

Aus der Klinik für Kardiologie, Pneumologie und Angiologie
des Universitätsklinikums Düsseldorf
Direktor: Prof. Dr. med. Malte Kelm

Plättchenreaktivität unter Acetylsalicylsäure- und Clopidogrel-Therapie –
Anwendung und Evaluation von Thrombozytenfunktionstests

Publikationsbasierte Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Carolin Helten

im Jahr 2020

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: PD Dr. med. Tobias Zeus

Zweitgutachter: PD Dr. med. Johannes Schneppendahl

– Meiner Familie und meinem Freund –

„Es muss von Herzen kommen, was auf Herzen wirken soll.“

Johann Wolfgang von Goethe: Faust. Der Tragödie zweiter Teil. Phorkyas. Stuttgart, 1832, S. 232

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

1) **Helten C**, Naguib D, Dannenberg L, Pöhl M, Ayhan A, Hohlfeld T, Levkau B, Kelm M, Zeus T, Polzin A. Platelet function testing: dead or alive. *J Thromb Haemost.* 2018 May;16(5):984-6.

2) Polzin A*, **Helten C***, Dannenberg L, Mourikis P, Naguib D, Achilles A, Knoop B, Zako S, Rehder S, Görlinger K, Levkau B, Zeus T, Kelm M, Hohlfeld T, Hoffmann T. Platelet Reactivity in Patients on Aspirin and Clopidogrel Therapy Measured by a New Bedside Whole-Blood Assay. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2019 Jan;73(1):40-7.

Zusammenfassung

Duale Plättchenhemmung (DAPT) mit Acetylsalicylsäure (ASS) und P2Y₁₂-Hemmern ist die Standardtherapie bei Koronarer Herzkrankheit (KHK) und Perkutaner Koronarintervention (PCI). Jedoch variiert der therapeutische Effekt hinsichtlich der Pharmakodynamik. Eine verminderte pharmakodynamische Antwort auf Plättchenhemmer wird *high on-treatment platelet reactivity* (HTPR) genannt und ist mit einer erhöhten Mortalität und ischämischen Ereignissen vergesellschaftet. Eine übersteigerte Antwort auf DAPT heißt hingegen *low on-treatment platelet reactivity* (LTPR). Hierunter ereignen sich vermehrt Blutungskomplikationen. Insbesondere ältere Patienten haben ein erhöhtes Blutungsrisiko. In unserer alternden Gesellschaft erscheint eine Überwachung der Plättchenfunktion und Ermittlung eines therapeutischen Bereichs für Plättchenhemmer deshalb relevant. In einigen Studien wurden daraufhin maßgeschneiderte gegen konservative Therapieschemata verglichen. Mit Ausnahme einer Studie reduzierte unabhängig von der Patientenpopulation, der Art des P2Y₁₂-Hemmers oder des Gabeschemas eine maßgeschneiderte Plättchenhemmung nicht die Rate an *major adverse cardiac and cerebrovascular events* (MACCE). Der Grund hierfür ist unklar, möglich wäre die Wahl des Plättchenfunktionstests (PFT). Der optimale Test zur Bestimmung der pharmakodynamischen Antwort auf Thrombozytenfunktionshemmer sollte sowohl praktisch, zeitsparend als auch pharmakologisch hochspezifisch sein. Deshalb untersuchten wir den neuartigen ROTEM® *platelet* Assay. Außerdem verglichen wir etablierte PFTs (Lichttransmissionsaggregometrie, Multiple-Elektroden-Aggregometrie und *vasodilator-stimulated phosphoprotein* Assay) bei 47 ASS- und 46 DAPT-Patienten. *Receiver operating characteristic* Analysen zeigten, dass ROTEM® *platelet* gut zwischen therapierten Patienten und gesunden Individuen diskriminiert. *Pearsons* Regressionsanalyse ermittelte mittlere bis schwache Korrelationen zwischen den verschiedenen PFTs. Es fiel auf, dass die Kategorisierung in eine HTPR oder LTPR sich sehr deutlich zwischen den verschiedenen Verfahren unterschied. In 17% der Fälle gab ein Test eine HTPR an, während ein anderer eine LTPR zeigte. Dies erschwert eine Übertragung auf die klinische Anwendung und Anpassung von Therapie-Regimen. Weitere klinische Studien sind notwendig zur Einschätzung des ROTEM® *platelet* hinsichtlich seiner Fähigkeit Patienten mit erhöhtem Risiko für MACCE zu detektieren.

Summary

Dual antiplatelet therapy (DAPT) with acetylsalicylic acid (ASA) and P2Y₁₂ inhibitors is essential after percutaneous coronary intervention (PCI) in patients with coronary artery disease. The pharmacodynamic reaction however differs between patients. High on-treatment platelet reactivity (HTPR) means an impaired pharmacodynamic response to antiplatelet therapy. HTPR is associated with a higher mortality rate and ischemic events. In contrast, an exaggerated response to antiplatelet medication results in low on-treatment platelet reactivity (LTPR). Consequently, a higher incidence of bleeding complications is found in patients with LTPR. As elderly patients have a high risk of bleeding, regular monitoring of their platelet reactivity could be beneficial. A therapeutic window for antiplatelet medication could then be determined. Therefore, clinical trials recently compared tailored to standard of care antiplatelet regimens. A reduction of major adverse cardiac and cerebrovascular events (MACCE) could not be achieved by tailored antiplatelet medication, regardless of patient population, type of P2Y₁₂ inhibitor or application scheme, except for one trial. A possible reason may be the selected platelet function test (PFT). The perfect PFT should be user-friendly, quick and highly specific in its determination of a therapeutic window for antiplatelet medication. In this context, we evaluated the novel ROTEM® platelet assay. Furthermore, we compared established PFTs (light transmission aggregometry, multiple electrode aggregometry and vasodilator-stimulated phosphoprotein flow cytometry) and their ability to monitor antiplatelet therapy in 47 patients on ASA medication and 46 patients on DAPT with ASA and clopidogrel. Receiver operating characteristic analyses showed that ROTEM® platelet differentiates well between patients on medication and healthy individuals. Pearson regression analyses revealed moderate to poor correlations between the PFTs. It appeared that a categorization of HTPR and LTPR differs immensely between the assays. In 17% of patients, one test showed HTPR whereas another showed LTPR. A transfer to clinical usage and adaptation of therapy regimens is therefore difficult.

Clinical trials are needed to investigate the ability of this new assay to identify patients at risk of adverse events.

Abkürzungsverzeichnis

AA = Arachidonsäure
ACS = Acute coronary syndrome / Akutes Koronarsyndrom
ADP = Adenosindiphosphat
aPTT = aktivierte partielle Thromboplastinzeit
ASS = Acetylsalicylsäure
AU = aggregation units
AUC = area under the curve
cAMP = cyclisches Adenosinmonophosphat
CAD = coronary artery disease
CLSI = Clinical and Laboratory Standards Institute
COX = Cyclooxygenase
CYP = Cytochrom P
DAPT = dual antiplatelet therapy
DGK = Deutsche Gesellschaft für Kardiologie
ESC = European Society of Cardiology
F = Faktor (Gerinnungskaskade)
GP = Glykoprotein
HTPR = high on-treatment platelet reactivity
INR = International Normalized Ratio
i.v. = intravenös
KHK = Koronare Herzkrankheit
KI = Konfidenzintervall / CI = confidence interval
LTPR = low on-treatment platelet reactivity
LTA = light transmission aggregometry
MACCE = major adverse cardiac and cerebrovascular events
MEA = multiple electrode aggregometry
MFI = mean fluorescence intensity
MG = Molekulargewicht
min = Minute(n)
MoA = maximum of aggregation
MS = maximum slope
NOAK = Nicht-Vitamin-K-abhängiges orales Antikoagulans
PAP = plättchenarmes Plasma

PCI = percutaneous coronary intervention

PFT = Plättchenfunktionstest

PGE1 = Prostaglandin E1

PRI = platelet reactivity index

PRP = plättchenreiches Plasma

ROC = receiver operating characteristic

ROTEM-PTL = ROTEM® platelet

SD = standard deviation

TEM = Thromboelastometrie

TP = Thromboxan-Prostanoid-Rezeptor

VASP = vasodilator-stimulated phosphoprotein

VASP-P = phosphoryliertes VASP

VKA = Vitamin-K-Antagonist

vWF = von-Willebrand-Faktor

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Die Bedeutung der koronaren Herzkrankheit.....	1
1.2 Der Thrombozyt als zentrales Element der Hämostase.....	1
1.3 Pharmakotherapie: Die duale Plättchenhemmung	5
1.3.1 Acetylsalicylsäure	6
1.3.2 Die Chronologie der P2Y ₁₂ -Hemmer	7
1.3.3 Duale antithrombozytäre Therapie (DAPT).....	9
1.3.4 DAPT und orale Antikoagulation	11
1.4 High und Low On-Treatment Platelet Reactivity.....	12
1.5 Rationale für eine Überwachung der Thrombozytenfunktion.....	13
1.6 Studienlage	13
1.7 Ethikvotum.....	14
1.8 Fragestellung und Ziele dieser Arbeit.....	14
2 Platelet function testing: dead or alive. Helten C, Naguib D, Dannenberg L, Pöhl M, Ayhan A, Hohlfeld T, Levkau B, Kelm M, Zeus T, Polzin A. J Thromb Haemost. 16(5):984-6, (2018)	15
3 Platelet Reactivity in Patients on Aspirin and Clopidogrel Therapy Measured by a New Bedside Whole-Blood Assay. Polzin A*, Helten C*, Dannenberg L, Mourikis P, Naguib D, Achilles A, Knoop B, Zako S, Rehder S, Görlinger K, Levkau B, Zeus T, Kelm M, Hohlfeld T, Hoffmann T. J Cardiovasc Pharmacol. 73(1):40-7, (2019)	16
4 Weiteres Material und weitere Methoden.....	17
4.1 Studienpopulation und -design.....	17
4.2 Blutentnahme	17
4.3 Lichttransmissionsaggregometrie.....	18
4.4 Multiple-Elektroden-Aggregometrie	18
4.5 ROTEM® platelet.....	18
4.6 Vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) Phosphorylierungs-Assay	20
4.7 Geräte, Substanzen und Puffer	21
4.7.1 Geräte	21
4.7.2 Substanzen.....	22
4.7.3 Lösungen und Puffer	23

4.8 Statistische Analysen	23
5 Weitere Ergebnisse.....	24
5.1 Patientencharakteristika.....	24
5.2 Korrelation verschiedener Assays.....	29
5.3 Unterscheidung von gesunden Probanden und behandelten Patienten	31
5.4 Definition von HTPR mit ROTEM® platelet.....	32
5.5 Einschätzung des Therapieerfolgs mit etablierten Verfahren.....	33
6 Diskussion	34
6.1 ROTEM platelet.....	34
6.2 Datenlage zu anderen Methoden.....	35
6.3 Unterschiede zwischen den Methoden.....	37
6.3.1 Präanalytik: Probenart.....	37
6.3.2 Reagenzien verschiedener Hersteller.....	38
6.3.3 Der Zeitfaktor	38
6.3.4 Der historische Goldstandard.....	39
6.3.5 VASP und Clopidogrel	39
6.4 Variabilität der Clopidogrel-Wirksamkeit.....	40
6.5 Anforderungen an einen Plättchenfunktionstest.....	41
6.6 Limitationen.....	41
6.7 Schlussfolgerungen.....	41
7 Literatur- und Quellenverzeichnis	43

1 Einleitung

1.1 Die Bedeutung der koronaren Herzkrankheit

Kardiovaskuläre Krankheiten und ihre Folgen haben eine hohe Bedeutung in der Gesellschaft. Im Jahr 2015 waren weltweit 422,7 Millionen Menschen von einer Herz-Kreislauf-Erkrankung betroffen – 17,92 Millionen verstarben daran. Davon wiederum starben 8,92 Millionen an einer koronaren Herzkrankheit (KHK), welche damit die Todesursache Nummer eins weltweit darstellt (1).

Die Therapie mit Acetylsalicylsäure (ASS) und einem P2Y₁₂-Hemmer wie Clopidogrel als duale Plättchenhemmung (DAPT) sind als Sekundärprävention nach Herzinfarkt und perkutaner Koronar-Intervention (PCI) unerlässlich (2). Auch bei der stabilen KHK bzw. nach neuerer Definition beim chronischem Koronarsyndrom spielen beide Wirkstoffe eine wichtige Rolle. Bei gleichzeitig bestehendem Vorhofflimmern wird ein Nicht-Vitamin-K-abhängiges orales Antikoagulans (NOAK) gegenüber einem Vitamin-K-Antagonisten (VKA) bevorzugt, sofern ein NOAK bei einem Patienten grundsätzlich infrage kommt (3).

Bei einer antikoagulatorischen Therapie mit Heparin oder einem VKA wie Phenprocoumon wird der Therapieerfolg routinemäßig durch Parameter wie die aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT), dem Quick-Wert bzw. der *International Normalized Ratio* (INR) kontrolliert und, wenn notwendig, die Dosis des Medikaments angepasst. Für die Therapie mit ASS und P2Y₁₂-Hemmern wird dies in der klinischen Praxis üblicherweise nicht durchgeführt. Doch auch Thrombozytenfunktionshemmer können aus verschiedenen Gründen, auf die später noch eingegangen wird, eine verstärkte oder verminderte Wirkung aufweisen. Wenn unter Therapie die Plättchenreaktivität zu hoch ist, steigt das Risiko für thrombembolische und ischämische Ereignisse. Dies nennt man *high on-treatment platelet reactivity* (HTPR). Durch eine Optimierung der Therapie und damit einem Eingriff in die Hämostase könnten diese unter Umständen vermieden werden.

1.2 Der Thrombozyt als zentrales Element der Hämostase

Das Blutplättchen ist eine flache, kernlose Blutzelle, die sich im Rahmen der Thrombopoese aus Megakaryozyten bildet (4). Seine Lebensdauer beträgt ca. 10 Tage (5). Mit 2-4 µm ist es zwar die kleinste Blutzelle, spielt im Prozess dieser

thrombembolischen Ereignisse aber eine wichtige Rolle (6). Durch Adhäsion an der Gefäßwand, Aktivierung durch verschiedene Botenstoffe und schließlich Aggregation untereinander bilden Thrombozyten den zentralen Bestandteil des Thrombus. Dieser Thrombus sorgt für Gefäßverschlüsse, beispielsweise beim Schlaganfall im Gehirn, bei der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit im Bein oder eben bei der KHK im Herzen. In der Akutsituation bzw. beim akuten Koronarsyndrom (ACS) kann dies zur Ischämie und zum Myokardinfarkt führen. Kleinere Verschlüsse, sogenannte Mikroembolisationen in der Mikrozirkulation des Herzmuskels, führen ebenfalls zu Langzeitschäden.

Grundlage dieser Geschehnisse ist die primäre und sekundäre Hämostase. Die primäre oder zelluläre Hämostase wird initiiert, wenn durch einen Endothelschaden von-Willebrand-Faktor (vWF) und Kollagenfasern freigelegt werden. Der vWF adhärert an dem thrombozytären vWF-Rezeptorkomplex Glykoprotein (GP) Ib/V/IX und an Kollagen (7). Kollagen bindet außerdem an GPVI und Integrin $\alpha 2\beta 1$, was zur Aktivierung des im Blut vorbeischwimmenden Thrombozyten führt (8). Daraufhin werden verschiedene Wege in Gang gesetzt: Aus α -Granula werden größere Moleküle wie vWF, Faktor I, II, V, VIII, Fibrinectin, *platelet-derived growth factor* und *vascular endothelial growth factor* freigesetzt. Hingegen werden aus den elektronendichten δ -Granula kleinere Moleküle wie Adenosindiphosphat (ADP), Calcium-Ionen und Serotonin sezerniert (9). All diese Mediatoren erfüllen weitere Aufgaben im Rahmen der Hämostase. Außerdem wird die Cyclooxygenase (COX) 1 stimuliert, aus Arachidonsäure (AA) Thromboxan A₂ zu bilden (10). Das Blutplättchen vollzieht unter der Aktivierung eine Konformationsänderung – den sogenannten *shape change* – und geht von seiner flachen Form in eine rundliche Form mit Pseudopodien über (11). Über diese Ausläufer findet eine Vernetzung mithilfe des GPIIb/IIIa-Komplexes und Fibrinogen statt; die Thrombozyten bilden Aggregate, die den Endothelschaden als instabiler weißer Thrombus vorübergehend abdichten (12) (Abb. 1, (13)).

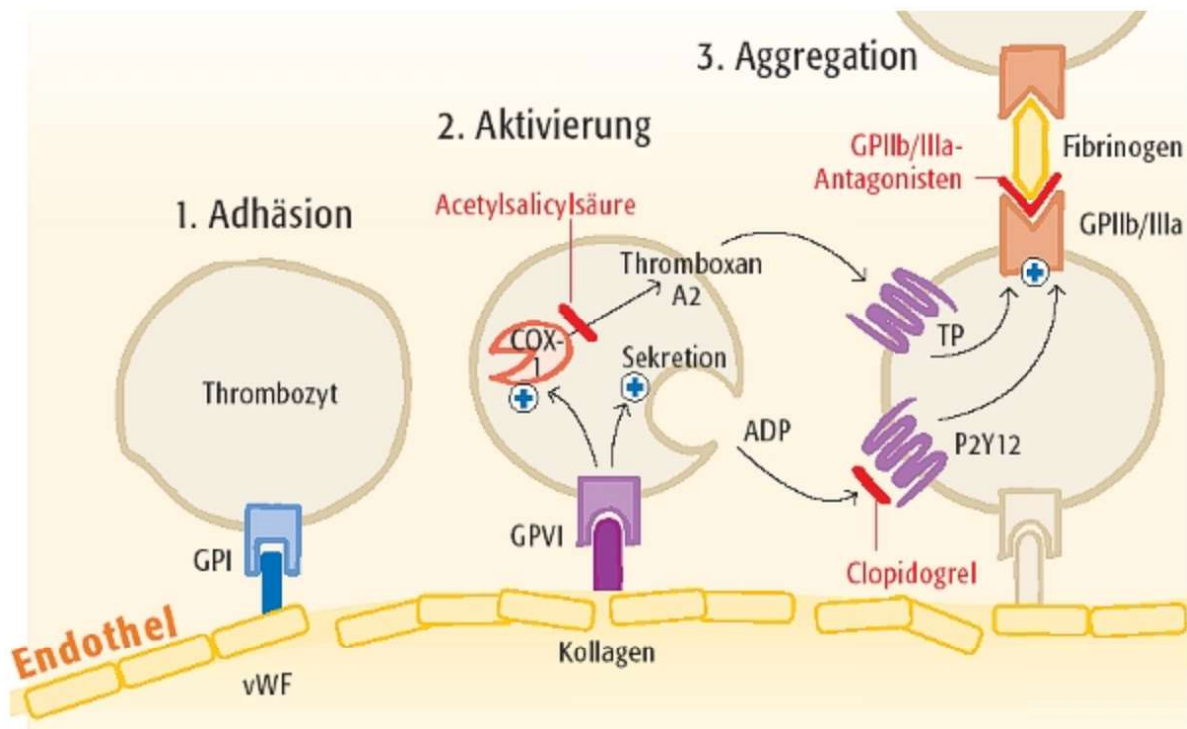


Abb. 1: Schematische Darstellung des Modells der primären Hämostase nach Lutz Hein, Aktuelle Therapie des Herzinfarkts, Pharmazeutische Zeitung, 15.05.2006, <https://www.pharmazeutische-zeitung.de/ausgabe-202006/aktuelle-therapie-des-herzinfarkts/> (13) (abgerufen 26.01.2020): Stufen der Thrombozytenaktivierung bei Schädigung des Endothels. Acetylsalicylsäure und Clopidogrel hemmen die Aggregation an verschiedenen Stellen. (COX = Cyclooxygenase, GP = Glykoprotein, P2Y12 = P2Y12-Rezeptor, TP = Thromboxan-Prostanoid-Rezeptor, vWF = von-Willebrand-Faktor)

Beim Stichwort Fibrinogen findet der Übergang zur sekundären bzw. plasmatischen Hämostase statt. Hauptsächlich besteht diese aus dem Ablauf der Gerinnungskaskade der plasmatischen Gerinnungsfaktoren mit dem Ziel der Fibrin-Bildung aus Fibrinogen. Hier unterscheidet man einen intrinsischen bzw. endogenen von einem extrinsischen bzw. exogenen Weg, die in einer gemeinsamen Endstrecke münden. Extrinsisch wird zunächst *tissue factor* freigesetzt, wenn im Körper ein Gefäßschaden auftritt. *Tissue factor* aktiviert Faktor (F) VII zu FVIIa, wodurch sich die sogenannte extrinsische Tenase aus *tissue factor*, FVIIa, Phospholipiden und Calcium-Ionen bildet. Diese Tenase spaltet sowohl FX als auch FIX (14). Man geht davon aus, dass hierüber nur ein kleiner Teil des am Ende der Gerinnungskaskade gebildeten Thrombins entstehen (15). Der überwiegende Teil entsteht durch den intrinsischen Weg, bei dem negativ geladene Oberflächen wie freigelegte Kollagenfasern oder durch positive Rückkopplung in der Blutzirkulation Kallikrein und

Kininogen FXII aktivieren. Dieser aktiviert wiederum FXI, der daraufhin FIX spaltet und aktiviert. Sowohl FIXa als auch durch Thrombin aktivierter FVIII sind auf der Oberfläche von Blutplättchen zu finden. Sie bilden zusammen die intrinsische Tenase. Diese mündet mit der extrinsischen Tenase in der gemeinsamen Endstrecke, wobei die intrinsische Tenase deutlich wirkungsvoller FX zu FXa aktiviert als der extrinsische Aktivierungsweg (16). Außerdem wird FV von Thrombin aktiviert und bildet als FVa den Prothrombinase-Komplex zusammen mit FXa, Phospholipiden und Calcium-Ionen. Dieser Komplex aktiviert nun FII zu FIIa, sprich Thrombin. Thrombin spaltet schlussendlich Faktor I, also Fibrinogen, zu Fibrin-Monomeren (17, 18).

Zur Gegenregulation von überschießender oder ungewollter Koagulation finden im Körper außerdem inhibitorische Prozesse statt. Antithrombin, Thrombomodulin, Protein C oder Protein S hemmen über verschiedene Wege die Gerinnungsfaktoren und lösen somit Thromben auf.

In vivo bietet sich eine zusammenhängendere Betrachtung der Blutstillung an, da primäre und sekundäre Hämostase, sowie extrinsisches und intrinsisches System der Gerinnungskaskade nicht isoliert voneinander ablaufen. Diese Betrachtungsweise wird als zellbasiertes Modell der Gerinnung bezeichnet und wurde erstmals 2001 vorgestellt (19). Es kombiniert Abläufe aus beiden Zweigen der Hämostase. Allerdings werden hierbei Zelloberflächen und deren Interaktion zwischen Rezeptor und Gerinnungsproteinen in den Vordergrund gestellt (19). Bei der Initiation wird Faktor FIII (auch Gewebethromboplastin oder *tissue factor*) durch einen Schaden am Endothel freigesetzt. FIII bindet an FVII und aktiviert diesen zu FVIIa (20). FVIIa und FIII bilden zusammen den extrinsischen Tenase-Komplex und spalten FX zu FXa. Durch FXa wird wenig FIIa (Thrombin) aktiviert, der sogenannte „Thrombin-Funke“. In der Phase der Amplifikation aktiviert diese geringe Menge FIIa den Thrombozyten als solchen und FXI, VIII und V. FVIII liegt gebunden an den vWF vor (21). FXIa wiederum aktiviert daraufhin FIX, dieser bildet mit FVIIIa einen Komplex. Dieser intrinsische Tenase-Komplex FVIIIa-FIXa aktiviert dann ebenfalls FX. Bei der Propagation bilden FXa und FVa den Prothrombinase-Komplex, der Prothrombin (FII) zu Thrombin (FIIa) spaltet. Hierbei entsteht eine deutlich größere Menge Thrombin auf der Plättchenoberfläche als zuvor beim extrinsischen Weg. Dies wird als „Thrombin-Burst“ bezeichnet. FIIa aktiviert nun FXIII und spaltet Fibrinogen (FI) zu Fibrin. Diese Monomere bilden zusammen ein Fibrinnetz, für dessen Stabilität FXIIIa sorgt. So entsteht ein roter

Gerinnungsthrombus (22), in dem sich auch Erythrozyten ansammeln, was ihm seine Farbe verleiht.

1.3 Pharmakotherapie: Die duale Plättchenhemmung

Um diesen prothrombotischen Prozessen entgegenzuwirken, wurden in den letzten Jahrzehnten einige antithrombozytär wirkende Medikamente entwickelt und in verschiedensten randomisierten klinischen Studien getestet – mehr als 35 mit über 225.000 Patienten. Die DAPT zählt somit zu den am meisten untersuchten Therapien in der kardiovaskulären Forschung (2). Dies wird in der folgenden Abbildung der *European Society of Cardiology* (ESC) (Abb. 2) deutlich. Gezeigt werden alle wesentlichen Studien seit 1996 zu den verschiedenen P2Y12-Hemmern Ticlopidin, Clopidogrel, Prasugrel und Ticagrelor. ASS existiert natürlich schon länger, wird aber in der Kombinationstherapie verwendet und ist deshalb mit aufgeführt. Alle Substanzen haben bestimmte pharmakologische Eigenschaften, Wirkungsvorteile für bestimmte Indikationen, aber auch Nebenwirkungen und Risiken.

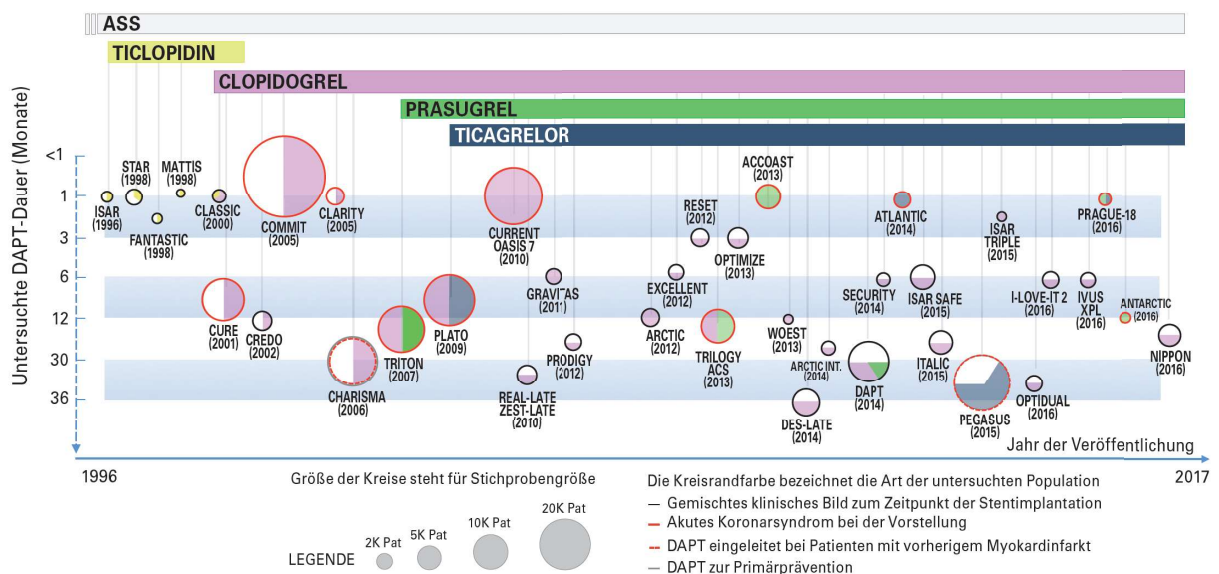


Abb. 2: Geschichte der dualen antithrombozytären Therapie (DAPT) bei Patienten mit Koronarer Herzkrankheit (Deutsche Version der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie (DGK) Pocket Guidelines S. 6 f., Abb. 1 nach 2017 ESC Focused Update on Dual Antiplatelet Therapy in Coronary Artery Disease developed in collaboration with the European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS) – The Task Force for the Management of Dual Antiplatelet Therapy in Coronary Artery Disease of the European Society of Cardiology (ESC) and of the European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS)) European Heart Journal (2018) 39, 213–254, doi:10.1093/eurheartj/ehx419 (2) (ASS = Acetylsalicylsäure, Pat. = Patienten)

1.3.1 Acetylsalicylsäure

Der Thrombozyt bietet verschiedene Angriffspunkte für eine Hemmung der Hämostase. ASS ist als Substanz schon lange bekannt. Sie ist ein Derivat der Salicylsäure, die ursprünglich aus der Rinde von Weide stammt. Schon 400 vor Christus schrieb Hippokrates ihr eine heilende Wirkung zu (23). Seitdem hat ASS an industrieller Bedeutung hinzugewonnen, nachdem dem Pharmakonzern Bayer® 1897 die Acetylierung der Salicylsäure durch Felix Hoffmann gelang (24). Heute gilt sie als Leitsubstanz in der Prävention und Behandlung von Herz-Kreislauf-erkrankungen (25, 26). Abgesehen von antithrombotischen Eigenschaften wirkt ASS auch analgetisch, antiinflammatorisch und antipyretisch. Den Mechanismus der COX-Inhibition fand John Vane im Jahr 1971 heraus, wofür ihm 1982 der Nobelpreis für Medizin verliehen wurde (24). Die Acetylierung findet am Serin-Rest Ser530 im katalytischen Zentrum des Enzyms COX-1 statt (Abb. 3). Dadurch wird dessen Funktion irreversibel gehemmt. Arachidonsäure kann nicht zu Prostaglandin H₂ und weiter zu Thromboxan A₂ umgewandelt werden. Dies verhindert die thromboxanabhängige Aktivierung der Thrombozyten und bewirkt eine verminderte Thrombozytenaggregation (27). Diese Hemmung hält bis zur Bildung neuer Plättchen im Knochenmark für etwa 10 Tage an, da der kernlose Thrombozyt keine Neusynthese der COX-1 betreiben kann (5). Die Unterbindung der Prostaglandin-Synthese resultiert außerdem in einer Hemmung von bestimmten Entzündungs- und Schmerzentscheidungsmechanismen. ASS inhibiert die COX-2 deutlich schwächer, da ihre Affinität hierzu wesentlich geringer ausfällt (28).

Weitere Substanzen wie Ibuprofen, Paracetamol oder Metamizol hemmen die COX ebenfalls. Dies erfolgt jedoch reversibel durch Bildung von Wasserstoffbindungen mit Aminosäure-Bausteinen wie Arginin oder Tyrosin (29) (Abb. 3). Therapeutisch werden diese nur zur Schmerzlinderung, Fiebersenkung oder Entzündungshemmung eingesetzt, während ASS in niedriger Dosierung von 100 mg/d auch zur Plättchenhemmung verwendet wird (30). Beim ACS sind dagegen entweder 150-300 mg oral oder 75-150 mg ASS intravenös (i.v.) als Aufsättigungsdosis indiziert (30, 31). Allerdings räumt die ESC-Leitlinie ein, dass die Datenlage hinsichtlich einer optimalen i.v.-Dosis nicht eindeutig ist. Eine Studie legt nahe, dass eine Einzeldosis 250-500 mg ASS i.v. verglichen mit 300 mg oral mit einer schnelleren und vollständigeren Hemmung der Thromboxan-Bildung und Thrombozytenaggregation nach 5 Minuten assoziiert ist, zu vergleichbarer Rate an Blutungsereignissen. Im Rettungsdienstwesen ist eine Gabe von 500 mg ASS ebenfalls gängige Praxis (32).

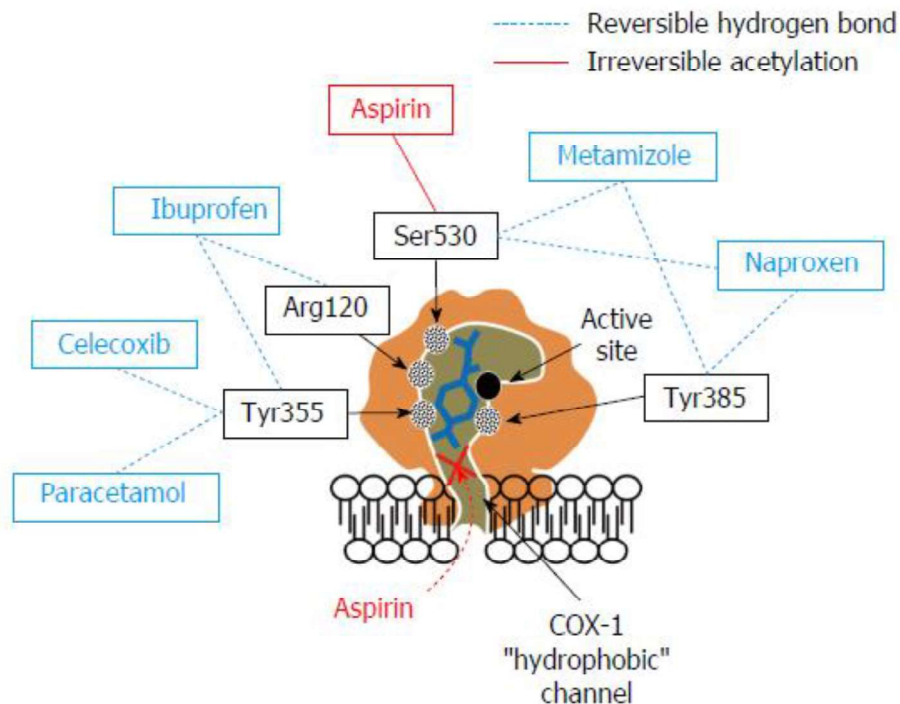


Abb. 3: Wirkungsweise verschiedener nicht-steroidaler Antirheumatika (NSAR) an der Cyclooxygenase-1 (COX-1) nach Polzin et al., „Impairment of aspirin antiplatelet effects by non-opioid analgesic medication.“ (29): Aspirin (=ASS) hemmt die COX-1 irreversibel über eine Acetylierung am Serin-Rest Ser530. Andere NSAR wie Ibuprofen, Paracetamol oder Metamizol wirken an anderen Stellen und hemmen die COX-1 dagegen reversibel.

1.3.2 Die Chronologie der P2Y12-Hemmer

Ein weiterer Angriffspunkt am Blutplättchen ist der ADP-Rezeptor. Der Thrombozyt setzt selbst, wie weiter oben beschrieben, über δ -Granula ADP frei und initiiert darüber autokrin die Aggregation. Hierbei ist ADP für verschiedene Prozesse verantwortlich: Es induziert u.a. den *shape change* über die Aktivierung des GPIIb/IIIa-Komplexes und bewirkt den Einstrom und die intrazelluläre Mobilisierung von Calcium-Ionen. Außerdem hemmt es über den G_i -Protein-gekoppelten Rezeptor die Hemmung der Adenylatcyclase und reduziert damit die Bildung von cyclischem Adenosinmonophosphat (cAMP) (33). All diese Prozesse wirken pro-thrombotisch.

Eine Untergruppe der ADP-Rezeptoren ist der P2Y12-Rezeptor, der ein potentes Ziel der Thrombozytenaggregationshemmung durch die Wirkstoffgruppe der Thienopyridin-Derivate darstellt (34). Der erste bekannte Vertreter der P2Y12-Rezeptor-Hemmer und Thienopyridine war Ticlopidin, welches jedoch zum einen

wegen der Gefahr eine Leukopenie bzw. Agranulozytose und potentiellen schweren Infektionen (35) und zum anderen wegen des Auftretens einer thrombotisch-thrombozytopenischen Purpura (36) nicht mehr eingesetzt wird.

Abgelöst wurde es vom strukturverwandten Clopidogrel (Handelsname Plavix® oder Iscover®, sowie Generika), dessen Einsatz 1996 in der Zulassungsstudie CAPRIE erforscht wurde und seit dem Jahr 1998 zugelassen ist (37). Darin wurde die Standarddosis 75 mg Clopidogrel im Vergleich mit 325 mg ASS für verschiedene vaskuläre Endpunkte als gleichwertig beschrieben. In der CLASSICS-Studie zeigte sich außerdem, dass Clopidogrel Ticlopidin überlegen ist (38). Als *Prodrug* wird es über das Cytochrom P450 2C19 (CYP2C19) enzymabhängig zu seinem aktiven Metaboliten hydrolysiert und oxidiert (39). Der Metabolit bindet irreversibel an den P2Y₁₂-Rezeptor und hemmt diesen (40). Die Aufsättigungsdosis beträgt 300 bis 600 mg Clopidogrel, danach werden 75 mg einmal täglich eingenommen (41).

Mittlerweile haben sich die beiden neueren Thienopyridine Prasugrel (Handelsname Efient®) und Ticagrelor (Brilique®) im Gegensatz zu Clopidogrel als potenter erwiesen. Das geringere Risiko für ischämische Ereignisse geht jedoch mit einem höheren Blutungsrisiko einher. Besonders unter Prasugrel traten in der TRITON-TIMI-38-Studie aus dem Jahr 2007 mehr starke und tödliche Blutungen auf als unter Clopidogrel (42). Ticagrelor birgt laut der PLATO-Studie von 2009 zwar kein erhöhtes Risiko für starke Blutungen, aber für solche, die nicht direkt auf die stattgehabte Prozedur zurückzuführen sind (41).

Prasugrel ist wie Clopidogrel ein *Prodrug*, das zu seinem aktiven Metaboliten konvertiert werden muss, um seine irreversible inhibitorische Wirkung auszuüben. Die übliche Dosis ist zunächst 60 mg, anschließend 10 mg einmal täglich (42). Ticagrelor bindet dagegen direkt und reversibel an den P2Y₁₂-Rezeptor. Die Aufsättigungsdosis beträgt 180 mg, gefolgt von einer Erhaltungsdosis zweimal 90 mg täglich. (41).

Die aktuelle ISAR-REACT-5 Studie legt nahe, dass im ACS Prasugrel gegenüber Ticagrelor eine bessere antiischämische Wirksamkeit bezogen auf die Studienendpunkte hat zu einem nicht signifikant verschiedenen Blutungsrisiko (43). Ob und wann dieses Ergebnis Einzug in die Leitlinien findet, steht zum aktuellen Zeitpunkt noch nicht fest.

1.3.3 Duale antithrombozytäre Therapie (DAPT)

ISAR (vgl. Abb. 2) war die erste randomisierte klinische Studie, die eine Überlegenheit dualer Plättchenhemmung mit ASS und Ticlopidin gegenüber einer Antikoagulation mit ASS und intravenösem Heparin oder oralem Phenprocoumon bei PCI zeigte (44). In vier folgenden Studien – CURE (45), CLARITY (46), COMMIT (47) und ACTIVE-A (48) – wurde als neuerer P2Y₁₂-Hemmer Clopidogrel mit einem Placebo verglichen, jeweils in Kombination mit ASS oder weiteren bis dahin etablierten Standardtherapien.

Heutzutage wird die duale Plättchenhemmung als Therapiestandard bei ACS und nach Koronarintervention angewendet. Während ASS bei fehlenden Kontraindikationen lebenslang verabreicht wird, sind P2Y₁₂-Hemmer in der Regel über 6 bzw. 12 Monate nach PCI indiziert (Abb. 4 (2)). Auch beim chronischem Koronarsyndrom, also einem stabilen Zustand der KHK, ist eine Therapie mit ASS indiziert. Falls ASS nicht vertragen wird, wird Clopidogrel stattdessen verwendet. Nach PCI wird auch hier nach Abwägung des individuellen Blutungsrisikos eine zusätzliche Therapie mit Clopidogrel für 6 Monate oder kürzer empfohlen (3).

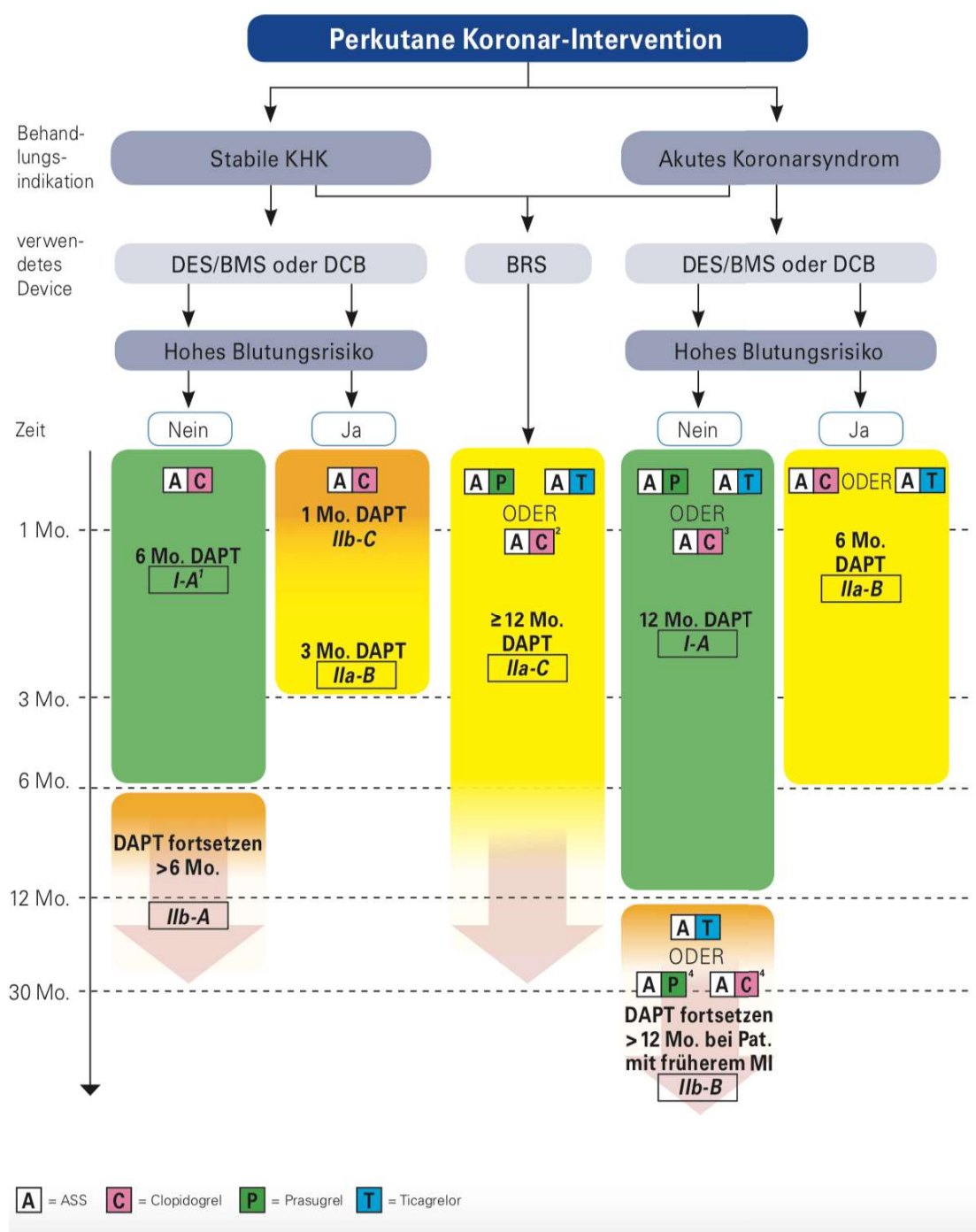


Abb. 4: Algorithmus zur DAPT bei Patienten nach perkutaner Koronar-Intervention (Deutsche Version der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie (DGK) Pocket Guidelines S. 16, Abb. 4 nach 2017 ESC Focused Update on Dual Antiplatelet Therapy in Coronary Artery Disease developed in collaboration with the European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS) – The Task Force for the Management of Dual Antiplatelet Therapy in Coronary Artery Disease of the European Society of Cardiology (ESC) and of the European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS)) European Heart Journal (2018) 39, 213–254, doi:10.1093/eurheartj/ehx419 (2) (BMS = unbeschichteter Metallstent, BRS = bioresorbierbarer Gefäßstent, DCB = medikamentenbeschichteter Ballonkatheter, DES = medikamentenbeschichteter Stent, KHK = Koronare Herzkrankheit, MI = Myokardinfarkt, Mo. = Monate)

1.3.4 DAPT und orale Antikoagulation

Eine Ausnahme bildet eine Indikation zur oralen Antikoagulation, beispielsweise bei Vorhofflimmern. Generell gilt es, eine Abwägung zwischen Blutungs- und Thrombose-Risiko zu treffen. Je nachdem, welche Indikation bzw. welches Risiko überwiegt, wird eine *Triple*-Therapie mit ASS für nur einen Monat oder aber für maximal 6 Monate verabreicht (Abb. 5). Als P2Y12-Hemmer wird in dieser Kombination Clopidogrel verwendet. Wenn ein NOAK grundsätzlich eine Therapieoption ist, wird dieses gegenüber einem VKA bevorzugt (3).

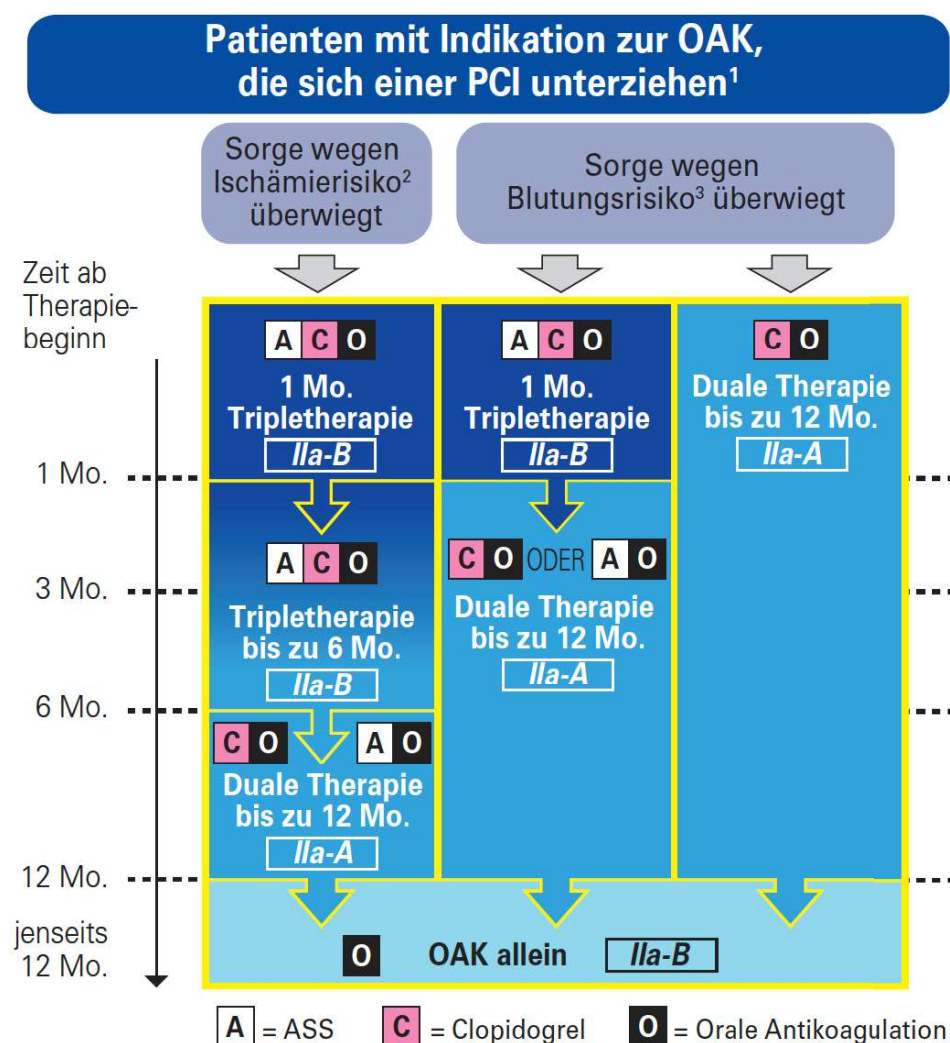


Abb. 5: Algorithmus zur DAPT bei Patienten mit Indikation zur oralen Antikoagulation, die eine PCI erhalten (Deutsche Version der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie (DGK) Pocket Guidelines S. 25, Abb. 7 nach 2017 ESC Focused Update on Dual Antiplatelet Therapy in Coronary Artery Disease developed in collaboration with the European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS) – The Task Force for the Management of Dual Antiplatelet Therapy in Coronary Artery Disease of the European Society of Cardiology (ESC) and of the European Association for Cardio-Thoracic Surgery

(EACTS)) European Heart Journal (2018) 39, 213–254, doi:10.1093/eurheartj/ehx419 (2) (OAK = orale Antikoagulation, PCI = perkutane Koronarintervention, Mo. = Monate)

1.4 High und Low On-Treatment Platelet Reactivity

Das Ansprechen einer plättchenhemmenden Therapie ist interindividuell sehr verschieden. Dies liegt zum einen im Rahmen von Komorbiditäten am Thrombozyten selbst und dessen Reagibilität auf das jeweilige Medikament. Zum anderen ist die Wirksamkeit von ASS oder Clopidogrel als Wirkstoff unter bestimmten Konditionen erhöht oder abgeschwächt.

Einige Patienten haben ein „normales“ Ansprechen auf die Substanz, liegen also im therapeutischen Bereich bzw. Fenster. Bei anderen tritt eine überschießende oder aber verminderte Reaktion des Plättchens auf das jeweilige Medikament auf. Diese beiden Extreme nennt man *low-* bzw. *high on-treatment platelet reactivity* (LTPR bzw. HTPR).

Einflussfaktoren können eine Nierenschädigung (49, 50) oder Komorbiditäten wie Diabetes mellitus (51) und Übergewicht (52, 53) sein. Außerdem spielen Medikamenteninteraktionen eine große Rolle. Hierbei zu nennen sind Protonenpumpeninhibitoren (54) oder nicht-steroidale Antiphlogistika wie Metamizol (55, 56). Eine Leberfunktionsstörung oder genetische CYP-Polymorphismen sind weitere mögliche Ursachen (57). Nicht zu unterschätzen ist außerdem die *Incompliance* einiger Patienten (58), die es in diesem Kontext durch Patientenedukation zu vermindern gilt.

Zur Quantifizierung dieser Bereiche von adäquater oder inadäquater Wirkung und ihrer Häufigkeit in der Bevölkerung haben Publikationen von Tantry, Bonello et al. mitunter aus den Jahren 2010 und 2013 beigetragen. In dieser Arbeit wurden Referenzintervalle für eine HTPR und LTPR etabliert, gemessen an unterschiedlichen Labormethoden (40, 59).

Diese beiden Zustände sind nicht nur laborchemische Phänomene, sondern spiegeln sich auch in klinischer Bedeutsamkeit wider. Unter einer HTPR treten vermehrt ischämische Ereignisse nach PCI auf (60-62). Eine LTPR ist mit einer höheren Rate an Blutungen assoziiert (59, 63), welche wiederum besonders in unserer alternden Bevölkerung gefährlich sein können. Deshalb erscheint eine Überwachung der

Plättchenfunktion mit geeigneten Methoden und Einstellung eines optimalen therapeutischen Bereichs relevant und notwendig.

1.5 Rationale für eine Überwachung der Thrombozytenfunktion

Diese Art des Therapie-Monitorings kennt man eher von einer oralen Antikoagulation mit Phenprocoumon (Marcumar®) oder Warfarin (Coumadin®), welche mithilfe des Quick-Wertes bzw. des INR eingestellt wird, oder einer Therapie mit unfractioniertem Heparin, welches mittels aPTT gemessen wird. Für die DAPT ist dies bisher nicht üblich.

Eine Herausforderung stellt die Standardisierung und Vergleichbarkeit von Methoden und Messwerten zwischen Laboren weltweit dar. Deshalb gibt es zum Beispiel für den Quick-Wert den INR als internationalen Referenzwert. Hilfestellung bietet hier das *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) mit seiner aktuellen Richtlinie zur Definition, Etablierung und Verifizierung von Referenzintervallen in der klinischen Labortätigkeit (64).

Ein ähnliches Problem tritt bei den verschiedenen Plättchenfunktionstests (PFTs) auf. Diese werden bisher nur selten für die klinische Diagnostik oder ein Therapie-Monitoring eingesetzt. Gründe dafür sind eine mangelnde Standardisierung und Erfahrung in der Übertragung von Laborergebnissen auf den klinischen Nutzen. Dennoch sollte aufgrund der zuvor beschriebenen Risikokonstellationen bei HTPR oder LTPR eine Überwachung und gegebenenfalls Anpassung der Medikation erwogen werden. Diese Anpassung der Therapie nennt man maßgeschneiderte bzw. *tailored therapy*. Die dazu verfügbaren Methoden werden im Verlauf dieser Arbeit noch weiter vorgestellt und diskutiert.

1.6 Studienlage

In den letzten Jahren wurden daraufhin in diversen Studien wie GRAVITAS, TRIGGER-PCI, ARCTIC und ANTARTIC maßgeschneiderte gegen Standard-Therapieschemata verglichen. Unabhängig von verschiedenen Faktoren wie der Patientenpopulation oder des Alters, der Wahl des P2Y12-Hemmers oder des Gabeschemas reduzierte eine *tailored therapy* die Rate an *major adverse cardiac and cerebrovascular events* (MACCE) nicht (65-68). Bisher zeigte lediglich TROPICAL-ACS einen Vorteil der Plättchenfunktions-Überwachung (69). Gründe hierfür gilt es zu untersuchen. Möglicherweise spielt die Wahl der Labormethode eine Rolle. Die

meisten Publikationen verwendeten ein Verfahren, das *bedside*-kompatibel, jedoch aus pharmakologischer Sicht wenig spezifisch ist. Pharmakologisch spezifische Methoden wie der Thromboxanbildungs-Assay für ASS und der *vasodilator-stimulated phosphoprotein* (VASP) Assay für P2Y₁₂-Rezeptorhemmer sind zeitaufwendig. Im besten Fall sollte ein Test zur Evaluation der Thrombozytenfunktionshemmung sowohl praktisch in der Handhabung als auch pharmakologisch hochspezifisch sein. Deshalb untersuchten wir unter anderem ROTEM® *platelet* sowie weitere etablierte Plättchenfunktionstests und ihre Verwendbarkeit zum Therapie-Monitoring.

1.7 Ethikvotum

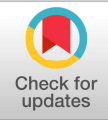
Die Studie wurde vom Ethikkomitee der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf genehmigt (Ethikvotum Studiennummer 5706).

1.8 Fragestellung und Ziele dieser Arbeit

In dieser Dissertation werden folgende zentrale Fragen untersucht:

- Was bedeutet eine unzureichende Plättchenhemmung für den Patienten?
- Welche PFTs stehen zur Verfügung?
- Ist deren Aussagekraft über den Therapieerfolg verlässlich und gleichwertig?
- Ist ein Monitoring der Plättchenfunktion sinnvoll oder sogar notwendig?

2 Platelet function testing: dead or alive. Helten C, Naguib D, Dannenberg L, Pöhl M, Ayhan A, Hohlfeld T, Levkau B, Kelm M, Zeus T, Polzin A. J Thromb Haemost. 16(5):984-6, (2018)



BRIEF REPORT

Platelet function testing: dead or alive

C. HELTEN,* D. NAGUIB,* L. DANNENBERG,* M. PÖHL,* A. AYHAN,* T. HOHLFELD,† B. LEVKAU,‡ M. KELM,* T. ZEUS* and A. POLZIN*

*Department of Cardiology, Pulmonology, and Vascular Medicine, Medical Faculty, Heinrich Heine University Düsseldorf, University Hospital Düsseldorf, Cardiovascular Research Institute Düsseldorf (CARID); †Institute for Pharmacology and Clinical Pharmacology, Heinrich Heine University, Düsseldorf; and ‡Institute of Pathophysiology, West German Heart and Vascular Center, University Hospital Essen, University of Duisburg-Essen, Essen, Germany

To cite this article: Helten C, Naguib D, Dannenberg L, Pöhl M, Ayhan A, Hohlfeld T, Levkau B, Kelm M, Zeus T, Polzin A. Platelet function testing: dead or alive. *J Thromb Haemost* 2018; **16**: 984–6.

Essentials

- Pharmacodynamic response to antiplatelet medication is heterogeneous.
- Platelet reactivity to dual antiplatelet therapy was analyzed by three platelet function assays.
- The prevalence of high and low platelet reactivity differed significantly between assays.
- Future trials are needed to determine the best assay to analyze platelet function.

Summary. *Background:* High on-treatment platelet reactivity (HTPR) to antiplatelet medication leads to ischemic events, whereas low on-treatment platelet reactivity (LTPR) increases bleeding risk. However, various trials have failed to demonstrate superiority of tailored antiplatelet regimens (ARCTIC, ANTARCTIC, Trigger-PCI, and GRAVITAS). TROPICAL-ACS was the first study that demonstrated the benefit of tailoring antiplatelet medication according to platelet function analysis. A potential reason may be that different platelet function assays were used in these trials. *Objectives:* To evaluate whether the results of platelet function tests are comparable. *Patients/Methods:* We tested three commonly used assays – light transmission aggregometry (LTA), (Multiplate impedance aggregometry [MP]), and vasodilator-stimulated phosphoprotein phosphorylation assay (VASP) – in 23 patients receiving dual antiplatelet therapy with aspirin and clopidogrel. *Results:* With LTA, HTPR occurred in 57% of patients; with VASP, it occurred in

43% of patients; and with MP, it occurred in 13% of patients. According to LTA, only 35% of patients were in the therapeutic window; according to VASP, 57% of patients were in the therapeutic window; and according to MP, 48% of patients were in the therapeutic window. With LTA, LTPR occurred in 9% of patients; with VASP, it occurred in 0% of patients; and with MP, it occurred in 39% of patients. Therefore, the prevalences of HTPR and LTPR differed significantly between assays. Remarkably, in 17% of patients, one assay showed HTPR whereas another showed LTPR. *Conclusions:* The results of different platelet function assays differ substantially. Up to now, only TROPICAL-ACS had demonstrated a benefit of tailoring antiplatelet medication according to platelet function analysis. Future trials are needed to evaluate whether the platelet function assay used in TROPICAL-ACS is the ‘correct’ one and revives platelet function testing.

Keywords: bleeding; ischemia; P2Y₁₂ receptor antagonists; pharmacodynamics; platelet function tests.

Introduction

Dual antiplatelet therapy (DAPT) is indispensable in patients after acute myocardial infarction and in patients undergoing cardiac interventions. However, it is well known that there is substantial interindividual variability in the pharmacodynamic response to antiplatelet medication [1–5]. Furthermore, it has been shown that high on-treatment platelet reactivity (HTPR) is associated with ischemic events, and that low on-treatment platelet reactivity (LTPR) is associated with bleeding [6]. However, only one trial was able to demonstrate a benefit of tailoring the antiplatelet regimen according to platelet function analyses [7]. The reason for this is unclear. Possible reasons may be the assay used for the determination of antiplatelet effects.

Correspondence: Amin Polzin, Moorenstrasse 5, 40225 Düsseldorf, Klinik für Kardiologie, Pneumologie und Angiologie, Düsseldorf, Germany
Tel.: +49 211 811 8800
E-mail: Amin.Polzin@med.uni-duesseldorf.de

Received: 5 January 2018
Manuscript handled by: M. Levi
Final decision: P. H. Reitsma, 26 February 2018

Methods

We investigated platelet function in 23 patients receiving permanent aspirin and clopidogrel medication. All patients had undergone (> 1 month previously) percutaneous coronary intervention (PCI). We used three different platelet function assays – Multiplate-impedance aggregometry (MP), light-transmission aggregometry (LTA), and vasodilator-stimulated phosphoprotein phosphorylation assay (VASP) – as previously described [8–10]. For LTA, HTPR to DAPT was defined as a maximum of aggregation (MOA) of > 46%, and LTPR to DAPT was defined as an MOA of < 19%. For MP, HTPR was set at > 46 aggregation units (AU), and LTPR was set at < 19 AU. For VASP, a platelet reactivity index (PRI) of > 50 was defined as HTPR, and a PRI of < 16 was defined as LTPR [6].

Results and discussion

Patients were aged 75 ± 10 years. Of the patients, 81% had arterial hypertension, 73% had hypercholesterolemia, and 31% had diabetes mellitus.

According to Spearman's rho, there were only moderate correlations between the assays: LTA versus VASP, $r_s = 0.488$, $P = 0.018$; LTA versus MP, $r_s = 0.562$, $P = 0.005$; and VASP versus MP, $r_s = 0.562$, $P = 0.005$.

With LTA, HTPR occurred in 57% of patients; with VASP, it occurred in 43% of patients; and with MP, it occurred in 13% of patients ($P = 0.008$). According to LTA, only 35% of patients were in the therapeutic window; according to VASP, 57% of patients were in the therapeutic window; and according to MP, 48% of patients were in the therapeutic window ($P = 0.3$). With LTA, LTPR occurred in 9% of patients; with VASP, it occurred in 0% of patients; and with MP, it occurred in 39% of patients ($P < 0.001$). Therefore, the prevalences of HTPR and LTPR differed significantly between assays. Remarkably, in 17% of patients, one assay showed HTPR whereas another showed LTPR (Fig. 1).

The major finding of this study was that the results of different platelet function assays differ substantially. ANTARCTIC, another large trial, failed to demonstrate superiority of tailored antiplatelet therapy [11]. The results are in line with those of other clinical trials (ARCTIC, GRAVITAS, and Trigger-PCI) [12–14]. However, in contrast to prior studies, ANTARCTIC investigated a high-risk population (elderly patients with acute coronary syndrome [ACS] undergoing urgent PCI). Accordingly, a more potent P2Y₁₂ inhibitor (prasugrel) was used predominantly. The results were astonishing, as it is known that HTPR is associated with ischemic events and LTPR is associated with bleeding [6]. After ANTARCTIC, platelet function testing to tailor antiplatelet medication was considered to be 'dead'. However, the recent TROPICAL-ACS trial demonstrated a benefit of platelet

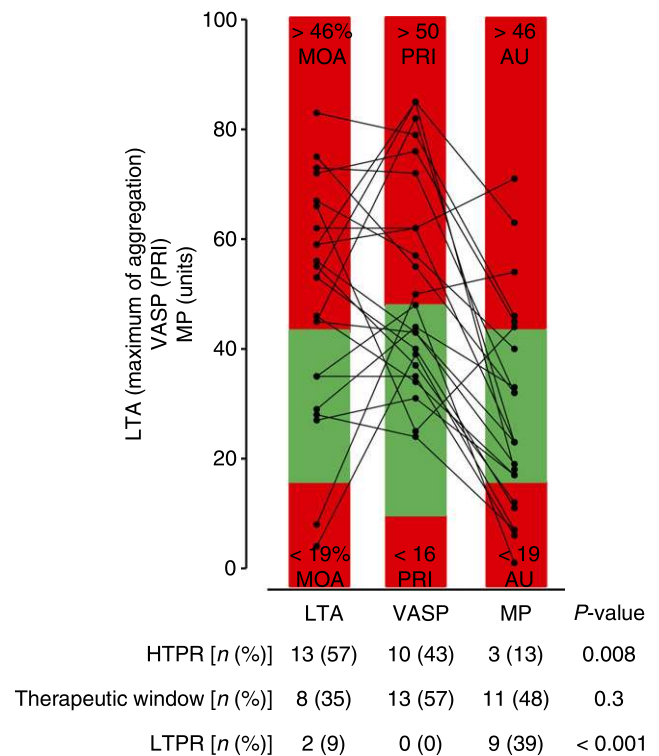


Fig. 1. Platelet function analysis using light transmission aggregometry (LTA), vasodilator-stimulated phosphoprotein phosphorylation assay (VASP), and Multiplate impedance aggregometry (MP). LTA, VASP and MP were conducted in 23 patients receiving P2Y₁₂ inhibitor. The results of different ADP-induced platelet reactivity analyses varied substantially. AU, aggregation units; HTPR, high on-treatment platelet reactivity; LTPR, low on-treatment platelet reactivity; MOA, maximum of aggregation; PRI, platelet reactivity index. [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

function testing in clinical decision-making [7]. Possible reasons may be the sophisticated study design, the intelligent choice of a net clinical primary endpoint, the non-inferiority hypothesis, or the platelet function assay applied. TROPICAL-ACS was the first of the above-mentioned landmark trials in tailored antiplatelet therapy that chose MP for the evaluation of P2Y₁₂ inhibition. This was remarkable, as MP requires more laboratory expertise and is more time-consuming than other bedside assays. In the present study, we were able to demonstrate that the results of different assays differ substantially. It is completely unknown which assay 'is correct'. However, given the TROPICAL-ACS findings, MP could possibly be the best assay for tailoring antiplatelet medication at present. Nevertheless, more studies are needed to address the question of the optimal antiplatelet regimen in individualized medicine.

In the tailored antiplatelet regimen arm of TROPICAL-ACS, 60% of patients with ACS were treated 'only' with clopidogrel. Clopidogrel is substantially less expensive than the newer agents prasugrel or ticagrelor, which represent the first choice for ACS patients, according to

current guidelines. Therefore, this new 'step-down' regimen may also significantly reduce healthcare costs.

This study had several limitations. The sample size was small, so generalizability is limited. Additionally, an assay that is commonly used assay in large trials, i.e. VerifyNow, was not tested in this study.

Conclusion

The results of different platelet function assays differ substantially. Up to now, only TROPICAL-ACS has demonstrated a benefit of tailoring antiplatelet medication according to platelet function analysis. Therefore, the following are needed: (i) basic, translational and clinical studies to develop a pharmacodynamically specific, bedside assay for evaluating antiplatelet effects; and (ii) large-scale trials to demonstrate improved outcomes in terms of ischemic and bleeding events with tailored antiplatelet regimens.

Addendum

A. Polzin and T. Zeus designed the study. C. Helten, D. Naguib, L. Dannenberg, M. Pöhl, and A. Ayhan analyzed and interpreted data, and wrote the manuscript. T. Hohlfeld, B. Levkau, and M. Kelm supervised the study and revised the manuscript. The manuscript has been read and approved for submission by all qualified authors.

Acknowledgements

Part of this work was supported by the Forschungskommission of the Medical Faculty of the Heinrich Heine University (No. 46-2016) (to L. Dannenberg).

The study conformed to the Declaration of Helsinki and was approved by the University of Düsseldorf Ethics Committee.

Disclosure of Conflict of Interests

The authors state that they have no conflict of interest.

References

- Polzin A, Afzal S, Balzer J, Rassaf T, Kelm M, Zeus T. Platelet reactivity in MitraClip patients. *Vascul Pharmacol* 2016; **77**: 54–9.
- Polzin A, Dannenberg L, Sansone R, Levkau B, Kelm M, Hohlfeld T, Zeus T. Antiplatelet effects of aspirin in chronic kidney disease patients. *J Thromb Haemost* 2016; **14**: 375–80.
- Polzin A, Dannenberg L, Sophia Popp V, Kelm M, Zeus T. Antiplatelet effects of clopidogrel and aspirin after interventional patent foramen ovale/atrium septum defect closure. *Platelets* 2016; **27**: 317–21.
- Dannenberg L, Erschoff V, Bonner F, Gliem M, Jander S, Levkau B, Kelm M, Hohlfeld T, Zeus T, Polzin A. Dipyrene comedication in aspirin treated stroke patients impairs outcome. *Vascul Pharmacol* 2016; **87**: 66–9.
- Polzin A, Schleicher M, Seidel H, Scharf RE, Merx MW, Kelm M, Zeus T. High on-treatment platelet reactivity in transcatheter aortic valve implantation patients. *Eur J Pharmacol* 2015; **751**: 24–7.
- Tantry US, Bonello L, Aradi D, Price MJ, Jeong YH, Angiolillo DJ, Stone GW, Curzen N, Geisler T, Ten Berg J, Kirtane A, Siller-Matula J, Mahla E, Becker RC, Bhatt DL, Waksman R, Rao SV, Alexopoulos D, Marcucci R, Reny JL, *et al.*; Working Group on On-Treatment Platelet Reactivity. Consensus and update on the definition of on-treatment platelet reactivity to adenosine diphosphate associated with ischemia and bleeding. *J Am Coll Cardiol* 2013; **62**: 2261–73.
- Sibbing D, Aradi D, Jacobshagen C, Gross L, Trenk D, Geisler T, Orban M, Hadamitzky M, Merkely B, Kiss RG, Komocsi A, Dezi CA, Holdt L, Felix SB, Parma R, Klopotoski M, Schwinger RHG, Rieber J, Huber K, Neumann FJ, *et al.*; TROPICAL-ACS Investigators. Guided de-escalation of antiplatelet treatment in patients with acute coronary syndrome undergoing percutaneous coronary intervention (TROPICAL-ACS): a randomised, open-label, multicentre trial. *Lancet* 2017; **390**: 1747–57.
- Born GV. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature* 1962; **194**: 927–9.
- Aleil B, Ravanat C, Cazenave JP, Rochoux G, Heitz A, Gachet C. Flow cytometric analysis of intraplatelet VASP phosphorylation for the detection of clopidogrel resistance in patients with ischemic cardiovascular diseases. *J Thromb Haemost* 2005; **3**: 85–92.
- Sibbing D, Braun S, Jawansky S, Vogt W, Mehili J, Schomig A, Kastrati A, von Beckerath N. Assessment of ADP-induced platelet aggregation with light transmission aggregometry and multiple electrode platelet aggregometry before and after clopidogrel treatment. *Thromb Haemost* 2008; **99**: 121–6.
- Cayla G, Cuisset T, Silvain J, Leclercq F, Manzo-Silberman S, Saint-Etienne C, Delarche N, Bellemain-Appaix A, Range G, El Mahmoud R, Carrie D, Belle L, Souteyrand G, Aubry P, Sabouret P, du Fretay XH, Beygui F, Bonnet JL, Lattuca B, Pouillot C, *et al.*, ANTARCTIC investigators. Platelet function monitoring to adjust antiplatelet therapy in elderly patients stented for an acute coronary syndrome (ANTARCTIC): an open-label, blinded-endpoint, randomised controlled superiority trial. *Lancet* 2016; **388**: 2015–22.
- Collet JP, Cuisset T, Range G, Cayla G, Elhadad S, Pouillot C, Henry P, Motreff P, Carrie D, Boueri Z, Belle L, Van Belle E, Rousseau H, Aubry P, Monsegu J, Sabouret P, O'Connor SA, Abtan J, Kerneis M, Saint-Etienne C, *et al.* Bedside monitoring to adjust antiplatelet therapy for coronary stenting. *N Engl J Med* 2012; **367**: 2100–9.
- Price MJ, Berger PB, Teirstein PS, Tanguay JF, Angiolillo DJ, Spriggs D, Puri S, Robbins M, Garratt KN, Bertrand OF, Stillabower ME, Aragon JR, Kandzari DE, Stinis CT, Lee MS, Manoukian SV, Cannon CP, Schork NJ, Topol EJ; GRAVITAS Investigators. Standard- vs high-dose clopidogrel based on platelet function testing after percutaneous coronary intervention: the GRAVITAS randomized trial. *JAMA* 2011; **305**: 1097–105.
- Trenk D, Stone GW, Gawaz M, Kastrati A, Angiolillo DJ, Muller U, Richardt G, Jakubowski JA, Neumann FJ. A randomized trial of prasugrel versus clopidogrel in patients with high platelet reactivity on clopidogrel after elective percutaneous coronary intervention with implantation of drug-eluting stents: results of the TRIGGER-PCI (Testing platelet reactivity in patients undergoing elective stent placement on clopidogrel to guide alternative therapy with prasugrel) study. *J Am Coll Cardiol* 2012; **59**: 2159–64.

3 Platelet Reactivity in Patients on Aspirin and Clopidogrel Therapy Measured by a New Bedside Whole-Blood Assay. Polzin A*, Helten C*, Dannenberg L, Mourikis P, Naguib D, Achilles A, Knoop B, Zako S, Rehder S, Görlinger K, Levkau B, Zeus T, Kelm M, Hohlfeld T, Hoffmann T. *J Cardiovasc Pharmacol.* 73(1):40-7, (2019)

Platelet Reactivity in Patients on Aspirin and Clopidogrel Therapy Measured by a New Bedside Whole-Blood Assay

Amin Polzin, MD,* Carolin Helten, MD,* Lisa Dannenberg, MD,* Philipp Mourikis, MD,* David Naguib, MD,* Alina Achilles, MD,* Betül Knoop, MD,* Saif Zako, MD,* Susanne Rehder,† Klaus Görlinger, MD,‡§ Bodo Levkau, MD,¶ Tobias Zeus, MD,* Malte Kelm, MD,* Thomas Hohlfeld, MD,|| and Till Hoffmann, MD†

Abstract: Various tests are available for measuring on-treatment platelet reactivity. The pharmacologically most specific assays are time-consuming and elaborate. A highly specific and convenient assay would be desirable for clinical routine. In this pilot study, we aimed to examine the ability of a novel bedside whole-blood assay—ROTEM platelet—to evaluate platelet inhibition compared with established assays. Platelet reactivity was investigated in 93 patients. Forty-Seven patients were on permanent aspirin therapy and 46 on dual antiplatelet therapy (DAPT) with aspirin and clopidogrel. We used ROTEM platelet impedance aggregometry (ROTEM-PTL), light transmission aggregometry (LTA), Multiplate electrode aggregometry (MEA) and vasodilator-stimulated phosphoprotein flow cytometry. Receiver operating characteristic (ROC) analyses showed ROTEM-PTL differentiates well between patients on medication and healthy individuals: aspirin: ROC_{AUC} 0.99 (95% confidence interval, 0.97–1.01); $P < 0.0001$; DAPT treatment: ROC_{AUC} 0.80 (95% confidence interval, 0.69–0.91); $P < 0.001$. Pearson regression analyses

showed moderate correlations between assays. Aspirin: MEA versus ROTEM-PTL $r^2 = 0.435$, $P \leq 0.001$; LTA versus ROTEM-PTL $r^2 = 0.048$, $P = 0.180$. DAPT: MEA versus ROTEM-PTL $r^2 = 0.398$, $P = 0.001$; LTA versus ROTEM-PTL $r^2 = 0.409$, $P = 0.001$; vasodilator-stimulated phosphoprotein versus ROTEM-PTL $r^2 = 0.164$, $P = 0.055$. ROTEM platelet distinguished well between treated and healthy individuals but correlated moderately with other assays. Clinical trials are needed to investigate the ability of this new assay to identify patients at risk of adverse events.

Key Words: aspirin, clopidogrel, high on-treatment platelet reactivity, low on-treatment platelet reactivity, platelet function test

(*J Cardiovasc Pharmacol*™ 2019;73:40–47)

INTRODUCTION

Dual antiplatelet therapy (DAPT) with aspirin and P2Y₁₂ receptor inhibitors is standard of care in patients with stent implantation in case of stable coronary artery disease.^{1–3} However, the pharmacodynamic response to this medication varies between different patients. Impaired pharmacodynamic response to antiplatelet medication is called high on-treatment platelet reactivity (HTPR). HTPR is associated with mortality and ischemic events such as myocardial infarction.⁴ In previous investigations, we observed that patients with dipyrene (metamizole) medication, MitraClip, transcatheter aortic valve implantation, chronic kidney disease, or persistent foramen ovale have a high incidence of HTPR.^{5–9} By contrast, a high response to antiplatelet therapy is responsible for low on-treatment platelet reactivity (LTPR). As a consequence, bleeding complications often occur in patients with LTPR.⁴ Especially elderly patients have a high bleeding risk. Monitoring platelet function to detect a therapeutic window for antiplatelet medication seems highly relevant. Therefore, tailored antiplatelet regimens have been recently compared with standard of care in several clinical trials such as GRAVITAS, TRIGGER-PCI, ARCTIC, and ANTARTIC. Regardless of patient population, type of P2Y₁₂ inhibitor, or application scheme, tailored antiplatelet therapy could not reduce major adverse cardiac events.^{10–13} The reason for this is unclear. A possible explanation might be the assay chosen to determine antiplatelet effects of medication. In most trials, a bedside compatible, however, pharmacologically less specific assay was used. Pharmacologically specific assays such as thromboxane formation assay for aspirin and vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) assay for clopidogrel are very time-consuming.

Received for publication July 1, 2018; accepted October 10, 2018.

From the *Division of Cardiology, Pulmonology, and Vascular Medicine, Heinrich Heine University Medical Centre Düsseldorf, Düsseldorf, Germany; †Institute of Transplantation Diagnostics and Cell Therapeutics, Heinrich Heine University Medical Centre Düsseldorf, Düsseldorf, Germany; ‡Department of Anaesthesiology and Intensive Care Medicine, University Hospital Essen, Essen, Germany; §Tem International GmbH, Munich, Germany; ¶Institute of Pathophysiology, West German Heart and Vascular Centre, University Hospital Essen, Essen, Germany; and ||Institute of Pharmacology and Clinical Pharmacology, Heinrich Heine University, Düsseldorf, Germany.

Supported by Tem-Group, Munich, Germany.

The authors report no conflicts of interest.

Supplemental digital content is available for this article. Direct URL citations appear in the printed text and are provided in the HTML and PDF versions of this article on the journal's Web site (www.jcvp.org).

A. Polzin and C. Helten authors contributed equally.

The study conformed to the ethical guidelines of the 1975 Declaration of Helsinki and was accepted by the University of Düsseldorf Ethics Committee (vote no 5706).

A. Polzin and T. Hoffmann designed the study. A. Polzin, C. Helten, and L. Dannenberg interpreted data and wrote the manuscript. C. Helten, L. Dannenberg, D. Naguib, A. Achilles, B. Knoop, P. Mourikis, and S. Zako collected data. S. Rehder analyzed the samples. A. Polzin, T. Zeus, T. Hohlfeld, B. Levkau, K. Görlinger, and M. Kelm supervised the study and revised the manuscript.

Reprints: Amin Polzin, MD, Division of Cardiology, Pulmonology, and Vascular Medicine, Heinrich Heine University Medical Centre Düsseldorf, Moorenstrasse 5, 40225 Düsseldorf, Germany (e-mail: Amin.Polzin@med.uni-duesseldorf.de).

Copyright © 2018 Wolters Kluwer Health, Inc. All rights reserved.

The optimal assay to determine pharmacodynamic response to antiplatelet medication should be easy to handle and pharmacologically highly specific. Therefore, in this pilot study, we evaluated the novel ROTEM platelet assay in determination of pharmacodynamic response to antiplatelet medication.

METHODS

Study Population and Design

In 2016, we conducted an observational, monocentric study with a cohort of 93 patients at the University Hospital of Düsseldorf, Germany. Eligibility criteria were informed consent and 100-mg aspirin monotherapy or DAPT with 75-mg clopidogrel and 100-mg aspirin. Age below 18 and medication with other P2Y₁₂ receptor blockers such as prasugrel or ticagrelor were the exclusion criteria. Administration of aspirin and clopidogrel was supervised during hospitalization. Indications for anticoagulation were atrial fibrillation or history of deep vein thrombosis and pulmonary embolism. Study patients did not receive oral anticoagulation during the measurement. Bridging with heparin was paused 2 hours before blood sampling to exclude any potential influence on platelet reactivity. Furthermore, 20 healthy individuals were included as reference group.

The study was approved by the ethics committee of the Heinrich-Heine University Düsseldorf (vote no 5706).

Blood Sampling

Two hours after oral intake of medication, one hour after breakfast, an aseptic venipuncture was performed on a cubital or dorsum manus vein using a 21-G butterfly needle (BD Vacutainer Safety-Lok) and tourniquet (CBC Classic Torniquet by Kimetec). The blood was collected in two 2.7-mL citrate tubes (BD Vacutainer), one S-Monovette 2.7-mL Hirudin tube, one S-Monovette 2.7-mL lithium heparin tube, and one lithium heparin calcium-balanced blood gas tube (Sarstedt). Immediately after blood sampling, centrifugation for light transmission aggregometry (LTA) was performed. On average, 20 minutes later, the platelet function tests were performed. Afterward, blood cells were counted by Sysmex XN-3100 Automated Hematology System.

ROTEM Platelet

ROTEM platelet is an add-on system to ROTEM delta (Tem-Group, Munich, Germany), which can work simultaneously but uses different techniques. ROTEM delta delivers a coagulation status through thromboelastometry. ROTEM platelet, such as Multiplate, uses impedance aggregometry to measure thrombocyte function and aggregation at the electrodes. It can be applied for hirudin- or citrate-anticoagulated whole blood samples as a point-of-care test with a runtime of 6 minutes. In our study, ara-tem [final concentration 0.42-mM arachidonic acid (AA)] and adp-tem [10- μ M adenosine diphosphate (ADP), Tem-Group] were used as reagents. Results are expressed in 3 ways: (1) as area under the aggregation curve (AUC) in Ohm $\times$ min, the parameter used in this study and describing the entire platelet aggregation (see **Figure 2, Supplemental Digital Content 1**, <http://links.lww.com/JCVP/A338>).

com/JCVP/A339), (2) as A6, the amplitude in Ohm after 6 minutes, a parameter for the efficiency of platelet aggregation, and (3) as maximum slope of the aggregation curve, a parameter that describes the velocity of platelet aggregation in Ohm/min. A typical tracing of a ROTEM platelet curve resembles its corresponding multiplate aggregometry curve (see **Figure 1, Supplemental Digital Content 2**, <http://links.lww.com/JCVP/A338>).

Light Transmission Aggregometry

First, citrate-anticoagulated blood was separated into platelet-rich plasma (PRP) and red blood cells at $250 \times g$. Second, platelet-poor plasma (PPP) was derived from the supernatant at $1600 \times g$. PPP is used to calibrate the aggregometer. LTA was performed on the APACT 4004 aggregometer (LABiTec, Ahrensburg, Germany). A 0.5-mM AA (NatuTec GmbH, Frankfurt am Main, Germany) and 10- μ M ADP (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) were used to activate platelet aggregation. Observation time of the aggregation was 6 minutes. HTPR to aspirin was defined as a maximum of aggregation (MOA) $>20\%$.^{6,14,15} For DAPT, MOA $>46\%$ was defined as HTPR and $<19\%$ as LTPR (see **Table 1, Supplemental Digital Content 3**, <http://links.lww.com/JCVP/A340>).⁴

Multiple Electrode Aggregometry

Multiplate Analyzer (F. Hoffmann-La Roche Ltd, Basel, Switzerland), similar to ROTEM platelet, also implements impedance aggregometry for hirudin- or citrate-anticoagulated whole blood samples. Platelets are activated by the ASPItest (0.5-mM AA) or ADPtest (6.4- μ M ADP). Activated platelets form aggregates that adhere to the electrodes. The consequently increasing resistance between the electrodes is registered and presented by AUC in arbitrary units (AU $\times$ min or U, conversion: 1 U = 10 AU $\times$ min). HTPR was set at >46 AU (aggregation units) and LTPR at <19 AU (see **Table 1, Supplemental Digital Content 3**, <http://links.lww.com/JCVP/A340>).⁴

VASP Phosphorylation Assay

We used PLT VASP/P2Y₁₂ Test Kit (Diagnostica Stago, Biocytex, Asnières sur Seine, France) as test for P2Y₁₂ inhibition. Citrated whole blood was incubated with prostaglandin E1 or ADP and prostaglandin E1. Afterward, phosphorylation of VASP was measured through dual color flow cytometry. Platelet reactivity index was calculated as ratio of the mean fluorescence intensity of the specimen incubated with prostaglandin E1 alone or with prostaglandin E1 and ADP. PRI >50 was defined as HTPR and <16 as LTPR (see **Table 1, Supplemental Digital Content 3**, <http://links.lww.com/JCVP/A340>).⁴

Statistical Analyses

GraphPad Prism5 (LaJolla) and Statistical Package for Social Sciences (Version 20, IBM, Ney York, NY) were used for statistical analyses. Type I error below $P = 0.05$ was considered significant. There was no exclusion of any outliers. Continuous variables are presented as mean $\pm$ SD and compared with t -tests, binary variables as absolute number,

and percentage in brackets (n (%)) and compared with χ^2 test. Normal distribution of the study population was tested with Shapiro–Wilk test. For the interpretation of receiver operating characteristic (ROC) analysis, Youden's index was calculated as $J = \text{sensitivity} + \text{specificity} - 1$.

RESULTS

Patient Characteristics

Patients were 75 ± 10 years of age. A total of 66% were male. Forty-seven of the 93 patients were on aspirin monotherapy, and 46 on dual therapy with aspirin and clopidogrel. A total of 83% of the patients suffered from coronary artery disease, 81% from hypertension, 31% had diabetes mellitus, and 73% hypercholesterolemia. Clinical and laboratory characteristics are presented in Tables 1–4.

Correlation Between Assays

Pearson regression analyses revealed moderate to poor correlations between the different assays.

In the group of aspirin-treated patients, expressed by AA-induced platelet reactivity, both impedance aggregometry tests ROTEM-PTL and multiplate electrode aggregometry (MEA) correlated well ($r^2 = 0.435$, $P \leq 0.001$). MEA

TABLE 1. Baseline Characteristics, Cardiovascular Risk Factors, and Medical History

Characteristics	Total (n = 93)
Age, yr (mean $\pm$ SD)	75 $\pm$ 10
Male gender, n (%)	61 (66%)
Height, cm (mean $\pm$ SD)	171 $\pm$ 11
Weight, kg (mean $\pm$ SD)	79 $\pm$ 16
Body mass index (mean $\pm$ SD)	27 $\pm$ 5
Cardiovascular risk factors, n (%)	
Hypertension	75 (81)
Hypercholesterolemia	68 (73)
Diabetes mellitus	29 (31)
Smoker (current)	27 (29)
Obesity (BMI > 30)	14 (15)
Medical history, n (%)	
Previous myocardial infarction	19 (20)
Previous CABG	21 (23)
Previous stroke	10 (11)
Intervention	70 (75)
Impaired LV function (EF < 40%)	25 (27)
Chronic kidney disease—none	6 (6)
Stage 1 (GFR: ≥ 90 mL/min/1.73 m ²)	38 (41)
Stage 2 (GFR: 60–89 mL/min/1.73 m ²)	38 (41)
Stage 3 (GFR: 30–59 mL/min/1.73 m ²)	7 (8)
Stage 4 (GFR: 15–29 mL/min/1.73 m ²)	4 (4)

BMI, body mass index; EF, ejection fraction; LV, left ventricular; CABG, coronary artery bypass graft, chronic kidney disease stages after KDIGO 2012.

TABLE 2. Clinical Presentation

Presentation	Total (n = 93), n (%)
ST-elevation myocardial infarction	5 (5)
Non-ST-elevation myocardial infarction	23 (25)
Unstable angina pectoris	1 (1)
Stable coronary artery disease	48 (52)
Coronary artery disease	
One vessel	14 (15)
Two vessel	17 (18)
Three vessel	46 (50)
None	16 (17)
CCS stage	
CCS 0	67 (72)
CCS 1	1 (1)
CCS 2	12 (13)
CCS 3	9 (10)
CCS 4	4 (4)
NYHA stage	
NYHA I	21 (23)
NYHA II	28 (30)
NYHA III	35 (37)
NYHA IV	9 (10)

CCS, Canadian Cardiovascular Society; NYHA, New York Heart Association.

correlated moderately with LTA ($r^2 = 0.133$, $P = 0.022$). Pearson correlation did not show an association of ROTEM-PTL and LTA ($r^2 = 0.048$, $P = 0.180$) (Fig. 1, see **Table 2, Supplemental Digital Content 4**, <http://links.lww.com/JCVP/A341>).

Among the DAPT-treated patients, the strongest significant correlation was observed for ROTEM-PTL versus LTA ($r^2 = 0.409$, $P = 0.001$). ROTEM-PTL correlated only slightly lower with MEA at $r^2 = 0.398$ ($P = 0.001$). Furthermore, VASP correlated with both LTA and MEA at $r^2 = 0.231$ ($P = 0.020$). ROTEM-PTL and VASP ($r^2 = 0.164$, $P = 0.055$) as well as MEA and LTA ($r^2 = 0.167$, $P = 0.053$) did not correlate (Fig. 2, see **Table 3, Supplemental Digital Content 5**, <http://links.lww.com/JCVP/A342>).

Differentiation Between Healthy Individuals and Patients on Medication

ROC analysis was performed to examine the test-specific ability to differentiate between healthy subjects and patients on medication. Youden's index was calculated to define a cut-off level between these 2 groups. ROTEM-PTL distinguishes well between healthy versus treated individuals: for aspirin monotherapy, ROC_{AUC} was 0.99 (95% CI, 0.97–1.00); $P < 0.0001$ (Fig. 3A) with a cut-off at 74 Ohm $\times$ min. For DAPT, ROC_{AUC} showed 0.80 (95% CI, 0.69–0.91); $P < 0.001$ (Fig. 3D). The cut-off was 68.5 Ohm $\times$ min here.

However, an even stronger discrimination was observed for LTA and MEA (Figs. 3B, C, E, F). For instance, in the DAPT group, MEA displayed ROC_{AUC} 0.91 (95% CI, 0.81–1.00); $P < 0.005$ (Fig. 3F) which is even higher than for ROTEM-PTL.

TABLE 3. Comedication

Medication	Total (n = 93), n (%)
Aspirin 100 mg	93 (100)
P2Y ₁₂ blocker (clopidogrel 75 mg)	46 (49)
ACE-/AT-II-receptor-inhibitor	62 (67)
Beta blocker	64 (69)
Calcium-channel inhibitor	32 (34)
Aldosterone antagonist	25 (27)
Cardiac glycoside	8 (9)
Proton-pump inhibitor	53 (57)
Statin	68 (73)
Oral antidiabetic	12 (13)
Insulin	12 (13)

ACE, angiotensin-converting enzyme; AT-II, angiotensin II.

HTPR Defined by ROTEM Platelet

Because of the lack of clinical studies that have worked with ROTEM-PTL, no HTPR cut-off levels have been established yet. Therefore, we took the most specific test for clopidogrel—VASP—as reference. Then, we matched our ROTEM-PTL data accordingly and performed an ROC analysis (Fig. 4). ROC_{AUC} was 0.76 (95% CI, 0.55–0.96), $P = 0.035$. Youden's index was regarded as cut-off value for HTPR measured by ROTEM-PTL. Based on VASP data, the optimal cut-off in ROTEM-PTL measurement to define HTPR to clopidogrel was 73 Ohm $\times$ min.

DISCUSSION

The major finding of this study is that the new ROTEM-PTL test is reliable in the differentiation of treated versus nontreated individuals. It correlates moderately with established assays.

TABLE 4. Laboratory Data

Laboratory Data	Unit	Mean $\pm$ SD
Hemoglobin	g/dL	11.8 $\pm$ 2.2
Hematocrit	%	36.2 $\pm$ 6.2
Thrombocytes	*1000/ μ L	224 $\pm$ 90
Leukocytes	*1000/ μ L	7.7 $\pm$ 3.2
Total cholesterol	mg/dL	161 $\pm$ 47
Triglycerides	mg/dL	136 $\pm$ 74
LDL	mg/dL	97 $\pm$ 37
HDL	mg/dL	47 $\pm$ 18
Creatinine	mg/dL	1.5 $\pm$ 1.2
Urea	mg/dL	44 $\pm$ 24
Glucose	mg/dL	151 $\pm$ 94
CRP	mg/dL	2.7 $\pm$ 3.8
Creatine kinase	U/L	108 $\pm$ 106
CK-MB	U/L	23 $\pm$ 10
Troponin T	ng/L	164 $\pm$ 716
BNP	pg/mL	3199 $\pm$ 5598

LDL, low-density lipoprotein; HDL, high-density lipoprotein; CRP, C-reactive protein; CK-MB, muscle-brain-type creatine kinase; BNP, brain natriuretic peptide.

Pharmacodynamic response to antiplatelet medication varies interindividually. This can partially be explained by its metabolism. The prodrug is hepatically converted by a cytochrome P450 2C19 (CYP2C19) enzyme-dependent oxidation and hydrolysis.¹⁶ The active metabolite is rather unstable but connects irreversibly to the P2Y₁₂ receptor.¹⁷ This leads to several possible explanations for insufficient effects of clopidogrel. First, hepatic failure or disturbed intestinal absorption could be a limiting factor. Second, interactions with other CYP2C19-dependent drugs such as proton pump inhibitors reduce bioactivation of clopidogrel.¹⁸ Third, patients with CYP2C19*2 loss-of-function polymorphism are “poor metabolizers” of clopidogrel and thus have a higher risk for adverse cardiovascular events.^{19–21} Last, diabetes and obesity are linked to HTPR.^{22–24}

Therefore, tailoring antiplatelet therapy according to individual response seems reasonable. However, GRAVITAS and other recent studies showed no association between tailored antiplatelet therapy and adverse events.^{10,12,13} The multiplicity of tests and the low correlation among each other might be one reason for this disappointing finding.

Therefore, in this study, we investigated the new ROTEM platelet assay. We revealed that ROTEM-PTL discriminated well between healthy and treated individuals. However, correlation with other assays was rather moderate. This agrees with findings of other groups.^{25–27} Therefore, one reason that above-mentioned studies failed to demonstrate superiority of tailored antiplatelet regimes might be that the used assays are not specific enough.

The comparability in-between the available tests is limited because of different methodical properties. All tests included in this study use whole blood samples, except for LTA. Whole blood resembles a more physiological milieu than PRP. Interaction of thrombocytes with other blood cells can therefore not be registered in LTA. Their potential influence on platelet aggregation is excluded. This might impair comparability. This is supported by the fact that, in our study, both whole-blood assays (MEA and ROTEM-PTL) provided a rather strong correlation as compared to correlations with non-whole-blood assays. This stronger correlation raises the question of how useful a new test is, providing similar results to one already available (MEA). However, there could be a benefit in (1) the very short runtime and (2) 3 different parameters—A6, AUC, and maximum slope.

Furthermore, light transmission and impedance aggregometry are 2 physically different approaches. In LTA, the optical density of platelet aggregation in the sample is detected in a light channel, whereas in impedance aggregometry, changes in resistance between 2 electrodes are measured.

LTA is the historical gold standard. It has been included in numerous studies. However, it is criticized for lacking standardization and reproducibility between different laboratories.^{25,28} LTA is time-consuming and needs experimental expertise. Moreover, usage of ADP in LTA does not specifically address the P2Y₁₂ receptor but also targets the P2Y₁ subtype.²⁹ The contribution of P2Y₁ to the modification of platelet response must be kept in mind when assessing clopidogrel effects by LTA.

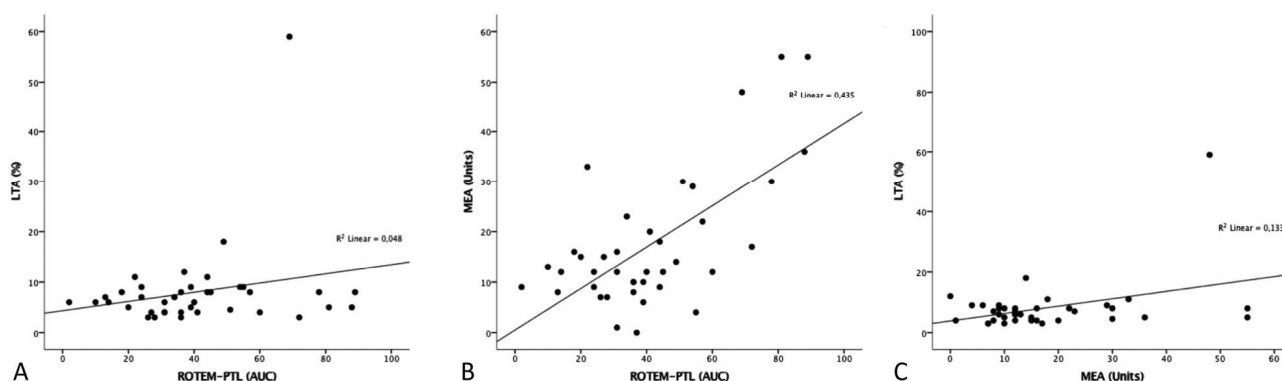


FIGURE 1. Pearson correlation between tests for aspirin group with arachidonic acid as stimulus: A, ROTEM platelet (ROTEM-PTL) versus light transmission aggregometry (LTA) did not correlate ($r^2 = 0.048$, $P = 0.180$). B, ROTEM-PTL versus multiplate impedance aggregometry (MEA) correlated well ($r^2 = 0.435$, $P \leq 0.001$). C, MEA versus LTA correlated moderately ($r^2 = 0.133$, $P = 0.022$).

The pharmacologically most specific assay to evaluate clopidogrel treatment is VASP. It targets only the P2Y₁₂ receptor.^{28,30} VASP assay is based on yet another physical principle: quantitative flow cytometry measures the level of phosphorylated versus dephosphorylated VASP. This correlates with inhibited versus activated P2Y₁₂.³¹ However, one must consider that VASP phosphorylation is modulated by some factors. It is impaired in certain comorbidities, eg,

myeloproliferative disorders.³² In addition, drugs such as cilostazol or dipyridamole enhance phosphorylation.^{33,34} Therefore, conclusions for the resulting adjustment of clopidogrel therapy should be drawn cautiously as well. Moreover, VASP assay is time-consuming too.

Aleil et al³¹ first implemented VASP assay in 2005 to detect clopidogrel-resistant patients suffering from ischemic cardiovascular events. This pilot study revealed good

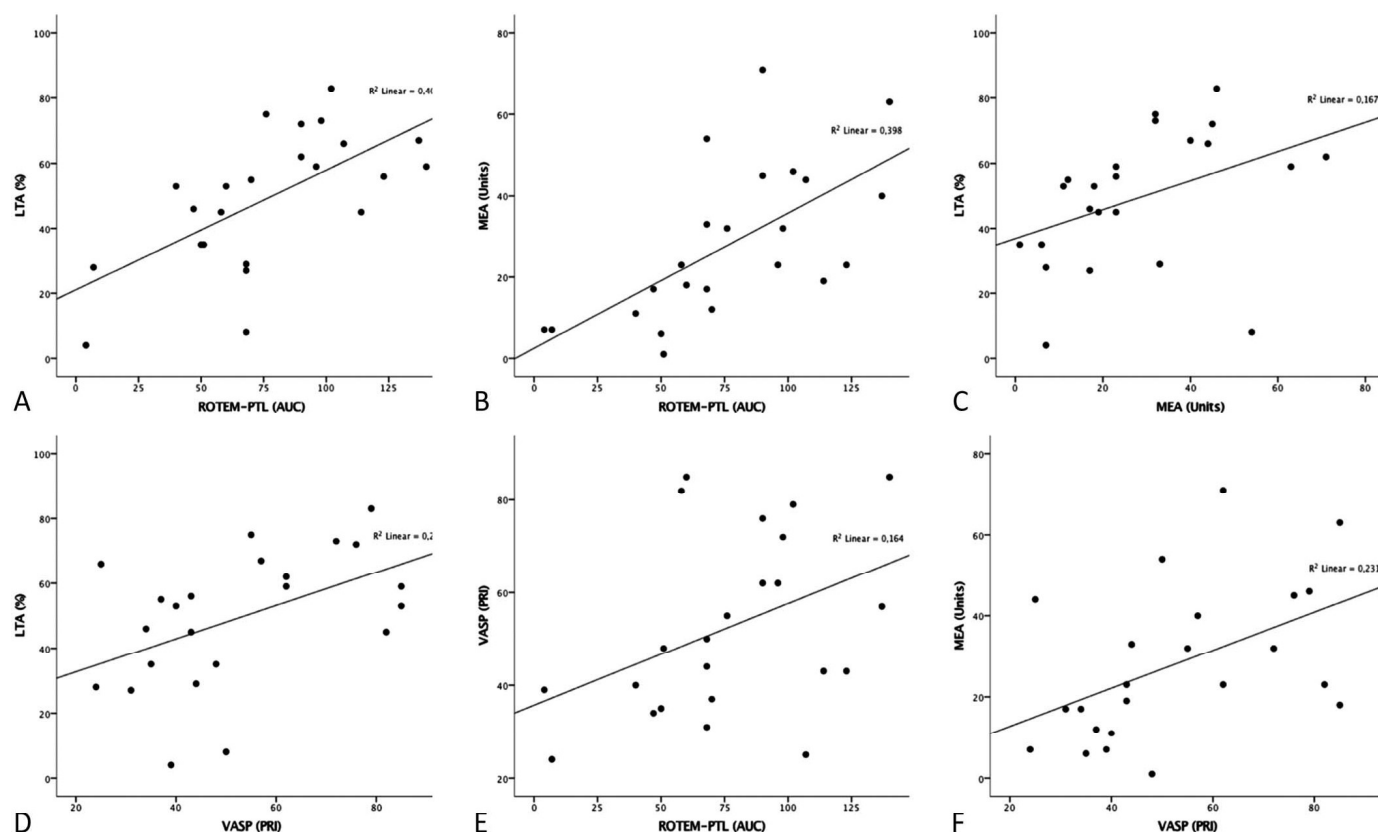


FIGURE 2. Pearson correlation between tests for DAPT group with ADP as stimulus. A, The strongest significant correlation was observed for ROTEM-PTL versus LTA ($r^2 = 0.409$, $P = 0.001$). B, ROTEM-PTL correlated only slightly lower with MEA at $r^2 = 0.398$ ($P = 0.001$). C, MEA and LTA ($r^2 = 0.167$, $P = 0.053$) did not correlate. D, VASP phosphorylation assay versus LTA correlated moderately ($r^2 = 0.231$, $P = 0.020$). E, ROTEM-PTL and VASP did not correlate ($r^2 = 0.164$, $P = 0.055$). F, VASP versus MEA correlated at $r^2 = 0.231$ ($P = 0.020$).

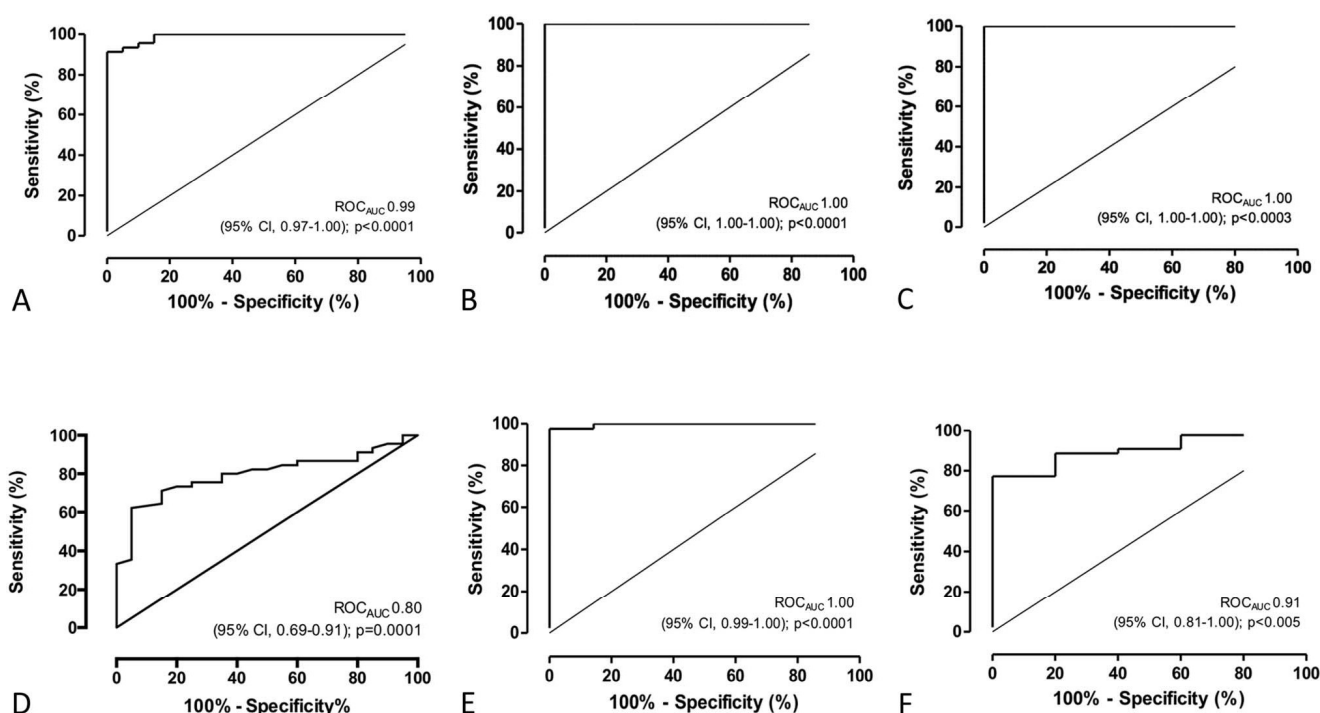


FIGURE 3. ROC analyses of assays—A–C, aspirin group, each stimulated with arachidonic acid, D–F, DAPT group, each stimulated with ADP. A, ROTEM-PTL distinguishes well between healthy versus treated individuals (ROC_{AUC} 0.99 (95% CI, 0.97–1.00); $P < 0.0001$). B and C, LTA [ROC_{AUC} 1.00 (95% CI, 1.00–1.00); $P < 0.0001$] and MEA [ROC_{AUC} 1.00 (95% CI, 1.00–1.00); $P < 0.0003$] showed an even stronger discrimination. D, For DAPT ROTEM-PTL discriminates well [ROC_{AUC} 0.80 (95% CI, 0.69–0.91); $P < 0.001$]. E and F, LTA [ROC_{AUC} 1.00 (95% CI, 0.99–1.00); $P < 0.0001$] and MEA [ROC_{AUC} 0.91 (95% CI, 0.81–1.00); $P < 0.005$] displayed a higher level of discrimination in this group.

correlations between VASP- and ADP-induced LTA. However, several following studies showed contradicting results with generally moderate to poor correlations.^{35–37} This goes in line with results of our study and indicates again that low

levels of agreement exist between technically different methods.

Furthermore, reagents such as AA, ADP etc. are provided by different companies. In this study, we used, for example, Tem products (ara-tem, adp-tem) and Roche products (ASPItest and ADPtest). Production is therefore not standardized. In addition, different concentrations of the stimuli are used in the different platelet function tests. This might affect the results of platelet function assays and might be a reason why MEA and ROTEM-PTL do not correlate perfectly. Because of this, future studies should evaluate whether reagents of different companies act similarly in one method, preferably in LTA.

In general, a good bedside assay should be specific, user-friendly, and fast. Indeed, the optimal assay in evaluation of aspirin antiplatelet effects would be thromboxane formation. This is the pharmacologically most specific test.³⁸ However, available assays are expensive, time-consuming, and require laboratory experience and skills. Nevertheless, an interesting approach that will perhaps be able to evaluate thromboxane formation bed-side has recently been published. Measurement of malondialdehyde, which is generated with thromboxane in a 1:1 ratio, can be measured by fluorometry.³⁹

LTA is time-consuming because of 2 necessary centrifugation steps for generating PRP and PPP. The other methods used in this study do not require centrifugation because they work with whole blood. The VASP protocol

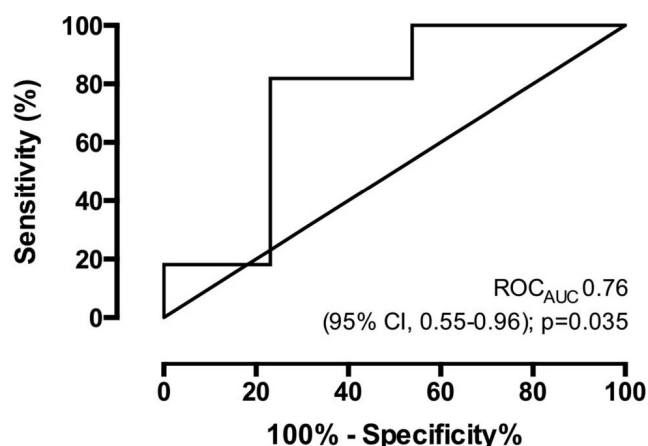


FIGURE 4. HTPR to clopidogrel measured by ROTEM-PTL (based on VASP data): As no HTPR cut-off levels have been established for ROTEM-PTL, yet VASP was taken as reference [ROC_{AUC} 0.76 (95% CI, 0.55–0.96), $P = 0.035$]. Youden's index was regarded as cut-off value for HTPR measured by ROTEM-PTL. Based on VASP data, the optimal cut-off in ROTEM-PTL measurement to define HTPR to clopidogrel was 73 Ohm $\times$ min.

takes 30 minutes (Diagnostica Stago, Biocytex, Asnières sur Seine, France) and MEA 10 minutes (F. Hoffmann-La Roche Ltd) to complete. By contrast, ROTEM-PTL delivers first results after 6 minutes of measurement (Tem-Group). Saving of time outweighs the moderate correlations of ROTEM platelet in comparison with other tests because, at the same time, ROTEM platelet differentiates well between treated and healthy patients.

LIMITATIONS

The major limitation of this pilot study was the small number of patients and lack of clinical outcome. Numerous trials have already investigated the agreement of established platelet function tests with clinical outcomes. Although frequently used, we did not include VerifyNow assay or Diapharma's Multiplate analyzer in our study. Newer methods such as ROTEM-PTL need to be evaluated regarding reliability and validity. Further studies with a greater number of patients have to demonstrate the repeatability of our findings. Another limitation is the lack of established HTPR reference levels for ROTEM-PTL. In general, units of measurement and cut-off levels differ between all available methods to assess platelet function. This is associated with a major limitation of platelet function testing: different assays applied in the same individual frequently lead to substantial different results ranging from HTPR in one test and LTPR in another.⁴⁰ In this study, we used the cut-off level for the respective assay recommended by the consensus document of platelet function testing.⁴ VASP assay is the most specific test for the evaluation of P2Y₁₂ inhibition, whereas LTA with ADP-induced MOA is not as specific. It is influenced by aspirin intake, and platelet activation is also mediated by other receptors than the P2Y₁₂ receptor. Therefore, based on the cut-off value for VASP, we matched ROTEM-PTL data accordingly. We then revealed an optimal cut-off through ROC analysis and Youden's index. However, randomized clinical studies are required to verify this statistically generated cut-off level. Besides, studies of platelet function with healthy subjects and in vitro added drugs are missing for ROTEM-PTL. This has to be evaluated in the future.

CONCLUSION

The novel ROTEM platelet assay distinguished well between treated patients and healthy individuals but correlated only moderately with other assays. Trials with clinical end points are needed to investigate the ability of this new assay to identify patients at risk of adverse events.

REFERENCES

- Jneid H, Anderson JL, Wright RS, et al. ACCF/AHA focused update of the guideline for the management of patients with unstable angina/non-ST-elevation myocardial infarction: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol*. 2012;60:645–681.
- Levine GN, Bates ER, Blankenship JC, et al. 2015 ACC/AHA/SCAI focused update on primary percutaneous coronary intervention for patients with ST-elevation myocardial infarction: an update of the 2011 ACCF/AHA/SCAI Guideline for percutaneous coronary intervention and the 2013 ACCF/AHA Guideline for the management of ST-elevation myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*. 2016;67:1235–1250.
- Hamm CW, Bassand JP, Agewall S, et al. ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation: the task force for the management of acute coronary syndromes (ACS) in patients presenting without persistent ST-segment elevation of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J*. 2011;32:2999–3054.
- Tantry US, Bonello L, Aradi D, et al. Consensus and update on the definition of on-treatment platelet reactivity to adenosine diphosphate associated with ischemia and bleeding. *J Am Coll Cardiol*. 2013;62:2261–2273.
- Dannenberg L, Erschoff V, Bonner F, et al. Dipyron comedication in aspirin treated stroke patients impairs outcome. *Vascul Pharmacol*. 2016;87:66–69.
- Polzin A, Afzal S, Balzer J, et al. Platelet reactivity in MitraClip patients. *Vascul Pharmacol*. 2016;77:54–59.
- Polzin A, Dannenberg L, Sansone R, et al. Antiplatelet effects of aspirin in chronic kidney disease patients. *J Thromb Haemost*. 2016;14:375–380.
- Polzin A, Dannenberg L, Sophia Popp V, et al. Antiplatelet effects of clopidogrel and aspirin after interventional patent foramen ovale/atrium septum defect closure. *Platelets*. 2016;27:317–321.
- Polzin A, Schleicher M, Seidel H, et al. High on-treatment platelet reactivity in transcatheter aortic valve implantation patients. *Eur J Pharmacol*. 2015;751:24–27.
- Price MJ, Berger PB, Teirstein PS, et al. Standard- vs high-dose clopidogrel based on platelet function testing after percutaneous coronary intervention: the GRAVITAS randomized trial. *JAMA*. 2011;305:1097–1105.
- Trenk D, Stone GW, Gawaz M, et al. A randomized trial of prasugrel versus clopidogrel in patients with high platelet reactivity on clopidogrel after elective percutaneous coronary intervention with implantation of drug-eluting stents: results of the TRIGGER-PCI (Testing Platelet Reactivity in Patients Undergoing Elective Stent Placement on Clopidogrel to Guide Alternative Therapy With Prasugrel) study. *J Am Coll Cardiol*. 2012;59:2159–2164.
- Cayla G, Cuisset T, Silvain J, et al. Platelet function monitoring to adjust antiplatelet therapy in elderly patients stented for an acute coronary syndrome (ANTARCTIC): an open-label, blinded-endpoint, randomised controlled superiority trial. *Lancet*. 2016;388:2015–2022.
- Collet JP, Cayla G, Cuisset T, et al. Randomized comparison of platelet function monitoring to adjust antiplatelet therapy versus standard of care: rationale and design of the assessment with a double randomization of (1) a fixed dose versus a monitoring-guided dose of aspirin and clopidogrel after DES implantation, and (2) treatment interruption versus continuation, 1 year after stenting (ARCTIC) study. *Am Heart J*. 2011;161:5–12 e5.
- Gum PA, Kottke-Marchant K, Welsh PA, et al. A prospective, blinded determination of the natural history of aspirin resistance among stable patients with cardiovascular disease. *J Am Coll Cardiol*. 2003;41:961–965.
- Breet NJ, van Werkum JW, Bouman HJ, et al. High on-aspirin platelet reactivity as measured with aggregation-based, cyclooxygenase-1 inhibition sensitive platelet function tests is associated with the occurrence of atherothrombotic events. *J Thromb Haemost*. 2010;8:2140–2148.
- Pereillo JM, Maftouh M, Andrieu A, et al. Structure and stereochemistry of the active metabolite of clopidogrel. *Drug Metab Dispos*. 2002;30:1288–1295.
- Bonello L, Tantry US, Marcucci R, et al. Consensus and future directions on the definition of high on-treatment platelet reactivity to adenosine diphosphate. *J Am Coll Cardiol*. 2010;56:919–933.
- Gilard M, Arnaud B, Cornily JC, et al. 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*. 2008;51:256–260.
- Mega JL, Close SL, Wiviott SD, et al. Cytochrome p-450 polymorphisms and response to clopidogrel. *N Engl J Med*. 2009;360:354–362.
- Horenstein RB, Madabushi R, Zineh I, et al. Effectiveness of clopidogrel dose escalation to normalize active metabolite exposure and antiplatelet effects in CYP2C19 poor metabolizers. *J Clin Pharmacol*. 2014;54:865–873.

21. Kim HS, Chang K, Koh YS, et al. CYP2C19 poor metabolizer is associated with clinical outcome of clopidogrel therapy in acute myocardial infarction but not stable angina. *Circ Cardiovasc Genet*. 2013;6:514–521.
22. Aleil B, Leon C, Cazenave JP, et al. CYP2C19*2 polymorphism is not the sole determinant of the response to clopidogrel: implications for its monitoring. *J Thromb Haemost*. 2009;7:1747–1749.
23. Hochholzer W, Trenk D, Fromm MF, et al. 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*. 2010;55:2427–2434.
24. Geisler T, Schaeffeler E, Dippon J, et al. CYP2C19 and nongenetic factors predict poor responsiveness to clopidogrel loading dose after coronary stent implantation. *Pharmacogenomics*. 2008;9:1251–1259.
25. Gremmel T, Koppensteiner R, Panzer S. Comparison of aggregometry with flow cytometry for the assessment of agonists -induced platelet reactivity in patients on dual antiplatelet therapy. *PLoS One*. 2015;10:e0129666.
26. Gremmel T, Steiner S, Seidinger D, et al. Comparison of methods to evaluate aspirin-mediated platelet inhibition after percutaneous intervention with stent implantation. *Platelets*. 2011;22:188–195.
27. Lordkipanidze M, Pharand C, Schampaert E, et al. A comparison of six major platelet function tests to determine the prevalence of aspirin resistance in patients with stable coronary artery disease. *Eur Heart J*. 2007;28:1702–1708.
28. Garabedian T, Alam S. High residual platelet reactivity on clopidogrel: its significance and therapeutic challenges overcoming clopidogrel resistance. *Cardiovasc Diagn Ther*. 2013;3:23–37.
29. Amison RT, Jamshidi S, Rahman KM, et al. Diverse signalling of the platelet P2Y1 receptor leads to a dichotomy in platelet function. *Eur J Pharmacol*. 2018;827:58–70.
30. Geiger J, Teichmann L, Grossmann R, et al. Monitoring of clopidogrel action: comparison of methods. *Clin Chem*. 2005;51:957–965.
31. Aleil B, Ravanat C, Cazenave JP, et al. Flow cytometric analysis of intraplatelet VASP phosphorylation for the detection of clopidogrel resistance in patients with ischemic cardiovascular diseases. *J Thromb Haemost*. 2005;3:85–92.
32. Eigenthaler M, Ullrich H, Geiger J, et al. Defective nitrovasodilator-stimulated protein phosphorylation and calcium regulation in cGMP-dependent protein kinase-deficient human platelets of chronic myelocytic leukemia. *J Biol Chem*. 1993;268:13526–13531.
33. Sudo T, Ito H, Kimura Y. Phosphorylation of the vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) by the anti-platelet drug, cilostazol, in platelets. *Platelets*. 2003;14:381–390.
34. Aktas B, Utz A, Hoenig-Liedl P, et al. Dipyridamole enhances NO/cGMP-mediated vasodilator-stimulated phosphoprotein phosphorylation and signaling in human platelets: in vitro and in vivo/ex vivo studies. *Stroke*. 2003;34:764–769.
35. Gaglia MA, Torguson R, Pakala R, et al. Correlation between light transmission aggregometry, VerifyNow P2Y12, and VASP-P platelet reactivity assays following percutaneous coronary intervention. *J Interv Cardiol*. 2011;24:529–534.
36. Jover E, Rodriguez JM, Bernal A, et al. High on-treatment platelet reactivity in patients with ischemic cerebrovascular disease: assessment of prevalence and stability over time using four platelet function tests. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2014;25:604–611.
37. Aradi D, Magyarlaki T, Tokes-Fuzesi M, et al. Comparison of conventional aggregometry with VASP for monitoring P2Y12-specific platelet inhibition. *Platelets*. 2010;21:563–570.
38. Mohring A, Piayda K, Dannenberg L, et al. Thromboxane Formation Assay to identify high on-treatment platelet reactivity to aspirin. *Pharmacology*. 2017;100:127–130.
39. Polzin A, Dannenberg L, Schneider T, et al. Malondialdehyde Assay in evaluation of aspirin antiplatelet effects. *Pharmacology*. 2018;103:23–29.
40. Helten C, Naguib D, Dannenberg L, et al. Platelet function testing: dead or alive. *J Thromb Haemost*. 2018;16:984–986.

4 Weiteres Material und weitere Methoden

4.1 Studienpopulation und -design

Im Jahre 2016 führten wir in der Klinik für Kardiologie, Pneumologie und Angiologie des Universitätsklinikums Düsseldorf eine monozentrische Beobachtungsstudie an einer Kohorte von 93 Patienten durch. Einschlusskriterien waren zum einen die Einwilligung des Patienten, zum anderen die klinische Indikation zur Therapie mit 100 mg ASS als Monotherapie oder eine duale Plättchenhemmung mit 100 mg ASS und 75 mg Clopidogrel täglich. Minderjährigkeit und die Verordnung von anderen P2Y12-Antagonisten wie Prasugrel oder Ticagrelor galten als Ausschlusskriterien. Die regelhafte Einnahme von ASS und Clopidogrel wurde vom Stationspersonal während des Krankenhausaufenthaltes überwacht. Um jedweden potentiellen Einfluss auf die Plättchenreaktivität auszuschließen, wurden zum Zeitpunkt der Blutentnahme keine oralen Antikoagulantien verabreicht. Ein *Bridging* mit Heparin wurde zwei Stunden vor der Probenabnahme pausiert. Als Referenzgruppe wurden des Weiteren 20 gesunde Probanden in die Studie eingeschlossen.

4.2 Blutentnahme

Zwei Stunden nach Einnahme des jeweiligen Medikaments, wenn der Plasmaspiegel im Blut des Studienpatienten als am höchsten eingestuft wird, wurde an einer Ellenbogen- oder Handvene unter sterilen Bedingungen Blut abgenommen. Dies erfolgte mit einer 21G Butterfly Nadel (BD Vacutainer® Safety-Lok™, Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, USA). Für die nachfolgenden Messungen wurden zwei 2,7 ml Citrat-Röhrchen (BD Vacutainer®, Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, USA), ein S-Monovette® 2,7 ml Hirudin-Röhrchen, ein S-Monovette® 2,7 ml Lithium Heparin-Röhrchen und ein Lithium-Heparin-Calcium-balanciertes Blutgasröhrchen (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) benötigt. Die Zahl der Blutzellen, insbesondere die Thrombozytenzahl, wurden mit einem Sysmex XN-3100™ Automated Hematology System (Sysmex Europe GmbH, Norderstedt, Deutschland) bestimmt. Direkt im Anschluss wurden die unterschiedlichen Tests durchgeführt.

4.3 Lichttransmissionsaggregometrie

Die Lichttransmissionsaggregometrie (LTA) ist ein optisches Verfahren, bei dem die Verklumpung der Thrombozyten im Plasma in einer Küvette über die Lichtintensität wahrgenommen wird. Zuerst wurde das Citrat-antikoagulierte Blut in plättchenreiches Plasma (PRP) und Hämatokrit bei 250 x g aufgeteilt. Anschließend wurde aus dem Überstand plättchenarmes Plasma (PAP) bei einer Zentrifugationszahl von 1600 x g gewonnen, welches zur Eichung des Aggregometers verwendet wurde. Die LTA wurde auf einem APACT 4004® Aggregometer (LABiTec, Ahrensburg, Deutschland) nach der zuvor beschriebenen Methode durchgeführt (70). In jede Küvette wurden 200 µl PRP, 50 µl Thrombozytenmedium und 5 µl Stimulans gegeben. 0,5 mM AA (NatuTec GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland) und 10 µM ADP (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) wurden hierfür verwendet. Ein Rührstäbchen sorgt mithilfe eines Magneten in dem Gerät für eine gleichmäßige Vermischung der Substanzen. Sechs Minuten lang wurde der Aggregationsverlauf beobachtet. Eine HTPR unter Aspirin wurde folgendermaßen definiert: *maximum of aggregation* (MoA) >20% (71-73). Für eine duale Plättchenhemmung wurde ein MoA >46% als HTPR und <19% als LTPR angenommen (Tabelle 1) (59).

4.4 Multiple-Elektroden-Aggregometrie

Der Multiplate® Analyzer (Roche Diagnostics, Rotkreuz, Schweiz) basiert, ähnlich wie ROTEM® *platelet*, auf dem Prinzip der Impedanzaggregometrie bzw. der Multiplen-Elektroden-Aggregometrie (MEA). Hierfür wurden Hirudin- oder Citrat-antikoagulierte Vollblutproben verwendet. In der Messzelle befinden sich zwei mit Silber beschichtete, leitfähige Kupferdrähte und ein teflonbeschichteter Rührstab (74). Die Thrombozyten wurden durch den ASPItest® (0,5 mM AA) oder den ADPtest® (6,4 µM ADP) aktiviert. Aktivierte Thrombozyten bilden Aggregate, die an den Elektroden haften. Der folglich steigende Widerstand zwischen den Elektroden wird von dem Gerät wahrgenommen, kontinuierlich aufgezeichnet und als AUC in *arbitrary units* dargestellt (AU*min = U, Umrechnung: 1 U = 10 AU*min) (75). Eine HTPR besteht bei >46 AU (*aggregation units*), eine LTPR bei <19 AU (Tabelle 1) (59).

4.5 ROTEM® platelet

Das ROTEM® *platelet* ist ein *add-on* Modul für das ROTEM® *delta* (beide Tem Innovations®, München, Deutschland). Beide Systeme können gleichzeitig arbeiten,

aber verwenden unterschiedliche Techniken. ROTEM® *delta* liefert einen Koagulationsstatus mittels Thromboelastometrie. ROTEM® *platelet* hingegen, wie das Multiplate®-System, nutzt die Impedanzaggregometrie, um die Thrombozytenfunktion an seinen Elektroden zu messen. Für diesen *Point-of-care* Test mit einer Laufzeit von 6 Minuten können sowohl Hirudin- als auch Citrat-Vollblutproben verwendet werden (76). Als Stimulantien wurden in unserer Studie ara-tem® (0,42 mM AA Endkonzentration) und adp-tem® (10 µM ADP, beides Tem Innovations, München, Deutschland) benutzt. Die Ergebnisse werden auf drei verschiedene Weisen dargestellt: 1. Als *area under the aggregation curve* (AUC) in Ohm*min. Dieser Parameter wurde in dieser Studie verwendet und ist ein Maß für die gesamte Plättchenaggregation (vgl. Abb. 7); 2. als A6, der Amplitude in Ohm nach 6 Minuten Laufzeit, einem Parameter für die Effizienz der Aggregation; 3. als *maximum slope* (MS) der Aggregationskurve, was die Geschwindigkeit der Aggregation in Ohm/min beschreibt (76). Ein typischer ROTEM® *platelet* (ROTEM-PTL) Kurvenverlauf ähnelt dem Multiplate®-Kurvenverlauf derselben Probe (vgl. Abb. 6).

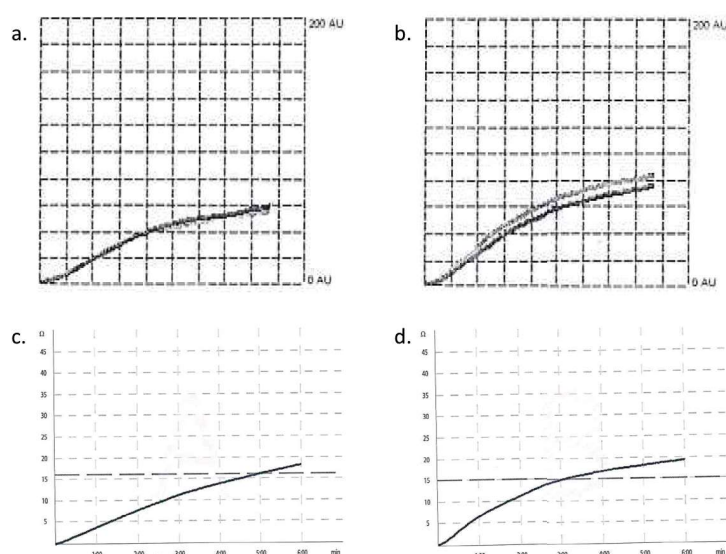


Abb. 6: Typische Kurvenverläufe in der Impedanzaggregometrie – a.+b. Multiplate (MEA), c.+d. ROTEM® *platelet* (ROTEM-PTL) a. MEA-Kurve mit Arachidonsäure (AA) ähnelt der dazugehörigen c. ROTEM-PTL Kurve. b. MEA-Graph stimuliert mit Adenosindiphosphat (ADP) ähnelt dem d. ROTEM-PTL Kurvenverlauf desselben Patienten.

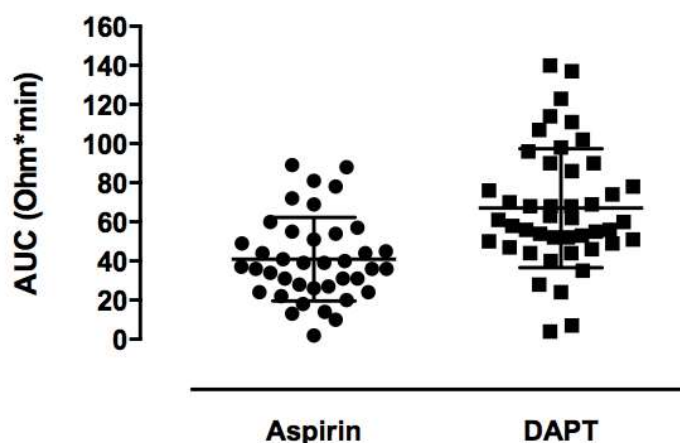


Abb. 7: Impedanzaggregometrie mit ROTEM® platelet: Verteilung der Werte in der Acetylsalicylsäure (ASS)-Gruppe (links) mit 47 Patienten. Duale Plättchenhemmung (DAPT)-Gruppe (rechts), bestehend aus 46 Patienten (AUC = *area under the aggregation curve*)

4.6 Vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) Phosphorylierungs-Assay

VASP ist ein intrazelluläres Protein im Plättchen, welches im Grundzustand nicht-phosphoryliert vorkommt. Die Phosphorylierung erfolgt über cAMP. Diese Kaskade wird über Prostaglandin E1 (PGE1) aktiviert. Über ADP und den P2Y12-Rezeptor wird diese gehemmt. Der Grad der VASP-Phosphorylierung korreliert mit der Rezeptorinhibition (Abb. 8).

Zur Einschätzung der Wirkung der P2Y12-Hemmung wurde das PLT VASP/P2Y12 Test Kit® (Diagnostica Stago, Biocytex, Asnières sur Seine, Frankreich) benutzt. Citrat-antikoagulierte Vollblut wurde mit PGE1 alleine oder ADP und PGE1 inkubiert. In der Durchflusssytometrie (Gallios Flow Cytometer, Beckman Coulter, Marseille, Frankreich) wurde danach die Phosphorylierung des VASP gemessen. Der *Platelet reactivity index* (PRI) wurde als Verhältnis der *mean fluorescence intensity* (MFI) der mit PGE1 oder ADP und PGE1 inkubierten Proben nach folgender Formel berechnet (77):

$$\text{PRI} = [(MFI_{\text{PGE1}} - MFI_{\text{ADP}}) / MFI_{\text{PGE1}}] \times 100$$

Ein PRI >50 gilt als HTPR, ein PRI <16 als LTPR (Tabelle 1) (59).

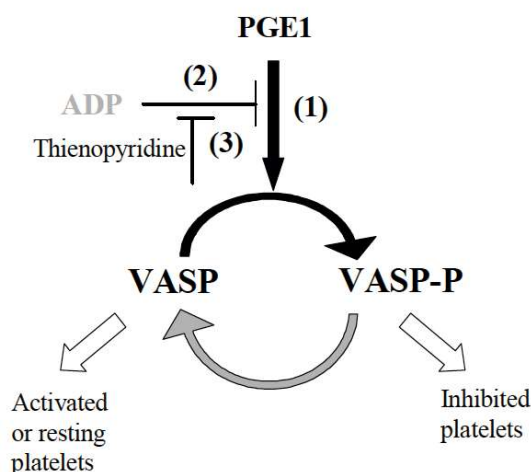


Abb. 8: VASP-Phosphorylierung nach Aleil et al., 2005 (77) und Biocytex, Marseille, Frankreich, Version März 2018 (78) (ADP: Adenosindiphosphat, PGE1: Prostaglandin E1, VASP: vasodilator-stimulated phosphoprotein, VASP-P: phosphoryliertes VASP)

	Cut-off LTPR	Cut-off HTPR
LTA (MOA)	< 19 %	> 46 %
MEA (AU)	< 19	> 46
VASP (PRI)	< 16 %	> 50 %

Tabelle 1: Referenzwerte für etablierte Tests erstellt nach Tantry et al. 2013 (59)

4.7 Geräte, Substanzen und Puffer

4.7.1 Geräte

APACT 4004 Aggregometer	LABiTec, Ahrensburg, Deutschland (D)
Gallios Flow Cytometer	Beckman Coulter, Marseille, Frankreich
Eppendorf Tischzentrifuge 5415 R	Eppendorf AG, Hamburg, D
Heraeus Minifuge RF	Heraeus Holding GmbH, Hanau, D
Multiplate Analyzer	Roche Diagnostics, Rotkreuz, Schweiz

ROTEM platelet	Tem Innovations GmbH, München, D
Sysmex XN-3100™ Automated Hematology System	Sysmex Europe GmbH, Norderstedt, D

4.7.2 Substanzen

Arachidonsäure (AA; 0,5 mM)	AA10, NatuTec, Frankfurt, D
ara-tem (0,42 mM AA)	Tem Innovations GmbH, München, D
ASPItest® (0,5 mM AA)	Roche Diagnostics, Rotkreuz, Schweiz
Adenosin-5'-Diphosphat (ADP; 10 µM)	A2754, Sigma, Steinheim, D
adp-tem (10 µM ADP)	Tem Innovations GmbH, München, D
ADPtest (6,4 µM ADP)	Roche Diagnostics, Rotkreuz, Schweiz
Dinatriumhydrogenphosphatdihydrat, Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	106342, Merck, Darmstadt, D
HEPES: <i>N</i> -(2-Hydroxyethyl)Piperazin- <i>N'</i> -(2-Ethansulfonsäure)	H3375, Sigma, Steinheim, D
Kaliumchlorid, KCl	4936, Merck, Darmstadt, D
Magnesiumchlorid, MgCl ₂ x 6H ₂ O	5833, Merck, Darmstadt, D
Natriumchlorid, NaCl	6404, Merck, Darmstadt, D
Natriumhydrogencarbonat, NaHCO ₃	6329, Merck, Darmstadt, D
Natriumhydroxid, NaOH (in Ethanol)	6498, Merck, Darmstadt, D
PLT VASP/P2Y ₁₂ Test Kit	Diagnostica Stago, Biocytex, Asnières sur Seine, Frankreich
Tris	48552, Carl Roth, Karlsruhe, D

4.7.3 Lösungen und Puffer

Arachidonsäure (AA):

- Stammlösung: 100 mM in Ethanol
- Gebrauchslösung: 100 µl Stammlösung AA + 300 µl alkoholische NaOH (100 mM in Ethanol)
- Versalzen unter N₂ und lichtgeschützte Lagerung bei -20°C in N₂-Atmosphäre
- Am Versuchstag: Gebrauchslösung in 200 µl Tris-Puffer aufgenommen

Thrombozytenmedium-Puffer (pH 7,40 – Molekulargewicht (MG)):

- | | | |
|--|---------------------|----------------|
| • 134,00 mM NaCl | MG = 58,44 g/mol → | 1,960 g/250 ml |
| • 12,00 mM NaHCO ₃ | MG = 84,01 g/mol → | 0,252 g/250 ml |
| • 2,90 mM KCl | MG = 74,56 g/mol → | 0,054 g/250 ml |
| • 0,36 mM NaH ₂ PO ₄ x 2H ₂ O | MG = 137,99 g/mol → | 0,012 g/250 ml |
| • 1,00 mM MgCl ₂ x 6H ₂ O | MG = 203,31 g/mol → | 0,051 g/250 ml |
| • 5,00 mM HEPES | MG = 238,30 g/mol → | 0,289 g/250 ml |

Tris-Puffer (pH 7,40):

50,0 mM Tris-HCl	MG = 121,14 g/mol →	6,057 g/l
------------------	---------------------	-----------

Die Test-Kits von Tem, Roche und Biocytex werden als gebrauchsfertige Substanzen verkauft und mussten nicht gesondert gelöst oder angesetzt werden.

4.8 Statistische Analysen

GraphPad Prism5© (LaJolla, USA) und Statistical Package for Social Sciences (IBM SPSS©, Version 20, New York, USA) wurden für die statistischen Analysen verwendet. Ein Fehler 1. Art zu einem Niveau von $p=0,05$ wurde als signifikant festgelegt. Es mussten keine Ausreißer ausgeschlossen werden. Kontinuierliche Variablen wurden als Mittelwert $\pm$ Standardabweichung (SD) beschrieben und mit dem T-Test verglichen. Binäre Variablen wurden als absolute Zahl und Prozentzahl in Klammern dahinter (no. (%)) angegeben und mit dem Chi-Quadrat-Test verglichen. Die Normalverteilung der Studienpopulation wurde mit dem Shapiro-Wilk-Test überprüft. Korrelationen wurden mithilfe der *Pearson* Regressionsanalyse ausgerechnet. Der *Youden*-Index wurde zur

Interpretation der *Receiver Operating Characteristic* (ROC)-Analysen als $J = \text{sensitivity} + \text{specificity} - 1$ berechnet. Die Ergebnisse der ROC-Analysen wurden zu einem Konfidenzintervall (KI) von 95% angegeben.

5 Weitere Ergebnisse

5.1 Patientencharakteristika

Die Patienten waren 75 ± 10 Jahre alt. 66% von ihnen waren männlich. 47 von 93 Patienten erhielten eine ASS-Monotherapie und 46 eine DAPT mit ASS und Clopidogrel. An kardiovaskulären Risikofaktoren präsentierten sich 81% mit arterieller Hypertonie, 73% mit Hypercholesterinämie, 31% mit Diabetes mellitus und 15% mit Übergewicht. 94% der Patienten hatten eine eingeschränkte Nierenfunktion, 52% eine stabile KHK und 20% einen Herzinfarkt in der Vorgeschichte. Weitere Charakteristika sind in Tabelle 2 bis 5 zu finden.

Table 2: Baseline characteristics, cardiovascular risk factors and medical history

Characteristics	total n=93
Age - years (mean $\pm$ SD)	75 $\pm$ 10
Male gender – no (%)	61 (66%)
Height, cm (mean $\pm$ SD)	171 $\pm$ 11
Weight, kg (mean $\pm$ SD)	79 $\pm$ 16
Body mass index (mean $\pm$ SD)	27 $\pm$ 5
Cardiovascular risk factors – no. (%)	
Hypertension	75 (81%)
Hypercholesterolemia	68 (73%)
Diabetes mellitus	29 (31%)
Smoker (current)	27 (29%)
Obesity (BMI>30)	14 (15%)
Medical history – no. (%)	
Prior myocardial infarction	19 (20%)
Prior CABG	21 (23%)
Prior Stroke	10 (11%)
Intervention	70 (75%)
Impaired LV function (EF < 40%)	25 (27%)
Chronic kidney disease - none	6 (6%)
Stage 1 (GFR: $\geq$ 90 ml/min/1.73m ²)	38 (41%)
Stage 2 (GFR: 60-89 ml/min/1.73m ²)	38 (41%)
Stage 3 (GFR: 30-59 ml/min/1.73m ²)	7 (8%)
Stage 4 (GFR: 15-29 ml/min/1.73m ²)	4 (4%)

BMI=body mass index, SD=standard deviation, EF=ejection fraction, LV=left ventricular, CABG=coronary artery bypass graft, LV=left ventricular, GFR=glomerular filtration rate; Chronic kidney disease stages after KDIGO 2012

Table 3: Clinical presentation

Presentation – no. (%)	total n=93
ST-elevation myocardial infarction	5 (5%)
Non ST-elevation myocardial infarction	23 (25%)
Unstable angina pectoris	1 (1%)
Stable coronary artery disease	48 (52%)
Coronary artery disease	
one-vessel	14 (15%)
two-vessel	17 (18%)
three-vessel	46 (50%)
none	16 (17%)
CCS-Stage	
CCS 0	67 (72%)
CCS 1	1 (1%)
CCS 2	12 (13%)
CCS 3	9 (10%)
CCS 4	4 (4%)
NYHA-Stage	
NYHA I	21 (23%)
NYHA II	28 (30%)
NYHA III	35 (37%)
NYHA IV	9 (10%)

CCS=Canadian Cardiovascular Society, NYHA=New York Heart Association

Table 4: Comedication

Medication – no. (%)	total n=93
Aspirin 100 mg	93 (100%)
P2Y12-Blocker (Clopidogrel 75 mg)	46 (49%)
ACE- /AT-II-receptor-inhibitor	62 (67%)
Beta-blocker	64 (69%)
Calcium-channel inhibitor	32 (34%)
Aldosterone antagonist	25 (27%)
Cardiac glycoside	8 (9%)
Proton-pump inhibitor	53 (57%)
Statin	68 (73%)
Oral antidiabetic	12 (13%)
Insulin	12 (13%)

ACE=angiotensin-converting enzyme, AT-II=angiotensin II

Table 5: Laboratory data

Laboratory data	Unit	Mean $\pm$ SD
Haemoglobin	g/dl	11.8 $\pm$ 2.2
Haematocrit	%	36.2 $\pm$ 6.2
Thrombocytes	*1000/ μ l	224 $\pm$ 90
Leukocytes	*1000/ μ l	7.7 $\pm$ 3.2
Total Cholesterol	mg/dl	161 $\pm$ 47
Triglycerides	mg/dl	136 $\pm$ 74
LDL	mg/dl	97 $\pm$ 37
HDL	mg/dl	47 $\pm$ 18
Creatinine	mg/dl	1.5 $\pm$ 1.2
Urea	mg/dl	44 $\pm$ 24
Glucose	mg/dl	151 $\pm$ 94
CRP	mg/dl	2.7 $\pm$ 3.8
Creatine kinase	U/l	108 $\pm$ 106
CK-MB	U/l	23 $\pm$ 10
Troponin T	ng/l	164 $\pm$ 716
BNP	pg/ml	3199 $\pm$ 5598

LDL=low-density lipoprotein, HDL= high-density lipoprotein, CRP=C-reactive protein, CK-MB=muscle-brain type creatine kinase, BNP=brain natriuretic peptide, SD=standard deviation

5.2 Korrelation verschiedener Assays

Pearsons Regressionsanalyse zeigte mittlere bis schwache Korrelationen zwischen den verschiedenen Assays.

AA-induzierte Plättchenreaktivität spiegelt die ASS-Wirkung wider. In der Gruppe der ASS-behandelten Patienten korrelierten beide impedanzaggregometrischen Verfahren – MEA und ROTEM-PTL – gut miteinander ($r^2=0,435$; $p<0,001$). Die *Pearson*-Korrelation zwischen MEA und LTA erwies sich hingegen als moderat ($r^2=0,133$; $p=0,022$). Es zeigte sich keine Assoziation zwischen ROTEM-PTL und LTA ($r^2=0,04$; $p=0,180$) (Abb. 9, Tabelle 6).

	ROTEM-PTL	LTA	MEA
ROTEM-PTL	-	0.048	0.435*
LTA	0.048	-	0.133*
MEA	0.435*	0.133*	-

Tabelle 6: *Pearson*-Korrelation zwischen den Tests in der ASS-Gruppe (* = signifikant)

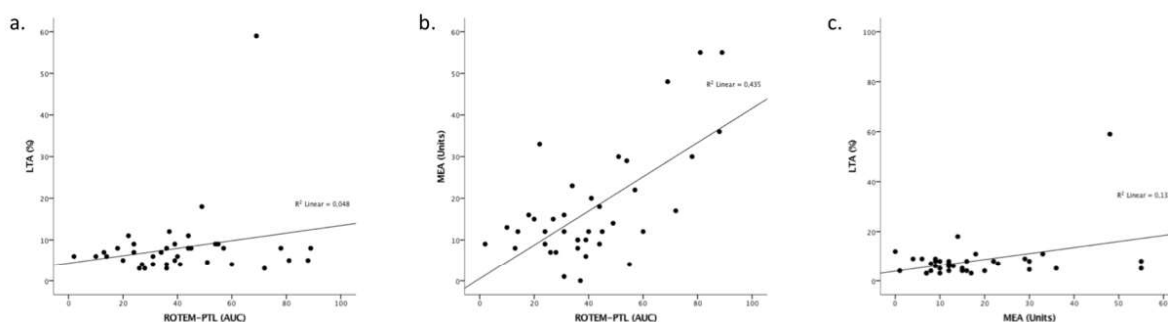


Abb. 9: *Pearson*-Korrelation zwischen den Tests in der ASS-Gruppe, mit AA als Agonist: a. ROTEM-PTL versus Lichttransmissionsaggregometrie (LTA) zeigten keine Korrelation ($r^2=0,048$; $p=0,18$). **b.** ROTEM-PTL und MEA korrelierten gut miteinander ($r^2=0,435$; $p<0,001$). **c.** MEA versus LTA waren moderat miteinander assoziiert ($r^2=0,133$; $p=0,022$).

Innerhalb der Gruppe der Patienten mit dualer Plättchenhemmung korrelierten ROTEM-PTL und LTA am stärksten miteinander ($r^2=0,409$; $p=0,001$). ROTEM-PTL zeigte eine etwas niedrigere Korrelation mit MEA von $r^2=0,398$ ($p=0,001$). VASP war sowohl mit LTA als auch mit MEA gleichermaßen assoziiert ($r^2=0,231$; $p=0,02$).

ROTEM-PTL und VASP korrelierten nicht miteinander ($r^2=0,164$; $p=0,055$), ebenso wenig wie MEA und LTA ($r^2=0,167$; $p=0,053$) (Abb. 10, Tabelle 7).

	ROTEM-PTL	LTA	MEA	VASP
ROTEM-PTL	-	0.409*	0.398*	0.164
LTA	0.409*	-	0.167	0.231*
MEA	0.398*	0.167	-	0.231*
VASP	0.164	0.231*	0.231*	-

Tabelle 7: *Pearson-Korrelation* zwischen den Tests in der DAPT-Gruppe (* = *signifikant*)

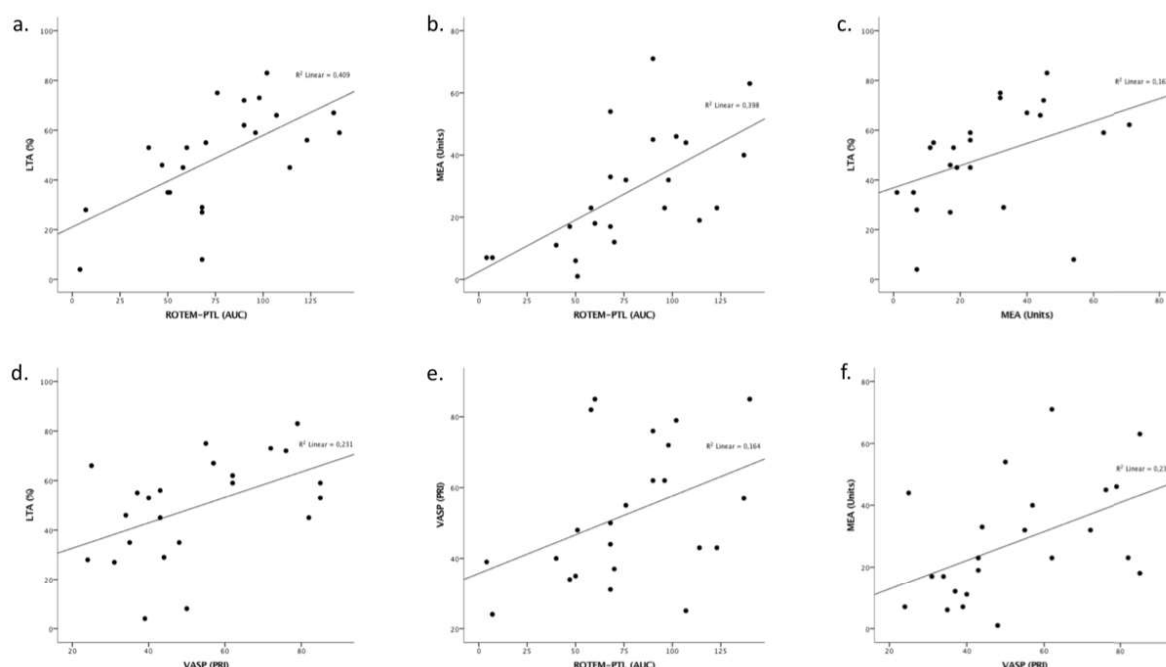


Abb. 10: *Pearson-Korrelation* zwischen den Tests in der DAPT-Gruppe, mit ADP als Agonist: **a.** Am stärksten korrelierten ROTEM-PTL und LTA ($r^2=0,409$; $p=0,001$). **b.** ROTEM-PTL korrelierte nur leicht schwächer mit MEA ($r^2=0,398$; $p=0,001$). **c.** MEA versus LTA ($r^2=0,167$; $p=0,053$) zeigten keine Assoziation. **d.** VASP-P Assay und LTA zeigten eine moderate Korrelation ($r^2=0,231$; $p=0,020$). **e.** ROTEM-PTL versus VASP waren nicht miteinander assoziiert ($r^2=0,164$; $p=0,055$). **f.** VASP versus MEA korrelierten mit $r^2=0,231$ ($p=0,020$).

5.3 Unterscheidung von gesunden Probanden und behandelten Patienten

Die Anforderung an einen PFT sollte sein, zwischen gesunden Probanden und behandelten Patienten unterscheiden zu können. Um dies zu prüfen, führten wir eine *Receiver Operating Characteristic* (ROC)-Analyse durch. Der *Youden-Index* wurde berechnet, um einen Grenzwert zwischen den beiden Gruppen zu erhalten.

ROTEM-PTL ist in der Lage gut zwischen den Gruppen zu diskriminieren: für die ASS-Monotherapie betrug die ROC_{AUC} 0,99 (95% KI; 0,97-1,00); $p < 0,0001$ (Abb. 11a) mit einem Grenzwert von 74 Ohm*min. Bei der DAPT war ROC_{AUC} 0,80; (95% KI; 0,69-0,91); $p < 0,001$ (Abb. 11d). Hierbei war der Grenzwert 68,5 Ohm*min.

Jedoch zeigte sich bei der LTA und MEA eine noch bessere Fähigkeit zur Unterscheidung der behandelten und unbehandelten Gruppe. Für die LTA war ROC_{AUC} 1,00 sowohl in der ASS-Mono- als auch in der dualen Therapie-Gruppe (95% KI; 0,99-1,00); $p < 0,0001$ (Abb. 11b+e). Für die MEA betrug ROC_{AUC} in der ASS-Monotherapie-Gruppe ebenfalls 1,00 (95% KI; 1,00-1,00); $p < 0,0003$ (Abb. 11c). In der DAPT-Gruppe war ROC_{AUC} für die MEA etwas niedriger mit 0,91 (95% KI; 0,81-1,00); $p < 0,005$, aber immer noch hochsignifikant (Abb. 11f).

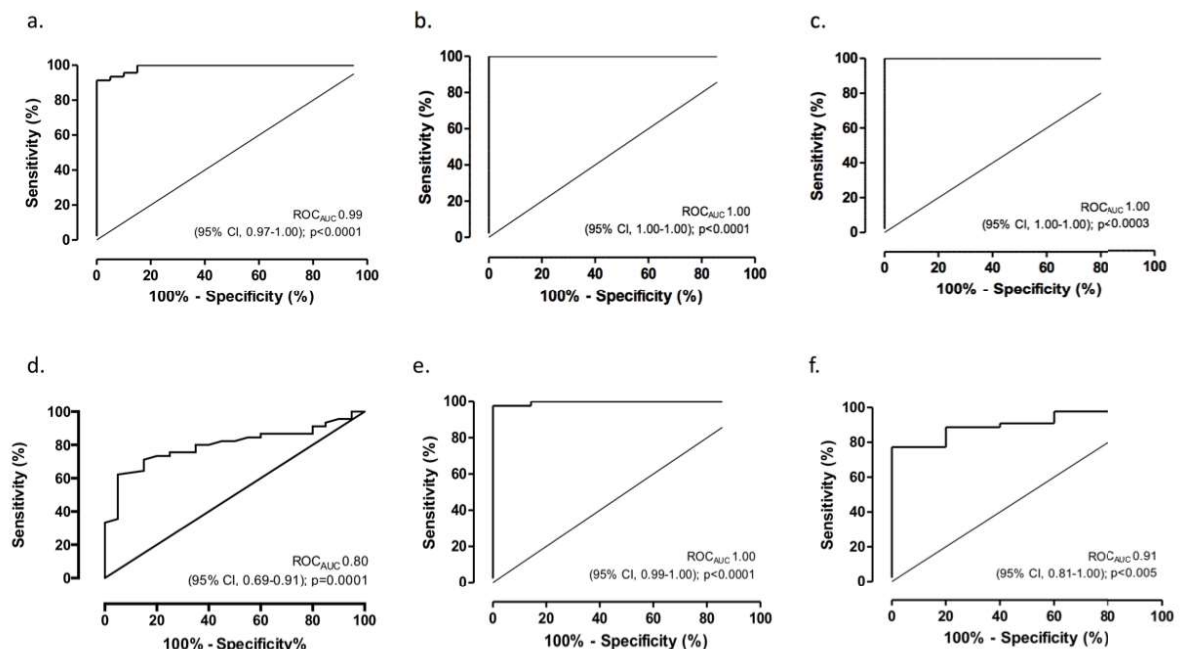


Abb. 11: Receiver Operating Characteristic (ROC) Analyse der Assays – a-c: ASS-Gruppe, jeweils mit AA stimuliert, d-f: DAPT-Gruppe, jeweils mit ADP stimuliert. a. ROTEM-PTL unterscheidet gut zwischen gesunden Probanden und behandelten Patienten (ROC_{AUC} 0,99; (95% KI; 0,97-1,00); $p < 0,0001$). **b.+c.** LTA (ROC_{AUC} 1,00; (95% KI; 1,00-1,00); $p < 0,0001$) und MEA (ROC_{AUC} 1,00; (95% KI;

1,00-1,00); $p < 0,0003$) zeigten eine noch höhere Fähigkeit zur Unterscheidung. **d.** Für die DAPT-Patienten zeigt ROTEM-PTL eine gute Diskrimination (ROC_{AUC} 0,80; (95% KI; 0,69-0,91); $p < 0,001$). **e.+f.** LTA (ROC_{AUC} 1,00; (95% KI, 0,99-1,00); $p < 0,0001$) und MEA (ROC_{AUC} 0,91; (95% KI; 0,81-1,00); $p < 0,005$) differenzierten noch stärker zwischen Probanden und DAPT-Patienten als ROTEM-PTL.

5.4 Definition von HTPR mit ROTEM® *platelet*

Da es bisher nur wenige Studien über das ROTEM® *platelet* gibt, wurden bislang keine Grenzwerte für eine HTPR unter DAPT bestimmt. Deshalb wählten wir den VASP als spezifischsten Test für die Clopidogrel-Wirkung als Referenztest mit seinen dazugehörigen Referenzwerten. Dann teilten wir jedem Wert eines Patienten im VASP-Test den entsprechenden Wert aus dem ROTEM-PTL-Test zu. Anschließend führten wir eine ROC-Analyse durch (Abb. 12). ROC_{AUC} betrug 0,76 (95% KI; 0,55-0,96); $p = 0,035$. Als Maßstab für einen HTPR-Richtwert für ROTEM-PTL berechneten wir den *Youden-Index*. Auf Basis der VASP-Daten zur Clopidogrel-Wirksamkeit wäre der Grenzwert für eine durch ROTEM-PTL gemessene HTPR 73 Ohm*min.

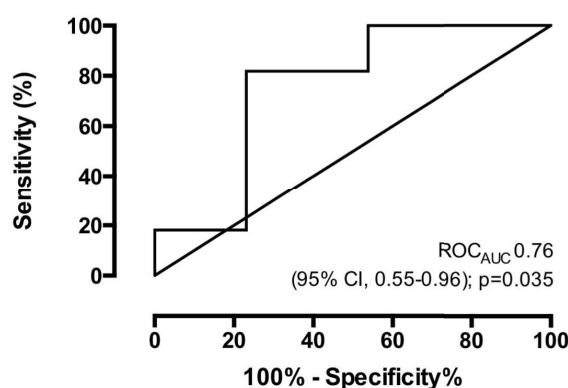


Abb. 12: High on-treatment platelet reactivity (HTPR) bei Clopidogrel-Einnahme durch ROTEM-PTL gemessen (auf Grundlage der VASP-Richtwerte): Da bisher noch keine HTPR-Grenzwerte für ROTEM-PTL etabliert sind, wurde der VASP-Assay als Bezugstest verwendet (ROC_{AUC} 0,76 (95% KI; 0,55-0,96); $p = 0,035$). Der *Youden-Index* wurde als Richtwert für eine durch ROTEM-PTL gemessene HTPR angesehen. Auf Grundlage der VASP-Daten ist der optimale HTPR-Grenzwert für eine Clopidogrel-Therapie gemäß ROTEM-PTL 73 Ohm*min.

5.5 Einschätzung des Therapieerfolgs mit etablierten Verfahren

Da für das ROTEM® *platelet* bisher noch keine Referenzbereiche für den Therapieerfolg unter Medikation in der Literatur etabliert sind, zogen wir für eine Einschätzung nur die etablierten Verfahren LTA, MEA und VASP und deren Grenzwerte heran. Dieser Abschnitt findet sich ebenfalls in der zugrundeliegenden Publikation für diese Dissertationsschrift wieder.

Auf die LTA bezogen trat eine HTPR in 57% der Fälle auf, für den VASP-Test in 43% und für die MEA in 13% der Fälle ($p=0,008$). Der LTA zufolge lag die Medikation nur bei 35% der Patienten im therapeutischen Bereich. Beim VASP galt dies für 57% und bei der MEA für 48% der Fälle ($p=0,3$). Eine LTPR lag vor in 9% der Patienten gemäß der LTA, während es bei der MEA 39% waren. Der VASP-Assay erkannte keinen Patienten als *low responder* ($p<0,001$). Es wird ersichtlich, dass die Prävalenz einer HTPR und LTPR sich sehr deutlich zwischen den verschiedenen Verfahren unterscheidet. Bemerkenswert ist, dass in 17% der Fälle ein Test eine HTPR angibt, während ein anderer eine LTPR zeigt, gewissermaßen also das exakte Gegenteil (Abb. 13).

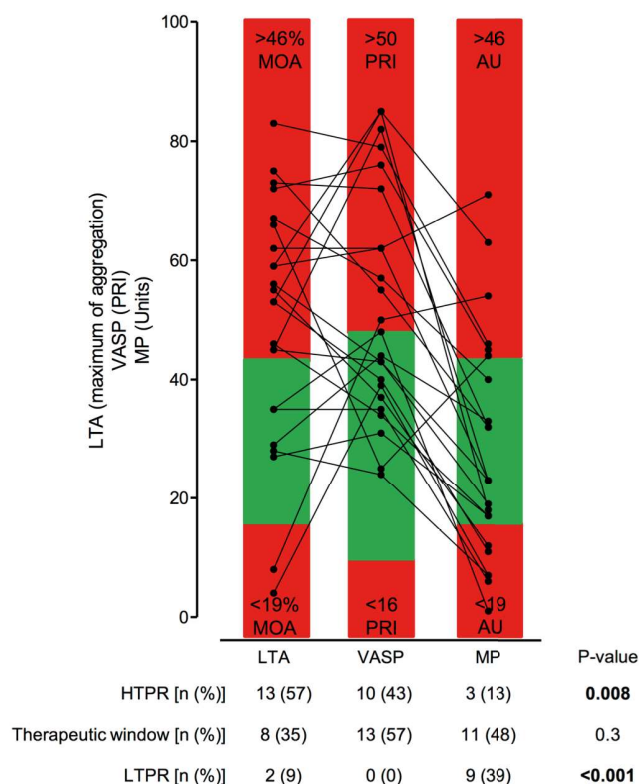


Abb. 13: Plättchenfunktionsanalyse mit LTA, VASP und MEA: LTA, VASP und MEA wurde bei 23 Patienten mit P2Y12-Hemmer Clopidogrel verwendet. Die Ergebnisse der verschiedenen ADP-induzierten Plättchenfunktionstests fielen sehr unterschiedlich aus. (AU = aggregation units, LTPR = low on-treatment platelet reactivity, MOA = maximum of aggregation, PRI = platelet reactivity index)

6 Diskussion

In dieser Arbeit konnte zum einen gezeigt werden, dass verschiedene PFTs unterschiedliche Ergebnisse in Bezug auf die Medikamentenwirkung liefern. Um einen relativ neuen Test mit den bereits etablierten Methoden zu vergleichen, wurde das ROTEM-PLT evaluiert. Dieses Verfahren unterscheidet eindeutig zwischen gesunden Probanden und behandelten Patienten. Mit den anderen Methoden korrelierte es eher mäßig.

6.1 ROTEM *platelet*

Bisher ist die Datenlage in der Literatur zum ROTEM *platelet* Modul relativ spärlich. Nach unserem Kenntnisstand existiert bisher keine einzige Studie, die das ROTEM *platelet* mit mehr als einem anderen Test vergleicht (79). Zwar gibt es Studien zum

ROTEM *delta*, dem Basisgerät von ROTEM *platelet*. Diese messen und vergleichen jedoch den Gerinnungsstatus eines Patienten mittels Thromboelastometrie (80, 81). Das ROTEM *platelet* hingegen misst die Thrombozytenfunktion mittels Impedanzaggregometrie. Deshalb ist das ROTEM *delta*, anders als das ROTEM *platelet*, nicht vergleichbar mit Thrombozytenfunktionstests.

Zum ROTEM *platelet* wurden im Jahr 2019 erstmals Referenzintervalle in einer Studie festgelegt, jedoch nur für gesunde Probanden, die nicht unter Medikation standen (82). Wie in dieser Arbeit thematisiert wird, wären jedoch von größerer Relevanz HTPR-Grenzwerte für Patienten, die ASS und/oder einen P2Y12-Hemmer einnehmen. In der genannten Studie wurden außerdem verschiedene Probenmaterialien, Probenstabilität, Unterschiede in den Ergebnissen bezogen auf Alter sowie Geschlecht analysiert (82). Außerdem wurden weitere potenzielle Einflüsse auf die Messergebnisse wie die Art des Probenverkehrs innerhalb einer Klinik untersucht. Hier konnte kein Unterschied festgestellt werden (83). In einem Fallbericht wurde das ROTEM *platelet* als sinnvolle Ergänzung zum ROTEM *delta* beim Monitoring der Blutungsneigung perioperativ bei Glanzmann-Thrombasthenie beschrieben, da es als Marker der Plättchenfunktion diesen entscheidenden Aspekt berücksichtigt (84). Des Weiteren wurde das ROTEM *platelet* als *Point-of-care* Gerät bei Trauma-induzierten Koagulopathien (85) und zur Blutungsrisikoeinschätzung bei Herzoperationen untersucht (79, 86). Es bewies im Vergleich zum Multiplate eine ähnliche Vorhersagekraft über postoperative Blutungen und Transfusionsbedarf. Es fehlen jedoch weiterhin etablierte HTPR- und LTPR-Referenzbereiche für das ROTEM-PTL, die bei anderen PFTs vorhanden sind.

6.2 Datenlage zu anderen Methoden

Das Auftreten einer HTPR oder LTPR unter kontinuierlicher Plättchenhemmung und das damit einhergehende Risiko von Ischämien oder Blutungen hat in den letzten Jahren das Bewusstsein für und den Bedarf an tiefergehenden Untersuchungen geweckt. In fast keiner der daraufhin durchgeführten großen Studien hat sich eine maßgeschneiderte antithrombozytäre Therapie anhand von PFTs als überlegen erwiesen. Maßgeblich hierfür war die Rate an *major adverse cardiac and cerebrovascular events (MACCE)*.

Im Jahre 2011 wurde die GRAVITAS-Studie mithilfe des VerifyNow Assays durchgeführt. Es zeigte sich, dass bei Patienten nach PCI eine hohe im Vergleich zu

einer Standard-Dosis Clopidogrel trotz signifikanter Senkung der HTPR-Rate das Auftreten von MACCE nicht reduzierte (65).

Im selben Jahr wurde mit dem gleichen PFT in der ARCTIC-Studie eine Kohorte mit mittlerem Risiko und elektiver PCI untersucht. Hier zeigte sich eine individuell angepasste DAPT mit Clopidogrel gegenüber der üblichen Therapie ebenfalls als nicht überlegen (87).

Mit TRIGGER-PCI wurde 2012 zwei Vertreter der P2Y₁₂-Hemmer nach geplanter PCI miteinander verglichen. Prasugrel erreichte im Vergleich zu Clopidogrel eine deutliche Reduktion einer zuvor bestehenden HTPR. Dennoch traten bei beiden Gruppen unerwünschte Ereignisse selten und nicht signifikant verschieden auf (66).

ANTARTIC untersuchte 2016 ein Kollektiv mit deutlich höherem Risiko – ältere Patienten mit dringender PCI bei ACS. Die eine Hälfte erhielt eine Standarddosis Prasugrel ohne Monitoring der Therapie. Die andere Hälfte wurde durch VerifyNow kontrolliert und die Prasugrel-Dosis gemäß Plättchenreaktivität angepasst. Ein besonderes Augenmerk lag hier auf dem Vorkommen von Blutungen. Eine adjustierte Therapie mithilfe des VerifyNow Assays erbrachte auch hier keinen Vorteil. Die Rate an Blutungen unterschied sich nicht signifikant zwischen den Gruppen (88). Danach hatte man die Hoffnung auf einen Nutzen der PFTs beinahe verloren.

Jedoch wurden ein Jahr später die wegweisenden Ergebnisse der TROPICAL-ACS-Studie vorgestellt (69). Das Studiendesign bzw. Therapiekonzept war hier etwas anders aufgebaut: Es ist bekannt, dass der potentere P2Y₁₂-Hemmer Prasugrel einen besseren antiischämischen Effekt als Clopidogrel ausübt, aber auch ein höheres hämorrhagisches Risiko aufweist. Den größten Nutzen haben die potenten P2Y₁₂-Hemmer in der frühen Phase nach ACS und PCI, wenn ischämische Ereignisse am häufigsten geschehen. Die meisten Blutungskomplikationen treten jedoch eher bei chronischer Therapie auf (89, 90). Deshalb wird in der klinischen Praxis immer häufiger ein deeskalierendes Regime angewendet, bei dem anfangs Prasugrel zur Prävention akuter Ereignisse verschrieben wird. Im Verlauf wird auf Clopidogrel als weniger potente Substanz umgestellt, um das Risiko von Blutungen zu verringern (91). Unter ökonomischen Aspekten ist Clopidogrel deutlich günstiger als die neueren Medikamente Prasugrel und Ticagrelor. Sollte sich das Konzept durchsetzen, könnte dies die Kosten für diese Medikamentengruppe im Gesundheitswesen senken.

TROPICAL-ACS wandte dieses deeskalierende Regime ebenfalls an. Gesteuert wurde es durch PFTs, um eine ausreichende Plättchenhemmung nach ACS zu gewährleisten. Sie konnte als erste Studie zeigen, dass dieser Wechsel gegenüber dem konventionellen 12-monatigen Prasugrel-Regime nicht unterlegen ist. Diese *non-inferiority* Hypothese war ein weiterer Unterschied zu vorherigen Studien.

Außerdem wurde als PFT nicht der VerifyNow Assay, sondern mit Multiplate ein impedanzaggregometrisches Verfahren verwendet. Der Aufwand war zum einen dadurch größer, dass die Therapie aller Patienten in allen Studienarmen überwacht wurde. Zum anderen fordert das Multiplate mehr Laborexpertise und Zeit als andere *Bedside*-Tests. Wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, ist weiterhin unklar, welcher PFT am besten zur Überwachung einer individualisierten Plättchenhemmung geeignet ist. Die im Gegensatz zu anderen Studien deutlichen Ergebnisse aus TROPICAL-ACS könnten derzeit das Multiplate möglicherweise zum besten Test küren.

6.3 Unterschiede zwischen den Methoden

Um der Frage nach dem besten PFT auf den Grund zu gehen, sollte man sich zunächst Unterschiede zwischen den verfügbaren Methoden anschauen und überlegen, ob diese einen Einfluss auf die Messgenauigkeit und Aussagekraft haben könnten.

6.3.1 Präanalytik: Probenart

Schaut man sich den präanalytischen Prozess von der Blutabnahme bis zur Messung an, unterscheidet sich zunächst einmal die Probenart und das verwendete Gerinnungsröhrchen. Alle in dieser Arbeit verwendeten PFTs benötigen Vollblut, bis auf die LTA, die mit PRP und PAP arbeitet. In Vollblutproben befinden sich die Thrombozyten in einer Umgebung, die physiologischer ist als in PRP. Die Wechselwirkung von Thrombozyten mit anderen Blutzellen kann im PRP in der LTA nicht mit in das Ergebnis einfließen (92). Dies könnte die Vergleichbarkeit von einem *ex-vivo*-PFT zu *in-vivo*-Zuständen im menschlichen Körper einschränken. In der Vergangenheit wurde häufiger bemängelt, dass PFTs als nicht-physiologisch anzusehen sind (93, 94). Im Gegensatz dazu wurde argumentiert, dass die vorhandenen Methoden im Laufe der Jahre optimiert wurden (59). Dennoch scheinen die Verfahren mit gleichem Probenmaterial, die zwei Vollblut-Methoden – ROTEM-PTL und MEA – stärker miteinander zu korrelieren als mit der plasma-basierten Methode LTA. Nun könnte man sich fragen, ob ein neuartiger Test, der einem bereits etablierten

(MEA) so sehr ähnelt, überhaupt notwendig ist. Allerdings benötigt ROTEM-PTL eine deutlich kürzere Laufzeit und liefert Ergebnisse in drei verschiedenen Parametern – A6, AUC und MS (76).

Außerdem stehen Blutröhrchen mit verschiedenen Antikoagulanzen wie zum Beispiel Citrat oder Hirudin zur Verfügung. Das häufig verwendete Natriumcitrat bildet Komplexe mit Calcium-Ionen im Blut und entzieht diese den Enzymen der Gerinnungskaskade (95). Diese sogenannte Calcium-Depletion kann die Thrombozytenaggregation *in-vitro* verändern (96-98). Allerdings können Proben auch rekalkifiziert werden, um diesem Problem entgegenzuwirken (99, 100).

Hirudin inhibiert Thrombin, nimmt dabei aber keinen Einfluss auf die Calciumkonzentration in der Probe (75, 101). Beim Vergleich von verschiedenen Antikoagulanzen, Lagerungsbedingungen und unterschiedlichen Größen von Probenröhrchen traten in vergangenen Studien ebenfalls Unterschiede auf (102, 103).

6.3.2 Reagenzien verschiedener Hersteller

Die Hersteller der verschiedenen PFTs vertreiben verschiedene Stimuli wie AA und ADP unter ihrem eigenen Namen. Deshalb werden für das Multiplate von Roche der ASPItest® und ADPtest® angeboten, während es für das ROTEM *platelet* von Tem Innovations ara-tem® sowie adp-tem® gibt. Für die LTA hingegen können die Reagenzien von verschiedenen Herstellern bezogen werden. Die Produktion dieser Substanzen ist folglich nicht standardisiert. Außerdem werden unterschiedliche Konzentrationen in den Protokollen der Hersteller verwendet (siehe Material und Methoden Kapitel 4.3 - 4.5, sowie 4.7.2 Substanzen). Dies könnte die Aussagekraft der PFTs beeinflussen und begründen, weshalb MEA und ROTEM-PTL nicht optimal miteinander korrelieren, obwohl sie ähnliche Methoden sind.

6.3.3 Der Zeitfaktor

Während viele der moderneren PFTs als *Point-of-care* bzw. *Bedside*-Tests konzipiert wurden, ist die LTA ein zeitaufwendiges Verfahren. Zwei Zentrifugationsschritte sind notwendig, um PRP und PPP zu gewinnen. Diese entfallen bei den anderen Methoden, bei denen Vollblut verwendet wird. Der VASP Assay ist ebenfalls mit Zeitaufwand verbunden. Er benötigt mindestens 30 Minuten, da die Probe für die Messung in der Durchflusszytometrie mehrere Präparations- und Inkubationsschritte durchlaufen muss (78). Ein Durchlauf mit dem Multiplate Analyzer dauert hingegen nur

10 Minuten (104). Das ROTEM *platelet* ist noch etwas schneller mit ersten Ergebnissen nach 6 Minuten (76). Die Laufzeiten der PFTs weisen also große Unterschiede auf. Dies bedeutet, dass die gemessenen Proben unterschiedlich lange aufbewahrt und verarbeitet werden. Hierin könnte sich ein weiterer Grund für die divergierenden Ergebnisse der Tests liegen.

6.3.4 Der historische Goldstandard

Die Lichttransmissions- und die Impedanzaggregometrie verfolgen verschiedene physikalische Prinzipien. Die LTA misst photometrisch bzw. optisch die Dichte der aggregierenden Thrombozyten in einem Lichtkanal und zeichnet diese graphisch auf (siehe Kapitel 4.3 Lichttransmissionsaggregometrie). In der Impedanzaggregometrie wird dagegen die Veränderung des Widerstandes zwischen zwei Messelektroden wahrgenommen (siehe Kapitel 4.4 Multiple-Elektroden-Aggregometrie).

Die LTA wird als der historische Goldstandard zur Evaluation von ASS-induzierter Plättchenhemmung betrachtet und wurde in unzähligen Studien eingesetzt. Allerdings werden ihr mangelnde Standardisierung und Reproduzierbarkeit vorgeworfen (94, 105). Wie zuvor erwähnt, ist die LTA zeitaufwendig und kann nur von erfahrenen Laboranten durchgeführt werden. Außerdem ist sie bei Stimulation mit ADP nicht spezifisch für P2Y₁₂-Rezeptor-induzierte Effekte, da die Wirkung von ADP auf den P2Y₁-Rezeptor nicht ausgeschlossen werden kann (106). Wenn man also die Wirkung von Clopidogrel mithilfe der LTA bewerten möchte, muss man diese unter Vorbehalt sehen, denn der P2Y₁-Rezeptor-Subtyp ist ebenfalls an einer Veränderung der Plättchenreaktivität beteiligt.

6.3.5 VASP und Clopidogrel

Der aus pharmakologischer Sicht spezifischste PFT für Clopidogrel-induzierte Thrombozytenhemmung ist der VASP Assay, da er ausschließlich den P2Y₁₂-Rezeptor-Subtyp erfasst (105, 107). In der Durchflusszytometrie wird quantitativ das Level an phosphoryliertem gegenüber nicht-phosphoryliertem VASP gemessen, welches mit dem Verhältnis aus gehemmten mit aktiviertem P2Y₁₂-Rezeptor korreliert (77). Allerdings wird die VASP-Phosphorylierung durch diverse Faktoren beeinflusst. Beispielsweise beeinträchtigen myeloproliferative Erkrankungen diese (108). Die Neuroleptika Clozapin, Haloperidol und Risperidon hemmen die Aggregation über den P2Y₁- und P2Y₁₂-Rezeptor (109). Medikamente wie Cilostazol oder Dipyridamol

verstärken im Gegensatz dazu die Phosphorylierung und behindern damit ebenfalls die Aussagekraft des VASP (110, 111). Folglich sollten unter Komedikation die Ergebnisse des VASP-Assays unter Vorbehalt interpretiert werden.

Aleil et al. untersuchten mit dem VASP im Jahre 2005 Clopidogrel-Resistenzen bei Patienten mit ischämischen kardiovaskulären Ereignissen (77). In dieser Studie traten starke Korrelationen zwischen VASP und der LTA mit ADP auf. In darauffolgenden Studien bestätigten sich diese Ergebnisse jedoch nicht. Dort fand man eher moderate bis schwache Korrelationen (112-114), welche sich eher mit den Resultaten dieser Arbeit decken. Darin könnte sich erneut bestätigen, dass PFTs mit verschiedenen physikalischen Ansätzen nur wenig miteinander korrelieren.

6.4 Variabilität der Clopidogrel-Wirksamkeit

Die Wirksamkeit des P2Y₁₂-Rezeptor-Hemmers Clopidogrel wird multifaktoriell beeinflusst und unterliegt interindividuell einer hohen Variabilität. Zum Teil erklärt sich dies über den hepatischen Stoffwechselweg. Das *Prodrug* wird über das Cytochrom P450 2C19 (CYP2C19) enzymabhängig oxidiert und hydrolysiert (39). Der aktive Metabolit ist danach relativ instabil, bindet jedoch irreversibel an den P2Y₁₂-Rezeptor (40). Genetische Veränderungen, sogenannte CYP2C19*2 *loss-of-function* Polymorphismen, lassen betroffene Patienten zu „*poor metabolizers*“ werden. Sie verstoffwechseln Clopidogrel also schlechter, was ihr Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse erhöht (115-117). Auf zellulärer Ebene führen eine Malabsorption oder ein Lebersversagen zu verminderter Aufnahme oder Metabolisierung. Außerdem konkurrieren andere CYP2C19-abhängige Medikamente wie Protonenpumpenhemmer mit Clopidogrel und verringern dessen Aktivierung (118). Wie schon zuvor erwähnt, scheinen auch Neuroleptika eine Rolle am P2Y₁₂-Rezeptor zu spielen (109). Außerdem beeinflussen andere nicht-steroidale Antirheumatika das Bindungsverhalten von ASS an der COX (29). Dies wirkt sich zwar nicht direkt auf die Clopidogrel-Wirksamkeit aus, im Rahmen der DAPT mit ASS und Clopidogrel jedoch auf das mögliche Risiko von ischämischen Ereignissen. Erkrankungen aus dem Kreis des metabolischen Syndroms wie Diabetes mellitus (51) und Übergewicht werden ebenfalls mit einer HTPR bei Clopidogrel-Therapie in Verbindung gebracht (119-121). Aufgrund der Komorbiditäten und Komedikation vieler kardiologischer Patienten erscheint eine individuelle und durch PFTs überwachte Plättchenhemmung deshalb sinnvoll.

6.5 Anforderungen an einen Plättchenfunktionstest

Erkennt man die Notwendigkeit einer maßgeschneiderten antithrombozytären Therapie, schließt sich die Frage nach den Eigenschaften eines optimalen PFTs an. Einige Studien versuchten in den letzten Jahren, den idealen Test zu determinieren. Grundsätzlich sollte dieser pharmakologisch möglichst spezifisch, anwenderfreundlich und schnell durchzuführen sein. Für die ASS-Wirkung wäre der modernste und spezifischste Test der Thromboxan-B₂-Bildungsassay (122). Jedoch sind viele der verfügbaren Tests und Reagenzien teuer, zeitintensiv und erfordern Laborkenntnisse. Ein vielversprechender Ansatz könnte ein *Bedside*-Thromboxan-Test sein, der fluorometrisch Malondialdehyd misst, ein Nebenprodukt, das 1:1 mit Thromboxan B₂ gebildet wird (123). Hier würde man den Anforderungen Spezifität und Zeitersparnis gerecht werden.

6.6 Limitationen

In dieser Arbeit lässt sich eine Generalisierbarkeit und Übertragbarkeit auf die Gesamtbevölkerung nur bedingt anwenden, da die Stichprobengröße recht klein ist. Das klinische *Outcome* der Patienten wurde nicht mitevaluiert. Außerdem wurde ein weiterer PFT, der VerifyNow Assay, nicht verwendet, da er in unserem Labor nicht zur Verfügung stand. Das neuere ROTEM-PTL müsste in weiteren Studien mit einer größeren Patientenzahl im Hinblick auf Reliabilität und Validität untersucht werden. Des Weiteren müssten HTPR-Referenzwerten für das ROTEM-PTL etabliert werden. In einem ersten Ansatz legten wir anhand der VASP-Daten und einer ROC-Analyse den Grenzwert für eine HTPR, gemessen mit ROTEM-PTL, fest. Diese sind jedoch nur statistisch berechnet und müssten in randomisierten klinischen Studien verifiziert werden.

6.7 Schlussfolgerungen

Abschließend lässt sich sagen, dass Aussagen über die Plättchenreaktivität bei verschiedenen PFTs stark variieren. Bisher konnte einzig die TROPICAL-ACS Studie zeigen, dass eine individuell gesteuerte Plättchenhemmung das klinische *Outcome* verbessert, obwohl diese Annahme zunächst logisch erscheint.

Mit einem neuartigen Impedanzaggregometrie-Test auf dem Markt stellte sich die Frage nach dessen Nutzen. Die Vorteile der kurzen Laufzeit und Fähigkeit zur Unterscheidung von Gesunden und Patienten stehen der mäßigen Korrelation mit

anderen PFTs gegenüber. Deshalb sollte in weiteren Arbeiten untersucht werden, ob das ROTEM *platelet* Patienten mit einem Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse anhand einer HTPR identifizieren kann.

Diese Fähigkeit zur Vorhersagbarkeit von unerwünschten Ereignissen sollte auch an anderen PFTs weiter erforscht werden, die pharmakologisch hochspezifisch und zugleich im *Point-of-care* Bereich einzusetzen sein müssten.

7 Literatur- und Quellenverzeichnis

1. Roth GA, Johnson C, Abajobir A, Abd-Allah F, Abera SF, Abyu G, et al. Global, Regional, and National Burden of Cardiovascular Diseases for 10 Causes, 1990 to 2015. *J Am Coll Cardiol*. 2017;70(1):1-25.
2. Valgimigli M, Bueno H, Byrne RA, Collet JP, Costa F, Jeppsson A, et al. 2017 ESC focused update on dual antiplatelet therapy in coronary artery disease developed in collaboration with EACTS: The Task Force for dual antiplatelet therapy in coronary artery disease of the European Society of Cardiology (ESC) and of the European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS). *Eur Heart J*. 2018;39(3):213-60.
3. Knuuti J, Wijns W, Saraste A, Capodanno D, Barbato E, Funck-Brentano C, et al. 2019 ESC Guidelines for the diagnosis and management of chronic coronary syndromes. *Eur Heart J*. 2020;41(3):407-77.
4. Krishnegowda M, Rajashekaraiah V. Platelet disorders: an overview. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2015;26(5):479-91.
5. Lebois M, Josefsson EC. Regulation of platelet lifespan by apoptosis. *Platelets*. 2016;27(6):497-504.
6. Goto S, Hasebe T, Takagi S. Platelets: Small in Size But Essential in the Regulation of Vascular Homeostasis - Translation From Basic Science to Clinical Medicine. *Circ J*. 2015;79(9):1871-81.
7. Yip J, Shen Y, Berndt MC, Andrews RK. Primary platelet adhesion receptors. *IUBMB Life*. 2005;57(2):103-8.
8. Dubois C, Panicot-Dubois L, Merrill-Skoloff G, Furie B, Furie BC. Glycoprotein VI-dependent and -independent pathways of thrombus formation in vivo. *Blood*. 2006;107(10):3902-6.
9. Golebiewska EM, Poole AW. Platelet secretion: From haemostasis to wound healing and beyond. *Blood Rev*. 2015;29(3):153-62.
10. Erkan LG, Guvenc G, Altinbas B, Niaz N, Yalcin M. The effects of centrally injected arachidonic acid on respiratory system: Involvement of cyclooxygenase to thromboxane signaling pathway. *Respir Physiol Neurobiol*. 2016;225:1-7.
11. Aslan JE, Itakura A, Gertz JM, McCarty OJ. Platelet shape change and spreading. *Methods Mol Biol*. 2012;788:91-100.
12. Kuijpers MJ, van der Meijden PE, Feijge MA, Mattheij NJ, May F, Govers-Riemslog J, et al. Factor XII regulates the pathological process of thrombus formation on ruptured plaques. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2014;34(8):1674-80.
13. Hein L. Aktuelle Therapie des Herzinfarkts, Stufen der Thrombozytenaktivierung an einer verletzten Endotheloberfläche (Abbildung 4): Pharmazeutische Zeitung; 15.05.2006 [updated 26.01.2020]. Available from: <https://www.pharmazeutische-zeitung.de/ausgabe-202006/aktuelle-therapie-des-herzinfarkts/>.
14. Osterud B, Rapaport SI. Activation of factor IX by the reaction product of tissue factor and factor VII: additional pathway for initiating blood coagulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977;74(12):5260-4.
15. Broze GJ, Jr. Why do hemophiliacs bleed? *Hosp Pract (Off Ed)*. 1992;27(3):71-4, 9-82, 5-6.
16. Panteleev MA, Saenko EL, Ananyeva NM, Ataullakhanov FI. Kinetics of Factor X activation by the membrane-bound complex of Factor IXa and Factor VIIIa. *Biochem J*. 2004;381(Pt 3):779-94.
17. Davie EW, Ratnoff OD. Waterfall Sequence for Intrinsic Blood Clotting. *Science*. 1964;145(3638):1310-2.
18. Macfarlane RG. An Enzyme Cascade in the Blood Clotting Mechanism, and Its Function as a Biochemical Amplifier. *Nature*. 1964;202:498-9.
19. Hoffman M, Monroe DM, 3rd. A cell-based model of hemostasis. *Thromb Haemost*. 2001;85(6):958-65.
20. Kamikubo Y, Mendolicchio GL, Zampolli A, Marchese P, Rothmeier AS, Orje JN, et al. Selective factor VIII activation by the tissue factor-factor VIIa-factor Xa complex. *Blood*. 2017;130(14):1661-70.

21. Saenko EL, Shima M, Gilbert GE, Scandella D. Slowed release of thrombin-cleaved factor VIII from von Willebrand factor by a monoclonal and a human antibody is a novel mechanism for factor VIII inhibition. *J Biol Chem.* 1996;271(44):27424-31.
22. Jurk K, Kehrel BE. Platelets: physiology and biochemistry. *Semin Thromb Hemost.* 2005;31(4):381-92.
23. Levesque H, Lafont O. [Aspirin throughout the ages: a historical review]. *Rev Med Interne.* 2000;21 Suppl 1:8s-17s.
24. Desborough MJR, Keeling DM. The aspirin story - from willow to wonder drug. *Br J Haematol.* 2017;177(5):674-83.
25. Halvorsen S, Andreotti F, ten Berg JM, Cattaneo M, Coccheri S, Marchioli R, et al. Aspirin therapy in primary cardiovascular disease prevention: a position paper of the European Society of Cardiology working group on thrombosis. *J Am Coll Cardiol.* 2014;64(3):319-27.
26. Steering Committee of the Physicians' Health Study Research G. Final report on the aspirin component of the ongoing Physicians' Health Study. *N Engl J Med.* 1989;321(3):129-35.
27. Fitzgerald R, Pirmohamed M. Aspirin resistance: effect of clinical, biochemical and genetic factors. *Pharmacol Ther.* 2011;130(2):213-25.
28. Vane JR, Bakhle YS, Botting RM. Cyclooxygenases 1 and 2. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1998;38:97-120.
29. Polzin A, Hohlfeld T, Kelm M, Zeus T. Impairment of aspirin antiplatelet effects by non-opioid analgesic medication. *World J Cardiol.* 2015;7(7):383-91.
30. Ibanez B, James S, Agewall S, Antunes MJ, Bucciarelli-Ducci C, Bueno H, et al. 2017 ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation: The Task Force for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J.* 2018;39(2):119-77.
31. Roffi M, Patrono C, Collet JP, Mueller C, Valgimigli M, Andreotti F, et al. 2015 ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation: Task Force for the Management of Acute Coronary Syndromes in Patients Presenting without Persistent ST-Segment Elevation of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J.* 2016;37(3):267-315.
32. Zeymer U, Hohlfeld T, Vom Dahl J, Erbel R, Munzel T, Zahn R, et al. Prospective, randomised trial of the time dependent antiplatelet effects of 500 mg and 250 mg acetylsalicylic acid i. v. and 300 mg p. o. in ACS (ACUTE). *Thromb Haemost.* 2017;117(3):625-35.
33. Puri RN, Colman RW. ADP-induced platelet activation. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 1997;32(6):437-502.
34. Nylander S, Schulz R. Effects of P2Y₁₂ receptor antagonists beyond platelet inhibition--comparison of ticagrelor with thienopyridines. *Br J Pharmacol.* 2016;173(7):1163-78.
35. Gent M, Blakely JA, Easton JD, Ellis DJ, Hachinski VC, Harbison JW, et al. The Canadian American Ticlopidine Study (CATS) in thromboembolic stroke. *Lancet.* 1989;1(8649):1215-20.
36. Bennett CL, Weinberg PD, Rozenberg-Ben-Dror K, Yarnold PR, Kwaan HC, Green D. Thrombotic thrombocytopenic purpura associated with ticlopidine. A review of 60 cases. *Ann Intern Med.* 1998;128(7):541-4.
37. Committee CS. A randomised, blinded, trial of clopidogrel versus aspirin in patients at risk of ischaemic events (CAPRIE). CAPRIE Steering Committee. *Lancet.* 1996;348(9038):1329-39.
38. Bertrand ME, Rupprecht HJ, Urban P, Gershlick AH, Investigators C. Double-blind study of the safety of clopidogrel with and without a loading dose in combination with aspirin compared with ticlopidine in combination with aspirin after coronary stenting : the clopidogrel aspirin stent international cooperative study (CLASSICS). *Circulation.* 2000;102(6):624-9.
39. Pereillo JM, Maftouh M, Andrieu A, Uzabiaga MF, Fedeli O, Savi P, et al. Structure and stereochemistry of the active metabolite of clopidogrel. *Drug Metab Dispos.* 2002;30(11):1288-95.
40. Bonello L, Tantry US, Marcucci R, Blindt R, Angiolillo DJ, Becker R, et al. Consensus and future directions on the definition of high on-treatment platelet reactivity to adenosine diphosphate. *J Am Coll Cardiol.* 2010;56(12):919-33.

41. Wallentin L, Becker RC, Budaj A, Cannon CP, Emanuelsson H, Held C, et al. Ticagrelor versus clopidogrel in patients with acute coronary syndromes. *N Engl J Med*. 2009;361(11):1045-57.
42. Wiviott SD, Braunwald E, McCabe CH, Montalescot G, Ruzyllo W, Gottlieb S, et al. Prasugrel versus clopidogrel in patients with acute coronary syndromes. *N Engl J Med*. 2007;357(20):2001-15.
43. Schupke S, Neumann FJ, Menichelli M, Mayer K, Bernlochner I, Wohrle J, et al. Ticagrelor or Prasugrel in Patients with Acute Coronary Syndromes. *N Engl J Med*. 2019;381(16):1524-34.
44. Schomig A, Neumann FJ, Kastrati A, Schuhlen H, Blasini R, Hadamitzky M, et al. A randomized comparison of antiplatelet and anticoagulant therapy after the placement of coronary-artery stents. *N Engl J Med*. 1996;334(17):1084-9.
45. Yusuf S, Zhao F, Mehta SR, Chrolavicius S, Tognoni G, Fox KK, et al. Effects of clopidogrel in addition to aspirin in patients with acute coronary syndromes without ST-segment elevation. *N Engl J Med*. 2001;345(7):494-502.
46. Sabatine MS, Cannon CP, Gibson CM, Lopez-Sendon JL, Montalescot G, Theroux P, et al. Addition of clopidogrel to aspirin and fibrinolytic therapy for myocardial infarction with ST-segment elevation. *N Engl J Med*. 2005;352(12):1179-89.
47. Chen ZM, Jiang LX, Chen YP, Xie JX, Pan HC, Peto R, et al. Addition of clopidogrel to aspirin in 45,852 patients with acute myocardial infarction: randomised placebo-controlled trial. *Lancet*. 2005;366(9497):1607-21.
48. Investigators A, Connolly SJ, Pogue J, Hart RG, Hohnloser SH, Pfeffer M, et al. Effect of clopidogrel added to aspirin in patients with atrial fibrillation. *N Engl J Med*. 2009;360(20):2066-78.
49. Mourikis P, Helten C, Dannenberg L, Hohlfeld T, Stegbauer J, Petzold T, et al. Platelet reactivity in patients with chronic kidney disease and hemodialysis. *J Thromb Thrombolysis*. 2019.
50. Polzin A, Dannenberg L, Sansone R, Levkau B, Kelm M, Hohlfeld T, et al. Antiplatelet effects of aspirin in chronic kidney disease patients. *J Thromb Haemost*. 2016;14(2):375-80.
51. Carreras ET, Hochholzer W, Frelinger AL, 3rd, Nordio F, O'Donoghue ML, Wiviott SD, et al. Diabetes mellitus, CYP2C19 genotype, and response to escalating doses of clopidogrel. Insights from the ELEVATE-TIMI 56 Trial. *Thromb Haemost*. 2016;116(1):69-77.
52. Mourikis P, Zako S, Dannenberg L, Helten C, Naguib D, Hohlfeld T, et al. Aspirin antiplatelet effects are associated with body weight. *Vascul Pharmacol*. 2019:106635.
53. Norgard NB. Obesity and Altered Aspirin Pharmacology. *Clin Pharmacokinet*. 2018;57(6):663-72.
54. Serbin MA, Guzauskas GF, Veenstra DL. Clopidogrel-Proton Pump Inhibitor Drug-Drug Interaction and Risk of Adverse Clinical Outcomes Among PCI-Treated ACS Patients: A Meta-analysis. *J Manag Care Spec Pharm*. 2016;22(8):939-47.
55. Polzin A, Zeus T, Schror K, Kelm M, Hohlfeld T. Dipyron (metamizole) can nullify the antiplatelet effect of aspirin in patients with coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol*. 2013;62(18):1725-6.
56. Dannenberg L, Erschoff V, Bonner F, Gliem M, Jander S, Levkau B, et al. Dipyron comedication in aspirin treated stroke patients impairs outcome. *Vascul Pharmacol*. 2016;87:66-9.
57. Chouchene S, Dabboubi R, Raddaoui H, Abroug H, Ben Hamda K, Hadj Fredj S, et al. Clopidogrel utilization in patients with coronary artery disease and diabetes mellitus: should we determine CYP2C19*2 genotype? *Eur J Clin Pharmacol*. 2018;74(12):1567-74.
58. Schwartz KA, Schwartz DE, Ghosheh K, Reeves MJ, Barber K, DeFranco A. Compliance as a critical consideration in patients who appear to be resistant to aspirin after healing of myocardial infarction. *Am J Cardiol*. 2005;95(8):973-5.
59. Tantry US, Bonello L, Aradi D, Price MJ, Jeong YH, Angiolillo DJ, et al. Consensus and update on the definition of on-treatment platelet reactivity to adenosine diphosphate associated with ischemia and bleeding. *J Am Coll Cardiol*. 2013;62(24):2261-73.
60. Komosa A, Siller-Matula JM, Lesiak M, Michalak M, Kowal J, Maczynski M, et al. Association between high on-treatment platelet reactivity and occurrence of cerebral ischemic events in patients undergoing percutaneous coronary intervention. *Thromb Res*. 2016;138:49-54.
61. Krasopoulos G, Brister SJ, Beattie WS, Buchanan MR. Aspirin "resistance" and risk of cardiovascular morbidity: systematic review and meta-analysis. *BMJ*. 2008;336(7637):195-8.

62. Nishikawa M, Takeda Y, Isomura N, Tanigawa T, Nanasato M, Tsukahara K, et al. Association between High Platelet Reactivity Following Dual Antiplatelet Therapy and Ischemic Events in Japanese Patients with Coronary Artery Disease Undergoing Stent Implantation. *J Atheroscler Thromb*. 2019.
63. Grosdidier C, Quilici J, Loosveld M, Camoin L, Moro PJ, Saut N, et al. Effect of CYP2C19*2 and *17 genetic variants on platelet response to clopidogrel and prasugrel maintenance dose and relation to bleeding complications. *Am J Cardiol*. 2013;111(7):985-90.
64. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), document EP28-A3c. Defining, Establishing, and Verifying Reference Intervals in the Clinical Laboratory; Approved Guideline-Third Edition. Wayne, PA, USA. 2010.
65. Price MJ, Berger PB, Teirstein PS, Tanguay JF, Angiolillo DJ, Spriggs D, et al. Standard- vs high-dose clopidogrel based on platelet function testing after percutaneous coronary intervention: the GRAVITAS randomized trial. *JAMA*. 2011;305(11):1097-105.
66. Trenk D, Stone GW, Gawaz M, Kastrati A, Angiolillo DJ, Muller U, et al. A randomized trial of prasugrel versus clopidogrel in patients with high platelet reactivity on clopidogrel after elective percutaneous coronary intervention with implantation of drug-eluting stents: results of the TRIGGER-PCI (Testing Platelet Reactivity In Patients Undergoing Elective Stent Placement on Clopidogrel to Guide Alternative Therapy With Prasugrel) study. *J Am Coll Cardiol*. 2012;59(24):2159-64.
67. Cayla G, Cuisset T, Silvain J, Leclercq F, Manzo-Silberman S, Saint-Etienne C, et al. Platelet function monitoring to adjust antiplatelet therapy in elderly patients stented for an acute coronary syndrome (ANTARCTIC): an open-label, blinded-endpoint, randomised controlled superiority trial. *Lancet*. 2016;388(10055):2015-22.
68. Collet JP, Cayla G, Cuisset T, Elhadad S, Range G, Vicaut E, et al. Randomized comparison of platelet function monitoring to adjust antiplatelet therapy versus standard of care: rationale and design of the assessment with a double randomization of (1) a fixed dose versus a monitoring-guided dose of aspirin and clopidogrel after DES implantation, and (2) treatment interruption versus continuation, 1 year after stenting (ARCTIC) study. *Am Heart J*. 2011;161(1):5-12 e5.
69. Sibbing D, Aradi D, Jacobshagen C, Gross L, Trenk D, Geisler T, et al. Guided de-escalation of antiplatelet treatment in patients with acute coronary syndrome undergoing percutaneous coronary intervention (TROPICAL-ACS): a randomised, open-label, multicentre trial. *Lancet*. 2017;390(10104):1747-57.
70. Born GV. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature*. 1962;194:927-9.
71. Gum PA, Kottke-Marchant K, Welsh PA, White J, Topol EJ. A prospective, blinded determination of the natural history of aspirin resistance among stable patients with cardiovascular disease. *J Am Coll Cardiol*. 2003;41(6):961-5.
72. Breet NJ, van Werkum JW, Bouman HJ, Kelder JC, Ten Berg JM, Hackeng CM. High on-aspirin platelet reactivity as measured with aggregation-based, cyclooxygenase-1 inhibition sensitive platelet function tests is associated with the occurrence of atherothrombotic events. *J Thromb Haemost*. 2010;8(10):2140-8.
73. Polzin A, Afzal S, Balzer J, Rassaf T, Kelm M, Zeus T. Platelet reactivity in MitraClip patients. *Vascul Pharmacol*. 2016;77:54-9.
74. Produktkatalog Multiplate Analyzer, Roche Diagnostics, Rotkreuz, Schweiz [updated 26.01.2020]. Available from: https://www.roche.de/res/content/7814/multiplate_produktkatalog2013.pdf.
75. Sibbing D, Braun S, Jawansky S, Vogt W, Mehilli J, Schomig A, et al. Assessment of ADP-induced platelet aggregation with light transmission aggregometry and multiple electrode platelet aggregometry before and after clopidogrel treatment. *Thromb Haemost*. 2008;99(1):121-6.
76. ROTEM Platelet Analyse-Parameter, Tem Innovations GmbH, München, Deutschland [updated 26.01.2020]. Available from: <https://www.rotem.de/methodik/rotem-platelet-analyse/>.
77. Aleil B, Ravanat C, Cazenave JP, Rochoux G, Heitz A, Gachet C. Flow cytometric analysis of intraplatelet VASP phosphorylation for the detection of clopidogrel resistance in patients with ischemic cardiovascular diseases. *J Thromb Haemost*. 2005;3(1):85-92.

78. Biocytex Package insert PLT VASP P2Y12, Zur Verlaufskontrolle der spezifischen Plättchen-ADP-Rezeptorantagonisten für die In-Vitro-Diagnostik: Biocytex; 01.03.2018 [updated 26.01.2020]. Available from: https://www.biocytex.com/fileadmin/user_upload/80-Biocytex/kits/DE_package%23insert%23PLT%23VASP%23P2Y12_7014_20180301.pdf.
79. Petricevic M, Konosic S, Biocina B, Dirkmann D, White A, Mihaljevic MZ, et al. Bleeding risk assessment in patients undergoing elective cardiac surgery using ROTEM((R)) platelet and Multiplate((R)) impedance aggregometry. *Anaesthesia*. 2016;71(6):636-47.
80. Whiting D, DiNardo JA. TEG and ROTEM: technology and clinical applications. *Am J Hematol*. 2014;89(2):228-32.
81. Wikkelsø A, Wetterslev J, Møller AM, Afshari A. Thromboelastography (TEG) or thromboelastometry (ROTEM) to monitor haemostatic treatment versus usual care in adults or children with bleeding. *Cochrane Database Syst Rev*. 2016(8):CD007871.
82. Nissen PH, Skipper MT, Hvas AM. Whole blood platelet aggregation determined by the ROTEM platelet equipment; reference intervals and stability. *Platelets*. 2019:1-6.
83. Nissen PH, Wulff DE, Tørring N, Hvas AM. The impact of pneumatic tube transport on whole blood coagulation and platelet function assays. *Platelets*. 2018;29(4):421-4.
84. Grassetto A, Fullin G, Lazzari F, Panizzo F, Polese F, Gessoni G, et al. Perioperative ROTEM and ROTEMplatelet monitoring in a case of Glanzmann's thrombasthenia. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2017;28(1):96-9.
85. Hanke AA, Horstmann H, Wilhelmi M. Point-of-care monitoring for the management of trauma-induced bleeding. *Curr Opin Anaesthesiol*. 2017;30(2):250-6.
86. Ranucci M, Baryshnikova E, Crapelli GB, Ranucci M, Meloni S, Pistuddi V, et al. Electric impedance platelet aggregometry in cardiac surgery patients: A comparative study of two technologies. *Platelets*. 2016;27(3):185-90.
87. Collet JP, Cuisset T, Range G, Cayla G, Elhadad S, Pouillot C, et al. Bedside monitoring to adjust antiplatelet therapy for coronary stenting. *N Engl J Med*. 2012;367(22):2100-9.
88. Cayla G, Cuisset T, Silvain J, Leclercq F, Manzo-Silberman S, Saint-Etienne C, et al. Platelet function monitoring to adjust antiplatelet therapy in elderly patients stented for an acute coronary syndrome (ANTARCTIC): an open-label, blinded-endpoint, randomised controlled superiority trial. *Lancet*. 2016.
89. Antman EM, Wiviott SD, Murphy SA, Voitek J, Hasin Y, Widimsky P, et al. Early and late benefits of prasugrel in patients with acute coronary syndromes undergoing percutaneous coronary intervention: a TRITON-TIMI 38 (TRial to Assess Improvement in Therapeutic Outcomes by Optimizing Platelet Inhibition with Prasugrel-Thrombolysis In Myocardial Infarction) analysis. *J Am Coll Cardiol*. 2008;51(21):2028-33.
90. Becker RC, Bassand JP, Budaj A, Wojdyla DM, James SK, Cornel JH, et al. Bleeding complications with the P2Y12 receptor antagonists clopidogrel and ticagrelor in the PLATElet inhibition and patient Outcomes (PLATO) trial. *Eur Heart J*. 2011;32(23):2933-44.
91. Rollini F, Franchi F, Angiolillo DJ. Switching P2Y12-receptor inhibitors in patients with coronary artery disease. *Nat Rev Cardiol*. 2016;13(1):11-27.
92. Spillert CR, Lee CS, Federici EE, Lazaro EJ. Role of platelet age in assessment of coagulation. *J Natl Med Assoc*. 1995;87(12):869-71.
93. Hirsh J. Hyperreactive platelets and complications of coronary artery disease. *N Engl J Med*. 1987;316(24):1543-4.
94. Gremmel T, Koppensteiner R, Panzer S. Comparison of Aggregometry with Flow Cytometry for the Assessment of Agonists -Induced Platelet Reactivity in Patients on Dual Antiplatelet Therapy. *PLoS One*. 2015;10(6):e0129666.
95. Arrabal-Polo MA, Arrabal-Martin M, Arias-Santiago S, Garrido-Gomez J, Poyatos-Andujar A, Zuluaga-Gomez A. Importance of citrate and the calcium : citrate ratio in patients with calcium renal lithiasis and severe lithogenesis. *BJU Int*. 2013;111(4):622-7.
96. Chapman K, Favaloro EJ. Time dependent reduction in platelet aggregation using the multiplate analyser and hirudin blood due to platelet clumping. *Platelets*. 2018;29(3):305-8.

97. Gorog DA, Sweeny JM, Fuster V. Antiplatelet drug 'resistance'. Part 2: laboratory resistance to antiplatelet drugs-fact or artifact? *Nat Rev Cardiol*. 2009;6(5):365-73.
98. Kalb ML, Potura L, Scharbert G, Kozek-Langenecker SA. The effect of ex vivo anticoagulants on whole blood platelet aggregation. *Platelets*. 2009;20(1):7-11.
99. Bergman A, Sidelnik NM. [Recalcification rate of fresh citrated plasma obtained by erythrocyte sedimentation or centrifugation and of plasma preserved in blood banks, undiluted or diluted with physiological saline or distilled water]. *Sem Med*. 1953;103(17):590-2.
100. Lutze G, Urbahn H. [Determination of the activated recalcification time (ART) in citrated blood]. *Z Med Lab Diagn*. 1981;22(1):37-42.
101. Wallen NH, Ladjevardi M, Albert J, Broijersens A. Influence of different anticoagulants on platelet aggregation in whole blood; a comparison between citrate, low molecular mass heparin and hirudin. *Thromb Res*. 1997;87(1):151-7.
102. Andreasen JB, Pistor-Riebold TU, Knudsen IH, Ravn HB, Hvas AM. Evaluation of different sized blood sampling tubes for thromboelastometry, platelet function, and platelet count. *Clin Chem Lab Med*. 2014;52(5):701-6.
103. Kaiser AF, Neubauer H, Franken CC, Kruger JC, Mugge A, Meves SH. Which is the best anticoagulant for whole blood aggregometry platelet function testing? Comparison of six anticoagulants and diverse storage conditions. *Platelets*. 2012;23(5):359-67.
104. Technische Daten Multiplate Analyzer, Roche Diagnostics, Rotkreuz, Schweiz [updated 26.01.2020]. Available from: <https://www.roche.de/diagnostics/systeme/gerinnungsdiagnostik/multiplate-analyzer.html#Spezifikationen>.
105. Garabedian T, Alam S. High residual platelet reactivity on clopidogrel: its significance and therapeutic challenges overcoming clopidogrel resistance. *Cardiovasc Diagn Ther*. 2013;3(1):23-37.
106. Amison RT, Jamshidi S, Rahman KM, Page CP, Pitchford SC. Diverse signalling of the platelet P2Y1 receptor leads to a dichotomy in platelet function. *Eur J Pharmacol*. 2018;827:58-70.
107. Geiger J, Teichmann L, Grossmann R, Aktas B, Steigerwald U, Walter U, et al. Monitoring of clopidogrel action: comparison of methods. *Clin Chem*. 2005;51(6):957-65.
108. Eigenthaler M, Ullrich H, Geiger J, Horstrup K, Honig-Liedl P, Wiebecke D, et al. Defective nitrovasodilator-stimulated protein phosphorylation and calcium regulation in cGMP-dependent protein kinase-deficient human platelets of chronic myelocytic leukemia. *J Biol Chem*. 1993;268(18):13526-31.
109. Wu CC, Tsai FM, Chen ML, Wu S, Lee MC, Tsai TC, et al. Antipsychotic Drugs Inhibit Platelet Aggregation via P2Y 1 and P2Y 12 Receptors. *Biomed Res Int*. 2016;2016:2532371.
110. Sudo T, Ito H, Kimura Y. Phosphorylation of the vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) by the anti-platelet drug, cilostazol, in platelets. *Platelets*. 2003;14(6):381-90.
111. Aktas B, Utz A, Hoenig-Liedl P, Walter U, Geiger J. Dipyridamole enhances NO/cGMP-mediated vasodilator-stimulated phosphoprotein phosphorylation and signaling in human platelets: in vitro and in vivo/ex vivo studies. *Stroke*. 2003;34(3):764-9.
112. Gaglia MA, Torguson R, Pakala R, Xue Z, Sardi G, Suddath WO, et al. Correlation between light transmission aggregometry, VerifyNow P2Y12, and VASP-P platelet reactivity assays following percutaneous coronary intervention. *J Interv Cardiol*. 2011;24(6):529-34.
113. Jover E, Rodriguez JM, Bernal A, Arroyo AB, Iniesta JA, Guiu IS, et al. High on-treatment platelet reactivity in patients with ischemic cerebrovascular disease: assessment of prevalence and stability over time using four platelet function tests. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2014;25(6):604-11.
114. Aradi D, Magyarlaci T, Tokes-Fuzesi M, Rideg O, Vorobcsuk A, Komocsi A. Comparison of conventional aggregometry with VASP for monitoring P2Y12-specific platelet inhibition. *Platelets*. 2010;21(7):563-70.
115. Mega JL, Close SL, Wiviott SD, Shen L, Hockett RD, Brandt JT, et al. Cytochrome p-450 polymorphisms and response to clopidogrel. *N Engl J Med*. 2009;360(4):354-62.
116. Horenstein RB, Madabushi R, Zineh I, Yerges-Armstrong LM, Peer CJ, Schuck RN, et al. Effectiveness of clopidogrel dose escalation to normalize active metabolite exposure and antiplatelet effects in CYP2C19 poor metabolizers. *J Clin Pharmacol*. 2014;54(8):865-73.

117. Kim HS, Chang K, Koh YS, Park MW, Choi YS, Park CS, et al. CYP2C19 poor metabolizer is associated with clinical outcome of clopidogrel therapy in acute myocardial infarction but not stable angina. *Circ Cardiovasc Genet*. 2013;6(5):514-21.
118. Gilard M, Arnaud B, Cornily JC, Le Gal G, Lacut K, Le Calvez G, et al. 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*. 2008;51(3):256-60.
119. Aleil B, Leon C, Cazenave JP, Gachet C. CYP2C19*2 polymorphism is not the sole determinant of the response to clopidogrel: implications for its monitoring. *J Thromb Haemost*. 2009;7(10):1747-9.
120. Hochholzer W, Trenk D, Fromm MF, Valina CM, Stratz C, Bestehorn HP, et al. 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*. 2010;55(22):2427-34.
121. Geisler T, Schaeffeler E, Dippon J, Winter S, Buse V, Bischofs C, et al. CYP2C19 and nongenetic factors predict poor responsiveness to clopidogrel loading dose after coronary stent implantation. *Pharmacogenomics*. 2008;9(9):1251-9.
122. Mohring A, Piayda K, Dannenberg L, Zako S, Schneider T, Bartkowski K, et al. Thromboxane Formation Assay to Identify High On-Treatment Platelet Reactivity to Aspirin. *Pharmacology*. 2017;100(3-4):127-30.
123. Polzin A, Dannenberg L, Schneider T, Knoop B, Naguib D, Helten C, et al. Malondialdehyde Assay in the Evaluation of Aspirin Antiplatelet Effects. *Pharmacology*. 2019;103(1-2):23-9.

8 Danksagung

Mein Dank gilt ...

... meinen Eltern Petra und Bernd für ihr Vertrauen in mich und ihre moralische und nicht selten kulinarische Unterstützung auf dem langen Weg des Studiums und der Promotion und beim Einstieg ins Arbeitsleben.

... meinem Bruder Daniel für konstruktiven Input, rhetorische Feinheiten und seinen individuellen Humor, bei dem Lachtränen manchmal nicht ausbleiben.

... meinem Freund Mark für seine unendliche Geduld, seinen grenzenlosen Optimismus und seine Fähigkeit mich zu erden. Als wir uns kennenlernten, ist er auf den fahrenden Zug meiner Promotion aufgesprungen und hat dafür gesorgt, dass ich nie entgleist bin.

... Herrn Prof. Dr. Malte Kelm für die Möglichkeit in seinem Labor und seiner Klinik diese Dissertation entwickeln und schreiben zu dürfen.

... Herrn PD Dr. Tobias Zeus als großartiger Doktorvater und Fels in der Brandung.

... Herrn PD Dr. Amin Polzin als Wegbereiter, für die unschlagbare Supervision, sein offenes Ohr und seine Geduld bis zur Fertigstellung.

... Frau Dr. Lisa Dannenberg als Motivationscoach, Inspirationsquelle und beste Betreuerin.

... Frau Kirsten Bartkowski für den Einsteiger-Kurs in die experimentelle Forschung, den Umgang mit Pipette, Schieblehre und Aggregometer und die vielen gemeinsam verbrachten Tage im Labor.

... der unvergleichlichen einzigartigen AG, in der ich nicht nur gute Kollegen, sondern wahre Freunde gefunden habe.

... meinen Freundinnen, die als Wegbegleiter mit ermutigenden Worten, Rat und Tat mir zur Seite standen und mit denen ich bereits viele besondere Momente auf unserem gemeinsamen Weg teilen durfte und noch teilen werden darf.