

Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik Tübingen

**Abteilung Innere Medizin III (Schwerpunkt: Kardiologie und
Kreislaufkrankungen)**

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. M. Gawaz

**Einfluss genetischer Polymorphismen auf das Ansprechen der
antithrombotischen Therapie und
die klinische Prognose bei kardiovaskulären Risikofaktoren**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Verena Buse

aus

Kiel

2013

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. T. Geisler

2. Berichterstatter: Professor Dr. Dr. B. Nürnberg

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-----------|
| 1. Einleitung | 1 |
| 1.1 Antithrombozytäre Therapie | 1 |
| 1.2 Antithrombozytäre Substanzen und ihre Rezeptoren | 5 |
| 1.3 Clopidogrel-Mechanismus | 8 |
| 1.4 Clopidogrel-Nebenwirkungen | 15 |
| 1.5 Verminderte Ansprechbarkeit auf Clopidogrel | 19 |
| 1.6 Einfluss genetischer Polymorphismen auf die Effektivität der antithrombozytären Therapie | 22 |
| 1.7 Pharmakogenomik und Pharmakogenetik | 25 |
| 1.8 Arzneimittel-Metabolisierung über Cytochrom P450 | 26 |
| 1.9 Ergänzende Studien zu CYP2C19 | 28 |
| | |
| 2. Zielsetzung | 31 |
| | |
| 3. Material und Methodik | 31 |
| 3.1 Patienten und Studiendesign | 31 |
| 3.2 Antithrombozytäre Therapie | 32 |
| 3.3 Gewinnung und Verarbeitung der Proben | 33 |
| 3.4 Aggregometrie | 35 |
| 3.5 Messung der EDTA-Blutproben | 37 |
| 3.6 Statistische Analyse | 42 |
| | |
| 4. Ergebnisse | 43 |
| 4.1 Thrombozytenaggregationswerte unter Clopidogrel- Behandlung | 43 |
| 4.2 Einfluss von Risikofaktoren auf die Clopidogrel-Behandlung | 46 |
| 4.3 Polymorphismen und ihre Bedeutung für die antithrombotische Therapie mit Clopidogrel | 46 |

| | |
|---|-----------|
| 5. Diskussion | 53 |
| 5.1 Genetische Befunde | 53 |
| 5.2 Prädisponierende Erkrankungen | 57 |
| 6. Zusammenfassung | 62 |
| Bedeutung des CYP2C19*2-Allels für die Wirksamkeit einer Clopidogrel-Therapie bei Patienten mit symptomatischer koronarer Herzkrankheit | |
| 7. Abbildungsverzeichnis | 63 |
| 8. Tabellenverzeichnis | 64 |
| 9. Überschriften erstellter Diagramme | 65 |
| 10. Abkürzungsverzeichnis | 66 |
| 11. Literaturverzeichnis | 68 |
| Danksagung | 85 |
| Curriculum vitae | 86 |

1. Einleitung

1.1 Antithrombozytäre Therapie

Die antithrombozytäre Therapie spielt eine wichtige Rolle zur Vorbeugung atherothrombotischer Komplikationen bei Patienten mit kardio- und cerebrovaskulären Erkrankungen. Die heute zur Verfügung stehenden antithrombozytären Medikamente zeigen in ihrem Wirkmechanismus und Ansprechen sehr unterschiedliche und vielfältige Charakteristiken. So gibt es neben dem am längsten verwendeten Wirkstoff Acetylsalicylsäure (Aspirin®) noch zahlreiche andere Wirkstoffgruppen wie die Thienopyridinderivate Ticlopidin (Ticlid®), Clopidogrel (Plavix®, Iscover®), Prasugrel (Efient®) und Ticagrelor (Brilique®) oder die Glykoprotein IIb-IIIa-Antagonisten (GPIIb-IIIa-Antagonisten) Abciximab (Reopro®), Eptifibatide (Integrilin®), Tirofiban (Aggrastat®) und Lamifiban (bisher nur im Forschungsstadium).

Der Nutzen der dualen antithrombozytären Therapie, bestehend aus Acetylsalicylsäure und Clopidogrel, nach koronarer Stentimplantation ist durch zahlreiche klinische Studien nachgewiesen worden (Metha und Yusuf, 2000). Die unterschiedlichen Ansatzpunkte beider antithrombozytärer Substanzen an den Plättchen führen zu einer verbesserten Prognose bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit (Plosker und Lyseng-Williamson, 2007). Während Acetylsalicylsäure zum einen in der Primärprävention bei erhöhtem kardiovaskulären Risiko und niedrigem Blutungsrisiko zur Anwendung kommt und zum anderen in der Sekundärprävention kardiovaskulärer Erkrankungen, inklusive Katheterintervention eine große Rolle spielt, wird Clopidogrel als Alternative bei Acetylsalicylsäure-Unverträglichkeit, Acetylsalicylsäure-Resistenzentwicklung, rezidivierenden Ereignissen unter Acetylsalicylsäure oder als Kombinationspräparat nach Stentimplantationen und akuten Koronarsyndromen (ACS) eingesetzt.

Erst kürzlich haben sich sechs multizentrisch durchgeführte Studien mit dem Nutzen und therapeutischen Effekt von Clopidogrel eingehender beschäftigt. So

zeigte eine Behandlung mit Clopidogrel eine höhere Effektivität betreffend der kardiovaskulären Prognose bei Patienten mit wiederkehrenden Myokardinfarkten, Schlaganfällen und peripheren arteriellen Verschlusskrankheiten als eine Behandlung mit Acetylsalicylsäure (CAPRIE Steering Committee, 1996). Clopidogrel führte demnach im Vergleich zu Acetylsalicylsäure zu einer um 8,7% höheren relativen Risikoreduktion und 0,5% höheren absoluten Risikoreduktion des primären Endpunktes. Eine generelle Kombinationstherapie aus Acetylsalicylsäure und Clopidogrel zur Primär- und Sekundärprophylaxe bei Patienten mit stabiler koronarer Herzkrankheit (KHK) und/oder multiplen Risikofaktoren wird aufgrund des erhöhten Blutungsrisikos derzeit nicht empfohlen (Bhatt et al., 2006).

Die CURE-Studie (Yusuf et al., 2001) verglich zwei Patientenpopulationen miteinander, von denen die eine Gruppe mit einer Kombination aus Acetylsalicylsäure und Clopidogrel und die andere mit einer Kombination aus Acetylsalicylsäure und einem Placebo über drei bis zwölf Monate behandelt wurde. Die Studie schloss Patienten mit akutem Koronarsyndrom (instabile Angina pectoris (IAP) und Nicht-ST-Hebungsinfarkt (NSTEMI)) ein. Dem Nicht-ST-Hebungsinfarkt kann sowohl eine instabile Angina pectoris als auch ein Herzinfarkt mit erhöhtem Troponin T oder Troponin I zugrunde liegen. Er weist jedoch keine ST-Streckenhebung auf. Unter dem ST-Hebungsinfarkt (STEMI) dagegen wird ein Herzinfarkt mit Enzymveränderungen (CK = Creatinkinase + Troponin I/T) und infarkttypischen EKG-Veränderungen, nämlich einer initialen ST-Hebung, verstanden. Die Studienergebnisse zeigten eine signifikant geringere Rate an kardiovaskulärer Mortalität, nicht tödlichem Myokardinfarkt oder Schlaganfall unter Clopidogrel-Therapie (9,3%) als unter Behandlung mit einem Placebo (11,4%). Damit belegt die Studie überzeugend, dass zur Prävention von Myokardinfarkt, Schlaganfall und kardiovaskulärem Tod die Kombinationstherapie aus Acetylsalicylsäure und Clopidogrel der alleinigen Acetylsalicylsäure-Therapie vorzuziehen ist. Allerdings zeigten sich in der mit Clopidogrel behandelten Patientengruppe signifikant häufiger schwere Blutungen als in der Placebogruppe (3,7% vs. 2,7%), wobei die Anzahl lebensbedrohlicher Blutungen nicht zunahm (2,2% vs. 1,8%) (Yusuf et al.,

2001). Durch eine prospektive Begleitstudie (PCI-CURE), in die interventionell behandelte Patienten mit einem akuten Koronarsyndrom einbezogen wurden, konnte die CURE-Studie weiter differenziert werden. Hier zeigte sich, dass eine Prämedikation mit Clopidogrel sechs Stunden vor Beginn einer koronaren Stentimplantation zu einer signifikanten Reduktion von kardiovaskulären Todesfällen und Myokardinfarkten führt (Metha et al., 2001).

In einer weiteren Studie, der COMMIT-Studie (COMMIT collaborative group, 2005), erhielten Patienten innerhalb von 24 Stunden nach einem ST-Hebungsinfarkt für 28 Tage Clopidogrel und Acetylsalicylsäure. Verglichen mit der alleinigen Gabe von Acetylsalicylsäure führte dies zur signifikant verminderten Rate an Todesfällen, Myokardinfarkten und Schlaganfällen.

In der so genannten CLARITY-TIMI 28-Studie (Sabatine et al., 2005) verbesserte die zusätzliche Gabe von Clopidogrel zu Acetylsalicylsäure das klinische Ergebnis bei Patienten mit STEMI. Den an der Studie teilnehmenden Patienten wurde zusätzlich zur thrombolytischen Therapie mit Acetylsalicylsäure entweder Clopidogrel oder ein Placebo verabreicht. Anschließend wurde eine Angiographie durchgeführt. Zur Beurteilung der Ergebnisse wurden als Endpunkte ein Arterienverschluss, eingetretener Tod oder wiederkehrende Herzinfarkte vor Durchführung einer Angiographie angesehen. Dabei traten diese Ereignisse bei 15,0% der Patienten, die Clopidogrel erhalten hatten, und bei 21,7% der Patienten, denen ein Placebo verabreicht worden war, ein. Damit zeigte sich statistisch eine relative Reduktion der oben genannten festgelegten Endpunkte von 36% unter Clopidogrel-Einnahme. Weiter verbesserte Clopidogrel den epikardialen Fluss (Durchblutung) sowie die myokardiale Reperfusion und führte außerdem zu einer deutlichen Reduktion thrombotischer Ereignisse verglichen zur Placebo-Therapie (Sabatine et al., 2005).

In einer weiteren Studie, der CREDO-Studie (Steinhubl et al., 2002), wurde der Nutzen einer Vor- und Langzeitbehandlung mit Clopidogrel in Kombination mit Acetylsalicylsäure bei Patienten mit Indikation zur koronaren Angioplastie untersucht. Eine Patientengruppe erhielt Clopidogrel als Prämedikation vor der

Intervention und anschließend die duale Plättchenhemmung als medikamentöse Therapie für ein Jahr. Eine andere Gruppe erhielt vor dem Eingriff ein Placebo und wurde anschließend für 28 Tage mit Clopidogrel und Acetylsalicylsäure versorgt. Dabei zeigte sich in der ersten Gruppe eine geringere Inzidenz von Todesfällen, Myokardinfarkten und Schlaganfällen innerhalb eines Jahres nach Intervention als bei der zweiten Patientengruppe. Infolge dieser mehrfach validierten Befunde nimmt Clopidogrel heute einen wichtigen Platz in der Therapie kardialer und cerebraler Erkrankungen ein. Dessen ungeachtet bleibt aber auch Acetylsalicylsäure als irreversibler Cyclooxygenase-Inhibitor nach wie vor ein unerlässlicher Baustein in der Vorbeugung und Behandlung ischämischer Ereignisse.

Eine weitere Komplikation, die bei Patienten mit erfolgter Stentimplantation auftreten kann und damit ebenso im Mittelpunkt des wissenschaftlichen Interesses steht, ist die Stentthrombose. Die Stentthrombose ist ein seltenes (Häufigkeit 0,5-3%), aber risikoreiches und schwerwiegendes Ereignis (hohe Mortalität und Morbidität) (Gawaz et al., 2009). Stentthrombosen treten in der Regel am häufigsten innerhalb von 30 Tagen nach Stentimplantation auf (frühe Stentthrombosen). Stentthrombosen, die nach diesem Zeitraum bis zu einem Jahr später auftreten, sind wesentlich weniger häufig (späte Stentthrombosen). Stentthrombosen über ein Jahr hinaus nach Implantation werden als sehr späte Stentthrombosen bezeichnet. Für die Gesamtstentthromboserate gibt es nach neueren Metaanalysen keine signifikanten Unterschiede zwischen dem Einsatz beschichteter oder unbeschichteter Stents (Kastrati et al., 2007; Stettler et al., 2007). Sehr späte Stentthrombosen treten besonders bei mit Medikamenten beschichteten Stents auf (Wöhrle, 2007). In neueren Arbeiten konnte ein Zusammenhang zwischen der periinterventionell gemessenen thrombozytären Restaktivität und dem Auftreten von insbesondere frühen Stentthrombosen nachgewiesen werden (Geisler et al., 2010; Gori et al., 2008; Sibbing et al., 2010).

1.2 Antithrombozytäre Substanzen und ihre Rezeptoren

Die antithrombozytäre Therapie stützt sich auf drei verschiedene Substanzen: Acetylsalicylsäure, Thienopyridine und Glykoprotein IIb-IIIa-Antagonisten. Diese Substanzen inhibieren mittels unterschiedlicher Mechanismen intrazelluläre Enzymkaskaden oder erzeugen durch die Bindung an Thrombozyten-Membranrezeptoren eine hemmende Wirkung (Eikelboom et al., 2012; Pettersen et al., 2012; Weitz et al., 2008). Daraus folgt eine reversible oder irreversible Hemmung der Thrombozytenaggregation.

Die Acetylsalicylsäure (Aspirin®) (Abb. 1.1) entwickelt ihre antithrombozytäre Wirkung über die irreversible Hemmung der Cyclooxygenase-1 (COX-1) (Gawaz, 1999 b). Dieses Enzym katalysiert die Umwandlung der Arachidonsäure in Prostaglandin G₂ (PGG₂), welches weiter zu Thromboxan A₂ (TXA₂) konvertiert (Vane et al., 1998). Dieser Mechanismus wird durch Blockade intrazellulärer Aktivierungsschritte erreicht. Thromboxan A₂ besitzt eine plättchenaktivierende- und zugleich vasokonstriktorische Wirkung. Die Thrombozytenaktivierung erfolgt über den TXA₂-Rezeptor, der sich auf der Thrombozytenoberfläche befindet. Acetylsalicylsäure ist der Thrombozytenaggregationshemmer der ersten Wahl. Bei akuten Ereignissen ist die Gabe einer Initialdosis von 250-500mg Acetylsalicylsäure i.v. in Kombination mit Heparin 70 IU/kg KG i.v. sowie einer Clopidogrel-Dosis von 300mg oder 600mg p.o. indiziert (Hamm et al., 2004 a und 2004 b). Ebenso kommt Acetylsalicylsäure in der Sekundärprävention kardiovaskulärer Ereignisse zum Einsatz und führt in Kombination mit β -Blockern, CSE (Cholesterin-Synthese-Enzym)- oder ACE (Angiotensin-Conversions-Enzym)-Hemmern zu einer relativen Risikoreduktion von ca. 75% (Yusuf, 2002). Damit gilt Acetylsalicylsäure als Standardmedikation in der Therapie und Prophylaxe atherothrombotischer Krankheiten und wird heute in der Regel in Kombination mit dem Thrombozytenaggregationshemmer Clopidogrel angewendet (Tepe et al., 2012).

Abbildung 1.1

Strukturformel von Azetylsalizylsäure

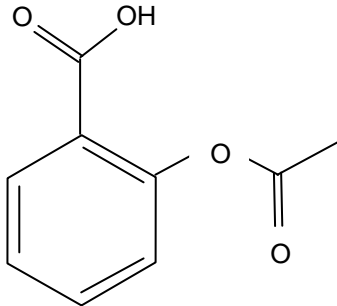
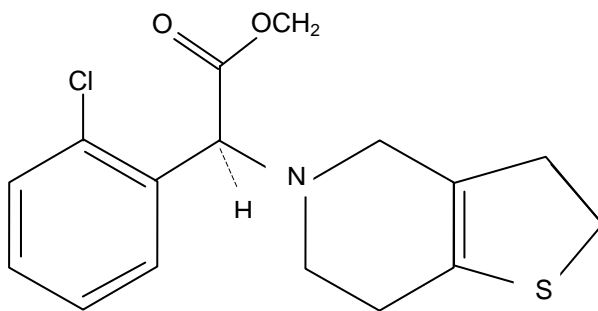


Abbildung 1.2

Strukturformel von Clopidogrel



Die Thienopyridine hemmen die ADP-induzierte Thrombozytenaktivierung, indem sie den P2Y₁₂-Rezeptor blockieren (Ding et al., 2003; Dorsam und Kunapuli, 2004; Hollopeter et al., 2001; Takasaki et al., 2001; Weber et al., 2001; Zhang et al., 2001). Zu ihren Vertretern gehören u.a. Clopidogrel (Abb. 1.2) und Ticlopidin. Da das Nebenwirkungsprofil von Clopidogrel deutlich günstiger und Blutbildveränderungen, insbesondere Leukopenien, deutlich seltener vorkommen, hat Clopidogrel die Vorgängersubstanz Ticlopidin ersetzt (Bertrand et al., 2000). Bislang hat eine Vielzahl von Studien die Überlegenheit von Clopidogrel gegenüber Ticlopidin dargestellt (Bertrand et al., 2000; Bhatt et al., 2002; Tanaka et al., 2012). Jedoch zeigt auch eine kürzlich durchgeführte Metaanalyse von Aradi und Koautoren (2010), dass die durch Clopidogrel

erzeugte hohe Reaktionsfähigkeit von Thrombozyten das Risiko kardiovaskulärer Ereignisse erhöht.

Neuere Substanzen wie Prasugrel und Ticagrelor, die als mögliche Folgesubstanzen von Clopidogrel angesehen werden, weisen eine noch deutlich höhere Thrombozytenaggregationshemmung als Clopidogrel auf. Zudem scheint das Blutungsrisiko deutlich geringer zu sein (Alexopoulos et al., 2012). Trotz der stärkeren Wirkung von Prasugrel, die am P2Y₁₂-Rezeptor ansetzt, kann bei Patienten, die sich einer Koronarintervention nach einem Myokardinfarkt unterzogen haben, nach Gabe von Prasugrel keine optimale Hemmung der Plättchenreaktivität nachgewiesen werden (Bonello et al., 2011). Auch hier zeigen die Patienten innerhalb eines Monats nach Intervention das deutlich erhöhte Risiko einer Stentthrombose mit Myokardinfarkt und kardiovaskulär bedingter Todesfolge. Heute findet Clopidogrel vor allem seine Anwendung in einer Kombinationstherapie mit Acetylsalicylsäure nach koronarer Stentimplantation und in der Sekundärprophylaxe bei akuten Koronarsyndromen (Sarafoff et al., 2012). Eine weitere Indikation zu einer alleinigen Clopidogrel-Therapie ist eine Acetylsalicylsäure-Unverträglichkeit.

Glykoprotein IIb-IIIa-Antagonisten sind Substanzen, die zu einer selektiven Thrombozytenaggregationshemmung führen, indem sie an GPIIb-IIIa-Rezeptoren der Zelloberfläche binden (Coller, 1997) und damit für Fibrinogen blockieren. Die Thrombozytenaggregationshemmung erfolgt dabei unabhängig von einem Aktivierungsreiz (Gawaz, 1999 c). Durch gleichzeitige Verstärkung des endogenen Lysepotentials wird sogar die Auflösung von Thromben in einem frühen Stadium möglich. Damit zählen die Glykoprotein IIb-IIIa-Antagonisten zu sehr potenten Aggregationsinhibitoren und können nach perkutaner Koronarintervention (PCI), einschließlich einer Ballondilatation mit oder ohne Stentimplantation (PTCA) und Atherektomie, und akutem Koronarsyndrom zusätzlich zur Standardtherapie mit Acetylsalicylsäure und Heparin i.v. eingesetzt werden (CAPTURE Studie, 1997; Hamm et al., 2004 a und 2004 b; PRISM-PLUS Studie, 1998). Unter einer Kombinationstherapie

kann das Risiko ischämischer Komplikationen deutlich gesenkt werden (Auer et al., 2003; Chen et al., 2005; Servoss et al., 2004). Aktuelle Studien zu Folge bietet sich der Einsatz von Glykoprotein IIb/IIIa-Antagonisten als sogenannte Übergangstherapie ebenfalls bei Patienten mit beschichtetem Stent an, die vor einem chirurgischen Eingriff eine laufende Therapie mit Clopidogrel aussetzen müssen. Auf diese Weise lässt sich das Risiko einer postoperativen kardialen Beeinträchtigung verringern (Ben Morrison et al., 2012).

1.3 Clopidogrel-Mechanismus

Über Clopidogrel (Plavix®, Iscover®), das vor allem nach perkutaner Koronarintervention mit oder ohne anschließender Stentimplantation eingesetzt wird, wurde in den letzten Jahren bezüglich seiner therapeutischen Effekte ausführlich diskutiert (Lyseng-Williamson und Plosker, 2006) (Tab.1).

Tabelle 1

Pharmakokinetische Kenndaten von Clopidogrel

| Maximaler Wirkspiegel | Elimination | Effektive Plasmahalbwertszeit | Biologische Plasmahalbwertszeit | Metabolisierung |
|-----------------------------------|------------------------------|-------------------------------|---------------------------------|-----------------|
| 600 mg: 2 – 6 h 75 mg: 4 – 5 d | hepatisch: 46% renal: 50% | 7 – 8 h | 7 – 10 d | hepatisch |

Nach ausschließlich peroraler Anwendung liegt das Thienopyridin Clopidogrel als inaktiver Metabolit im Plasma vor. Dabei werden Clopidogrel und sein inaktiver Hauptmetabolit SR 26334 in vitro zu fast 98% bzw. 94% an Plasmaproteine gebunden. Studien zeigen, dass der maximale Plasmaspiegel nach ungefähr einer Stunde erreicht wird (Coukell und Markham, 1997). Die

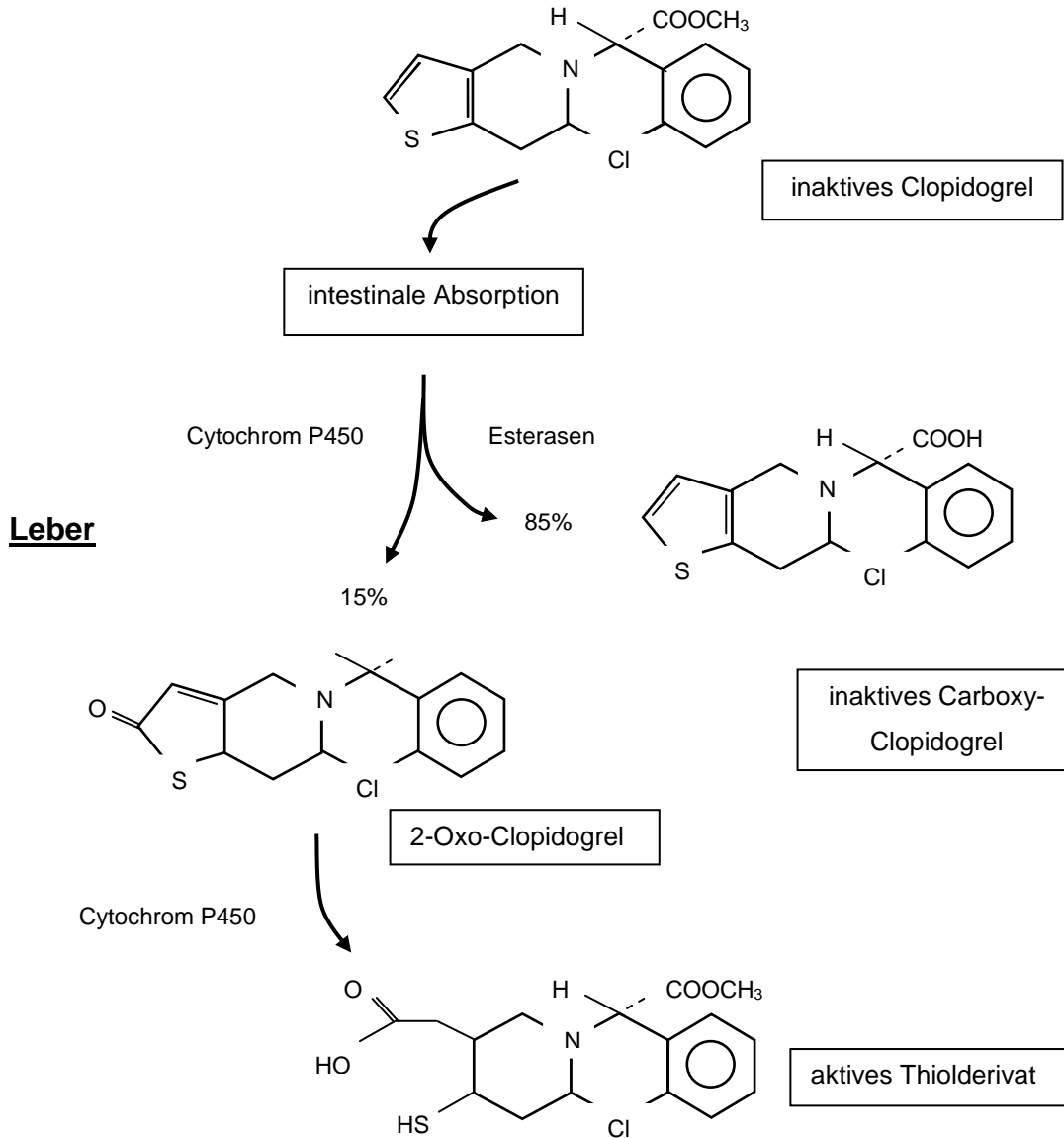
Elimination von Clopidogrel und seiner Metabolite erfolgt durch Metabolisierung in der Leber. Die Eliminationshalbwertszeit wird abhängig von der Dosierung (bei 600mg Clopidogrel als Bolus) zwischen 0,7 bis 1,9 Stunden angegeben (Taubert et al., 2004) (Abb. 2).

Die Inaktivierung von Clopidogrel erfolgt über Carboxylesterasen in der Leber. Die Esterasen hydrolysieren die labile Carbonsäuremethylester-Struktur von Clopidogrel. Die entstehenden Carboxylderivate SR 26334 (Carboxy-Clopidogrel) machen ungefähr 85% der im Körper vorliegenden Clopidogrel-Verbindungen aus (Savi et al., 2000) und sind pharmakologisch unwirksam. Nur 15% des Medikamentes Clopidogrel werden in pharmakologisch aktive Metabolite umgewandelt. Zunächst kommt es über einen ersten Metabolisierungsschritt von Clopidogrel durch das Cytochrom P450 in der Leber (Andersson et al., 2005; Brandt et al., 2007; Clarke und Waskell, 2003; Kazui et al., 2010; Wenaweser et al., 2005) zur Bildung des inaktiven 2-Oxo-Clopidogrel. Ein weiterer Metabolisierungsschritt führt anschließend zur Bildung eines Thiolderivats (Savi et al., 2000).

Die Freisetzung des Thiolderivats in den hepatischen Extrazellulärraum ermöglicht die Bindung von Cysteinresten an den $P2Y_{12}$ -Rezeptoren der Thrombozyten und blockiert letztlich dadurch irreversibel die Plättchenreaggregation (Ding et al., 2003; Dorsam und Kunapuli, 2004; Gachet, 2001) (Abb. 3.1). Die thrombozytären P_2 -Rezeptoren sind somit für den weiteren Verlauf der Hämostase und Thrombose entscheidend. Über sie können aber auch weitere Substanzen, insbesondere die Thienopyridine, ihre Wirkung entfalten und damit Einfluss auf die Blutgerinnung nehmen (Kehrel, 2003; Kehrel, 2008). Die P_2 -Rezeptoren werden als drei Subtypen exprimiert, die Rezeptoren: $P2Y_{12}$ -, $P2Y_1$ - und $P2X_1$ (Abb. 3.1 und 3.2). Die beiden erst genannten sind G-Protein-gekoppelte ADP-Rezeptoren. Der $P2X_1$ -Rezeptor ist dagegen ein ligandengesteuerter Ionenkanal.

Abbildung 2

Schematische Darstellung der Pharmakokinetik von Clopidogrel



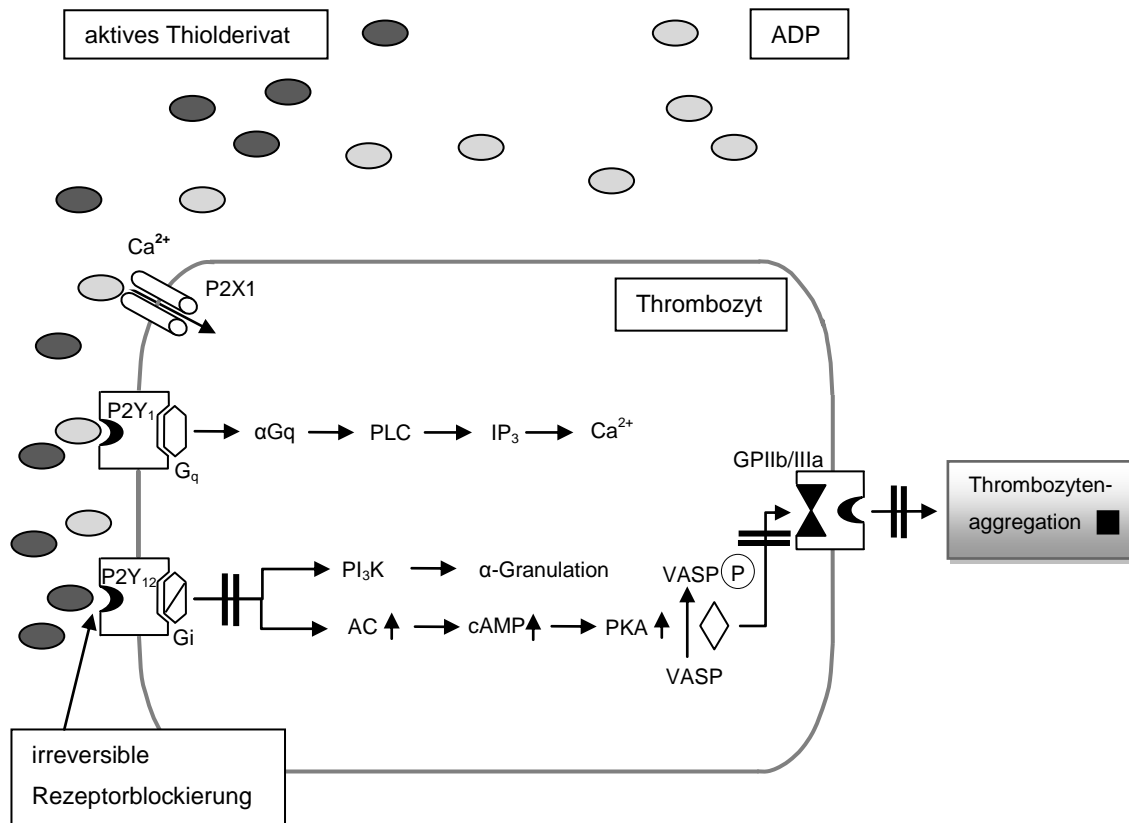
Der P2Y₁₂-Rezeptor ist ein Clopidogrel gesteuerter heptahelikaler Transmembranrezeptor (Abb. 3.1). Durch irreversible Bindung von Clopidogrel an den P2Y₁₂-Rezeptor wird eine Untereinheit eines an ihn gebundenen Proteins, das Gi-Protein inhibiert. Dies führt zur Aktivierung der Adenylatcyclase und damit zur Erhöhung des cAMP-Spiegels (Murugappa und Kunapuli, 2006; Yang et al, 2002). In der Folge wird die Proteinkinase aktiviert und VASP wird phosphoryliert. Phosphoryliertes VASP inhibiert den GPIIb-IIIa-Rezeptor, so dass die Thrombozytenaggregation gehemmt wird. Dies führt zu einer Reduktion der Vernetzung der Thrombozyten (Geiger et al., 1999; Schwarz et al., 1999; Stellbaum et al., 2012).

ADP, das während der Thrombozytenaktivierung verstärkt aus thrombozytären Speichergranula sezerniert wird, fördert durch die Bindung an ADP-Rezeptoren auf den Thrombozyten deren Aggregation (Gawaz, 1999a). Durch die erhöhte ADP-Konzentration wird am P2Y₁₂-Rezeptor als ein weiterer Effekt die $\beta\gamma$ -Untereinheit aus dem G-Proteinkomplex herausgelöst, und führt unter Aktivierung der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI₃K) zur verstärkten Ausschüttung von α -Granula, die aggregationsfördernde Substanzen und Proteine enthalten und damit die Aktivierung der Thrombozytenaggregation unterstützen (Conley und Delaney, 2003).

Neben dem P2Y₁₂-Rezeptor ist der P2Y₁-Rezeptor und des Weiteren der P2X₁-Rezeptor an der ADP-vermittelten Thrombozytenaktivierung beteiligt, wobei dem erstgenannten der maßgebliche Einfluss auf die thrombozytäre Aggregation zukommt. Somit funktioniert die antithrombozytäre Aggregation auch, wenn sich der P2X₁-Rezeptor im Refraktärzustand befindet (Takano et al., 1999). Die P2X₁-Rezeptoren führen unter Bindung von ADP zu einem raschen Calciumionen-Einstrom in die Zelle und damit zu einer Konformationsänderung der Thrombozyten (Rolf und Mahaut-Smith, 2002).

Abbildung 3.1

Clopidogrel Wirkmechanismus über den P2Y₁/P2Y₁₂-Rezeptor am Thrombozyten mit nachfolgender Inhibition der Thrombozytenaggregation



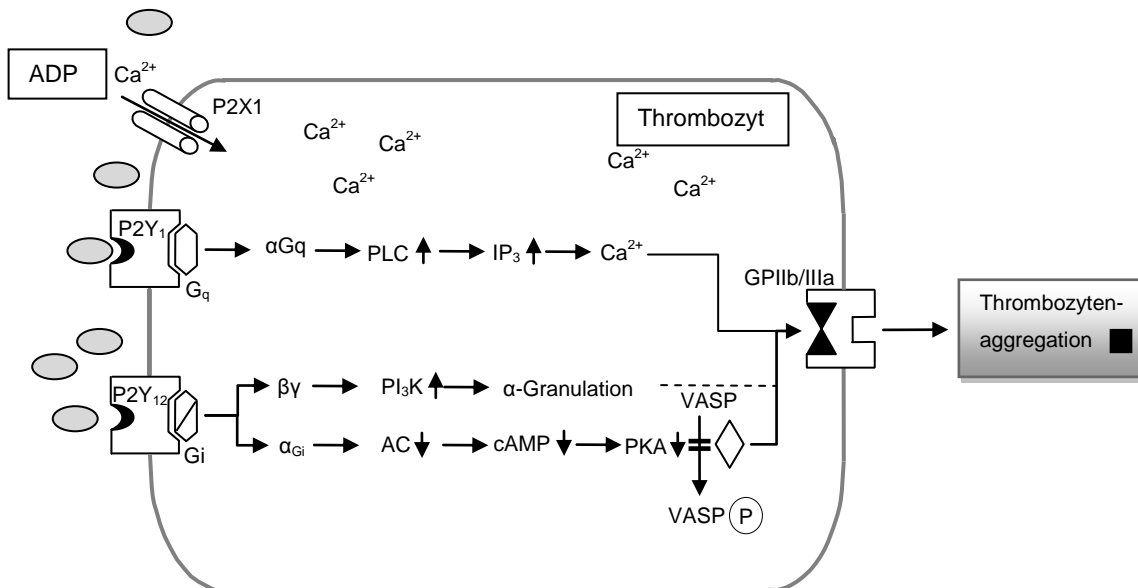
AC: Adenylatcyclase; ADP: Adenosindiphosphat; α, βγ: G-Protein Untereinheiten; Ca²⁺: Calcium²⁺; cAMP: cyclisches Adenosinmono-phosphat; G_i: inhibitorisches G-Protein G_i; G_q: stimulatorisches G-Protein G_q; GPIIb/IIIa: Glykoprotein IIb/IIIa; IP₃: Inosintri-phosphat; PKA: aktivierte Proteinkinase; PLC: Phospholipase C; P2X₁-/ P2Y₁-/ P2Y₁₂: -Rezeptoren; VASP: Vasodilatator-stimuliertes Phosphoprotein

Im Gegensatz zu ADP vermag auch Prostaglandin E1 (PGE1) den Weg der cAMP abhängigen VASP-Phosphorylierung aktivieren. Bei kompletter Blockierung des P2Y₁₂-Rezeptors z.B. durch Clopidogrel lässt sich keine relevante Verminderung der VASP-P-Konzentration durch Stimulation von PGE1 und ADP verglichen zu PGE1 messen (Geiger et al., 1999; Geisler und Gawaz, 2010).

Der G-Protein-gekoppelte P2Y₁-Rezeptor trägt zur Plättchenaggregation bei. Durch die ADP-Bindung an den Rezeptor kommt es unter Vermittlung der α -Untereinheit zur Aktivierung des Inositol-3-Phosphats (IP₃), was zu einer intrazellulären Freisetzung von Calcium führt (Léon et al, 1999). Dadurch kommt es zur Konformationsänderung und der thrombozytären Degranulation. Für eine vollständige Thrombozytenaggregation scheint das Funktionieren dieses Rezeptors unerlässlich zu sein (Hechler et al., 1998). So wird eine effektive Blutstillung bei Personen mit einem defekten P2Y₁-Rezeptor behindert (Nurden et al., 1995). Die vollständige Aggregation wird nur in Koaktivierung mit dem P2Y₁₂-Rezeptor erreicht (Baurand et al., 2000). Die Bindung von ADP an den P2Y₁₂-Rezeptor führt einer VASP vermittelten Potenzierung der Expression des GPIIb-IIIa-Rezeptors auf der Thrombozytenoberfläche. Der Wirkort von Clopidogrel ist der P2Y₁₂-Rezeptor und damit der Zielrezeptor der Thienopyridinderivate. Dieser Rezeptor spielt für die Entwicklung anti-thrombozytärer Substanzen eine wichtige Rolle.

Abbildung 3.2

ADP-Wirkmechanismus über den P2Y₁/P2Y₁₂-Rezeptor am Thrombozyten in Abwesenheit von Clopidogrel mit nachfolgender Thrombozytenaggregation



AC: Adenylatcyclase; ADP: Adenosindiphosphat; α , $\beta\gamma$: G-Protein Untereinheiten; Ca²⁺: Calcium²⁺; cAMP: cyclisches Adenosinmono-phosphat; G_i: inhibitorisches G-Protein G_i; G_q: stimulatorisches G-Protein G_q; GPIIb/IIIa: Glykoprotein IIb/IIIa; IP₃: Inosintri-phosphat; PKA: aktivierte Proteinkinase; PLC: Phospholipase C; P2X₁-/ P2Y₁-/ P2Y₁₂: -Rezeptoren; VASP: Vasodilatator-stimuliertes Phosphoprotein

In vorausgehenden Studien ermittelten Hochholzer et al. (2005) und Thebault et al. (1999), dass die maximale Hemmung der Plättchenaggregation mittels einer einzelnen Aufsättigungsdosis von 300- 600mg Clopidogrel je nach verwendeter Dosis nach zwei bis sechs Stunden erreicht werden kann und sich durch eine höhere Initialdosis nicht weiter verstärken. Dagegen entfaltet eine täglich verabreichte Dosis von 75mg Clopidogrel erst innerhalb von drei bis sieben Tagen ihre volle Wirksamkeit (Savic et al., 1999). Neben seinem plättchenhemmenden Effekt nimmt Clopidogrel Einfluss auf Entzündungsmediatoren, wie das C-reaktive Protein und die Expression inflammatorischer Substanzen, wie den CD40-Liganden in aktivierten Plättchen und P-Selectin

(Quinn et al., 2004; Vivekananthan et al., 2004). Nach Hemmung des CD40-Liganden bleibt die Plättchen-Leukozyten-Interaktion aus. Damit verbunden beobachtet man einen akuten Mangel der Tissue-Faktor (TF)- Expression, das heißt, einen Mangel an Gewebsthromboplastin. Weiter vermindert Clopidogrel die Funktion von Plättchen-Leukozyten-Konjugaten bei Patienten mit einem Nicht-ST-Hebungsinfarkt (Xiao und Theroux, 2004). Dem P2Y₁₂-Rezeptor, der Zielstruktur von Clopidogrel, konnte eine wichtige Rolle in der Atherogenese über inflammatorisch vermittelte Signalwege nachgewiesen werden (Li et al., 2012).

1.4 Clopidogrel- Nebenwirkungen

Sehr selten (1:3 Millionen pro Jahr) wurde unter einer Clopidogrel-Therapie die Entstehung einer thrombotisch-thrombozytopenischen Purpura (TTP) beobachtet (Bennett et al., 2000; Lotta et al., 2012; Reichenberger et al., 2001; Steinhubl et al., 1999). Es handelt sich um eine Multisystemerkrankung, die mit Thrombozytopenie, hämolytischer Anämie, Fieber, neurologischen Ausfällen und Nierenversagen einhergeht. Mit dem Auftreten ist während der ersten Therapiewoche zu rechnen (Azarm et al., 2011). Die durch Thienopyridine induzierte TTP ist bekannt (Ishikawa et al., 2012; Rock 2000; Zakerija et al., 2004), wobei jedoch der Mechanismus auf molekularer Ebene bisher ungeklärt bleibt (Majhail et al., 2003). Hautveränderungen, gastrointestinale und hämatologische Beschwerden können ebenfalls die Folge einer Clopidogrel-Therapie sein (Denas et al., 2012; Tamura et al., 2012). Jedoch scheint das Auftreten dieser Erkrankungsbilder unter Clopidogrel im Gegensatz zu anderen Thienopyridinen wie zum Beispiel dem Ticlopidin seltener aufzutreten (McCarthy et al., 2004; McFadden et al., 2004). Die durch Clopidogrel induzierte Neutropenie kann zu einer Schwächung des Immunsystems und somit zur erhöhten Infektanfälligkeit führen (Khangura und Gordon, 2011).

Obwohl Clopidogrel eine hohe Tolerabilität aufweist, können Krankheitsbilder wie die akute Arthritis, laut Coulter und Koautor nicht ausgeschlossen werden

(Coulter und Montandon, 2012). Auch im Tiermodell konnten Clopidogrel proinflammatorische Effekte zugeschrieben werden (Garcia et al., 2012). Ebenfalls kann Clopidogrel in seltenen Fällen hepatotoxisch wirken. So zeigte sich bei einer Patientin, die nach einer perkutanen koronaren Intervention mit Clopidogrel und Acetylsalicylsäure behandelt wurde drei Wochen nach Therapiebeginn ein deutlicher Anstieg der Leberenzyme. Nach Absetzen von Clopidogrel und dem diagnostischen Ausschluss anderer möglicher Ursachen war die Erhöhung der Leberwerte rückläufig. Nach nochmaligem Ansetzen der Clopidogrel-Therapie konnte jedoch wieder eine Zunahme der Leberenzyme beobachtet werden (Goyal et al., 2009).

In anderen Versuchen konnte nachgewiesen werden, dass Clopidogrel die Entstehung von Glomerulonephritiden induzieren kann (Park et al., 2003; Peters et al., 2004). Auch neurologische Symptomatiken wie das Auftreten von Halluzinationen, bizarres Benehmen, mentale Sprunghaftigkeit und Kopfschmerzen nach Gabe von Clopidogrel werden in der Literatur beschrieben (Azarm et al., 2011). Die Häufigkeiten der beschriebenen Nebenwirkungen, wie sie auch den zuständigen Regulationsbehörden vorliegen, sind in Tabelle 2 zusammengefasst (Produktinformation Clopidogrel-Hydrogensulfat, Plavix, BRD).

Tabelle 2

Häufigkeiten von Clopidogrel-Nebenwirkungen (nach: Produktinformation Clopidogrel-Hydrogensulfat, Plavix, BRD)

| Systemorganklasse | häufig (≥1/100 - <1/10) | gelegentlich (≥1/1000 - <1/100) | selten (≥1/10000 - <1/1000) | sehr selten (<1/10000) |
|---|-----------------------------------|---|---|---|
| Erkrankungen des Blutes und des Lymphsystems | | Thrombozytopenie, Leukopenie, Eosinophilie | Neutropenie, einschließlich schwerer Neutropenien | TTP, aplastische Anämie, Panzytopenie, Agranulozytose, schwere Thrombozytopenie, Granulozytopenie, Anämie |
| Erkrankungen des Immunsystems | | | | Anaphylaktischer Schock, Serumkrankheit, Verschlimmerung allergischer Reaktionen bei Lebensmittelallergie |
| Stoffwechsel- und Ernährungsstörungen | | | | Hypoglykämie, Gicht |
| Psychiatrische Erkrankungen | | | | Halluzinationen, Verwirrtheit |
| Erkrankungen des Nervensystems | | Intrakranielle Blutungen, Benommenheit, Kopfschmerz | | Geschmacksstörungen |
| Erkrankungen des Auges | | Augenblutungen (intraokular, konjunktival, retinal) | | |
| Erkrankungen des Ohrs und des Labyrinths | | | Vertigo | Hörverlust, Tinnitus |
| Gefäßerkrankungen | Hämatome | | | Schwere Blutungen, Vaskulitis, Hypotonie |
| Erkrankungen der Atemwege und des Brustraums und Mediastinum | Dyspnoe, Epistaxis | | | Hämoptyse, Bronchospasmen, interstitielle Pneumonie |

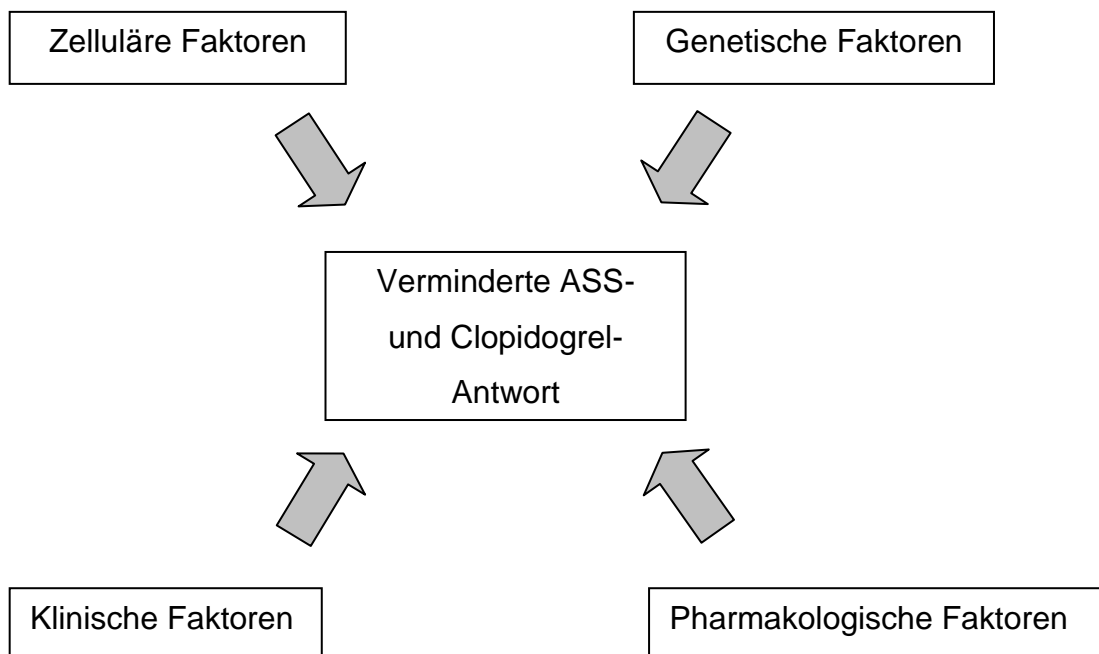
| Systemorganklasse | häufig (≥1/100 - <1/10) | gelegentlich (≥1/1000 - <1/100) | selten (≥1/10000 - <1/1000) | sehr selten (<1/10000) |
|---|---|---|---------------------------------------|---|
| Erkrankungen des Gastrointestinaltrakts | Gastrointestinale Blutungen, Durchfall, Dyspepsie | Ulcus ventrikuli, Ulcus duodeni, Gastritis, Flatulenz Erbrechen, Übelkeit, | Retroperitoneale Blutungen | Gastrointestinale- und retroperitoneale Blutungen, Pankreatitis, gastroduodenale Ulzerationen/ Perforationen, Colitis |
| Leber- und Gallenerkrankungen | | | | Akutes Leberversagen, Hepatitis, erhöhte Leberwerte |
| Erkrankungen der Haut und des Unterhautzellgewebes | subkutane oder dermale Blutungen, blaue Flecken | Hautausschlag, Juckreiz | | Bullöse Dermatitis, Angioödem, erythematöses Exanthem, Urtikaria, Ekzem, Lichen planus |
| Skelettmuskulatur-, Bindegewebs- und Knochenerkrankungen | | | | Hämarthrose, Arthritis, Athralgie, Myalgie |
| Erkrankungen der Nieren und Harnwege | | Hämaturie | | Akute Nierenfunktionseinschränkung, Herzdekomensation, nephrotisches Syndrom, Glomerulonephritis |
| Allgemeine Erkrankungen und Beschwerden am Verabreichungsort | Blutungen an Einstichstelle | | | Fieber |
| Erkrankungen der Geschlechtsorgane und der Brustdrüse | | Vaginale Blutungen (einschließlich Metrorrhagie) | | |
| Untersuchungen | | Verminderte Neutrophilen- und Thrombozytenzahl | | Anstieg des Serumkreatinins |

1.5 Verminderte Ansprechbarkeit auf Clopidogrel

Vermerkt gibt es in der letzten Zeit Hinweise, dass der Effekt von Clopidogrel bei einem relevanten Patientenkollektiv abgeschwächt ist oder ausbleibt, das heißt, der pharmakologische Effekt des Medikaments wird nicht erreicht. Man spricht in diesem Fall von einer Clopidogrel-Resistenz oder besser von einem inadäquaten Ansprechen auf Clopidogrel (Abb. 4). Dieses zeigen insbesondere Patienten, die unter der Therapie das Rezidiv eines kardiovaskulären Ereignisses erleiden (Wiviott und Antman, 2004). Beschrieben werden 4-30% Patienten, bei denen ein adäquater antithrombotischer Effekt ausbleibt (Angiolillo et al., 2004; Gurbel et al., 2003; Järemo et al., 2002; Mobley et al., 2004; Müller et al., 2003 b; Serebruany et al., 2005), wobei die Ursachen eines mangelnden Ansprechens vielfältig sein können.

Abbildung 4

Schaubild zu Mechanismen der Clopidogrel-Resistenz



Clopidogrel und Prasugrel-Verabreichungen führten zu einer veränderten Plättchenvariabilität, die einen signifikanten Risikofaktor für die kardiovaskuläre Prognose von Patienten mit akutem Koronarsyndrom oder für das Auftreten von Stentthrombosen darstellt (Patel und Augoustides, 2010). In die standardisierten Messungen wurden sowohl genetische Polymorphismen als auch bekannte Medikamenteninteraktionen mit einbezogen. Ebenso stellt die Metaanalyse von Sofi und Koautoren (2010) eine Assoziation zwischen Clopidogrel-Resistenz und kardiovaskulärer Morbidität her. Die neuen Studien weisen somit einen Zusammenhang zwischen geringem Ansprechen und atherothrombotischen Ereignissen nach, jedoch fehlen bisher Daten prospektiver Studien.

Eine mögliche Auswirkung auf die Resistenzentwicklung könnten auch Substratinteraktionen haben. Dies sei am Beispiel der Wechselwirkungen von Cholesterin-Synthese-Enzymhemmern (CSE-Hemmer) und Protonenpumpen-inhibitoren (PPI) mit Clopidogrel dargestellt. So werden zur Behandlung der Hypercholesterinämie CSE-Hemmer, auch Statine genannt, eingesetzt. Wie Clopidogrel, so unterliegt die Mehrzahl der Statine der hepatischen Metabolisierung durch das Enzym CYP3A4 (Gröchenig, 2001). Fluvastatin und Rosuvastatin sind dagegen Substrate des CYP2C9 und besitzen nur eine geringe Affinität zu CYP3A4 (Transon et al., 1996). Pravastatin unterliegt nicht der Cytochrom-Metabolisierung und wird unverändert renal eliminiert (Jacobsen et al., 1999). CSE-Hemmer weisen demnach ein sehr unterschiedliches Interaktionspotential auf (Paoletti et al., 2002).

Was die Rolle von Statinen bezüglich der Abschwächung der Clopidogrel-abhängigen Thrombozytenhemmung angeht, sind sich zahlreiche Wissenschaftler uneinig. Lau et al. (2003) zeigten experimentell, dass die Verabreichung von 40mg Atorvastatin zu einer Reduktion der plättchenhemmenden Wirkung von Clopidogrel führt. Dies konnte von Clarke und Waskell (2003) in einer weiteren Studie bestätigt werden. Signifikante Interaktionen zwischen Clopidogrel und Lipidsenkern wurde allerdings auch von

mehreren Autoren widersprochen (Gorchakova et al., 2004; Mitsios et al., 2004; Müller et al., 2003 a; Neubauer et al., 2003; Saw et al., 2003; Serebruany et al., 2001 und 2004; Wienbergen et al., 2003). Z.B. beobachteten sie bei zusätzlicher Gabe von Statinen keine verminderte plättchenhemmende Wirkung von Clopidogrel (Saw et al., 2003; Serebruany et al., 2001; Wienbergen et al., 2003).

Insgesamt scheint somit eine Interaktion zwischen Clopidogrel und Statinen gering zu sein. Es zeigte sich, dass durch die zusätzliche Gabe von Statinen zur dualen Therapie der Plättchenaggregation weder die Plättchenaggregation nach Intervention kardiovaskulär behandelter Patienten erhöht war noch sich die klinische Prognose dieser Patienten verschlechterte (Geisler et al., 2008 d). Bedeutenderen Einfluss auf die Clopidogrel-Resistenz haben demgegenüber Protonenpumpeninhibitoren (PPI), die ebenso wie Clopidogrel über das CYP2C19, ein geringer Teil über CYP3A4, in der Leber metabolisiert werden (Thjodleifsson, 2002). Der Protonenpumpeninhibitor Rabeprazol unterliegt nur geringfügig dem enzymatischem Abbau und besitzt vermutlich weniger Interaktionspotential als andere Protonenpumpeninhibitoren (Martín de Argila, 2005). Da die Metabolisierung der Protonenpumpeninhibitoren auf unterschiedliche Weise erfolgt, ist der CYP2C19-Genotyp von entscheidender Bedeutung. Bei homozygotem CYP2C19-Genotyp liegt eine verlangsamte Metabolisierung der Protonenpumpeninhibitoren vor, so dass es zu einer Erhöhung der Plasmakonzentration des jeweiligen Präparates kommt. Dieser Effekt soll laut Ishizaki und Horai (1999) besonders ausgeprägt bei Omeprazol sein, gefolgt von Lansoprazol, Esomeprazol, Pantoprazol und Rabeprazol. Aufgrund dieser Vermutungen untersuchten Zuern und Koautoren (2010) bei Patienten, die eine koronare Intervention erhalten hatten, die Auswirkung von Protonenpumpeninhibitoren auf die Clopidogrel-Wirkung, indem sie die Plättchenaggregation ex vivo ermittelten. Dabei ergab sich bei gleichzeitiger Behandlung mit Protonenpumpeninhibitoren und Clopidogrel eine signifikant erhöhte Plättchenaggregation im Vergleich zur alleinigen Therapie mit Clopidogrel (34,0% vs. 29,8%, $p < 0,001$). Demzufolge führt die Substrat-

interaktion zwischen PPI und Clopidogrel zu einer Senkung der Clopidogrel-Wirkung.

Eine taiwanesische Studie nutzte das in der asiatischen Bevölkerung stark verbreitete, dort jedoch funktionslose CYP2C19. Dessen Funktionsverlust macht potentielle Medikamenteninteraktionen im Versuch transparenter. Es ergab sich eine signifikant höhere Inzidenz von Rehospitalisierung und Mortalität bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit, die begleitend zu ihrer Therapie Protonenpumpeninhibitoren eingenommen hatten (Huang et al., 2010). Zhang und Koautoren (2009) kamen zu dem Schluss, dass die Clopidogrel-Wirkung unter gleichzeitiger Behandlung mit PPI nicht durch den schwachen inhibitorischen Effekt der PPI am CYP2C19 hervorgerufen werden kann. Viel mehr postulierten sie, dass Clopidogrel selbst ein Inhibitor des CYP2C19 sei. Diese Hypothese muss jedoch noch durch weitere Experimente bestätigt werden. Sicher ist, dass die Clopidogrel-Wirkung durch PPI beeinflusst wird. Dabei muss zwischen Interaktionen, gemessen durch ex vivo-Thrombozytenfunktionstests, und klinisch-prognostischen Effekten unterschieden werden. In wenigen systematischen randomisierten klinischen Studien ließ sich kein Einfluss der gemessenen Effekte der Clopidogrel abhängigen Aggregationshemmung auf die klinische Prognose nachweisen (Bhatt et al., 2010). Das Ausmaß der Substratinteraktionen wird gegenwärtig in zahlreichen Versuchen untersucht. Es könnte eine bedeutende Ursache für die Clopidogrel-Resistenz darstellen.

1.6 Einfluss genetischer Polymorphismen auf die Effektivität der antithrombozytären Therapie

Die Rolle bestimmter genetischer Polymorphismen für die Effektivität der antithrombozytären Therapie wird aktuell diskutiert. Clopidogrel wird als „Prodrug“ über das CYP2C19 und das CYP3A4 aktiviert. Unter einem „Prodrug“ versteht man eine Substanz, die nach Aufnahme zunächst inaktiv im Organismus vorliegt und erst durch enzymatischen Umbau ihre Wirkfähigkeit

erreicht. Der CYP2C19*2- und der CYP2C19*3-Polymorphismus führen zum Verlust der enzymatischen Aktivität. Diese Polymorphismen verhindern damit die vollständige Entfaltung der Clopidogrel-Wirkung (Jinnai et al., 2009).

In einer Assoziationsstudie identifizierten Shuldiner und Koautoren (2009) 13 Einzel-Nukleotid-Polymorphismen auf dem Chromosom 10q24 für CYP2C18, CYP2C19, CYP2C9 und CYP2C8, die mit einer verminderten Clopidogrel-Wirkung verbunden sind. Besonders führt die CYP2C19*2-Variante zu einer Beeinträchtigung der Wirkung von Clopidogrel und verschlechtert die Prognose kardiovaskulärer Erkrankungen. In einer weiteren Studie wurden ebenfalls genetische Variationen im CYP2C19 als Ursache einer veränderten Clopidogrel-Wirkung untersucht (Momary et al., 2010). Diese senken die Entstehung aktiver Clopidogrel-Metabolite und führen damit zu einer Variabilität in der Clopidogrel-Wirkung. Eine Relevanz hat nach Gladding und Koautoren (2008) die Dosierung von Clopidogrel. Träger der CYP2C19*2- und *4-Variante zeigten im Versuch eine reduzierte Plättchenhemmung nach Applikation von 600mg Clopidogrel. Die Plättchenhemmung konnte mittels einer höheren Clopidogrel-Dosis zwar auch bei Trägern der CYP2C19 „loss-of-function“-Genvariante verbessert werden (Bonello, JACC 2010), allerdings deutlich weniger als bei Patienten ohne diese Variante.

Neben der Wirkung der hier beschriebenen CYP2C19 „loss-of-function“-Genvariante spielt offensichtlich der Polymorphismus des P2Y₁₂-Gens eine Rolle. So ließ sich initial für die Deletionsmutation im P2Y₁₂-Gen eine verminderte Rezeptorsynthese aufzeigen, woraus eine verminderte Bindung von ADP an den Rezeptor gefolgert wurde (Conley und Delaney, 2003). Fontana et al. (2003 a) entdeckten drei Einzel-Nukleotid-Polymorphismen (SNP = single nucleotide polymorphism) sowie eine Nukleotid-Insertion im P2Y₁₂-Gen. Hieraus schlossen sie auf einen Major-Haplotyp H1 (Träger keines Polymorphismus) und einen Minor-Haplotyp H2 (Träger aller 4 Polymorphismen). Diese treten mit einer Frequenz von 86% bzw. 14% auf. Es stellte sich heraus, dass der H2-Haplotyp mit einer erhöhten ADP-induzierten

Plättchenaggregation einhergeht. Dies zeigte sich sowohl bei homozygoten als auch bei heterozygoten Trägern des H2-Allels. Dabei fand sich bei den homozygoten Trägern eine höhere Thrombozytenaggregation als bei den heterozygoten Trägern (Fontana et al., 2003 a). Zudem wurden bei einer aus 184 Patienten bestehenden Population mit bekannter peripherer arterieller Verschlusskrankheit (pAVK) bei 30% mindestens ein H2-Allel gefunden (Fontana et al., 2003 b). In einer aus 330 Personen bestehenden Kontrollgruppe ohne pAVK konnte der H2-Haplotyp dagegen nur vereinzelt nachgewiesen werden.

In einer 2007 durchgeführten Studie wurde die Bedeutung des H2-Haplotyps bezüglich seines Einflusses auf die Plättchenaggregation erneut bestätigt. Nichtraucher vom H2-Haplotyp zeigten eine erhöhte Prädisposition zu atherothrombotischen Erkrankungen (Cavallari et al., 2007). Die verminderte Clopidogrel-Antwort könnte ein Hinweis auf eine abgeschwächte Substanzwirkung sein. Abschließend ließ sich jedoch bisher kein eindeutiger Zusammenhang zwischen diesem Polymorphismus und der Wirksamkeit von Clopidogrel insbesondere auf die klinische Prognose nachweisen.

Eine weitere Studie verglich die homozygoten und heterozygoten Haplotypen (H1/H1,H1/H2,H2/H2) des P2Y₁₂-Rezeptors bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit (KHK) (Schettert et al., 2006). Alle drei Genotypen führten nach Behandlung zu einer ähnlichen klinischen Prognose, so dass die Überlegenheit des H2-Haplotyps nicht bestätigt werden konnte. Der generelle Einfluss der Haplotypen auf die kardiovaskulären Endpunkte kardialer Tod, Myokardinfarkt und refraktäre Angina pectoris mit notwendiger Revaskularisierung konnte durch die Studie jedoch nicht ausgeschlossen werden.

Für kontroverse Diskussionen sorgte ein Artikel von Boumann et al. (2011) zum Paraoxonase-1 Enzym, dass an der Biotransformation von Clopidogrel beteiligt ist. Sie identifizierten einen Zusammenhang zwischen dem Q19PR-Polymorphismus des für dieses Enzym kodierenden Gens und einer reduzierten

Biotransformation mit der aggregationshemmenden Wirkung von Clopidogrel. Dementsprechend zeigte sich bei einem mit Clopidogrel behandelten Patientenkollektiv von homozygoten Trägern des PON1 Q192R-Genotyps nach Stentimplantation ein erhöhtes Risiko für Stentthrombosen. In Folgestudien ließ sich dieser Zusammenhang jedoch nicht bestätigen. So wurden 760 Patienten nach koronarer Stentimplantation mit anschließender Clopidogrel-Therapie auf den Paraoxonase-1 Q192R Polymorphismus hin untersucht, ohne dass sich zwischen Polymorphismus und plättchenhemmender Wirkung von Clopidogrel ein Zusammenhang nachweisen ließ (Trenk et al., 2011). Desgleichen konnten weder Fontana et al. (2011), noch Hulot und Koautoren (2011) die Ursache einer möglichen Variabilität der Clopidogrel-Wirkung in dem Paraoxonase-1 Enzym experimentell bestätigen. Beide Autoren heben dagegen die Bedeutung des Cytochrom P2C19-Enzyms (CYP2C19) hervor. Ihrer Meinung nach sind es die Cytochrom P2C19-Enzymvarianten, die die pharmakokinetischen- und pharmakodynamische Eigenschaften von Clopidogrel maßgeblich beeinflussen.

1.7 Pharmakogenomik und Pharmakogenetik

Mittels der Pharmakogenomik lassen sich die Auswirkungen veränderter Genexpressionen auf den Metabolismus bestimmter Arzneimittel erkennen. Dabei betrachtet die Pharmakogenomik im Gegensatz zur Pharmakogenetik, die am einzelnen Individuum ansetzt, das Genom einer Population und stellt mittels Screeningverfahren, Datenbanken und anerkannten klinischen Versuchen Ansatzpunkte für mögliche therapeutische Interventionen dar. Ergänzend zur Pharmakogenomik dient die Pharmakogenetik der Suche nach den Ursachen veränderter Genexpressionen. Diese können durch strukturelle Veränderungen genetischer Sequenzen entstehen und großen Einfluss auf die Wirksamkeit und Verträglichkeit von Arzneimitteln haben.

Die Beeinträchtigung des Arzneimittelmetabolismus steht nach Wiviott und Antman (2004) häufig in Zusammenhang mit dem Auftreten von Polymorphismen oder genetischen Varianten der für den Metabolisierungs-

vorgang zuständigen Enzyme. Abweichungen der DNA-Sequenz auf Genen haben Polymorphismen zur Folge. Die Allelhäufigkeit eines Polymorphismus muss dabei mit einer Frequenz von $> 1\%$ in einer Population vertreten sein. Tritt ein Polymorphismus als Folge eines einzigen Nukleotidaustauschs im DNA-Molekül auf, so spricht man von einem Einzel-Nukleotid-Polymorphismus (SNP = single nucleotide polymorphism). Die SNP-Sequenzen sind eine häufige Ursache für das Auftreten einer veränderten Enzymaktivität und damit für das sehr unterschiedliche individuelle Ansprechen von Patienten auf Arzneimittel.

1.8 Arzneimittel-Metabolisierung über Cytochrom P450

Die Metabolisierung von Arzneimitteln im menschlichen Organismus erfolgt überwiegend über das Cytochrom P450 (CYP450)-Enzymsystem. Bisher sind 39 funktionelle menschliche CYP-Enzyme (www.drnelson.utmem.edu/cytochromeP450.html) bekannt, von denen 12 für den menschlichen Arzneimittelmetabolismus relevant sind (Schwab et al., 2002). Bei diesem Enzymsystem handelt es sich um Monooxygenasen. Ca. 90-95% der P450-Enzyme sind in der Leber lokalisiert. 60-65% der Enzyme sind in den Arzneimittelmetabolismus involviert. Die Biotransformation der Arzneimittel beinhaltet zwei Phasen, wobei die ausschlaggebende Funktion der P450-Enzyme in der ersten Phase angesiedelt ist. Sie fungieren in Form von Hämoproteinen, welche in der Membran des endoplasmatischen Retikulums verankert sind, und sorgen über das Einfügen und Freilegen funktioneller Gruppen in der zu verstoffwechselnden Substanz für eine größere Affinität. In der zweiten Phase der Katalyse werden die Metabolite an negativ geladene Gruppen gekoppelt und anschließend überwiegend über die Niere ausgeschieden (Schwab et al., 2002).

Die Transformation von Clopidogrel über das CYP450-Enzym schließt eine Vielzahl von Isoenzymen ein. Dabei muss berücksichtigt werden, dass ein verabreichtes Arzneimittel je nach Beschaffenheit seines Wirkstoffs entweder durch das P450-Enzymsystem verstoffwechselt wird oder als Inhibitor der an

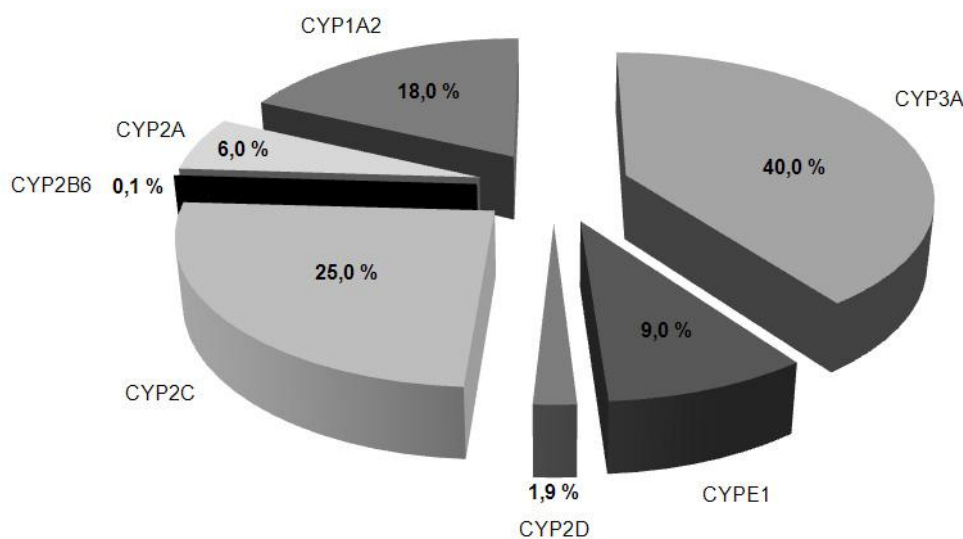
der Metabolisierung beteiligten Isoenzyme fungiert. Dies könnte wiederum zur Folge haben, dass die plättchenhemmende Wirkung nicht nur von einem Medikament wie Clopidogrel ausgeht, sondern zusätzlich vom Einfluss anderer, den Clopidogrel-Metabolismus störender Substrate, abhängt. Hinzu kommen mögliche Polymorphismen der CYP-Isoenzyme, die Substratinteraktionen negativ beeinflussen könnten. Das Cytochrom P450-Enzymsystem besteht aus zahlreichen Isoformen. Den größten Anteil nimmt dabei die CYP3A-Subfamilie ein, die ca. 40% aller therapeutisch eingesetzten Arzneimittel verstoffwechselt. Auf die Isoformen CYP1A2 und CYP2C entfallen dabei ca. 18- bzw. 25% der Metabolisierungsrate (Geisler und Gawaz, 2008) (Abb. 5). Polymorphismen der CYP-Enzyme sind jedoch nur dann funktionell wichtig, wenn mindestens 30% der Dosis eines Medikaments durch diese Enzyme verstoffwechselt wird (Ingelman-Sundberg et al., 1999; Nebert, 1997). Bei sogenannten „Prodrugs“ kann schon ein Anteil von 3-20% der Dosis eine therapeutische Relevanz haben.

Polymorphismen können in den metabolischen Umsatz eingreifen. So können individuell auftretende Differenzen im Abbau von Arzneimitteln auf genetische Unterschiede in der Codierung verschiedener Enzyme zurückgeführt werden. Veränderte Genexpressionen werden in den meisten Fällen zunächst im Phänotyp, der Ausprägung eines klinischen Faktors, sichtbar. Das CYP 450-Enzymsystem weist bezüglich seiner Funktion eine hohe Variabilität auf, so dass ein bei gleicher Dosierung verabreichtes Arzneimittel bei verschiedenen Patienten unterschiedliche Wirkung, Metabolisierungsdauer und Nebenwirkungen erzielen kann. Der Funktionsverlust oder Teilverlust einer CYP 450-abhängigen Enzymaktivität kann den Metabolisierungsstatus eines Patienten sehr stark beeinträchtigen. Normalerweise läuft der Metabolisierungsvorgang stark verlangsamt ab. Die damit verbundene Gefahr besteht in einer übermäßigen Anhäufung des Medikaments im Organismus, was zu geringgradigen Nebenwirkungen bis zu starker Toxizität führen kann. Somit muß die Dosierung des Medikaments davon abhängig gemacht werden, ob das durch den Polymorphismus betroffene Enzym an der Bioaktivierung oder am

Abbau der Substanz beteiligt ist. Das Cytochrom P2C19-Enzym (CYP2C19) ist für die Metabolisierung zahlreicher Medikamente verantwortlich, z.B. von Magen-Darm-Therapeutika, Protonenpumpeninhibitoren, Antiepileptika, Antidepressiva und Malariawirkstoffen. 2- 5% der deutschen Bevölkerung besitzt einen defizienten Metabolismus für CYP2C19 mit fehlender metabolischer Kapazität (Schwab et al., 2002).

Abbildung 5

Anteilige Isoenzyme am Cytochrom P450-Enzymsystem



(aus Platelet Pharmacogenetics and Pharmacogenomics, Geisler T and Gawaz M, © 2008 Georg Thieme-Verlag KG)

1.9 Ergänzende Studien zu CYP2C19 (Tab 3)

Mit Hilfe von Studien, die auf genetischen Analysen basieren, konnte die Auswirkung des CYP2C19-Polymorphismus auf die Einnahme von Clopidogrel bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit besser erfasst und verstanden werden. Der Thrombozytenaggregationsinhibitor Clopidogrel nimmt mit seinem Wirkmechanismus Einfluss auf die Hämostase im Organismus. Ein Polymorphismus in Enzymen, die für die Metabolisierung von Clopidogrel verantwortlich sind, kann den ausgleichenden Effekt des Medikaments auf die Hämostase unterdrücken. Zu unterscheiden sind zunächst drei Begriffe, die für

die primäre Hämostase entscheidend sind: Thrombozytenadhäsion, Thrombozytenaktivität und Thrombozytenaggregation. Die Thrombozytenadhäsion führt zur Anlagerung von Plättchen an die nicht intakte Gefäßwand. Dies geschieht unter anderem über thrombozytäre Glykoproteine, den von-Willebrand-Faktor und diverse Adhäsionsrezeptoren (Ruggeri, 2002). Die Thrombozytenaktivität bezeichnet die Aktivierung und damit einhergehende Formveränderungen der Thrombozyten durch Ausbildung von Pseudopodien auf der Zelloberfläche (Ofuso und Nyarko, 2000; Rosenfeld und Gralnick, 1997). Die Thrombozytenaktivität lässt sich unter anderem mittels flußzytometrischer Meßmethoden darstellen. Die Thrombozytenaggregation, die die Zusammenlagerung von Blutplättchen in der zellulären Hämostase bezeichnet, dient dem Verschluss von verletzten Gefäßen über Fibrinogenbindungen (Gawaz, 1999 a).

Die Daten von Hulot et al. (2006) weisen einen deutlichen Zusammenhang zwischen der Allelvariante CYP2C19*2 und einer verminderten Pharmakodynamik von Clopidogrel auf. So zeigten Patienten mit einem homozygoten CYP2C19-Wildtyp (*1/*1) und Patienten mit heterozygotem CYP2C19 (*1/*2) bei Hinzufügen von 10µmol ADP in einem in dieser Studie ex vivo durchgeführten Funktionstest einen signifikanten Unterschied bezüglich der Plättchenaggregation. Somit kam es unter einer einmal täglich verabreichten Clopidogrel-Dosis von 75mg und der anschließend ADP-induzierten Plättchenaggregation zu einer Abnahme derselben bei homozygoten Trägern, nicht jedoch bei heterozygoten Trägern. Die Messungen beschränkten sich auf die Thrombozytenaggregation. Die Thrombozytenaktivität wurde nicht mit einbezogen. Das Vorkommen der CYP2C19*2-Variante beeinflusst dagegen die Metabolisierung von Clopidogrel. Daraus resultiert eine verminderte Hemmung der Plättchenaggregation. Laut De Morais und Koautoren (1994) liegt diesem Mechanismus eine fehlerhafte Codierung von Seiten der CYP2C19*2-Variante (681G > A Polymorphismus in Exon 5) zugrunde, die zur Bildung eines mutierten CYP2C19*2-Enzyms führt.

Tabelle 3

Tabellarische Übersicht bisheriger Studien zu CYP2C19

| Kohortenstudien | Anzahl an Patienten und Einschlusskriterien | Behandlungsart und Dauer der Behandlung | Primärer Endpunkt (1) Sekundärer Endpunkt (2) | Referenz |
|-----------------|---|--|--|------------------------------------|
| 1. | 94 europide Medizinstudenten | Initiale Clopidogrel-Therapie 300mg/d; Erhaltungsdosis von 75mg/d über eine Woche | | Fontana et al., 2007 |
| 2. | 259 Patienten (<45 Jahre), nach überlebtem Myokardinfarkt | Clopidogrel-Therapie 75mg/d mindestens einen Monat; Wiederholung halbjährlich nach individuellen Kriterien | Tod, Myokardinfarkt, akute koronare Revaskularisation während Clopidogrel-Exposition (1) Durch Angiographie nachgewiesene Stentthrombosen (2) | Collet et al., 2008 |
| 3.1 | 162 gesunde Patienten | Thienopyridine | Plättchenaggregation, aktive Clopidogrel-Metabolite (1) | Mega et al., 2009 |
| 3.2 | 1477 Patienten mit akutem Koronarsyndrom | Initiale Clopidogrel-Therapie 300mg/d; Erhaltungsdosis von 75mg/d über 15 Monate | Tod durch kardiovaskuläres Ereignis, Myokardinfarkt, Schlaganfall, Stentthrombose (1) | Mega et al., 2009 (TRITON-TIMI 38) |
| 4. | 2208 Patienten mit akutem Myokardinfarkt | Clopidogrel-Therapie 300mg/d; Erhaltungsdosis von 75mg/d | Tod, nicht fataler Schlaganfall oder Myokardinfarkt während des ersten Jahres nach Behandlungsbeginn (1) | Simon et al., 2009 |

2. Zielsetzung

In der vorliegenden Arbeit soll die Frage geklärt werden, inwieweit die Varianten des CYP450-Enzymsystems die Wirkung von Clopidogrel beeinflussen. Untersucht werden die bisher mit der Verstoffwechslung von Clopidogrel in Zusammenhang gebrachten Polymorphismen *2, *3 und *17 des CYP2C19-Enzyms, des CYP3A4*1B- und des CYP3A5*3-Polymorphismus. Die dazu notwendigen Messungen werden mit Hilfe von ex vivo-Thrombozytenfunktionstests vorgenommen. Anhand einer konsekutiven Patientenpopulation mit symptomatischer koronarer Herzkrankheit, der eine Initialdosis von 600mg Clopidogrel verabreicht wurde, soll eine Aufteilung der Studienteilnehmer in „Responder“ und „poor-Responder“ erfolgen. Die Bedeutung der unterschiedlichen Polymorphismen für die Aggregationshemmung durch Clopidogrel soll ermittelt und mit klinischen, nicht-genetischen Faktoren korreliert werden.

3. Material und Methodik

3.1 Patienten und Studiendesign

In der vorliegenden Arbeit wurde EDTA-Blut von insgesamt 237 Patienten untersucht. Die Patienten waren in der 1. Medizinischen Klinik des Universitätsklinikums Tübingen in der Abteilung für Kardiologie aufgrund einer symptomatischen koronaren Herzkrankheit (KHK) und koronarinterventioneller Behandlung mit einer dualen antithrombozytären Therapie aus Acetylsalicylsäure und Clopidogrel behandelt worden. Vergleichend wurden Blutproben von 186 Kontrollpersonen untersucht. Die Probanden der Kontrollgruppe waren symptomlose gesunde Individuen, randomisiert nach Schäffeler et al., 2001. Die Studienpopulation der 237 erkrankten Probanden umfasste zu 76,4% männliche und zu 23,6% weibliche Probanden mit einem Altersdurchschnitt von 67,8 +/- 9,9 Jahren (Tab. 4).

Sowohl die 237 erkrankten Personen als auch die 186 gesunden Personen der Kontrollgruppe wurden auf Polymorphismen untersucht, die die Clopidogrel-Wirkung beeinflussen. Mögliche Zusammenhänge im Auftreten koronarischämischer Symptomaten und den damit korrelierenden Polymorphismen wurden mittels der ex vivo-Thrombozytenfunktion erfasst. Die Genotypisierung erfolgte anhand der CYP-Allel-Frequenzen.

Ein akutes Koronarsyndrom wurde als solches diagnostiziert, wenn eines der folgenden Kriterien erfüllt war: Instabile Angina pectoris (klinische Symptome und EKG-Veränderungen ohne Auftreten einer myokardialen Nekrose), akuter Myokardinfarkt (positive myokardiale Nekrosemarker, z.B. eine Erhöhung des Serumentroponin und der CK-MB [Creatinkinase (Myokardtyp)]) sowie der ST-Hebungsinfarkt (STEMI) als auch der Nicht-ST-Hebungsinfarkt (NSTEMI).

Eine sachgemäße Aufklärung der Patienten und Kontrollpersonen erfolgte in mündlicher und schriftlicher Form. Die Genehmigung der Ethikkommission der Eberhard Karls Universität Tübingen lag vor.

3.2 Antithrombozytäre Therapie

Die Dosierung des Wirkstoffs Clopidogrel erfolgte abhängig von einer schon bestehenden oder nicht bestehenden Therapie. Patienten, die Clopidogrel als Dauermedikation in Form einer täglichen Dosis von 75mg erhielten, wurde vor dem Eingriff eine Clopidogrel-Dosis von 300mg, entsprechend vier Filmtabletten à 75mg, verabreicht. Patienten, denen erstmalig Clopidogrel gegeben wurde, wurden mit einer Dosis von 600mg, entsprechend acht Filmtabletten, behandelt. Anschließend folgte eine Clopidogrel-Therapie à 75mg für mindestens drei Monate. Zusätzlich wurden die Patienten vor der Koronarangiographie mit 500mg Acetylsalicylsäure intravenös und in der Folgezeit mit 100mg Acetylsalicylsäure oral versorgt. Die Glykoprotein IIb/IIIa-Antagonisten Abciximab (Reopro®) und Eptifibatide (Integrilin®) wurden demgegenüber als Bolus oder als Infusion verabreicht.

3.3 Gewinnung und Verarbeitung der Proben

Verwendete Materialien:

- 10ml-Citratröhrchen, zwei 2,7ml-EDTA-Röhrchen
(Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland)
- Heraeus® Megafuge® 1.0 R
(Kendro, Langenselbold, Deutschland)
- Polystyrol-Röhrchen (1000µl plättchenreiches Plasma [PRP])
(Greiner Bio-One GmbH, Essen, Deutschland)
- Sysmex SE-9000 (500µl PRP)
(Sysmex Europe GmbH, Norderstedt, Deutschland)
- 2ml Safe-Lock Reaktionsgefäße
(Eppendorf-Hütchen, Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH,
Wesseling-Berzdorf, Deutschland)
- Eppendorf-Pipetten (10-100 µl und 100-1000 µl)

Die für die Arbeit erforderlichen Blutentnahmen waren zeitlich abhängig von der jeweiligen Dosierung. Bei einer Dosis von 600mg Clopidogrel erfolgte die Blutentnahme frühestens nach sechs Stunden, während bei einer Dosis von 300mg die Blutentnahme frühestens 24 Stunden nach Einnahme des Medikaments durchgeführt wurde. Die Blutentnahme wurde demnach in dem Zeitraum der maximal zu erreichenden Hemmung der Plättchenaggregation vorgenommen (Gurbel et al., 2003; Hochholzer et al., 2005; Müller et al., 2001; Seyfarth et al., 2002). Nach Verabreichung von Abciximab (Reopro®) in Form eines Bolus plus Infusion erfolgte die Blutentnahme fünf Tage nach Beendigung der Infusion.

Um festzustellen welche Wirkung Clopidogrel, Abciximab und Eptifibatide als antithrombotische Medikamente auf die Thrombozytenfunktion der einzelnen Patienten besitzen, wurde sofort nach der Blutentnahme die Thrombozytenaggregation bestimmt. Dafür wurde das Blut über eine Monovetten®-Kanüle in jeweils ein 10ml-Citratröhrchen und zwei 2,7ml-EDTA-Röhrchen gesammelt.

Die EDTA-Röhrchen wurden nummeriert und in einem Tiefkühlschrank bei -75° Celsius tiefgefroren. Diese Proben wurden zur Bestimmung von CYP2C19-, CYP3A4- und CYP3A5-Polymorphismen des P450-Enzymkomplexes in das Institut für Klinische Pharmakologie, Stuttgart, Prof. Dr. M. Schwab, gesandt.

Das mit Citrat antikoagulierte Patientenblut wurde zur Untersuchung seiner Aggregationseigenschaften innerhalb einer Stunde nach Entnahme weiterverarbeitet. Dazu wurden die Blutproben zunächst bei 20° Celsius und 1000 Umdrehungen pro Minute ohne Bremsfunktion zehn Minuten lang in der Heraeus® Megafuge® 1.0 R zentrifugiert. Es bildete sich in den Reagenzgläsern ein Pellet sowie eine Überstandsfraktion aus plättchenreichem Plasma. Davon wurden jeweils $1000\mu\text{l}$ in ein Polystyrol-Röhrchen pipettiert und für die aggregometrische Messung verwendet. Jeweils weitere $500\mu\text{l}$ aus dem Überstand wurden für die Messung der Thrombozytenzahl im Sysmex SE-9000, einem Blutzell-Analysesystem entnommen. Das Pipettieren erfolgte mittels Eppendorf-Pipetten ($10-100\mu\text{l}$ und $100-1000\mu\text{l}$). Für die Messungen am Sysmex SE-9000 wurden 2ml Safe-Lock- Reaktionsgefäße (Eppendorf-Hütchen) verwendet. Es folgte eine weitere 10-minütige Zentrifugation der Blutproben bei 20° Celsius und 3500 Umdrehungen pro Minute mit Bremsfunktion. Die daraus resultierende Überstandsfraktion bestand aus nunmehr plättchenarmem Plasma. Das plättchenarme Plasma wurde nun dafür verwendet, das plättchenreiche Plasma auf eine Thrombozytenkonzentration von ungefähr 200.000 Thrombozyten/ μl einzustellen.

Die im Sysmex SE-9000 errechnete Thrombozytenzahl der jeweiligen Probe entschied über eine notwendige Verdünnung des plättchenreichen Plasmas durch plättchenarmes Plasma. Bei weniger als 200.000 Thrombozyten/ μl war eine Verdünnung nicht erforderlich. Bei über 200.000 Thrombozyten/ μl hatte eine Verdünnung zu erfolgen.

Die Messung der Thrombozytenaggregation am Aggregometer erfolgte über die gewonnenen Proben von plättchenreichem und plättchenarmem Plasma. $490\mu\text{l}$

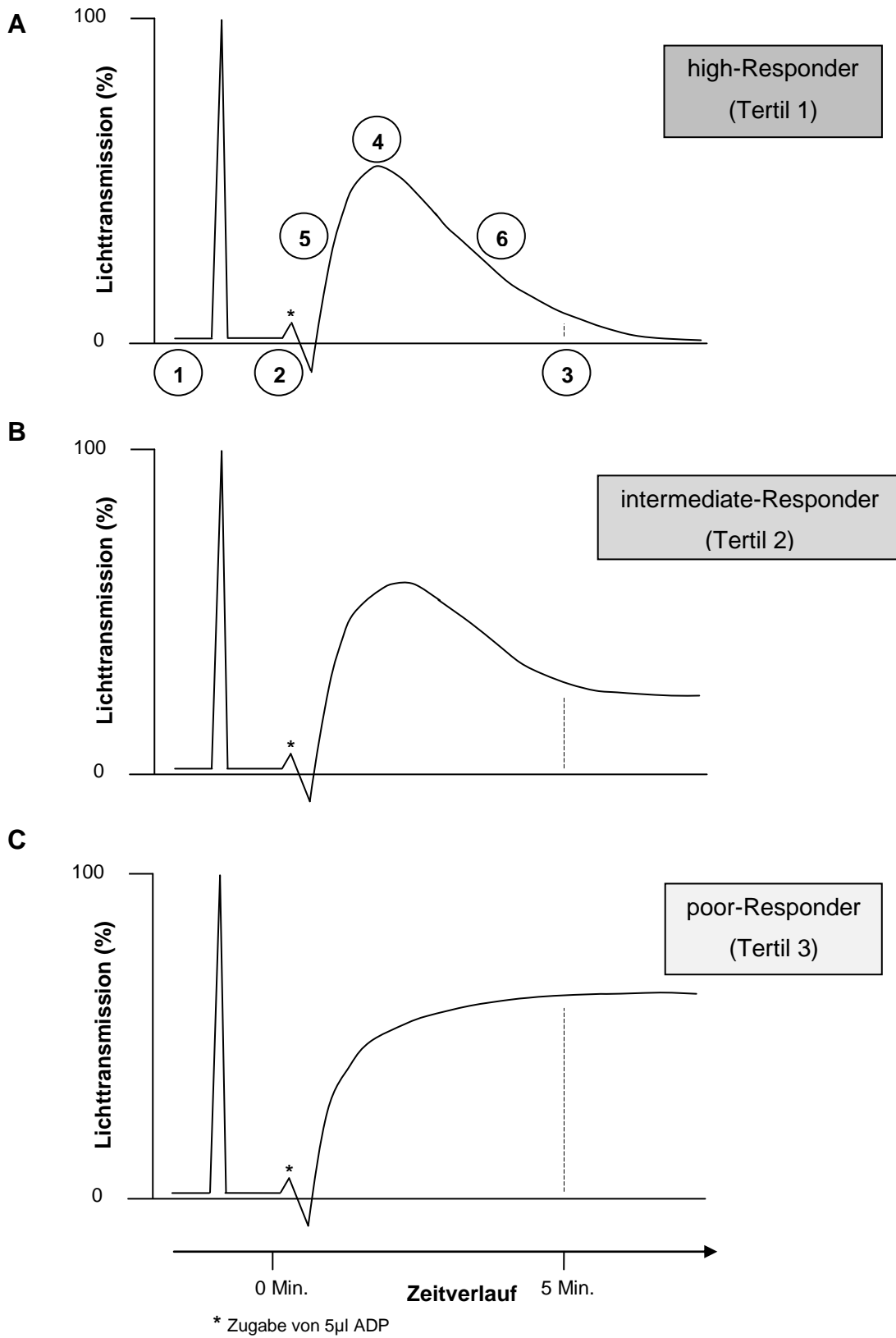
des plättchenreichen Plasmas (PRP) und 500µl des plättchenarmen Plasmas (PPP) wurden jeweils in eine silikonbeschichtete Glasküvette mit einem Magnetrührstäbchen gegeben. Zu Beginn der Probenverarbeitung erfolgte eine zweiminütige Erwärmung der Proben, woraufhin bei 1000 Umdrehungen und Raumtemperatur die eigentliche Verarbeitung folgte. Bei dem verwendeten Aggregometer handelte es sich um ein 2-Kanal-Vollblut-Lumi-Aggregometer des Modells 490. Die für die am Aggregometer verwendeten Materialien wurden alle von Chrono-Log Corporation, Havertown, PA, USA, bezogen (Vertrieb über Probe & go Labordiagnostica GmbH, Eendingen, Deutschland).

3.4 Aggregometrie

Für die Beurteilung der Thrombozytenfunktion wurde ein turbidimetrisches Messverfahren, die Aggregometrie, eingesetzt. Dabei haben wir uns nach der von Born (1962) entwickelten Methodik gerichtet. Hierbei wird die Differenz der optischen Dichte zweier Proben photometrisch gemessen und graphisch dargestellt. Das plättchenarme Plasma gibt den 100%-Wert der Lichttransmission wieder, womit die Proben des plättchenreichen Plasmas verglichen werden können. Zunächst ist die Lichtdurchlässigkeit des plättchenreichen Plasmas wesentlich geringer, sie steigt aber mit zunehmender Aggregation an. Dies spiegelt sich graphisch in einer wachsenden Amplitude wider. Die Messung kann durch die Zugabe eines Thrombozytenaggregationsstimulators, z.B. von ADP, beschleunigt werden. Über einen angeschlossenen Drucker werden Aggregationsverlauf, Kurvenmaximum, Endaggregation und die Kinetik der Reaktion aufgezeichnet (Abb. 6).

Abbildung 6

Schematische Darstellung einer Aggregometerkurve nach Aktivierung mit ADP



Legende Abbildung 6

Messung am Aggregometer nach Positionierung der Glasküvetten mit plättchenreichem und plättchenarmem Plasma in den Strahlengang: mit Beginn der Messung erfolgt der Nullabgleich durch den ein Nullwert unabhängig von der Voraggregation der Proben gesetzt wird (1). Es folgt eine zweiminütige Erwärmung der Proben. Anschließend wird die eigentliche Messung bei Raumtemperatur durchgeführt. Dazu werden 20µmol/l des Agonisten ADP (CHRONO-PAR ADP-Reagenz, Probe & go Labordiagnostica, Endingen, Deutschland) in die plättchenarme Lösung pipettiert (2). ADP beeinflusst den Kurvenverlauf bei „Respondern“ („high- [A] und intermediate-Responders [B]“) und „poor-Respondern [C]“ unterschiedlich. Die Aggregationsparameter sind der nach fünf Minuten gemessene Aggregationswert (3), das Aggregationsmaximum (4), die Aggregationssteigung (5) und die Deaggregation (6). Aggregationswert und Aggregationsmaximum werden dem Kurvenverlauf entnommen und protokolliert. Während die Aggregationssteigung die Schnelligkeit der entstehenden Plättchenaggregate darstellt, zeigt die Deaggregation die Wiederauflösung, die sogenannte Reversibilität, der Plättchenaggregate an.

3.5 Messung der EDTA-Blutproben

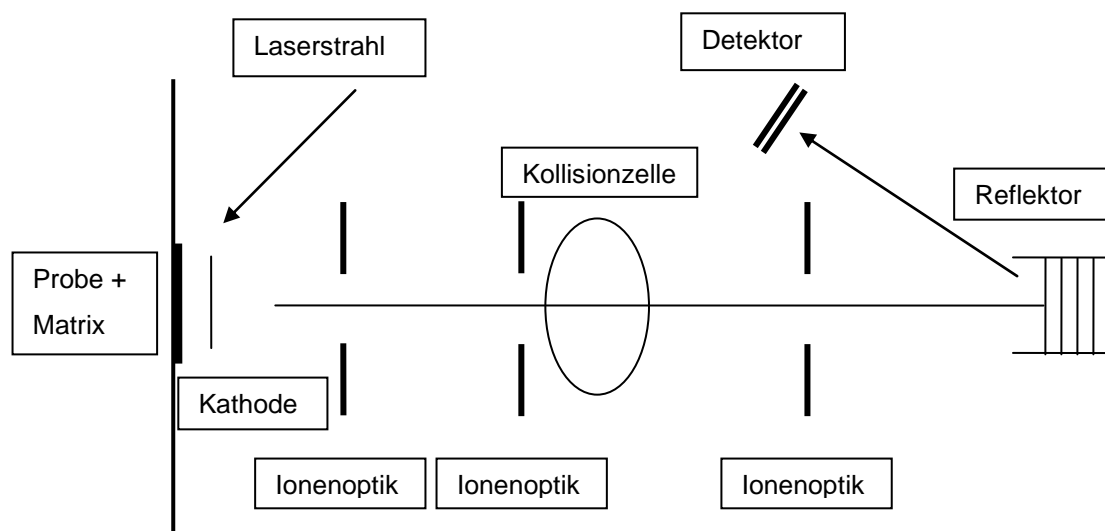
Mit Hilfe des QIAamp® DNA Blood Mini Kit Systems (Qiagen, Hilden, Germany) wurde die DNA aus den EDTA-Blutproben entfernt und hinsichtlich der Polymorphismen CYP2C19*2 (681G>A), -*3 (636G>A), -*17 (-806>T), CYP3A4*1B (-392>G)- und CYP3A5*3 (6986>G) analysiert. Der folgende Abschnitt basiert auf Daten von Illig et al. (2004) und Tost und Gut (2005).

Im Labor des Dr. Margarete Fischer-Bosch-Instituts für Klinische Pharmakologie (IKP) am Robert-Bosch-Krankenhaus (RBK), Stuttgart, erfolgte die Genotypisierung der Einzel-Nukleotid-Polymorphismen (SNP) mit Hilfe der Laser-Desorptions-/Ionisationsmassenspektrometrie „MALDI-TOF MS“ (Matrix-assisted-Laser-Desorption-/Ionization-Time-of-Flight Mass Spectrometry) mit

dem MassArray® Compact System der Firma Sequenom (Sequenom, CA, USA). Dieses System ist ausgelegt auf die Analyse des Einzelbasenaustauschs im Genom (Abb. 7.1).

Abbildung 7.1

Skizze eines Matrix-assisted-Laser-Desorption-/Ionization-Time-of-Flight Mass Spectrometer (MALDI-TOF MS)



Der Laserstrahl führt zur Ionisierung von Molekülen auf der Probe + Matrix. In der Kathode erfolgt die Beschleunigung der Moleküle, die eine leere Kollisionzelle durchfliegen und auf den Reflektor treffen. Dort kommt es zur Umlenkung der Moleküle auf den Detektor. Dieser dient der Bestimmung der Flugzeit. Die gesamte Messung findet im Hochvakuum statt.

Um eine einheitliche Qualitätssicherung der Hochdurchsatz-Genotypisierung zu gewährleisten, wurde die Qualität der genomischen DNA hinsichtlich Menge und Degradation überprüft und eine Standard-PCR-Reaktion durchgeführt. Des Weiteren wurden 2% Negativ- bzw. Positivkontrollen hinzugezogen und 10% der Proben innerhalb des Versuchsablaufs als Qualitätskontrolle retypisiert. Zusätzlich zu den allgemein geltenden Qualitätssicherungsmaßnahmen waren

die Laborarbeiten betreffend der Patientenproben während der gesamten Messvorgänge verblindet.

Vor der SNP-Genotypisierung mittels MALDI-TOF MS erfolgten:

- die Messung der DNA-Konzentration
- die Verdünnung und Normalisierung der DNA auf einheitliche Konzentrationen
- die Verteilung der DNA auf PCR-Platten im 384-well-Format
- das Pipettieren von PCR-Mixen auf über Nacht luftgetrocknete genomische DNA
- Die Verteilung der DNA von 96-well-Lagerplatten auf 384-well-PCR-Platten (mittels Robotersystem mit 8 und 96 Kanälen der Firma Tecan, Crailsheim, BRD).

Für die Durchführung der PCR wurden mehr als 30 Tetrad Multi Cyclers-Blöcke der Firma MJ Research (Biozym Diagnostik GmbH, Hess. Oldendorf, Deutschland) verwendet. 10% der PCR-Produkte wurden als Kontrolle auf 3%igen Agarosegelen untersucht. Nach abgeschlossener PCR-Reaktion erfolgte die Inaktivierung nicht eingebauter Nukleotide mit dem SAP-Enzym (Shrimp Alkaline Phosphatase-Enzym). Anschließend wurde eine Primer-Extensionsreaktion durchgeführt. Ein Primer ist ein Einzelnukleotid mit der Fähigkeit, vor dem zu untersuchenden SNP (single nucleotide polymorphism) an das DNA-Fragment zu binden. Damit dient der Primer aufgrund seiner spiegelbildlichen Eigenschaften zum nachzuweisenden DNA-Segment als Startpunkt für DNA-replizierende Enzyme. Die Abbruchreaktion nach Sanger wurde wie üblich durch drei Didesoxynukleotide und ein Desoxynukleotid hervorgerufen. Für die Pipettierungen wurden Roboter von der Firma Beckman Coulter GmbH (Krefeld, BRD) verwendet.

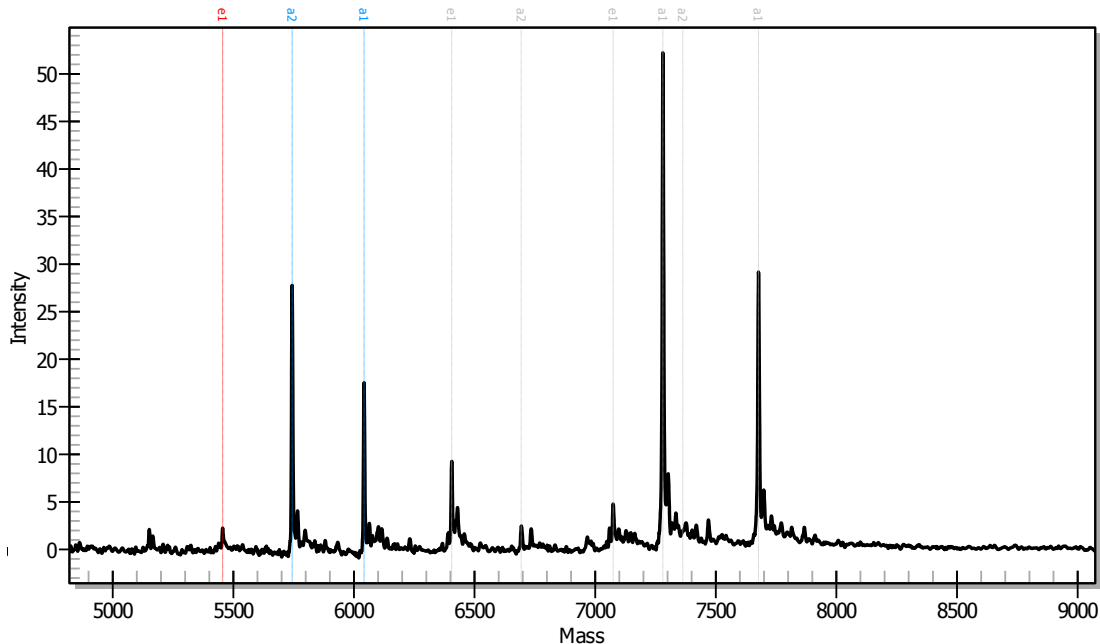
Da Nukleinsäuren eine hohe Affinität zu Alkali- und Erdalkaliionen aufweisen, wurde nach erfolgter PCR-Reaktion ein Ionenaustauschharz (SpectroClean™, Sequenom, Hamburg, BRD) hinzugegeben. Dieses führte zur Bindung der

Kationen. Damit wurden störende Signale entfernt und eine Molekülion-Signalüberlagerung in der MALDI-TOF-MS-Messung verhindert. Anschließend wurde von 1-2nl des Analytengemischs mit Hilfe des Spectro Point Nanoliter Pipetting SystemsTM der Firma Sequenom auf Siliciumchips übertragen. Die Chips waren mit 384 Matrixspots bestückt, die die organische Säure 3-Hydroxypicolinsäure (3-HPA) enthielten. Auf die Chips wurde die zu messende Substanz aufgetragen. Die Kalibrierung des Analysesystems erfolgte mit Kalibranten bestehend aus einer Mischung von Oligonukleotiden bekannter Masse. Für die Massenspektrometrie wurden 10 Chips auf einen Probenträger übertragen und über eine Vakuumschleuse eingeführt.

Die Energieaufnahme der Untersuchungsprobe erfolgte durch UV-Absorption der Matrix. Für die massenspektrometrische Analyse wurde das Flugzeit-Massenspektrometer (Time-of-Flight Mass Spectrometer) mit Beschleunigungsspannung und Laser verwendet (Abb. 7.2). Die bei jedem Laser-Puls entstandenen Ionen traten in gasförmigem Zustand aus der Matrix aus und gelangten unter Beschleunigung aus dem elektrischen in ein elektronegatives Feld. Die Massentrennung der Moleküle erfolgte abhängig von ihrem Masse- und Ladungsverhältnis (m/z). Die Startzeit der Ionen aus der Probe und die Ankunftszeit der Ionen am Detektor ermöglichten eine gleichzeitige Registrierung der Ionen.

Abbildung 7.2

Matrix-assisted-Laser-Desorption-/Ionization-Time-of-Flight Mass Spectrometer (MALDI-TOF MS)



Die Aufgabe der Matrixmoleküle besteht darin, die Energie aufzunehmen und sie schnell, ohne dass thermische Zersetzungen auftreten, auf die Moleküle der Untersuchungssubstanz zu übertragen. Die Bestrahlung des Gemischs bestehend aus Matrixmolekülen und DNA-Fragmenten, führt unter Freisetzung von Energie zur Ionisierung der Moleküle (Photoionisation). Des Weiteren besitzt die Matrix der MALDI-Technik photolytische Schutzfunktion für Analyten und unterdrückte Molekülinteraktionen (zur Verfügung gestellt von Frau Dr. rer. nat. E. Schäffeler; Dr. Margarete Fischer-Bosch-Institut für Klinische Pharmakologie (IKP) am Robert-Bosch- Krankenhaus (RBK), Stuttgart).

3.6 Statistische Analyse

Die Ermittlung des Probenumfangs wurde mittels des nQuery Advisor Release-Programms 4.0 ausgeführt. Dabei wurden die CYP2C19*2-Allele bei gesunden Europäern mit einer Häufigkeit von 15% beschrieben (Geisler et al., 2008 a). Daraus ergab sich, dass 28% dieser Personen das CYP2C19*2-Allel tragen. Die Anzahl von 180 Patienten reicht aus, um eine signifikante Differenz von ungefähr 15% in der Häufigkeitsverteilung der CYP2C19*2-Allele bei Patienten mit einer residualen Plättchenaggregation (RPA), höher oder niedriger als 47%, nachzuweisen. Dafür wurde eine statistische Grundlage von 86%igem und 5%igem Alpha-Level angenommen. Alle Werte wurden als Haupt- und Standardabweichung präsentiert. Um Genotypen mit großem Reaktionsvermögen auf Clopidogrel zu identifizieren, wurden Analysen durchgeführt.

Frühere Studien untersuchten den Einfluss nicht-genetischer Risikofaktoren auf die Entstehung der residualen Plättchenaggregation nach koronarer Stent-implantation. Unter der residualen Plättchenaggregation wird die thrombozytäre Restaggregation verstanden, mit welcher die Variabilität in der Wirkung antithrombotischer Therapie erfasst werden kann (Geisler et al., 2008 b). Alle Werte der RPA wurden in drei Tertiale klassifiziert. Es wurden chi-square-Analysen oder der Fisher-Test verwendet (Geisler et al., 2008 a). Diese erlauben einen Gruppenvergleich von kategorisch eingeteilten Variablen. Das logistische Regressionsmodell mit der kategorischen Einteilung der residualen Thrombozytenaggregation als abhängige Variable wurde mit der statistischen Software R, Version 2.4.1. (The R Project for Statistical Computing) berechnet. Die Odds Ratio (OR) wurde mit einem 95%igen Konfidenzintervall und zweiseitigen P-Werten angegeben. Die statistische Signifikanz wurde als $p < 0,05$ definiert. Die Odds Ratio gibt als statistische Maßzahl ein Quotenverhältnis wieder, das eine Aussage über den Zusammenhang zwischen zwei Merkmalen ermöglicht. Allel- und Genotyp-Frequenzen innerhalb der Populationen wurden mittels Hardy-Weinberg-Gleichgewichtsberechnungen (<http://ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>) verglichen.

4. Ergebnisse

4.1 Thrombozytenaggregationswerte unter Clopidogrel-Behandlung

237 Patienten mit entweder einem akuten Koronarsyndrom und anschließender Stentimplantation oder bekannter stabiler koronarer Herzkrankheit werden mit Clopidogrel behandelt. Diesen Patienten wird im Anschluß an die Behandlung Blut abgenommen und die Thrombozytenaggregation mittels Aggregometer gemessen. Es zeigen sich bei den Patienten Aggregationswerte von $10 \pm 7\%$ bis $55 \pm 6\%$ mit einer durchschnittlichen residualen Plättchenaggregation von $32 \pm 19\%$. Die Patienten werden nach niedrigen (0-25%, Tertial 1), mittleren (26-47%, Tertial 2) und hohen (48-70%, Tertial 3) Aggregationswerten gruppiert. Sie werden entsprechend dem gängigen Sprachgebrauch als „Responder“ („high und intermediate“, Tertiale 1 und 2) und „poor-Responder“ (Tertial 3) bezeichnet. Unter den insgesamt 237 Patienten befinden sich 175 „Responder“ und 62 „poor-Responder“ (Tab. 4).

Tabelle 4

Ergebnisse der Thrombozytenaggregationsuntersuchungen

| | Anzahl Patienten (n = 237) |
|---------------------------------------|-------------------------------|
| High Responder (Tertial 1) | n = 86 |
| Intermediate Responder (Tertial 2) | n = 89 |
| Poor Responder (Tertial 3) | n = 62 |

(vergl. Abbildung 6, S. 36)

Zur detaillierten Charakterisierung der Probanden werden diese nach Altersgruppen und Geschlecht geordnet. Zudem erfolgt die Zuordnung nach folgenden, in vorausgehenden ermittelten Kriterien, wobei Probanden mit einer bekannten Plättchenfunktionsstörung oder mit einer GPIIb-IIIa-Inhibitor-Behandlung, eine Woche vor Beginn der Untersuchung, ausgeschlossen werden:

1. Die Patienten leiden an einer koronaren Herzkrankheit, z.B. stabile Angina pectoris oder akutes Koronarsyndrom.
2. Den Patienten wird eine Startdosis von 600mg Clopidogrel vor der perkutanen Koronarintervention (PCI) verabreicht mit einer folgenden täglichen Dosis von 75mg.
3. Alle Patienten erhalten vor der PCI, 500mg Acetylsalicylsäure i.v., gefolgt von einer täglichen Dosis von 100mg Acetylsalicylsäure, außer bei Vorliegen von Kontraindikationen, wie vorausgehender gastrointestinaler Blutungen oder allergischer Reaktionen.
4. Allen Patienten wird vor der Untersuchung unfraktioniertes Heparin (70 Units/kg KG) verabreicht.

Die Aufgliederung zeigt ein Probandenalter zwischen 66 ± 8 und 69 ± 8 Jahren. Die Gruppenzugehörigkeit zu „Respondern“ und „poor-Respondern“ erweist sich als altersunabhängig. Ebenso lassen sich keine Geschlechtsunterschiede in der Gruppenzugehörigkeit erkennen. Von insgesamt 181 untersuchten Männern und 56 untersuchten Frauen verteilen sich Männer wie Frauen zu gleichen Anteilen auf die „Responder“ und „poor-Responder“ (Tab. 5).

Tabelle 5

Vorgenommene Einteilung der Patienten in Tertiale 1 bis 3, nach individueller residueller Plättchenaktivität

| Variablen | Tertial 1, 2 Niedrige RPA („Responder“) (n = 175) | Tertial 3 Hohe RPA („poor-Responder“) (n = 62) | Total (n = 237) |
|---|--|---|--------------------|
| Residuale Plättchenaktivität (%)* | 26 (27,0) | 54 (9,0) | 34 (33,8) |
| Alter (Jahre)* | 69 (13,0) | 69 (11,3) | 69 (13,0) |
| Geschlecht (%) | | | |
| Männlich | 136 (77,7) | 45 (72,6) | 181 (76,4) |
| Weiblich | 39 (22,3) | 17 (27,4) | 56 (23,6) |
| Akutes Koronarsyndrom (%) | 76 (43,4) | 30 (48,4) | 106 (44,7) |
| STEMI | 21 (12,0) | 9 (14,5) | 30 (12,7) |
| NSTEMI | 40 (22,9) | 14 (22,6) | 54 (22,8) |
| Linksventrikuläre Funktion (%) | | | |
| 45- 55% | 45 (25,7) | 17 (27,9) | 62 (26,3) |
| 35- 45% | 14 (8,0) | 12 (19,7) | 26 (11,0) |
| < 35% | 23 (13,1) | 9 (14,8) | 32 (13,6) |
| Diabetes mellitus (%) | 56 (32,0) | 26 (41,9) | 82 (34,6) |
| Hypertension (%) | 147 (84,0) | 55 (88,7) | 202 (85,2) |
| Nierenfunktion (%) (Serum- Kreatinin > 1,5 mg/dl) | 20 (11,5) | 14 (22,6) | 34 (14,4) |
| Rauchen (%) | 67 (38,3) | 22 (35,5) | 89 (37,6) |
| Hyperlipidämie (%) | 129 (73,7) | 46 (74,2) | 175 (73,8) |

*Mittelwert (Qartil-Intervalle);
STEMI: ST-Hebungsinfarkt;

NSTEMI: nicht-ST-Hebungsinfarkt;
RPA: residuale Plättchenaggregation

4.2 Einfluss von Risikofaktoren auf die Clopidogrel-Behandlung

Risikogruppen, die von uns in vorherigen Studien ermittelt worden waren, umfassten das akute Koronarsyndrom (ACS), die linksventrikuläre Funktion (LVF), Diabetes mellitus Typ II, die arterielle Hypertonie, Nierenfunktionsstörungen, Zigarettenrauchen und Hyperlipidämie (Tab. 5). Von diesen Risiken wird für alle 237 Patienten der PREDICT-score berechnet (s.u. Diagramm 2, S. 51). Der PREDICT-score und die Bestimmung der CYP2C19*2-Genotypen ermöglichen eine kombinierte Analyse von prognostischem Score und Genetik.

Bei der Auswertung zeigt sich ein akutes Koronarsyndrom bei 43,4% der „Responder“ gegenüber 48,4 % der „poor-Responder“. Dies erweist sich als signifikanter Unterschied zwischen beiden Patientengruppen. Unabhängig von der Gruppenzugehörigkeit ist der NSTEMI häufiger vertreten als der STEMI. Eine erhöhte residuale Plättchenaggregation ist somit als erhöhtes Risiko eines Herzinfarkts einzustufen.

Bei 106 (44,7%) der insgesamt 237 Patienten, die wegen eines akuten Koronarsyndroms behandelt wurden, liegt bei einem Drittel (34,6%) ein Diabetes mellitus Typ II vor. Von diesen erweisen sich 41,9% als „poor-Responder“ und 32,0% als „Responder“. Die weiteren Risikofaktoren, wie z.B. arterielle Hypertension und Nikotinabusus (Rauchen) zeigen keine wesentlichen Unterschiede zu den von uns ermittelten Werten (Tab. 5).

4.3 Polymorphismen und ihre Bedeutung für die anti-thrombotische Therapie mit Clopidogrel

„Responder“- und „poor-Responder“-Eigenschaften liegen genetische Ursachen zugrunde. In dieser Arbeit werden mittels MALDI-TOF MS (s.o.) fünf verschiedene Allele auf DNA-Ebene untersucht: CYP2C19*2, CYP2C19*3, CYP2C19*17, CYP3A4*1B und CYP3A5*3. Das EDTA-Blut der 237 Patienten sowie von 186 Kontrollpersonen wird auf den jeweiligen Genotyp der fünf CYP-Allele hin untersucht (Tab. 6). Es können vier der fünf getesteten Allele

nachgewiesen werden. Die Allele sind in der Patientengruppe und bei den Kontrollpersonen jeweils gleichmäßig verteilt. Von den drei CYP2C19-Allelen ist mit 25,5% am häufigsten das Allel *17 exprimiert. Demgegenüber ist das Allel *2 nur zu 15% nachzuweisen und das Allel *3 lässt sich bei keinem Patienten/ keiner Kontrollperson finden.

Tabelle 6

Frequenzhäufigkeit der CYP-Allele bei Probanden und gesunden Kontrollpersonen

| CYP-Allele | Frequenzhäufigkeit (%) | |
|-------------------|------------------------|-----------------------------|
| | Patienten [n= 237] | Kontrollpersonen [n=186] |
| CYP2C19*2 | 15,2* | 15,2° |
| CYP2C19*3 | 0 | 0 |
| CYP2C19*17 | 25,5 | 25,7 |
| CYP3A4*1B | 3,5 | 4,6 |
| CYP3A5*3 | 92,8 | 88,9 |

*CYP2C19-Genotyp: *1/*1, n = 175 (74%); *1/*2, n = 52 (22%); *2/*2, n = 10 (4%)

°CYP2C19-Genotyp: *1/*1, n = 135 (74%); *1/*2, n = 42 (23%); *2/*2, n = 7 (4%)

Im Folgenden werden die Genotypen mit der Fähigkeit zur residualen Plättchenaggregation korreliert (Tab. 7). Am Beispiel des CYP2C19-Genotyps wird aufgezeigt, wie der Wildtyp (*1/*1) und der heterogene Typ (*1/*2) mit den „Respondern“ und der homozygote Genotyp (*2/*2) mit den „poor-Respondern“ assoziiert sind. Das Vorkommen des Wildtyps beläuft sich auf insgesamt 74%. Der heterozygote Typ kommt mit einem prozentualen Anteil von 22-23% und der homozygote Genotyp mit 4% vor. „Responder“ und „poor-Responder“ sind sowohl bei den Patienten als auch bei der Kontrollgruppe zu gleichen Teilen vertreten. Die Abgleichung der CYP2C19*2-Varianten mit den Thrombozytenaggregationseigenschaften der Träger zeigt, dass der Wildtyp mit einer signifi-

Tabelle 7

Genotypisierung und residuale Plättchenaggregation (RPA Cut-Off-Wert 47%)

| CYP Polymorphismen | Patienten | | | Statistiken | niedrige vs. hohe RPA | |
|--------------------------------|-------------|-------------|--------------|------------------------------|-----------------------------------|----------|
| | Genotyp | Low RPA (%) | High RPA (%) | | χ^2 oder Odds Ratio (95% KI) | p - Wert |
| CYP2C19*2 (n = 237) | *1/*1 (74%) | 144 (82,3) | 31 (50) | *1/*1 vs. *1/*2 + *2/*2 | 4,6 (2,5–8,7) | <0,0001 |
| | *1/*2 (22%) | 28 (16) | 24 (38,7) | *1/*1 vs. *1/*2 vs. *2/*2 | 27,17 | <0,001 |
| | *2/*2 (4%) | 3 (1,7) | 7 (11,3) | – | – | – |
| CYP2C19*17 (n = 237) | *1/*1 (58%) | 96 (54,9) | 41 (66,1) | *1/*1 vs. *1/*17 + *17/*17 | 0,62 (0,34–1,14) | 0,14 |
| | *1/*17(33%) | 65 (37,1) | 14 (22,6) | *1/*1 vs. *1/*17 vs. *17/*17 | 4,48 | 0,11 |
| | *17/*17(9%) | 14 (8,0) | 7 (11,3) | – | – | – |
| CYP3A4*1B (n = 234) | *1/*1 (94%) | 162 (94,2) | 57 (91,9) | *1/*1 vs. *1/*1B + *1B/*1B | 1,42 (0,46–4,33) | 0,14 |
| | *1/*1B (6%) | 10 (5,8) | 4 (6,5) | *1/*1 vs. *1/*1B vs. *1B/*1B | 2,83 | 0,11 |
| | *1B/*1B(0%) | 0 (0) | 1 (1,6) | – | – | – |
| CYP3A5*3 (n = 235) | *3/*3 (86%) | 149 (86,1) | 53 (85,5) | *3/*3 vs. *1/*3 + *1/*1 | 1,05 (0,46–2,41) | 1,00 |
| | *1/*3 (18%) | 24 (13,9) | 8 (12,9) | *3/*3 vs. *1/*3 vs. *1/*1 | 2,82 | 0,24 |
| | *1/*1 (0%) | 0 (0) | 1 (1,6) | – | – | – |

KI: Konfidenzintervall; RPA: Residuale Plättchenaggregation; Odds Ratio < 2,5% nicht signifikant

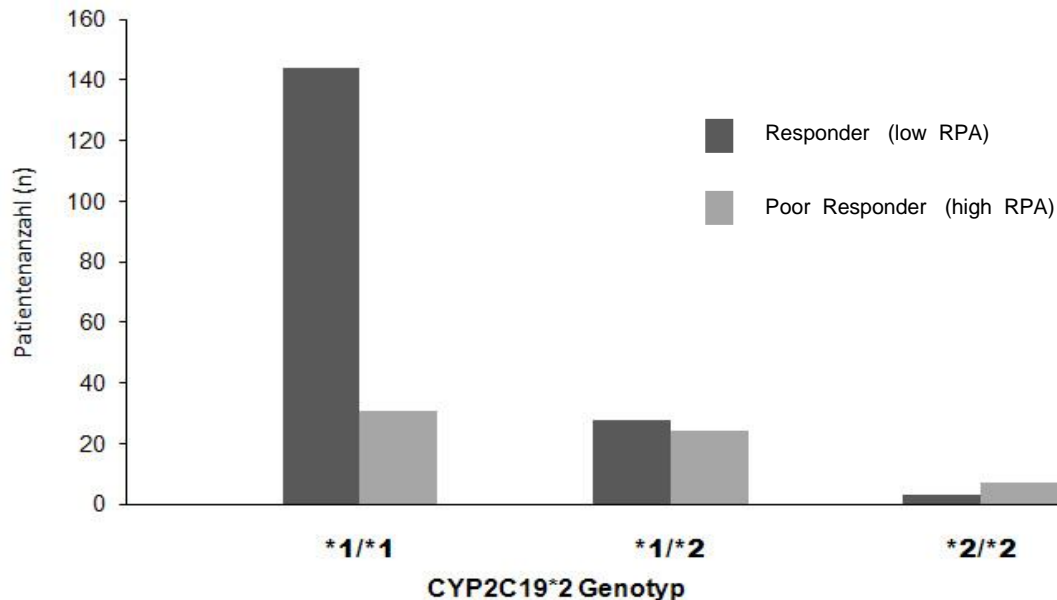
kant höheren Thrombozytenaggregation als der heterozygote- und der homozygote Genotyp einhergeht. Der homozygote Typ (*2/*2) weist eine noch höhere RPA als der heterozygote Genotyp (*1/*2) auf. Die hohe RPA des homozygoten Trägers (*2/*2) weist auf ein geringeres Ansprechen von Clopidogrel hin. Dieser Befund spiegelt sich in der „Odds Ratio“ wieder. Ein niedriger Wert gibt geringe Aggregationsraten an, ein höherer Wert entsprechend erhöhte Raten (Tab.7). Für geringere Odds Ratio-Werte als 2,5 kann kein genauer Wert gegeben werden, da aus Signifikanzgründen mindestens 230 Probanden herangezogen werden müssten.

Alle anderen Polymorphismen (CYP19*17, CYP3A4*1B und CYP3A5*3) zeigen dagegen keinen Einfluss auf die residuale Plättchenaggregation und befinden sich, mit Ausnahme des CYP2C19*2-Polymorphismus, im Hardy-Weinberg Gleichgewicht. Der CYP2C19*3 -Polymorphismus tritt aufgrund seiner seltenen Prävalenz im untersuchten Kollektiv nicht auf.

Der genetische Hintergrund für eine Behandlung mit Clopidogrel wird gesondert am Beispiel des CYP2C19*2 Allels dargestellt (Diagramm 1). Patienten des CYP2C19*2-Genotyps werden in drei RPA-Tertiale unterteilt, in die Gruppen 1 und 2 (homozygote und heterozygote „Responder“) und in die Gruppe 3 (homozygote „poor-Responder“), mit jeweils sehr stark differierender residueller Plättchenaggregation (chi-square 27; $p < 0,0001$). Durch die Gegenüberstellung des homo- und heterozygoten CYP2C19*2-Genotyps und des Wildtyps (CYP2C19*1/*1 vs. CYP2C19*1/*2 plus *2/*2; chi-square 25,9, $p < 0,001$) werden die in Tabelle 7 gegebenen Daten verdeutlicht. Träger mit mindestens einem *2-Allel weisen bereits ein um die Odds Ratio 4,38 erhöhtes Risiko ($p < 0,0001$, 95% KI) der residualen Plättchenaggregation (>47%) auf. Trägern von mindestens einem CYP2C19*2-Allel wird eine höheren RPA (> 47%) entsprechend dem „poor-Responder“ zugeordnet.

Diagramm 1

Genotyp-Verteilung des CYP2C19*2-Polymorphismus in Patienten mit hoher und niedriger residualer Plättchenaggregation nach Gabe einer Initialdosis von 600mg Clopidogrel



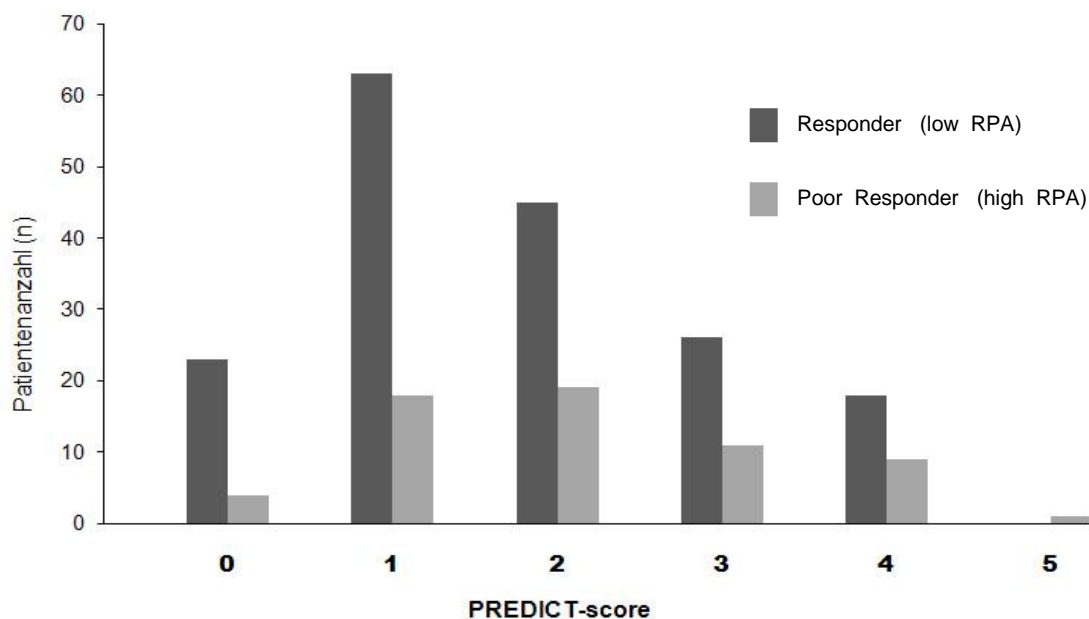
RPA: Residuale Plättchenaggregation

In einer vorhergehenden Studie war ein sogenannter PREDICT-score (Residual Platelet Reactivity of Intracoronary Stent) definiert worden, der ausschließlich fünf nicht-genetische Risikofaktoren berücksichtigt (Geisler et al., 2008 a): Alter > 65 Jahre, akutes Koronarsyndrom, Diabetes mellitus Typ II, eingeschränkte linksventrikuläre Funktion und Nierenfunktionsstörung. Jeder dieser Risikofaktoren wird, abhängig vom Signifikanzniveau, mit einem Gewichtungsfaktor zwischen eins und drei bewertet (Alter und akutes Koronarsyndrom: Faktor 1; Diabetes mellitus und Nierenfunktion: Faktor 2; linksventrikuläre Dysfunktion: Faktor 3). Beispielhaft werden Probanden aus einer von unserer Gruppe vorgenommenen Kohortenstudie nach ihrem individuellen PREDICT-score und ihrer Ansprechbarkeit als „Responder“ oder „poor Responder“ zusammengestellt (Diagramm 2). Im Diagramm wird gezeigt, dass das Risiko einer erhöhten Thrombozytenrestaktivität mit steigendem

Score-Niveau zunimmt und das die Aggregationswerte in den „Responder“-Tertialen 1 und 2 deutlich geringer ausfallen als im „poor-Responder“-Tertial 3.

Diagramm 2

Verteilung der Patienten nach ihrem individuellen PREDICT-score und Zuordnung zu „Respondern“ oder „poor-Respondern“

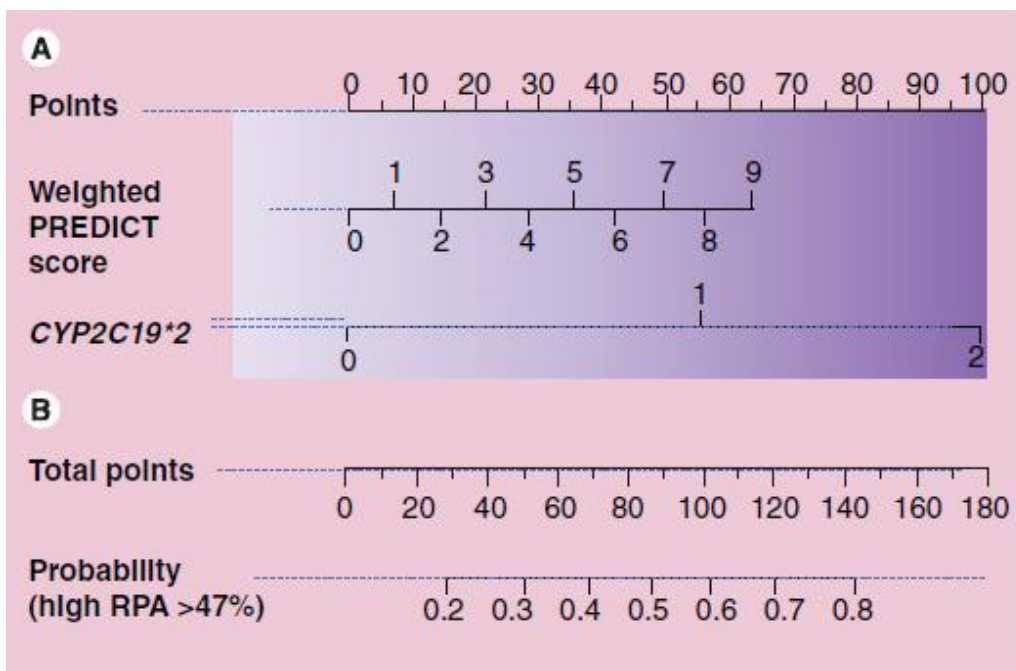


Die dargestellte PREDICT-score-Verteilung bildet die Grundlage zur Entwicklung eines „risk-score“ Modells (Nomogramm), das neben den nicht-genetischen Faktoren auch genetische Faktoren berücksichtigt (Diagramm 3). Für die Einbeziehung des CYP2C19*2-Genotyps in die Risikobewertung entwickelten wir zusätzlich einen Risikoscore. Aus dem „risk-score“ unter Berücksichtigung genetischer- und nicht-genetischer Faktoren ergibt sich eine nochmals verstärkte Plättchenaggregation. Das Risiko, eine verstärkte residuale Plättchenaggregation hervorzurufen, steigt mit der Anzahl der CYP2C19*2-Allele an (ein Allel: Odds Ratio 3,71); zwei Allele: Odds Ratio 10,72). Basierend auf diesem logistischen Regressionsmodell wird ein proportionales Odds-Modell erstellt, um die Wahrscheinlichkeit des Auftretens der residualen Plättchenaggregation nur im 3. Tertial bei gegebenem PREDICT-score und CYP2C19*2 aufzuzeigen (Geisler et al., 2008 c). Zuerst werden alle Punkte dem PREDICT-score zugeordnet, um anschließend den CYP2C19*2-Genotyp hinzuzuaddieren. Die durch eine verbindene Gerade

aufgezeigte Summe wird in einer Punkteskala dargestellt und die Wahrscheinlichkeit der RPA von der Skala „Propability“ abgelesen. Die RPA muss < 47% sein, um von einer befriedigenden Clopidogrel-Wirkung sprechen zu können. Das Nomogramm zeigt, dass sowohl genetische als auch nicht-genetische Faktoren für eine verminderte Wirksamkeit einer Clopidogrel-Anfangsdosis mit 600mg verantwortlich sind (Diagramm 3).

Diagramm 3

Nomogramm zur individuellen Risikokalkulation einer hohen residualen Plättchenaggregation unter Erhalt einer Initialdosis von 600mg Clopidogrel



Das Nomogramm kalkuliert die Wahrscheinlichkeit des Auftretens einer hohen RPA (>47%) unter Einbeziehung von nicht-genetischen Faktoren (gewichteter PREDICT-score) und CYP2C19*2-Genotypen (0: CYP2C19-Wildtyp, 1: CYP2C19 *1/*2, 2: CYP2C19*2/*2). (A): Den Parametern der Skalen „CYP2C19*2“ und „weighted PREDICT-score“ ist eine Zahl der oberen Skala „Points“ zugeordnet. (B): Die Zahl der Punkte wird in die Skala „Total points“ übertragen. Auf der Skala „Probability“ wird die erwartete Wahrscheinlichkeit der RPA abgelesen (Geisler et al. 2008 c).

RPA: Residuale Plättchenaggregation

Diskussion

5.1 Genetische Befunde

In unserer Studie wird der CYP2C19-Polymorphismus bei Patienten mit einer symptomatischen koronaren Herzkrankheit und folgender Intervention mit Stentimplantation untersucht. Dabei spielt das Vorhandensein von Allelen und die dadurch veränderte Enzymfunktion eine große Rolle. Zudem zeigen wir, dass fünf nicht-genetische Variablen (PREDICT-score: Alter > 65 Jahre, Diabetes mellitus Typ II, abnehmende linksventrikuläre Funktion, Niereninsuffizienz, akutes Koronarsyndrom) die Empfindlichkeit der Patienten für eine hohe residuale Plättchenaggregation (RPA) erhöhen. Durch multivariable logistische Regressionsanalysen und Kombination von nicht-genetischen Faktoren (PREDICT-score) mit dem CYP2C19*2-Genotyp ($\chi^2 = 25,85$; $p < 0,0001$) lässt sich eine hohe Vorhersagewahrscheinlichkeit der residualen Plättchenaggregation erreichen. Die Daten verdeutlichen, dass die reduzierte Wirkung von Clopidogrel sowohl auf genetische als auch auf nicht-genetische (physiologisch und pathophysiologisch) Faktoren zurückgeht.

Bei allen CYP2C19*2-Allel-Trägern zeigt sich nach einer verabreichten Initialdosis von Clopidogrel ein deutlich erhöhtes Risiko für eine verminderte Wirkung. Träger mit mindestens einem CYP2C19*2-Allel (heterozygote Träger) haben demnach ein vierfach erhöhtes Risiko ($p < 0,0001$), eine hohe residuale Plättchenaggregation (RPA) zu entwickeln. Das Risiko einer hohen RPA steigt mit Anzahl zweier CYP2C19*2-Allele (homozygote Träger) an, wobei die Odds Ratio bei nur einem *2-Allel 3,71, bei zwei *2-Allelen 10,72 beträgt. Dies bedeutet, dass die Wirkung von Clopidogrel auf die ADP-vermittelte Plättchenaggregation einem Gen-Dosis-Effekt unterliegt. Einschränkend sei jedoch erwähnt, dass sich durch bisherige Modelle nur 10-15% der Variabilität der Thrombozytenfunktion durch CYP2C19-Polymorphismus und nicht-genetische Analysen erklären ließen (Hochholzer et al., 2010).

Eine besondere Bedeutung kommt somit der Variabilität zu, der zufolge Clopidogrel bei Patienten mit gleicher Symptomatik unterschiedliche Wirkungen zeigt. Entsprechende Untersuchungen von Hulot et al. (2006) zum Enzym CYP2C19 zeigen eine Reihe weiterer polymorpher Enzymvarianten auf, die zu einer veränderten Clopidogrel-Antwort und damit zu unterschiedlicher Plättchenaktivität bei gesunden Probanden führen. Hulot und Koautoren zufolge spielt bei der Reduktion der Clopidogrel-Wirkung das in der Leber wirksame *2-Allel des CYP2C19-Enzyms eine wichtige Rolle.

Unterstützt werden unsere Ergebnisse von Collet und Koautoren (2009), die die Wirkung des *2-Polymorphismus auf die Langzeit-Prognose von Patienten (< 45 Jahre) mit andauernder Clopidogrel-Therapie, überprüften. Sie verglichen heterozygote (*1/*2) und homozygote (*2/*2) Allel-Träger mit dem Wildtyp und stellten bei den Allel-Trägern vermehrt kardiovaskuläre Ereignisse fest. Auch Giusti et al. (2007) zufolge besteht ein signifikanter Zusammenhang zwischen einer verminderten Clopidogrel-Antwort und dem Vorhandensein eines *2-Polymorphismus im CYP2C19-Enzym, was sich durch eine verminderte residuale Plättchenaggregation (RPA) manifestiert.

Nur das CYP2C19*2-Allel inhibiert die CYP2C19-Enzymaktivität, wohingegen das Allel-CYP2C19*1, welches dem CYP2C19-Wildtyp entspricht, keinen Einfluss auf die Enzymaktivität ausübt (Desta et al., 2002). Ursächlich liegt diesem Mechanismus ein verkürztes Protein zu Grunde, welches durch die *2-Allelvariante kodiert wird und nicht fähig ist, an den Häm-Rest des CYP2C19 zu binden (Desta et al., 2002), woraus eine verminderte Enzymaktivität resultiert.

In einer von Fontana et al. (2007) durchgeführten „Kohortenstudie“ mit 94 Probanden („Caucasian medical students“), denen eine Initialdosis von 300mg Clopidogrel und anschließend eine Woche lang eine Erhaltungsdosis von 75mg Clopidogrel pro Tag verabreicht wurde, zeigen sich bei Trägern der Wildtyp-Variante (CYP2C19*1) eine deutliche Abnahme der ADP-induzierten Plättchenaggregation ($p = 0,001$). Im Vergleich zeigen Träger mit der *2-

Variante eine verminderte Enzymaktivität des CYP2C19 und damit einen verminderten Einfluss auf die ADP-induzierte Plättchenaggregation. Fontana und Koautoren folgern, dass die Träger des CYP2C19*2-Allels dem Risiko einer verminderten Clopidogrel-Wirkung unterliegen.

Für das CYP2C19*17-Allel wurde im Gegensatz zu dem CYP2C19*2-Allel eine vermeintliche Zunahme der Enzymaktivität des CYP2C19 beschrieben (Santoso et al., 1999; Schroth et al., 2007), da es zu einer Abnahme der residualen Plättchenaggregation kam. Damit erscheint die Wirkung des *17-Allels auf die CYP2C19-Aktivität der Wirkung des *2-Allels entgegengesetzt zu sein. Der CYP2C19*17-Polymorphismus wird auch mit einer Zunahme der klinischen Effektivität in Zusammenhang gebracht. So stellen Sibbing und Koautoren (2010) fest, dass dieser Polymorphismus die Wirkung von Clopidogrel steigert und damit gleichzeitig das Blutungsrisiko erhöht. Sowohl bei homozygoten als auch bei heterozygoten Allelträgern finden sich in den Untersuchungen signifikant verminderte ADP-induzierte Werte für die Höhe der Plättchenaggregation.

In Übereinstimmung mit den genannten Autoren sollte somit für die uneinheitliche Wirkung des Plättchenaggregationshemmers Clopidogrel der Polymorphismus des Enzyms CYP2C19 verantwortlich sein und damit erhebliche Bedeutung für die Therapie thrombotischer Ereignisse besitzen. Diese Befunde werden durch eine Reihe weiterer, exemplarisch in der zusammenfassenden Tabelle 8 aufgeführten Studien zu den Enzymvarianten, untermauert.

Tabelle 8 Isoenzyme mit Einfluss auf die Metabolisierung von Clopidogrel und die Frequenz polymorphistischer Varianten (aus Platelet Pharmacogenetics and Pharmacogenomics, Geisler T. and Gawaz M., © 2008 Georg Thieme-Verlag KG)

| CYP-Isoenzyme | Genetische Varianten | Einzel-Nukleotid-Polymorphismus | Allelfrequenz und Referenz | Referenz zur Diskussion über die Clopidogrel-Antwort |
|----------------|----------------------|---------------------------------|---|--|
| CYP2C19 | | 681 G > A | 13-20% Kaukasier, 25% afrikanisch abstammende Amerikaner, 23-39% Asiaten 38-79% pazifische Inselpopulation (Blaisdell J et al., 2002, Goldstein JA et al., 1997) | (Brandt et al., 2007; Frere et al., 2008; Geisler et al., 2008 c; Giusti et al., 2007; Trenk et al., 2008) |
| | CYP2C19*3 | 636 G > A | 6-10% Asiaten (Blaisdell J et al., 2002, Goldstein JA et al., 1997) ~ 5% Europäer (Halling J et al., 2005) | (Chen et al., 2008) |
| | CYP2C19*17 | - 806 C > T - 3402 C > T | 18% Europäer, Afrikaner (Sim SC et al., 2006), 1-2% Chinesen, Japaner (Sugimoto K et al., 2008) | *2 Haplotyp: sehr schnelle Metabolisierer, mögl. Ursache für akzellerierte Thienopyridin-Metabolisierung |
| CYP3A4 | CYP3A4*1B | - 392 A > G | ~ 4% Europäer (Fontana P et al., 2003, Schirmer M et al., 2006) ~ 80% Afrikaner (Garsa AA et al., 2005) | (Angiolillo et al., 2006) (Beitelshees et al., 2006) |
| | CYP3A4*1G | IVS10 + 12G > A | 20-30% Chinesen (Gao Y et al., 2008) | (Angiolillo et al., 2006) |
| | CYP3A4*20 | 1461 – 1462insA; Frameshift | < 1% weiße Personen (Westlind-Johnsson A et al., 2006) | (Beitelshees et al., 2006) |
| CYP3A5 | CYP3A5*3 | 22893 A > G | 90- 95% Kaukasier, ~ 70% Asiaten 27% afrikanisch abstammende Amerikaner (Hustert E et al., 2001) | (Suh et al., 2006) |

5.2 Prädisponierende Erkrankungen

Eine 2009 veröffentlichte Studie beschäftigte sich mit den für CYP450 kodierenden Genvarianten und ihrem Zusammenhang mit dem Auftreten aktiver Clopidogrel-Metabolite im Plasma, sowie der Clopidogrel-induzierten Plättchenhemmung (Mega et al., 2009). An dieser Studie nahmen 162 gesunde Personen teil. Schwerpunktmäßig wurde untersucht, ob es hinsichtlich der klinischen Prognose eine Verbindung zwischen den Genvarianten dieses Personenkollektivs und den Genvarianten einer aus 1477 kranken Personen bestehenden Kohortenstudie gibt. Die Patienten der so genannten TRITON-TIMI 38 Kohortenstudie waren aufgrund eines akuten Koronarsyndroms (ACS) mit Clopidogrel behandelt worden. Die Ergebnisse der Studie zeigen, dass, entsprechend unseren Ergebnissen, dem Einfluss der CYP2C19-Allele eine besondere Bedeutung bezüglich des Wirkpotentials von Clopidogrel zukommt. Es sei erwähnt, dass es sich bei den CYP-Allelen zu 95% um das *2-Allel handelt. So findet sich unter den gesunden Probanden bei Trägern mindestens eines funktionslosen CYP2C19-Allels eine relative Reduktion der im Plasma vorliegenden aktiven Clopidogrel-Metabolite von 32,4%. Ebenso führt das Vorkommen der CYP2C19-Allele zu einer absoluten Reduktion der plättchenhemmenden Wirkung von Clopidogrel unter den Allel-Trägern (Mega et al., 2009).

Die Probanden der Kohortenstudie (TRITON-TIMI 38-Studie) erfuhren als Träger von CYP2C19-Allelen eine Zunahme des relativen Risikos um 53%. Es kam zu kardiovaskulär bedingtem Tod, zum Myokardinfarkt oder zum Schlaganfall. Ebenso war bei CYP2C19-Allel-Trägern der Risikoanstieg einer Stentthrombose dreifach erhöht. Kritisch gesehen wird jedoch die geringe Zahl an Probanden und eine unzureichende Datenerfassung nach Blutungen als eine der Nebenwirkungen von Clopidogrel (Freedman und Hylek, 2009). Sowohl bei gesunden Personen als auch bei Personen mit akutem Koronarsyndrom, erhöhte sich nach Verlust von mindestens einem der CYP2C19-Allele das Risiko kardiovaskulärer Ereignisse gegenüber Trägern des Wildtyps (Mega et al., 2009). Nach Freedman und Hylek (2009) bleibt

unverständlich, dass, ungeachtet der blutungsfördernden Nebenwirkung von Clopidogrel, bei Patienten ohne CYP-Varianten keine Zunahme des Blutungsrisikos beobachtet wird.

Mit dem Einfluss genetischer Determinanten auf die Clopidogrel-Antwort und auf kardiovaskuläre Ereignisse befassten sich ebenfalls Simon et al. (2009). In ihrer Studie stellen sie ein Patientenkollektiv mit akutem Koronarsyndrom (ACS) und anschließender Clopidogrel-Behandlung vor. Ihren Befunden zufolge wird die, über das ABCB1-Gen gesteuerte, Clopidogrel-Absorption mit steigender Anzahl der im Gen enthaltenen Allele vermindert, so dass damit das Risiko kardiovaskulärer Ereignisse ansteigt. Das Wildtyp-Gen ist dagegen mit einem nur geringen Risiko behaftet. Man findet eine erhöhte Rate an Todesfällen, nicht-letalen Schlaganfällen und Myokardinfarkten. Ebenso zeigt sich, dass bei Patienten mit zwei funktionslosen CYP2C19-Allelen, die sich während des Krankenhausaufenthalts einer perkutanen Koronarintervention (PCI) unterzogen hatten, ein etwa 3½-mal höheres Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse auftrat.

Freedman und Hylek (2009) bewerten die TRITON-TIMI 38-Studie und die von Simon et al. (2009) durchgeführte Studie als bedeutend, da sie entscheidende Fragen der Clopidogrel-Behandlung ansprechen: kann der durch die Gen-Varianten hervorgerufene Wirkungsverlust von Clopidogrel möglicherweise durch eine erhöhte Dosis kompensiert oder sogar umgangen werden oder ist bei Patienten mit funktionslosen CYP-Varianten eine bessere plättchenhemmende Wirkung durch einen anderen Thrombozyteninhibitor, z.B. Prasugrel, zu erwarten?

Das für die Metabolisierung von Clopidogrel zuständig Cytochrom P450-Enzymsystem besteht aus zahlreichen Enzym-Isoformen (CYP-Isoenzyme, z.B. die CYP3A4- und CYP3A5-Subfamilie). Diese sind an der Verstoffwechslung sehr vieler Medikamente beteiligt und könnten, ebenso wie das CYP2C19-Enzym, die plättchenhemmende Wirkung von Clopidogrel durch das

Vorhandensein von Polymorphismen beeinflussen. Im Gegensatz zum CYP3A5 (CYP3A5*3) werden innerhalb einer Bevölkerung vertretene Allelvarianten für CYP3A4 in nur geringer Frequenz beschrieben (Schirmer et al., 2006). Die CYP3A4-Funktion scheint demnach keine bedeutende klinische Relevanz zu besitzen.

Lediglich die CYP3A4*1B-Variante lässt nach Wandel et al. (2000) eine veränderte CYP3A4-Proteinfunktion erkennen. Deren Einfluss auf die residuale Plättchenaggregation lässt sich in unserer Patientenpopulation jedoch nicht beweisen. Des Weiteren weist der CYP3A4*1G-Polymorphismus, der im Intron des CYP3A4-Gens (IVS+12G>A, CYP3A4*1G) gefunden wird, bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit und sofortiger Clopidogrel-Behandlung eine signifikant reduzierte Glykoproteinrezeptor (GP) IIb-IIIa-Aktivität auf. Aber auch hier wird die plättchenhemmende Wirkung unter Gabe von Clopidogrel nicht wesentlich beeinträchtigt (Angiolillo et al., 2006). Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen fanden weder Fontana et al. (2007) bei gesunden Personen, noch Brandt und Koautoren (2007) bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom und folgender Koronarintervention (PCI) nach Verabreichung von Clopidogrel einen Zusammenhang zwischen dem CYP3A4*1G-Genotyp und einer ADP-vermittelten Aggregation.

Der im CYP3A-Gen gegenwärtig am besten untersuchte Polymorphismus ist die CYP3A5*3-Variante. Diese führt zu einem veränderten mRNA-Splicing-Vorgang, der mit Bildung eines verfrühten Endcodon und anschließender Nonsense-Bildung der mRNA einhergeht (Kuehl et al., 2001). Der CYP3A5-Polymorphismus unterscheidet sich in einem expressorischen Wildtyp (*1) und nicht-expressorischen Allelen (*3). In einer Studie von Suh et al. (2006) wurde Probanden mit einem CYP3A5 exprimierenden Genotyp sowohl Clopidogrel als auch der CYP3A4-Inhibitor Itraconazol verabreicht, ohne dass eine Plättchenaggregation beobachtet werden konnte. Im Falle des CYP3A5*3-Polymorphismus kam es dagegen zur Plättchenaggregation. Dies zeigt, dass die Expression eines vorhandenen Polymorphismus die Metabolisierung von

Clopidogrel entscheidend beeinflusst, dies aber vor allem abhängig von Enzyminhibitoren ist. Dementsprechend berichteten Suh et al. (2006) bei Patienten des CYP3A5*3-Genotyps über zunehmende atherothrombotische Ereignisse in einem Zeitraum von sechs Monaten. Homozygote CYP3A5*3-Träger, die am häufigsten unter Europäern vertreten sind, zeigen eine 30-fach geringere Konzentration des CYP3A5-Enzyms als Personen, die mindestens ein CYP3A5*1-Wildtyp-Allel tragen (Hustert et al., 2001; Kuehl et al., 2001). Vermindertes CYP3A5 jedoch kann zu einer deutlichen Wirkstoffveränderung führen.

In Hinblick auf den erforschten CYP3A5*3-Polymorphismus sind lediglich drei Studien bekannt, die CYP3A5 auf die ADP-induzierte Aggregation bei gesunden freiwilligen Personen (Brandt et al., 2007) und bei Patienten untersuchen, die sich zuvor einer perkutanen Koronarintervention (PCI) unterzogen hatten (Smith et al., 2006). Eine Verbindung zwischen dem CYP3A5-Polymorphismus und dem plättchenhemmenden Effekt durch Clopidogrel können die Autoren nicht erkennen. Im Einklang mit unseren Ergebnissen ist die CYP3A5-Variante nicht geeignet, die Variabilität der Clopidogrel-Antwort zu erklären.

Die pharmakogenetische Zusammensetzung des CYP2C19-Enzyms beeinflusst nicht nur die Metabolisierung des Wirkstoffs Clopidogrel, sondern auch indirekt die Verstoffwechslung weiterer Medikamente, z.B. Statine, die durch dieses Enzym abgebaut werden. Zudem ist ein Einfluss auf die orale Clearance von Protonenpumpenhemmern (PPI) wie Omeprazol und Lansoprazol anzunehmen (Zhao et al., 2008). Unter oraler Clearance wird die Schnelligkeit der Aufnahme einer Substanz, in diesem Fall des PPI, in das Plasmavolumen verstanden. Damit deutet sich ein Zusammenhang zwischen der pharmakogenetischen Zusammensetzung des CYP2C19-Enzyms und den daraus resultierenden Wirkungen auf Protonenpumpenhemmer an. Personen, bei denen Mutationen in beiden Allelen des für CYP2C19 kodierenden Gens auftreten, können der Funktionslosigkeit des CYP2C19 (funktionslose CYP2C19-Allele) unterliegen (so genannte „poor-Metabolisierer“). Träger zweier funktionsloser CYP2C19*2-

Allele zeigten z.B. im Falle von PPI, eine Abnahme der oralen Clearance von ca. 85%. Dies bedeutet, dass funktionstüchtige CYP2C19*2-Allele die Aufnahme der PPI in das Plasmavolumen fördern, die Metabolisierung von Clopidogrel über den CYP450-Enzymkomplex jedoch hemmen. Ebenso zeigte sich, dass die gleichzeitige Gabe des Protonenpumpeninhibitors Omeprazol und Clopidogrels mit einer signifikant erhöhten P2Y₁₂-Rezeptor-Reaktivität einhergeht und zusätzlich zu einer schlechteren Clopidogrel-Wirkung als unter alleiniger Clopidogrel-Therapie führt (Furuta et al., 2001; Gilard et al., 2008). Diese Studien erhärten, dass Träger des CYP2C19-Wildtyps (*1/1*) bei Helicobacter-Infektion und Behandlung mit PPI eine geringere Heilungsrate erwarten können, als homozygote (*2/2*) bzw. heterozygote(*1/2*) Anlageträger (Furuta et al., 2004; Klotz U et al., 2004). Dieser bereits bekannte Hintergrund belegt die Notwendigkeit zur Beachtung von Sekundärfaktoren.

Interessanterweise variiert die Frequenz von CYP2C19-„poor-Metabolisierern“ in verschiedenen ethnischen Gruppen (Desta et al., 2002). Während bei europiden und negriden homozygote Träger zwischen 2 und 4 % vertreten sind, liegt die Frequenz in der asiatischen Bevölkerung bei ca. 14% und erreicht in Japan sogar Werte von 20%. Der CYP2C19*2-Polymorphismus wäre danach von besonderer Relevanz für die Metabolisierung von Clopidogrel in der asiatischen Bevölkerung.

Zusammenfassend bestätigt sich durch die vorgelegten Untersuchungen somit das Bild, dass im Falle von Clopidogrel seine Wirksamkeit sowohl von genetischen Modulatoren als auch von äußeren Faktoren wie Alter, Krankheitsstatus, Organfunktion, Komedikation etc. bestimmt wird. Somit wird die individuelle Reaktion auf eine bestimmte Substanz zum einen durch die Vererbung (Polymorphismen), zum anderen durch äußere Faktoren bestimmt. Nicht-genetische Faktoren spielen zusätzlich zum Vererbungsmodus eine wichtige Rolle- ein Beispiel dafür, dass multiple Faktoren gemeinsam die Effektivität eines Medikaments beeinflussen (Eichelbaum et al., 2006; Roden et al., 2006).

6. Zusammenfassung

Der Einfluss genetischer Polymorphismen auf das Ansprechen einer antithrombozytären Therapie und die klinische Prognose bei kardiovaskulären Risikofaktoren sind Gegenstand intensiver Forschung. Die CYP450-Isoenzyme CYP2C19 und CYP3A4/5 beeinflussen die Metabolisierung von Clopidogrel. Die Arbeit untersucht den Zusammenhang zwischen der Clopidogrel-Wirkung und der Expression des CYP450-Isoenzym bei Patienten ohne und mit symptomatischer koronarer Herzkrankheit. Die Ergebnisse werden mit nicht-genetischen Risikofaktoren (Alter, akutes oder stabiles Koronarsyndrom, Diabetes mellitus Typ II, eingeschränkte linksventrikuläre Funktion, Nierenfunktionsstörung) korreliert.

Die Genotypisierung für CYP2C19(*2, *3, *17)-, CYP3A4*1B- und CYP3A5*3-Polymorphismen erfolgte bei 237 Patienten nach akutem Koronarsyndrom oder bei bekannter stabiler koronarer Herzkrankheit und koronarer Intervention mit Clopidogrel. Sechs Stunden nach erstmaliger Clopidogrel-Applikation (600mg) wurde mittels Adenosindiphosphat (ADP) die Plättchenaggregation ermittelt. Im Ergebniss zeigten Träger des CYP2C19*2-Allels das vierfache Risiko erhöhter Plättchenaggregation. Dagegen waren die Polymorphismen CYP2C19*3, CYP2C19*17, CYP3A4*1B und CYP3A5*3 wirkungslos.

Nicht-genetische Risikofaktoren wurden anhand eines etablierten Risikomodells (PREDICT-score) untersucht. Die logistische Regressionsanalyse belegte eine verbesserte Vorhersagewahrscheinlichkeit der Plättchenaggregation wenn neben dem CYP2C19*2-Genotyp die nicht-genetischen Risikofaktoren einbezogen wurden. Das CYP2C19*2-Allel erwies sich somit als relevanter Faktor für die Wirksamkeit der Clopidogrel-Therapie bei interventionell behandelten Patienten mit symptomatischer koronarer Herzkrankheit. Zukünftig sollten kombinierte nicht-genetische und genetisch unterlegte Risikomodelle evaluiert werden, um Patienten frühzeitig einer individualisierten und verbesserten antithrombozytären Therapie zuzuführen.

7. Abbildungsverzeichnis

Abbildungen 1.1 und 1.2

Strukturformeln von Acetylsalicylsäure und Clopidogrel

Abbildung 2

Schematische Darstellung der Pharmakokinetik von Clopidogrel

Abbildung 3.1

Clopidogrel Wirkmechanismus über den P2Y₁/P2Y₁₂-Rezeptor am Thrombozyten mit nachfolgender Inhibition der Thrombozytenaggregation

Abbildung 3.2

ADP Wirkmechanismus über den P2Y₁/P2Y₁₂-Rezeptor am Thrombozyten in Abwesenheit von Clopidogrel mit nachfolgender Thrombozytenaggregation

Abbildung 4

Schaubild zu Mechanismen der Clopidogrel-Resistenz

Abbildung 5

Anteilige Isoenzyme am Cytochrom P450-Enzymsystem

Abbildung 6

Schematische Darstellung einer Aggregometerkurve nach Aktivierung mit ADP

Abbildung 7.1

Skizze eines Matrix-assisted-Laser-Desorption-/Ionization-Time-of-Flight Mass Spectrometer (MALDI-TOF MS)

Abbildung 7.2

Matrix-assisted-Laser-Desorption-/Ionization-Time-of-Flight Mass Spectrometer (MALDI-TOF MS)

8. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1

Pharmakokinetische Kenndaten von Clopidogrel

Tabelle 2

Häufigkeiten von Clopidogrel-Nebenwirkungen

Tabelle 3

Tabellarische Übersicht bisheriger Studien zu CYP2C19

Tabelle 4

Ergebnisse der Thrombozytenaggregationsuntersuchungen

Tabelle 5

Vorgenommene Einteilung der Patienten in Tertiale 1 bis 3, nach individueller residualer Plättchenaktivität

Tabelle 6

Frequenzhäufigkeit der CYP-Allele bei Probanden und gesunden Kontrollpersonen

Tabelle 7

Genotypisierung und residuale Plättchenaggregation (RPA Cut-Off-Wert 47%)

Tabelle 8

Isoenzyme mit Einfluss auf die Metabolisierung von Clopidogrel und die Frequenz polymorphistischer Varianten

9. Überschriften erstellter Diagramme

Diagramm 1

Genotyp-Verteilung des CYP2C19*2-Polymorphismus in Patienten mit hoher und niedriger residualer Plättchenaggregation nach Gabe einer Initialdosis von 600mg Clopidogrel

Diagramm 2

Verteilung der Patienten nach ihrem individuellen PREDICT-score und Zuordnung zu „Respondern“ oder „poor-Respondern“

Diagramm 3

Nomogramm zur individuellen Risikokalkulation bezüglich einer hohen residualen Plättchenaggregation unter Erhalt einer Initialdosis von 600mg Clopidogrel

10. Abkürzungsverzeichnis

| | |
|------------|--|
| Abb | Abbildung |
| ACE-Hemmer | Angiotensin-Conversions-Enzym-Hemmer |
| ACS | acute coronary syndrom (Akutes Koronarsyndrom) |
| ADP | Adenosindiphosphat |
| ASS | Acetylsalicylsäure |
| BMI | Body-Maß-Index |
| CAD | coronar artery disease (Koronare Herzerkrankung) |
| cAMP | cyclisches Adenosinmonophosphat |
| CD | cluster of differentiation (Differenzierungsmarker an der Oberfläche von Zellen) |
| CK | Creatinkinase |
| CSE-Hemmer | Cholesterin-Synthese-Enzym-Hemmer |
| CYP | Cytochrom P |
| EDTA | Ethylen-Diamin-Tetra-Acetat |
| EKG | Elektrokardiogramm |
| GP | Glykoprotein |
| IAP | instabile Angina pectoris |
| I. E. | internationale Einheiten |
| LVF | linksventrikuläre Funktion |
| M | mol/L |
| mRNA | messenger ribonucleid acid (Boten-RNA) |
| NSTEMI | Nicht-ST-Hebungsinfarkt |
| pAVK | periphere arterielle Verschlusskrankheit |
| PCI | percutaneous coronary intervention (Perkutane Koronarintervention) |
| PCR | polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion) |
| PGE | Prostaglandin E |

| | |
|---------|--|
| PK | Proteinkinase |
| PI3K | Phosphatidylinositol-3-Kinase |
| PPI | Protonenpumpeninhibitor |
| PPP | platelet poor plasma (plättchenarmes Plasma) |
| PREDICT | residual platelet reactivity of intracoronary stent |
| PRP | platelet rich plasma (plättchenreiches Plasma) |
| PTCA | perkutane transluminale Coronar-Angioplastie (Ballondilatation) |
| RPA | residuale Plättchenaggregation |
| SD | standard deviation (Standardabweichung) |
| SNP | single nucleotide polymorphism (Einzel-Nukleotid-Polymorphismus) |
| STEMI | ST-Hebungsinfarkt |
| TTP | Thrombotisch thrombozytopenische Purpura |
| VASP | Vasodilatator-stimuliertes Phosphoprotein |

11. Literaturverzeichnis

- (1) Alexopoulos D, Galati A, Xanthopoulou I, Mavronasiou E, Kassimis G, Theodoropoulos KC, Makris G, Damelou A, Tsigkas G, Hahalis G, Davlouros P. 2012. Ticagrelor versus prasugrel in acute coronary syndrome patients with high on-clopidogrel platelet reactivity following percutaneous coronary intervention: a pharmacodynamic study. *J Am Coll Cardiol* 60(3):193–9.
- (2) Andersson T, Flockhart DA, Goldstein DB, Huang SM, Kroetz DL, Milos PM, Ratain MJ, Thummel K. 2005. Drug-metabolizing enzymes: evidence for clinical utility of pharmacogenomic tests. *Clin Pharmacol Ther* 78(6):559–81.
- (3) Angiolillo DJ, Fernández-Ortiz A, Bernardo E, Barrera Ramírez C, Sabaté M, Fernandez C, Hernández-Antolín R, Escaned J, Alfonso F, Macaya C. 2004. Platelet aggregation according to body mass index in patients undergoing coronary stenting: should clopidogrel loading-dose be weight adjusted? *J Invasive Cardiol* 16(4):169–74.
- (4) Angiolillo DJ, Fernandez-Ortiz A, Bernardo E, Ramírez C, Cavallari U, Trabetti E, Sabaté M, Hernández R, Moreno R, Escaned J, Alfonso F, Bañuelos C, Costa MA, Bass TA, Pignatti PF, Macaya C. 2006. Contribution of gene sequence variations of the hepatic cytochrome P450 3A4 enzyme to variability in individual responsiveness to clopidogrel. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26(8):1895–900.
- (5) Aradi D, Komócsi A, Vorobcsuk A, Rideg O, Tokés-Füzesi M, Magyarlaki T, Horváth IG, Serebruany VL. 2010. Prognostic significance of high on-clopidogrel platelet reactivity after percutaneous coronary intervention: systematic review and meta-analysis. *Am Heart J* 160(3):543–51.
- (6) Auer J, Berent R, Lassnig E, Weber T, Maurer E, Eber B. 2003. Platelet glycoprotein IIb/IIIa inhibitors in coronary artery disease. *Herz* 28(5):393–403.
- (7) Azarm T, Sohrabi A, Mohajer H, Azarm A. 2011. Thrombotic Thrombocytopenic Purpura associated with Clopidogrel: a case report and review of the literature. *J Res Med Sci* 16(3):353–7.
- (8) Baurand A, Eckly A, Bari N, Léon C, Hechler B, Cazenave JP, Gachet C. 2000. Desensitization of the platelet aggregation response to ADP: differential down-regulation of the P2Y1 and P2cyc receptors. *Thromb Haemost* 84(3):484–91.
- (9) Beitelshes AL, McLeod HL. 2006. Clopidogrel pharmacogenetics: promising steps towards patient care? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26(8):1681–3.
- (10) Ben Morrison T, Horst BM, Brown MJ, Bell MR, Daniels PR. 2012. Bridging with glycoprotein IIb/IIIa inhibitors for periprocedural management of antiplatelet therapy in patients with drug eluting stents. *Catheter Cardiovasc Interv* 79(4):575–82.
- (11) Bennett CL, Connors JM, Carwile JM, Moake JL, Bell WR, Tarantolo SR, McCarthy LJ, Sarode R, Hatfield AJ, Feldman MD, Davidson CJ, Tsai

- HM. 2000. Thrombotic thrombocytopenic purpura associated with clopidogrel. *N Engl J Med* 342(24):1773–7.
- (12) Bertrand ME, Rupprecht HJ, Urban P, Gershlick AH; CLASSICS Investigators. 2000. 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(6):624–9.
- (13) Bhatt DL, Bertrand ME, Berger PB, L'Allier PL, Moussa I, Moses JW, Dangas G, Taniuchi M, Lasala JM, Holmes DR, Ellis SG, Topol EJ. 2002. Meta-analysis of randomized and registry comparisons of ticlopidine with clopidogrel after stenting. *J Am Coll Cardiol* 39(1):9–14.
- (14) Bhatt DL, Cryer BL, Contant CF, Cohen M, Lanos A, Schnitzer TJ, Shook TL, Lapuerta P, Goldsmith MA, Laine L, Scirica BM, Murphy SA, Cannon CP; COGENT Investigators. 2010. Clopidogrel with or without omeprazole in coronary artery disease. *N Engl J Med* 363(20):1909–17.
- (15) Bhatt DL, Fox KA, Hacke W, Berger PB, Black HR, Boden WE, Cacoub P, Cohen EA, Creager MA, Easton JD, Flather MD, Haffner SM, Hamm CW, Hankey GJ, Johnston SC, Mak KH, Mas JL, Montalescot G, Pearson TA, Steg PG, Steinhubl SR, Weber MA, Brennan DM, Fabry-Ribaudo L, Booth J, Topol EJ; CHARISMA Investigators. 2006. Clopidogrel and Acetylsalicylsäure versus aspirin alone for the prevention of atherothrombotic events. CHARISMA Investigators. *N Engl J Med* 354(16):1706–17.
- (16) Blaisdell J, Mohrenweiser H, Jackson J, Ferguson S, Coulter S, Chanas B, Xi T, Ghanayem B, Goldstein JA. 2002. Identification and functional characterization of new potentially defective alleles of human CYP2C19. *Pharmacogenetics* 12(9):703–11.
- (17) Bonello L, Pansieri M, Mancini J, Bonello R, Maillard L, Barnay P, Rossi P, Ait-Mokhtar O, Jouve B, Collet F, Peyre JP, Wittenberg O, de Labriolle A, Camilleri E, Cheneau E, Cabassome E, Dignat-George F, Camoin-Jau L, Paganelli F. 2011. High on-treatment platelet reactivity after prasugrel loading dose and cardiovascular events after percutaneous coronary intervention in acute coronary syndromes. *Journal of American College of Cardiology* Vol.58, No.5.
- (18) Bouman HJ, Schömig E, van Werkum JW, Velder J, Hackeng CM, Hirschhäuser C, Waldmann C, Schmalz HG, ten Berg JM, Taubert D. 2011. Paraoxonase-1 is a major determinant of clopidogrel efficacy. *Nat Med* 17(1):110–6.
- (19) Brandt JT, Close SL, Iturria SJ, Payne CD, Farid NA, Ernest CS 2nd, Lachno DR, Salazar D, Winters KJ. 2007. Common polymorphisms of CYP2C19 and CYP2C9 affect the pharmacokinetic and pharmacodynamic response to clopidogrel but not prasugrel. *J Thromb Haemost* 5(12):2429–36.
- (20) CAPRIE Steering Committee. 1996. A randomised, blinded, trial of clopidogrel versus aspirin in patients at risk of ischaemic events (CAPRIE). *Lancet* 348:1329–39.

- (21) CAPTURE Study. 1997. Randomised placebo-controlled trial of abciximab before and during coronary intervention in refractory unstable angina. *Lancet* 349(9063):1429–35.
- (22) Cavallari U, Trabetti E, Malerba G, Biscuola M, Girelli D, Olivieri O, Martinelli N, Angiolillo DJ, Corrocher R, Pignatti PF. 2007. Gene sequence variations of the platelet P2Y12 receptor are associated with coronary artery disease. *BMC Med Genet* 8:59.
- (23) Chen ZM, Jiang LX, Chen YP, Xie JX, Pan HC, Peto R, Collins R, Liu LS. 2005. COMMIT (Clopidogrel and Metoprolol in Myocardial Infarction Trial) collaborative group. Addition of clopidogrel to aspirin in 45,852 patients with acute myocardial infarction: randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 366(9497):1607–21.
- (24) Chen BL, Zhang W, Li Q, Li YL, He YJ, Fan L, Wang LS, Liu ZQ, Zhou HH. 2008. Inhibition of ADP-induced platelet aggregation by clopidogrel is related to CYP2C19 genetic polymorphisms. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 35(8):904–8.
- (25) Clarke TA, Waskell LA. 2003. The metabolism of clopidogrel is catalyzed by human cytochrome P450 3A and is inhibited by atorvastatin. *Drug Metab Dispos* 31(1):53–9.
- (26) Collier BS. 1997. Platelet GPIIb/IIIa antagonists: the first anti-integrin receptor therapeutics. *J Clin Invest* 99(7):1467–71.
- (27) Collet JP, Hulot JS, Pena A, Villard E, Esteve JB, Silvain J, Payot L, Brugier D, Cayla G, Beygui F, Bensimon G, Funck-Brentano C, Montalescot G. 2009. Cytochrome P450 2C19 polymorphism in young patients treated with clopidogrel after myocardial infarction: a cohort study. *Lancet* 373(9660):309–17.
- (28) Conley PB, Delaney SM. 2003. Scientific and therapeutic insights into the role of the platelet P2Y12 receptor in thrombosis. *Curr Opin Hematol* 10(5):333–8.
- (29) Coukell AJ, Markham A. 1997. Clopidogrel. *Drugs* 54(5):745–50.
- (30) Coulter CJ, Montandon SV. 2012. Prasugrel as a safe alternative for clopidogrel-induced polyarthralgias. *Pharmacotherapy* 32(2):e24–6.
- (31) De Morais SM, Wilkinson GR, Blaisdell J, Nakamura K, Meyer UA, Goldstein JA. 1994. The major genetic defect responsible for the polymorphism of S-mephenytoin metabolism in humans. NIEHS, National Institutes of Health, Research Triangle Park, North Carolina 27709. *J Biol Chem* 269(22):15419–22.
- (32) Denas G, Padayattil Jose S, Gresele P, Erba N, Testa S, De Micheli V, Quintavalla R, Poli D, Bracco A, Fierro T, Iliceto S, Pengo V. 2012. Major bleeding in patients undergoing PCI and triple or dual antithrombotic therapy: a parallel-cohort study. *J Thromb Thrombolysis (im Druck)*.
- (33) Desta Z, Zhao X, Shin JG, Flockhart DA. 2002. Clinical significance of the cytochrome P450 2C19 genetic polymorphism. *Clin Pharmacokinet* 41(12):913–58.
- (34) Ding Z, Kim S, Dorsam RT, Jin J, Kunapuli SP. 2003. Inactivation of the human P2Y12 receptor by thiol reagents requires interaction with both extracellular cysteine residues, Cys17 and Cys270. *Blood* 101(10):3908–14.

- (35) Dorsam RT, Kunapuli SP. 2004. Central role of the P2Y₁₂ receptor in platelet activation. *J Clin Invest* 113(3):340–5.
- (36) Eichelbaum M, Ingelman-Sundberg M, Evans WE. 2006. Pharmacogenomics and individualized drug therapy. *Annu Rev Med* 57:119–37.
- (37) Eikelboom JW, Hirsh J, Spencer FA, Baglin TP, Weitz JI. 2012. Antiplatelet drugs: Antithrombotic Therapy and Prevention of Thrombosis, 9th ed: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines. *Chest* 141(2 Suppl):e89S–119S.
- (38) Farid NA, Payne CD, Small DS, Winters KJ, Ernest CS 2nd, Brandt JT, Darstein C, Jakubowski JA, Salazar DE. 2007. Cytochrome P450 3A inhibition by ketoconazole affects prasugrel and clopidogrel pharmacokinetics and pharmacodynamics differently. *Clin Pharmacol Ther* 81(5):735–41.
- (39) Fontana P, Dupont A, Gandrille S, Bachelot-Loza C, Reny JL, Aiach M, Gaussem P. 2003 a. Adenosine diphosphate-induced platelet aggregation is associated with P2Y₁₂ gene sequence variations in healthy subjects. *Circulation* 108(8):989–95.
- (40) Fontana P, Gaussem P, Aiach M, Fiessinger JN, Emmerich J, Reny JL. 2003 b. P2Y₁₂ H2 haplotype is associated with peripheral arterial disease: a case-control study. *Circulation* 108(24):2971–3.
- (41) Fontana P, Hulot JS, De Moerloose P, Gaussem P. 2007. Influence of CYP2C19 and CYP3A4 gene polymorphisms on clopidogrel responsiveness in healthy subjects. *J Thromb Haemost* 5(10):2153–5.
- (42) Fontana P, James R, Barazer I, Berdagué P, Schved JF, Rebsamen M, Vuilleumier N, Reny JL. 2011. Relationship between paraoxonase-1 activity, its Q192R genetic variant and clopidogrel responsiveness in the ADRIE study. *J Thromb Haemost* 9(8):1664–6.
- (43) Freedman JE, Hylek EM. 2009. Clopidogrel, genetics and drug responsiveness. *N Engl J Med* 360(4): 411–3.
- (44) Frere C, Cuisset T, Morange PE, Quilici J, Camoin-Jau L, Saut N, Faille D, Lambert M, Juhan-Vague I, Bonnet JL, Alessi MC. 2008. Effect of cytochrome p450 polymorphisms on platelet reactivity after treatment with clopidogrel in acute coronary syndrome. *Am J Cardiol* 101(8):1088–93.
- (45) Furuta T, Shirai N, Sugimoto M, Ohashi K, Ishizaki T. 2004. Pharmacogenomics of proton pump inhibitors. *Pharmacogenomics* 5(2):181–202.
- (46) Furuta T, Shirai N, Xiao F, Ohashi K, Ishizaki T. 2001. Effect of high-dose lansoprazole on intragastric pH in subjects who are homozygous extensive metabolizers of cytochrome P450C19. *Clin Pharmacol Ther* 70(5):484–92.
- (47) Gachet C. 2001. ADP receptors of platelets and their inhibition. *Thromb Haemost* 86(1):222–32.
- (48) Gao Y, Zhang LR, Fu Q. 2008. CYP3A4*1G polymorphism is associated with lipid-lowering efficacy of atorvastatin but not of simvastatin. *Eur J Clin Pharmacol* 64(9):877–82.
- (49) Garcia AE, Mada SR, Rico MC, Dela Cadena RA, Kunapuli SP. 2011. Clopidogrel, a P2Y₁₂ receptor antagonist, potentiates the inflammatory response in a rat model of peptidoglycan polysaccharide-induced arthritis. *PLoS One* 6(10):e26035.

- (50) Garsa AA, McLeod HL, Marsh S. 2005. CYP3A4 and CYP3A5 genotyping by Pyrosequencing. *BMC Med Genet* 6:19.
- (51) Gawaz M. 1999 a. Das Blutplättchen: Physiologie, Pathophysiologie, Membranrezeptoren, antithrombozytäre Wirkstoffe und Therapie bei koronarer Herzerkrankung. Stuttgart, New York: Thieme 9–15, 21–23, 43–46, 89–108.
- (52) Gawaz M. 1999 b. Das Blutplättchen: Physiologie, Pathophysiologie, Membranrezeptoren, antithrombozytäre Wirkstoffe und Therapie bei koronarer Herzerkrankung. Stuttgart, New York: Thieme 54–59.
- (53) Gawaz M. 1999 c. Das Blutplättchen : Physiologie, Pathophysiologie, Membranrezeptoren, antithrombozytäre Wirkstoffe und Therapie bei koronarer Herzerkrankung. Stuttgart, New York: Thieme 63–76.
- (54) Gawaz M, Geisler T. 2009. Coronary artery disease: Platelet activity: an obstacle for successful PCI. *Nat Rev Cardiol* 6(6):391–2.
- (55) Geiger J, Brich J, Hönl-Liedl P, Eigenthaler M, Schanzenbächer P. 1999. Specific impairment of human platelet P2Y₁ ADP receptor-mediated signaling by the antiplatelet drug clopidogrel. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19(8):2007–11.
- (56) Geisler T, Gawaz M. 2010. Thrombosen und Gefäßverschlüsse trotz antithrombotischer Therapie. Herausgeber: Plötzsch B, Madlener K. In: *Hämostaseologie Grundlagen, Diagnostik, Therapie*. Springer-Verlag GmbH S.684.
- (57) Geisler T, Grass D, Bigalke B, Stellos K, Drosch T, Dietz K, Herdeg C, Gawaz M. 2008 a. The Residual Platelet Aggregation after Deployment of Intracoronary Stent (PREDICT) score. *Thromb Haemost* 6(1):54–61.
- (58) Geisler T, Kapp M, Göhring-Frischholz K, Daub K, Dösch C, Bigalke B, Langer H, Herdeg C, Gawaz M. 2008 b. Residual platelet activity is increased in clopidogrel- and ASA-treated patients with coronary stenting for acute coronary syndromes compared with stable coronary artery disease. *Heart* 94(6):743–7.
- (59) Geisler T, Schaeffeler E, Dippon J, Winter S, Buse V, Bischofs C, Zuern C, Moerike K, Gawaz M, Schwab M. 2008 c. CYP2C19 and nongenetic factors predict poor responsiveness to clopidogrel loading dose after coronary stent implantation. *Pharmacogenomics* 9(9):1251–9.
- (60) Geisler T, Zürn C, Paterok M, Göhring-Frischholz K, Bigalke B, Stellos K, Seizer P, Kraemer BF, Dippon J, May AE, Herdeg C, Gawaz M. 2008 d. Statins do not adversely affect post-interventional residual platelet aggregation and outcomes in patients undergoing coronary stenting treated by dual antiplatelet therapy. *Eur Heart J* 29(13):1635–43.
- (61) Geisler T, Zürn C, Simonenko R, Rapin M, Kraibooj H, Kilias A, Bigalke B, Stellos K, Schwab M, May AE, Herdeg C, Gawaz M. 2010. Early but not late stent thrombosis is influenced by residual platelet aggregation in patients undergoing coronary interventions. *Eur Heart J* 31(1):59–66.
- (62) Gilard M, Arnaud B, Cornily JC, Le Gal G, Lacut K, Le Calvez G, Mansourati J, Mottier D, Abgrall JF, Bosch J. 2008. Influence of omeprazole on the antiplatelet action of clopidogrel associated with aspirin: the randomized, double-blind OCLA (Omeprazole Clopidogrel Aspirin) study. *J Am Coll Cardiol* 51(3):256–60.

- (63) Giusti B, Gori AM, Marcucci R, Saracini C, Sestini I, Paniccchia R, Valente S, Antonucci D, Abbate R, Gensini GF. 2007. Cytochrome P450 2C19 loss-of-function polymorphism, but not CYP3A4 IVS10 + 12G/A and P2Y12 T744C polymorphisms, is associated with response variability to dual antiplatelet treatment in high-risk vascular patients. *Pharmacogenet Genomics* 17(12):1057–64.
- (64) Gladding P, Webster M, Zeng I, Farrell H, Stewart J, Ruygrok P, Ormiston J, El-Jack S, Armstrong G, Kay P, Scott D, Gunes A, Dahl ML. 2008. The pharmacogenetics and pharmacodynamics of clopidogrel response: an analysis from the PRINC (Plavix Response in Coronary Intervention) trial. Green Lane Cardiovascular Service, Auckland City Hospital, Auckland, New Zealand. *JACC Cardiovasc Interv* 1(6):620–7.
- (65) Goldstein JA, Ishizaki T, Chiba K, de Morais SM, Bell D, Krahn PM, Evans DA. 1997. Frequencies of the defective CYP2C19 alleles responsible for the mephenytoin poor metabolizer phenotype in various Oriental, Caucasian, Saudi Arabian and American black populations. *Pharmacogenetics* 7(1):59–64.
- (66) Gorchakova O, von Beckerath N, Gawaz M, Mocz A, Joost A, Schömig A, Kastrati A. 2004. Antiplatelet effects of a 600 mg loading dose of clopidogrel are not attenuated in patients receiving atorvastatin or simvastatin for at least 4 weeks prior to coronary artery stenting. *Eur Heart J* 25(21):1898–902.
- (67) Gori AM, Marcucci R, Migliorini A, Valenti R, Moschi G, Paniccchia R, Buonamici P, Gensini GF, Vergara R, Abbate R, Antonucci D. 2008. Incidence and clinical impact of dual nonresponsiveness to aspirin and clopidogrel in patients with drug-eluting stents. *J Am Coll Cardiol* 52(9):734–9.
- (68) Goyal RK, Srivastava D, Lessnau KD. 2009. Clopidogrel-induced hepatocellular injury and cholestatic jaundice in an elderly patient: case report and review of the literature. *Pharmacotherapy* 29(5):608–12.
- (69) Gröchenig HP. 2001. Interaktionspotential der Statine. *J KARDIOL* 8(7–8):306–11.
- (70) Gurbel PA, Bliden KP, Hiatt BL, O'Connor CM. 2003. Clopidogrel for coronary stenting: response variability, drug resistance, and the effect of pretreatment platelet reactivity. *Circulation* 107(23):2908–13.
- (71) Halling J, Petersen MS, Damkier P, Nielsen F, Grandjean P, Weihe P, Lundgren S, Lundblad MS, Brøsen K. 2005. Polymorphism of CYP2D6, CYP2C19, CYP2C9 and CYP2C8 in the Faroese population. *Eur J Clin Pharmacol* 61(7):491–7.
- (72) Hamm CW, Arntz HR, Bode C, Giannitsis E, Katus H, Levenson B, Nordt TH, Neumann FJ, Tebbe U, Zahn R. 2004 a. Leitlinien: Akutes Koronarsyndrom (ACS) Teil 1: ACS ohne persistierende ST-Hebung. *Z Kardiol* 93:72–90.
- (73) Hamm CW, Arntz HR, Bode C, Giannitsis E, Katus H, Levenson B, Nordt TH, Neumann FJ, Tebbe U, Zahn R. 2004 b. Leitlinien: Akutes Koronarsyndrom (ACS) Teil 2: Akutes Koronarsyndrom mit ST-Hebung. *Z Kardiol* 93:324–341.

- (74) Hechler B, Eckly A, Ohlmann P, Cazenave JP, Gachet C. 1998. 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(3):858–66.
- (75) Hochholzer W, Trenk D, Fromm MF, Valina CM, Stratz C, Bestehorn HP, Büttner HJ, Neumann FJ. 2010. Impact of cytochrome P450 2C19 loss-of-function polymorphism and of major demographic characteristics on residual platelet function after loading and maintenance treatment with clopidogrel in patients undergoing elective coronary stent placement. *J Am Coll Cardiol* 55(22):2427–34.
- (76) Hochholzer W, Trenk D, Frundi D, Blanke P, Fischer B, Andris K, Bestehorn HP, Büttner HJ, Neumann FJ. 2005. Time dependence of platelet inhibition after a 600-mg loading dose of clopidogrel in a large, unselected cohort of candidates for percutaneous coronary intervention. *Circulation* 111(20):2560–4.
- (77) Hollopeter G, Jantzen HM, Vincent D, Li G, England L, Ramakrishnan V, Yang RB, Nurden P, Nurden A, Julius D, Conley PB. 2001. Identification of the platelet ADP receptor targeted by antithrombotic drugs. *Nature* 409(6817):202–7.
- (78) Huang CC, Chen YC, Leu HB, Chen TJ, Lin SJ, Chan WL, Chen JW. 2010. Risk of adverse outcomes in Taiwan associated with concomitant use of clopidogrel and proton pump inhibitors in patients who received percutaneous coronary intervention. *Am J Cardiol* 105(12):1705–9.
- (79) Hulot JS, Bura A, Villard E, Azizi M, Remones V, Goyenvallé C, Aiach M, Lechat P, Gaussem P. 2006. Cytochrome P450 2C19 loss-of-function polymorphism is a major determinant of clopidogrel responsiveness in healthy subjects. *Blood* 108(7):2244–7.
- (80) Hulot JS, Collet JP, Cayla G, Silvain J, Allanic F, Bellemain-Appaix A, Scott SA, Montalescot G. 2011. CYP2C19 but not PON1 genetic variants influence clopidogrel pharmacokinetics, pharmaco-dynamics, and clinical efficacy in post-myocardial infarction patients. *Circ Cardiovasc Interv* 4(5):422–8.
- (81) Hustert E, Haberl M, Burk O, Wolbold R, He YQ, Klein K, Nuessler AC, Neuhaus P, Klattig J, Eiselt R, Koch I, Zibat A, Brockmöller J, Halpert JR, Zanger UM, Wojnowski L. 2001. The genetic determinants of the CYP3A5 polymorphism. *Pharmacogenetics* 11(9):773–9.
- (82) Illig T, Vollmert C, Gohlke H, Klopp N. 2004. Hochdurchsatz SNP Genotypisierung mit MALDI TOF MS. *Biospektrum* S. 670–673.
- (83) Ingelman-Sundberg M, Oscarson M, McLellan RA. 1999. Polymorphic human cytochrome P450 enzymes: an opportunity for individualized drug treatment. *Trends Pharmacol Sci* 20(8):342–9.
- (84) Ishikawa T, Makita M, Saeki K, Hara Y, Yamamoto K, Imajo K. 2012. Clopidogrel-associated thrombotic thrombocytopenic purpura. *Rinsho Ketsueki* 53(6):628–31.
- (85) Ishizaki T, Horai Y. 1999. Review article: cytochrome P450 and the metabolism of proton pump inhibitors--emphasis on rabeprazole. *Aliment Pharmacol Ther* 13 Suppl 3:27–36.

- (86) Jacobsen W, Kirchner G, Hallensleben K, Mancinelli L, Deters M, Hackbarth I, Benet LZ, Sewing KF, Christians U. 1999. Comparison of cytochrome P-450-dependent metabolism and drug interactions of the 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase inhibitors lovastatin and pravastatin in the liver. *Drug Metab Dispos* 27(2):173–9.
- (87) Järemo P, Lindahl TL, Fransson SG, Richter A. 2002. Individual variations of platelet inhibition after loading doses of clopidogrel. *J Intern Med* 252(3):233–8.
- (88) Jinnai T, Horiuchi H, Makiyama T, Tazaki J, Tada T, Akao M, Ono K, Hoshino K, Naruse Y, Takahashi K, Watanabe H, Kita T, Kimura T. 2009. Impact of CYP2C19 polymorphisms on the antiplatelet effect of clopidogrel in an actual clinical setting in Japan. *Circ J* 73(8):1498–503.
- (89) Kastrati A, Mehilli J, Pache J, Kaiser C, Valgimigli M, Kelbaek H, Menichelli M, Sabaté M, Suttorp MJ, Baumgart D, Seyfarth M, Pfisterer ME, Schömig A. 2007. Analysis of 14 trials comparing sirolimus-eluting stents with bare-metal stents. *N Engl J Med* 356(10):1030–9.
- (90) Kazui M, Nishiya Y, Ishizuka T, Hagihara K, Farid NA, Okazaki O, Ikeda T, Kurihara A. 2010. Identification of the human cytochrome P450 enzymes involved in the two oxidative steps in the bioactivation of clopidogrel to its pharmacologically active metabolite. *Drug Metab Dispos* 38(1):92–9.
- (91) Kehrel BE. 2003. Blood platelets: biochemistry and physiology. *Hamostaseologie* 23(4):149–58.
- (92) Kehrel BE. 2008. Platelets: biochemistry and physiology. *Hamostaseologie* 28(5):289–98.
- (93) Kenngott S, Olze R, Kollmer M, Botthelm H, Laner A, Holinski-Feder E, Gross M. 2010. Clopidogrel and proton pump inhibitor (PPI) interaction: separate intake and a non-omeprazole PPI the solution? *Eur J Med Res* 15(5):220–4.
- (94) Khangura S, Gordon WL. 2011. Prasugrel as an alternative for clopidogrel-associated neutropenia. *Can J Cardiol* 27(6):869.e9–11.
- (95) Klotz U, Schwab M, Treiber G. 2004. CYP2C19 polymorphism and proton pump inhibitors. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 95(1):2–8.
- (96) Kuehl P, Zhang J, Lin Y, Lamba J, Assem M, Schuetz J, Watkins PB, Daly A, Wrighton SA, Hall SD, Maurel P, Relling M, Brimer C, Yasuda K, Venkataramanan R, Strom S, Thummel K, Boguski MS, Schuetz E. 2001. Sequence diversity in CYP3A promoters and characterization of the genetic basis of polymorphic CYP3A5 expression. *Nat Genet* 27(4):383–91.
- (97) Lang T, Klein K, Fischer J, Nüssler AK, Neuhaus P, Hofmann U, Eichelbaum M, Schwab M, Zanger UM. 2001. Extensive genetic polymorphism in the human CYP2B6 gene with impact on expression and function in human liver. *Pharmacogenetics* 11(5):399–415.
- (98) Lau WC, Waskell LA, Watkins PB, Neer CJ, Horowitz K, Hopp AS, Tait AR, Carville DG, Guyer KE, Bates ER. 2003. Atorvastatin reduces the ability of clopidogrel to inhibit platelet aggregation: a new drug-drug interaction. *Circulation* 107(1):32–7.

- (99) Léon C, Hechler B, Freund M, Eckly A, Vial C, Ohlmann P, Dierich A, LeMeur M, Cazenave JP, Gachet C. 1999. Defective platelet aggregation and increased resistance to thrombosis in purinergic P2Y(1) receptor-null mice. *J Clin Invest* 104(12):1731–7.
- (100) Lepäntalo A, Virtanen KS, Heikkilä J, Wartiovaara U, Lassila R. 2004. Limited early antiplatelet effect of 300 mg clopidogrel in patients with aspirin therapy undergoing percutaneous coronary interventions. *Eur Heart J* 25(6):476–83.
- (101) Li D, Wang Y, Zhang L, Luo X, Li J, Chen X, Niu H, Wang K, Sun Y, Wang X, Yan Y, Chai W, Gartner TK, Liu J. 2012. Roles of Purinergic Receptor P2Y₁, G Protein-Coupled 12 in the Development of Artherosclerosis in Apolipoprotein E-Deficient Mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 32(8):e81–9.
- (102) Lotta LA, Mancini I, Tuana G, Musallam KM, Peyvandi F. 2012. Case report: use of thienopyridines in a patient with acquired idiopathic thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Thromb Thrombolysis* 34(3): 416–8.
- (103) Lyseng-Williamson KA, Plosker GL. 2006. Clopidogrel: a pharmacoeconomic review of its use in patients with non-ST elevation acute coronary syndromes. *Pharmacoeconomics* 24(7):70.
- (104) Majhail NS, Lichtin AE. 2003. Clopidogrel and thrombotic thrombocytopenic purpura: no clear case for causality. *Cleve Clin J Med* 70(5):466–70.
- (105) Martín de Argila C. 2005. Safety of potent gastric acid inhibition. *Drugs* 65 Suppl 1:97–104.
- (106) Mauri L, Hsieh WH, Massaro JM, Ho KK, D’Agostino R, Cutlip DE. 2007. Stent thrombosis in randomized clinical trials of drug-eluting stents. *N Engl J Med* 356(10):1020–9.
- (107) McCarthy LJ, Dlott JS, Orazi A, Waxman D, Miraglia CC, Danielson CF. 2004. Thrombotic thrombocytopenic purpura: yesterday, today, tomorrow. *Ther Apher Dial* 8(2):80–6.
- (108) McFadden EP, Stabile E, Regar E, Cheneau E, Ong AT, Kinnaird T, Suddath WO, Weissman NJ, Torguson R, Kent KM, Pichard AD, Satler LF, Waksman R, Serruys PW. 2004. Late thrombosis in drug-eluting coronary stents after discontinuation of antiplatelet therapy. *Lancet* 364(9444):1519–21.
- (109) Mega JL, Close SL, Wiviott SD, Shen L, Hockett RD, Brandt JT, Walker JR, Antman EM, Macias W, Braunwald E, Sabatine MS. 2009. Cytochrome p-450 polymorphisms and response to clopidogrel. *N Engl J Med* 360(4):354–62.
- (110) Mehta SR, Yusuf S. 2000. 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* 21(24):2033–41.
- (111) Mehta SR, Yusuf S, Peters RJ, Bertrand ME, Lewis BS, Natarajan MK, Malmberg K, Rupprecht H, Zhao F, Chrolavicius S, Copland I, Fox KA. 2001. Clopidogrel in Unstable angina to prevent Recurrent Events trial (CURE) Investigators. Effects of pretreatment with clopidogrel and aspirin

- followed by longterm therapy in patients undergoing percutaneous coronary intervention: the PCI-CURE study. *Lancet* 358:527–33.
- (112) Mitsios JV, Papathanasiou AI, Rodis FI, Elisaf M, Goudevenos JA, Tselepis AD. 2004. Atorvastatin does not affect the antiplatelet potency of clopidogrel when it is administered concomitantly for 5 weeks in patients with acute coronary syndromes. *Circulation* 109(11):1335–8.
- (113) Mobley JE, Bresee SJ, Wortham DC, Craft RM, Snider CC, Carroll RC. 2004. Frequency of nonresponse antiplatelet activity of clopidogrel during pretreatment for cardiac catheterization. *Am J Cardiol* 93(4):456–8.
- (114) Momary KM, Dorsch MP, Bates ER. 2010. Genetic causes of clopidogrel nonresponsiveness: which ones really count? *Pharmacotherapy* 30(3):265–74.
- (115) Morais J. 2002. Insights from CURE: using clopidogrel on top of standard therapy. *Cerebrovasc Dis* 13 Suppl 1:17–21.
- (116) Müller I, Besta F, Schulz C, Li Z, Massberg S, Gawaz M. 2003 a. Effects of statins on platelet inhibition by a high loading dose of clopidogrel. *Circulation* 108(18):2195–7.
- (117) Müller I, Besta F, Schulz C, Massberg S, Schönig A, Gawaz M. 2003 b. Prevalence of clopidogrel non-responders among patients with stable angina pectoris scheduled for elective coronary stent placement. *Thromb Haemost* 89(5):783–7.
- (118) Müller I, Seyfarth M, Rüdiger S, Wolf B, Pogatsa-Murray G, Schömig A, Gawaz M. 2001. Effect of a high loading dose of clopidogrel on platelet function in patients undergoing coronary stent placement. *Heart* 85(1):92–3.
- (119) Murugappa S, Kunapuli SP. 2006. The role of ADP receptors in platelet function. *Front Biosci* 11:1977–86.
- (120) Nebert DW. 1997. Polymorphisms in drug-metabolizing enzymes: what is their clinical relevance and why do they exist? *Am J Hum Genet* 60(2):265–71.
- (121) Neubauer H, Günesdogan B, Hanefeld C, Spiecker M, Mügge A. 2003. Lipophilic statins interfere with the inhibitory effects of clopidogrel on platelet function- a flow cytometry study. *Eur Heart J* 24(19):1744–9.
- (122) Nurden P, Savi P, Heilmann E, Bihour C, Herbert JM, Maffrand JP, Nurden A. 1995. An inherited bleeding disorder linked to a defective interaction between ADP and its receptor on platelets. Its influence on glycoprotein IIb-IIIa complex function. *J Clin Invest* 95(4):1612–22.
- (123) Ofosu FA, Nyarko KA. 2000. Human platelet thrombin receptors. Roles in platelet activation. *Hematol Oncol Clin North Am* 14(5):1185–98.
- (124) Paoletti R, Corsini A, Bellosta S. 2002. Pharmacological interactions of statins. *Atheroscler Suppl* 3(1):35–40.
- (125) Park SH, Cho YJ, Kim YL, Kwak JS, Kim YJ, Cho DK. 2003. Clopidogrel-induced membranous nephropathy. *Clin Nephrol* 60(3):218–20.
- (126) Patel PA, Augoustides JG. 2010. Progress in Platelet Medicine: Focus on Stent Thrombosis and Drug Resistance. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 24(4):722–7.
- (127) Peters H, Eisenberg R, Daig U, Liefeldt L, Westenfeld R, Gaedeke J, Krämer S, Neumayer HH. 2004. Platelet inhibition limits TGF-beta

- overexpression and matrix expansion after induction of anti-thy1 glomerulonephritis. *Kidney Int.* 65(6):2238–48.
- (128) Pettersen AA, Arnesen H, Opstad TB, Bratseth V, Seljeflot I. 2012. Markers of endothelial and platelet activation are associated with high on-aspirin platelet reactivity in patients with stable coronary artery disease. *Thromb Res.* 130(3):424–8.
- (129) Plosker GL, Lyseng-Williamson KA. 2007. Clopidogrel: a review of its use in the prevention of thrombosis. *Drugs* 67(4):613–46.
- (130) PRISM-PLUS Study Investigators. 1998. Inhibition of the platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor with tirofiban in unstable angina and non-Q-wave myocardial infarction. Platelet Receptor Inhibition in Ischemic Syndrome Management in Patients Limited by Unstable Signs and Symptoms. *N Engl J Med* 338(21):1488–97.
- (131) Quinn MJ, Bhatt DL, Zidar F, Vivekananthan D, Chew DP, Ellis SG, Plow E, Topol EJ. 2004. Effect of clopidogrel pretreatment on inflammatory marker expression in patients undergoing percutaneous coronary intervention. *Am J Cardiol* 93(6):679–84.
- (132) Rand ML, Leung R, Packham MA. 2003. Platelet function assays. *Transfus Apher Sci* 28(3):307–17.
- (133) Reichenberger F, Wirtz H, Paschke R. 2001. Clopidogrel and side effects. *Cardiology* 96(1):51–2.
- (134) Rock GA. Management of thrombotic thrombocytopenic purpura. 2000. *Br J Haematol* 109(3):496–507.
- (135) Roden DM, Altman RB, Benowitz NL, Flockhart DA, Giacomini KM, Johnson JA, Krauss RM, McLeod HL, Ratain MJ, Relling MV, Ring HZ, Shuldiner AR, Weinshilboum RM, Weiss ST. 2006. Pharmacogenetics Research Network. Pharmacogenomics: challenges and opportunities. *Ann Intern Med* 145(10):749–57.
- (136) Rolf MG, Mahaut-Smith MP. 2002. Effects of enhanced P2X1 receptor Ca²⁺ influx on functional responses in human platelets. *Thromb Haemost* 88(3):495–502.
- (137) Rosenfeld SJ, Gralnick HR. 1997. Adhesive interactions in hemostasis. *Acta Haematol* 97(1–2):118–25.
- (138) Ruggeri ZM. 2002. Platelets in atherothrombosis. *Nat Med* 8(11):1227–34.
- (139) Sabatine MS, Cannon CP, Gibson CM, López-Sendón JL, Montalescot G, Theroux P, Claeys MJ, Cools F, Hill KA, Skene AM, McCabe CH, Braunwald E; CLARITY-TIMI 28 Investigators. 2005. Addition of clopidogrel to aspirin and fibrinolytic therapy for myocardial infarction with ST-segment elevation. *N Engl J Med* 352(12):1179–89.
- (140) Sacco RL, Adams R, Albers G, Alberts MJ, Benavente O, Furie K, Goldstein LB, Gorelick P, Halperin J, Harbaugh R, Johnston SC, Katzan I, Kelly-Hayes M, Kenton EJ, Marks M, Schwamm LH, Tomsick T. 2006. Guidelines for prevention of stroke in patients with ischemic stroke or transient ischemic attack: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association Council on Stroke: co-sponsored by the Council on Cardiovascular Radiology and

- Intervention: the American Academy of Neurology affirms the value of this guideline. *Circulation* 113(10):409–49.
- (141) Santoso S, Kunicki TJ, Kroll H, Haberbosch W, Gardemann A. 1999. Association of the platelet glycoprotein Ia C807T gene polymorphism with nonfatal myocardial infarction in younger patients. *Blood* 93(8):2449–2453.
 - (142) Sarafoff N, Byrne RA, Sibbing D. 2012. Clinical use of clopidogrel. *Curr Pharm Des* 18(33): 5224–39.
 - (143) Savi P, Pereillo JM, Uzabiaga MF, Combalbert J, Picard C, Maffrand JP, Pascal M, Herbert JM. 2000. Identification and biological activity of the active metabolite of clopidogrel. *Thromb Haemost* 84(5):891–6.
 - (144) Savic M, Hauert J, Bachmann F, Wyld PJ, Geudelin B, Cariou R. 1999. Clopidogrel loading dose regimens: kinetic profile of pharmacodynamic response in healthy subjects. *Semin Thromb Hemost* 25 Suppl 2:15–9.
 - (145) Saw J, Steinhubl SR, Berger PB, Kereiakes DJ, Serebruany VL, Brennan D, Topol EJ. 2003. Clopidogrel for the Reduction of Events During Observation Investigators. Lack of adverse clopidogrel-atorvastatin clinical interaction from secondary analysis of a randomized, placebo-controlled clopidogrel trial. *Circulation* 108(8):921–4.
 - (146) Schäffeler E, Eichelbaum M, Brinkmann U, Penger A, Asante-Poku S, Zanger UM, Schwab M. 2001. Frequency of C3435T polymorphism of MDR1 gene in African people. *Lancet* 358(9279):383–4.
 - (147) Schettert IT, Pereira AC, Lopes NH, Hueb WA, Krieger JE. 2006. Association between platelet P2Y12 haplotype and risk of cardiovascular events in chronic coronary disease. *Thromb Res* 118(6):679–83.
 - (148) Schirmer M, Toliat MR, Haberl M, Suk A, Kamdem LK, Klein K, Brockmöller J, Nürnberg P, Zanger UM, Wojnowski L. 2006. Genetic signature consistent with selection against the CYP3A4*1B allele in non-African populations. *Pharmacogenet Genomics* 16(1):59–71.
 - (149) Schroth W, Antoniadou L, Fritz P, Schwab M, Muerdter T, Zanger UM, Simon W, Eichelbaum M, Brauch H. 2007. Breast cancer treatment outcome with adjuvant tamoxifen relative to patient CYP2D6 and CYP2C19 genotypes. *J Clin Oncol* 25(33):5187–5193.
 - (150) Schwab M, Marx C, Zanger UM, Eichelbaum M. 2002. Pharmakogenetik der Zytochrom-P-450-Enzyme: Bedeutung für Wirkungen und Nebenwirkungen von Medikamenten. *Dtsch. Ärztebl* 99(8):A–497 /B–400 / C–377.
 - (151) Schwarz UR, Geiger J, Walter U, Eigenthaler M. 1999. Flow cytometry analysis of intracellular VASP phosphorylation for the assessment of activating and inhibitory signal transduction pathways in human platelets-definition and detection of ticlopidine/clopidogrel effects. *Thromb Haemost* 82(3):1145–52.
 - (152) Serruys PW, de Feyter P, Macaya C, Kokott N, Puel J, Vrolix M, Branzi A, Bertolami MC, Jackson G, Strauss B, Meier B. 2002. Lescol Intervention Prevention Study (LIPS) Investigators. Fluvastatin for prevention of cardiac events following successful first percutaneous coronary intervention: a randomized controlled trial. *JAMA* 287(24):3215–22.

- (153) Seyfarth HJ, Kokschi M, Roethig G, Rother T, Neugebauer A, Klein N, Pfeiffer D. 2002. Effect of 300- and 450-mg clopidogrel loading doses on membrane and soluble P-selectin in patients undergoing coronary stent implantation. *Am Heart J* 143(1):118–23.
- (154) Serebruany VL, Malinin AI, Callahan KP, Gurbel PA, Steinhubl SR. 2001. Statins do not affect platelet inhibition with clopidogrel during coronary stenting. *Atherosclerosis* 159(1):239–41.
- (155) Serebruany VL, Midei MG, Malinin AI, Oshrine BR, Lowry DR, Sane DC, Tanguay JF, Steinhubl SR, Berger PB, O'Connor CM, Hennekens CH. 2004. Absence of interaction between atorvastatin or other statins and clopidogrel: results from the interaction study. *Arch Intern Med* 164(18):2051–7.
- (156) Serebruany VL, Steinhubl SR, Berger PB, Malinin AI, Bhatt DL, Topol EJ. 2005. Variability in platelet responsiveness to clopidogrel among 544 individuals. *J Am Coll Cardiol* 45(2):246–51.
- (157) Servoss SJ, Wan Y, Snapinn SM, DiBattiste PM, Zhao XQ, Theroux P, Jang IK, Januzzi JL Jr. 2004. PRISM-PLUS trial Tirofiban therapy for patients with acute coronary syndromes and prior coronary artery bypass grafting in the PRISM-PLUS trial. *Am J Cardiol* 93(7):843–7.
- (158) Shuldiner AR, O'Connell JR, Bliden KP, Gandhi A, Ryan K, Horenstein RB, Damcott CM, Pakyz R, Tantry US, Gibson Q, Pollin TI, Post W, Parsa A, Mitchell BD, Faraday N, Herzog W, Gurbel PA. 2009. Association of cytochrome P450 2C19 genotype with the antiplatelet effect and clinical efficacy of clopidogrel therapy. *JAMA* 302(8):849–57.
- (159) Sibbing D, Koch W, Gebhard D, Schuster T, Braun S, Stegherr J, Morath T, Schömig A, von Beckerath N, Kastrati A. 2010. Cytochrome 2C19*17 allelic variant, platelet aggregation, bleeding events, and stent thrombosis in clopidogrel-treated patients with coronary stent placement. *Circulation* 121(4):512–8.
- (160) Sim SC, Risinger C, Dahl ML, Aklillu E, Christensen M, Bertilsson L, Ingelman-Sundberg M. 2006. A common novel CYP2C19 gene variant causes ultrarapid drug metabolism relevant for the drug response to proton pump inhibitors and antidepressants. *Clin Pharmacol Ther* 79(1):103–13.
- (161) Simon T, Verstuyft C, Mary-Krause M, Quteineh L, Drouet E, Méneveau N, Steg PG, Ferrières J, Danchin N, Becquemont L. 2009. French Registry of Acute ST-Elevation and Non-ST-Elevation Myocardial Infarction (FAST-MI) Investigators. Genetic determinants of response to clopidogrel and cardiovascular events. *N Engl J Med* 360(4):363–75.
- (162) Smith SM, Judge HM, Peters G, Armstrong M, Fontana P, Gaussem P, Daly ME, Storey RF. 2006. Common sequence variations in the P2Y12 and CYP3A5 genes do not explain the variability in the inhibitory effects of clopidogrel therapy. *Platelets* 17(4):250–258.
- (163) Spaulding C, Daemen J, Boersma E, Cutlip DE, Serruys PW. 2007. A pooled analysis of data comparing sirolimus-eluting stents with bare-metal stents. *N Engl J Med* 356(10):989–97.

- (164) Sofi F, Marcucci R, Gori AM, Giusti B, Abbate R, Gensini GF. 2010. Clopidogrel non-responsiveness and risk of cardiovascular morbidity. An updated meta-analysis. *Thromb Haemost* 103(4):841–8.
- (165) Steinhubl SR, Berger PB, Mann JT 3rd, Fry ET, DeLago A, Wilmer C, Topol EJ. 2002. Early an sustained dual oral antiplatelet therapy following percutaneous coronary intervention: a randomized controlled trial. CREDO Investigators. *JAMA* 288(19):2411–20.
- (166) Steinhubl SR, Tan WA, Foody JM, Topol EJ. 1999. Incidence and clinical course of thrombotic thrombocytopenic purpura due to ticlopidine following coronary stenting. EPISTENT Investigators. Evaluation of Platelet IIb/IIIa Inhibitor for Stenting. *JAMA* 281(9):806–10.
- (167) Stellbaum C, Ayral Y, Morguet A, Schultheiss HP, Rauch U. 2012. Doubling the clopidogrel dose in patients with reduced responsiveness to the standard dose is associated with a limited effectiveness as evaluated by impedance aggregometry. *Cardiovasc Revasc Med* 13(3):159–66.
- (168) Stettler C, Wandel S, Allemann S, Kastrati A, Morice MC, Schömig A, Pfisterer ME, Stone GW, Leon MB, de Lezo JS, Goy JJ, Park SJ, Sabaté M, Suttorp MJ, Kelbaek H, Spaulding C, Menichelli M, Vermeersch P, Dirksen MT, Cervinka P, Petronio AS, Nordmann AJ, Diem P, Meier B, Zwahlen M, Reichenbach S, Trelle S, Windecker S, Jüni P. 2007. Outcomes associated with drug-eluting and bare-metal stents: a collaborative network meta-analysis. *Lancet* 370(9591):937–48.
- (169) Stone GW, Moses JW, Ellis SG, Schofer J, Dawkins KD, Morice MC, Colombo A, Schampaert E, Grube E, Kirtane AJ, Cutlip DE, Fahy M, Pocock SJ, Mehran R, Leon MB. 2007. Safety and efficacy of sirolimus- and paclitaxel-eluting coronary stents. *N Engl J Med* 356(10):998–1008.
- (170) Sugimoto K, Uno T, Yamazaki H, Tateishi T. 2008. Limited frequency of the CYP2C19*17 allele and its minor role in a Japanese population. *Br J Clin Pharmacol* 65(3):437–9.
- (171) Suh JW, Koo BK, Zhang SY, KW Park, Cho JY, Jang IJ, Lee DS, Sohn DW, Lee MM, Kim HS. 2006. Increased risk of atherothrombotic events associated with cytochrome P450 3A5 polymorphism in patients taking clopidogrel. *CMAJ* 174(12):1715–22.
- (172) Takano S, Kimura J, Matsuoka I, Ono T. 1999. No requirement of P2X1 purinoceptors for platelet aggregation. *European Journal of Pharmacology* 372:305–9.
- (173) Takasaki J, Kamohara M, Saito T, Matsumoto M, Matsumoto S, Ohishi T, Soga T, Matsushime H, Furuichi K. 2001. Molecular cloning of the platelet P2T(AC) ADP receptor: pharmacological comparison with another ADP receptor, the P2Y(1) receptor. *Mol Pharmacol* 60(3):432–9.
- (174) Tamura T, Sakaeda T, Kadoyama K, Okuno Y. 2012. Aspirin- and Clopidogrel-associated Bleeding Complications: Data Mining of the Public Version of the FDA Adverse Event Reporting System, AERS. *Int J Med Sci* 9(6):441–6.
- (175) Tanaka A, Sakakibara M, Okumura S, Okada K, Ishii H, Murohara T. 2012. Comparison of early outcomes after primary stenting in Japanese patients with acute myocardial infarction between clopidogrel and

- ticlopidine in concomitant use with protonpump inhibitor. *J Cardiol* 60(1):7–11.
- (176) Taubert D, Kastrati A, Harlfinger S, Gorchakova O, Lazar A, von Beckerath N, Schömig A, Schömig E. 2004. Pharmacokinetics of clopidogrel after administration of a high loading dose. *Thromb Haemost* 92(2):311–6.
- (177) Taubert D, von Beckerath N, Grimberg G, Lazar A, Jung N, Goeser T, Kastrati A, Schömig A, Schömig E. 2006. Impact of P-glycoprotein on clopidogrel absorption. *Clin Pharmacol Ther* 80(5):486–501.
- (178) Tepe G, Bantleon R, Brechtel K, Schmehl J, Zeller T, Claussen CD, Strobl FF. 2012. Management of peripheral arterial interventions with mono or dual antiplatelet therapy-the MIRROR study: a randomised and double-blinded clinical trial. *Eur Radiol* 22(9):1998–2006.
- (179) Thebault JJ, Kieffer G, Cariou R. 1999. Single-dose pharmacodynamics of clopidogrel. *Semin Thromb Hemost* 25 Suppl 2:3–8.
- (180) Thjodleifsson B. 2002. Treatment of acid-related diseases in the elderly with emphasis on the use of proton pump inhibitors. *Drugs Aging* 19(12):911–27.
- (181) Tost J, Gut IG. 2005. Genotyping single nucleotide polymorphisms by MALDI mass spectrometry in clinical applications. *Clin Biochem* 38(4):335–50.
- (182) Transon C, Leemann T, Dayer P. 1996. In vitro comparative inhibition profiles of major human drug metabolising cytochrome P450 isozymes (CYP2C9, CYP2D6 and CYP3A4) by HMG-CoA reductase inhibitors. *Eur J Clin Pharmacol* 50(3):209–15.
- (183) Trenk D, Hochholzer W, Fromm MF, Chialda LE, Pahl A, Valina CM, Stratz C, Schmiebusch P, Bestehorn HP, Büttner HJ, Neumann FJ. 2008. Cytochrome P450 2C19 681G>A polymorphism and high on-clopidogrel platelet reactivity associated with adverse 1-year clinical outcome of elective percutaneous coronary intervention with drug-eluting or bare-metal stents. *J Am Coll Cardiol* 51(20):1925–34.
- (184) Trenk D, Hochholzer W, Fromm MF, Zolk O, Valina CM, Stratz C, Neumann FJ. 2011. Paraoxonase-1 Q192R polymorphism and antiplatelet effects of clopidogrel in patients undergoing elective coronary stent placement. *Circ Cardiovasc Genet* 4(4):429–36.
- (185) Vane JR, Bakhle YS, Botting RM. 1998. Cyclooxygenases 1 and 2. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 38:97–120.
- (186) Vivekananthan DP, Bhatt DL, Chew DP, Zidar FJ, Chan AW, Moliterno DJ, Ellis SG, Topol EJ. 2004. Effect of clopidogrel pretreatment on periprocedural rise in C-reactive protein after percutaneous coronary intervention. *Am J Cardiol* 94(3):358–60.
- (187) Wandel C, Witte JS, Hall JM, Stein CM, Wood AJ, Wilkinson GR. 2000. CYP3A activity in African American and European American men: population differences and functional effect of the CYP3A4*1B5'-promoter region polymorphism. *Clin Pharmacol Ther* 68(1):82–9.
- (188) Weber AA, Braun M, Hohlfeld T, Schwippert B, Tschöpe D, Schrör K. 2001. Recovery of platelet function after discontinuation of clopidogrel treatment in healthy volunteers. *Br J Clin Pharmacol* 52(3):333–6.

- (189) Weitz JI, Hirsh J, Samama MM; American College of Chest Physicians. 2008. New antithrombotic drugs: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines (8th Edition). *Chest* 133(6 Suppl):234S–256S.
- (190) Wenaweser P, Dörffler-Melly J, Imboden K, Windecker S, Togni M, Meier B, Haerberli A, Hess OM. 2005. Stent thrombosis is associated with an impaired response to antiplatelet therapy. *J Am Coll Cardiol* 45(11):1748–52.
- (191) Westlind-Johnsson A, Hermann R, Huennemeyer A, Hauns B, Lahu G, Nassr N, Zech K, Ingelman-Sundberg M, von Richter O. 2006. Identification and characterization of CYP3A4*20, a novel rare CYP3A4 allele without functional activity. *Clin Pharmacol Ther* 79(4):339–49.
- (192) Wienbergen H, Gitt AK, Schiele R, Juenger C, Heer T, Meisenzahl C, Limbourg P, Bossaller C, Senges J; MITRA PLUS Study Group. 2003. Comparison of clinical benefits of clopidogrel therapy in patients with acute coronary syndromes taking atorvastatin versus other statin therapies. *Am J Cardiol* 92(3):285–8.
- (193) Wiviott SD, Antman EM. 2004. Clopidogrel resistance: a new chapter in a fast-moving story. *Circulation* 109(25):3064–7.
- (194) Wöhrle J. 2007. Stent thrombosis in the era of drug-eluting stents. *Herz* 32(5):411–8.
- (195) Xiao Z, Thérroux P. 2004. Clopidogrel inhibits platelet-leukocyte interactions and thrombin receptor agonist peptide-induced platelet activation in patients with an acute coronary syndrome. *J Am Coll Cardiol* 43(11):1982–8.
- (196) Yang J, Wu J, Jiang H, Mortensen R, Austin S, Manning DR, Woulfe D, Brass LF. 2002. Signaling through Gi family members in platelets. Redundancy and specificity in the regulation of adenylyl cyclase and other effectors. *J Biol Chem* 277(48):46035–42.
- (197) Yusuf S. 2002. Two decades of progress in preventing vascular disease. *Lancet* 360(9326):2–3.
- (198) Yusuf S, Zhao F, Mehta SR, Chrolavicius S, Tognoni G, Fox KK. 2001. Clopidogrel in Unstable Angina to Prevent Recurrent Events Trial Investigators. Effects of clopidogrel in addition to Acetylsalicylsäure in patients with acute coronary syndromes without ST-segment elevation. *N Engl J Med* 345(7):494–502.
- (199) Zakarija A, Bandarenko N, Pandey DK, Auerbach A, Raisch DW, Kim B, Kwaan HC, McKoy JM, Schmitt BP, Davidson CJ, Yarnold PR, Gorelick PB, Bennett CL. 2004. Clopidogrel-associated TTP: an update of pharmacovigilance efforts conducted by independent researchers, pharmaceutical suppliers, and the Food and Drug Administration. *Stroke* 35(2):533–7.
- (200) Zhang FL, Luo L, Gustafson E, Lachowicz J, Smith M, Qiao X, Liu YH, Chen G, Pramanik B, Laz TM, Palmer K, Bayne M, Monsma FJ Jr. 2001. ADP is the cognate ligand for the orphan G protein-coupled receptor SP1999. *J Biol Chem* 276(11):8608–15.

- (201) Zhang H, Ragueneau-Majlessi I, Levy RH. 2009. Interaction between clopidogrel and proton pump inhibitors: hypothesis to explain multifactorial CYP2C19 inhibition. *Drug Metab Lett* 3(4):287–9.
- (202) Zhao F, Wang J, Yang Y, Wang X, Shi R, Xu Z, Huang Z, Zhang G. 2008. Effect of CYP2C19 genetic polymorphisms on the efficacy of proton pump inhibitor-based triple therapy for *Helicobacter pylori* eradication: a meta-analysis. *Helicobacter* 13(6):532–41.
- (203) Zuern CS, Geisler T, Lutilsky N, Winter S, Schwab M, Gawaz M. 2010. Effect of comedication with proton pump inhibitors (PPIs) on post-interventional residual platelet aggregation in patients undergoing coronary stenting treated by dual antiplatelet therapy. *Thromb Rest* 125(2):51–4.

Danksagung

Herrn Professor Dr. T. Geisler danke ich für die Überlassung des Themas und die Betreuung während der Anfertigung der Arbeit.

Dem Ärztlichen Direktor der Abteilung Innere Medizin III (Schwerpunkt: Kardiologie und Kreislaufkrankungen, Herrn Prof. Dr. M. Gawaz, danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

Curriculum vitae

Name, Vorname: Buse, Verena
Geburtsdatum: 05.04.1984
Geburtsort: Kiel
Staatsbürgerschaft: deutsch

Beruf

Oktober 2010 – März 2011 Assistenzärztin, Anästhesiologie,
Universitätsklinikum Würzburg
April 2011 – September 2011 Assistenzärztin, Innere Medizin,
Universitätsklinikum Frankfurt am Main
seit Oktober 2011 Assistenzärztin, Anästhesiologie,
Universitätsklinikum Würzburg

Studium

WS 2003/04 – SS 2004 Agrarökologie, Universität Rostock
WS 2004/05 – WS 2009/10 Humanmedizin, Eberhard Karls Universität
Tübingen
27. März 2006 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
15. Juni 2010 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
21. Juni 2010 Approbation

Praktisches Jahr 2009

Februar – Juni Universitäts-Frauenklinik, Tübingen
Juni – August Allgemein Chirurgie, Kantonsspital Glarus/
Schweiz

| | |
|--------------------|--|
| August – Oktober | Allgemeinchirurgie, Universitätsklinikum Tübingen |
| Oktober – Dezember | Innere Medizin, Universitätsklinikum Tübingen |

Famulaturen

| | |
|-----------------------|---|
| Juli – September 2003 | Krankenpflegepraktikum, Clemenshospital, Münster |
| August 2006 | Famulatur Innere Medizin und Neurologie, Krankenhaus Göttlicher Heiland, Wien |
| März 2007 | Praxisfamulatur Allgemeinmedizin, Dr. med. M. Datz, Tübingen |
| Februar – März 2008 | Famulatur, Emergency Medicine, Doctors Hospital, Bahamas/USA |
| Juli – August 2008 | Famulatur Akutgeriatrie und Schlaganfall- einheit, Katholisches Klinikum Mainz (kkm), St. Hildegardis-Krankenhaus |

Schulbildung

| | |
|---------------|--|
| 1990 – 1993 | Goethe-Grundschule, Kiel |
| 1993 – 1994 | Brüder-Grimm-Schule, Grundschule Krons- hagen |
| 1994 – 1995 | Kieler Gelehrtenschule, Kiel |
| 1994 – 2003 | Gymnasium Paulinum, Münster |
| 28. Juni 2003 | Abitur am Gymnasium Paulinum, Münster |

Würzburg, den 14. Oktober 2013