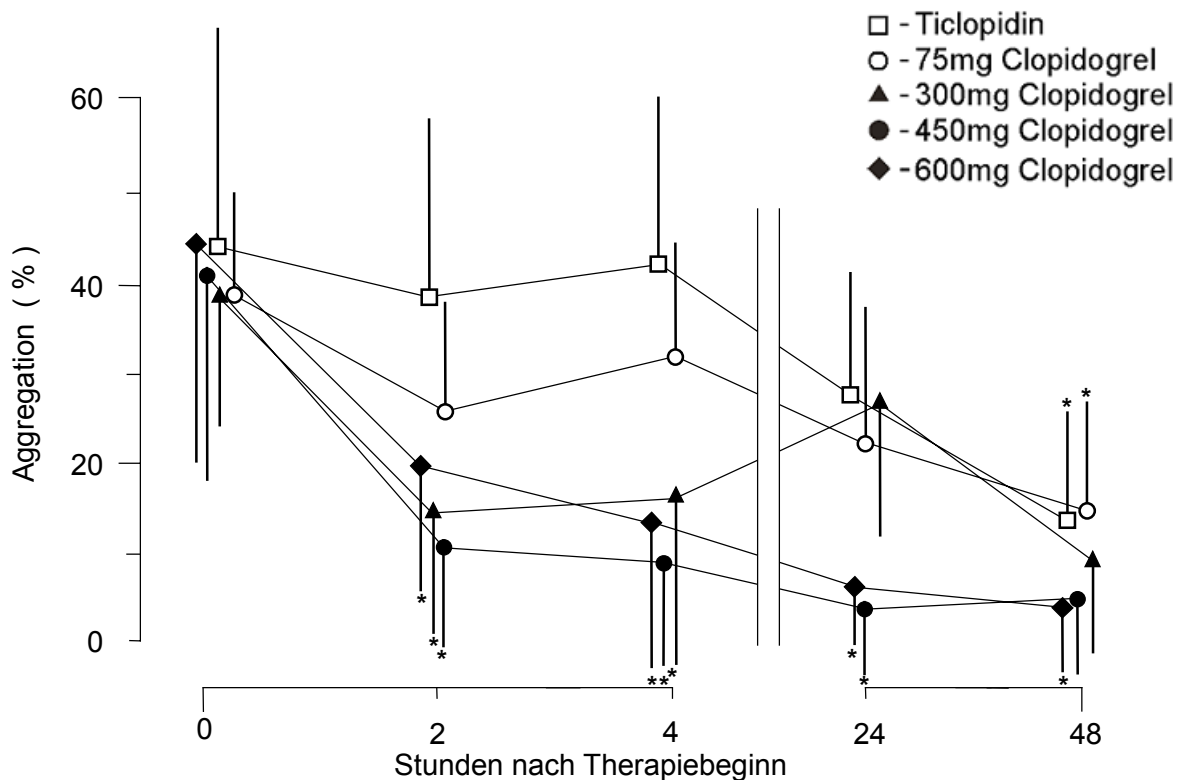
**Abb. 4.1: Aggregation** fünf Minuten nach Aktivierung mit 20µM ADP (\* p < 0,05)

(Mittelwert ± Standardabweichung)

Unter Aktivierung mit 5µM ADP zeigte sich ein ähnlicher Verlauf wie mit 20µM ADP. Nach einer Ladungsdosis Clopidogrel reduzierte sich die Aggregation innerhalb von zwei Stunden signifikant (600mg p = 0,022; 450mg p = 0,009; 300mg p = 0,008), unter Ticlopidin und 75mg Clopidogrel dagegen erst am zweiten Tag (48 Stunden) nach Therapiebeginn (jeweils p = 0,028).

Unter Ticlopidin fiel die Aggregation innerhalb von 48 Stunden von 44,3% auf 13%, unter 75mg Clopidogrel von 39,0% auf 14,4%, unter 300mg Clopidogrel von 75,7% auf 31,9%, unter 450mg Clopidogrel von 41,5% auf 4,4%, unter 600mg Clopidogrel von 44,0% auf 3,4%, (Abb. 4.2).

Wiederum lag bereits eine Stunde nach Einnahme von 450mg Clopidogrel das Signifikanzniveau p bei 0,068.



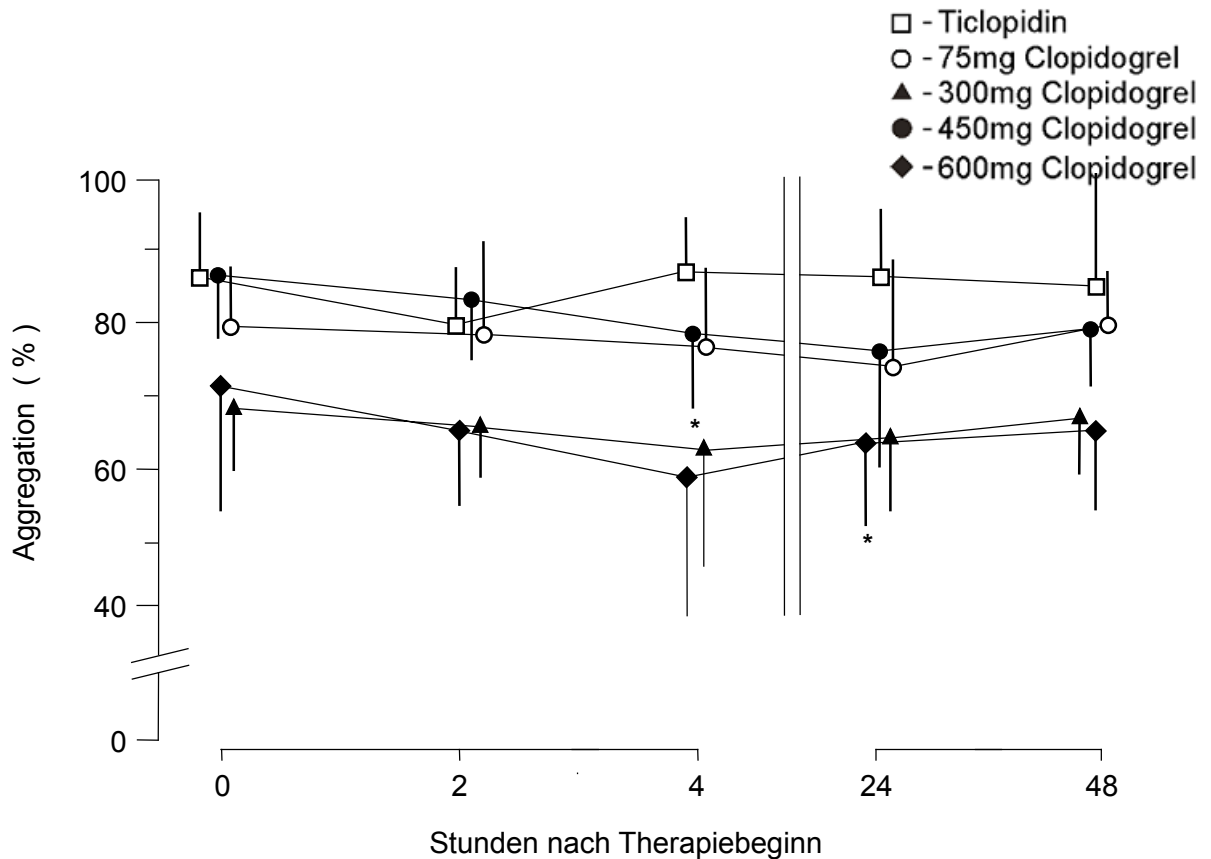
**Abb. 4.2: Aggregation** fünf Minuten nach Aktivierung mit 5 $\mu$ M ADP (\* p < 0,05)

(Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung)

Im Vergleich zur ADP-induzierten Aggregation veränderte sich die TRAP-induzierte unter dem Einfluß von Clopidogrel kaum: unter 75mg betrug sie anfangs 79,3%, nach 48 Stunden 78,9%; unter 300mg anfangs 68,6% nach 48 Stunden 65,4%.

Unter 450mg bzw. 600mg Clopidogrel ließ sich die Aggregation mittels TRAP nach vier bzw. 24 Stunden signifikant (p = 0,011 bzw. 0,021) weniger induzieren (450mg initial 86,6%, vier Stunden 77,6%, 24 Stunden 75,5%; 600mg initial 70,9%, vier Stunden 59,3%, 24 Stunden 64,0%).

Unter Ticlopidin trat im Behandlungsverlauf keine signifikante Veränderung der durch TRAP ausgelösten Aggregation auf (initial 86,4%; 24 Stunden 82,8%) (Abb. 4.3).



**Abb. 4.3: Aggregation** fünf Minuten nach Aktivierung mit 25µM TRAP (\* p < 0,05)

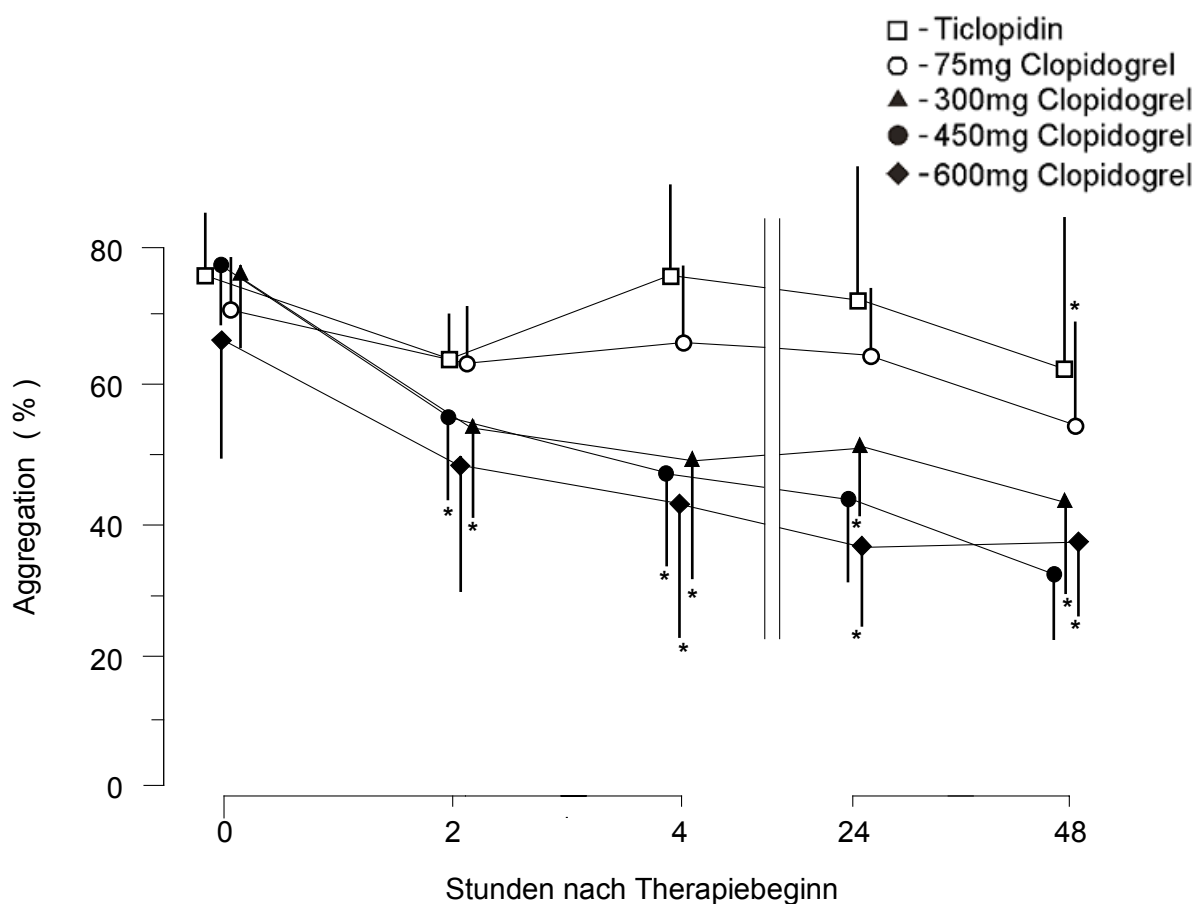
(Mittelwert ± Standardabweichung)

#### 4.1.2 Aggregationsmaximum

Die Ergebnisse der Aggregationsmaxima sind in Tabelle II im Anhang aufgeführt.

Auch das Aggregationsmaximum nach ADP-Aktivierung verringerte sich in allen Studienarmen. Auch hier zeigten die Therapien unter Clopidogrel mit Ladungsdosis die stärkere Wirkung bzw. den schnelleren Wirkungseintritt: Innerhalb von 48 Stunden war das durch 20µM ADP ausgelöste Aggregationsmaximum unter Ticlopidin von 77,3% auf 63,0% zurückgegangen, nach 300mg Clopidogrel von 77,5% auf 44,3 % (p = 0,043) und unter 600 mg von 66,9% auf 38,1% (p = 0,028).

Unter Clopidogrel mit einer Ladungsdosis war das Aggregationsmaximum bereits nach zwei (300mg  $p = 0,005$ ; 450mg  $p = 0,007$ ) bzw. vier Stunden (600mg  $p = 0,015$ ) signifikant kleiner; nach Beginn mit 75mg war es nach 48 Stunden mit  $p = 0,075$  nicht-signifikant erniedrigt. Unter 450mg Clopidogrel lag das Signifikanzniveau bereits eine Stunde nach Einnahme bei  $p = 0,068$ . Ticlopidin konnte dagegen keinen signifikanten Einfluß auf das Aggregationsmaximum nehmen (Abb. 4.4).



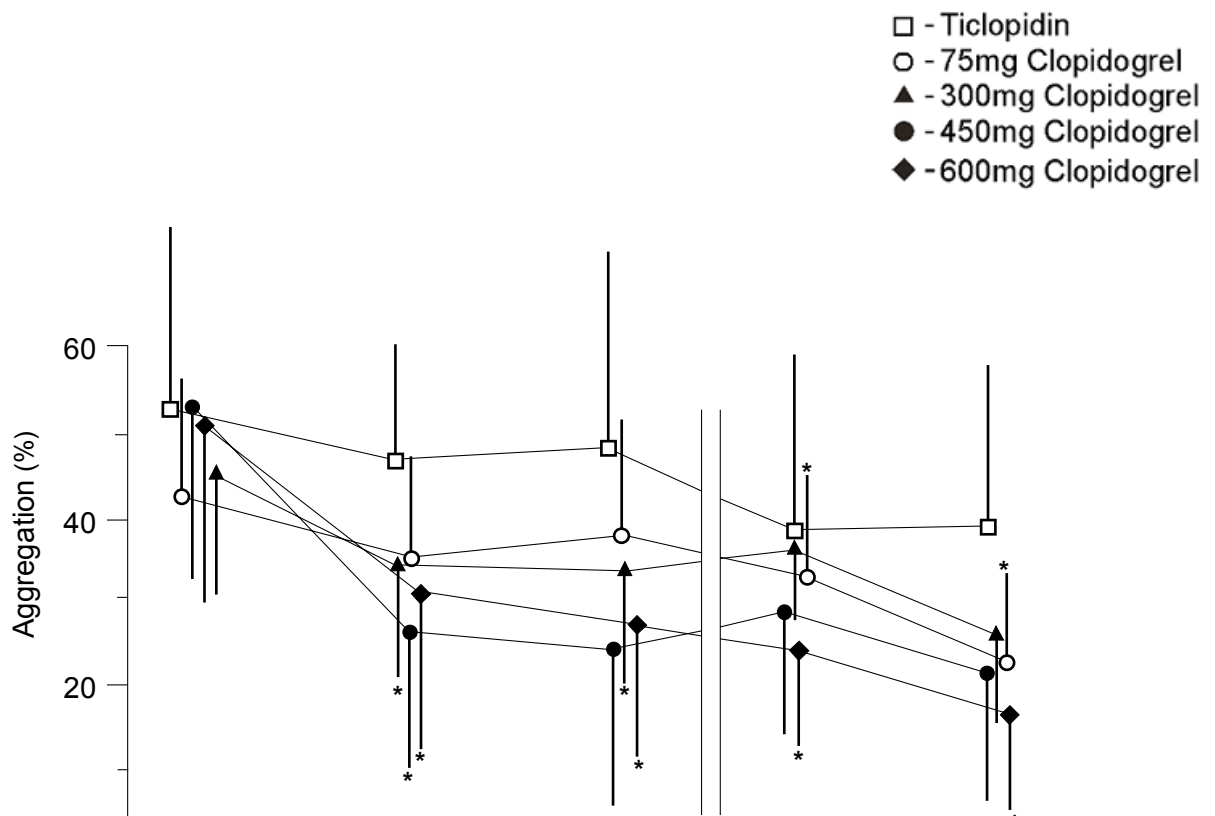
**Abb. 4.4: Aggregationsmaximum** nach Aktivierung mit  $20\mu\text{M}$  ADP (\*  $p < 0,05$ )

(Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung)

Auch die durch  $5\mu\text{M}$  ADP ausgelösten Aggregationsmaxima sanken in allen Studienarmen: unter Ticlopidin nicht-signifikant von anfangs 52,5% auf 40,8% nach 48 Stunden, unter den höheren Clopidogrel-Dosen 450mg bzw. 600mg signifikant

auf 21,3% ( $p = 0,068$ ) bzw. 17,3% ( $p = 0,018$ ). 600mg konnten bereits innerhalb von zwei Stunden eine signifikante Abnahme von 51.4% auf 30.9% bewirken ( $p = 0,028$ ), 450mg eine hochsignifikante ( $p = 0,005$ ).

Unter 75mg Clopidogrel war die maximale Aggregation ab 24 Stunden ( $p = 0,036$ ), unter 300mg zwei Stunden nach Einnahme signifikant ( $p = 0,017$ ) erniedrigt (Abb. 4.5).



**Abb. 4.5: Aggregationsmaximum** nach Aktivierung mit 5 $\mu$ M ADP (\*  $p < 0,05$ )

(Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung)

Im Vergleich dazu wurden die durch TRAP hervorgerufenen Aggregationsmaxima durch Clopidogrel nicht so stark gehemmt wie die ADP-induzierten. Beispielsweise gingen sie wahrend 48 Stunden nach Einnahme von 600mg von 70,9%

auf 63,5% zurück. Dieser Verlauf war nach 24 und 48 Stunden signifikant ( $p = 0,021$ ), unter 450mg Clopidogrel nach vier Stunden ( $p = 0.011$ ).

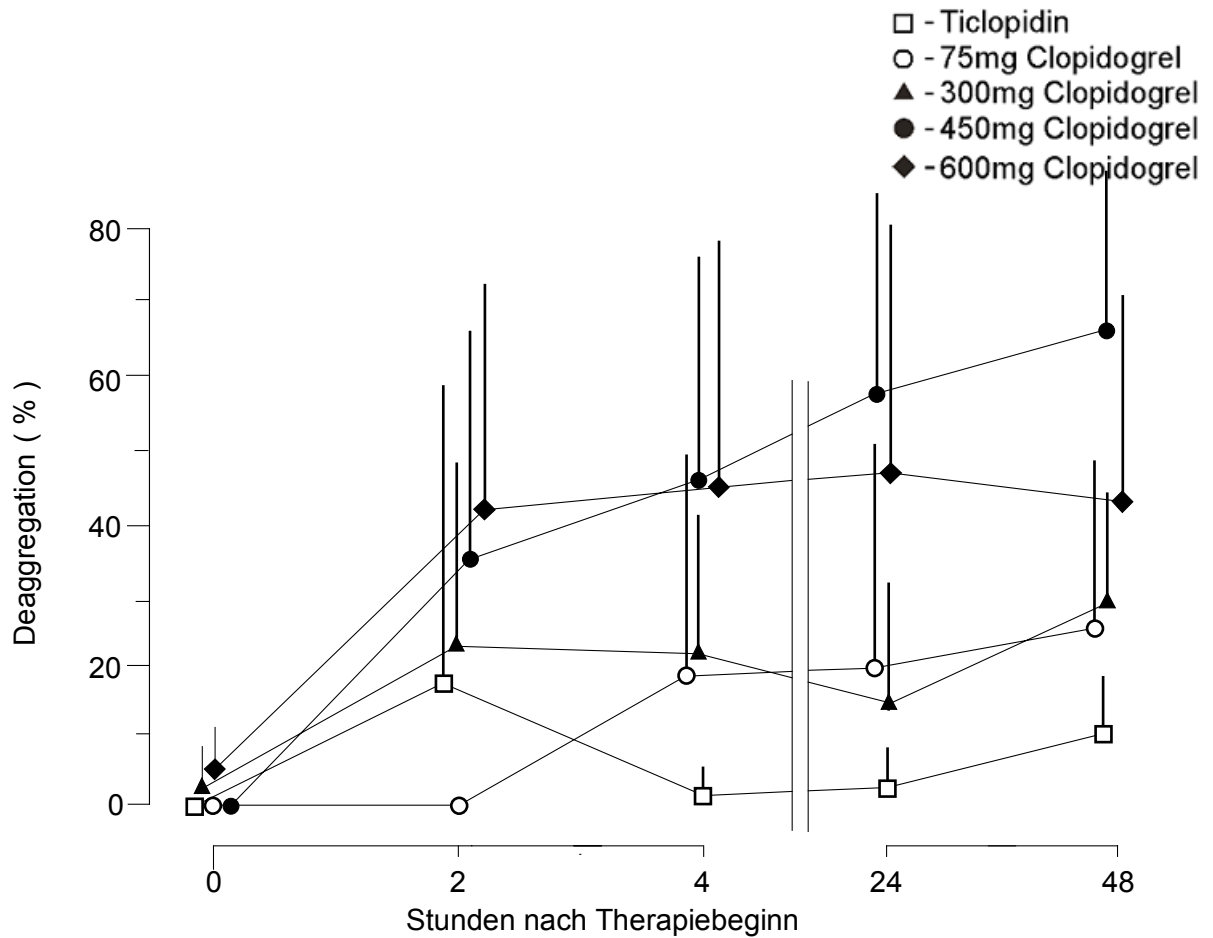
Unter Ticlopidin blieb die TRAP-induzierte maximale Aggregation auf dem Ausgangsniveau (initial 84,4%; nach 48 Stunden 82,8%).

### **4.1.3 Deaggregation**

Die Berechnung der Thrombozytendeaggregation wurde unter 3.4.2 erläutert, die Ergebnisse zeigt Tabelle III im Anhang. Da die Deaggregation indirekt ermittelt wurde (aus der Aggregation fünf Minuten nach Aktivierung und dem Aggregationsmaximum), wurde hierzu eine vergleichende Analyse ohne Angabe von Signifikanzen erstellt.

Die mit 20 $\mu$ M ADP aktivierten Thrombozyten deaggregierten je nach Therapie unterschiedlich stark.

Innerhalb von zwei Stunden konnte die Wiederauflösung der Plättchenaggregate am meisten durch Einnahme von 600mg Clopidogrel angeregt werden (von 5,2% auf 41,8%). Die stärkste Deaggregation zeigte sich am ersten und zweiten Tag nach Einnahme von 450mg Clopidogrel (57,8% und 65,7%). Unter Ticlopidin war die Deaggregation mit 11,6% 48 Stunden nach Einnahme am geringsten (Abb. 4.6).

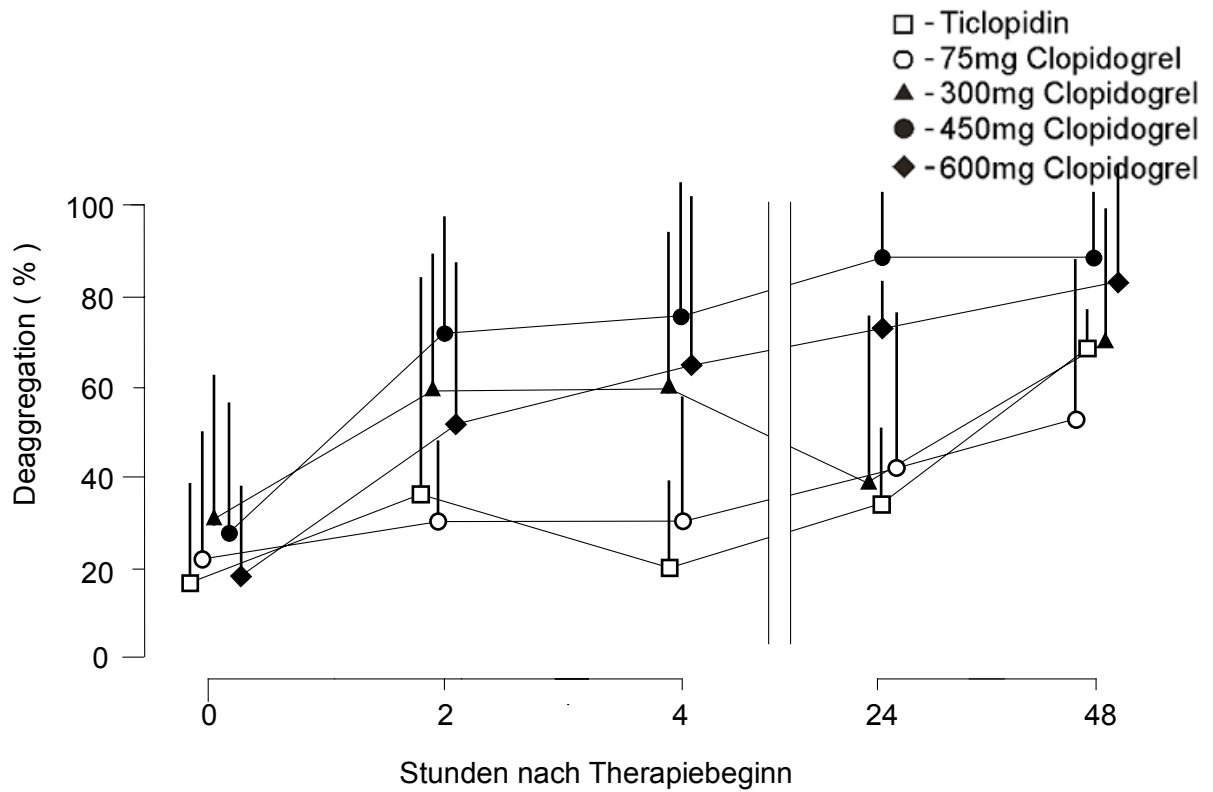


**Abb. 4.6: Deaggregation** nach Aktivierung mit 20µM ADP

(Mittelwert ± Standardabweichung)

Auch nach Aktivierung mit 5µM ADP deaggregierten die Thrombozyten nach Einnahme von höheren Clopidogrel-Dosen stärker als unter 75mg und unter Ticlopidin. Unter 450mg Clopidogrel wurde die Deaggregation im Verlauf mit 88,2% nach 24 Stunden am höchsten (Abb. 4.7).





**Abb. 4.7: Deaggregation** nach Aktivierung mit 5 $\mu$ M ADP

(Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung)

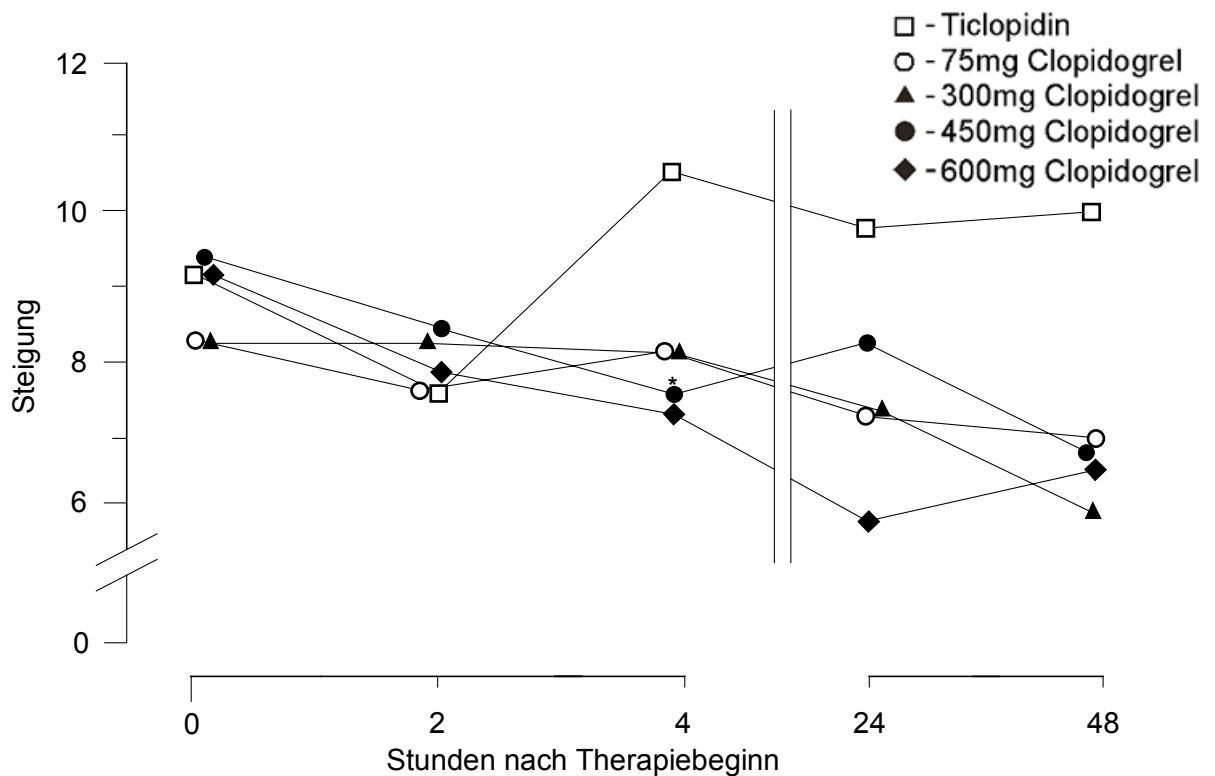
Die durch 25 $\mu$ M TRAP ausgelöste Aggregation zeigte sich irreversibel. In einem Fall wurde zwei Stunden nach Einnahme von 600mg Clopidogrel ein Höchstwert von 37% Deaggregation beobachtet.

#### 4.1.4 Aggregationsgeschwindigkeit

Die Ergebnisse aus der Bestimmung der Aggregationsgeschwindigkeit (**slope**) zeigt Tabelle IV im Anhang.

Die Geschwindigkeit der durch 20µM ADP ausgelösten Aggregation ging unter dem Einfluß von Clopidogrel während 48 Stunden zurück – eine signifikante Abnahme zeigte sich jedoch nur unter 450mg nach vier Stunden ( $p = 0,028$ ).

Unter Ticlopidin war die Steigung nach anfänglicher Schwankung 48 Stunden nach Einnahme höher als vor Einnahme (Abb. 4.8).



**Abb. 4.8: Steigung** der Aggregationskurven nach Aktivierung mit 20µM ADP (\*  $p < 0,05$ )

(Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung)

Nach Aktivierung mit 5 $\mu$ M ADP aggregierten die Thrombozyten unter Ticlopidin nach vier, 24 ( $p = 0,028$ ) und 48 Stunden ( $p = 0,044$ ) und unter Clopidogrel 75mg nach 48 Stunden ( $p = 0,027$ ) signifikant langsamer.

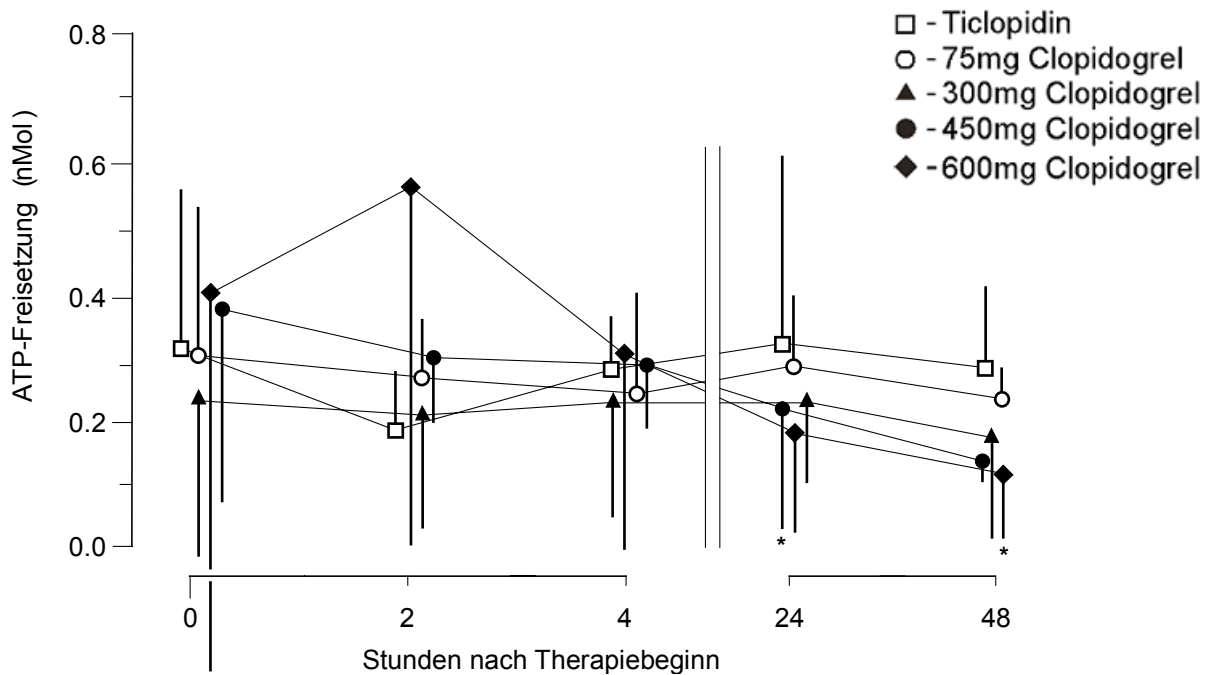
Die Steigung der TRAP-induzierten Aggregationskurven blieb unter Clopidogrel im Verlauf konstant, unter Ticlopidin war dagegen eine leichte Zunahme zu verzeichnen.

#### **4.1.5 Degranulation**

Die Ergebnisse der Freisetzungsreaktion sind in Tabelle V im Anhang wiedergegeben.

Bei der Degranulierung der dichten Granula (ATP-Freisetzung) fielen in allen Studienarmen große Schwankungen auf, was an hohen Standardabweichungen deutlich wird. Bei Stimulation mit 20 $\mu$ M ADP setzten die Thrombozyten der mit den höheren Clopidogrel-Dosen behandelten Patienten nach 48 Stunden am wenigsten ATP frei.

Signifikant geringer war die ATP-Freisetzung nur unter 450 bzw. 600mg Clopidogrel nach 24 ( $p = 0,028$ ) bzw. 48 Stunden ( $p = 0,018$ ) (Abb. 4.9).



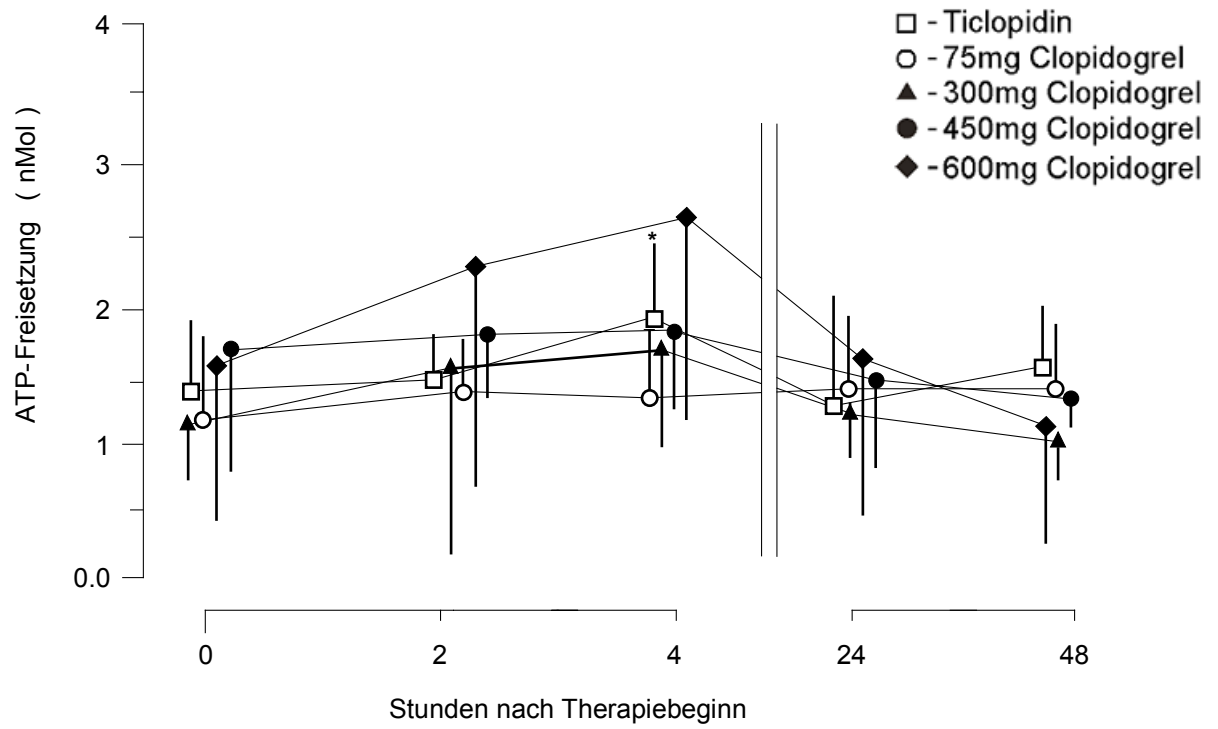
**Abb. 4.9: Freisetzung von ATP** nach Aktivierung mit 20µM ADP (\* p < 0,05)

(Mittelwert ± Standardabweichung)

Bei der durch 5µM ADP ausgelösten Aggregation differierten die Ausgangswerte der ATP-Freisetzung bereits erheblich. Während vor Einnahme von 450mg Clopidogrel im Mittel 0,12nMol, nach 48 Stunden 0,03nMol ATP freigesetzt wurden, sank die Ausschüttung unter 600mg von 0,05nMol auf 0,01nMol. Die Sekretion von ATP war unter 450mg Clopidogrel zwei Stunden nach Einnahme signifikant niedriger (p = 0,021).

Unter 300 und 75mg Clopidogrel und unter Ticlopidin ergaben sich keine eindeutigen Tendenzen in der Freisetzungsreaktion; 48 Stunden nach Einnahme von Ticlopidin wurde signifikant weniger ATP sezerniert (p = 0,046).

In allen Studienarmen fiel auf, daß die durch TRAP induzierte ATP-Freisetzung bis vier Stunden nach Therapiebeginn anstieg (unter Ticlopidin signifikant; p = 0,018) und anschließend wieder abfiel - in den höheren Clopidogrel-Dosen bis unter das Ausgangsniveau (Abb. 4.10).



**Abb. 4.10: Freisetzung von ATP** nach Aktivierung mit 25 $\mu$ M TRAP (\*  $p < 0,05$ )

(Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung)

## **4.2 Oberflächenexpression thrombozytärer Membranglykoproteine unter Einfluß von Ticlopidin bzw. Clopidogrel**

### **4.2.1 Dichte der Fibrinogenrezeptoren (CD41-Antikörper)**

Die Ergebnisse der durchflußzytometrischen Bestimmung der CD41-Immunfluoreszenz zeigt Tabelle VI im Anhang.

Eine erhöhte Aktivierung des Fibrinogenrezeptors war unabhängig von der quantitativen Oberflächenexpression des GPIIb-IIIa-Komplexes. Die Oberflächenexpression von GPIIb-IIIa (anti-CD41) blieb innerhalb des Beobachtungszeitraums in den einzelnen Studienarmen im wesentlichen unverändert.

Die mit 20µM ADP aktivierten Plättchen zeigten unter Clopidogrel-Therapie (450mg) nach vier Stunden eine signifikant niedrigere Immunfluoreszenz der CD41-Antikörper ( $p = 0,011$ ), unter 300mg nach zwei ( $p = 0,028$ ), unter 600mg nach vier Stunden ( $p = 0,012$ ).

Unter Aktivierung mit 5µM ADP war die Fluoreszenz vier Stunden nach Einnahme von 300mg Clopidogrel geringer: Es waren hochsignifikant weniger CD41-Antigene exprimiert ( $p = 0,008$ ).

Unter den TRAP-aktivierten Thrombozyten waren die gemessenen Werte vier Stunden nach Einnahme von 75 bzw. 300mg Clopidogrel signifikant niedriger ( $p = 0,043$  bzw.  $0,044$ ), ebenso 24 Stunden nach Einnahme von 600mg ( $p = 0,037$ ).

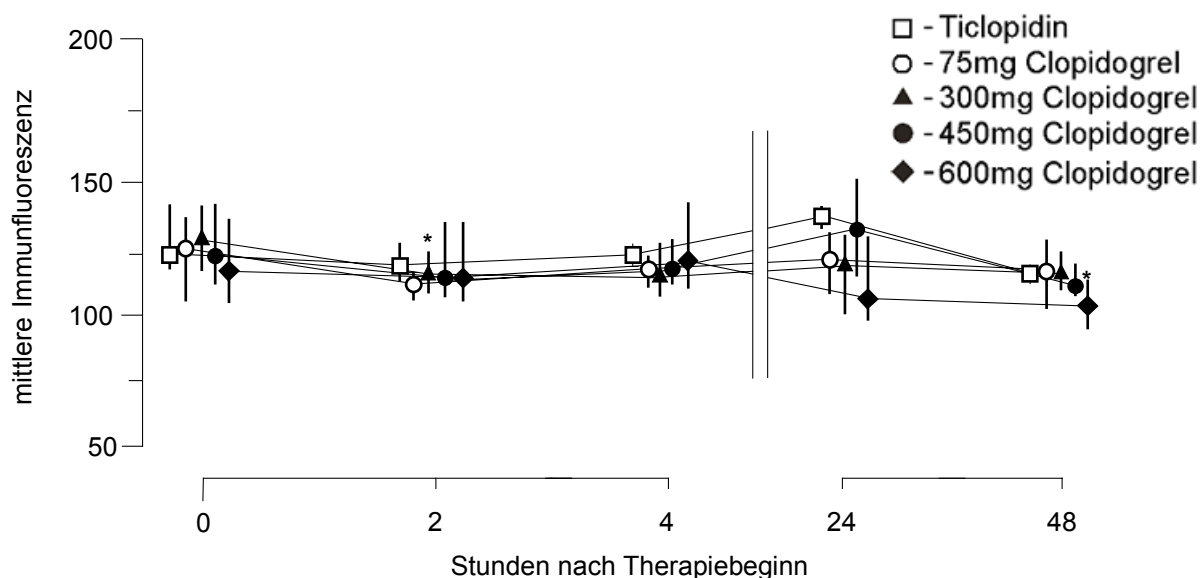
### **4.2.2 Expression aktivierter Fibrinogenrezeptoren (PAC-1-Antikörper)**

Die Ergebnisse der durchflußzytometrischen Bestimmung der PAC-1-Immunfluoreszenz sind in Tabelle VII im Anhang dargestellt.

Vor Einnahme von 600mg Clopidogrel wurde eine mittlere Immunfluoreszenz der PAC-1-markierten nicht-aktivierten Thrombozyten von 119 gemessen, 48 Stunden danach mit 107 eine signifikant erniedrigte ( $p = 0,027$ ). Der gleiche jedoch nicht-signifikante Verlauf fand nach 450 und 300mg Clopidogrel statt. Unter 300mg war die

Fluoreszenz innerhalb der ersten zwei Stunden nach Einnahme von 129 auf 119 signifikant schwächer ( $p = 0,038$ ) und blieb auf diesem Niveau.

Unter 75mg Clopidogrel und unter Ticlopidin wurde nach 48 Stunden mit 122 bzw. 121 eine gleichbleibende Immunfluoreszenzstärke anti-PAC-1 gemessen wie eingangs mit 127 bzw. 124 (Abb. 4.11).



**Abb. 4.11: PAC-1, nicht-aktiviert** (\*  $p < 0,05$ )

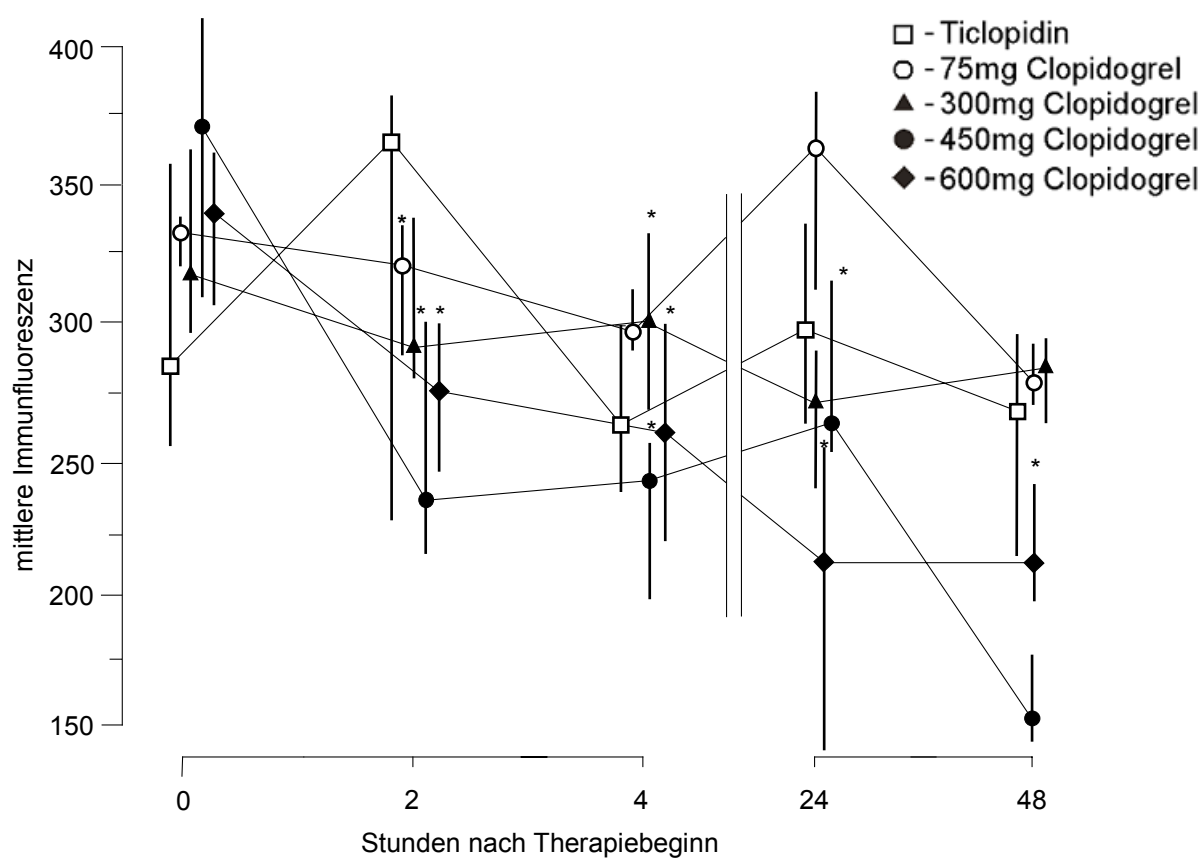
(mittlere Immunfluoreszenz, 25%- und 75%-Quartile)

Mittels 20 $\mu$ M ADP induzierte Thrombozyten zeigten unter 600mg Clopidogrel ebenfalls innerhalb von zwei Stunden einen signifikanten Rückgang ( $p = 0,037$ ) in ihrer PAC-1-Immunfluoreszenz von 339 auf 272, dieser setzte sich fort bis auf 218 nach 48 Stunden. Innerhalb 48 Stunden am stärksten zurückgegangen war die Dichte aktivierter GPIIb-IIIa-Komplexe unter 450mg Clopidogrel von 371 auf 155. Nach zwei und vier Stunden war dieser Verlauf hochsignifikant ( $p = 0,005$ ), nach 24 Stunden signifikant ( $p = 0,018$ ), nach 48 Stunden war  $p = 0,068$ . Hier ist zu bemerken, daß die Immunfluoreszenz 24 Stunden nach Einnahme (264) im Vergleich zur Messung vier Stunden nach Einnahme wieder etwas angestiegen war (239). Dieser Verlauf zeigte sich noch etwas ausgeprägter unter 75mg Clopidogrel, wo die Werte nach vier Stunden mit  $p = 0,066$  annähernd signifikant unterhalb des Ausgangsniveaus

veaus lagen, am nächsten Tag jedoch höher als dieses waren. Nach 48 Stunden lagen sie wieder darunter.

Unter 300mg Clopidogrel unterlagen die PAC-1-Messwerte nicht so ausgeprägten Schwankungen - 24 Stunden nach Einnahme waren sie signifikant gesunken ( $p = 0,025$ ).

Unter Ticlopidin war die PAC-1-Immunfluoreszenz zwei Stunden nach Einnahme von 286 auf 365 nicht-signifikant angestiegen, im weiteren Verlauf manifestierte sie sich in Höhe des Ausgangsniveaus (Abb. 4.12).

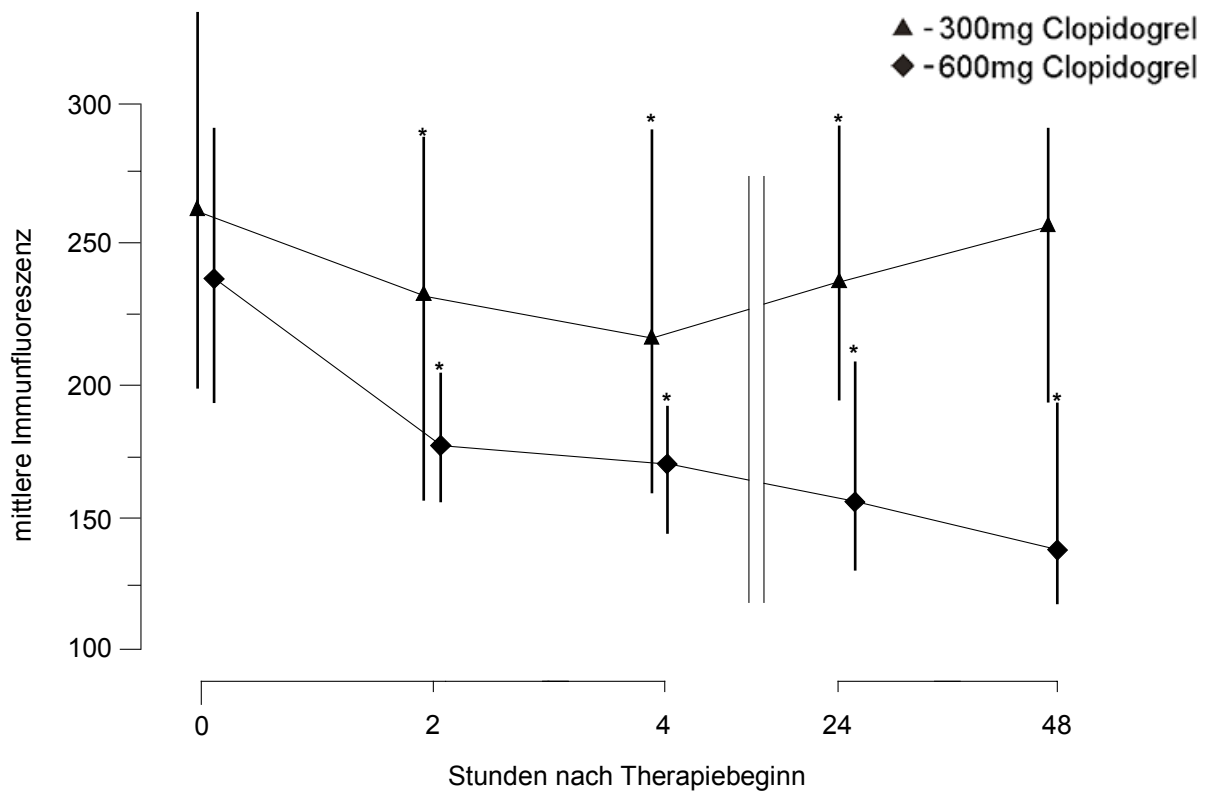


**Abb. 4.12: PAC-1, Aktivierung mit 20 $\mu$ M ADP (\*  $p < 0,05$ )**

(mittlere Immunfluoreszenz, 25%- und 75%-Quartile)



Unter 300 und 600mg Clopidogrel wurde - wie unter 3.3 beschrieben - auch die Fibrinogenrezeptordichte der mit 5µM ADP aktivierten Thrombozyten bestimmt. Zwei Stunden nach Einnahme von 600mg Clopidogrel waren die PAC-1-Werte von 239 auf 181 hochsignifikant gesunken ( $p = 0,007$ ), sie gingen im Verlauf noch weiter signifikant zurück bis auf 142 nach 48 Stunden ( $p = 0,046$ ). Unter 300mg fielen sie während der ersten 24 Stunden ebenfalls signifikant von 267 auf 241 ab ( $p = 0,05$ ), lagen nach 48 Stunden jedoch wieder in Höhe des Ausgangsniveaus (Abb. 4.13).



**Abb. 4.13: PAC-1, Aktivierung mit 5µM ADP (\*  $p < 0,05$ )**

(mittlere Immunfluoreszenz, 25%- und 75%-Quartile)

Gemessen mit PAC-1-Immunfluoreszenz exprimierten die TRAP-induzierten Thrombozyten unter 75mg Clopidogrel bereits eine, zwei und vier Stunden nach Einnahme signifikant ( $p = 0,043, 0,018$  und  $0,021$ ) weniger aktivierte Fibrinogenrezeptoren auf ihrer Oberfläche (im Verlauf bis vier Stunden: 205, 157, 154, 181). Nach 24 Stunden war PAC-1 mit 211 wieder angestiegen. Ein ähnlicher, jedoch nicht signifikanter Verlauf ergab sich auch unter 300 und 450mg Clopidogrel. Unter 600mg war die Immunfluoreszenz 24 Stunden nach Einnahme dagegen signifikant gesunken ( $p = 0,046$ ); nach 48 Stunden war sie wieder so hoch wie zu Beginn.

Unter Ticlopidin zeigte sich hingegen keine Veränderung im Auftreten von aktiviertem GPIIb-IIIa.

#### **4.2.3 Expression von P-Selektin (CD62P-Antikörper)**

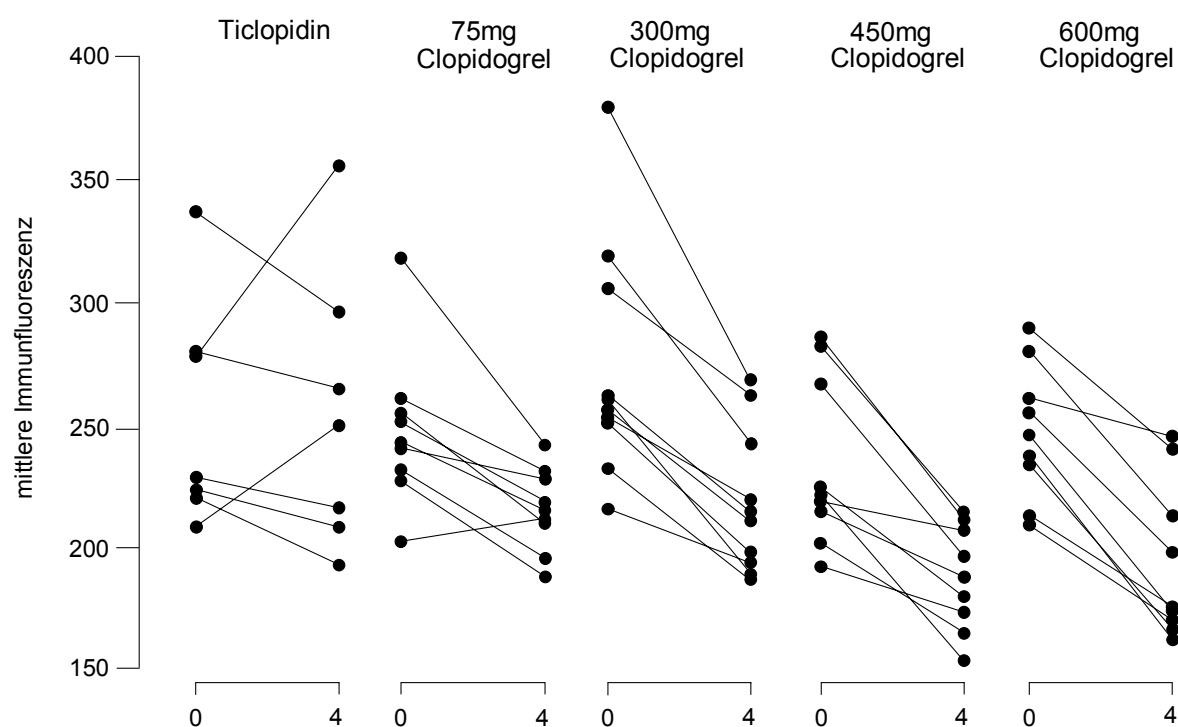
Die Ergebnisse der durchflußzytometrischen Bestimmung der CD62P-Immunfluoreszenz zeigt Tabelle VIII im Anhang.

Die Sekretion von  $\alpha$ -Granula und damit die Expression von P-Selektin der nicht-aktivierten Thrombozyten zeigte gemessen anhand mittlerer Immunfluoreszenz von CD62P-Antikörpern unter Clopidogrel-Therapie einen leichten Rückgang, der unter 75mg 48 Stunden nach Einnahme ( $p = 0,028$ ), unter 300mg zwei ( $p = 0,032$ ), vier ( $p = 0,021$ ) und 48 Stunden ( $p = 0,043$ ), und unter 600mg 24 Stunden nach Einnahme signifikant war ( $p = 0,037$ ).

Die mit  $20\mu\text{M}$  ADP induzierten Thrombozyten zeigten während der ersten vier Stunden nach Einnahme von Clopidogrel eine Abnahme ihrer CD62P-Immunfluoreszenz: unter 75 mg nach vier Stunden ( $p = 0,011$ ), unter 300mg während aller Messungen nach Einnahme signifikant (nach zwei und nach vier Stunden  $p = 0,005$ , nach 24 Stunden  $p = 0,035$ , nach 48 Stunden  $p = 0,043$ ) unter 450mg nach zwei und vier Stunden hochsignifikant ( $p = 0,005$  und  $0,008$ ) und lagen nach 24 Stunden wieder auf dem Ausgangsniveau. Unter der hohen Ladungsdosis von 600mg zeigten sich hohe Standardabweichungen und keine signifikante Abnahme der gemessenen Immunfluoreszenz. Unter Ticlopidin war die CD62P-Immunfluoreszenz nach zwei Stun-

den gesunken ( $p = 0,08$ ), in den weiteren Messungen jedoch nicht unter das Ausgangsniveau (Abb. 4.14).

Dagegen war die Expression von CD62P nach Aktivierung mit  $5\mu\text{M}$  ADP zwei und vier Stunden nach Einnahme von 600 mg reduziert ( $p = 0,074$ ), signifikant reduziert nach 24 ( $p = 0,013$ ) und nach 48 Stunden ( $p = 0,028$ ). Unter der Ladungsdosis von 300mg zeigte sich ein hochsignifikanter Abfall der Aktivierbarkeit bereits zwei ( $p = 0,009$ ) bzw. vier Stunden ( $p = 0,005$ ) nach Einnahme, nach 24 Stunden ein nicht-signifikanter ( $p = 0,069$ ), nach 48 Stunden erneut ein signifikanter ( $p = 0,043$ ).



**Abb. 4.14: CD62P**, Aktivierung mit  $20\mu\text{M}$  ADP; Einzelwerte nach 0 und 4 Stunden  
(mittlere Immunfluoreszenz)

Die durch TRAP stimulierten Thrombozyten zeigten in ihrer CD62P-Immunfluoreszenz keine eindeutige Tendenz. Unter Ticlopidin blieben sie relativ konstant auf gleicher Höhe. Unter 75mg und 300mg wurden nach zwei und vier Stunden zunächst signifikant geringere Werte gemessen, danach wieder die Ausgangswerte. Ein ähnlicher jedoch nicht-signifikanter Verlauf ließ sich unter 600mg Clopidogrel feststellen. Die stärksten Schwankungen in der Immunfluoreszenz ergaben sich unter 450mg.

#### **4.2.4 Expression von von-Willebrand-Faktor-Rezeptor (CD42b-Antigen)**

Die Bestimmung der CD42b-Immunfluoreszenz zeigt Tabelle IX im Anhang.

Die Immunfluoreszenz der CD42b-markierten Thrombozyten, welche nicht aktiviert wurden, zeigte unter Ticlopidin wie auch unter 75mg Clopidogrel nach 48 Stunden eine leicht ansteigende Tendenz, unter den höheren Clopidogrel-Dosen dagegen einen Abfall, der unter 600mg nach 48 Stunden signifikant wurde ( $p = 0,043$ ).

Die mit 20 $\mu$ M ADP aktivierten Thrombozyten exprimierten während der ersten vier Stunden nach Einnahme von Ticlopidin bzw. Clopidogrel vermehrt von-Willebrand-Faktor-Rezeptoren, im weiteren Verlauf ließ sich jedoch keine einheitliche Tendenz feststellen.

Unter 300 und 600mg Clopidogrel war die CD42b-Immunfluoreszenz nach vier Stunden signifikant erhöht ( $p = 0,032$  und  $0,005$ ), unter 300mg zusätzlich hochsignifikant bereits nach zwei Stunden ( $p = 0,009$ ). In beiden Gruppen fanden sich zu späteren Messzeiten wieder Ausgangswerte.

Unter 75mg Clopidogrel wurde eine Stunde nach Einnahme eine signifikant höhere Anzahl an vWF-Rezeptoren gemessen ( $p = 0,043$ ; Median 0 h: 532, 1 h: 550).

Nach Aktivierung mit 5 $\mu$ M ADP ergab sich unter 300mg Clopidogrel ein tendentieller Rückgang der Oberflächendichte von Glykoprotein Ib-V-IX, unter 600mg zunächst eine leichte Zunahme.

Auf die Expression von vWF-Rezeptoren, welche mittels TRAP induziert wurde, nahmen Clopidogrel sowie Ticlopidin keinen wesentlichen Einfluß.

### **4.3 Thrombozytenzahl im Routineblutbild**

Die Anzahl der im peripheren Blut zirkulierenden Thrombozyten nahm in allen Studienarmen innerhalb von 48 Stunden nicht-signifikant geringfügig ab. In der Gruppe mit 600mg Ladungsdosis Clopidogrel sanken die Mittelwerte von 210 auf  $186 \times 10^9/l$ , mit 450mg Ladungsdosis von 226 auf  $214 \times 10^9/l$ , mit 300mg Ladungsdosis von 219 auf  $197 \times 10^9/l$ , in der Gruppe ohne Ladungsdosis Clopidogrel stieg die Thrombozytenzahl nach zwei Stunden signifikant über das Ausgangsniveau von 240 auf 251 ( $p < 0,05$ ) und sank anschließend nicht-signifikant auf  $221 \times 10^9/l$ . Unter Ticlopidin fielen die Thrombozyten von anfangs 228 auf  $202 \times 10^9/l$ .

Insbesondere zeigte sich im Gruppenvergleich kein Unterschied zwischen den einzelnen Therapien.

## 5. Diskussion

### 5.1 Bedeutung der Thienopyridine für die interventionelle Kardiologie

Thrombozyten spielen eine bedeutende Rolle in der Pathophysiologie von Atherosklerose und ischämischen Komplikationen (26; 31; 78). Bei Geschehnissen im Blutgefäßsystem pathologischer (Ischämien, Infarkte) sowie therapeutischer Art (PTCA, Stent-Implantationen) zeigen Thrombozyten eine erhöhte Aktivierbarkeit und vergrößern damit zusätzlich das Risiko einer vollständigen Thrombosierung z. B. von Koronararterien (39). Mit einer Funktionsanalyse des thrombozytären GPIIb-IIIa läßt sich das Risiko einer Stentthrombose abschätzen (40). Desweiteren konnte gezeigt werden, daß es innerhalb von 72 Stunden nach Fibrinolysebeginn trotz der Gabe von Acetylsalicylsäure und Heparin zu einer Aktivierung des Fibrinogenrezeptors kommt (13). Dies ist assoziiert mit einem erhöhten Risiko eines thrombotischen Wiederverschlusses des Infarkt-Gefäßes (107).

Thienopyridine blockieren die ADP-vermittelte Thrombozytenaktivierung, wodurch sie dem thrombotischen Verschuß eines Gefäßes entgegenwirken. Die CAPRIE-Studie zeigte bei einem Vergleich der Monotherapien eine Reduktion des relativen Risikos um 8,7% von Clopidogrel gegenüber ASS hinsichtlich ischämischer vaskulärer Mortalität (21; 37).

Clopidogrel vermag dabei im Vergleich zu Ticlopidin ein größeres antithrombotisches Potential in kürzerer Zeit zu entfalten und ist zugleich hinsichtlich seiner Nebenwirkungen weniger belastend. Dies wurde klinisch anhand der CLASSICS-Studie nachgewiesen und konnte im Rahmen der vorliegenden Untersuchung experimentell verifiziert werden. Eine signifikante Reduktion der fünf Minuten nach Zugabe einer aktivierenden Substanz (20µM ADP) gemessenen Plättchenaggregation zeigte sich unter Clopidogrel spätestens vier Stunden nach Einnahme des Medikaments (75mg). Unter Ticlopidin dagegen wurde diese Wirkung erst nach 48 Stunden erreicht.

Die Datenlage der jüngsten Vergleichsstudien der beiden Thienopyridinderivate macht einen Ersatz von Ticlopidin durch Clopidogrel mit Ladungsdosis im Rahmen akuter Koronarsyndrome bzw. zur Prophylaxe von Restenosierungen nach intrakoronarem Stenten empfehlenswert (7; 11; 77). Die Kombination von Clopidogrel

mit Acetylsalicylsäure ist dabei der Monotherapie aus Clopidogrel bzw. ASS überlegen (9).

Während das Blutungsrisiko unter beiden Therapeutika gleich groß ist (9%), verursacht Ticlopidin doppelt so häufig Diarrhoen wie Clopidogrel. Die Wahrscheinlichkeit, eine medikamenten-induzierte schwere Neutropenie ( $< 450/\mu\text{l}$ ) zu erleiden, liegt unter Ticlopidin bei knapp einem Prozent, unter Clopidogrel bei 0,05% (35).

In der vorliegenden Versuchsreihe klagten zwei Patienten aus der Ticlopidin-Gruppe und ein Patient unter Clopidogrel zu Beginn der Therapie über Übelkeit bzw. leichte Diarrhoe.

## **5.2 Thrombozytäre Aggregation unter Thienopyridinen**

Die Aktivierbarkeit von Blutplättchen wurde in der vorliegenden Arbeit mit thrombogenen Substanzen bestimmt, welche nach Zugabe zu einer plättchenreichen Suspension die Aggregation auslösen. Je nach Aktivierbarkeit fällt diese – in Form einer aufgezeichneten Kurve – unterschiedlich stark aus bzw. ist unterschiedlich stark reversibel (Deaggregation). In vitro kann die Aktivierung agonisten-spezifisch induziert werden. So läßt sich das Maß der ADP-induzierten Aktivierungshemmung ermitteln.

Einen gesicherten Einfluß auf die TRAP-induzierte Aggregierbarkeit haben die Thienopyridine nicht.

Die Steigung der Aggregationskurven und damit die Reaktionsfähigkeit der Thrombozyten wurde durch die beiden Substanzen nur leicht unterschiedlich modifiziert: Unter Ticlopidin nahm sie nicht-signifikant leicht zu, während sie unter Clopidogrel abnahm (nicht-signifikant).

## **5.3 Freisetzungsreaktion**

Luminometrisch wurde simultan zur Aggregation die Menge an freigesetztem ATP festgestellt, ein Indikator für die Freisetzung dichter Granula von Thrombozyten. Die thrombozytäre ATP-Freisetzungsreaktion reduzierte sich in keiner der Therapie-

gruppen nennenswert. Sie ging unter Clopidogrel tendentiell eher zurück als unter Ticlopidin.

P-Selektin wird an der thrombozytären Oberfläche nach Freisetzung von  $\alpha$ -Granula exprimiert und von anti-CD62P-Antikörpern gebunden. Es ist bekannt, daß gemeinsam mit P-Selektin auch andere granulär gespeicherte, biologisch potente Stoffe wie Wachstumsfaktoren sowie Serotonin in den plasmatischen Raum freigegeben werden und ihre atherosklerotische Wirkung entfalten (43; 52; 59). Sie spielen in der Pathophysiologie der Restenosierung nach PCI eine Rolle.

Thienopyridine hemmen die nach Stentimplantation zu beobachtende vermehrte Freisetzung von  $\alpha$ -Granula (40). Dies unterlegt vorliegende Studie sowohl für Ticlopidin als auch für Clopidogrel. Nach Einsatz von Clopidogrel verminderte sich die mit 20 $\mu$ M ADP induzierte Expression von CD62P am deutlichsten unter den Ladungsdosen 300 und 450mg: Zwei und vier Stunden nach Einnahme war die Aktivierbarkeit durch 20 $\mu$ M ADP hochsignifikant gesunken. Für 600mg ergab sich eine hohe Standardabweichung bei der Messung unter dieser ADP-Konzentration, und die Abnahme der gemessenen Oberflächenexpression war insgesamt statistisch nicht signifikant; die Einzelauswertung zeigt dennoch einen Abfall der Immunfluoreszenz, wie am Beispiel vier Stunden nach Einnahme graphisch dargestellt werden kann (s. 4.2.3).

Es läßt sich hieraus schließen, daß durch den Einsatz von Clopidogrel, insbesondere mit einer initialen Ladungsdosis in der Akutbehandlung eines Koronarsyndroms, eine verminderte Degranulierung der pleiotropen thrombozytären Stoffe erzielt werden kann.

## **5.4 Effekte der Ladungsdosen von Clopidogrel**

Die antithrombozytäre Wirkung von Clopidogrel ist konzentrationsabhängig (66). Verglichen mit Ticlopidin bewirkte Clopidogrel bereits in einer Dosis von 75mg ab dem ersten Einnahmetag eine signifikante Reduktion der Plättchenaggregation (vier Stunden nach Einnahme um 10,9% bei Aktivierung mit 20 $\mu$ M ADP versus 4,4% unter Ticlopidin). Noch effektiver war die Aggregationshemmung nach einer initialen



Ladungsdosis Clopidogrel: um 22,7% bei 300mg, um 47,1% bei 450mg und um 32,8% bei 600mg.

Eine Wiederauflösung der Plättchenaggregate konnte durch Einnahme von Ticlopidin kaum erzielt werden, jedoch sehr effektiv unter Clopidogrel-Therapie, welche mit einer Ladungsdosis von 450 oder 600mg begonnen wurde: Am zweiten Tag der Einnahme lösten sich bis zu 66% der nach Aktivierung (ADP 20 $\mu$ M) gebildeten Aggregate nach fünf Minuten wieder auf.

Die Aktivierung über den Thrombinrezeptor löste dagegen die Aggregation in gleicher Weise aus wie vor Behandlungsbeginn mit Clopidogrel. Es kann folglich davon ausgegangen werden, daß auch eine Kombinationstherapie von Aspirin und Clopidogrel keinen Einfluß auf die thrombininduzierte Plättchenaktivität ausübt bzw. die ADP-Rezeptor getriggerte Aktivierung nicht durch Thrombin ausgelöst werden kann.

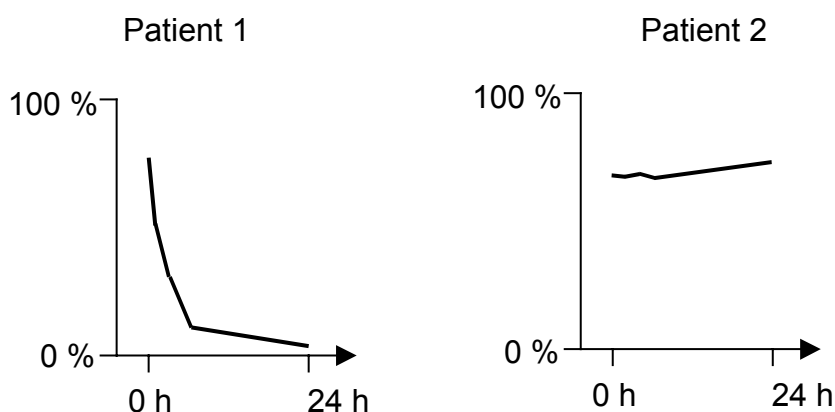
Die Gabe einer Ladungsdosis bei bereits bestehender Standardtherapie mit 75mg Clopidogrel scheint im Rahmen interventioneller Eingriffe zusätzlich einen Benefit zu erbringen. In einer Studie an zwanzig Patienten erzielte eine Dosis von 600mg nach vierwöchiger Clopidogreltherapie zusätzlich noch einen Effekt von über 60% der bereits bestehenden Plättchenhemmung (56).

## **5.5 Interindividuelle Wirkung der Thienopyridine**

Das Ansprechen auf die antithrombozytäre Wirkung von Clopidogrel oder Ticlopidin zeigte sich auch innerhalb der Gruppen individuell unterschiedlich. Daß die in einer Konzentration von 5 oder 20 $\mu$ M ADP hervorgerufene Aggregation sich im Verlauf der ersten vier Stunden in nicht wenigstens einer der Messungen um mindestens 20% verringerte, war bei sechs Patienten unter Ticlopidin-, sieben Patienten unter 75mg Clopidogrel- und einem Patienten unter 450mg Clopidogrel-Therapie der Fall.

Bei einem Teil der Patienten stieg die Aggregation mit 20 $\mu$ M ADP nach Therapiebeginn im Verlauf der ersten Stunden sogar an: Unter Ticlopidin und unter 75mg Clopidogrel bei über 40%, nach 300mg Clopidogrel bei einem Patienten, bei zwei Patienten nach 450mg und nach 600mg Clopidogrel. Eine dosisabhängige Bezie-

hung des Ansprechens ist nicht eindeutig erkennbar – auch nach Gabe von 450mg Clopidogrel wurden Verläufe beobachtet, die verminderte bzw. keine thrombozytäre Reaktion zeigten. In Abb. 5.1 sind zwei Verlaufskurven der Aggregation nach fünf Minuten unter 450mg Clopidogrel dargestellt:



**Abb. 5.1: Aggregation im Zeitintervall 0 bis 24 Stunden**

bei zwei Patienten nach Einnahme von Clopidogrel 450mg

Zu sehen ist ein typischer Abfall der Aggregation innerhalb der ersten 24 Stunden nach Einnahme von 77,8% auf 2,5% sowie ein Verlauf ohne Aggregationshemmung (0 h: 74,1%; 24 h: 77,8%). Die Immunfluoreszenz der aktivierten Fibrinogenrezeptoren (PAC-1) war jeweils adäquat dazu gesunken (um 21% bei Patient 1) bzw. nicht zurückgegangen (bei Patient 2), sondern leicht gestiegen. Auch unter Ticlopidin wurden derartige Unterschiede zwischen den einzelnen Patienten deutlich.

Eine kürzlich publizierte Studie untersuchte die Ansprechrate auf Clopidogrel anhand der Thrombozyteninhibition. 105 Patienten mit stabiler Angina pectoris unterzogen sich einer Koronarangiographie mit PTCA bzw. Stent-Implantation. Wie in der vorliegenden Untersuchung wurde die Aggregation nach Aktivierung mit ADP in 5 bzw. 20µM Konzentration vor und vier Stunden nach Einnahme von 600mg Clopidogrel gemessen. Patienten mit einer Aggregationshemmung von unter 30% im Vergleich zum Ausgangswert wurden als relative (Semi-responder), mit einer Aggregationshemmung von weniger als 10% als absolute Non-responder eingestuft. Bei zwei Patienten war es anschließend zu einer subakuten Thrombose des Stent-Implantates

gekommen. Diese Patienten befanden sich in der Gruppe der Non-responder. Die Verfasser diskutieren eine höhere Validität der Aussage gemessen mit 5µM ADP-Aktivierung der Thrombozyten. Im Vergleich zur Stimulierung mit 20µM ADP kann ein subtileres Ansprechen der Blutplättchen detektiert werden. In dieser Studie waren 10% der Patienten Semi- und 5% Non-responder (72).

Gemessen an diesen Kriterien können in der vorliegenden Arbeit drei der zehn Patienten nach 600mg Clopidogrel-Ladungsdosis als Semi-responder bezeichnet werden. Eine Inhibition von weniger als 10% nach 4 Stunden (Non-responder) konnte in dieser Gruppe unter 5µM ADP-Aktivierung nicht verzeichnet werden, unter 20µM ADP-Aktivierung bei zwei Patienten.

Im Vergleich dazu ließ sich unter den zehn Patienten, welche 450mg Clopidogrel eingenommen hatten, unter 5µM Aktivierung jeweils nur ein Semi- und ein absoluter Non-responder feststellen (versus drei Semi-respondern unter 600mg). Dies könnte erklären, warum die Aggregationshemmung der Gruppe mit 450mg Ladungsdosis durchschnittlich stärker war als in der 600mg-Gruppe (47,1% versus 32,8%; s. 5.4). Ein eindeutig linearer Verlauf der Inhibitionssteigerung entsprechend der Ladungsdosis wird in der vorliegenden Studie durch die individuelle Ansprechrate auf Thienopyridine verhindert. Eine größere Fallzahl an Probanden wäre nötig, um dies darstellen zu können.

Es ist demnach ein individuell sehr unterschiedliches Ansprechen auf Thienopyridine zu beobachten. Es wurde bereits erwähnt, daß kongenitale Variationen unter den thrombozytären Purinozeptoren beschrieben sind (35). Auch Topol und Mitarbeiter führen bis zu 30% der natürlichen Variationen im Reaktionsverhalten von Blutplättchen auf genetische Unterschiede zurück (106).

Desweiteren wird ein individueller Unterschied in der Metabolisierung der „prodrugs“ Ticlopidin bzw. Clopidogrel diskutiert. Wie jüngst bestätigt werden konnte, geschieht die Umwandlung über den Subtyp 3A4 des hepatischen Cytochrom-P-Systems. Die individuelle Aktivität dieses Enzyms scheint für die Ausprägung der Umwandlung von Clopidogrel in seinen aktiven Metaboliten verantwortlich bzw. für den antithrombozytären Effekt entscheidend zu sein. Bei Probanden mit guter bzw. reduzierter antithrombozytärer Wirkung von Clopidogrel wurde dies nachgewiesen: Die Einnahme weiterer Substanzen, welche über das Cytochrom-P 450 3A4 metabolisiert werden und sich im Atemtest messen lassen (z. B. Erythromycin), zeigten bei

ihnen entsprechend der Aktivität des Enzyms eine hohe bzw. schwache Wirkung (57).

Erste klinische Ergebnisse weisen darauf hin, daß bei Clopidogrel-Nonrespondern ein um 40% erhöhtes Risiko für ein weiteres kardiovaskuläres Ereignis besteht, verglichen mit Patienten, deren Thrombozyten durch das Medikament inhibiert werden (62).

## **5.6 Studienbeschränkung**

Die Untersuchung der Thrombozytenfunktion wird immer von dem potentiellen Risiko einer artifiziellen Thrombozytenaktivierung in vitro, bei der Gewinnung oder Verarbeitung der Proben, beeinträchtigt. Um fehlerhafte Ergebnisse zu vermeiden, wurden deshalb methodische Variablen innerhalb der untersuchten Patienten konstant gehalten und außerdem alle Proben innerhalb kürzest möglicher Zeit verarbeitet.

Die durchflußzytometrische Untersuchung erlaubt nur Aussagen über noch zirkulierende Thrombozyten, aber keine Beurteilung einer Aktivierung von Blutplättchen, die bereits sequestriert wurden. Demnach wäre es möglich, daß die thrombozytäre Aktivität unterbewertet wurde, was besonders bei Patienten mit geringer systemischer Thrombozytenaktivierung zum Tragen kommen könnte.

Mit Hilfe der Durchflußzytometrie ist es nicht möglich nur geringe Unterschiede in der Reaktionsbereitschaft der Thrombozyten nachzuweisen, weil durch diese Methodik lediglich der Endzustand der Thrombozyten dargestellt werden kann und nicht der Verlauf bis zu diesem Zustand. So ist zu erklären, daß in der Durchflußzytometrie durch die gewählten Agonistenkonzentrationen keine signifikanten Unterschiede in der Oberflächenexpression mancher Membranglykoproteine meßbar waren.

Desweiteren können auch in dieser Studie keine Interaktionen der vom Patienten eingenommenen Medikamente ausgeschlossen werden, welche einen unerwünschten Einfluß auf die untersuchten Meßgrößen haben.

## 5.7 Aussichten

Sowohl CURE als auch CREDO konnten den Nutzen der Kombination Clopidogrel plus ASS beim akuten Koronarsyndrom belegen (100; 112). Inzwischen wurde der diesbezügliche Einsatz von Clopidogrel in die Leitlinien der Amerikanischen sowie auch der Europäischen Gesellschaften für Kardiologie aufgenommen. Die Behandlung sollte demnach mit der einmaligen Aufsättigungsdosis von 300mg Clopidogrel begonnen und langfristig (mindestens neun Monate) mit 75mg pro Tag fortgesetzt werden (10).

Die in dieser Arbeit evaluierten unterschiedlichen Ladungsdosen sind derzeit klinisch in Erprobung. Die Messergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen eine Befürwortung der hohen Ladungsdosis von 600mg Clopidogrel zu. Im Vergleich mit der Ladungsdosis von 300mg konnte mit 600mg zum einen die maximale Aggregation nach Aktivierung mit ADP (5 $\mu$ M) vier Stunden nach Einnahme um 46,5% gesenkt werden (versus 24,7% nach 300mg Clopidogrel). Zum anderen zeigte sich durchflußzytometrisch die Aktivierbarkeit der Thrombozyten unter 600mg Clopidogrel in der hohen wie auch der niedrigen ADP-Konzentration in allen Messungen nach Therapiebeginn signifikant erniedrigt. Dies ergab die Verlaufskurve der gemessenen Immunfluoreszenz der PAC-Antikörper. Unter der halben Ladungsdosis konnte dies nur in der 5 $\mu$ M ADP-Konzentration nachgewiesen werden.

In Form weiterer Untersuchungen und anhand weiterer Messparameter sollten die beiden Ladungsdosen verglichen werden, um darzustellen, wie sich der Einsatz der hohen initialen Dosis von 600mg Clopidogrel auswirken könnte.

Weiterführend wird das „Management of Atherothrombosis with Clopidogrel in High-risk Patients with Recent Transient Ischaemic Attack or Ischaemic Stroke“ evaluiert (MATCH), wo an ca. 7 600 Patienten ermittelt werden soll, ob Clopidogrel in Kombination mit ASS effizienter vor ischämischen Insulten schützt als ASS alleine (48).

Um die Langzeiteffekte im Sinne einer Sekundärprävention zu ermitteln, wurde die „The Clopidogrel for High Atherothrombotic Risk and Ischemic Stabilization, Management and Avoidance“-Studie (CHARISMA) in die Wege geleitet. Anhand einer längerfristigen Kontrolle der über 15 000 eingeschlossenen Patienten soll sich

zeigen, ob die Kombination von Clopidogrel mit Aspirin auch einen längerfristigen Benefit gegenüber Aspirin erwarten läßt (12).

## 6. Zusammenfassung

In der vorliegenden Dissertation wurde anhand von 50 Patienten mit stabiler Angina pectoris untersucht, welchen Einfluß die Substanzen Ticlopidin und Clopidogrel auf die Thrombozytenaktivität ausüben. Dazu wurde vor Einnahme von Ticlopidin oder Clopidogrel und in mehreren Intervallen danach Blut entnommen und die Aggregation sowie die Expression aktivierungsabhängiger Oberflächenantigene bestimmt.

Ticlopidin wurde initial mit 2 x 500mg und dann mit 2 x 250mg täglich verabreicht, Clopidogrel wurde ohne sowie mit einer Ladungsdosis von 300, 450 bzw. 600mg und anschließend 75mg pro Tag verordnet.

Im Vergleich zu Ticlopidin zeigte sich unter Clopidogrel eine signifikant höhere Inhibierung der thrombozytären Aggregation, die mittels photometrischer Aggregometrie bestimmt wurde, sowie durchflußzytometrisch eine verminderte Expression aktivierter Fibrinogenrezeptoren nach Stimulation der Thrombozyten mit ADP. Eine höhere Ladungsdosis beschleunigt den Eintritt der antithrombozytären Wirkung von Clopidogrel und schließt damit eine therapeutische Lücke, die zwischen Einnahme und Wirkungseintritt von Ticlopidin entsteht. Innerhalb von vier Stunden konnte eine Ladungsdosis von mindestens 300mg Clopidogrel die thrombozytäre Aggregation bereits signifikant inhibieren.

Eine signifikant verminderte Freisetzung thrombogener Substanzen wie P-Selektin konnte in der vorliegenden Untersuchung teilweise gemessen werden; die ATP-Freisetzung blieb unbeeinflusst.

Es bleibt zu diskutieren, ob ein thrombozytäres Ansprechen bei Verabreichung von Clopidogrel individuell zu überprüfen ist, um einen plättcheninhibierenden Effekt sicherstellen zu können.

## Abkürzungsverzeichnis

AA	Arachidonsäure
Abb	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
ASS	Acetylsalicylsäure
ATP	Adenosintriphosphat
CD	Cluster of Determinants
Col	Kollagen
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetra-Azetat
Fg	Fibrinogen
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
Fn	Fibronektin
GP	Glykoprotein
I. E.	Internationale Einheiten
ICAM	Intercellular adhesion molecule
KHK	Koronare Herzkrankheit
Lam	Laminin
M	Mol/l
PE	Phycoerythrin
PBS	phosphate buffered saline
PECAM	platelet endothelial cellular adhesion molecule
PPP	Platelet Poor Plasma
PRP	Platelet Rich Plasma
PTCA	Percutane transluminale Koronarangioplastie
RGD	Arginin-Glycin-Aspartat
rtPA	rekombinant tissue plasminogen activator
SD	Standardabweichung
Tab.	Tabelle
TRAP	thrombin receptor activating peptide
TxA <sub>2</sub>	Thromboxan A <sub>2</sub>
vWF	von-Willebrand-Faktor
Z. n.	Zustand nach



# Abbildungsverzeichnis

1.1	Aktivierungsphase eines Thrombozyten	S. 8
1.2	Schematische Darstellung der Thrombozytenadhäsion	S. 9
1.3	Schematische Darstellung der Thrombozytenaggregation	S. 10
1.4	Struktur des GPIIb-IIIa	S. 15
1.5	Metabotrophe ADP-Bindungsstellen	S. 18
1.6	Strukturformeln der Moleküle Ticlopidin und Clopidogrel	S. 24
3.1	Aggregationskurve	S. 36
3.2	Die Zwei-Parameter Darstellung in der Durchflußzytometrie	S. 38
3.3	Die Darstellung als Histogramm in der Durchflußzytometrie	S. 39
4.1	Aggregation fünf Minuten nach Aktivierung mit 20µM ADP	S. 42
4.2	Aggregation fünf Minuten nach Aktivierung mit 5µM ADP	S. 43
4.3	Aggregation fünf Minuten nach Aktivierung mit 25µM TRAP	S. 44
4.4	Aggregationsmaximum nach Aktivierung mit 20µM ADP	S. 45
4.5	Aggregationsmaximum nach Aktivierung mit 5µM ADP	S. 46
4.6	Deaggregation nach Aktivierung mit 20 µM ADP	S. 48
4.7	Deaggregation nach Aktivierung mit 5µM ADP	S. 49
4.8	Steigung der Aggregationskurven nach Aktivierung mit 20µM ADP	S. 50
4.9	Freisetzung von ATP nach Aktivierung mit 20µM ADP	S. 52
4.10	Freisetzung von ATP nach Aktivierung mit 25µM TRAP	S. 53
4.11	PAC-1, nicht-aktiviert	S. 55
4.12	PAC-1, Aktivierung mit 20µM ADP	S. 56
4.13	PAC-1, Aktivierung mit 5µM ADP	S. 57
4.14	CD62P: Aktivierung mit 20µM ADP; Einzelwerte nach 0 und 4 Stunden	S. 59
5.1	Aggregation im Zeitintervall 0 bis 24 Stunden bei zwei Patienten	S. 66

## Tabellenverzeichnis

1.1	Thrombozytäre Membranglykoproteine	S. 13
3.1	Demographische Daten der Studienpopulation	S. 31
3.2	Pipettierschema für die Durchflußzytometrie	S. 33

# Curriculum Vitae

## **Persönliche Daten**

Name	Beate Birgit Coppola (geb. Wolf)
Geburtsdatum, -ort	16. November 1974, Hannover
Staatsangehörigkeit	deutsch
Konfession	römisch-katholisch
Familienstand	verheiratet, ein Kind
Ehemann	Luigi Coppola
Eltern	Alois und Johanna Wolf

## **Schulbildung**

1981-1985	Grundschule Hannover Kirchrode / Grundschule Rott am Inn
1985-1994	Ignaz-Günther-Gymnasium Rosenheim
Abschluß	Allgemeine Hochschulreife

## **Studium der Medizin**

1994-1997	Vorklinischer Studienabschnitt: Ludwig-Maximilian-Universität München
1997-2001	Klinischer Studienabschnitt: Technische Universität München
02/2002-07/2003	ÄiP im Städtischen Krankenhaus München Harlaching, Abteilung für Urologie
08/2003-01/2004	Assistenzärztin in der Praxis für Allgemeinmedizin Dr. med. Dieter Kutschker, Rott am Inn

## Danksagung

Mein größter Dank gilt Herrn Professor Meinrad Gawaz, der mir das Gelingen dieser spannenden und interessanten Dissertation ermöglichte, für seine kompetente und motivierende Betreuung.

Ich möchte mich herzlich bei Frau Dr. Silja Rüdiger und Frau Dr. Iris Müller für ihre Betreuung und Mithilfe bei den Studien bedanken.

Herzlichen Dank an Frau Dr. Gisela Pogatsa-Murray für die Einführung in die Methodik und die stets freundliche und verlässliche Hilfestellung.

Herrn Dr. Winfried Taubitz danke ich sehr für die Einweisung am Durchflußzytometer.

Vielen Dank an Frau Kirsten Langenbrink, Frau Antje Wallmuth, Frau Christiane Donick und Frau Sandra Kerstan im Labor für experimentelle Kardiologie des Deutschen Herzzentrums. Ihre fachkundige Betreuung brachte mir viel Spaß an der Arbeit im Labor.

Nicht zuletzt möchte ich Herrn Dr. Willibald Hochholzer für seine stete Unterstützung danken.

## Literaturverzeichnis

- (1). Andrews, RK, Lopez, JA, Bendt, MC Molecular mechanisms of platelet adhesion and activation. *Int J Biochem Cell Biol* 29 (1997) 91-105
- (2). Andrioli, G, Ortolani, R, Fontana, L, Gaino, S, Bellavite, P, Lechi, C, Minuz, P, Manzato, F, Tridente, G, Lechi, A Study of platelet adhesion in patients with uncomplicated hypertension. *J Hypertens* 14 (1996) 1215-21
- (3). Badimon, JJ, Fuster, V, Chesebro, JH and Badimon, L Coronary atherosclerosis. A multifactorial disease. *Circulation* 87 (1993) 113-16
- (4). Baurand, A, Eckly, A, Bari, N, Léon, C, Hechler, B, Cazenave, JP, Gachet, C Desensitization of the Platelet Aggregation Response to ADP: Differential Down-regulation of the P2Y1 and P2cyc Receptors. *Thromb Haemost* 84 (2000) 484-91
- (5). Becker, RC Antiplatelet therapy in coronary heart disease. Emerging strategies for the treatment and prevention of acute myocardial infarction. *Arch Pathol Lab Med* 117 (1993) 89-96
- (6). Bennett CL, Connors, J, Carwile, JM, Moake JL, Bell WR, Tarantolo SR, McCarthy LJ, Sarode R, Hatfield AJ, Feldman MD, Davidson CJ, Tsai HM Thrombotic thrombocytopenic purpura associated with clopidogrel. *N Engl J Med Related\_Articles, Books, LinkOut* 342 (2000) 1773-7
- (7). Berger, PB, Bell, MR, Rihal, CS, Ting, H, Barsness, G, Garatt, K, Bellot, V, Mathew, V, Melby, S, Hammes, LV, Grill, D, Holmes, DR Clopidogrel versus ticlopidine after intracoronary stent placement. *J Am Coll Cardiol* 34 (1999) 1891-4
- (8). Bertolino, G, Noris, P, Previtalli, M, Gamba, G, Ferrario, M, Montani, M, Balduini, CL Platelet function after in vivo and in vitro treatment with thrombolytic agents. *Am J Cardiol* 69 (1992) 457-61
- (9). Bertrand, ME, Rupprecht, HJ, Urban, P, Gershlick, AH, et al. Double-blind study of the safety of clopidogrel with and without a loading dose in combination with aspirin compared with ticlopidine in combination with aspirin after coronary stenting : the clopidogrel aspirin stent international cooperative study (CLASSICS). *Circulation* 102 (2000) 624-9.
- (10). Bertrand, ME, ML, Fox, KA , Wallentin, LC, Hamm, CW, McFadden, E, De Feyter, PJ, Specchia, G, Ruzylo, W Management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation. *Eur. Heart J.* 23 (2002) 1809-40

- (11). Bhatt, CL, Bertrand, ME, Berger, PB, L'Allier, PL, Moussa, I, Moses, JW , Dangas, G, Taniuchi, M, Lasala, JM, Holmes, DR, Ellis, SG, Topol, EJ Meta-analysis of randomized and registry comparisons of ticlopidine with clopidogrel after stenting. *J Am Coll Cardiol* 39 (2002) 9-14
- (12). Bhatt, CL, Topol, EJ Clopidogrel for High Atherothrombotic Risk and Ischemic Stabilization, Management and Avoidance Executive Committee. Clopidogrel added to aspirin versus aspirin alone in secondary prevention and high-risk primary prevention: rationale and design of the Clopidogrel for High Atherothrombotic Risk and Ischemic Stabilization, Management and Avoidance (CHARISMA) trial. *American Heart Journal* 148 (2004) 263-8
- (13). Bihour, C, Durrieu-Jais, C, Besse, P, Nurden, P, Nurden, AT Flow cytometry reveals activated GPIIb-IIIa complexes on platelets from patients undergoing thrombolytic therapy after acute myocardial infarction. *Blood Coagul Fibrinolysis* 6 (1995) 395-410
- (14). Born, GVR Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. *nature* June (1962) 927-9
- (15). Bossavy, JP, Thalamas, C, Sagnard, L, Barret, A, Sakariassen, K, Boneu, B, Cadroy, Y A double-blind randomized comparison of combined aspirin and ticlopidine therapy versus aspirin or ticlopidine alone on experimental arterial thrombogenesis in humans. *Blood* 92 (1998) 1518-25
- (16). Brass, LF, Manning, DR, Cichowski, K, Abrams, CS Signaling through G Proteins in Platelets: to the Integrins and Beyond. *Thromb Haemost* 78 (1997) 581-9
- (17). Braun, M, Kramann, J, Strohbach, H, Schrör, K Incomplete inhibition of platelet secretion by low-dose aspirin. *Platelets* 5 (1994) 325-31
- (18). Califf, RM Glycoprotein IIb/IIIa blockade and thrombolytics: early lessons from the SPEED and GUSTO IV trials. *Am Heart J* 138 (1999) S12-5
- (19). Cannon, CP, Tracy, R Clotting for the clinician: an overview of thrombosis and antithrombotic therapy. *J Thrombosis and Thrombolysis* 2 (1995) 95-106
- (20). Caplain, H, Donat, F, Gaud, C, Necciari, J Pharmacokinetics of Clopidogrel. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* 25, Suppl.2 (1999) 25-8
- (21). CAPRIE Steering Committee. A randomised, blinded, trial of clopidogrel versus aspirin in patients at risk of ischaemic events (CAPRIE). *Lancet* 348 (1996) 1329-39.
- (22). Charo, IF, Kieffer, N, Phillips, DR Platelet membrane glycoproteins. In: *Haemostasis and Thrombosis: Basis principles and clinical practice*. RW Colman,

- Hirsh, J, Marder, V, Salzman, EW (Ed.), Lippincott, JB, Philadelphia (1994) 3, 489-507
- (23). Cohen, LS Clinical pharmacology of acetylic acid. *Sem Thromb Hemost* 2 (1976) 95-106
- (24). Collen, D, Lijnen, HR Molecular basis of fibrinolysis, as relevant for thrombolytic therapy. *Thromb Haemost* 74 (1995) 167-71
- (25). Coller, BS Blockade of platelet GPIIb/IIIa receptors as an antithrombotic strategy. *Circulation* 92 (1995) 2373-80
- (26). Coller, BS Platelets in cardiovascular thrombosis and thrombolysis. In: *The Heart and Cardiovascular System: Scientific foundations*. Fozzard, HA, Haber, E, Jennings, RB, Katz, AM, Morgan, HE (Ed.), Raven Press, New York (1991) 219-73
- (27). Coukell, AJ and Markham, A Clopidogrel. *Drugs* 54 (1997) 745-50; discussion 751.
- (28). DeGroot, PG and Sixma, JJ Platelet Adhesion. *Br J Haematol* 75 (1990) 581-9
- (29). Diener, HC Thrombotisch-thrombozytopenische Purpura durch Clopidogrel? *Arzneimitteltherapie* 19. Jahrgang (2001) 136-7
- (30). Fitzgerald, DJ, Roy, L, Catella, F and FitzGerald, GA Platelet activation in unstable coronary disease. *N Engl J Med* 315 (1986) 983-9
- (31). Fuster, V, Badimon, L, Badimon, JJ and Chesebro, JH The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes (1). *N Engl J Med* 326 (1992) 242-50
- (32). Fuster, V, Badimon, L, Badimon, JJ and Chesebro, JH The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes (2). *N Engl J Med* 326 (1992) 310-8
- (33). Fuster, V, Badimon, L, Cohen, M, Ambrose, JA, et al. Insights into the pathogenesis of acute ischemic syndromes. *Circulation* 77 (1988) 1213-20
- (34). Gachet, C, Hechler, B, Léon, C, Vial, C, Leray, C, Ohlmann, P, Cazenave, JP Activation of ADP Receptors and Platelet Function. *Thromb Haemost* 78 (1997) 271-5
- (35). Gachet, C ADP receptors of platelets and their inhibition. *Thromb Haemost* 86 (2001) 222-32
- (36). Gachet, C Identification, characterization and inhibition of the platelet ADP receptors. *Int J Hematol* 74 (2001) 375-81
- (37). Gawaz, M Das Blutplättchen. In: *Das Blutplättchen*. (Ed.), Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1999)

- (38). Gawaz, M, Brand, K, Dickfeld, T, Pogatsa-Murray, G, Page, S, Bogner, C, Koch, W, Schomig, A, Neumann, F Platelets induce alterations of chemotactic and adhesive properties of endothelial cells mediated through an interleukin-1-dependent mechanism. Implications for atherogenesis. *Atherosclerosis* 148 (2000) 75-85
- (39). Gawaz, M, Neumann, FJ, Ott, I, May, A, Rudiger, S, Schomig, A Changes in membrane glycoproteins of circulating platelets after coronary stent implantation. *Heart* 76 (1996) 166-72
- (40). Gawaz, M, Neumann, FJ, Ott, I, May, A, Rudiger, S, Schomig, A Role of activation-dependent platelet membrane glycoproteins in development of subacute occlusive coronary stent thrombosis. *Coron Artery Dis* 8 (1997) 121-8
- (41). Gawaz, M, Neumann, FJ, Ott, I, May, A, Schomig, A Platelet activation and coronary stent implantation. Effect of antithrombotic therapy. *Circulation* 94 (1996) 279-85
- (42). Gawaz, M, Neumann, FJ, Ott, I, Schiessler, A, Schomig, A Platelet function in acute myocardial infarction treated with direct angioplasty [see comments]. *Circulation* 93 (1996) 229-37
- (43). Gawaz, M, Neumann, FJ and Schomig, A Evaluation of platelet membrane glycoproteins in coronary artery disease : consequences for diagnosis and therapy. *Circulation* 99 (1999) E1-E11
- (44). Gawaz, M, Loftus, JC, Bajt, ML, Frojmovic, MM, Plow, EF, Ginsberg, MH Ligand bridging mediates integrin alpha IIb beta 3 (platelet GPIIB- IIIA) dependent homotypic and heterotypic cell-cell interactions. *J Clin Invest* 88 (1991) 1128-34
- (45). George, JN and Colman, RW Overview of Platelet Structure and Funktion. In: Hemostasis and thrombosis: basic principles and clinical practice. RW Colman, J Hirsh, VJ Marder, AW Clowes and JN George (Ed.), Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia (2001) 4th ed., 382-6
- (46). Gillis, JC, Wagstaff, AJ, Goa, KL Alteplase. A reappraisal of its pharmacological properties and therapeutic use in acute myocardial infarction. *Drugs* 50 (1995) 102-36
- (47). Ginsberg, MH, Du, X, O'Toole, TE and Loftus, JC Platelet integrins. *Thromb Haemost* 74 (1995) 352-9
- (48). Hacke, W From CURE to MATCH: ADP Receptor Antagonists as the Treatment of Choice for High-Risk Atherothrombotic Patients. *Cerebrovasc Dis* 13 (2002) 22-6



- (49). Hechler, B, Eckly, A, Ohlmann, P, Cazenave, JP, Gachet, C The P2Y1 receptor, necessary but not sufficient to support full ADP-induced platelet aggregation, is not the target of the drug clopidogrel. *Br. J. Haematol* 103 (1998) 858-66
- (50). Hershey, LA Stroke prevention in women: role of aspirin versus ticlopidine. *Am J Med* 91 (1991) 288-92
- (51). Hollopeter, G, Jantzen, HM, Vincent, D, Li, G, England, L, Ramakrishnan, V, Yang, RB, Nurden, P, Nurden, A, Julius, D, Conley, PB Identification of the platelet ADP receptor targeted by antithrombotic drugs. *nature* 409 (2001) 202-7
- (52). Holmsen, H, Day, HJ, Stormoken, H The blood platelets release reaction. *Scand J Haematol* 8 (1969) 1-6
- (53). Horwitz, AF Integrine. *Spektrum der Wissenschaft* (1998) 86-94
- (54). Hudson, MP, Greenbaum, AB, Harrington, RA and Ohman, EM Use of glycoprotein IIb/IIIa inhibition plus fibrinolysis in acute myocardial infarction. *J Thromb Thrombolysis* 7 (1999) 241-5
- (55). Jantzen, HM, Gousset, L, Bhaskar, V, Vincent, D, Tai, A, Reynolds, EE, Conley, PB Evidence for Two Distinct G-protein-coupled ADP Receptors Mediating Platelet Activation. *Thromb Haemost* 81 (1999) 111-7
- (56). Kastrati, A, v. 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* July (2004)
- (57). Lau, WC, Gurbel, PA, Watkins, PB, Neer, CJ, et al. Contribution of Hepatic Cytochrome P450 3A4 Metabolic Activity to the Phenomenon of Clopidogrel Resistance. *Circulation* 109 (2004) 166-71
- (58). Lefkowitz, J, Plow, EF and Topol, EJ Platelet glycoprotein IIb/IIIa receptors in cardiovascular medicine. *N Engl J Med* 332 (1995) 1553-9
- (59). Mackie, IJ, Neal, CR The Platelet. Platelet-vessel wall interactions (The Bloomsbury series in clinical science). In: (Ed.), Springer Verlag Berlin, Heidelberg, (1988) 1-32
- (60). Madan, M, Berkowitz, SD, Tchong, JE Glycoprotein GPIIb-IIIa integrin blockade. *Circulation* 98 (1998) 2629-35
- (61). Maruyama, S, Katayama, S Therapeutic effects of anti-platelet drugs towards TIA, RIND. An open comparative study of ticlopidine versus aspirin. *Japanese Journal of Clinical and Experimental Medicine* 58 (1981) 3617-26

- (62). Matetzky, SS, B; Guetta, V, Shechter, M, Bienart, R, Goldenberg, I, Novikov, I, Pres, H, Savion, N, Varon, D, Hod, H Clopidogrel Resistance Is Associated With Increased Risk of Recurrent Atherothrombotic Events in Patients With Acute Myocardial Infarction. *Circulation* 109 (2004) 3171-5
- (63). McEver, RP Properties of GMP-140, an inducible granule membrane protein of platelets and endothelium. *Blood Cells* 16 (1990) 73-80
- (64). Mehta, SR, Yusuf, S, Peters, RJ, Bertrand, ME, Lewis, BS, Natarajan, MK, Malmberg, K, Rupprecht, H, Zhao, F, Chrolavicius, S, Copland, I, Fox, KA; Clopidogrel in Unstable angina to prevent Recurrent Events trial (CURE) Investigators. Effects of pretreatment with clopidogrel and aspirin followed by long-term therapy in patients undergoing percutaneous coronary intervention: the PCI-CURE study. *Lancet* 358 (2001) 527-33
- (65). Michelson, AD Flow cytometry: a clinical test of platelet function. *Blood* 87 (1996) 4925-36
- (66). Mills, DC, Puri, R, Hu, CJ, Minniti, C, Grana, G, Freedman, MD, Colman, RF, Colman, RW Clopidogrel inhibits the binding of ADP analogues to the receptor mediating inhibition of platelet adenylate cyclase. *Arteriosc Thromb* 12 (1992) 430-6
- (67). Mills, DC ADP Receptors on Platelets. *Thromb Haemost* 76 (1996) 835-56
- (68). Moloney, B A. An analysis of the side-effects of ticlopidine. In: Ticlopidine, Platelets and Vascular Disease. W. K. Hass, Easton, J.D. (Ed.), Springer, New York (1993) 117-39
- (69). Morais, J Insights from CURE: Using Clopidogrel on Top of Standard Therapy. *Cerebrovasc Dis* 13 Suppl (2002) 17-21
- (70). Mousa, SA, Bennett, JS Platelets in health and disease: Platelet GPIIb-IIIa structure and function: recent advances in antiplatelet therapy. *Drugs of the future* 21 (1996) 1141-54
- (71). Moussa, I, Oetgen, M, Roubin, G, Colombo, A, Wang, X, Iyer, S, Maida, R, Collins, M, Kreps, E, Moses, JW Effectiveness of Clopidogrel and Aspirin Versus Ticlopidine and Aspirin in Preventing Stent Thrombosis After Coronary Stent Implantation. *Circulation* 99 (1999) 2364-6
- (72). Muller, I, Besta, F, Schulz, C, Massberg, S, Schomig, A, Gawaz, M Prevalence of clopidogrel non-responders among patients with stable angina pectoris scheduled for elective coronary stent placement. *Thromb Haemost* 89 (2003) 783-7

- (73). Neumann, FJ, Hochholzer, W, Pogatsa-Murray, G, Schömig, A, Gawaz, M Antiplatelet Effects of Abciximab, Tirofiban and Eptifibatide in Patients Undergoing Coronary Stenting. *Journal of the American College of Cardiology* 37 (2001) 1323-8
- (74). Neumann, FJ, Gawaz, M, Dickfeld, T, Wehinger, A, Walter, H, Blasini, R, Schomig, A Antiplatelet effect of ticlopidine after coronary stenting. *J Am Coll Cardiol* 29 (1997) 1515-9
- (75). Nurden, AT, Macchi, L, Bihour, C, Durrieu, C, Besse, P, Nurden, P Markers of platelet activation in coronary heart disease patients. *Eur J Clin Invest* 24 Suppl 1 (1994) 42-5
- (76). Nurden, P et al. An inherited bleeding disorder linked to a defective interaction between ADP and its receptor on platelets. *J. Clin. Invest.* 95 (1995) 1612-22
- (77). Pache, J, Mehilli, J, Gawaz, M, Neumann, FJ, Seyfarth, M, Hall, D, Braun, S, Dirschinger, J, Schömig, A Clopidogrel therapy in patients undergoing coronary stenting: value of a high-loading-dose regimen. *Catheter Cardiovasc Interv.* 55 (2002) 436-41
- (78). Packham, MA and Mustard, JF The role of platelets in the development and complications of atherosclerosis. *Semin Hematol* 23 (1986) 8-26
- (79). Patrono, C Aspirin as an antiplatelet drug. *New Engl J Med* 330 (1994) 1287-94
- (80). Pawlowska, Z, Swiatkowska, M, Krzeslowska, J, Pawlicki, L, Cierniewski, CS Increased platelet-fibrinogen interaction in patients with hypercholesterolemia and hypertriglyceridemia. *Atherosclerosis* 103 (1993) 13-20
- (81). Plow, EF, D'Souza, SE and Ginsberg, MH Consequences of the interaction of platelet membrane glycoprotein GPIIb- IIIa (alpha IIb beta 3) and its ligands. *J Lab Clin Med* 120 (1992) 198-204
- (82). Plow, EF, D'Souza, SE and Ginsberg, MH Ligand binding to GPIIb-IIIa: a status report. *Semin Thromb Hemost* 18 (1992) 324-32
- (83). Pryse-Phillips, W Ticlopidin in patients with stroke precursors: The ticlopidin aspirin stroke study (TASS). WWW: (1990)
- (84). Reichenberger, F, Wirtz, H, Paschke, R Clopidogrel and side effects. *Cardiology* 96 (2001) 51-2
- (85). Rolf, MG, Brearly, CA Mahaut-Smith, MP Platelet Shape Change Evoked by Selective Activation of P2X1 Purinoceptors with  $\alpha,\beta$ -Methylene ATP. *Thromb Haemost* 85 (2001) 303-8

- (86). Ross, R Atherosclerosis - an inflammatory disease. *N Engl J Med* 340 (1999) 115-26
- (87). Ruggeri, ZM New insights into the mechanisms of platelet adhesion and aggregation. *Semin Hematol* 31 (1994) 229-39
- (88). Ruggeri, ZM Platelet-Vessel Wall Interactions in Flowing Blood. In: Hemostasis and thrombosis: basic principles and clinical practice. RW Colman, J Hirsh, VJ Marder, AW Clowes and JN George (Ed.), Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia (2001) 4th ed., 683-98
- (89). Ruggeri, ZM Structure of vWF and its function in platelet adhesion and thrombus formation. *Clinical haematology* 14 (2001) 258-79
- (90). Savi, P, Pereillo, JM, Uzabiaga, MF, Combalbert, J, Picard, C, Maffrand, JP, Pascal, M, Herbert, JM Identification and Biological Activity of the Active Metabolite of Clopidogrel. *Thromb Haemost* 84 (2000) 891-6
- (91). Schafer, AI and Handin, RI The role of platelets in thrombotic and vascular disease. *Prog Cardiovasc Dis* 22 (1979) 31-52
- (92). Schömig, A, Neumann, FJ, Kastrati, A, Schühlen, H, et al. A randomized comparison of antiplatelet and anticoagulant therapy after the placement of coronary-artery stents [see comments]. *N Engl J Med* 334 (1996) 1084-9
- (93). Schrör, K Antiplatelet drugs. A comparative review. *Drugs* 50 (1995) 7-28
- (94). Schrör, K The Basic Pharmacology of Ticlopidine and Clopidogrel. *Platelets* 4 (1993) 252-61
- (95). 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. *Am J Cardiol* 87 (2001) 397-400
- (96). Siess, W Molecular mechanisms of platelet activation. *Physiol Rev* 69 (1989) 58-178
- (97). Sixma, JJ Interaction of blood platelets with the vessel wall. In: Hemostasis and Thrombosis. A. Bloom, Forbes, CD (Ed.), NY: Churchill Livingstone, New York (1994) 259-85
- (98). Slugg PH, MD, Smith WB, Vargas R, Nichola P, Necciari J Cirrhosis does not affect the pharmacokinetics and pharmacodynamics of clopidogrel. *J Clin Pharmacol* 40 (2000) 396-401
- (99). Steinhubl, SR, Tan, WA, Foody, JM, Topol, EJ Incidence and clinical course of thrombotic thrombocytopenic purpura due to ticlopidine following coronary stenting. *JAMA* 281 (1999) 806-10

- (100). Steinhubl, SR, Berger, PB, Tift Mann III, J, Fry, ETA, DeLago, A, Wilmer, C, Topol, EJ Clopidogrel for Reduction of Events During Extended Observation. *JAMA* 288 (2002) 2411-20
- (101). Storey, RF, Oldroyd, KG, Wilcox, RG Open Multicentre Study of the P2T Receptor Antagonist AR-C69931MX Assessing Safety, Tolerability and Activity in Patients with Acute Coronary Syndromes. *Thromb Haemost* 85 (2001) 401-7
- (102). Takano, S, Kimura, J, Matsuoka, I, Ono, T No requirement of P2X1 purinoceptors for platelet aggregation. *European Journal of Pharmacology* 372 (1999) 305-9
- (103). Taub, R, Gould, RJ, Garsky, VM, Ciccarone, TM, Hoxie, J, Friedman, PA, Shattil, SJ A monoclonal antibody against the platelet fibrinogen receptor contains a sequence that mimics a receptor recognition domain of fibrinogen. *J Biol Chem* 264 (1989) 259-65
- (104). The Clopidogrel in Unstable angina to prevent Recurrent Events (CURE) Study Investigators. The Clopidogrel in Unstable angina to prevent Recurrent Events (CURE) trial programme; rationale, design and baseline characteristics including a meta-analysis of the effects of thienopyridines in vascular disease. *Eur Heart J* 2000 Dec; 21(24):2033-41 21 (2000) 2033-41
- (105). Theroux, P, Fuster, V Acute coronary syndroms. Unstable angina and non-Q-wave myocardial infarction. *Circulation* 97 (1998) 1195-206
- (106). Topol, EJ, Quinn, MJ Common variations in platelet glycoproteins: pharmacogenomic implications. *Pharmacogenomics* 4 (2001) 341-52
- (107). Topol, EJ Toward a new frontier in myocardial reperfusion therapy: emerging platelet preeminence. *Circulation* 97 (1998) 211-8
- (108). Topol, EJ, Moliterno, DJ, Herrmann, HC, Powers, ER, Grines, CL, Cohen, EA, Bertrand, M, Neumann, FJ, Stone, GW, DiBattiste, PM, Demopoulos, L Comparison of two platelet glycoprotein IIb/IIIa inhibitors, Tirofiban and Abciximab, for the prevention of ischemic events with percutaneous coronary revascularization. *N Engl J Med* 344 (2001) 1888-94
- (109). Weber, AA, Braun, M, Hohlfeld, T, Schwippert, B, Tschoepe, D, Schrör, K Recovery of platelet function after discontinuation of clopidogrel treatment in healthy volunteers. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 52 (2001) 333-6
- (110). White, JG and Krumwiede, MD The down-side of platelet interaction with surfaces. *Eur J Cell Biol* 65 (1994) 178-88

- (111). Willerson, JT, Golino, P, Eidt, J, Campbell, WB, Buja, LM Specific platelet mediators and unstable coronary artery lesions. Experimental evidence and potential clinical implications. *Circulation* 80 (1989) 198-205
- (112). Yusuf, S, Zhao, F, Mehta, SR, Chrolavicius, S, Tognoni, G, Fox, KK Effects of clopidogrel in addition to aspirin in patients with acute coronary syndromes without ST-segment elevation. *The New England Journal of Medicine* 345 (2001) 494-503

# Anhang

## Geräteeinstellung:

### Durchflußzytometer

(Bestimmung der Thrombozyten)

Cytometer Typ:	FACScan			
Detectors/Amps:	Parameter	Detector	Voltage	Amplification Gain
Mode				
	P1	FSC	E00	1,00 log
	P2	SSC	261	1,00 log
	P3	FL1	670	1,00 log
	P4	FL2	565	1,00 log
	P5	FL3	150	1,00 log
Threshold:	Parameter FSC			
	Value 200			
Compensation:	FL1	0,0 %	FL2	
	FL2	45,0 %	FL1	
	FL2	0,0 %	FL3	
	FL3	0,0 %	FL2	
Log Data Units:	Channel Values			

**Tabelle I: Einfluß von Ticlopidin / Clopidogrel auf die Plättchenaggregation ( Fünf Minuten nach Aktivierung )**

Zeit nach Einnahme von		0 h	2 h	4 h	24 h	48 h
Clopidogrel (600mg)	ADP (5µmol/l)	44,0 ± 24,6	19,5 ± 22,5	14,2 ± 19,8	7,7 ± 5,4	3,4 ± 4,2
	ADP (20µmol/l)	63,5 ± 17,7	37,1 ± 26,7	30,7 ± 28,1	22,7 ± 14,7	26,3 ± 11,7
	TRAP (25µmol/l)	70,9 ± 16,3	66,6 ± 12,8	59,3 ± 19,7	64,0 ± 11,9	63,4 ± 11,3
Clopidogrel (450mg)	ADP (5µmol/l)	41,5 ± 26,8	10,5 ± 12,8	9,8 ± 16,0	4,4 ± 6,9	4,4 ± 6,8
	ADP (20µmol/l)	77,2 ± 12,3	39,0 ± 25,0	29,9 ± 25,2	20,5 ± 16,7	12,9 ± 10,0
	TRAP (25µmol/l)	86,6 ± 9,9	82,9 ± 10,9	77,6 ± 10,2	75,5 ± 17,0	78,8 ± 10,5
Clopidogrel (300mg)	ADP (5µmol/l)	39,0 ± 17,7	15,8 ± 15,1	16,4 ± 17,6	25,7 ± 16,1	9,0 ± 8,3
	ADP (20µmol/l)	75,7 ± 13,0	44,8 ± 20,9	43,0 ± 19,5	47,1 ± 16,3	31,9 ± 8,9
	TRAP (25µmol/l)	68,6 ± 8,3	66,7 ± 8,1	63,5 ± 16,6	65,0 ± 11,1	65,4 ± 6,7
Clopidogrel (75mg)	ADP (5µmol/l)	39,0 ± 13,9	25,8 ± 14,2	33,3 ± 15,8	21,0 ± 14,7	14,4 ± 11,8
	ADP (20µmol/l)	69,2 ± 9,0	64,3 ± 14,0	58,3 ± 14,4	58,8 ± 17,1	45,0 ± 23,4
	TRAP (25µmol/l)	79,3 ± 8,8	78,3 ± 15,8	75,6 ± 11,9	72,7 ± 15,7	78,9 ± 7,5
Ticlopidin (2 x 500mg)	ADP (5µmol/l)	44,3 ± 21,0	38,6 ± 23,2	42,6 ± 23,2	27,2 ± 17,8	13,4 ± 11,7
	ADP (20µmol/l)	78,0 ± 9,4	63,6 ± 11,4	73,6 ± 16,3	70,8 ± 21,6	50,3 ± 30,6
	TRAP (25µmol/l)	86,4 ± 8,7	78,3 ± 11,8	86,1 ± 9,6	83,8 ± 10,9	82,8 ± 18,3

(Aggregation in %)

Alle Werte sind als Mittelwert ± Standardabweichung angegeben.



**Tabelle II: Einfluß von Ticlopidin / Clopidogrel auf die maximale Plättchenaggregation**

Zeit nach Einnahme von	0 h	2 h	4 h	24 h	48 h
Clopidogrel (600mg)	ADP (5µmol/l)	30,9 ± 19,5	27,1 ± 17,1	23,2 ± 12,2	17,3 ± 13,1
	ADP (20µmol/l)	48,7 ± 18,2	40,3 ± 21,4	36,0 ± 11,8	38,1 ± 11,8
	TRAP (25µmol/l)	71,7 ± 13,7	60,0 ± 18,0	64,0 ± 11,9	63,5 ± 11,3
Clopidogrel (450mg)	ADP (5µmol/l)	26,6 ± 17,1	25,8 ± 18,1	29,0 ± 18,2	21,3 ± 17,2
	ADP (20µmol/l)	56,6 ± 13,3	49,5 ± 14,3	43,7 ± 14,2	33,1 ± 11,5
	TRAP (25µmol/l)	83,6 ± 10,2	79,8 ± 8,4	81,4 ± 8,6	81,0 ± 7,3
Clopidogrel (300mg)	ADP (5µmol/l)	33,1 ± 14,7	32,8 ± 14,5	38,8 ± 10,5	27,9 ± 11,3
	ADP (20µmol/l)	54,3 ± 15,1	51,5 ± 17,8	54,2 ± 11,9	44,3 ± 15,1
	TRAP (25µmol/l)	66,7 ± 8,1	63,5 ± 16,6	65,0 ± 11,1	65,4 ± 6,7
Clopidogrel (75mg)	ADP (5µmol/l)	35,2 ± 14,4	38,9 ± 15,4	32,3 ± 14,7	22,2 ± 12,9
	ADP (20µmol/l)	63,6 ± 13,3	66,3 ± 13,0	64,5 ± 12,2	53,4 ± 18,9
	TRAP (25µmol/l)	73,2 ± 15,7	76,1 ± 11,1	74,6 ± 13,2	68,7 ± 25,7
Ticlopidin (2 x 500mg)	ADP (5µmol/l)	47,2 ± 15,9	50,2 ± 20,9	39,9 ± 19,0	40,8 ± 21,3
	ADP (20µmol/l)	63,8 ± 10,9	74,8 ± 14,7	72,2 ± 19,7	63,0 ± 27,2
	TRAP (25µmol/l)	77,9 ± 10,6	86,1 ± 9,6	83,8 ± 10,9	82,8 ± 18,3

(Aggregation in %)

Alle Werte sind als Mittelwert ± Standardabweichung angegeben.

**Tabelle III: Einfluß von Ticlopidin / Clopidogrel auf die Plättchendeaggregation**

Zeit nach Einnahme von		0 h	2 h	4 h	24 h	48 h
Clopidogrel (600mg)	ADP (5µmol/l)	18,9 ± 21,5	52,0 ± 37,2	65,6 ± 38,2	69,4 ± 9,6	82,4 ± 27,0
	ADP (20µmol/l)	5,2 ± 6,2	41,8 ± 36,9	44,9 ± 38,5	46,2 ± 34,1	42,3 ± 31,0
	TRAP (25µmol/l)	0,0 ± 0,0	6,1 ± 12,9	3,3 ± 10,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,1
Clopidogrel (450mg)	ADP (5µmol/l)	27,8 ± 30,5	70,8 ± 33,2	76,5 ± 30,0	88,2 ± 14,7	87,9 ± 16,1
	ADP (20µmol/l)	0,0 ± 0,0	34,6 ± 33,0	45,7 ± 35,8	57,8 ± 26,9	65,7 ± 24,5
	TRAP (25µmol/l)	2,0 ± 5,9	1,0 ± 3,1	2,8 ± 5,9	7,9 ± 14,4	3,0 ± 6,0
Clopidogrel (300mg)	ADP (5µmol/l)	31,4 ± 31,0	59,7 ± 33,9	60,4 ± 36,2	37,4 ± 36,0	66,2 ± 32,6
	ADP (20µmol/l)	2,7 ± 5,3	23,1 ± 26,0	21,7 ± 20,0	14,1 ± 17,6	25,9 ± 18,3
	TRAP (25µmol/l)	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Clopidogrel (75mg)	ADP (5µmol/l)	23,2 ± 30,3	30,5 ± 23,2	30,6 ± 27,8	42,0 ± 32,5	48,9 ± 39,0
	ADP (20µmol/l)	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	19,6 ± 32,5	20,1 ± 33,9	22,9 ± 28,0
	TRAP (25µmol/l)	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,7 ± 2,1	1,8 ± 5,2	0,0 ± 0,0
Ticlopidin (2 x 500mg)	ADP (5µmol/l)	18,2 ± 17,3	37,8 ± 44,1	21,6 ± 21,5	34,3 ± 17,5	65,2 ± 12,6
	ADP (20µmol/l)	0,0 ± 0,0	18,0 ± 40,2	2,2 ± 2,9	3,1 ± 5,7	11,6 ± 8,0
	TRAP (25µmol/l)	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0

(% Abnahme vom Aggregationsmaximum fünf Minuten nach Aktivierung)  
Alle Werte sind als Mittelwert ± Standardabweichung angegeben.

**Tabelle IV: Einfluß von Ticlopidin / Clopidogrel auf die Steigung der Aggregationskurve**

Zeit nach Einnahme von	0 h	2 h	4 h	24 h	48 h
Clopidogrel (600mg)	ADP (5µmol/l)	6,5 ± 4,0	5,1 ± 2,4	4,9 ± 2,7	4,0 ± 2,6
	ADP (20µmol/l)	7,9 ± 4,1	7,3 ± 3,7	5,9 ± 2,4	6,5 ± 3,5
	TRAP (25µmol/l)	11,1 ± 4,6	10,0 ± 5,7	10,0 ± 4,4	11,0 ± 4,5
Clopidogrel (450mg)	ADP (5µmol/l)	5,5 ± 2,4	5,9 ± 3,8	5,5 ± 3,4	4,9 ± 3,2
	ADP (20µmol/l)	8,4 ± 2,7	7,5 ± 2,0	8,2 ± 3,5	6,7 ± 0,7
	TRAP (25µmol/l)	11,0 ± 3,2	12,0 ± 3,1	11,1 ± 3,9	11,8 ± 2,8
Clopidogrel (300mg)	ADP (5µmol/l)	6,6 ± 2,9	6,1 ± 2,7	5,5 ± 2,1	5,3 ± 2,1
	ADP (20µmol/l)	8,2 ± 2,6	8,1 ± 4,2	7,2 ± 3,2	6,0 ± 2,9
	TRAP (25µmol/l)	10,3 ± 4,0	10,6 ± 4,4	9,1 ± 4,2	10,4 ± 4,6
Clopidogrel (75mg)	ADP (5µmol/l)	5,6 ± 2,4	6,2 ± 2,5	5,5 ± 2,3	4,9 ± 2,1
	ADP (20µmol/l)	7,6 ± 2,6	8,1 ± 1,9	7,1 ± 1,9	6,9 ± 2,2
	TRAP (25µmol/l)	9,9 ± 3,2	10,1 ± 3,6	9,8 ± 3,6	9,8 ± 3,1
Ticlopidin (2 x 500mg)	ADP (5µmol/l)	7,3 ± 2,4	8,8 ± 4,1	8,0 ± 4,3	8,4 ± 4,7
	ADP (20µmol/l)	7,5 ± 2,5	10,8 ± 2,5	9,9 ± 4,6	10,1 ± 4,8
	TRAP (25µmol/l)	10,9 ± 4,5	9,7 ± 3,4	12,1 ± 4,7	13,1 ± 4,6

Alle Werte sind als Mittelwert ± Standardabweichung angegeben.



**Tabelle V: Einfluß von Ticlopidin / Clopidogrel auf die ATP-Freisetzung**

Zeit nach Einnahme von	0 h	2 h	4 h	24 h	48 h	
Clopidogrel (600mg)	ADP (5µmol/l)	0,05 ± 0,05	0,06 ± 0,07	0,07 ± 0,11	0,05 ± 0,04	0,01 ± 0,02
	ADP (20µmol/l)	0,41 ± 0,61	0,56 ± 0,61	0,32 ± 0,33	0,19 ± 0,17	0,12 ± 0,10
	TRAP (25µmol/l)	1,67 ± 1,27	2,39 ± 1,63	2,57 ± 1,32	1,70 ± 1,11	1,13 ± 0,92
Clopidogrel (450mg)	ADP (5µmol/l)	0,12 ± 0,08	0,05 ± 0,05	0,08 ± 0,11	0,06 ± 0,03	0,03 ± 0,02
	ADP (20µmol/l)	0,38 ± 0,31	0,31 ± 0,12	0,30 ± 0,14	0,22 ± 0,18	0,14 ± 0,03
	TRAP (25µmol/l)	1,72 ± 0,91	1,82 ± 0,50	1,84 ± 0,46	1,50 ± 0,76	1,34 ± 0,30
Clopidogrel (300mg)	ADP (5µmol/l)	0,07 ± 0,08	0,04 ± 0,03	0,04 ± 0,05	0,08 ± 0,05	0,07 ± 0,11
	ADP (20µmol/l)	0,24 ± 0,29	0,20 ± 0,18	0,24 ± 0,20	0,24 ± 0,16	0,18 ± 0,16
	TRAP (25µmol/l)	1,16 ± 0,49	1,59 ± 1,42	1,75 ± 0,77	1,22 ± 0,45	0,89 ± 0,41
Clopidogrel (75mg)	ADP (5µmol/l)	0,06 ± 0,07	0,04 ± 0,02	0,07 ± 0,04	0,07 ± 0,08	0,05 ± 0,03
	ADP (20µmol/l)	0,31 ± 0,22	0,28 ± 0,10	0,23 ± 0,13	0,29 ± 0,11	0,22 ± 0,06
	TRAP (25µmol/l)	1,19 ± 0,62	1,31 ± 0,59	1,40 ± 0,48	1,37 ± 0,53	1,37 ± 0,56
Ticlopidin (2 x 500mg)	ADP (5µmol/l)	0,08 ± 0,08	0,07 ± 0,04	0,10 ± 0,09	0,06 ± 0,05	0,04 ± 0,04
	ADP (20µmol/l)	0,32 ± 0,25	0,18 ± 0,09	0,29 ± 0,10	0,33 ± 0,28	0,29 ± 0,15
	TRAP (25µmol/l)	1,41 ± 0,51	1,45 ± 0,51	1,96 ± 0,57	1,28 ± 0,74	1,65 ± 0,52

(ATP-Freisetzung in nMol)  
Alle Werte sind als Mittelwert ± Standardabweichung angegeben.

**Tabelle VI: Einfluß von Ticlopidin / Clopidogrel auf die totale Expression der Fibrinogenrezeptoren (CD41-Antikörper)**

Zeit nach Einnahme von	0 h	2 h	4 h	24 h	48 h
Clopidogrel (600mg)	nicht aktiviert	576 (558, 584)	580 (562, 584)	575 (555, 578)	583 (569, 595)
	ADP (5µmol/l)	582 (549, 593)	577 (570, 591)	577 (558, 591)	583 (563, 596)
	ADP (20µmol/l)	578 (569, 585)	573 (550, 587)	580 (567, 594)	587 (579, 601)
	TRAP (25µmol/l)	582 (553, 610)	586 (584, 603)	589 (529, 606)	606 (585, 618)
Clopidogrel (450mg)	nicht aktiviert	590 (563, 609)	599 (570, 607)	596 (563, 612)	572 (563, 583)
	ADP (5µmol/l)	-	-	-	-
	ADP (20µmol/l)	613 (596, 622)	596 (585, 622)	612 (596, 618)	589 (582, 600)
	TRAP (25µmol/l)	603 (588, 625)	605 (588, 613)	613 (595, 627)	605 (595, 610)
Clopidogrel (300mg)	nicht aktiviert	568 (543, 576)	569 (539, 585)	575 (557, 586)	569 (564, 578)
	ADP (5µmol/l)	583 (556, 598)	580 (535, 588)	583 (521, 595)	583 (583, 587)
	ADP (20µmol/l)	581 (552, 597)	574 (540, 595)	584 (568, 595)	589 (577, 592)
	TRAP (25µmol/l)	584 (550, 598)	589 (566, 592)	580 (519, 607)	593 (579, 595)
Clopidogrel (75mg)	nicht aktiviert	533 (524, 543)	541 (533, 582)	558 (543, 590)	577 (537, 595)
	ADP (5µmol/l)	-	-	-	-
	ADP (20µmol/l)	564 (549, 580)	576 (556, 609)	588 (554, 605)	586 (577, 613)
	TRAP (25µmol/l)	556 (541, 569)	558 (538, 585)	572 (567, 605)	598 (558, 621)
Ticlopidin (2 x 500mg)	nicht aktiviert	561 (541, 567)	563 (557, 611)	590 (566, 609)	588 (577, 601)
	ADP (5µmol/l)	-	-	-	-
	ADP (20µmol/l)	595 (577, 627)	589 (566, 596)	616 (584, 644)	618 (594, 618)
	TRAP (25µmol/l)	585 (569, 605)	584 (579, 595)	591 (582, 614)	619 (585, 631)

(Mittlere Immunfluoreszenz anti-CD41)

Alle Werte sind als Median und als erste und dritte Quartile angegeben.



**Tabelle VII: Einfluß von Ticlopidin / Clopidogrel auf die Exposition aktivierter Fibrinogenrezeptoren (PAC-1-Antikörper)**

<b>Zeit nach Einnahme von</b>	<b>0 h</b>	<b>2 h</b>	<b>4 h</b>	<b>24 h</b>	<b>48 h</b>
Clopidogrel (600mg)	nicht aktiviert	118 (106, 131)	125 (110, 137)	104 (102, 127)	107 (97, 120)
	ADP (5µmol/l)	181 (157, 208)	172 (134, 190)	161 (126, 216)	142 (116, 195)
	ADP (20µmol/l)	272 (245, 297)	262 (225, 299)	218 (142, 256)	218 (191, 252)
	TRAP (25µmol/l)	161 (154, 233)	181 (133, 222)	148 (127, 201)	195 (171, 221)
Clopidogrel (450mg)	nicht aktiviert	118 (110, 132)	119 (115, 133)	135 (118, 162)	118 (116, 124)
	ADP (5µmol/l)	-	-	-	-
	ADP (20µmol/l)	233 (207, 298)	239 (194, 258)	264 (264, 314)	155 (145, 174)
	TRAP (25µmol/l)	111 (108, 189)	121 (112, 207)	164 (131, 190)	133 (113, 170)
Clopidogrel (300mg)	nicht aktiviert	119 (108, 125)	113 (108, 129)	123 (100, 128)	121 (109, 123)
	ADP (5µmol/l)	233 (158, 291)	220 (161, 289)	241 (188, 282)	269 (188, 296)
	ADP (20µmol/l)	289 (278, 331)	300 (270, 331)	271 (230, 289)	289 (261, 297)
	TRAP (25µmol/l)	148 (129, 205)	157 (136, 198)	192 (119, 212)	152 (143, 162)
Clopidogrel (75mg)	nicht aktiviert	113 (106, 119)	118 (112, 125)	124 (107, 132)	122 (103, 138)
	ADP (5µmol/l)	-	-	-	-
	ADP (20µmol/l)	320 (286, 336)	296 (288, 318)	366 (310, 383)	280 (275, 293)
Ticlopidin (2 x 500mg)	ADP (20µmol/l)	154 (127, 189)	181 (139, 195)	211 (177, 231)	184 (138, 201)
	nicht aktiviert	122 (116, 130)	127 (118, 129)	141 (135, 142)	121 (118, 122)
	ADP (5µmol/l)	-	-	-	-
Ticlopidin (2 x 500mg)	ADP (20µmol/l)	365 (228, 380)	266 (235, 297)	295 (261, 336)	270 (216, 251)
	ADP (20µmol/l)	164 (140, 195)	150 (144, 156)	166 (129, 181)	125 (112, 150)
	TRAP (25µmol/l)	164 (137, 177)	150 (144, 156)	166 (129, 181)	125 (112, 150)

(Mittlere Immunfluoreszenz anti-PAC-1)

Alle Werte sind als Median und als erste und dritte Quartile angegeben.

**Tabelle VIII: Einfluß von Ticlopidin / Clopidogrel auf die Expression von P-Selektin (CD62P-Antikörper)**

Zeit nach Einnahme von	0 h	2 h	4 h	24 h	48 h	
Clopidogrel (600mg)	nicht aktiviert	173 (159, 181)	167 (159, 175)	168 (159, 175)	168 (152, 172)	161 (152, 173)
	ADP (5µmol/l)	202 (174, 222)	179 (166, 184)	178 (165, 190)	174 (171, 193)	186 (170, 202)
	ADP (20µmol/l)	244 (231, 261)	210 (193, 235)	193 (182, 238)	207 (183, 223)	208 (204, 210)
	TRAP (25µmol/l)	271 (197, 307)	227 (197, 307)	215 (174, 272)	297 (183, 321)	295 (282, 325)
Clopidogrel (450mg)	nicht aktiviert	172 (166, 186)	169 (157, 184)	169 (168, 177)	189 (169, 203)	172 (184, 168)
	ADP (5µmol/l)	-	-	-	-	-
	ADP (20µmol/l)	244 (226, 275)	197 (192, 224)	204 (190, 220)	233 (222, 243)	202 (196, 207)
	TRAP (25µmol/l)	226 (165, 316)	251 (232, 279)	210 (198, 260)	255 (240, 289)	254 (245, 269)
Clopidogrel (300mg)	nicht aktiviert	173 (162, 179)	169 (161, 172)	165 (151, 172)	168 (152, 176)	168 (150, 169)
	ADP (5µmol/l)	251 (209, 271)	196 (169, 239)	177 (164, 223)	243 (183, 266)	206 (193, 240)
	ADP (20µmol/l)	258 (251, 294)	221 (204, 260)	218 (192, 242)	259 (189, 273)	234 (221, 245)
	TRAP (25µmol/l)	213 (184, 307)	191 (165, 228)	194 (178, 216)	220 (196, 319)	177 (174, 184)
Clopidogrel (75mg)	nicht aktiviert	168 (161, 188)	166 (157, 169)	164 (160, 166)	161 (130, 188)	165 (134, 178)
	ADP (5µmol/l)	-	-	-	-	-
	ADP (20µmol/l)	261 (246, 271)	227 (222, 239)	231 (224, 246)	258 (226, 270)	226 (200, 244)
	TRAP (25µmol/l)	249 (234, 270)	202 (183, 235)	220 (184, 258)	247 (210, 271)	225 (198, 284)
Ticlopidin (2 x 500mg)	nicht aktiviert	178 (170, 185)	162 (144, 164)	182 (162, 215)	196 (166, 202)	196 (181, 203)
	ADP (5µmol/l)	-	-	-	-	-
	ADP (20µmol/l)	250 (239, 298)	224 (222, 251)	268 (226, 302)	274 (230, 290)	250 (246, 256)
	TRAP (25µmol/l)	250 (209, 275)	252 (180, 283)	260 (243, 266)	244 (201, 266)	244 (211, 284)

(Mittlere Immunfluoreszenz anti-CD62P)

Alle Werte sind als Median und als erste und dritte Quartile angegeben.



**Tabelle IX: Einfluß von Ticlopidin / Clopidogrel auf die Expression von von-Willebrand-Faktor-Rezeptor (CD42b-Antikörper)**

Zeit nach Einnahme von	0 h	2 h	4 h	24 h	48 h	
Clopidogrel (600mg)	nicht aktiviert	624 (612, 649)	624 (595, 643)	616 (599, 635)	601 (593, 628)	626 (608, 630)
	ADP (5µmol/l)	585 (574, 601)	608 (581, 616)	613 (589, 622)	580 (558, 589)	587 (571, 588)
	ADP (20µmol/l)	565 (543, 589)	580 (569, 607)	591 (570, 603)	570 (535, 583)	583 (542, 591)
	TRAP (25µmol/l)	612 (578, 630)	610 (593, 620)	615 (584, 623)	588 (566, 603)	585 (581, 601)
Clopidogrel (450mg)	nicht aktiviert	646 (605, 651)	638 (611, 650)	644 (608, 653)	646 (614, 656)	609 (603, 618)
	ADP (5µmol/l)	-	-	-	-	-
	ADP (20µmol/l)	599 (572, 617)	611 (597, 623)	604 (598, 617)	576 (573, 598)	570 (564, 578)
	TRAP (25µmol/l)	617 (602, 621)	628 (628, 650)	609 (595, 614)	603 (598, 612)	602 (594, 605)
Clopidogrel (300mg)	nicht aktiviert	626 (623, 640)	625 (609, 642)	626 (601, 644)	598 (585, 625)	590 (584, 602)
	ADP (5µmol/l)	612 (588, 623)	609 (605, 617)	609 (596, 616)	579 (561, 598)	570 (560, 579)
	ADP (20µmol/l)	568 (556, 594)	595 (564, 603)	597 (578, 614)	565 (550, 589)	566 (541, 568)
	TRAP (25µmol/l)	575 (554, 617)	594 (585, 622)	599 (598, 626)	564 (528, 589)	533 (530, 563)
Clopidogrel (75mg)	nicht aktiviert	594 (584, 624)	590 (563, 604)	594 (573, 670)	598 (568, 644)	603 (568, 651)
	ADP (5µmol/l)	-	-	-	-	-
	ADP (20µmol/l)	532 (514, 586)	540 (508, 562)	548 (510, 597)	549 (500, 587)	547 (538, 578)
	TRAP (25µmol/l)	558 (530, 582)	591 (559, 595)	595 (582, 599)	571 (553, 585)	582 (576, 607)
Ticlopidin (2 x 500mg)	nicht aktiviert	636 (614, 645)	626 (625, 650)	633 (625, 641)	626 (600, 655)	634 (633, 639)
	ADP (5µmol/l)	-	-	-	-	-
	ADP (20µmol/l)	574 (561, 599)	588 (588, 612)	587 (561, 595)	570 (566, 572)	583 (571, 599)
	TRAP (25µmol/l)	602 (582, 657)	622 (599, 648)	623 (603, 646)	620 (553, 649)	589 (582, 600)

(Mittlere Immunfluoreszenz anti-CD42b)

Alle Werte sind als Median und als erste und dritte Quartile angegeben.