

**Aus dem Institut für Pharmakologie und Klinische
Pharmakologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Prof. Dr. rer. nat. Jens Fischer**

**Untersuchung der Wechselwirkung von Metamizol und nicht-
steroidalen Antirheumatika auf die
Thrombozytenfunktionshemmung durch *low-dose*
Acetylsalicylsäure an Patienten mit koronarer Herzkrankheit**

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

vorgelegt von

Stefan Bernd Richter

2016

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

gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf

Erstgutachter: Univ.-Prof. Dr. med. Thomas Hohlfeld

Zweitgutachter: Univ.-Prof. Dr. med. Malte Kelm

-Widmung-

Diese Arbeit widme ich meinen Eltern Bernd und Brigitte Richter ohne deren Unterstützung ich nicht die Möglichkeit der Inanspruchnahme eines Forschungssemesters bekommen hätte, was dazu geführt hat, diese Arbeit in Ruhe und mit meinem vollen Einsatz zu erarbeiten und niederzuschreiben.

Auch in Zukunft werde ich versuchen, zum Wohle der Patienten mich stets fort- und weiterzubilden, inspiriert von dem Zitat des Sokrates (468 v.Chr. – 399 v.Chr.):

„Wer glaubt, etwas zu sein, hat aufgehört, etwas zu werden.“

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Polzin, A., Zeus, T., Schrör, K., Kelm, M., Hohlfeld, T., 2013, *Dipyron (metamizole) can nullify the antiplatelet effect of aspirin in patients with coronary artery disease*. J Am Coll Cardiol; 62, 1725-1726.

Polzin A., Richter S., Schrör K., Rassaf T., Merx MW., Kelm M., Hohlfeld T., Zeus T., 2015, *Prevention of dipyron (metamizole) induced inhibition of aspirin antiplatelet effects*, Thromb Haemost.; 114, 87-95.

Zusammenfassung

Acetylsalicylsäure (ASS) ist ein essentieller Bestandteil der pharmakologischen Prävention kardiovaskulärer Ereignisse. Leider zeigen nicht alle Patienten unter ASS die erwartete Hemmung der Thrombozytenfunktion. Eine solche *ASS-Non-Response* kann die Prävention atherothrombotischer Ereignisse in Frage stellen.

In der Vergangenheit wurden unterschiedlichste Ursachen für *ASS-Non-Response* identifiziert. Unter anderem kam es im Rahmen unvermeidbarer Polypharmazie zur Interaktion zwischen ASS und nicht-steroidalen Analgetika/Antirheumatika oder dem in Deutschland sehr häufig verwendeten Analgetikum Metamizol (Novalgin).

In Zusammenarbeit mit der kardiologischen Klinik des Universitätsklinikums Düsseldorf wurde bei Patienten mit KHK (n= 64), die neben *low-dose* ASS auch mit einem NSAID oder mit Metamizol behandelt wurden, die Thrombozytenfunktion (Arachidonsäure-induzierte Aggregation nach Born) und thrombozytäre Thromboxansynthese (Immunoassay) im Rahmen einer Beobachtungsstudie untersucht. Als Kontrollgruppe dienten vergleichbare Patienten ohne analgetische Therapie (n= 35).

Als wichtigstes Ergebnis konnte die vorliegende Dissertation zeigen, dass bei ca. 50 % der KHK-Patienten, die neben der regelmäßigen Einnahme von ASS zusätzlich Metamizol mit analgetischer Indikation erhielten, die Thrombozytenaggregation und thrombozytäre Thromboxansynthese gar nicht oder nicht ausreichend gehemmt war. Diese erhebliche *ASS-Non-Response* bei Metamizol-behandelten Patienten kann die sekundärpräventive Wirksamkeit von ASS beeinträchtigen und das Risiko für zukünftige atherothrombotische Ereignisse erhöhen. In einer parallel untersuchten Patientengruppe mit der Wirkstoffkombination ASS und Ibuprofen konnte, im Gegensatz zu Berichten in der Literatur, keine Interaktion beobachtet werden. Für die Kombinationen aus ASS und Diclofenac sowie ASS und Paracetamol war ebenfalls keine Arzneimittelinteraktion nachzuweisen.

Mögliche Ursache für die Interaktion zwischen ASS und Metamizol ist eine Bindungskonkurrenz dieses Analgetikums mit ASS im hydrophoben Kanal der thrombozytären Cyclooxygenase (COX-1). Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde die Hemmung der Thrombozytenfunktion durch ausgewählte COX-1 - unabhängige Inhibitoren *in vitro* untersucht. Hier konnte gezeigt werden, dass Terbogrel als Thromboxansynthese-Inhibitor, Ticagrelor als P₂Y₁₂-Rezeptorantagonist und Tirofiban als GPIIb/IIIa-Rezeptor-Antagonist die Thrombozytenfunktion in Gegenwart von Metamizol (gesunde Thrombozyten in Blutplasma Metamizol-behandelter Patienten) effektiv hemmen. Im Unterschied dazu war die Thrombozytenfunktionshemmung durch ASS auch in diesem System erheblich beeinträchtigt.

Im Ergebnis konnte durch diese Beobachtungsstudie und die weiterführenden *in vitro* Experimente nachgewiesen werden, dass im Rahmen der analgetischen Routinebehandlung eingesetztes Metamizol die Thrombozytenfunktionshemmung durch ASS bei ca. 50 % der Patienten mit koronarer Herzkrankheit weitgehend oder ganz aufhebt. Zukünftige Untersuchungen werden die Auswirkungen dieser Arzneimittelinteraktion auf klinische Endpunkte analysieren.

Abkürzungen

Aq. dest.	Destilliertes Wasser
AA	Arachidonsäure
AAA	4-Acetylaminoantipyrin
4-AA	4-Aminoantipyrin
Abb.	Abbildung
ACD	<i>acid-citrate-dextrose</i>
ACE	<i>angiotensin-converting-enzyme</i>
ACVB	Aorto-Coronarer-Venen-Bypass
ATII-Blocker	Angiotensin II-Rezeptor-Antagonist
ADP	Adenosindiphosphat
AKS	Akutes Koronarsyndrom
AP	Angina pectoris
ATP	Adenosintri-phosphat
ASS	Acetylsalicylsäure, Aspirin i.v.®
AUC	<i>area under the curve</i>
β-Blocker	β-Rezeptor-Antagonist
bzw.	beziehungsweise
Ca²⁺	Kalziumion
CCS-Score	<i>Canadian Cardiovascular Society-Score</i>
CK	Kreatinkinase
CK-MB	Kreatinkinase- <i>Muscle and Brain</i>
COX	Cyclooxygenase
CPTP	Cyclopentyltriazolopyrimidin
CRP	C-reaktives Protein
CSE-Hemmer	Cholesterin-Synthese-Enzym-Hemmer
DDD	<i>defined daily dose</i> , Tagesdosen
11-DH-TXB₂	11-dehydro-Thromboxan B ₂
E_{allo}	allosterische Untereinheit der Cyclooxygenase
E_{cat}	katalytische Untereinheit der Cyclooxygenase
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EF	Ejektionsfraktion
EIA	Enzymimmunoassay
EtOH	Ethanol
FDA	Food and Drug Administration
Fe³⁺/Fe²⁺	drei-/zweiwertiges Eisenion
GP	Glykoprotein
Hb	Hämoglobin
HCE-1	humane Carboxylesterase-1
HDL	<i>high density lipoprotein</i>
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
HWZ	Halbwertszeit
i.v.	intravenös
KI	Konfidenzintervall
KHK	Koronare Herzkrankheit
KWK	Konzentrations-Wirkungs-Kurve
LDL	<i>low density lipoprotein</i>
LLOQ	<i>lower limit of quantification</i>
LVF	linksventrikuläre Funktion
MAA	4-Methylaminoantipyrin

mg	Milligramm
min.	Minute
n	Anzahl der Stichproben
NF-κB	<i>nuclear factor `kappa-light-chain-enhancer` of activated B-cells</i>
NMH	niedermolekulares Heparin
NO	Stickstoffmonoxid
n.s.	nicht signifikant
NSAID	<i>non-steroidal anti-inflammatory drug</i>
NSTEMI	<i>non-ST-elevation myocardial infarction</i>
NYHA	New York Heart Association
o.g.	oben genannt
OR	Odds Ratio
OTC	<i>over the counter</i> , nicht verschreibungspflichtige Arzneimittel
p-Wert	Signifikanzwert
PAP	plättchenarmes Plasma
PCI	perkutane koronare Intervention
PFA-100[®]	<i>Platelet Function Analyzer-100[®]</i>
PGD	Prostaglandin D
PGE	Prostaglandin E
PGF_{2α}	Prostaglandin F _{2α}
PGH₂	Prostaglandin H ₂
PGHS	Prostaglandin-Endoperoxid-H-Synthase
PGG₂	Prostaglandin G ₂
PGI₂	Prostaglandin I ₂ (Prostacyclin)
p.o.	<i>per os</i>
PPI	Protonenpumpen-Inhibitor
PRP	plättchenreiches Plasma
PTCA	perkutane transluminale koronare Angioplastie
RCA	<i>Arteria coronaria dextra</i>
RCX	<i>Ramus circumflexus</i>
RIA	Radioimmunoassay
RIVA	<i>Ramus interventricularis anterior</i>
RR	relatives Risiko
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
SD	Standardabweichung
SEM	<i>Standard Error of the Mean</i> , Standardfehler
STEMI	<i>ST-elevation myocardial infarction</i>
TG	Triacylglycerin
TM	Thrombozytenmedium
TX	Thromboxan
TXA₂	Thromboxan A ₂
TXB₂	Thromboxan B ₂
UAW	unerwünschte Arzneimittelwirkung
UKD	Universitätsklinikum Düsseldorf
U/min.	Umdrehung pro Minute
vgl.	vergleiche
vs.	<i>versus</i>
vWF	von-Willebrand-Faktor
V/AU	<i>Volt per Absorbance Unit</i>
Ø	Durchschnitt

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Bedeutung der Thrombozyten für die primäre und sekundäre Hämostase	2
1.2	Der thrombozytäre Arachidonsäuremetabolismus	3
1.3	Die Cyclooxygenase und ihre Isoformen	4
1.4	Acetylsalicylsäure als Cyclooxygenase-Inhibitor	6
1.5	Die Acetylsalicylsäure in der Sekundärprävention bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit	7
1.6	<i>ASS-Non-Response</i>	8
1.7	Stellenwert des Metamizols unter dem Gesichtspunkt der Interaktion mit ASS	10
1.8	Ziele der Dissertation.....	12
2	Material und Methodik.....	14
2.1	Studiendesign	14
2.2	Patienten	14
2.3	Versuchsprotokolle.....	14
2.4	Material.....	15
2.4.1	Blutentnahme.....	15
2.4.2	Plasmagewinnung.....	15
2.5	Substanzen und Lösungen	16
2.5.1	Substanzen und Herstellerangabe	16
2.5.2	Puffer und Lösungen	17
2.6	Methodik.....	18
2.6.1	Laborparameter.....	18
2.6.2	Messung der Thrombozytenfunktion.....	19
2.6.3	Bestimmung der TXB ₂ -Konzentration	21
2.6.4	Identifikation und Quantifikation der Analgetika im Patientenplasma	22
2.7	Darstellung unterschiedlicher Signaltransduktionswege zur Hemmbarkeit der Thrombozytenfunktion	24
2.7.1	Blutentnahme von gesunden Probanden.....	24
2.7.2	Aufbereitung des thrombozytenreichen Plasmas von Probanden	24
2.7.3	Thrombozytenaggregationsmessung	25
2.8	Statistik	25
3	Ergebnisse.....	27
3.1	Patientenkollektiv	27
3.1.1	Gruppierung des Patientenkollektivs nach Medikation.....	31
3.2	Thrombozytenzahlen und spezifische Laborparameter.....	33
3.3	Arachidonsäure-induzierte thrombozytäre Aggregation	35
3.4	Thrombozytäre Aggregation bei KHK-Patienten mit ASS und Metamizol.....	36
3.4.1	Thromboxan-Konzentrationen bei KHK-Patienten mit ASS und Metamizol.	37

3.4.2	Plasmakonzentration von Metamizol bzw. Metamizol-Metabolite.....	39
3.4.3	Komorbidität Diabetes mellitus bei KHK-Patienten mit ASS und Metamizol.....	39
3.4.4	Vergleich zwischen ASS-Respondern und -Non-Respondern in der Gruppe der Metamizol-behandelten Patienten	41
3.5	Betrachtung der Wirkstoffkombination ASS und Ibuprofen.....	43
3.6	Kombination von ASS und Diclofenac	44
3.7	Kombination ASS und Paracetamol	45
3.8	Kombination von ASS mit mehr als einem NSAID.....	46
3.9	<i>In vitro</i> Untersuchungen zur Hemmung der Thrombozytenaggregation über alternative Signaltransduktionswege	48
3.9.1	Versuch mit gesunden Probanden-Thrombozyten (PRP) und verdünntem Patientenplasma mit einem MAA-Plasmaspiegel von 3,0 µM	48
3.9.2	Versuche mit gesunden Probanden-Thrombozyten (PRP) unter Zugabe von Patientenplasma mit einer MAA-Konzentration von 3,0 µM und dem P ₂ Y ₁₂ -Rezeptor-Antagonist Ticagrelor	49
3.9.3	Versuche mit gesunden Probanden-Thrombozyten (PRP) unter Zugabe von Patientenplasma mit einer MAA-Konzentration von 3,0 µM und dem GPIIb/IIIa-Rezeptor-Antagonist Tirofiban.....	51
4	Diskussion	54
4.1	Acetylsalicylsäure als Sekundärprophylaxe für KHK-Patienten vor dem Hintergrund des möglichen Therapieversagens	54
4.2	Bedeutung der Interaktion zwischen ASS und nicht-steroidalen Antirheumatika für KHK-Patienten in Bezug auf ASS-Non-Response	55
4.3	Interaktion von Metamizol mit der Thrombozytenaggregationshemmung durch ASS.....	56
4.4	Weitere Erklärungsansätze der ASS-Non-Response	58
4.4.1	ASS-Non-Compliance	58
4.4.2	Erhöhter Thrombozytenumsatz/-verbrauch.....	58
4.4.3	Thrombozytenhyperreaktivität	59
4.4.4	Genpolymorphismen bzw. Mutationen der Cyclooxygenase-1	59
4.4.5	Intra- und interindividuelle Variabilität der Pharmakokinetik von ASS.....	60
4.4.6	Zur COX-1 alternierende TXA ₂ -Synthesewege	60
4.5	Evaluation der verschiedenen Biomarker zur Bestimmung der Thrombozytenfunktion im Hinblick auf die Validität der ASS-Non-Response ..	61
4.6	Alternative Pharmakotherapie der Thrombozyteninhibition über nicht COX-1 selektive Signaltransduktionswege.....	62
4.7	Schlussfolgerungen zur Sicherstellung der antithrombozytären Therapie unter Risikominimierung der Entwicklung einer ASS-Non-Response.....	64
5	Literatur- und Quellenverzeichnis.....	66

1 Einleitung

Mit der synthetischen Herstellung der Acetylsalicylsäure 1853 in unreiner Form durch Charles Gerhardt bzw. mit der Reinsynthese durch Felix Hoffmann und Arthur Eichengrün 1899 während ihrer Tätigkeit bei Bayer in Elberfeld gewann die Acetylsalicylsäure (ASS) an Bedeutung für die Pharmakotherapie [1]. 1972 konnte Sir John Vane den zentralen Mechanismus der Acetylsalicylsäure (ASS) als Inhibitor der Prostaglandinsynthese entschlüsseln [2].

Aspirin zählt bis heute zu den meist verwendeten schmerzlindernden Medikamenten der Welt, was sich beispielsweise im jährlichen Pro-Kopf-Verbrauch der US-Amerikaner von 220 Tabletten widerspiegelt [3]. In der Bundesrepublik Deutschland genießt ASS ebenfalls einen hohen Stellenwert, wohl primär nicht durch Nutzung der antipyretischen und antiphlogistischen Eigenschaft als vielmehr in der Sekundär- und Tertiärprävention von kardiovaskulären Ereignissen dank der Hemmung der Thrombozytenfunktion mittels irreversibler Inaktivierung der thrombozytären Cyclooxygenase (COX).

Zur leitliniengerechten Standardtherapie in der Sekundärprävention von kardiovaskulär thromboembolischen Ereignissen zählt ASS in niedriger Dosierung (*low-dose*, entsprechend 75-100 mg/d) nach wie vor zur Basismedikation. In dualer Therapie wird es vorzugsweise mit einem P₂Y₁₂-Rezeptorantagonist kombiniert [4]. Mit der lebenslang täglichen Einnahme werden nachweislich das Risiko beispielsweise für das Erleiden eines akuten Koronarsyndroms (AKS), eines Schlaganfalls oder eines peripheren arteriellen Verschlusses gesenkt und folglich die Mortalität minimiert [5]. Allerdings ist die Prognose der einzelnen Patientenkollektive sehr variabel. Die Limitation der Hemmung der Thromboxan-abhängigen Thrombozytenaggregation mittels *low-dose* ASS wurde in zahlreichen Untersuchungen beschrieben [6-9].

Meta-Analysen haben gezeigt, dass bei Patienten, denen man *in vitro* eine „Aspirin-Resistenz“ nachweisen konnte, auch ein erhöhtes Risiko für thromboembolische Ereignisse bestand [10, 11]. Ursächlich werden mannigfaltige Mechanismen beschrieben wie *Non-Compliance* [12, 13], gestörte Resorption [14], genetische Polymorphismen [15], gesteigerte Plättchenregeneration [16] sowie die Interaktion mit nicht-steroidalen Antirheumatika (NSAID), welche eindrucksvoll in zahlreichen Untersuchungen herausgearbeitet werden konnten [17-20].

Die vorliegende Arbeit konzentriert sich auf das Thema der „Aspirin-Resistenz“, eine verkürzte Bezeichnung für die verminderte bzw. vollständig aufgehobene, plättchenhemmende Wirkung des *low-dose* ASS. Diese kann Ausdruck einer Interaktion mit dem nicht-opioid-Analgetikum Metamizol sein, welches in der eigenen Arbeitsgruppe bereits Gegenstand vorausgehender experimenteller und klinischer Untersuchungen gewesen ist [21].

Die Verordnungszahlen des Metamizols (in Mio. DDD) stiegen von 2001 bis 2010 kontinuierlich an (vgl. Abb. 1), trotz der immer wieder beschriebenen unerwünschten Arzneimittelwirkungen Agranulozytose und anaphylaktische Reaktion. Dies spiegelt die sowohl ambulant als auch klinisch die zunehmende Bedeutung des Metamizols wider. Im Folgenden werden die Grundlagen, die zu dieser Interaktion führen, sowie deren Auswirkungen anhand von KHK-Patienten erörtert.

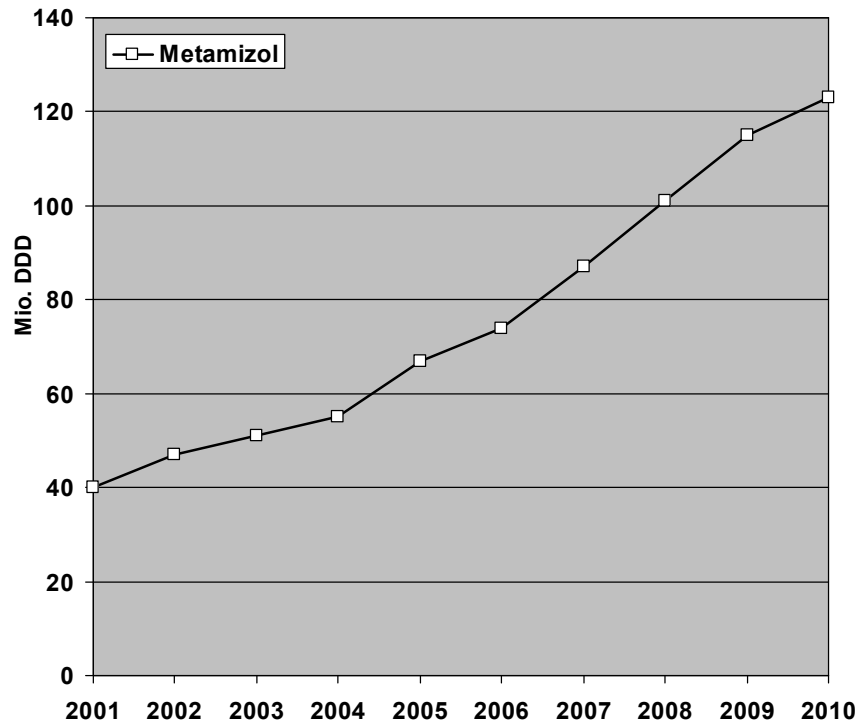


Abb. 1: Verordnungszahlen von Metamizol 2001 bis 2010. Gesamtverordnungen nach definierten Tagesdosen (nach: Arzneiverordnungsreport 2012: Aktuelle Daten, Kosten, Trends und Kommentare; Herausgegeben von U. Schwabe, D. Paffrath)

1.1 Bedeutung der Thrombozyten für die primäre und sekundäre Hämostase

Um den Blutverlust aus einem verletzten Gefäß zu unterbinden, ist die Bildung eines Gefäßwandthrombus unerlässlich. Diese Hämostasereaktion wird durch ihren zeitlichen Ablauf in die primäre und sekundäre Hämostase mit anschließender Fibrinolyse unterteilt. Sie wird durch einen Gewebsdefekt und damit verbundenem Freilegen von subendothelial befindlicher extrazellulärer Matrix ausgelöst, die der diskoide Thrombozyt während der primären Adhäsion mittels seiner membranständigen Adhäsionsrezeptoren (Membranglykoproteine, GP) erkennen kann. Dies geschieht durch den kollagenbehafteten von-Willebrand-Faktor (vWF), der durch die Gefäßläsion freigelegt wird, und mit dem Glykoprotein Ib/IX/V-Komplex des Thrombozyten in Verbindung tritt (vgl. Abb. 2) [22]. Zur Stabilisierung der Adhäsion und Aktivierung des Blutplättchens ist vorrangig eine weitere Verbindung zwischen dem thrombozytären Glykoprotein VI als Kollagenrezeptor und dem freiliegenden Kollagen notwendig. Daraufhin bilden sich mittels Plättchenaktivierung Pseudopodien aus, die die Gefäßwandabdichtung unterstützen [23]. Ferner synthetisiert der jetzt sphärische Thrombozyt aus freigesetzter Arachidonsäure (AA) das Thromboxan A₂ (TXA₂), das autokrin am membranständigen Thromboxanrezeptor bindet und zur Verstärkung des Aktivierungsprozesses führt, so dass es zur Degranulation von beispielsweise Adenosindiphosphat (ADP) und Ca²⁺ kommt. Durch das TXA₂ sowie dem ADP werden parakrin weitere Thrombozyten rekrutiert. Dies geschieht parallel auch durch das gegenwärtige, aktivierte Thrombin.

Von zentraler Bedeutung in der Aggregationsphase ist der Glykoprotein IIb/IIIa-Rezeptor, der im Zuge der Aktivierung unter Anwesenheit von Ca^{2+} das Fibrinogen als Brückenelement zu benachbarten Thrombozyten bindet [24].

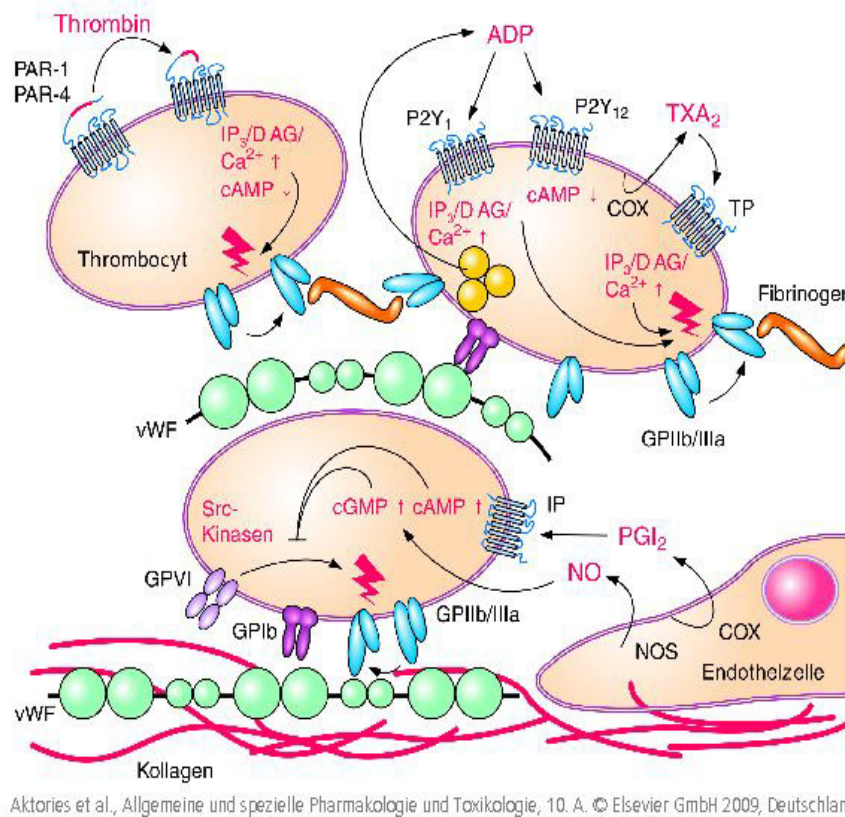


Abb. 2: Modell der Thrombozytenaggregation (aus: Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, Aktories/Förstermann/Hofmann/Starke, 10. überarbeitete Auflage 2009 Elsevier GmbH München)

In dieser Phase der Aggregation ist die Koadhäsion der Plättchen zueinander noch instabil. Dieser Zustand erfährt in Anwesenheit von Thrombin eine Änderung, denn durch Anlagerung von Fibrin an das Plättchenkonglomerat wird die fehlende Rigidität verliehen.

Die parallel ablaufende sekundäre Hämostasereaktion wird durch negative Ladungen der freigelegten Matrix sowie der aktivierten Thrombozytenoberfläche in Gang gesetzt. Das Prothrombin wird als Ziel der gemeinsamen Endstrecke von intrinsischem und extrinsischem System in seine aktive Form überführt [25].

1.2 Der thrombozytäre Arachidonsäuremetabolismus

Zu den zentralen Aktivierungsmechanismen von Thrombozyten gehört die Thromboxansynthese. Die Arachidonsäure (AA) wird durch die Ca^{2+} getriggerte Phospholipase A_2 aus den Membranphospholipiden freigesetzt und als vierfach ungesättigte Fettsäure durch Cyclooxygenase und Lipooxygenasen zu weiteren Eicosanoiden verstoffwechselt (vgl. Abb. 3).

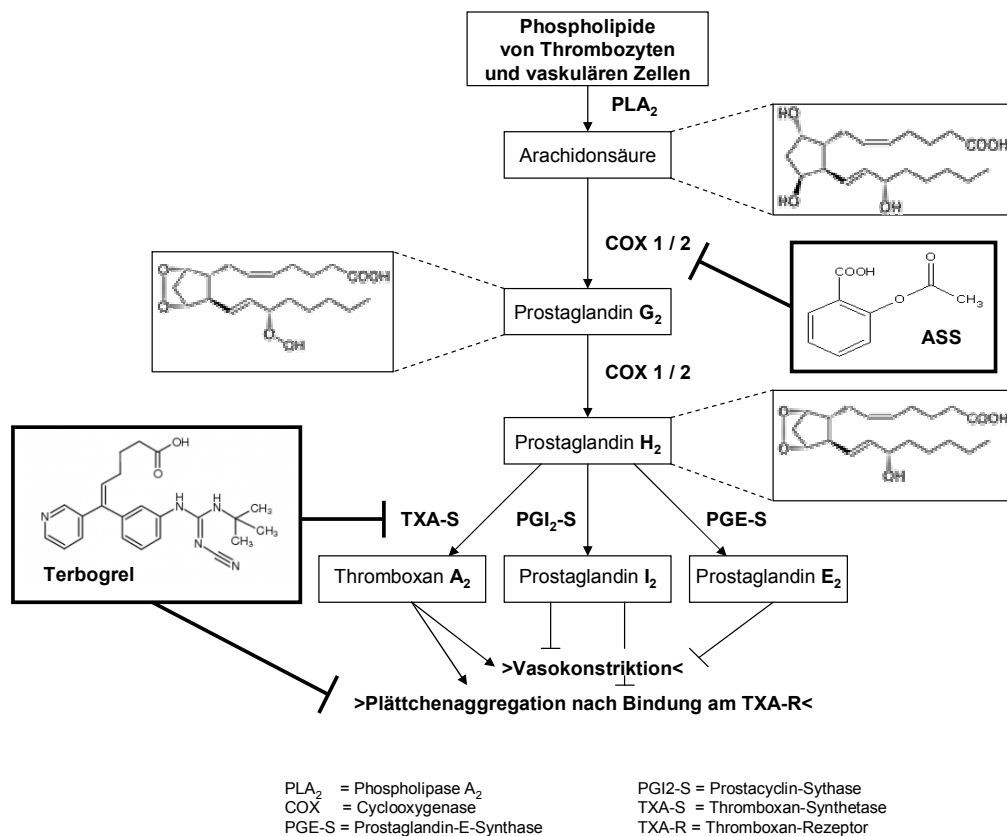


Abb. 3: Vereinfachte schematische Darstellung des Arachidonsäuremetabolismus mit für die Plättchenaktivierung essentiellen Synthesewegen

Katalysiert durch die thrombozytäre Cyclooxygenase wird aus der Arachidonsäure zunächst das cyclische Endoperoxid Prostaglandin G_2 synthetisiert, welches mittels desselben Enzyms weiter zu Prostaglandin H_2 verstoffwechselt wird. Daraufhin katalysiert die Thromboxan-Synthetase die Bildung des Thromboxan A_2 , welches autokrin mit dem G-Protein gekoppelten Thromboxanrezeptor interagiert und die thrombozytäre Vesikel-Degranulation stimuliert. Neben den α -Granula, welches Enzyme, adhäsive und zytokinähnliche Proteine sowie Wachstums- und Koagulationsfaktoren beinhalten, werden auch dichte Granula (Inhalt: ADP, ATP, Ca^{2+} , Serotonin) und Lysosomen (Inhalt: hydrolytische Enzyme) in Abhängigkeit der zytoplasmatischen Ca^{2+} -Konzentration exozytiert. Die Thromboxanrezeptoren sind zudem membranständig an den glatten Muskelzellen der Gefäßwand lokalisiert und erwirken nach Bindung des Thromboxan A_2 eine lokale Vasokonstriktion.

Die Prostaglandinsynthese erfolgt nach jedem Stimulus neu und ist durch ihre kurze Halbwertszeit (HWZ) charakterisiert. Das Thromboxan A_2 wird nicht-enzymatisch in weniger als einer Minute zum stabilen und somit im Humanplasma messbaren Thromboxan B_2 hydrolysiert [26].

1.3 Die Cyclooxygenase und ihre Isoformen

Die Cyclooxygenase (COX) wird auch als Prostaglandin-Endoperoxid-H-Synthase (PGHS) bezeichnet. Sie ist ein homodimeres Enzym, welches den ersten Schritt der Proteinbiosynthese der Prostaglandine PGD, PGE und PGF sowie Thromboxan (TXA_2) und seinem Gegenspieler Prostacyclin (PGI_2) katalysiert (vgl. Abb. 3). Die hydrophobe,

membranbindende Region des Enzyms bildet einen ebenfalls hydrophoben, blind endenden Kanal, welcher das aktive Zentrum darstellt (vgl. Abb. 4) [27]. Dort läuft die Cyclooxygenasereaktion in exakt zwei Teilschritten ab. Zum einen werden im katalytischen Zentrum neben dem Ringschluss der Kohlenstoffatome C₈ und C₁₂ zwei Sauerstoffmoleküle am C₁₁ und C₁₅ in die Arachidonsäure eingefügt, die mittels kovalenter Bindung eine Peroxidbrücke ausbilden. Zum anderen wird aus dem nun entstandenen Prostaglandin G₂ durch die Peroxidaseaktivität der COX das Prostaglandin H₂ reduziert. Das PGH₂ wird mittels spezieller Synthasen rasch zu beispielsweise TXA₂ umgesetzt.

Die homodimere Struktur der COX erlaubt eine gegenseitige Regulation der Monomere E_{allo} und E_{cat} untereinander. Während E_{cat} als Monomer die katalytische Funktion übernimmt, charakterisiert E_{allo} die regulatorische Aufgabe in der COX-2 [27].

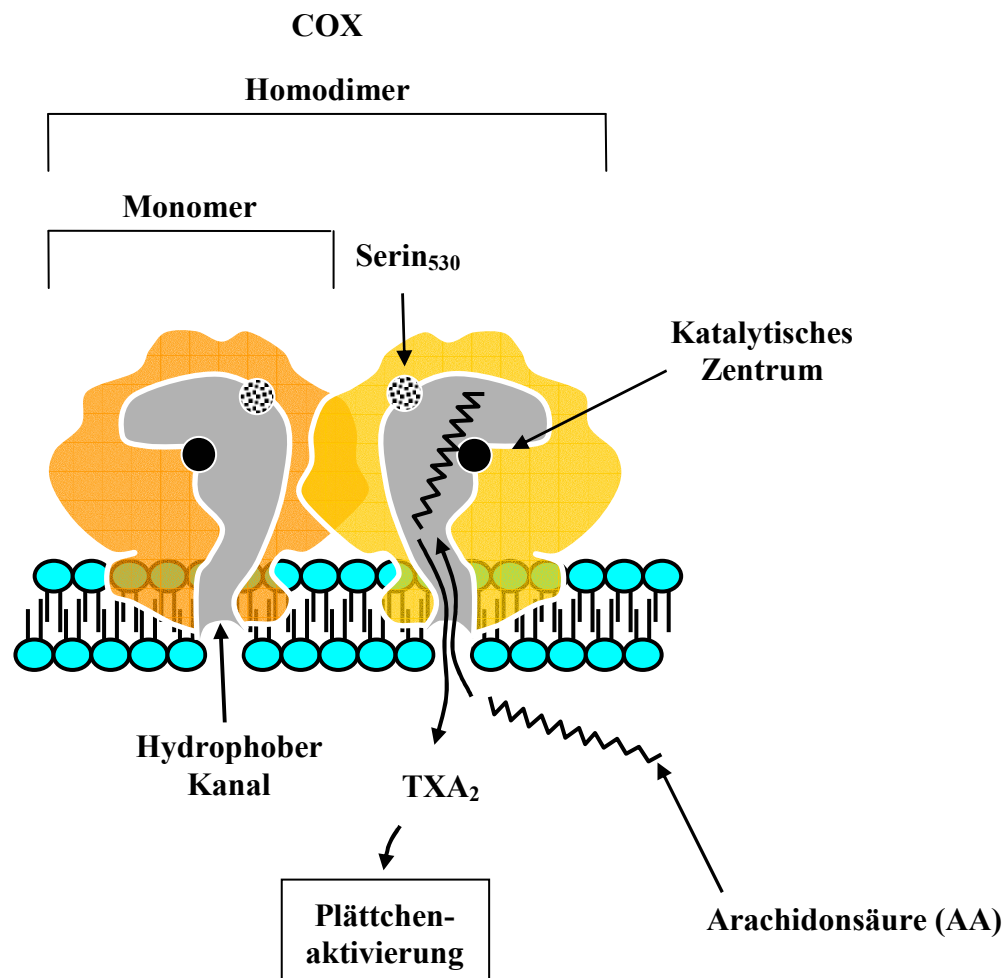


Abb. 4: Schematische Darstellung der Cyclooxygenase (modifiziert nach Catella-Lawson et al., 2001)

Neben den Isoformen COX-1 und COX-2 mit ca. 600 Aminosäuren wurde eine dritte Isoform, die COX-1b (=COX-3), beschrieben. Sie teilt als modifizierte Variante der COX-1 alle wichtigen katalytischen und strukturellen Eigenschaften der beiden erstgenannten Isoformen [27, 28].

Ein grundlegender Unterschied zwischen den Isoformen 1 und 2 ist der Austausch von Isoleucin in der COX-1 zu Valin in der COX-2 an Position 523 [29]. Dadurch ändert sich die charakteristische Struktur des hydrophoben Kanals, was der COX-2 erlaubt, größeren

Substraten eine Bindung zu ermöglichen. Die konstitutive COX-1 ist ubiquitär im gesunden Gewebe exprimiert und induziert physiologische Effekte. Während die COX-2 ebenfalls physiologisch bedingt im Zuge der Wundheilung, der Weheninduktion oder auch der Nierendurchblutung exprimiert wird, kann sie auch lokal eine vermehrte Expression aufgrund eines Entzündungsstimulus aufweisen [30].

1.4 Acetylsalicylsäure als Cyclooxygenase-Inhibitor

Acetylsalicylsäure ist ein nicht-opioides Analgetikum mit antiphlogistischer Wirkung und zählt zur Gruppe der nicht-steroidalen antiinflammatorischen Wirkstoffe (NSAID). Es hemmt die Cyclooxygenase irreversibel durch Acetylierung des Serin-Restes an der Position 530, was zur Blockierung des hydrophoben Kanals und letztendlich des katalytischen Zentrums führt. Somit ist die Bindungsstelle für Arachidonsäure nicht mehr erreichbar (vgl. Abb. 5).

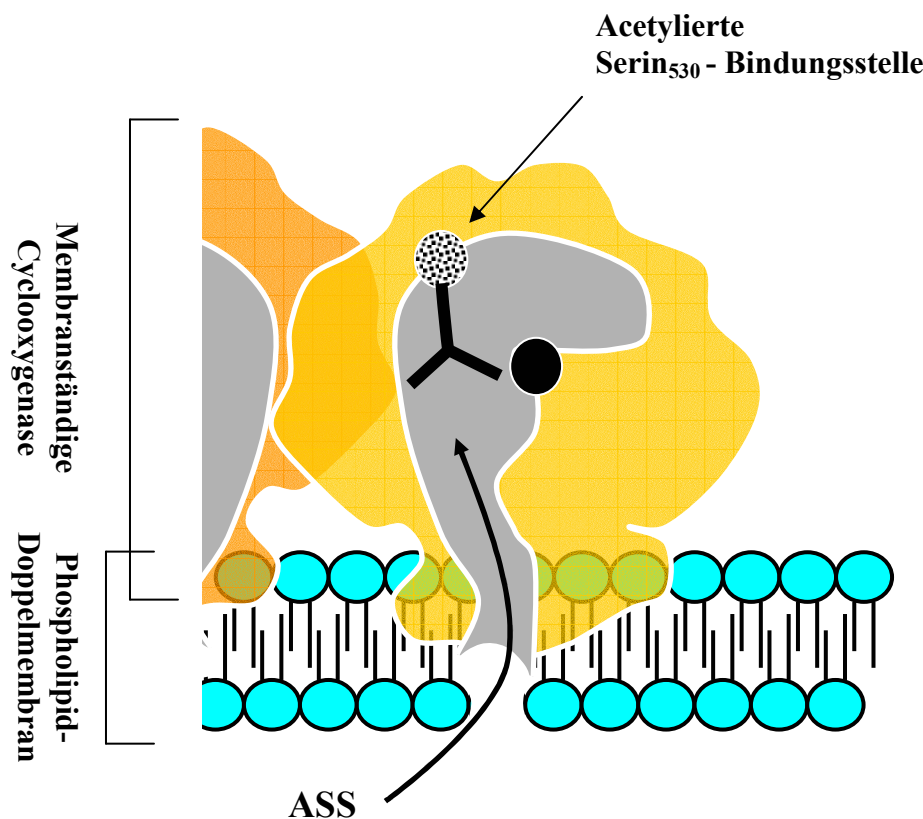


Abb. 5: Schematische Darstellung der Funktionsweise der Acetylsalicylsäure (modifiziert nach Catella-Lawson et al., 2001)

ASS hemmt mit relativer Selektivität die COX-1 aufgrund einer höheren Affinität zu dieser Isoform als zur COX-2 [31]. Folglich wird die Synthese des zur Plättchenaktivierung wichtigen TXA_2 gehemmt, was letztendlich zur Hemmung der Thrombozytenfunktion führt.

Die thrombozytäre Cyclooxygenase kann durch die nahezu fehlende Proteinbiosynthese in kernlosen Thrombozyten nicht ersetzt werden, so dass die Bildung von Thromboxan für die Lebensdauer von 7 bis 12 Tagen nicht mehr möglich ist. Erst nach Abbau der gealterten Plättchen im retikulo-endothelialen System von Leber und Milz sowie Regeneration junger Thrombozyten erholt sich die primäre Hämostase wieder.

1.5 Die Acetylsalicylsäure in der Sekundärprävention bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit

Patienten, die an einer koronaren Herzkrankheit leiden, zeigen charakteristisch ein chronisches Ungleichgewicht von Sauerstoffbedarf und Sauerstoffangebot im Herzmuskelgewebe aufgrund der Manifestation von Arteriosklerose in den Gefäßwänden der Koronararterien.

Durch die Intimaproliferation, die parallel zur intimalen Lipideinlagerung und deren Phagozytose mittels eingewanderter Makrophagen (spätere „Schaumzellen“) auftritt, kommt es folglich zur Querschnittsabnahme der geschädigten Gefäßwandabschnitte. Das Risiko der Bildung von sekundären Thrombosen an den plaquebedingten Engstellen steigt mit der Abnahme des Lumens, zum einen durch die Abnahme der Fließgeschwindigkeit und zum anderen durch den Funktionsverlust des Endothels durch mangelnde Synthese von Stickstoffmonoxid (NO), zur Gefäßrelaxation, Antiinflammation und Inhibition der Plättchenaktivität beiträgt [32]. Diese sich daraus ergebene endotheliale Dysfunktion ist von zentraler Bedeutung für die Pathogenese koronarer Durchblutungsstörungen und wird durch Hypercholesterinämie, Nikotinabusus, arterieller Hypertonie sowie Diabetes mellitus begünstigt [32]. Mangels NO-Synthese werden mittels voraktivierten Thrombozyten bei Kontakt zu den betroffenen Endothelzellen Zytokine freigesetzt, die zur Monozytenchemotaxis und Adhäsionsrezeptorexpression führen, und demzufolge die Plaquebildung begünstigen [32]. Eine komplexe Dysbalance zwischen pro- und antiinflammatorischen Faktoren zu Gunsten der proinflammatorischen Antwort erhöht zusätzlich den oxidativen Stress in den betroffenen Bereichen [33], auch hervorgerufen durch das Zusammenspiel von nativen und adaptiven Immunabwehrzellen [34].

Nach Plaque-Ruptur mit anschließender Lösung von thrombotischem Material kann dieses lokal das Gefäßlumen okkludieren oder in distale Abschnitte des Koronarsystems embolisieren. Folge ist ein akutes Koronarsyndrom (AKS), zu dem neben der instabilen Angina pectoris auch der ST-Streckenhebungsinfarkt (STEMI) und der Nicht-ST-Streckenhebungsinfarkt (NSTEMI) zählen.

Um die Bildung dieses Thrombus zu vermeiden, werden kardiovaskuläre Risikopatienten lebenslang mit *low-dose* ASS präventiv therapiert [35]. Allerdings ist nicht zu erwarten, dass *low-dose* ASS eine Progression arteriosklerotischer Plaques verhindert [25]. Ein Einsatz des *low-dose* ASS in der Primärprävention ist demzufolge kritisch zu betrachten. Dies bringt eine Meta-Analyse aus dem Jahr 2009 der *Antithrombotic Trialists' (ATT) Collaboration* zum Ausdruck:

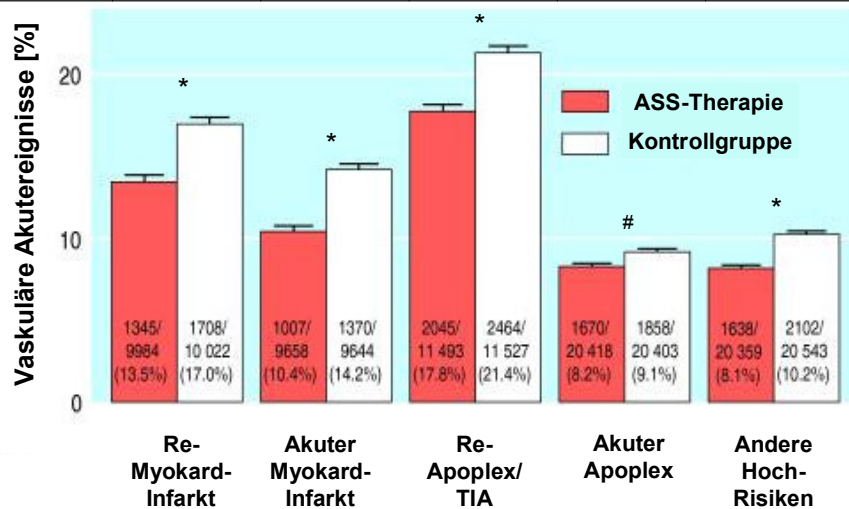
Zwar zeigt die Analyse eine signifikante Reduktion von kardiovaskulären Akutereignissen gegenüber der Kontrollgruppe (0,51 % in der ASS-Gruppe gegenüber 0,57 % in der Kontrollgruppe, $p=0,0001$), jedoch wird keine signifikante Veränderung der kardiovaskulären Gesamtmortalität ($RR=0,97$ [95 % $KI=0,87-1,09$], $p=0,7$) erreicht. Auch ergibt sich keine signifikante Auswirkung auf die Risikoreduktion einen Apoplex zu erleiden (Primärprävention: $p=0,07$, Sekundärprävention: $P=0,05$).

Demgegenüber erhöht ASS in der Primärprävention das Risiko für eine gastrointestinale Blutung sowie weitere extrakranielle Blutungen ($RR=1,54$ [1,30–1,82], $p<0,0001$) [36].

In der Sekundärprävention hingegen haben Meta-Analysen gezeigt, dass eine antithrombozytäre Therapie mit ASS bei Hochrisiko-Patienten eine signifikante Risikoreduktion, ein erneutes thromboembolisches Akutereignis zu erleiden, um 20-25 % erreicht werden kann [5]. Patienten profitieren je nach Art und Lokalisation des

thromboembolischen Geschehens unterschiedlich von der Sekundärprävention. So konnte die Reduktion eines Re-Infarktes um ein Drittel erreicht werden, während die Zahl der Patienten mit einem Re-Apoplex um ein Viertel gesenkt werden konnte (vgl. absolute Zahlen in Abb. 6) [5]. Hier überwiegt der Nutzen von *low-dose* ASS gegenüber dem Risiko, extrakranielle Blutungen zu erleiden. Die üblicherweise niedrige Dosierung von 100 mg/Tag wird damit begründet, dass hiermit die Synthese des funktionellen Antagonisten Prostacyclin zum Thromboxan nur gering beeinflusst wird aufgrund der überwiegenden COX-1 Selektivität von ASS [31].

Absolute Ereignisreduktion [pro 1000 Patienten]	36	38	36	9	22
Mittlerer Behandlungszeitraum [Monat]	27	1	29	0,7	22



(*): $p < 0,0001$, (#): $p = 0,0009$

Abb. 6: Absoluter Effekt der antithrombozytären Behandlung von vaskulären Akutereignissen im Vergleich zur Kontrollgruppe (modifiziert nach British Medical Journal Publishing Group et al. 2002,324:71-86)

Folgerichtig ist ASS in niedriger Dosierung von 75-100 mg/d eine wichtige Säule in der Sekundärprävention von Patienten mit koronarer Herzkrankheit. Die CURE-Studie zeigte sogar, dass die Kombination von ASS mit Clopidogrel als P_2Y_{12} -Rezeptorantagonist (75 mg/d), für einen Zeitraum von neun bis zwölf Monaten noch einmal eine signifikante Reduktion der Inzidenz für ein erneutes thromboembolisches Akutereignis bei AKS-Patienten mit NSTEMI erreicht werden kann gegenüber der ASS-Monotherapie (9,3 % vs. 11,4 %; RR=0,80; 95 % KI=0,72–0,90; $p < 0,001$) [35, 37].

1.6 ASS-Non-Response

Zahlreiche Untersuchungen der letzten Jahre haben gezeigt, dass mit der täglichen Medikation von ASS in der Dosierung von 100 mg nicht die optimale Hemmung der

Thromboxansynthese und folglich der Thrombozytenaggregation erreicht wird [6-9]. Dies bedeutet, dass mehr als 95 % der Thromboxansynthese gehemmt ist [38, 39].

Zwei Meta-Analysen von Krasopoulos et al. und Snoep et al. zeigen, dass Patienten, bei welchen *in vitro* eine „Resistenz“ der Thrombozyten gegenüber der Wirkung von ASS nachgewiesen werden konnte, mit einem signifikant etwa 4-fach erhöhten Risiko für ein thromboembolisches Ereignis assoziiert sind. Von einer Komedikation mit Clopidogrel oder Tirofiban profitierte dieses Patientenkollektiv nicht. Krasopoulos et al. untersuchten 20 Studien, in denen 2930 Patienten eingeschlossen waren, die an einer kardiovaskulären Erkrankung gelitten hatten. Die ASS-Medikation befand sich in dem Dosierungsbereich von 75 bis 325 mg pro Tag. 810 der 2930 Patienten (28 %) wurden als ASS-resistent identifiziert. 39,4 % der 810 resistenten Patienten erfuhren ein akutes kardiovaskuläres Ereignis im Vergleich zu 16 % der 2120 ASS-sensitiven Patienten [10]. Snoep et al. kamen in ihrer Analyse zu dem Ergebnis, dass Patienten mit einer *in vitro* nachgewiesenen „ASS-Resistenz“ ein signifikant höheres Risiko aufweisen ($p=0,03$), ein erneutes kardiovaskuläres Akutereignis zu erleiden, als Patienten, die *in vitro* als ASS-sensitiv eingestuft wurden (OR=3,8) [11].

Der Begriff „ASS-Resistenz“ ist insofern missverständlich, als es sich eher um eine verminderte Ansprechrate der Thrombozyten auf Acetylsalicylsäure handelt. Dabei gilt es zu beachten, dass Thrombozyten auch Thromboxan (TXA₂)-unabhängig aktiviert werden können, wie etwa durch Thrombin oder ADP (vgl. 1.1).

Eine einheitliche Definition des Begriffs „ASS-Resistenz“ gibt es noch nicht. Insbesondere gibt es keinen Konsens für eine Messmethodik der Thrombozytenfunktion. So haben Schrör, Huber und Hohlfeld die Vor- und Nachteile der unterschiedlichen Messmethoden aufgezeigt [40]. Während in der Aggregometrie nach Born (vgl. 2.6.2.1) mit plättchenreichem Plasma die fehlenden Scherkräfte sowie die durch Zentrifugation absedimentierten weiteren Blutbestandteile wie Leukozyten bemängelt wurden, arbeitet der *Platelet Function Analyzer-100*[®] (PFA-100[®]) mit Vollblut und kann Scherkräfte simulieren, wie sie in stenosierte Gefäßen vorliegen, indem die Blutprobe durch eine mit Kollagen und Epinephrin beschichtete Apparatur geleitet wird. Nachteilig sind hier dosisabhängige Ergebnisse sowie der Einfluss des Citrats bei der Antikoagulation.

Eine durch Weber et al. vorgeschlagene Definition der „ASS-Resistenz“ unterscheidet anhand der TXA₂-Synthese und Aggregation 3 Subtypen (s. Tabelle 1) [39, 41]:

Der erste Resistenztyp (Typ I, pharmakokinetischer Typ) zeigt *in vivo* keinen messbaren ASS-Effekt, während durch *in vitro* Versuche unter Zugabe von 100 µM ASS sowohl die Thromboxansynthese als auch die Plättchenaggregation vollständig gehemmt werden kann. Ursache ist die variable Bioverfügbarkeit, wie sie bei der *low-dose* ASS-Medikation beobachtet wurde [14]. Ebenso fällt eine mögliche *Non-Compliance* darunter.

Der zweite Resistenztyp (Typ II, pharmakodynamischer Typ) zeigt wie der Typ I keine messbare Hemmung der TXA₂-Synthese sowie der Plättchenaggregation trotz Einnahme von 100 mg ASS *per os* für mindestens fünf Tage. In diesem Fall kann aber auch durch Zugabe von 100 µM ASS *in vitro* keine suffiziente Hemmung der TXA₂-Synthese und der Aggregation erreicht werden. Zur Erklärung des Mechanismus werden verschiedene Thesen aufgestellt, unter anderem ein Gen-Polymorphismus der COX-1 durch Punktmutationen [15, 42] oder die Arzneimittelinteraktion mit NSAIDs.

Beim dritten Resistenztyp (Typ III, „Pseudo-Resistenz“) kann, unter dergleichen Einnahmeveraussetzung wie Typ I und II, sowohl *in vivo* als auch *in vitro* keine Hemmung

der Plättchenaggregation erreicht werden. Die Thromboxansynthese wird jedoch nahezu vollständig gehemmt. Als Erklärung kommt eine Thromboxan-unabhängige Plättchenaktivierung in Betracht.

Typisierung	<i>in vivo</i> (100 mg ASS p.o. für min. 5 Tage)		<i>in vitro</i> [+ 100 µM ASS] (100 mg ASS p.o. für min. 5 Tage)	
	Hemmung von		Hemmung von	
	TZ- Aggregation	TXA ₂ - Synthese	TZ- Aggregation	TXA ₂ - Synthese
I (Pharmakokinetischer Typ)	-	-	+	+
II (Pharmakodynamischer Typ)	-	- ($<90\%$)	-	-
III („Pseudo-Resistenz“)	-	+	-	+

Tabelle 1: Tabellarische Darstellung der Typisierung der ASS-Resistenz nach A. A. Weber et al., 2002

Diese Einteilung scheint plausibel, da das TXA₂, als dominanter auto- und parakriner Mediator, quantitativ und qualitativ durch seinen Metaboliten TXB₂ zu bestimmen ist, und somit zur Determinierung der Plättchenaktivität herangezogen werden kann.

Durch die zunehmende Polypharmazie rückt die Medikamenteninteraktion zwischen ASS und NSAIDs zur Begründung des pharmakodynamischen Typs immer mehr in den Vordergrund. Catella-Lawson et al. haben anhand der Interaktion von ASS und Ibuprofen, als unselektiver, reversibler COX-Inhibitor, gezeigt, dass die Komedikation mit NSAIDs Einfluss auf die irreversible Bindung der Acetylsalicylsäure im katalytischen Zentrum zur Folge hat. So haben Studienteilnehmer über sechs Tage ASS kombiniert mit Ibuprofen als tägliche Einmaldosis eingenommen. In zwei Gruppen wurden jeweils ASS zwei Stunden vor Ibuprofen verabreicht bzw. Ibuprofen zwei Stunden vor dem Plättchenhemmer. Nach sechs Tagen war bei den Studienteilnehmern die Serumkonzentration des TXB₂ um 99 % gefallen, die ASS zuerst eingenommen hatten, wohingegen die TXB₂-Konzentration in der zweiten Gruppe, die Ibuprofen vor ASS einnahm, nur um 53 % reduziert werden konnte. Ähnlich beeindruckende Zahlen zeigten sich bei der Aggregationshemmung [17]. Im Ergebnis zeigte diese Arbeit, dass Ibuprofen die Thrombozytenfunktionshemmung weitgehend aufheben kann. Gegenstand der vorliegenden Arbeit war es, das Interaktionspotenzial zwischen ASS und NSAIDs, insbesondere ASS und Metamizol, zu untersuchen.

1.7 Stellenwert des Metamizols unter dem Gesichtspunkt der Interaktion mit ASS

Metamizol, ein nicht-saures und nicht-opioides Analgetikum, gehört zur Gruppe der Pyrazole.

Im niedrigen pH-Bereich des Magensaftes wird es nicht-enzymatisch zu seinem aktiven Metaboliten 4-Methylaminoantipyrin (MAA) hydrolysiert (vgl. Abb. 7). Später erfolgt die hepatische Acetylierung über 4-Aminoantipyrin (AA), das nur eine schwache Wirkung aufweist, zu 4-Acetylaminoantipyrin (AAA) [43, 44]. Die Elimination der Abbauprodukte

erfolgt hauptsächlich renal. Metamizol zeichnet sich durch eine hohe Bioverfügbarkeit (ca. 90 %) bei einer Halbwertszeit (HWZ) von zwei bis drei Stunden aus sowie einer verhältnismäßig geringen Plasmaproteinbindung (ca. 57 %), die die Überwindung der Blut-Hirn-Schranke erleichtert, so dass das MAA auch zentral seine analgetische Wirkung entfalten kann [45]. Seine Wirkung erreicht MAA durch die unselektive und reversible Hemmung der COX, gemessen an der Abnahme der Thromboxan-Konzentration, ungleich des Mechanismus der Acetylsalicylsäure, der sich durch mangelnde antiphlogistische Wirkung und die geringe gastrointestinale Toxizität ausdrückt. Ob neben der Cyclooxygenase-Hemmung weitere Wirkmechanismen beteiligt sind, ist bis heute nicht vollständig geklärt [21].

Pierre et al. vertreten die These, dass MAA mit der Häm-Gruppe der COX interagiert und im ersten Schritt das zugehörige Fe^{3+} zu Fe^{2+} reduziert. Daraus folgt die Reduktion bzw. Inhibition der katalytischen Aktivität im Zentrum der COX. Durch die Reduktion des Eisens entsteht ein Metamizolradikal, das durch seine Alkyl-gruppe stabilisiert wird und mit der Peroxidase reagiert [46].

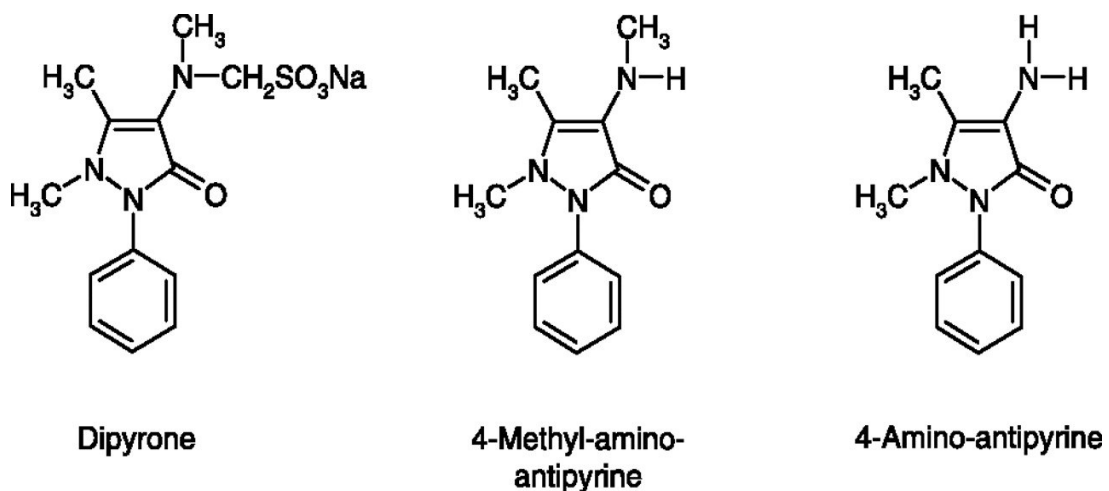


Abb. 7: Strukturformel von Metamizol und seinen Metaboliten

Durch seine potente antipyretische und analgetische Wirkung wird Metamizol vermehrt zur Therapie von hohem Fieber sowie starken Schmerzen in Form von Tumorschmerzen, Koliken und Migräne eingesetzt, auch Dank seiner geringen gastro-intestinalen Nebenwirkungen [47, 48].

Kontraindikationen stellen neben der bekannten Unverträglichkeit auch die hepatische Porphyrrie und der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogensase-Mangel dar [30].

So haben sich die rezeptpflichtigen Gesamtverordnungszahlen nach definierten Tagesdosen in der Bundesrepublik Deutschland seit 2005 verdoppelt (vgl. Abb. 1) [49], obwohl immer wieder kritisch die Nebenwirkung der Agranulozytose und des anaphylaktischen Schocks zu Bedenken gegeben werden [50-52].

Diese führte in Schweden im Jahr 1974 zur Marktrücknahme der Substanz. Drei Jahre später wurde auch in den Vereinigten Staaten von Amerika ein Verbot durchgesetzt, wohingegen in Ländern wie Brasilien, Mexiko, Spanien oder auch Russland Metamizol sogar als *OTC*-Arzneimittel im Handel ist.

Metamizol selbst interagiert mit der thrombozytenhemmenden Wirkung des ASS aufgrund der Blockierung des hydrophoben Substratkanals der COX und folglich der Acetylierungsstelle des ASS, wie durch Hohlfeld et al. gezeigt wurde (vgl. Abb. 8) [21].

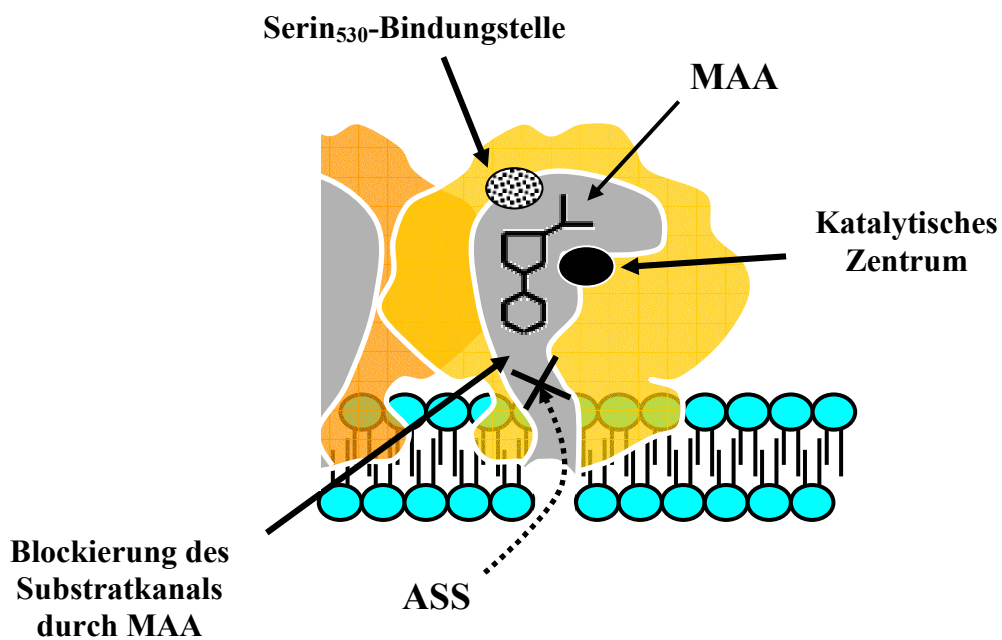


Abb. 8: Schematische Darstellung der Interaktion von MAA mit ASS (modifiziert nach Catella-Lawson et al., 2001)

1.8 Ziele der Dissertation

In der Kardiologie wird ASS leitliniengerecht zur Sekundärprävention eingesetzt. Die vorliegende Untersuchung konzentriert sich auf Patienten, die aufgrund einer KHK oder Koronarintervention eine Routinetherapie mit ASS erhalten und klinisch indiziert Metamizol oder andere NSAID-Analgetika benötigen.

Vor dem Hintergrund Interaktion zwischen Acetylsalicylsäure und COX-hemmenden nicht-opioiden Analgetika sollen innerhalb dieses Kollektivs folgende Fragen erörtert werden:

- Tritt bei hospitalisierten Patienten, die an einer koronaren Herzkrankheit leiden und aus klinischer Indikation Ibuprofen, Diclofenac oder Metamizol verordnet bekommen, eine Interaktion zwischen ASS und den Analgetika auf im Sinne einer ASS- *Non-Response*?
- Lassen sich hierbei quantitative und qualitative Unterschiede zwischen NSAIDs darstellen, gemessen anhand der TXB₂-Konzentration und der Plättchenaggregation (Steigung bzw. Amplitude)?
- Kann trotz bestehender *Non-Response* durch *in vitro* Zugabe von 30 bzw. 100 µM ASS eine vollständige Hemmung der Thrombozytenaktivierung erreicht werden?
- Sind Thrombozyten von ASS-*Non-Respondern*, deren Plättchenfunktion sowohl *in vivo* als auch *in vitro* nicht durch ASS hemmbar ist, gegenüber anderen Wirkmechanismen von Thrombozytenfunktionshemmern sensitiv? Hier sind von

Interesse: Antagonismus am TXA_2 -Rezeptor, Hemmung der TXA_2 -Synthase, GPIIb/IIIa-Rezeptor-Blockade und Hemmung am P_2Y_{12} -Rezeptor beeinflussbar?

2 Material und Methodik

2.1 Studiendesign

Die Untersuchung wurde als offene, prospektive Beobachtungsstudie konzipiert, anhand eines Patientenkollektivs mit stabiler KHK oder nach Katheterintervention im Rahmen der Behandlung einer koronaren Stenosierung in der Kardiologischen Klinik der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Einschlusskriterien waren 1. die Routinetherapie mit ASS (70-300 mg/d) sowie 2. eine klinisch induzierte analgetische und antiphlogistische Gabe nicht-selektiver oder COX-2-selektiver NSAID-Substanzen.

Folgende Ausschlusskriterien wurden vor Beginn der Studie definiert:

- Patientenalter <18 Jahre
- hämodynamische Instabilität
- hämorrhagische Diathese als Komorbidität

Da es sich um eine Beobachtungsstudie handelt, griff diese Untersuchung nicht in den Therapieplan der ausgewählten Patienten ein.

Für den Zeitraum von Februar 2011 bis einschließlich Juni 2012 wurden 99 Patienten von den kardiologischen Stationen ME06, ME08, ME09, MI03 sowie der interdisziplinären Notaufnahmestation MA01 für die Studie akquiriert.

2.2 Patienten

Das Studienprotokoll befindet sich in Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki, und es liegt ein zustimmendes Votum der Ethikkommission der Heinrich-Heine-Universität vor (interne Studiennummer: 3628).

Die Studie wurde registriert unter <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01402804> (Identifikation: NCT01402804).

Alle Patienten bekamen nach einer ausführlichen Aufklärung (mündlich und schriftlich) ausreichend Zeit, Fragen zu stellen und eine unabhängige Entscheidung zu treffen. Jeder Studienteilnehmer gab sein schriftliches Einverständnis vor der Blutgewinnung ab.

An der Studie nahmen insgesamt 99 Patienten teil, die sich in einem Alter zwischen 35 und 97 Jahren befanden bei einem Altersdurchschnitt von $74,45 \pm 12,85$ Jahren sowie einem Median von 78 Jahren.

Darunter kamen 43 (43 %) weibliche Teilnehmer sowie 56 (57 %) männliche Teilnehmer vor.

2.3 Versuchsprotokolle

Die vorliegende Arbeit wurde an der Heinrich-Heine-Universität in Düsseldorf erstellt und ist in vier unterschiedliche Arbeitsabschnitte gegliedert:

1. *In vitro* - Messung der Thrombozytenaggregationshemmung (Detektion von ASS-*Non-Respondern*) in Form einer Konzentrations-Wirkungs-Kurve (KWK) mittels Lichttransmissions-Aggregometrie unter Zugabe von 0, 30, 100 μM ASS sowie 1 μM Terbogrel stimuliert durch 1 mM Arachidonsäure.

2. Bestimmung der TXB₂-Konzentration aus den plättchenfreien Plasmen der einzelnen Aggregationsversuchen per „*Thromboxane B₂ EIA Kit*“ (Cayman Chemical Company, Ann Arbor/Michigan, USA).
3. Messung von im Patientenplasma vorliegenden Konzentrationen der verordneten Analgetika und deren Metaboliten mittels Hochdruckflüssigkeits-Chromatographie (*high pressure liquid chromatography*, HPLC).
4. *in vitro* - Versuchsreihe mit plättchenreichem Plasma (PRP) gesunder Probanden und PAP von ausgewählten KHK-Patienten mit Metamizol-Medikation unter Zugabe verschiedener Konzentrationen Tirofiban bzw. Ticagrelor zur Beschreibung der Hemmbarkeit ASS resistenter Patienten über einen differentiellen Signaltransduktionsweg.

2.4 Material

2.4.1 Blutentnahme

Die Blutentnahme wurde in der Medizinisch-Neurologisch-Radiologischen Klinik (MNR-Klinik) der Heinrich-Heine-Universität in Düsseldorf auf den oben genannten Stationen (vgl. Kapitel 2.1) durchgeführt.

Nach der Abgabe des schriftlichen Einverständnisses wurde den Patienten Vollblut mittels Venenpunktion in zwei Vacutainer® mit je 2,7 ml (Becton, Dickson and Company, Plymouth UK) abgenommen, die zur Antikoagulation das Additiv Citrat (1:10) enthielten. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Patienten ihre morgendliche Medikation in 1-2 Stunden zeitlichem Abstand zur Probengewinnung einnahmen.

Die zur Weiterverarbeitung der Blutproben und deren Auswertung nötigen Patientendaten wurden nach Zustimmung zur Studienteilnahme erhoben und anonymisiert in einer Excel-Tabelle dokumentiert.

Im Anschluss wurden die Blutproben unmittelbar temperatur- und lichtgeschützt ins Institut für Pharmakologie und klinische Pharmakologie der Heinrich-Heine-Universität verbracht und dort direkt weiterverarbeitet.

2.4.2 Plasmagewinnung

Das mit Citrat versetzte Vollblut (3,2 %) wurde zur Vorbereitung auf die Zentrifugation in 2 ml große Cups (Standard Reaktionsgefäß, Eppendorf AG, Hamburg) pipettiert.

Die befüllten Cups wurden unter Raumtemperatur (RT) für 30 Sekunden mit 4.000 U/min. zentrifugiert (EBA 12 Zentrifuge, Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen). Anschließend erfolgte durch Abheben des Überstandes die Gewinnung des plättchenreichen Plasmas (PRP).

Daraufhin folgte eine erneute Zentrifugation des restlichen Vollblutes mit 14.000 U/min. für einen Zeitraum von 5 Minuten.

Das so gewonnene plättchenarme Plasma (PAP) wurde zum Zweck der Plasmaspiegelbestimmung einzelner Wirkstoffe bei -80 °C bzw. zur TXB₂-Bestimmung bei -20 °C eingelagert.

2.5 Substanzen und Lösungen

2.5.1 Substanzen und Herstellerangabe

<u>Artikelbezeichnung</u>	<u>Artikelnummer, Hersteller, Herkunftsort</u>
Acetonitril, C ₂ H ₃ N	(83713, VWR international, Leuven, Belgien)
Adenosin 5'-Diphosphat	(A5285, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland)
Aggrastat [®] , Tirofibanhydrochlorid	(Iroko Cardio Ltd. UK, London, England)
Aspirin i.v. [®] 500 mg, D,L-Lysinacetylsalicylat	(Bayer AG, Leverkusen, Deutschland)
Arachidonsäure (20:4, n-6)	(Oxford Biomedical Research, Oxford/Michigan, USA)
Aqua, dest. (Milli-Q)	(Millipore-Anlage, institutseigend)
Brilique [™] 90mg Filmtabletten, Ticagrelor	(Astra Zeneca AB, Schweden)
Dimethyl-Sulfoxide, DMSO	(D5879, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)
Essigsäure, C ₂ H ₄ O ₂	(0063, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)
Ethanol, EtOH	(0983, Merck, Darmstadt, Deutschland)
Ethylendiamintetraacetat, EDTA	(8418, Merck, Darmstadt, Deutschland)
Indomethacin	(I7378, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)
Kaliumchlorid, KCl	(4936, Merck, Darmstadt, Deutschland)
Kaliumdihydrogenphosphat, KH ₂ PO ₄	(4873, Merck, Darmstadt, Deutschland)
Magnesiumchlorid, MgCl ₂ x 6H ₂ O	(5833, Merck, Darmstadt, Deutschland)
Natrium-Acetat, C ₂ H ₃ NaO ₂	(6268, Merck, Darmstadt, Deutschland)
Natriumchlorid, NaCl	(6404, Merck, Darmstadt, Deutschland)
Natriumhydroxid, NaOH (in Ethanol)	(6498, Merck, Darmstadt, Deutschland)
Natriumdihydrogenphosphat, NaH ₂ PO ₄ x 2H ₂ O	(6346, Merck, Darmstadt, Deutschland)
Natriumhydrogencarbonat, NaHCO ₃	(6329, Merck, Darmstadt, Deutschland)
<i>N</i> -(2-Hydroxyethyl)Piperazin- <i>N'</i> -(2-Ethansulfonsäure), HEPES	(H3375, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)
Terbogrel (BIBV 308 SE)	(121946, Boehringer Ingelheim, Ingelheim, Deutschland)

Tris

(48552, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)

2.5.2 Puffer und Lösungen

ACD (acid-citrate-dextrose):

- 74,8 mM Trisodiumcitrat; MG = 294,10 g/mol -> 2,50 g/100ml
- 65,0 mM Citronensäure x H₂O; MG = 210,14 g/mol -> 1,37 g/100ml
- 111,0 mM Glukose x H₂O; MG = 198,17 g/mol -> 2,20 g/100ml
(ad 100 ml Aqua dest.)

alkoholische NaOH:

- 100 mM NaOH in Ethanol

Arachidonsäure (AA):

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

ASS-Stammlösung (zur *in vitro* Addition nach Verdünnung):

- 0,5 g in 1,0 g Aspirin i.v.[®]; MG = 180 g/mol
- 5,0 mM Stammlösung -> 3,6 mg Aspirin i.v.[®]/2,0 ml TM
- Verdünnungsfaktor: 1:5; 100 µl auf 500 µl Küvetten-Ansatz:
 - 0,5 mM Gebrauchslösung durch 1:10-Verdünnung der Stammlösung zum Erreichen der Endkonzentration von 100 µM ASS im Ansatz
 - 0,15 mM Gebrauchslösung durch 1:3-Verdünnung der 0,5 mM Gebrauchslösung zum Erreichen der Endkonzentration von 30µM ASS im Ansatz

EDTA (Ethyldiamintetraacetat):

- 77,0 mM Na-EDTA; MG = 372,24 g/mol -> 2,866 g/100ml

Indomethacinlösung:

- 50,0 mM gelöst in EtOH abs.; MG = 357,80 g/mol -> 18,0 g/ml

Ticagrelor-Stammlösung:

- 90 mg in 1 Filmtablette Brilique[®]; MG = 522,60 g/mol
- 86,0 mM Stammlösung -> 90 mg gelöst in 2 ml EtOH
- Verdünnungsfaktor: 1:100; 5 µl auf 500 µl Küvetten-Ansatz:
 - 10 mM Gebrauchslösung durch 1:8,6-Verdünnung der Stammlösung zum Erreichen der Endkonzentration von 100 µM Ticagrelor im Ansatz
 - 1 mM Gebrauchslösung durch 1:10-Verdünnung der 10 mM Gebrauchslösung zum Erreichen der Endkonzentration von 10 µM Ticagrelor im Ansatz, (etc.)
 - 30 mM Gebrauchslösung durch 1:2,9-Verdünnung der Stammlösung zum Erreichen der Endkonzentration von 300 µM Ticagrelor im Ansatz
 - 3 mM Gebrauchslösung durch 1:10-Verdünnung der 30 mM Gebrauchslösung zum Erreichen der Endkonzentration von 30 µM Ticagrelor im Ansatz, (etc.)

Tirofiban-Stammlösung:

- Aggrastat[®]-Infusionslösung mit 0,25 mg/ml; MG = 441,00 g/mol
- 570,0 mM Stammlösung
- Verdünnungsfaktor: 1:5; 100 µl auf 500 µl Küvetten-Ansatz:
 - 50 mM Gebrauchslösung durch 1:11,4-Verdünnung der Stammlösung zum Erreichen der Endkonzentration von 10 mM Tirofiban im Ansatz
 - 5 mM Gebrauchslösung durch 1:10-Verdünnung der 50 mM Gebrauchslösung zum Erreichen der Endkonzentration von 1 mM Tirofiban im Ansatz, (etc.)
 - 15 mM Gebrauchslösung durch 1:3-Verdünnung der 50 mM Gebrauchslösung zum Erreichen der Endkonzentration von 3 mM Ticagrelor im Ansatz
 - 1,5 mM Gebrauchslösung durch 1:10-Verdünnung der 15 mM Gebrauchslösung zum Erreichen der Endkonzentration von 300 µM Tirofiban im Ansatz, (etc.)

Terbogrel-Stammlösung:

- 10,0 mM gelöst in DMSO; MG = 405,50 g/mol -> 4,06 mg/ml
- Verdünnungsfaktor: 1:100; 5 µl auf 500 µl Küvetten-Ansatz
 - 0,1 mM Gebrauchslösung durch 1:100-Verdünnung der Stammlösung zum Erreichen der Endkonzentration von 1 µM Terbogrel im Ansatz

Thrombozytenmedium(TM)-Puffer (pH=7,40):

- 134,00 mM NaCl; MG = 58,44 g/mol -> 1,960 g/250ml
- 12,00 mM NaHCO₃; MG = 84,01 g/mol -> 0,252 g/250ml
- 2,90 mM KCl; MG = 74,56 g/mol -> 0,054 g/250ml
- 0,36 mM NaH₂PO₄ x 2H₂O; MG = 137,99 g/mol -> 0,012 g/250ml
- 1,00 mM MgCl₂ x 6H₂O; MG = 203,31 g/mol -> 0,051 g/250ml
- 5,00 mM HEPES; MG = 238,30 g/mol -> 0,289 g/250ml

Tris-Puffer (pH=7,40):

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

2.6 Methodik

2.6.1 Laborparameter

Die erhobenen Blutparameter (Thrombozytenzahl, Hämoglobin, Hämatokrit, Cholesterinwerte, Nierenretentionswerte, Glucose, C-reaktives Protein, Leukozytenzahl, Herzenzyme) wurden im Rahmen der klinischen Routinediagnostik erhoben.

Deren Bestimmung erfolgte im Zentralinstitut für klinische Chemie und Laboratoriumsdiagnostik der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Durch eigene HPLC- und Thromboxan-Messungen erzielte Werte wurden gleich 0 gesetzt, wenn sie unterhalb der Empfindlichkeitsgrenze (LLOQ, *lower limit of quantification*) der jeweiligen Untersuchungsmethoden lagen.

2.6.2 Messung der Thrombozytenfunktion

2.6.2.1 Licht-Transmissions-Aggregometrie nach Born

Zur Messung der Thrombozytenfunktion diente das turbidimetrische Aggregationsverfahren nach Born (1962). Diese etablierte Funktionsdiagnostik beruht auf der Grundlage, dass sich durch Plättchenaggregation die optische Dichte des in der Küvette befindlichen plättchenreichen Plasmas verändert in Abhängigkeit der Thrombozytenanzahl und deren Aktivität. Unter Zugabe der Arachidonsäure als Plättchenstimulus werden die in der Küvette vorhandenen Thrombozyten aktiviert, was zur Aggregatbildung der Plättchen führt verbunden mit der Veränderung der Lichtdurchlässigkeit der Suspension, die photometrisch durch das Zweikanalaggregometer (Labor APACT-Aggregometer, Hamburg, Deutschland) kontinuierlich registriert wird. Dabei ist diese Suspension in ständig gleichmäßiger Bewegung mittels magnetischen Rührmechanismus (1.200 U/min).

Der Grad der gesteigerten Lichttransmission wird als Funktion der Zeit in Form einer Aggregationskurve mittels Zweikanalschreiber (Packard-Zweikanalschreiber „model 621“, Zaventem, Belgien) graphisch dargestellt.

Zur Eichung des Aggregometers wird vor jeder Messung die minimal (0 %) und maximal (100 %) mögliche Transmission definiert.

Anhand der Vorlage von PRP und PAP in die Eichküvetten ergibt sich daraus die graphische Wiedergabe der maximalen bzw. minimalen Aggregation.

2.6.2.2 Durchführung der Thrombozytenaggregationsmessung

Im Anschluss an die Eichung des Aggregometers (vgl. 2.6.2.1) wird ein Gesamtvolumen von 500 µl in eine Küvette vorgelegt. Dieses setzt sich aus 100 µl TM sowie 400 µl PRP des zu untersuchenden Patienten zusammen. In weitere Küvetten werden das TM durch 100 µl einer 30 µM bzw. 100 µM ASS-Lösung ersetzt. Die Molarität bezieht sich auf die Endkonzentration im Ansatz.

Zum Beweis der ASS-unabhängigen Hemmbarkeit der Plättchen wird abschließend ein Ansatz vorbereitet, indem neben 100 µl TM auch 5 µl einer 1 µM Terbogrel, einem kombinierten Thromboxanrezeptorantagonist und Thromboxansynthasehemmstoff, vorgelegt werden. Damit soll die Abhängigkeit der Plättchenaggregation von Thromboxan bestätigt werden.

Sobald 400 µl PRP hinzugegeben wurden, wird der Ansatz für 4 Minuten bei 37 °C im Heizblock des Aggregometers inkubiert. Anschließend wird die Küvette für weitere 2 Minuten im Lichtkanal positioniert, indem die Suspension durch den Rührmechanismus gleichmäßig in Bewegung versetzt wird (1.200 U/min, 37 °C). Nach insgesamt 6 Minuten werden 10 µl der 1 mM Arachidonsäure in die Küvette pipettiert und für weitere 4 Minuten die Aggregationskurve mittels Zweikanalschreiber dokumentiert. Dieser zeichnet die Kurve mit einem Vorschub von 3 cm/min auf.

Zur Beendigung des Aggregationsversuches wird nach 10 Minuten dem Ansatz 0,4 mM Indomethacinlösung sowie 4,5 mM EDTA (jeweils der Endkonzentration entsprechend) hinzugefügt. Die Ansätze werden abschließend zentrifugiert (vgl. 2.4.2), und die Überstände bis zur Bestimmung der TXB₂-Konzentration bei -20 °C eingefroren.

2.6.2.3 Auswertung der Aggregationskurven

Die Auswertung der Aggregationskurven erfolgt durch die Messung der absoluten Amplitude [cm], der relativen Amplitude in Bezug auf die durch die Eichung bestimmte maximale Amplitude [%] sowie der Tangentensteigung [cm/min].

Wenn nach 6 Minuten Inkubation und stetiger Bewegung die 1 mM Arachidonsäure dem Ansatz hinzu gegeben wird, kann eine kurzfristige Abnahme der Lichttransmission in Form des so genannten „shape change“ beobachtet werden (vgl. Abb. 9). Dies geschieht durch Abkugeln der sonst flachen Thrombozyten mit anschließender Ausbildung von Pseudopodien als Reaktion auf den Stimulus. Anschließend flacht die Aggregationskurve ab bis zum Erreichen der Plateauphase, die gleichbedeutend mit der maximal möglichen Aggregation bzw. der maximalen Zunahme der Lichttransmission ist. Dies ereignet sich durch die Bildung von Fibrinbrücken zwischen den einzelnen Thrombozyten, so dass es zur Aggregatausbildung kommt. Die Steigungstangente wurde im Anschluss an die Kurvenaufzeichnung an die maximale Steigung der Aggregationskurve angelegt und eingezeichnet (vgl. Abb. 9). Unter Zuhilfenahme des Steigungsdreiecks kann nun bei Berücksichtigung des Vorschubs von 3 cm/min die Steigung in [cm/min] ermittelt werden. Abbildung 10 zeigt als Beispiel eine Aggregationskurve einer Versuchsdurchführung mit PRP eines Patienten, bei dem die Thrombozyten *in vitro* oder *in vivo* nicht durch ASS hemmbar sind. Ebenfalls charakteristisch für diese Aggregationskurve sind gesunde Probanden, die nicht mit ASS behandelt werden.

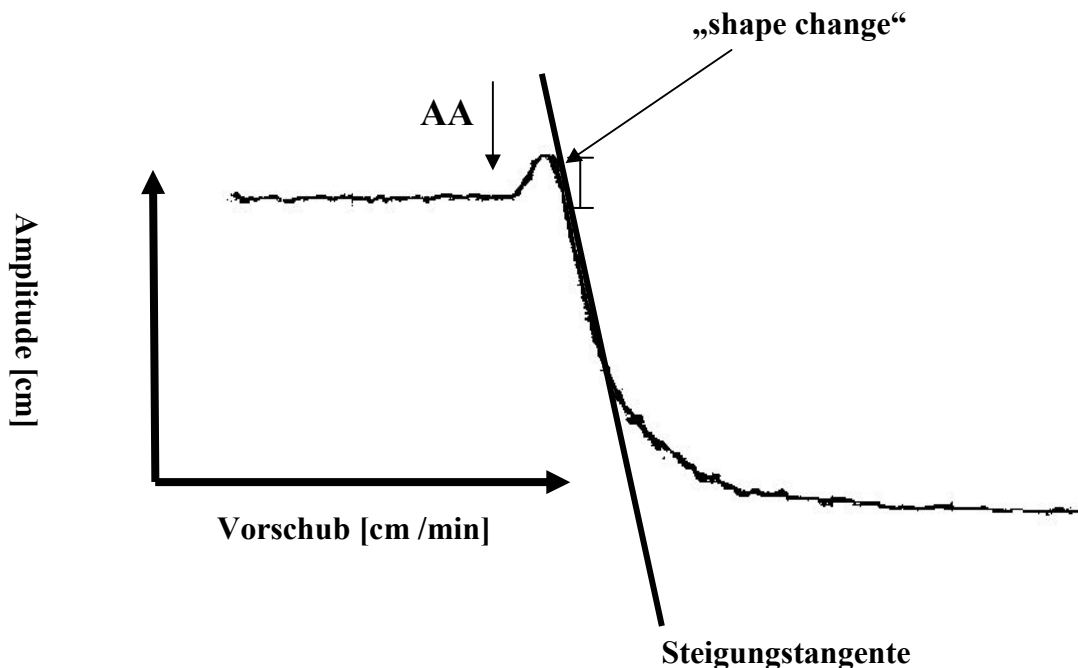


Abb. 9: Arachidonsäure induzierte irreversible Aggregation

In Abbildung 10 wird beispielhaft ein Aggregationsversuch dargestellt, in dem nach Zusatz von Arachidonsäure mit anschließendem „shape change“ in Folge der fehlenden Thrombozytenaggregation keine Steigung registriert wird.

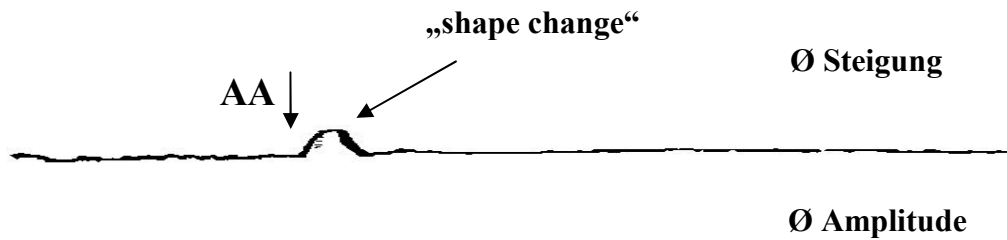


Abb. 10: Keine Arachidonsäure induzierte Aggregation

2.6.3 Bestimmung der TXB₂-Konzentration

Thromboxan A₂ (TXA₂), welches im Aktivierungsprozess der Thrombozyten eine zentrale Stellung einnimmt, wird innerhalb ca. 1 Minute nicht-enzymatisch zum stabilen Thromboxan B₂ (TXB₂) hydrolysiert. TXB₂ wiederum wird in einer Halbwertszeit von 5-7 Minuten zu dem wasserlöslichen und damit über die Niere ausscheidbaren Metaboliten 11-Dehydro-TXB₂ verstoffwechselt.

Die Messung der TXB₂-Konzentrationen der einzelnen Studienteilnehmer sollte zur Quantifizierung der Aggregationsfähigkeit der Thrombozyten dienen.

Diese quantitative Bestimmung der TXB₂-Konzentration wird durch ein Enzymimmunoassay (EIA) durchgeführt basierend auf dem kompetitiven Prinzip. Dazu wird das ELISA-Kit „Thromboxane B₂ EIA Kit“ (Artikel-Nr.: 519031, Cayman Chemical Company, Ann Arbor/Michigan, USA) verwendet.

Hierbei konkurriert das TXB₂ aus den zentrifugierten Humanplasmaproben mit einem hinzugegebenen Tracer, einem TXB₂-Acetylcholinesterase-Konjugat, um eine limitierte Anzahl von Bindungsmöglichkeiten an das TXB₂-spezifische Kaninchen-Antiserum. Dieses wiederum bindet an einen immobilisierten Maus-Antikörper (IgG), der sich in den 96 unabhängigen Reaktionsräumen der Mikrotiterplatten befindet.

Die Konzentration des Tracers ist stets konstant, während die Menge des TXB₂ aus den Plasmaproben variiert, so dass die mit dem Antiserum bindende Menge des Tracers umgekehrt proportional zur TXB₂-Konzentration ist. Anschließend werden alle nicht gebundenen Substanzen ausgewaschen.

Daraufhin wird Ellmanns Reagenz, bestehend aus 5,5'-Dithio-bis-(-2-nitrobenzoesäure) und Acetylthiocholin, hinzugegeben.

In Anwesenheit der Acetylcholinesterase des Tracers wird das Acetylthiocholin in Acetat und Thiocholin gespalten und reagiert mit der 5,5'-Dithio-bis-(-2-nitrobenzoesäure) zur gelblich gefärbten 5-Thio-2-Nitrobenzoesäure, deren Extinktion bei 412 nm photometrisch gemessen wird.

Die Extinktion ist umgekehrt proportional zur TXB₂-Konzentration in der Plasmaprobe. Alle erzielten Werte, die unter die Empfindlichkeitsgrenze (LLOQ, *lower limit of quantification*) fallen, werden gleich 0 gesetzt.

2.6.4 Identifikation und Quantifikation der Analgetika im Patientenplasma

2.6.4.1 Analyseverfahren der Analgetika mittels HPLC

Zur Bestimmung der sich im vorab proteinbefreiten Patientenplasma befindlichen Metabolite von Metamizol, Ibuprofen und Diclofenac wurde das Verfahren der Hochdruckflüssigkeitschromatographie (*high pressure liquid chromatography*, HPLC) als analytische Methode aus der Chemie herangezogen. Sie diene zum einen der Bestätigung der regelmäßigen Einnahme des entsprechenden Wirkstoffes, zum anderen zur Feststellung eines Zusammenhangs zwischen Wirkstoffkonzentration und Aggregationsmaximum. Für die vorliegende Arbeit sind zur Identifikation und Quantifizierung der Wirkstoffe bzw. deren Metabolite zwei verschiedene Trennsäulen verwendet worden.

Als stationäre (= ruhende) Phase zur quantitativen Bestimmung der Metamizol-Metabolite dient eine Trennsäule (EC 125/4 Nucleodur C18 Pyramid, Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland) mit einer Säulendimension von 125 x 4 mm sowie einer Porengröße von 3 µm.

Der dazugehörige Eluent (= mobile Phase) setzt sich aus 87 % Na-Acetat (30 mM) sowie 13 % Acetonitril bei einem pH-Wert von 5,6 zusammen, der durch Zugabe von Essigsäure erreicht wird.

Die zu untersuchende proteinfreie Plasmaprobe wird samt der mobilen Phase mit einem Flow von 0,5 ml/min bei einem maximalen Druck von 200 mbar durch die Säule gepumpt (Merck-Hitachi L-6200 Intelligent HPLC Pump, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland).

Dabei ist darauf zu achten, dass mindestens das 5-fache Schleifenvolumen in die Säule injiziert wird. Hier beträgt das Schleifenvolumen 20 µl, was einem Injektionsvolumen von 100 µl des Plasma-Eluenten-Gemisches entspricht.

Zum Nachweis der stoffcharakterisierenden Retentionszeiten im Vergleich mit den vorher analysierten Standard wird ein UV-Detektor mit einer Wellenlänge von 257 nm verwendet (Merck-Hitachi L-7420 UV-VIS Detector, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland).

Zur Analyse der NSAID-Substanzen dient eine stationäre Phase mit einer Länge von 250 mm bei einem Durchmesser von 4,6 mm sowie einer Porengröße von 5 µm (EC 250/4,6 Nucleodur C18 Gravity, Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland).

Die mobile Phase besteht zu 55 % aus Kaliumdihydrogenphosphat (20 mM) und zu 45 % aus Acetonitril bei einem pH-Wert von 2,5, der durch Hinzugabe von Phosphorsäure eingestellt wird.

Das Plasma-Eluenten-Gemisch wird mit einem Flow von 1,0 ml/min bei einem Druck von 300 mbar durch die Säule gepumpt (Merck-Hitachi Lachrom L-7100 HPLC Pump, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland). Auch hier wird mit 100 µl das 5-fache Schleifenvolumen injiziert. Der hierbei verwendete UV-Detektor (SpectraSYSTEM™ UV1000 Detector, Thermo Electron Cooperation, Dreieich, Deutschland) arbeitet mit einer Wellenlänge von 230 nm.

Die für das Analyseverfahren eingesetzten Lösungen müssen HPLC geeignet sein und bedürfen somit höchster Reinheitsgarde.

2.6.4.2 Identifikation und Quantifizierung der Substanzen im Patientenplasma

Die detektierten Signale mit den Informationen zu den eluierten Stoffen werden in Form einer Gauß'schen Kurve (= Peak) graphisch dargestellt.

In einem Chromatogramm werden diese Peaks im zeitlichen Verlauf auf der x-Achse aufgezeichnet. Der zu einem Peak gehörende Zeitpunkt wird als Retentionszeit eines Stoffes bezeichnet und dient zu seiner Identifikation.

Der Beginn der Zeitmessung wird mit dem Einspritzen der zu untersuchenden Probe gleichgesetzt. Der Zeitpunkt des Peakmaximums (ablesbar auf der y-Achse) beschreibt die stoffcharakterisierende Retentionszeit.

Die Fläche des Peaks (*area under the curve*, AUC) ist proportional zur Stoffkonzentration, so dass bei bekannter unterer Quantifizierungsgrenze (*lower limit of quantification*, LLOQ), welche die niedrigste analysierbare Stoffmenge beschreibt, die tatsächliche Konzentration des Analgetikums bzw. seines Metaboliten bestimmt werden kann.

Die Berechnung der Fläche unter dem Peak wird durch das Computer gestützte Programm CHROMuLAN (PIKRONs.r.o., Prag, Tschechische Republik) ausgeführt. Mittels vorab bestimmter Eichgeraden findet letztendlich die Errechnung der Stoffkonzentrationen durch das Computerprogramm Microsoft Office Excel 2003 statt. In dieser Arbeit liegen die erzielten Werte mindestens fünffach über der unteren Nachweisgrenze.

Die folgende Abbildung (Abb. 11) zeigt beispielhaft ein Chromatogramm, in dem die Peaks mit den charakterisierenden Retentionszeiten abgebildet werden. Auf der Abszisse des Chromatogramm wird der zeitliche Verlauf t in [min.] dargestellt, während auf der Ordinate die Stoff charakterisierenden Ausschläge als „Volt per Absorbance Unit“ [V/AU] erfasst werden.

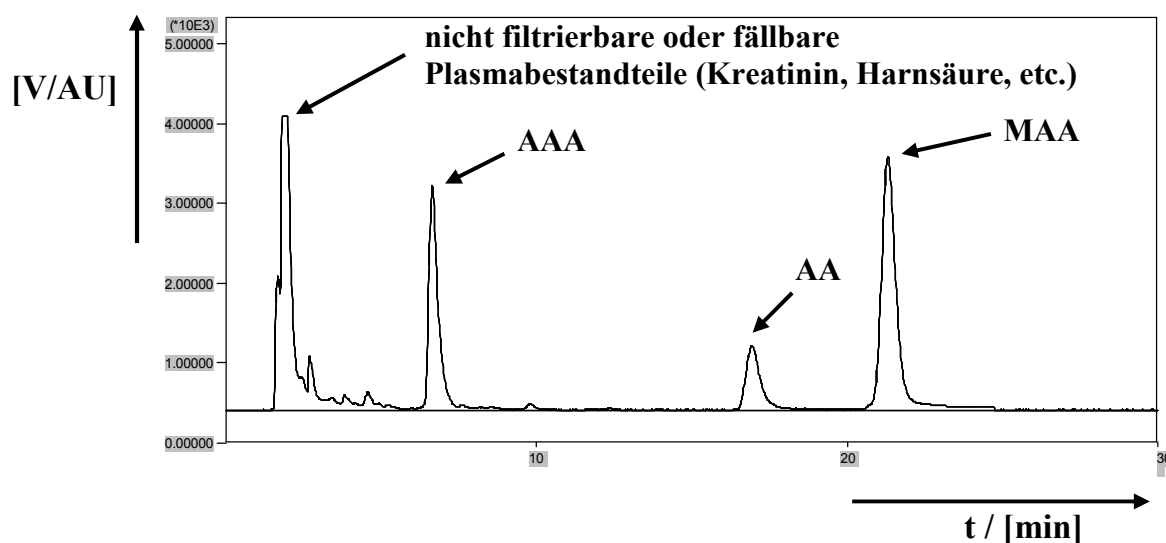


Abb. 11: Beispiel für ein Chromatogramm, erstellt durch das Programm CHROMuLAN

Gemessen werden stets nur die frei im Plasma vorliegenden Wirkstoffe bzw. deren Metabolite. Dafür wird das Humanplasma vor seiner Eingabe in die Trennsäule filtriert, um proteingebundene von den freien Bestandteilen zu trennen.

Definierte Plasmabestandteile wie das Kreatinin oder die Harnsäure sind mit den institutseigenen Methoden derzeit nicht filtrier- bzw. fällbar und zeigen sich so als früher Peak im Chromatogramm.

Die Retentionszeiten der Plasmametabolite lagen im Rahmen der Messungen für Acetylaminoantipyryn zwischen 6,30 und 6,50 Minuten, für Aminoantipyryn zwischen 15,80 und 16,60 Minuten sowie für Methylaminoantipyryn zwischen 20,50 und 21,20 Minuten.

2.7 Darstellung unterschiedlicher Signaltransduktionswege zur Hemmbarkeit der Thrombozytenfunktion

Eine ergänzende Versuchsreihe diente zur Kontrolle der Hemmbarkeit der Thrombozytenfunktion trotz möglich bestehender *ASS-Non-Response* über zwei alternative Signaltransduktionswege.

Dazu wurden mehrfache Thrombozytenaggregationsmessungen mit PRP von 5 gesunden Probanden unter PAP-Zugabe von 15 KHK-Patienten mit stark variierenden Metamizol-Plasmaspiegeln (zwischen 13,24 μM und 206,83 μM) sowie von 5 Patienten der Kontrollgruppe durchgeführt.

Ergänzt wurden die Versuchsansätze um die Thrombozytenaggregationshemmer ASS, Tirofiban und Ticagrelor.

Beim synthetischen Wirkstoff Tirofiban handelt es sich um einen kompetitiven Antagonist des Glycoprotein (GP) IIb/IIIa, das die Bindung zwischen Thrombozyten über Fibrinogenbrücken unabhängig von ihrem Aktivierungszustand blockiert. Im klinischen Alltag wird es als Infusionslösung zur Therapie eines akuten Koronarsyndroms, insbesondere im Rahmen einer perkutanen Koronarintervention, verabreicht.

Ticagrelor ist ein Inhibitor des P_2Y_{12} -Rezeptors, was zur mangelnden Aktivierung der Thrombozyten durch ADP führt. Indiziert ist es zur Behandlung des akuten Koronarsyndroms in Kombination mit ASS. Sein Vorteil gegenüber anderen P_2Y_{12} -Rezeptorantagonisten wie Clopidogrel oder Prasugrel ist der direkte Wirkungseintritt ohne vorherige Metabolisierung.

2.7.1 Blutentnahme von gesunden Probanden

Für diese Versuchsreihe wurde Blut gesunder Probanden verwendet, die nach Aufklärung schriftlich ihr Einverständnis Vollblut zu spenden, erklärt hatten. Dabei ist darauf geachtet worden, dass die Probanden zum Zeitpunkt der Blutabnahme keiner medikamentösen Therapie bedürfen sowie an keinen Erkrankungen insbesondere Hämorrhagien leiden. Mögliche thrombozytäre Fehlfunktionen, die die Aggregation hätten beeinflussen können, sollten damit von vornherein ausgeschlossen werden.

Die Blutabnahme (ca. 20 ml) wurde mittels Venenpunktion durch einen institutangehörigen approbierten Arzt vorgenommen. Dafür wurde eine 20 ml große Spritze (Braun injekt[®] solo, B.Braun Melsungen AG, Deutschland), befüllt mit ACD (1:10) zur Antikoagulation, verwendet.

2.7.2 Aufbereitung des thrombozytenreichen Plasmas von Probanden

Die Blutprobe wurde direkt nach Abnahme auf mehrere Falcon-Röhrchen (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland) verteilt und für 10 Minuten mit 1.200 U/min bei Raumtemperatur zentrifugiert (Minifuge RF, Heraeus Sepatech GmbH, Osterode, Deutschland). Im Anschluss wurde das PRP abgehoben und in 2 ml große Cups (Standard Reaktionsgefäß, Eppendorf AG, Hamburg) separiert.

Das restliche Vollblut wurde erneut für 10 Minuten mit 3.000 U/min zur PAP-Gewinnung zentrifugiert.

Direkt daran anschließend wurde das bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ eingefrorene Humanplasma von ausgewählten KHK-Patienten aufgetaut (Thermomixer 5436, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland).

2.7.3 Thrombozytenaggregationsmessung

Die Durchführung der Thrombozytenaggregationsmessung sowie deren Auswertung fanden entsprechend des Standard-Protokolls (vgl. 2.6.2) statt.

Da Ticagrelor nur in Tablettenform vorliegt, sind vorab Lösungsversuche mit verschiedenen Lösungsmitteln (Aqua dest., DMSO, Ethanol) durchgeführt worden, mit dem Ergebnis, dass die nahezu vollständige Lösung des Wirkstoffes in Ethanol erreicht werden konnte. Tirofiban stand für die Versuchsreihe als Infusionslösung zur Verfügung.

Zu Beginn der Aggregationsversuche sind unter Berücksichtigung der Molekulargewichte sowie der Verdünnungsfaktoren im Hinblick auf die Endkonzentration im Küvetten-Ansatz die Stammlösungen errechnet und angesetzt worden.

Daraufhin wurden Verdünnungsreihen von 0 μM bis 10 μM für Ticagrelor (gelöst in EtOH) und von 0 μM bis 300 μM für Tirofiban (als Infusionslösung Tirofibanhydrochlorid) angefertigt (vgl. 2.5.2).

Des Weiteren wurde in einer Konzentrations-Wirkungs-Kurve ausgearbeitet, bis zu welcher Konzentration *in vitro* hinzugegebenes MAA die Thrombozytenaggregation der gesunden Probanden ohne Addition weiterer Thrombozytenaggregationshemmern blockiert, und welche Konzentration nicht mehr ausreicht, um die Aggregatbildung zu verhindern. Genau diese MAA-Stoffmenge ist als Grundlage zur Verdünnung des Patientenplasmas herangezogen worden. Bei den Thrombozyten der gesunden Probanden lag diese Grenze durchweg bei 3 μM MAA. Hiermit sollte eine Vergleichbarkeit der einzelnen Aggregationsversuche, dargestellt durch die Aggregationsmaxima, erreicht werden, im Hinblick auf die Konkurrenz zwischen ASS und Metamizol um die Bindungsstelle im hydrophoben Kanal der COX.

Das jeweilige dem Ansatz hinzugegebene Plasmavolumen der KHK-Patienten wurde anhand seiner Therapie bedingten MAA-Konzentration in Bezug auf das Gesamtvolumen des Ansatzes errechnet, so dass sich in diesem 3 μM MAA befand.

Zur Verdeutlichung ist nachfolgend ein Berechnungsbeispiel aufgeführt:

Patient X	[MAA] = 50 μM
400 μl Patienten-PAP	[MAA] = 50 μM
400 μl Pat.-PAP + 100 μl TM bzw. ASS	[MAA] = 40 μM
30 μl Pat.-PAP auf 500 μl Ansatz-Volumen	[MAA] = 3 μM

Als Stimulanzen zum Start der Aggregation dienten in Gegenwart des Ticagrelors 10 μM ADP bzw. 1 mM Arachidonsäure bei Anwesenheit von Tirofiban.

2.8 Statistik

Die statistische Auswertung der vorliegenden Studie erfolgte mit den Programmen Microsoft Office Excel 2003, Sigma Plot 11.0 sowie SPSS 18.0.

Im Fall der Normalverteilung wurden zur deskriptiven Statistik die erhobenen Daten als Mittelwerte \pm dem Standardfehler des Mittelwertes (SEM) von der Anzahl (n) der Versuche angegeben.

Bei fehlender Normalverteilung wurden die metrischen Daten durch den Median sowie dem minimalen und maximalen Wert beschrieben.

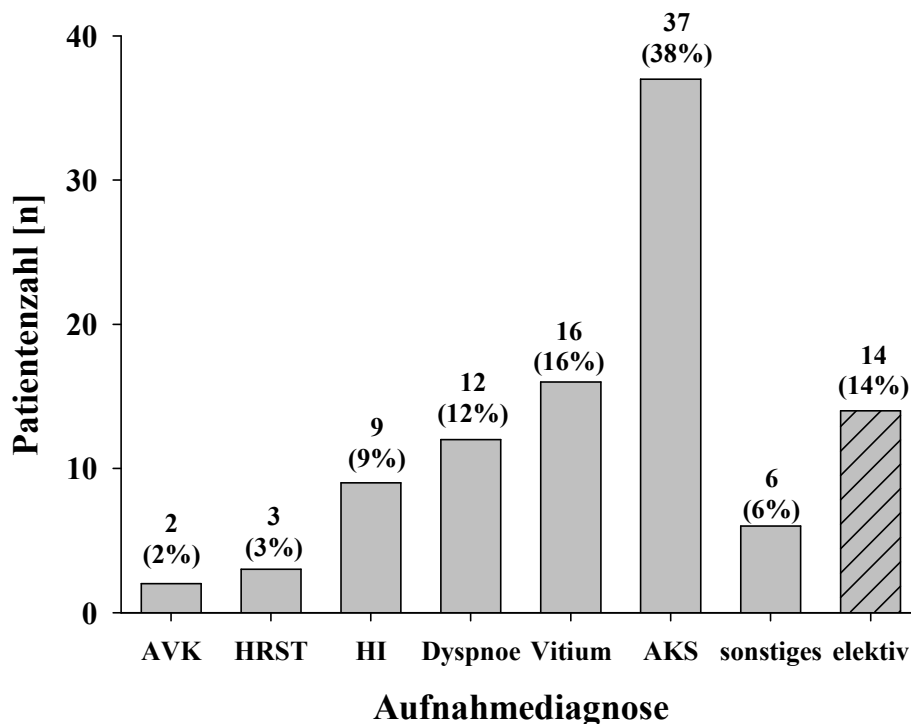
Die Darstellung statistischer Unterschiede zweier Parameter bezogen auf ein Merkmal wurde mit dem Student T-Test durchgeführt. Der herausgearbeitete Unterschied dieser Parameter galt als signifikant, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit unter 5 % liegt ($p < 0,05$). Es wurde ein Konfidenzintervall von 95 % festgesetzt.

3 Ergebnisse

3.1 Patientenkollektiv

Die in die vorliegende Arbeit eingehenden 99 stationär behandelten Patienten wurden mit unterschiedlichen Verdachtsdiagnosen in die Notaufnahme „MA 01“ des Universitätsklinikum Düsseldorf (UKD) eingewiesen.

Jede dritte stationäre Aufnahme erfolgte mit dem Symptomkomplex „Akutes Koronarsyndrom“ (37 %). Weitere häufige Aufnahmen waren „Herzklappenvitium“ (16 %) und „akute Atemnot“ (12 %). Abbildung 12 gibt einen Überblick über die Diagnosen.



AVK= arterielle Verschlusskrankheit, n.n.b.
HRST= Herzrhythmusstörungen, n.n.b.
HI= Herzinsuffizienz, n.n.b.
AKS= Akutes Koronar-Syndrom

Abb. 12: Verteilung der Diagnosen bei stationärer Aufnahme über die Notaufnahme MA01 des UKD

Daran schlossen sich die Verdachtsdiagnosen der hier nicht detailliert charakterisierten „Herzinsuffizienz“ (9 %), der „Herzrhythmusstörungen“ (3 %) und der „arteriellen Verschlusskrankheit“ (2 %) an. Zu den sonstigen Aufnahmediagnosen (6 %) zählte unter anderem die hier nicht näher spezifizierte „Kardiomyopathie“ und das „persistierende Foramen ovale“.

Bei 14 % der Patienten erfolgte eine Aufnahme elektiv. Der überwiegende Grund für die Aufnahme war eine geplante Darstellung der Herzkranzgefäße zur Bestimmung des aktuellen Stenosegrades im Rahmen einer Herzkatheteruntersuchung.

Hinsichtlich der Akquirierung des Patientenkollektivs wurde darauf geachtet, dass gemäß den Einschlusskriterien alle Patienten an einer Koronaren Herzkrankheit (KHK) litten. Alle

Patienten wiesen eine diagnostizierte KHK mit unterschiedlichen Schweregraden auf. Dies ist in Abbildung 13 dargestellt.

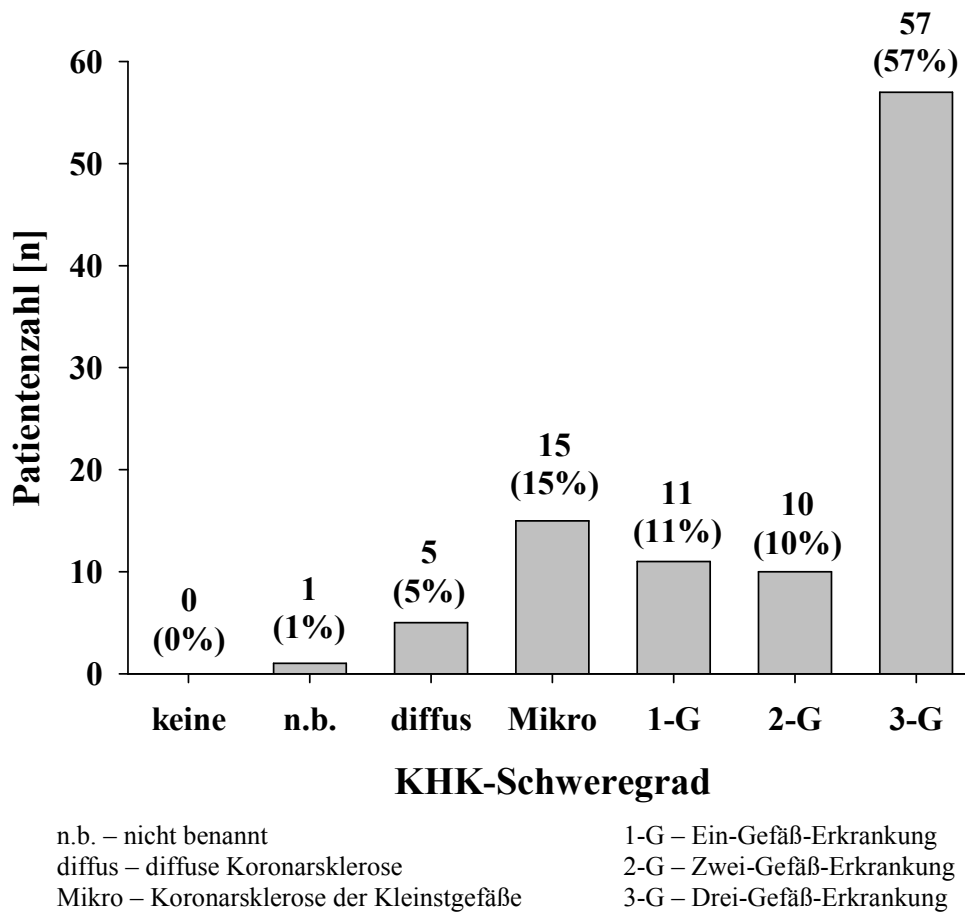


Abb. 13: Einteilung des Patientenkollektivs nach dem Schweregrad der Koronaren Herzkrankheit (KHK)

Mehr als die Hälfte der Patienten (57 %) zeigten relevante Stenosen von > 70 % in allen drei Hauptgefäßen: der rechten Herzkranzarterie (*Arteria coronaria dextra*, RCA) und der linken Herzkranzarterie, die sich nach dem Hauptstamm in zwei Äste teilt, den *Ramus interventricularis anterior* (RIVA) sowie dem *Ramus circumflexus* (RCX). 10 % der Patienten zeigten in zwei Arterien eine Gefäßquerschnittabnahme auf < 30 % und 11 % des Kollektivs haben immerhin noch eine höhergradige Stenose in einem der Hauptversorgungsgefäße. 20 % der Patienten besaßen diffuse Plaqueablagerungen bzw. Stenosierungen der Herzkranzgefäße < 70 % mit jedoch deutlich ausgeprägtem Symptomkomplex im Sinne einer KHK.

Zwei Drittel des Probandenkollektivs (67 %) waren bei Blutentnahme post-interventionell, während 21 % auf eine perkutane transluminale Koronarangioplastie (PTCA) vorbereitet wurden. In 12 % der Fälle war keine Katheterintervention vorgesehen gewesen.

46 % der Patienten waren durch ein neu aufgetretenes Akutereignis mit dem Notarzt in die Notaufnahme eingeliefert worden, wohingegen 30 % im Rahmen des vorgegebenen Zeitfensters mit diagnostiziertem interventionsbedürftigem Ereignis vorstellig wurden. Die weiteren Patienten wurden elektiv zur Katheteruntersuchung aufgenommen bzw. ohne PTCA behandelt.

Bei vielen Patienten bestand eine Einschränkung der linksventrikulären Pumpfunktion (LVF) als Folge der KHK. Diese wird anhand der Ejektionsfraktion (EF) in Tabelle 2 wie folgt beschrieben [53]:

Linksventrikuläre Funktion (LVF)	Ejektionsfraktion (EF)
normal	> 55 %
leichtgradig eingeschränkt	45 – 54 %
mittelgradig eingeschränkt	30 – 44 %
hochgradig eingeschränkt	< 30 %

Tabelle 2: klinische Einteilung der Linksventrikulären Funktion durch Messung der Ejektionsfraktion mittels Echokardiographie

In 44 % der Untersuchungen war die linksventrikuläre Pumpfunktion normal, während jeder vierte Patient (25 %) eine leichte Reduktion der linksventrikulären Funktion aufwies. Fast jeder dritte Patient (31 %) litt zum Zeitpunkt der Untersuchung an einer mittel- bis hochgradig eingeschränkten Pumpfunktion (vgl. Abb. 14).

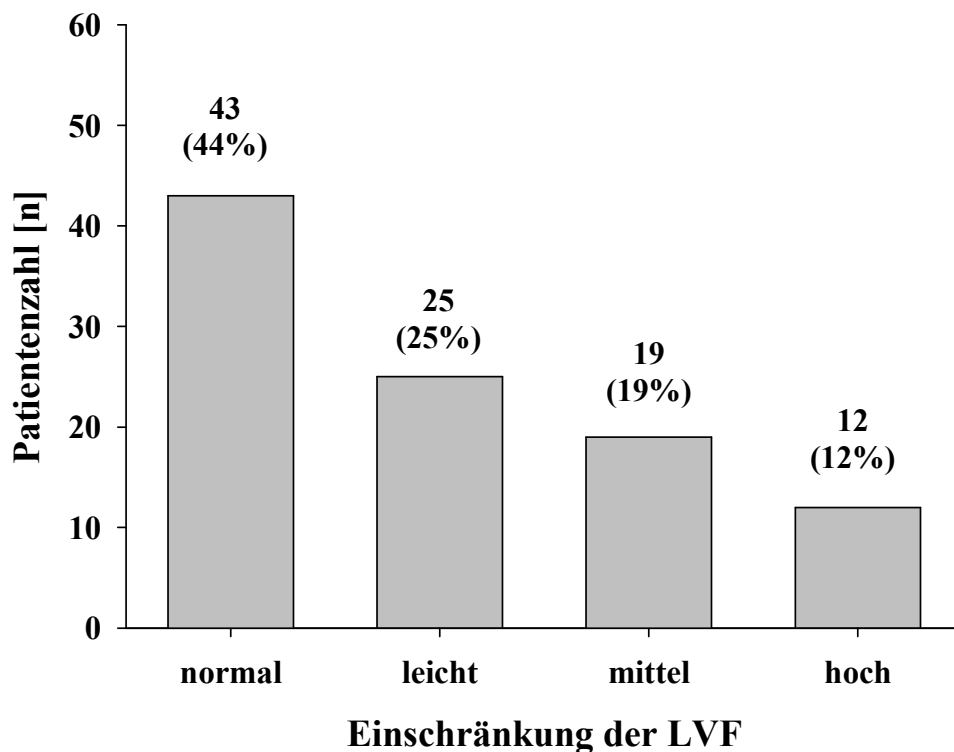


Abb. 14: Einschränkung der Pumpfunktion des linken Ventrikels zur Beurteilung einer Herzinsuffizienz

Das Hauptsymptom der Atemnot (Dyspnoe) tritt im Rahmen einer Herzinsuffizienz als Folge der koronaren Herzkrankheit auf, welches je nach körperlicher Konstitution und Stadium bei Belastung oder gar schon in Ruhe geschildert wird.

Zur Beurteilung einer Progression der Herzinsuffizienz wurde gemäß der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie (DGK) die NYHA-Klassifikation (*New York Heart Association*) herangezogen.

71 % der Patienten befanden sich im NYHA-Stadium II bis III (vgl. Abb. 15). In 15 % der Fälle verspürten die Patienten keine Einschränkung ihrer Leistungsfähigkeit entsprechend dem Stadium I.

Dagegen bestand bei 10 % eine schwerste Symptomatik selbst in Ruhephasen (NYHA IV).

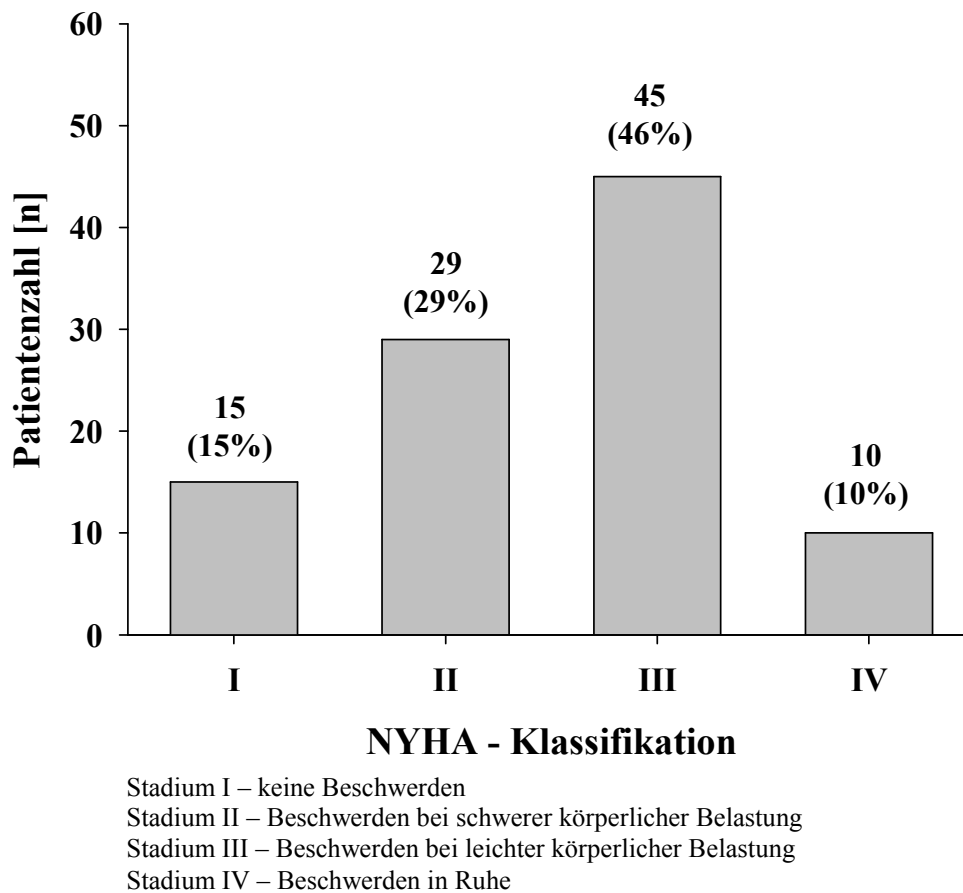
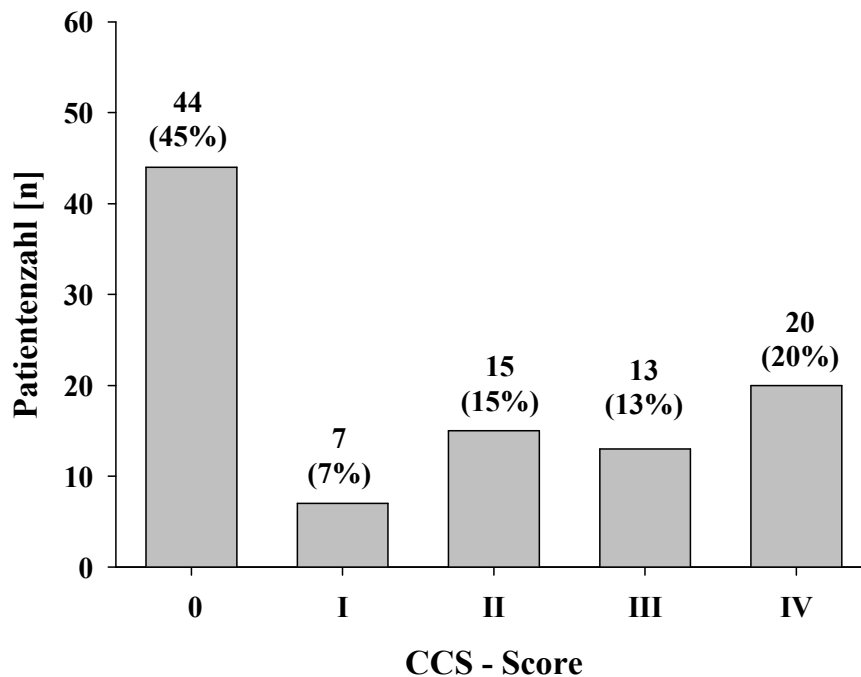


Abb. 15: Stadieneinteilung der Herzinsuffizienz des Studienkollektivs anhand der NYHA-Klassifikation

Neben dem Hauptsymptom „Dyspnoe“ diente zur Einschätzung der Progression der KHK auch das Auftreten von pektanginösen Beschwerden in Form der Angina pectoris (AP). Zur klinischen Einordnung der stabilen Angina pectoris dient der CCS – Score (*Canadian Cardiovascular Society*) [54].

Hierbei gaben 45 % der Patienten an, während ihres stationären Aufenthaltes keine thorakalen Beschwerden im Sinne einer stummen Ischämie (CCS 0) zu verspüren. Die fortgeschrittenen Stadien (I-IV), in denen AP-Beschwerden bei starker körperlicher Anstrengung bis hin zur AP-Symptomatik bei geringster Belastung oder in Ruhe auftraten, sind von den Patienten in 7 % bis 20 % der Fälle angegeben worden. Herauszuheben ist, dass jeder fünfte Patient pektanginöse Beschwerden schon bei geringer Belastung im Sinne des Stadium IV beschrieb (vgl. Abb. 16).



CCS 0 – stumme Ischämie
 CCS I – keine Angina pectoris bei normaler körperlicher Belastung
 CCS II – geringe Beeinträchtigung bei normaler körperlicher Belastung durch AP
 CCS III – erhebliche Beeinträchtigung bei normaler körperlicher Belastung durch AP
 CCS IV – Angina pectoris bei geringer körperlicher Belastung (Ruheschmerz)

Abb. 16: Klassifikation der stabilen Angina pectoris am Patientenkollektiv durch den CCS - Score

3.1.1 Gruppierung des Patientenkollektivs nach Medikation

Alle 99 Patienten erhielten eine tägliche Basismedikation mit ASS in einer Dosierung von 100 mg/Tag. Als Applikationsart diente ausschließlich die Tablettenform. 96 % des Patientenkollektivs nahmen ASS morgens, 4 % mittags.

Additiv erhielten 72 % der Studienteilnehmer zum Zeitpunkt der Blutabnahme den P₂Y₁₂-Rezeptor-Antagonisten Clopidogrel.

Die Bildung der Patientengruppen geschah anhand der Komedikation mit Metamizol, Ibuprofen, Diclofenac sowie Paracetamol. Zudem wurde eine weitere Gruppe eingerichtet, in der Patienten mit Mehrfachmedikation der oben genannten Wirkstoffe zusammengefasst wurden. Des Weiteren wurde eine Kontrollgruppe etabliert, bei der die Medikation mit den vorab genannten NSAIDs sicher ausgeschlossen werden konnte.

Die Metamizol-Gruppe umfasste 36 Patienten im Alter von 51 bis 97 Jahren mit ausgeglichener Geschlechterverteilung. Metamizol wurde in 75 % der Applikationen in Tropfenform verabreicht.

Bei 14 % wurde Metamizol als Tablette gegeben, und 11 % der Patienten erhielten Metamizol intravenös. Dabei bewegt sich die Dosierung zwischen 500 und 1000 mg bis zu viermal täglich.

Ibuprofen erhielten 8 Patienten im Alter von 50 bis 84 Jahren. Sechs Probanden waren männlichen und 2 weiblichen Geschlechts. Ibuprofen wurde ausschließlich als Tablette in Dosierungen von 400 bis 800 mg ein- bis dreimal täglich verabreicht.

Die Diclofenac-Gruppe umfasste 6 Patienten im Alter von 38 bis 86 Jahre. Diclofenac wurde nur in Tablettenform mit Dosierungen von 50 bis 75 mg bis zu zweimal täglich gegeben. Zwei Patienten erhielten Diclofenac nach Bedarf.

Nur 3 Patienten im Alter von 61 bis 78 Jahren bekamen Paracetamol. Zwei in einer Dosierung von 500 – 1000 mg/Tag bis zu dreimal täglich. Bei einem Patienten fand die Applikation als Infusion statt.

In der Multi-NSAID-Gruppe waren 11 Patienten vertreten. Fünf davon bekamen Metamizol und Ibuprofen verabreicht. Drei Probanden nahmen neben Metamizol auch Diclofenac zu sich. Die Kombination von Ibuprofen mit Diclofenac, Metamizol mit Paracetamol und Paracetamol mit einem Coxib traten jeweils einmal auf.

In der folgenden Darstellung (Tabelle 3) werden die verschiedenen Gruppen in ihre persönlichen Merkmale, kardiovaskulären Risikofaktoren und Medikation tabellarisch untergliedert und gegenübergestellt.

	<u>Kontroll-Gruppe</u> KHK-Patienten + ASS	<u>Metamizol-Gruppe</u> KHK-Patienten + ASS +Metamizol	<u>Ibuprofen-Gruppe</u> KHK-Patienten +ASS +Ibuprofen	<u>Diclofenac-Gruppe</u> KHK-Patienten +ASS +Diclofenac	<u>Paracetamol-Gruppe</u> KHK-Patienten +ASS +Paracetamol	<u>Multi-NSAID-Gruppe</u> KHK-Patienten +ASS +>1 NSAID
Anzahl	35	36	8	6	3	11
Alter (Jahre)	74 (35-90)	77 (51-97)	69 (50-84)	69 (38-86)	72 (61-78)	77 (45-90)
Geschlecht (w/m)	10 / 25	18 / 18	2 / 6	6 / -	2 / 1	5 / 6
<u>Risikofaktoren:</u>						
Hypertension (n)	34 (97%)	36 (100%)	8 (100%)	6 (100%)	3 (100%)	10 (91%)
Diabetes mellitus (n)	13 (37%)	11 (31%)	1 (13%)	2 (33%)	1 (33%)	1 (9%)
Nikotin-Abusus (n)	11 (31%)	6 (17%)	4 (50%)	-	1 (33%)	3 (27%)
BMI (Ø)	28	25	27	27	32	28
Gesamtcholesterin (Ø)	169	189	178	199	161	165
<u>Co-Medikation (n):</u>						
Acetylsalicylsäure	35 (100%)	36 (100%)	8 (100%)	6 (100%)	3 (100%)	11 (100%)
P2Y12-Antagonisten	27 (77%)	27 (75%)	4 (50%)	5 (83%)	2 (67%)	6 (55%)
β-Blocker	26 (74%)	32 (89%)	7 (88%)	4 (67%)	2 (67%)	7 (64%)
ACE-Hemmer	19 (54%)	28 (78%)	4 (50%)	4 (67%)	2 (67%)	7 (64%)
ATII-Rez.-Antagonisten	3 (9%)	4 (11%)	3 (38%)	-	1 (33%)	1 (9%)
Dihydropyridine	8 (23%)	18 (50%)	3 (38%)	3 (50%)	1 (33%)	2 (18%)
Diuretika	16 (46%)	28 (78%)	3 (38%)	3 (50%)	3 (100%)	8 (73%)
Aldosteronantagonisten	7 (20%)	6 (17%)	1 (13%)	1 (17%)	2 (67%)	3 (27%)
Statine	20 (57%)	25 (69%)	6 (75%)	4 (67%)	3 (100%)	7 (64%)
orale Antidiabetika	5 (14%)	3 (8%)	-	1 (17%)	-	1 (9%)
Insuline	5 (14%)	8 (22%)	-	-	-	-
PP-Inhibitoren	24 (69%)	22 (61%)	5 (63%)	5 (83%)	1 (33%)	7 (64%)
Heparin	2 (6%)	9 (25%)	-	1 (17%)	-	2 (18%)
NMH	4 (11%)	4 (11%)	1 (13%)	-	-	1 (9%)
Phenprocoumon	6 (17%)	8 (22%)	2 (25%)	-	-	2 (18%)
<u>Analgetika (n):</u>						
Metamizol	-	36 (100%)	-	-	-	-

Ibuprofen	-	-	8 (100%)	-	-	-
Diclofenac	-	-	-	6 (100%)	-	-
Paracetamol	-	-	-	-	3 (100%)	-
Opioid-Agonisten	4 (11%)	7 (19%)	1 (13%)	2 (33%)	1 (33%)	4 (36%)
Kombinationen (n):						
Metamizol+Ibuprofen	-	-	-	-	-	5 (46%)
Metamizol+Diclofenac	-	-	-	-	-	3 (27%)
Metamizol+Paracetamol	-	-	-	-	-	1 (9%)
Ibuprofen+Diclofenac	-	-	-	-	-	1 (9%)
Paracetamol+Coxib	-	-	-	-	-	1 (9%)

Tabelle 3: Tabellarische Darstellung der Patientengruppen unterteilt in Alter, Geschlecht, kardiovaskulären Risikofaktoren und Medikation

Die zugehörige Kontroll-Gruppe umfasste 35 Patienten im Alter von 35 bis 90 Jahren. Neben der ASS-Medikation bestand zum Zeitpunkt der Probengewinnung keine Komedikation mit Metamizol oder einem anderen NSAID.

3.2 Thrombozytenzahlen und spezifische Laborparameter

In der folgenden Tabelle (Tabelle 4) sind die gemessenen Thrombozytenzahlen sowie routinemäßig erhobene Laborparameter als Mittelwerte anhand der 6 verschiedenen Patientengruppen unterteilt und gegenübergestellt.

	<u>Kontroll-Gruppe</u> KHK-Patienten + ASS	<u>Metamizol-Gruppe</u> KHK-Patienten + ASS +Metamizol	<u>Ibuprofen-Gruppe</u> KHK-Patienten + ASS +Ibuprofen	<u>Diclofenac-Gruppe</u> KHK-Patienten + ASS +Diclofenac	<u>Paracetamol-Gruppe</u> KHK-Patienten + ASS +Paracetamol	<u>Multi-NSAID-Gruppe</u> KHK-Patienten + ASS +>1 NSAID
Anzahl (n)	35	36	8	6	3	11
Alter (Jahre)	74 (35-90)	77 (51-97)	69 (50-84)	69 (38-86)	72 (61-78)	77 (45-90)
Geschlecht (w/m)	10 / 25	18 / 18	2 / 6	6 / -	2 / 1	5 / 6
<u>Thrombozytenzahlen:</u> Thrombozyten (x 1.000/ μ l)	238,0	272,0	207,0	276,0	268,0	210,0
<u>Blutbild:</u> Hämoglobin (mg/dl)	12,2	12,6	13,6	12,0	12,3	12,3
Hämatokrit (%)	37,0	36,6	40,3	36,9	38,1	37,9
<u>Entzündungsparameter:</u> CRP (mg/dl)	2,7	3,0	0,4	0,5	3,4	0,9
Leukozyten (x 1.000/nl)	8,2	9,2	6,8	8,0	6,7	8,3
<u>Serumlipide:</u> Ges.-Cholesterin (mg/dl)	169,0	189,0	178,0	199,0	161,0	165,0
TG (mg/dl)	142,0	206,0	193,0	111,0	82,0	175,0
LDL (mg/dl)	120,0	124,0	109,0	141,0	n.b.	83,0
HDL (mg/dl)	50,0	57,0	52,0	67,0	n.b.	46,0

<u>Herzenzyme:</u>						
CK (U/l)	132,0	139,0	135,0	107,0	74,0	163,0
CK-MB (U/l)	30,0	128,0	14,0	18,0	9,0	n.b.
Troponin T (U/l)	148,0	588,0	21,0	54,0	111,0	137,0
<u>Nierenparameter:</u>						
Harnstoff (mg/dl)	53,0	63,0	37,0	33,0	63,0	58,0
Kreatinin (ml/min.)	1,3	1,4	0,9	1,0	1,2	1,2
<u>Blutglukose:</u>						
Blutzucker (mg/dl)	141,0	123,0	146,0	98,0	128,0	132,0

Tabelle 4: Darstellung erhobener Laborparameter durch Gegenüberstellung der 6 Patientengruppen

Die Plättchenzahlen wiesen eine starke Streuung zwischen 60.000 und 1.017.000 / μ l auf. Der Gesamtmittelwert betrug 248.000 / μ l \pm 12.000 / μ l.

Weder für den minimalen noch für den maximalen, beobachteten Wert (60.000 bzw. 1.017.000 / μ l) war eine Ätiologie bekannt. Die Mittelwerte der Thrombozytenzahlen waren in den einzelnen Gruppen vergleichbar.

Während der gemittelte Hämoglobin-Wert (Hb) $12,2 \pm 0,20$ mg/dl betrug, berechnete sich der Gesamtmittelwert des Hämatokrits auf $37,3 \pm 0,58$ %.

Das C-reaktive Protein unterlag erfahrungsgemäß einer großen Streuung. So betrug der Gesamtmittelwert $2,3 \pm 0,35$ mg/dl (Median = 0,8 mg/dl). Das Konfidenzintervall (Alpha-Fehler = 0,05) wurde mit 1,61 – 2,99 mg/dl angegeben. 31 % der Patienten zeigten keine oder nur eine minimale CRP-Konzentration im Blut, wohingegen ebenfalls 31 % einen CRP-Wert $> 2,0$ mg/dl (Maximum von 19,1 mg/dl) aufwiesen. Auffallend waren die unterdurchschnittlichen Mittelwerte der Ibuprofen- bzw. Diclofenac-Gruppe, die auf ihre antiphlogistische Wirkung zurückzuführen sind.

Die Leukozytenzahlen wiesen einen Gesamtmittelwert von $8,4 \pm 0,34 \times 1.000$ /nl (Median = $7,8 \times 1.000$ /nl) auf mit einem Minimum von $3,4 \times 1.000$ /nl sowie einem Maximum von $31,8 \times 1.000$ /nl. Das 95%-Konfidenzintervall lag zwischen $7,74 - 9,06 \times 1.000$ /nl.

Eine einheitliche Aussage zu den Cholesterinwerten (Gesamtcholesterin, TG, LDL, HDL) konnte nicht getroffen werden, da in 38 % das Routinelabor der Patienten nicht die Bestimmung der Blutfettwerte umfasste. Des Weiteren erhielten zum Zeitpunkt der Blutabnahme 71 % der Probanden einen Lipidsenker verabreicht (66 % CSE-Hemmer, 4 % Cholesterol-Resporptions-Hemmer, 1 % Fibrinsäurederivate), wodurch die Blutfettwerte falsch negativ beschrieben worden wären.

Der Gesamtmittelwert der Creatinkinase (CK) des Gesamtkollektivs betrug $131 \pm 15,69$ U/l (Median = 75 U/l) mit einem 95 %-Konfidenzintervall zwischen $100,71 - 161,29$ U/l. Zur Isoform der Creatinkinase, die CK-MB, sowie zum Troponin T sind keine repräsentativen Aussagen möglich, da sie zum Zeitpunkt der Probengewinnung nur vereinzelt analysiert wurden. Die CK-MB wurde nur in 23% und das Troponin T in 42% der Fälle angegeben. Als Begründung wurde der fortgeschrittene stationäre Aufenthalt der Patienten angeführt, wobei die Herzenzyme zeitnah nach dem Akutereignis anstiegen und aufgrund ihrer anschließenden Normalisierung nicht mehr im Focus der im Verlauf zu betrachteten Laborwerte standen.

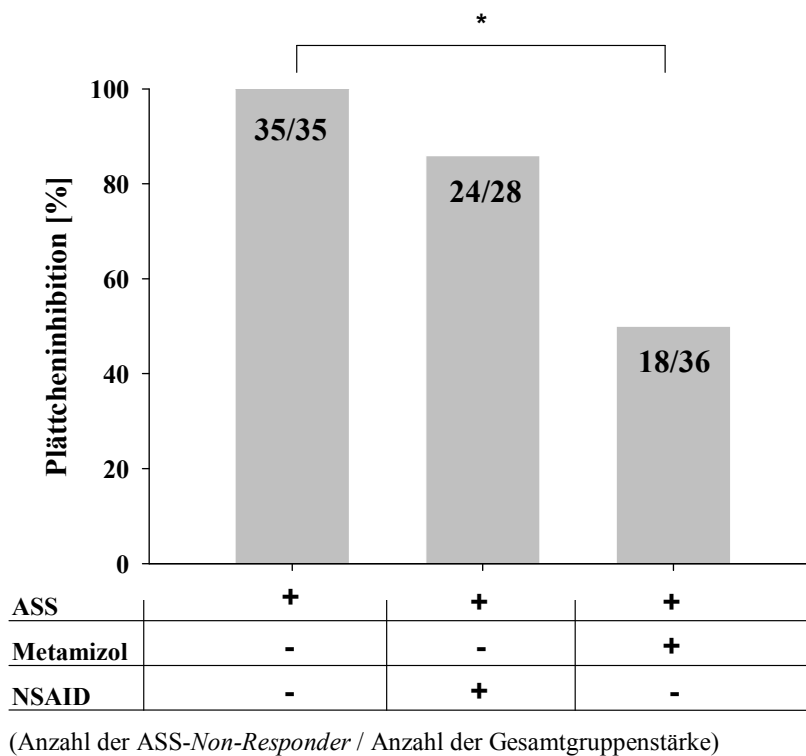
Der Kreatininwert wurde mit einem Gesamtmittelwert von $1,3 \pm 0,06$ ml/min (Median = 1,1 mg/dl) beschrieben bei einem Minimum von 0,6 ml/min sowie einem Maximum von 3,8 ml/min, und das 95 %- Konfidenzintervall lag zwischen $1,18 - 1,42$ ml/min. Der Gesamtmittelwert des Harnstoffs entsprach $55 \text{ mg/dl} \pm 3,14 \text{ mg/dl}$ (Median = 47mg/dl) mit einem Minimum von 14 mg/dl und einem Maximum von 186 mg/dl. Das 95%-Konfidenzintervall wurde zwischen $48,87 - 61,13$ mg/dl angegeben.

3.3 Arachidonsäure-induzierte thrombozytäre Aggregation

Die Hemmung der Plättchenfunktion in den KHK-Patientenplasmen der Kontrollgruppe, die mit einer täglichen Dosierung von 100 mg ASS behandelt wurde, konnte beim Versuch, eine *in vitro* Stimulation durch Zugabe von 1 mM Arachidonsäure hervorzurufen, vollständig erreicht werden (vgl. Abb. 17). Die gleichen Resultate wurden bei den Wirkstoffkombinationen ASS mit Ibuprofen (8 von 8), ASS mit Diclofenac (6 von 6) und Paracetamol (3 von 3) erzielt.

In der Gruppe der KHK-Patienten, die neben ASS auch Metamizol einnahmen, war in 18 von 36 Fällen, trotz regelmäßig mittels Anamnese nachgefragter und bestätigter ASS-Einnahme, keine ausreichende Hemmung der Plättchenaktivität erzielt worden (vgl. Abb. 17).

Auch in der Multi-NSAID-Patientengruppe wurde eine solche ASS-*Non-Response* in 4 von 11 Fällen beobachtet. Zwei dieser 4 Patienten mit unvollständig gehemmter Plättchenfunktion erhielten neben Metamizol ein zusätzliches NSAID. Ein weiterer Patient bekam Ibuprofen mit Diclofenac verordnet. Ein Patient nahm neben Paracetamol ein Coxib ein. Im mittleren Balken der Abbildung 17 werden die Patienten mit den Wirkstoffkombinationen ASS plus NSAID (auch Mehrfachkombinationen) zu n=28 zusammengefasst:

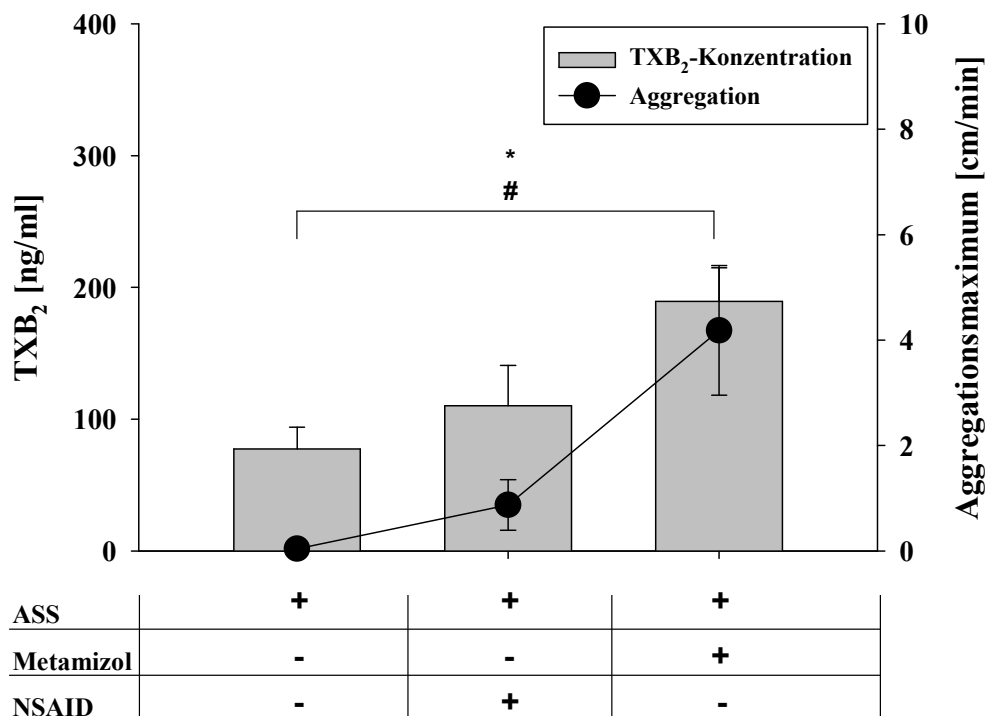


(*): $p < 0,001$: Vergleich ASS-*Non-Responder* der Metamizol-Gruppe mit der Kontrollgruppe

Abb. 17: Anteil der ASS-*Non-Responder* im *in vitro* Versuch zur thrombozytären Aggregationshemmung ohne *in vitro* ASS-Zugabe

Die zugehörigen Werte der Aggregation betragen für die Kontrollgruppe (n=35) $0,1 \pm 0,1$ cm/min bei gemittelten TXB₂-Werten von $77,5 \pm 16,4$ ng/ml.

Im Gegensatz dazu lag die Aggregation der Metamizol-Gruppe (n=36) bei $4,2 \pm 1,2$ cm/min ($p < 0,001$) bei TXB₂-Werten von $188,4 \pm 25,7$ ng/ml ($p < 0,001$) (vgl. Abb. 18).



(#): $p < 0,001$ für $[TXB_2]$: ASS vs. ASS+Metamizol; (*): $p < 0,001$ für Aggregation: ASS vs. ASS+Metamizol

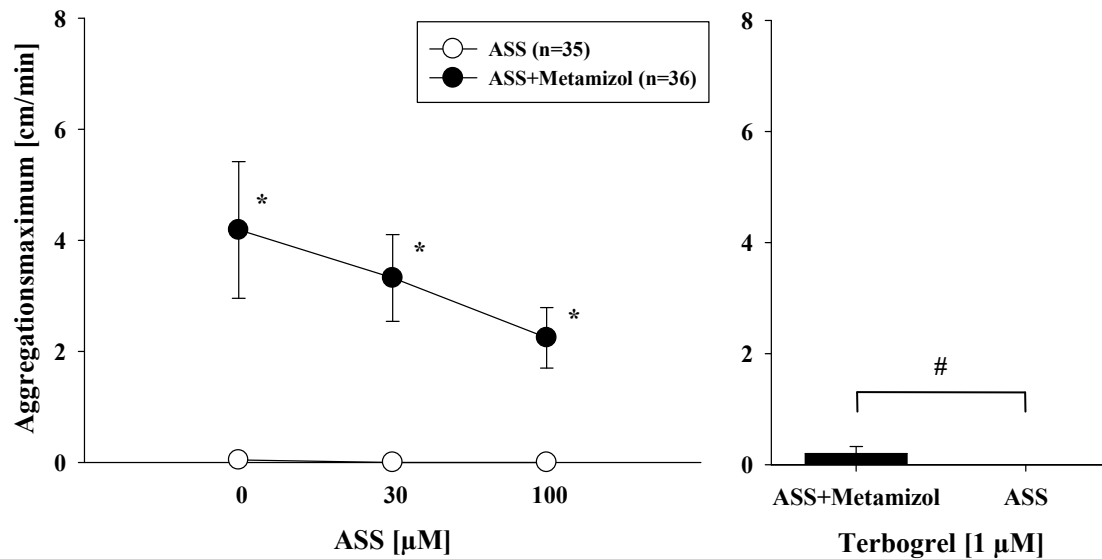
Abb. 18: Vergleich der einzelnen Patientengruppen anhand der Aggregation [cm/min] sowie Thromboxan Konzentration [ng/ml]

3.4 Thrombozytäre Aggregation bei KHK-Patienten mit ASS und Metamizol

Wie unter 3.3 beschrieben, ergab sich in 50 % der Aggregationsversuchen (18 von 36) keine ausreichende Hemmung der Plättchenfunktion nach Stimulation durch 1 mM Arachidonsäure genau der Patienten, die die Medikamentenkombination ASS und Metamizol erhielten. Die Aggregation war in dieser Gruppe mit 4,2 cm/min signifikant stärker als in der Kontroll-Gruppe mit 0,1 cm/min ($p < 0,001$).

Selbst wenn *in vitro* 30 μ M bzw. 100 μ M ASS dem thrombozytenreichen Plasma zugesetzt wurden, gelang es nicht, die thrombozytäre Aggregation in der Metamizol-Gruppe vollständig zu unterbinden. Mit 3,3 cm/min bei Vorlage von 30 μ M ASS sowie 2,2 cm/min bei Vorlage von 100 μ M ASS *in vitro* ergab sich noch immer eine signifikant höhere Steigung der Aggregationskurven im Vergleich zur Kontroll-Gruppe mit 0,00 cm/min in Gegenwart beider ASS-Konzentrationen ($p < 0,001$).

Demgegenüber bewirkte die *in vitro* Zugabe von 1 μ M Terbogrel eine nahezu vollständige Hemmung der Aggregation. Hier konnten die Plättchen ausreichend gehemmt werden mit einer Steigung der Aggregationskurve von 0,2 cm/min in der Metamizol-Gruppe im Vergleich zur Kontroll-Gruppe mit 0,0 cm/min. Der Unterschied war statistisch nicht signifikant (vgl. Abb. 19).



(*): $p < 0,001$: ASS+Metamizol vs. ASS unter Zugabe von 0-30-100 μM ASS *in vitro*, (#): nicht signifikant

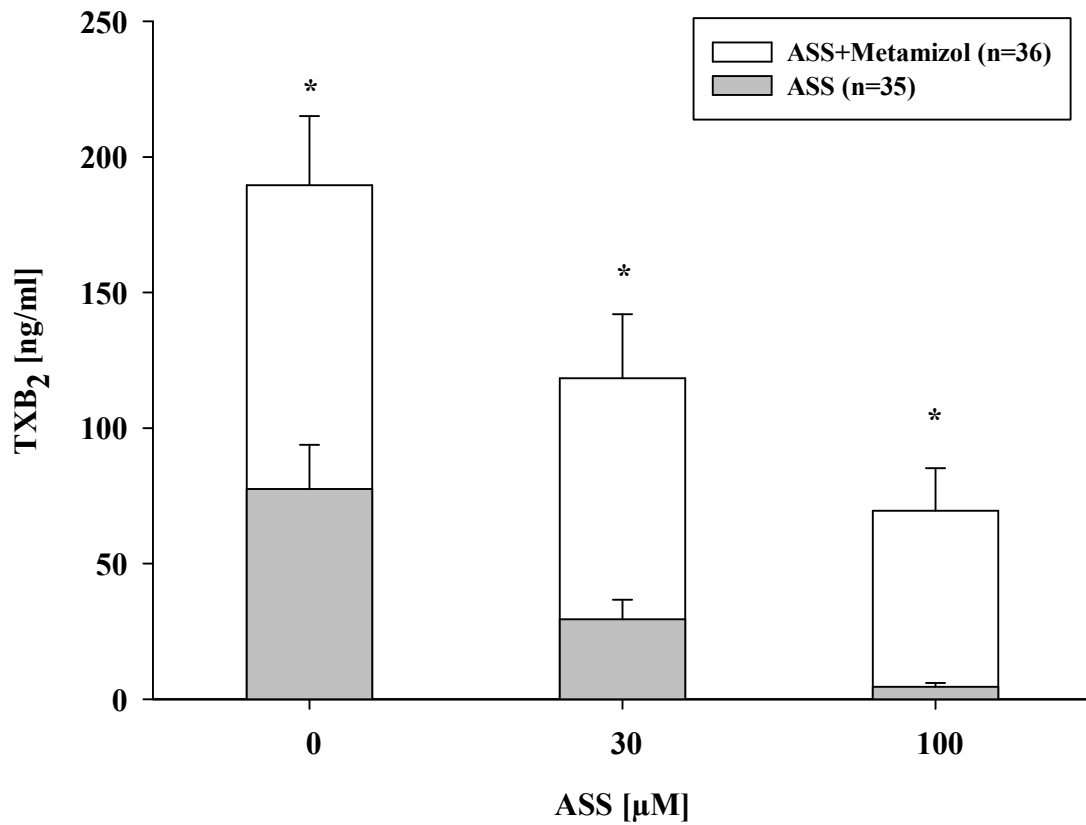
Abb. 19: Vergleich der Kontroll-Gruppe (\circ , $n=35$) mit dem Metamizol-Patientenkollektiv (\bullet , $n=36$) unter Zugabe von 0-30-100 μM ASS sowie 1 μM Terbogrel (Stimulation mit 1 mM Arachidonsäure)

3.4.1 Thromboxan-Konzentrationen bei KHK-Patienten mit ASS und Metamizol

Die Ergebnisse der Aggregationsmaxima in 3.4 spiegeln sich auch in den TXB_2 -Konzentrationen wider.

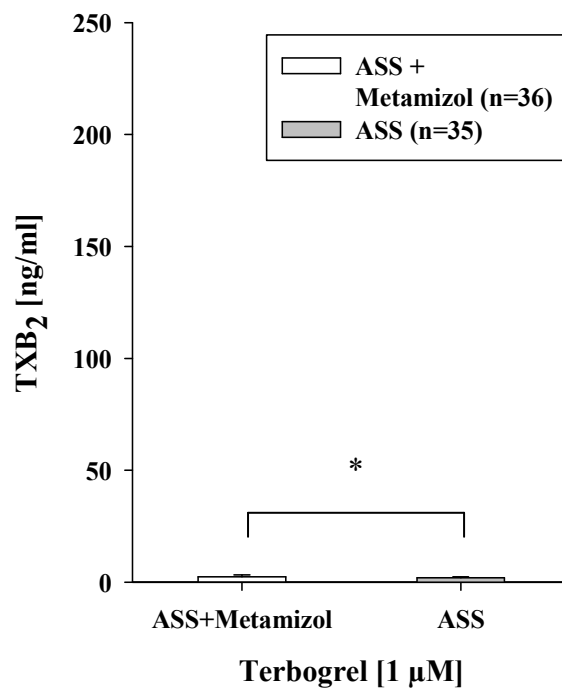
Während die TXB_2 -Konzentrationen in der Metamizol-Gruppe von 188,4 ng/ml (0 μM ASS *in vitro* Exposition) bei *in vitro* Zusatz von 30 bzw. 100 μM ASS auf 118,3 ng/ml bzw. 69,5 ng/ml sanken, ergaben sich in der Kontroll-Gruppe signifikant niedrigere Thromboxan-Werte mit jeweils 77,5, 29,5 und 4,5 ng/ml (vgl. Abb. 20).

Der *in vitro* Zusatz von 1 μM Terbogrel führte sowohl in der Metamizol-Gruppe mit 2,4 ng/ml als auch in der Kontroll-Gruppe mit 2,0 ng/ml zu nahezu vollständiger Hemmung der Thromboxansynthese (vgl. Abb. 21).



(*): $p < 0,001$: ASS+Metamizol vs. ASS unter Zugabe von 0-30-100 μM ASS *in vitro*

Abb. 20: Vergleich der TXB₂-Konzentrationen der Metamizol-Gruppe (n=36) mit der Kontroll-Gruppe (n=35)



(*): nicht signifikant

Abb. 21: Thromboxan-Konzentration nach Addition von 1 μM Terbogrel im Vergleich der Metamizol-Gruppe (n=36) mit der Kontroll-Gruppe (n=35)

3.4.2 Plasmakonzentration von Metamizol bzw. Metamizol-Metabolite

Die mittels HPLC-Verfahren bestimmten Konzentrationen der Metamizol-Metabolite wiesen starke interindividuelle Unterschiede auf. Der aus den Werten aller mit Metamizol behandelter Patienten errechnete Mittelwert des aktiven Metaboliten 4-Methylaminoantipyrin (MAA) betrug $35,3 \pm 7,3 \mu\text{M}$. Für 4-Aminoantipyrin (AA) und 4-Acetylaminoantipyrin (AAA) wurden $12,0 \pm 3,4 \mu\text{M}$ bzw. $56,8 \pm 8,4 \mu\text{M}$ ermittelt (vgl. Abb. 22). Entsprechend zeigten auch die als Summe zusammengefassten Konzentrationen von MAA, AA und AAA eine hohe interindividuelle Variation. So betrug die minimale beobachtete Gesamtkonzentration der drei Metabolite $3,8 \mu\text{M}$, wohingegen die maximale Gesamtkonzentration $427,9 \mu\text{M}$ war. Die mittlere Gesamtkonzentration betrug $104,1 \mu\text{M} \pm 16,0 \mu\text{M}$.

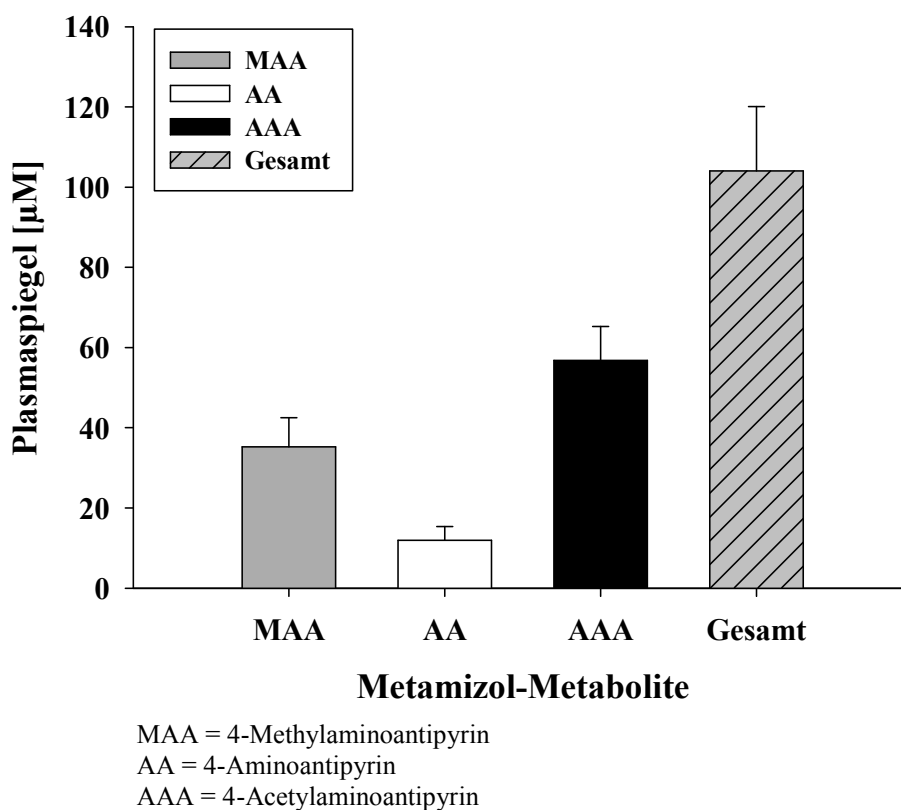


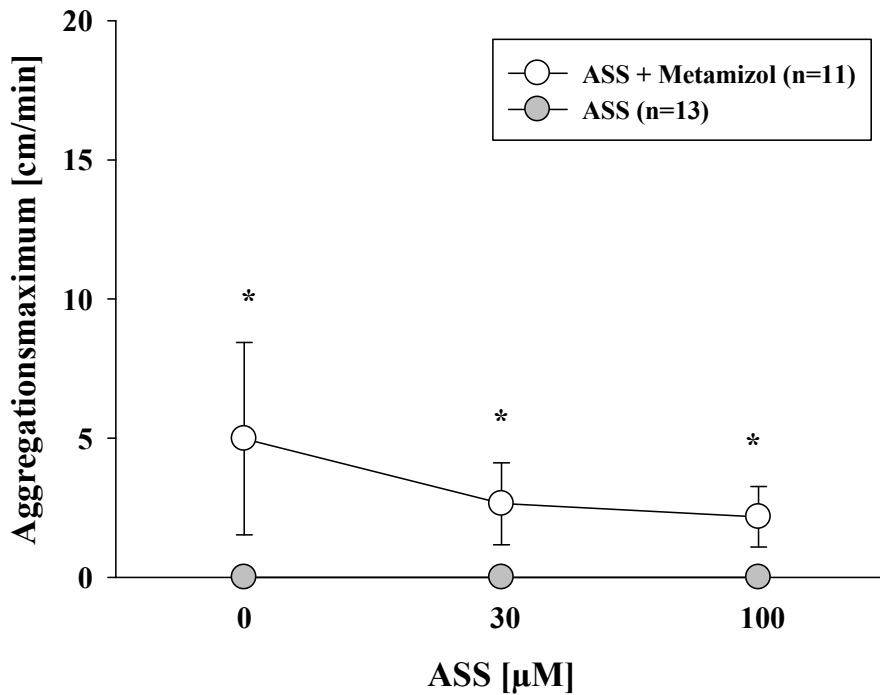
Abb. 22: Gemessene Konzentrationen der Metamizol-Metabolite als Mittelwerte mit SEM

3.4.3 Komorbidität Diabetes mellitus bei KHK-Patienten mit ASS und Metamizol

In der Gruppe der mit Metamizol-therapierten Patienten waren 11 der 36 Patienten unter anderem an Diabetes mellitus erkrankt (31 %). Zum Vergleich waren 13 der 35 KHK-Patienten der Kontroll-Gruppe an Diabetes mellitus erkrankt (36 %).

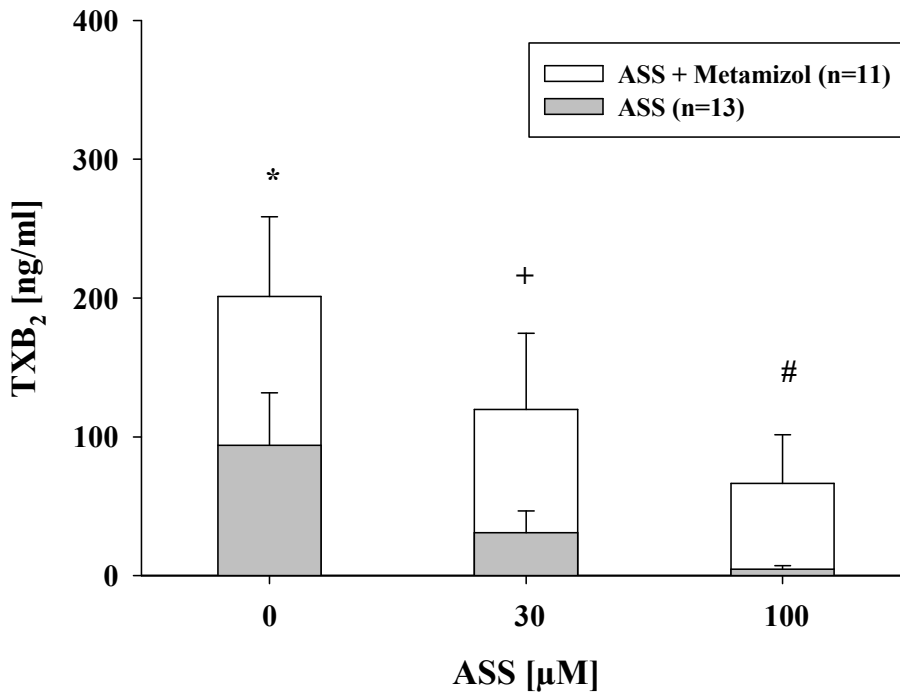
Acht der 11 Diabetiker der Metamizol-Gruppe zeigten eine ausreichende Hemmung der Thrombozytenfunktion, wohingegen drei als ASS-Non-Responder identifiziert wurden (27 %). In der Kontroll-Gruppe konnte die Plättchenfunktion bei allen 13 Diabetes mellitus Patienten ausreichend gehemmt werden (100 %).

Die folgende Abbildung stellt dies dar (Abb. 23):



(*): $p < 0,001$: ASS + Metamizol vs. ASS unter Zugabe von 0-30-100 µM ASS *in vitro*
Abb. 23: Gegenüberstellung der an Diabetes mellitus erkrankten KHK-Patienten anhand der Aggregationsmaxima getrennt nach Metamizol- und Kontroll-Gruppe

Dies spiegelt auch die Thromboxansynthese im Vergleich der an Diabetes erkrankten KHK-Patienten zwischen den beiden Gruppen wieder (Abb. 24):



(*): $p = 0,202$, (+): $p = 0,013$, (#): $p = 0,001$: ASS + Metamizol vs. ASS unter Zugabe von 0-30-100 µM ASS *in vitro*

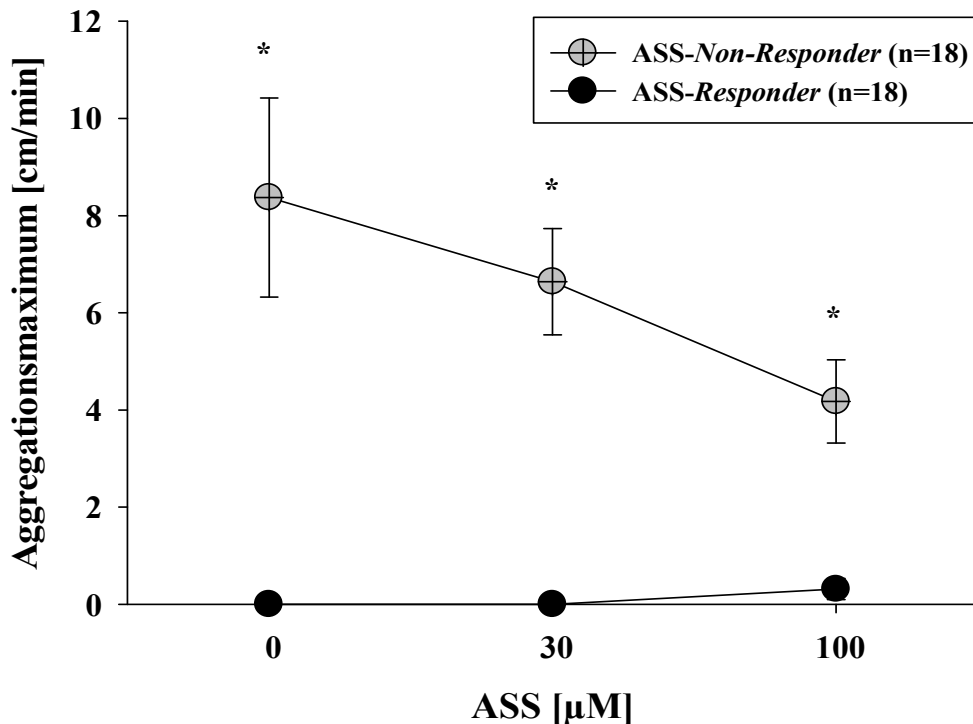
Abb. 24: Gegenüberstellung der an Diabetes mellitus erkrankten KHK-Patienten anhand der Thromboxansynthese getrennt nach Metamizol- und Kontroll-Gruppe. Die Thrombozyten wurden *in-vitro* mit ASS (0-100 µM) behandelt

3.4.4 Vergleich zwischen ASS-Respondern und -Non-Respondern in der Gruppe der Metamizol-behandelten Patienten

Betrachtet man die Patienten der Metamizol-Gruppe getrennt nach Inhibition der Plättchenfunktion, so ergibt sich folgendes Bild:

Die Patienten, die unter Metamizol und ASS eine ausreichende Hemmung der Thrombozytenaggregation aufwiesen, zeigten erwartungsgemäß keine Aggregation, wenn ASS (30 bzw. 100 μM) *in vitro* zugesetzt worden war. Entsprechendes galt auch für Terbogrel (1 μM).

Im Vergleich dazu betrug die mittlere Steigung in den Aggregationskurven der Patienten, deren Thrombozytenaktivität nicht oder nicht ausreichend hemmbar war, $8,4 \pm 2,1$ cm/min bei keinem *in vitro* ASS Zusatz, $6,6 \pm 1,1$ cm/min bei 30 μM ASS *in vitro*, $4,2 \pm 0,9$ cm/min bei 100 μM ASS *in vitro* und $0,4 \pm 0,2$ cm/min bei 1 μM Terbogrel *in vitro* (vgl. Abb. 25). Auch hier war die interindividuelle Variabilität groß.



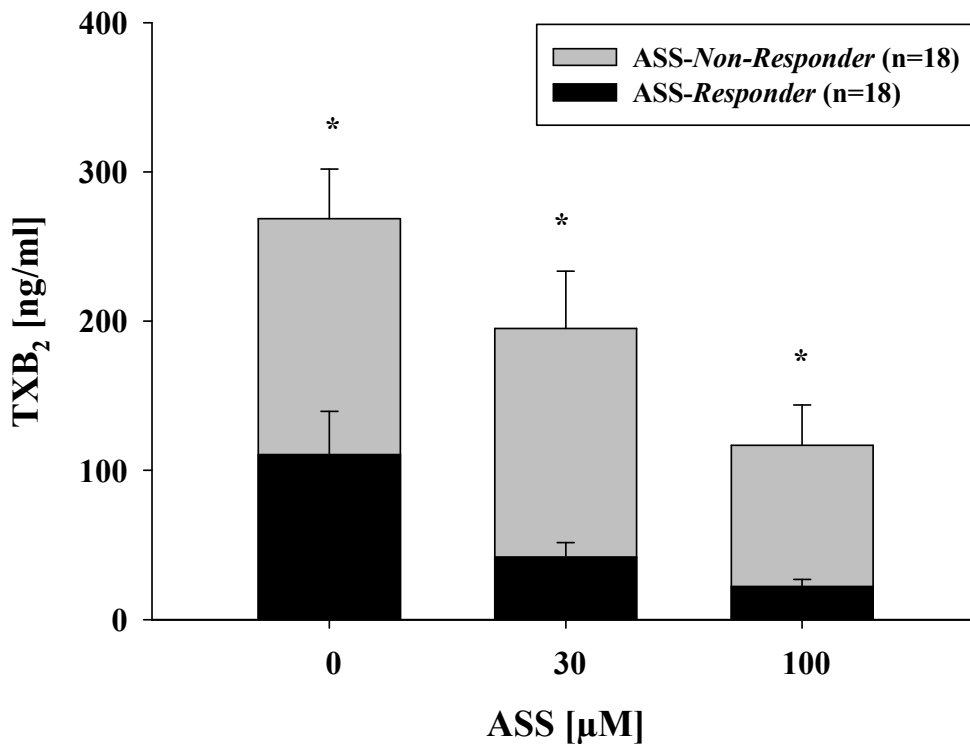
(*): $p < 0,001$: Non-Responder vs. Responder unter Zugabe von 0-30-100 μM ASS *in vitro*

Abb. 25: Aufteilung der Metamizol-Gruppe (n=36) in ASS-Responder (n=18) und -Non-Responder (n=18) unter Darstellung der Aggregationsmaxima (Stimulation mit 1 mM Arachidonsäure)

Die entsprechenden TXB_2 -Konzentrationen wichen auch hier signifikant voneinander ab. Während in der Gruppe der ASS-Responder die TXB_2 -Freisetzung der Thrombozyten bei $110,6 \pm 29,0$ ng/ml mit 0 μM ASS *in vitro* lag, nahmen die Konzentrationen ab, wenn ASS (30 bzw. 100 μM) *in vitro* zugesetzt worden war. So war die TXB_2 -Konzentration $41,9 \pm 9,6$ ng/ml unter Zusatz von 30 μM ASS *in vitro*, $22,2 \pm 4,6$ ng/ml unter 100 μM ASS *in vitro* und $2,0 \pm 1,7$ ng/ml unter 1 μM Terbogrel *in vitro*.

Die Konzentrationen in der Gruppe der *ASS-Non-Responder* erreichten signifikant höhere Werte ($p < 0,001$): Hier lagen die TXB₂-Konzentrationen bei $268,5 \pm 33,3$ ng/ml (0 μ M ASS *in vitro*), $195,0 \pm 38,6$ ng/ml (30 μ M ASS *in vitro*), $116,7 \pm 27,2$ ng/ml (100 μ M ASS *in vitro*) und $2,1 \pm 0,9$ ng/ml (1 μ M Terbogrel *in vitro*).

Zur Veranschaulichung sind die gemittelten TXB₂-Konzentrationen beider Gruppen in Abbildung 26 gegenübergestellt:

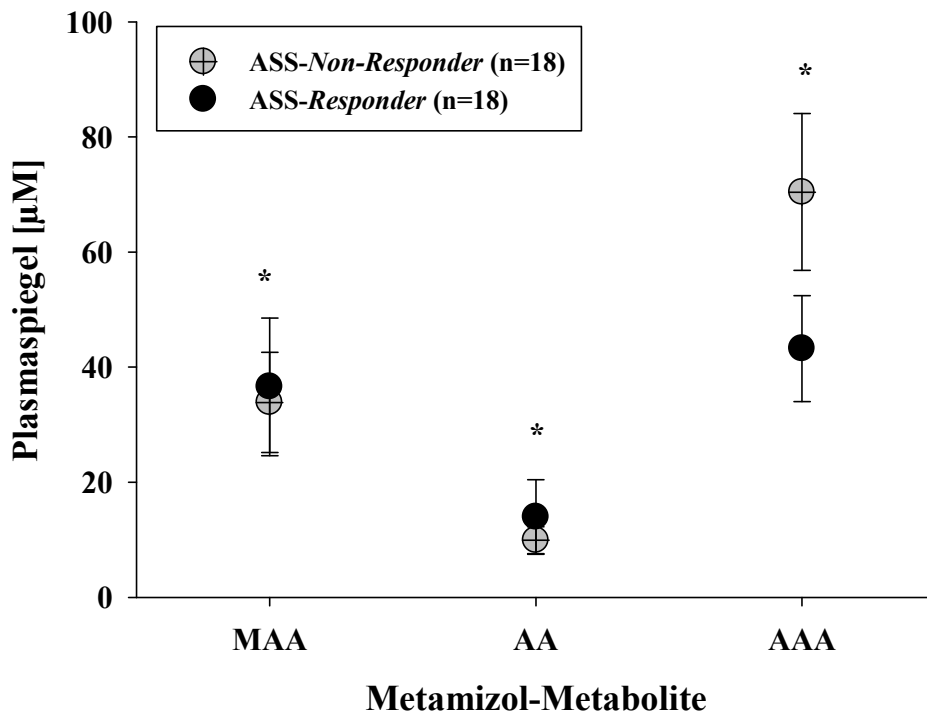


(*): $p < 0,001$: *ASS-Responder* vs. *ASS-Non-Responder* unter Zugabe von 0-30-100 μ M ASS *in vitro*

Abb. 26: Aufteilung der Metamizol-Gruppe ($n=36$) in *ASS-Responder* ($n=18$) und *-Non-Responder* ($n=18$) unter Darstellung der TXB₂-Konzentration

In der Gruppe der *ASS-Responder* betrug die Plasmakonzentration für 4-Methylaminoantipyrin $36,6 \pm 12,0$ μ M, was vergleichbar mit der Konzentration des MAA in der Gruppe der *ASS-Non-Responder* mit $33,9 \pm 8,7$ μ M war. Somit ergab sich für MAA kein signifikanter Unterschied zwischen den verglichenen Plasmaspiegeln ($p=0,912$, Abb. 27). Entsprechendes galt für 4-Aminoantipyrin. Der spätere Metabolit 4-Acetylaminoantipyrin ergab mit $43,3 \pm 9,2$ μ M bei den *ASS-Respondern* und $70,4 \pm 13,6$ μ M einen nicht signifikanten Trend für eine höhere Plasmakonzentration bei *Non-Respondern* ($p=0,150$).

Auffallend war in der Gruppe der *ASS-Responder*, dass trotz täglicher, anamnestisch bestätigter ASS-Einnahme bei 7 Patienten TXB₂-Werte zwischen 103,0 und 491,5 ng/ml ($223,9 \pm 49,9$ ng/ml) auftraten ohne den Nachweis einer Aggregation. Durch *in vitro* Zugabe von ASS (30 bzw. 100 μ M) konnte die TXB₂-Produktion dieser Patienten auf $73,3 \pm 19,1$ ng/ml bzw. $31,4 \pm 9,1$ ng/ml gesenkt werden. Nach Addition von Terbogrel (1 μ M) betrug die TXB₂-Konzentration noch $5,3 \pm 4,3$ ng/ml.



(*): nicht signifikant

Abb. 27: Darstellung der Plasmaspiegel der Metamizol-Metabolite getrennt nach ASS-Non-Responder (n=18) und ASS-Responder (n=18)

3.5 Betrachtung der Wirkstoffkombination ASS und Ibuprofen

Die Thrombozytenaktivität der 8 KHK-Patienten, die parallel zur ASS-Medikation Ibuprofen einnahmen, war vollständig gehemmt und somit offenbar ohne Interaktion. So betrug die mittlere Steigung der Aggregationskurve ohne *in vitro* Exposition von ASS 0,00 cm/min. Entsprechend blieb auch bei *in vitro* Zugabe von 30 bzw. 100 µM ASS sowie 1 µM Terbogrel die Aggregation aus (vgl. Abb. 28).

Die zugehörigen TXB₂-Werte lagen zwischen 91,9 ng/ml und 0,2 ng/ml je nach *in vitro* Addition von ASS bzw. Terbogrel.

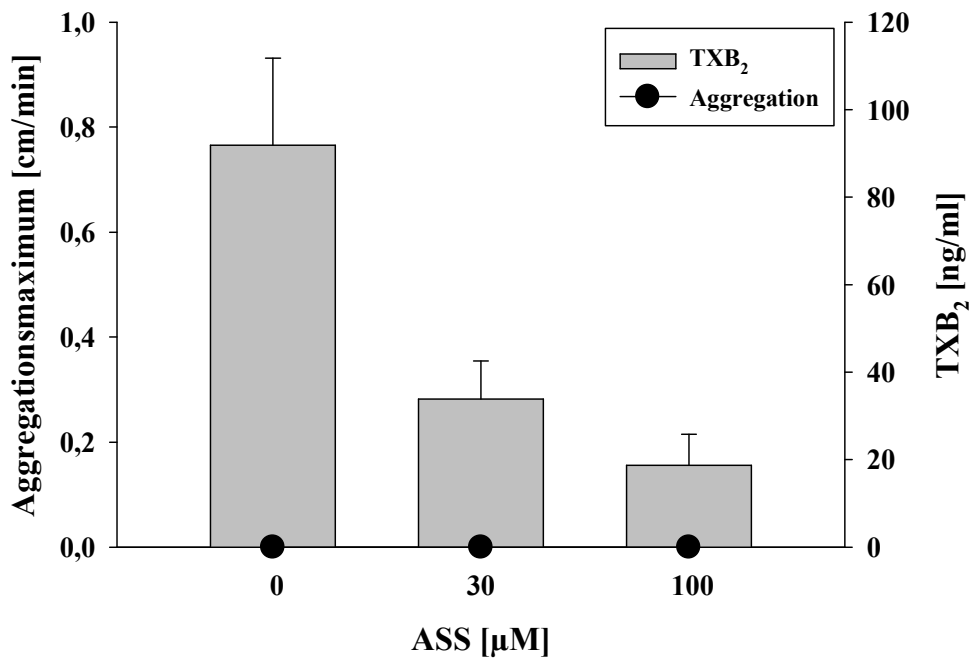


Abb. 28: Aggregationsmaxima und TXB₂-Konzentrationen unter *in vitro* Zugabe von 0-30-100 µM ASS in der Ibuprofen-Gruppe (n=8) (Stimulation mit 1 mM Arachidonsäure)

3.6 Kombination von ASS und Diclofenac

Auch in der Gruppe der 6 KHK-Patienten mit der Kombination ASS und Diclofenac zeigte sich keine Thrombozytenaggregation, ähnlich wie schon bei der Kombination von ASS und Ibuprofen. Ebenso führte eine *in vitro* Exposition von ASS bzw. Terbogrel zu keiner Veränderung in der Konzentrations-Wirkungs-Kurve (vgl. Abb. 29).

Die TXB₂-Konzentrationen nahmen je nach *in vitro* Konzentration von ASS und Terbogrel von 11,0 ng/ml auf 0,4 ng/ml ab.

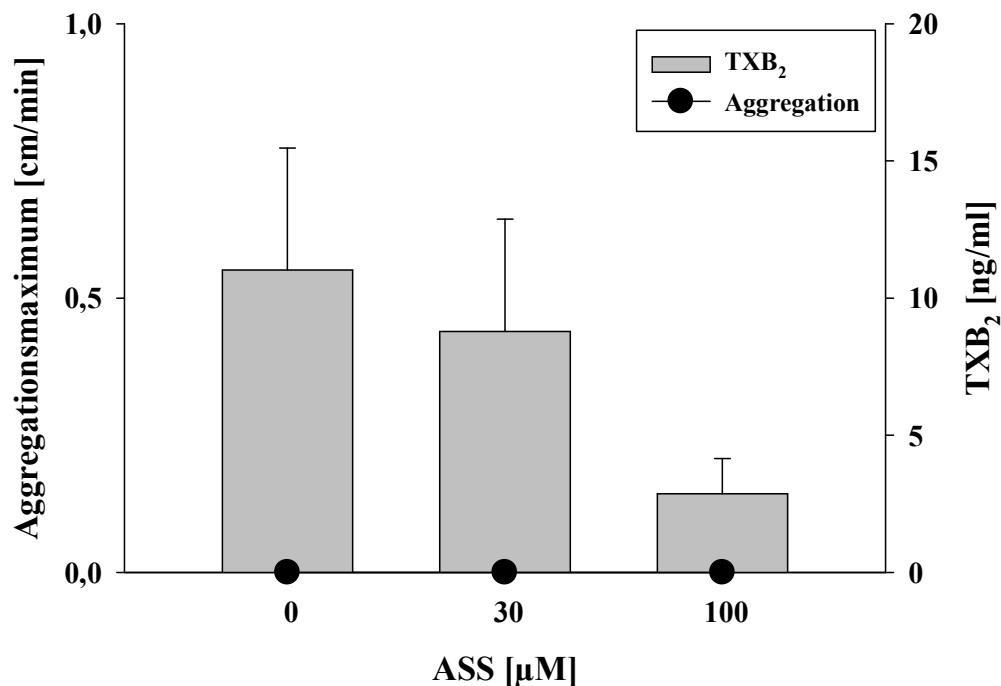


Abb. 29: Aggregationsmaxima und TXB₂-Konzentrationen unter *in vitro* Zugabe von 0-30-100 µM ASS in der Diclofenac-Gruppe (n=6) (Stimulation mit 1 mM Arachidonsäure)

3.7 Kombination ASS und Paracetamol

Die 3 Patienten, die neben der Acetylsalicylsäure auch Paracetamol einnahmen, zeigten ebenfalls keine Aggregation. Auch war die Thromboxansynthese durch die *in vitro* Exposition von ASS konzentrationsabhängig gehemmt.

Die Konzentrationen belaufen sich auf $315,4 \pm 247,9$ ng/ml ohne ASS Zusatz über $2,6 \pm 1,7$ ng/ml für einen *in vitro* Zusatz von 30 µM ASS bis zu $0,9 \pm 0,5$ ng/ml bei Zugabe von 100 µM ASS *in vitro* (vgl. Abb. 30).

Auffallend war, dass im Plasma eines der drei Patienten dieser Gruppe ohne *in vitro* ASS ein sehr hoher TXB₂-Wert mit 805,9 ng/ml gemessen werden konnte, ohne dass die Thrombozyten im Versuch aggregiert haben. Unter *in vitro* Zugabe von 30 bzw. 100 µM ASS zeigte sich jedoch ein Abfall der TXB₂-Werte auf 2,0 bzw. 1,0 ng/ml.

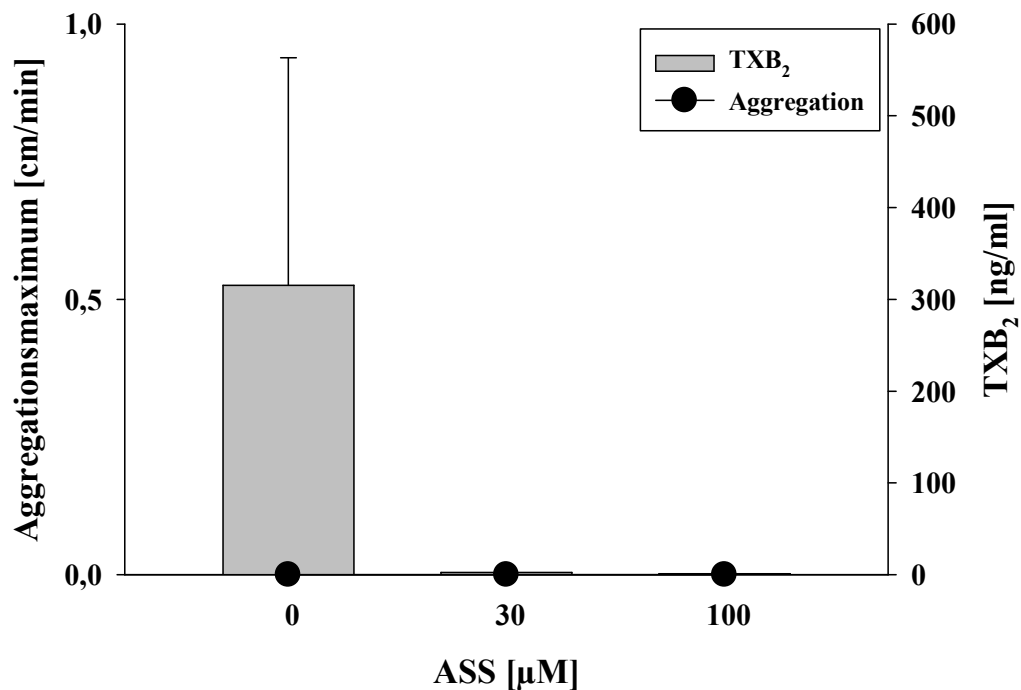


Abb. 30: Aggregationsmaxima und TXB₂-Konzentrationen unter *in vitro* Zugabe von 0-30-100 µM ASS in der Paracetamol-Gruppe (n=3) (Stimulation mit 1 mM Arachidonsäure)

3.8 Kombination von ASS mit mehr als einem NSAID

In dem der Studie zu Grunde liegenden Patientenkollektiv waren auch KHK-Patienten, die zusätzlich zu ASS mehrere NSAIDs einnahmen.

Die folgende Tabelle zeigt die betreffenden Kombinationen (ASS-Non-Responder/ Gesamtanzahl):

ASS	Metamizol	Ibuprofen	Diclofenac	Paracetamol	Coxib
Metamizol		1/5	0/3	1/1	0
Ibuprofen	1/5		1/1	0	0
Diclofenac	0/3	1/1		0	0
Paracetamol	1/1	0	0		1/1
Coxib	0	0	0	1/1	

Tabelle 5: Gegenüberstellung der NSAID-Kombinationen und ASS-Non-Responder

Von diesen 11 Patienten trat in 4 Fällen eine ASS-Non-Response auf. Die NSAID-Kombinationen waren jeweils unterschiedlich.

So stellte sich eine unzureichende Thrombozytenaggregationshemmung für die Kombinationen aus ASS mit Metamizol und Ibuprofen, ASS mit Metamizol und Paracetamol sowie ASS mit Ibuprofen und Diclofenac als auch ASS mit Paracetamol und einen Coxib dar.

Die folgende Abbildung gibt einen Überblick der Multi-NSAID-Gruppe:

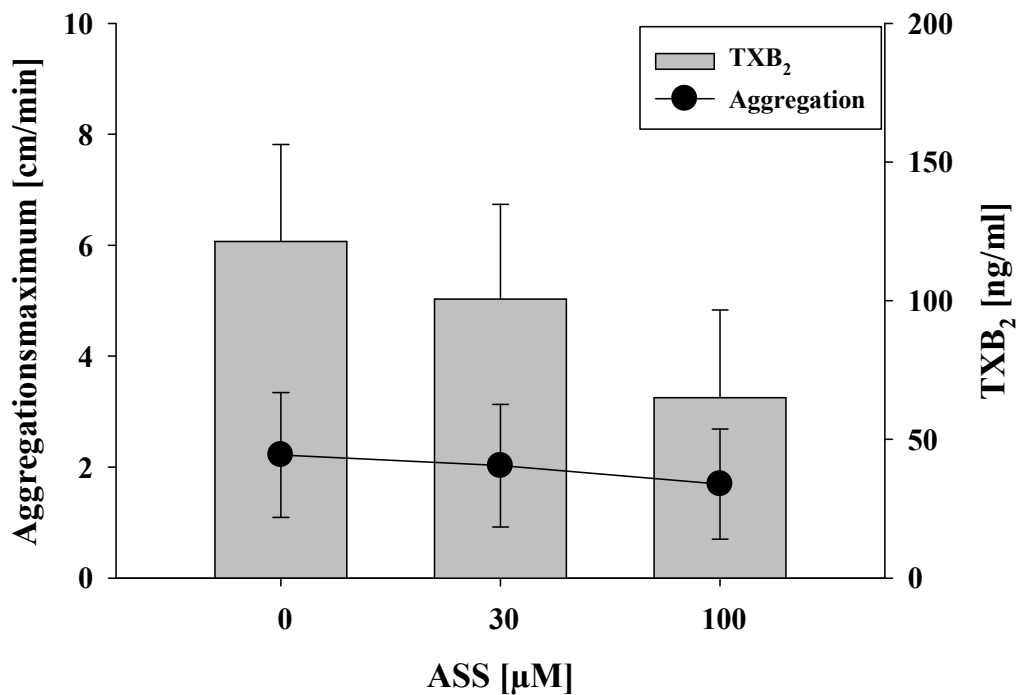


Abb. 31: Aggregationsmaxima und TXB₂-Konzentrationen unter *in vitro* Zugabe von 0-30-100 µM ASS in der Multi-NSAID-Gruppe (n=11) (Stimulation mit 1 mM Arachidonsäure)

Die Aggregationsmaxima [cm/min] sind in Abbildung 32 jeweils nach NSAID-Kombinationen dargestellt:

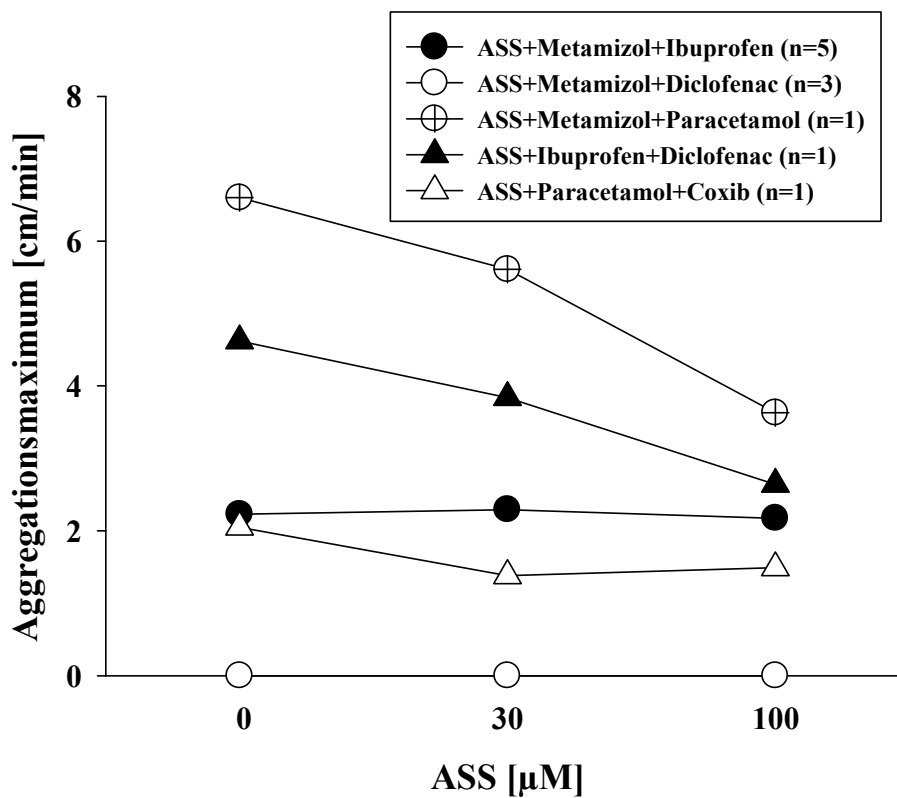


Abb. 32: Aggregationsmaxima unter *in vitro* Zugabe von 0-30-100 µM ASS getrennt nach NSAID-Kombinationen. Zur Übersichtlichkeit wurden SEM-Werte nicht eingezeichnet.

3.9 *In vitro* Untersuchungen zur Hemmung der Thrombozytenaggregation über alternative Signaltransduktionswege

3.9.1 Versuch mit gesunden Probanden-Thrombozyten (PRP) und verdünntem Patientenplasma mit einem MAA-Plasmaspiegel von 3,0 μM

Durch diesen Versuch sollte herausgearbeitet werden, ob bei gleichzeitiger Anwesenheit von ASS und Metamizol, in diesem Fall Patientenplasma mit einem nachgewiesenen Metamizol-Plasmaspiegel, medikamentös unbehandelte Spenderthrombozyten nur unzureichend gehemmt werden können.

Vor Beginn dieser Messungen wurde die Konzentration des Metamizol-Metaboliten MAA im Patientenplasma ermittelt, bei der eine alleinige Hemmung der Thromboxan abhängigen Plättchenaggregation noch nicht gegeben war. Dadurch sollte ausgeschlossen werden, dass eine zu hohe MAA-Konzentration eigenständig die Thrombozytenfunktion hemmt. Dazu wurde eine Konzentrations-Wirkungs-Kurve (KWK) mit Probanden-Plasma unter *in vitro* Zugabe verschiedener MAA-Konzentrationen erstellt (s. Abb. 33). Als Agonist wurde Arachidonsäure (1 mM) verwendet.

Unter einer Plasmakonzentration von 3 μM wurde unter den Versuchsbedingungen noch keine eigene Hemmung der Thrombozytenaggregation beobachtet (vgl. Abb. 33).

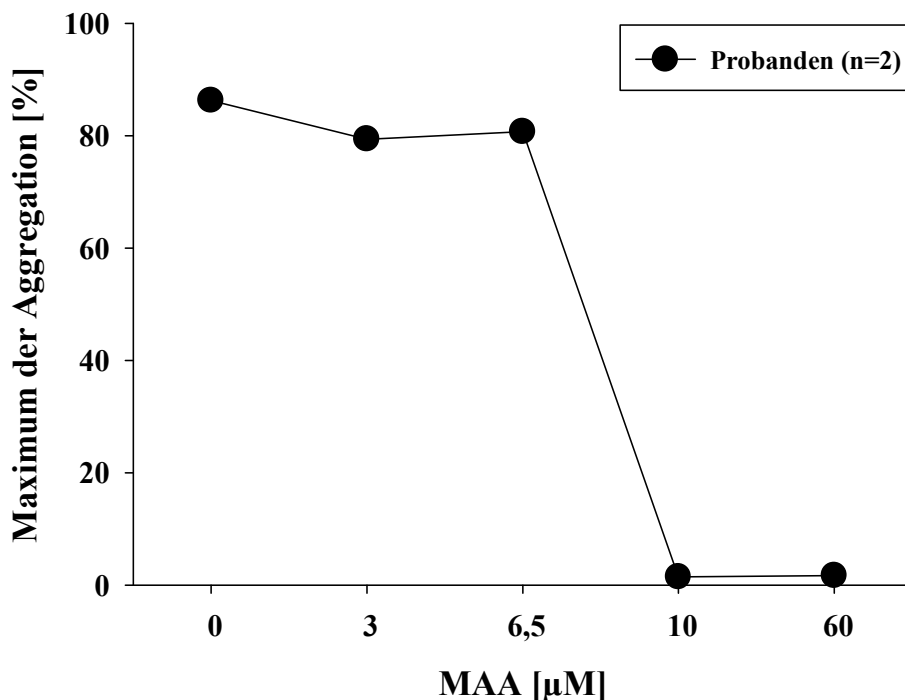


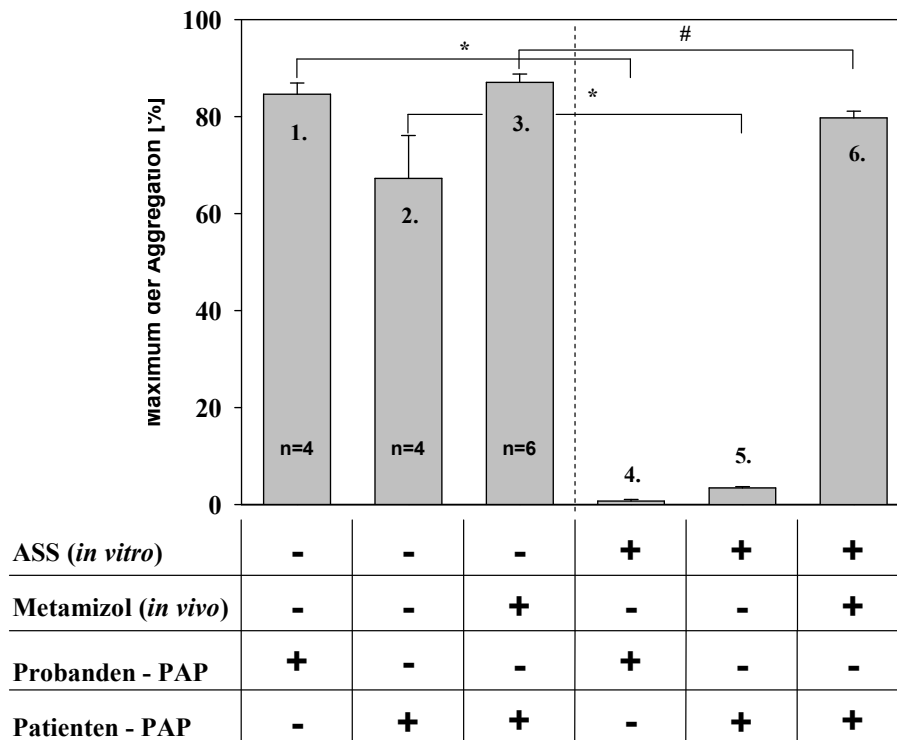
Abb. 33: Konzentrations-Wirkungs-Kurve mit Probandenplasma unter *in vitro* Zugabe von 0 – 3 – 6,5 – 10 – 60 μM MAA (Stimulation mit 1 mM Arachidonsäure)

In den anschließenden Aggregationsversuchen ergaben sich folgende Ergebnisse (vgl. Abb. 34):

Die Thrombozyten im Probandenplasma ($n=4$) konnten durch *in vitro* Zusatz von ASS vollständig gehemmt werden. Vor Zugabe von ASS ergab sich ein Mittelwert für das Aggregationsmaximum von 84,6 % sowie nach Addition von 0,8 % (erster bzw. vierter Balken).

Wie erwartet, führte ASS *in vitro* (30-50 μM) zu einer vollständigen Hemmung der Plättchenaggregation (n=4) mit plättchenreichem Probandenplasma unter Hinzugabe von plättchenarmen Kontrollpatientenplasma, das kein MAA enthielt. Der Mittelwert des Aggregationsmaximum betrug ohne ASS 67,2 % (zweiter Balken) und mit ASS 3,4 % (fünfter Balken).

Im Gegensatz dazu zeigte sich im Aggregationsversuch (n=6) mit Probanden-PRP mit Zusatz von Patientenplasma, welches auf eine MAA-Konzentration von 3,0 μM eingestellt worden war (vgl. 2.7.3), nahezu keine Hemmung der Plättchenfunktion unter *in vitro* Zugabe von ASS (dritter vs. sechster Balken):



(*): $p < 0,001$, (#): $p = 0,015$

Abb. 34: Versuchsreihe zur Thrombozytenaggregation mit Probanden-PRP und Patienten-PAP unter *in vitro* Zugabe von 30-50 μM ASS

Die entsprechenden Mittelwerte der Aggregationsmaxima betragen 87,1 % (ohne ASS) und 79,8 % (mit ASS). Hier war die Abnahme des Aggregationsmaximums um 7,3 % geringer als bei Abwesenheit von MAA mit 86,9 % beim Probandenplasma bzw. 63,8 % beim Kontrollpatientenplasma, obwohl ASS (30-50 μM) im Ansatz der Aggregation vorhanden war. Durch Zugabe des auf 3,0 μM MAA verdünnten Patientenplasmas konnte die vollständige Hemmung durch ASS *in vitro* also weitgehend aufgehoben werden.

3.9.2 Versuche mit gesunden Probanden-Thrombozyten (PRP) unter Zugabe von Patientenplasma mit einer MAA-Konzentration von 3,0 μM und dem P_2Y_{12} -Rezeptor-Antagonist Ticagrelor

In diesem Versuch sollte ermittelt werden, ob die Interaktion zwischen ASS und Metamizol nur ASS betrifft. Alternativ könnte Metamizol auch die Inhibition anderer

Plättchenfunktionshemmer aufheben. Exemplarisch wurde dies am Beispiel des P₂Y₁₂-Rezeptorantagonisten Ticagrelor untersucht. In diesem Experiment wurde ADP (10 µM) als Agonist verwendet, um die Aggregation zu induzieren.

Analog zu 3.9.1 wurde anhand des Probandenplasmas zunächst die individuelle Konzentration von Ticagrelor für eine *in vitro* Hemmung der Plättchenfunktion eines jeden Probanden mittels Konzentrations-Wirkungs-Kurve ermittelt (vgl. Abb. 35).

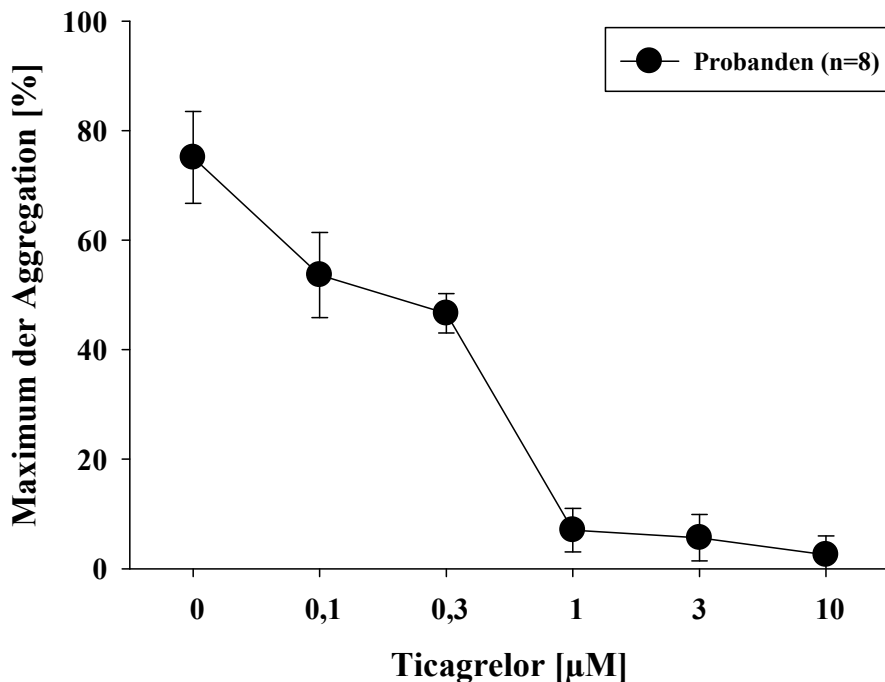


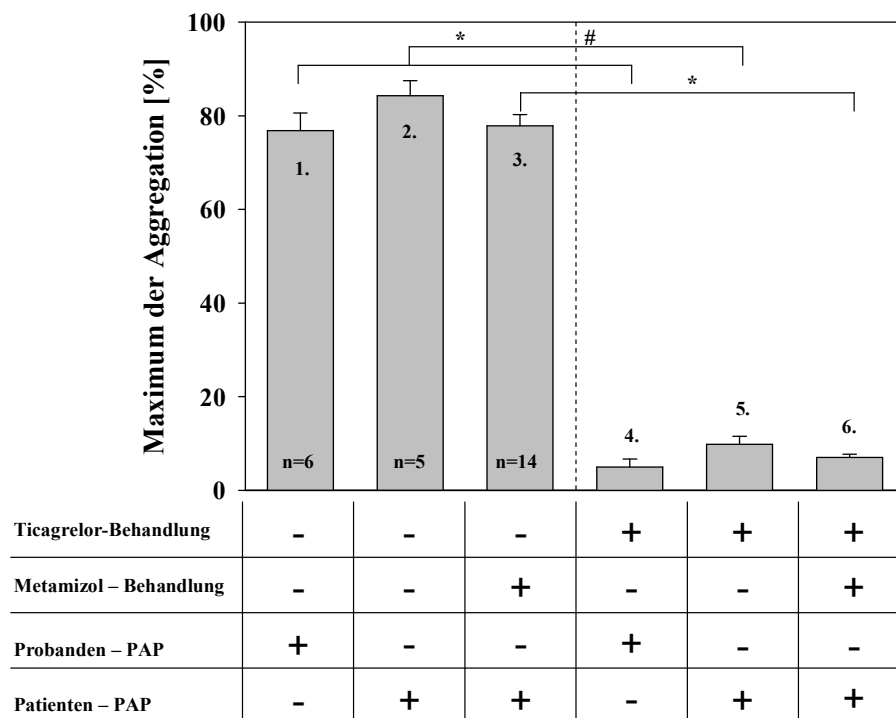
Abb. 35: Konzentrations-Wirkungs-Kurve mit Probandenplasma unter *in vitro* Zugabe von 0 – 0,1 – 0,3 – 1 – 3 – 10 µM Ticagrelor (Stimulation mit 10 µM ADP)

Eine Ticagrelor-Konzentration von 3,0 µM ergab unter den gewählten experimentellen Bedingungen eine annähernd vollständige Hemmung der Aggregation der Thrombozyten gesunder Probanden.

Die Aggregationsversuche (vgl. Abb. 36) ergaben für das Probandenplasma (n=6) ohne Zusatz von Ticagrelor eine Aggregation in Höhe von 76,8 % (erster Balken). Bei *in vitro* Zusatz von Ticagrelor wurde noch ein gemittelt Maximum von 5,0 % (vierte Balken) erzielt (p<0,001).

Im zweiten Versuchsabschnitt (n=5) wurde das Probanden-PRP um das PAP eines Kontrollpatienten ergänzt. Hier ergab sich ein Maximum von 84,3 % (zweiter Balken). Nach Zugabe von Ticagrelor sank das Aggregationsmaximum auf 9,8 % (p=0,002), was sich im fünften Balken darstellt.

In der dritten Versuchsreihe, bei der dem Probanden-PRP das auf 3,0 µM MAA verdünnte Patienten-PAP hinzugegeben wurde, ergab sich ein gemittelt Maximum von 77,9 % (dritter Balken). Nach Hinzufügen des Ticagrelor wurde die Aggregation auf 7,1 % gehemmt (sechster Balken, p<0,001).



(*): $p < 0,001$, (#): $p = 0,002$

Abb. 36: Versuchsreihe zur Thrombozytenaggregation mit Probanden-PRP und Patienten-PAP unter Hinzugabe von $3,0 \mu\text{M}$ Ticagrelor

3.9.3 Versuche mit gesunden Probanden-Thrombozyten (PRP) unter Zugabe von Patientenplasma mit einer MAA-Konzentration von $3,0 \mu\text{M}$ und dem GPIIb/IIIa-Rezeptor-Antagonist Tirofiban

Als alternativer Plättchenfunktionshemmer zu ASS und Ticagrelor sollte Tirofiban in einer ergänzenden Versuchsreihe dazu dienen, einen möglichen Einfluss von Metamizol auf die aggregationshemmende Funktion von Tirofiban herauszuarbeiten. Im Experiment wurde Arachidonsäure (1 mM) als Agonist verwendet, um die Aggregation zu induzieren.

Analog zu 3.9.2 wurde vorab die individuell benötigte Tirofiban-Konzentration mittels Konzentrations-Wirkungs-Kurve bestimmt, um eine annähernd vollständige Hemmung der Plättchenaggregation zu erzielen (vgl. Abb. 37). Dies wurde unter den gewählten experimentellen Bedingungen für eine Tirofiban-Konzentration von $300 \mu\text{M}$ erreicht.

Die Aggregationsversuche (vgl. Abb. 38) mit dem Probandenplasma ($n=3$) ergaben eine Aggregation in Höhe von $79,9 \%$ (erster Balken), welche durch *in vitro* Hinzugabe von Tirofiban nahezu vollständig gehemmt werden konnten mit einem gemittelten Maximum von $3,6 \%$ (vierter Balken, $p < 0,001$).

Im weiteren Versuchsverlauf wurde das Probanden-PAP durch PAP von Kontrollpatienten ersetzt. Dabei stellte sich eine hohe Aggregationsfähigkeit mit einem gemittelten Maximum von $83,3 \%$ (zweiter Balken) dar, welche durch Tirofiban gehemmt werden konnte mit einem Aggregationsmaximum von $6,9 \%$ (fünfter Balken, $p = 0,008$).

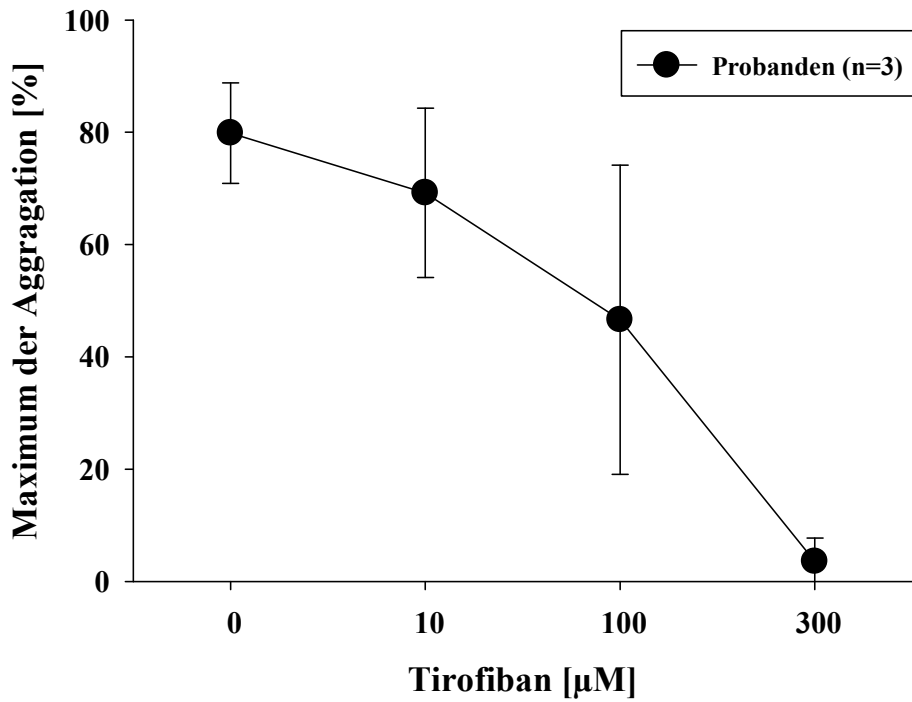
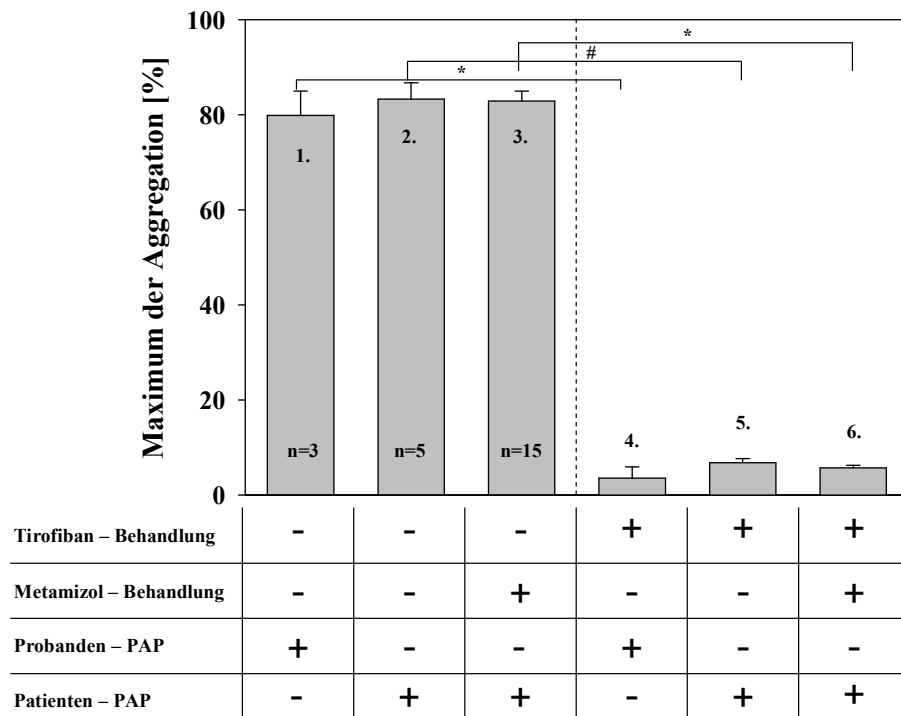


Abb. 37: Konzentrations-Wirkungs-Kurve mit Probandenplasma unter *in vitro* Zugabe von 0 – 10 – 100 – 300 μM Tirofiban (Stimulation mit 1 mM Arachidonsäure)



(*): $p < 0,001$, (#): $p = 0,008$

Abb. 38: Versuchsreihe zur Thrombozytenaggregation mit Probanden-PRP und Patienten-PAP unter *in vitro* Zugabe von 300 μM Tirofiban

Im letzten Versuchsabschnitt wurden die gesunden Probandenplättchen mit PAP von Patienten der Metamizol-Gruppe in einer MAA-Konzentration von 3,0 μM ergänzt, was im Versuch zu einem Aggregationsmaximum von 83,0 % (dritter Balken) führte.

Durch die *in vitro* Zugabe von Tirofiban konnte die Plättchenfunktion hinreichend gehemmt werden (sechster Balken), so dass ein gemittelt Maximum der Aggregation von 5,8 % verblieb ($p < 0,001$).

4 Diskussion

Gemäß den aktuellen, nationalen Versorgungsleitlinien erhalten Risikopatienten, die an einer stabilen, chronischen koronaren Herzkrankheit (KHK) leiden, im Rahmen der Sekundärprävention mit der täglichen Einnahme von 100 mg ASS [55]. Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Patienten, die an einer KHK leiden, wiesen eine dementsprechend hohe Komorbidität auf (vgl. Tabelle 3). So leiden 97 der 99 eingeschlossenen Patienten an arterieller Hypertonie mit Einnahme eines Antihypertensivums. Weitere kardiovaskuläre Risikofaktoren der Patienten sind Diabetes mellitus, Hyperlipoproteinämie oder Nikotin-Abusus. Derartige Begleiterkrankungen führen nicht selten zu Polypharmazie mit oft mehr als 5 Wirkstoffgruppen für einen Patienten. Für den behandelnden Arzt kann es schwer sein, zu beurteilen, inwieweit Wirkstoffe interagieren, im Sinne neuer unerwünschter Arzneimittelwirkungen (UAW) oder in der Beeinträchtigung der angestrebten Wirkung. Weitere Probleme können *Non-Compliance*, gestörte Resorptionsmechanismen, gesteigerte Plättchenhyperreaktivität sowie Polymorphismen bzw. Modifikationen der COX sein.

Diese Arbeit konzentriert sich auf die Beeinträchtigung von Metamizol sowie weiteren Nicht-Opioid-Analgetika auf Acetylsalicylsäure im Rahmen der kardiovaskulären Sekundärprophylaxe. Hier kann es zum Verlust der Wirkung von ASS kommen. Auch wenn im Rahmen der vorliegenden Dissertation Langzeitergebnisse zu kardiovaskulären Ereignissen noch nicht vorliegen, besteht die Möglichkeit, dass hierdurch die Sekundärprävention von kardiovaskulären Ereignissen durch ASS beeinträchtigt wird.

Vor diesem Hintergrund ist es von großer Bedeutung, das Interaktionspotential zwischen den Nicht-Opioid-Analgetika an kardiologischen Patienten zu untersuchen. Im Rahmen der vorliegenden Dissertation konnte gezeigt werden, dass unter analgetischer Behandlung mit Metamizol unter Routinebedingungen die Thrombozytenfunktionshemmung und thrombozytäre Thromboxansynthese durch ASS in erheblichem Maß und statistisch signifikant beeinträchtigt bzw. ganz aufgehoben ist.

4.1 Acetylsalicylsäure als Sekundärprophylaxe für KHK-Patienten vor dem Hintergrund des möglichen Therapieversagens

ASS senkt das Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse um ca. 25 %. Dies hatte eine große systemische Meta-Analyse aus dem Jahre 2002 durch Auswertung von 287 Studien mit mehr als 200.000 Patienten gezeigt [5], welche im Jahre 2009 durch eine erneute Meta-Analyse, die 16 Studien und ca. 17.000 Patienten umfasste, bestätigt wurde [36].

In einer im Jahr 2003 veröffentlichten Studie von Gum et al. wurde in einem Zeitraum von zwei Jahren bei entsprechendem *Follow-up* ein Kollektiv von 326 KHK-Patienten beobachtet, unter denen sich 17 ASS-*Non-Responder* befanden. Diese 17 Patienten hatten ein mehr als dreifach erhöhtes Risiko gegenüber den ASS-*Respondern*, ein kardiovaskuläres Ereignis zu erleiden [56].

Ähnliche Ergebnisse zeigte auch eine Studie von Chen et al. im Jahr 2007. Hier wurden 468 Patienten, die an einer stabilen KHK litten, über ca. 1,5 Jahre hinweg beobachtet. 128 Patienten wurden als ASS-*Non-Responder* detektiert, was einem Anteil von 27,4 % der Studienpopulation entsprach. 15,6 % der 128 ASS-*Non-Responder* erlitten im Beobachtungszeitraum ein koronaremboisches Ereignis entgegen 5,3 % in der ASS-*Responder*-Population. Dabei unterschieden sich die Risikofaktoren sowie die Medikationen zwischen den beiden Gruppen kaum. Lediglich ein höheres Alter, das

weibliche Geschlecht, die chronische Niereninsuffizienz sowie ein niedrigerer Hämoglobinwert fanden sich eher in der Gruppe der *Non-Responder* wieder [57].

Zwei weitere Metaanalysen (Krasopoulos et al. und Snoep et al.) fassten darüber hinaus die Bedeutung der laborchemischen „*ASS-Non-Response*“ zusammen und prüften deren Assoziation mit klinischem Therapieversagen bei KHK. Die Analyse von Krasopoulos et al. ergab, dass bei 28 % von 2930 Patienten, die Teilnehmer 20 analysierter Studien waren, eine Dauermedikation mit *low-dose* ASS nicht die gewünschte antithrombozytäre Wirkung erzielte. Das war mit einem signifikant erhöhten Risiko verbunden, ein kardiovaskuläres Ereignis zu erleiden im Vergleich mit Patienten, die eine effektive Plättchenhemmung durch ASS aufwiesen [10]. Eine ähnliche Meta-Analyse von Snoep et al. kam zu einem entsprechenden Ergebnis. Jedoch variierte in beiden Meta-Analysen das Risiko zwischen den jeweils untersuchten Studien sehr, wahrscheinlich infolge unterschiedlicher Dosierungen, laborchemischer Detektionsverfahren, Komorbiditäten und Komedikationen in den einzelnen Studien [11].

Darüber hinaus hat eine große Multicenter-Studie belegt, dass die 1-Jahres-Mortalität bei Post-Infarkt-Patienten auch unter diskontinuierlicher Wirkung von ASS ansteigt [13].

Zusammenfassend legen diese Studien nahe, dass KHK-Patienten mit nachgewiesener *ASS-Non-Response* durch ein höheres Risiko charakterisiert sind, einen Myokardinfarkt oder cerebrovaskulären Insult zu erleiden, als Patienten, bei welchen eine effektive Hemmung der Thrombozytenfunktion erreicht wird.

4.2 Bedeutung der Interaktion zwischen ASS und nicht-steroidalen Antirheumatika für KHK-Patienten in Bezug auf *ASS-Non-Response*

Die zu Beginn angesprochene Problematik der Polypharmazie bei kardiologischen Patienten ist Grundlage für Interaktionen von ASS mit Metamizol. Beide Wirkstoffe sind in der klinischen Routine seit langem etabliert [58, 59].

Im Jahr 2001 beschrieben Catella-Lawson et al. [17] in einer prospektiv geplanten *Crossover*-Studie an gesunden Probanden die Interaktion zwischen *low-dose* ASS und Ibuprofen. Es stellte sich heraus, dass bei Verabreichen von Ibuprofen vor ASS die Hemmung der Thrombozyten durch ASS aufgehoben wurde. Dagegen ermöglichte eine Einnahme von ASS zwei Stunden vor Ibuprofen die Plättcheninhibition durch ASS. Die Autoren folgerten, dass Ibuprofen den hydrophoben Kanal der COX-1 blockiert und somit die Möglichkeit für ASS, eine dauerhafte Bindung und Acetylierung des Enzyms zu bewirken, aufgehoben wird.

In der vorliegenden Arbeit konnte eine Wechselwirkung zwischen ASS und Ibuprofen nicht bestätigt werden, vermutlich weil das Design entsprechend einer Beobachtungsstudie keine Standardisierung der Einnahme und Dosierung von ASS und Ibuprofen vorsah, um die Behandlung unter klinischen Routinebedingungen zu erfassen. Die in der aktuellen Arbeit relativ geringe Anzahl von Patienten mit n=8 ist für eine Detektion geringer Interaktions-Effekte wahrscheinlich auch zu gering (vgl. Kapitel 3.5).

Viele weitere Studien zeigten ähnliche Interaktionen von ASS und Ibuprofen und auch anderen NSAIDs [60-63]. Eine Untersuchung von Capone et al. im Jahr 2005 [18] beschrieb die Beeinträchtigung der Antiplättchenwirkung von ASS auch durch Naproxen, welches neben direkter (reversibler) Hemmung der COX-1 mit der Wirkung von ASS interferierte. Nach Absetzen von Naproxen erfolgt eine relativ schnelle Regeneration der COX-Aktivität, da die reversible Bindung des Naproxen gelöst wurde, und ASS aufgrund ihrer kurzen HWZ nicht die Möglichkeit bekam, an der zugehörigen Bindungsstelle im hydrophoben Kanal der COX-1 anzudocken.

Demgegenüber zeigte die Arbeit von Catella-Lawson et al. [17], dass es im Hinblick auf die Plättchenhemmung durch ASS keine Interaktion mit Paracetamol und Diclofenac gab. Dies ist mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit insofern vereinbar, als auch an Thrombozyten von Patienten mit Komedikation von *low-dose* ASS und Paracetamol bzw. Diclofenac eine effektive Hemmung von Aggregation und Thromboxansynthese beobachtet wurde (vgl. Kapitel 3.6 und 3.7). Auch Schuijt et al. kamen in einer 2009 veröffentlichten Studie zu dem Ergebnis, dass *ASS-Non-Response* unter Ibuprofen und ASS ungleich häufiger ist als unter Kombination von Diclofenac und ASS [19]. Begründet wurde dies mit einer geringeren Affinität von Diclofenac zur COX-1, was diese Autoren durch die geringere Thromboxansynthesehemmung im Vergleich mit Ibuprofen begründeten [64].

Die folgende Tabelle gibt eine Übersicht über die Arbeiten, die die Interaktion zwischen NSAID und ASS als mögliche Ursache einer *ASS-Non-Response* untersucht haben:

Autoren	Titel	Journal
Catella-Lawson, F., et al.	<i>Cyclooxygenase inhibitors and the antiplatelet effects of aspirin</i>	N Engl J Med, 2001. 345(25): p. 1809-17
Rao, G.H., et al.	<i>Ibuprofen protects platelet cyclooxygenase from irreversible inhibition by aspirin</i>	Arteriosclerosis, 1983. 3(4): p. 383-8
MacDonald, T.M. and L. Wei	<i>Effect of ibuprofen on cardioprotective effect of aspirin</i>	Lancet, 2003. 361(9357): p. 573-4
Gengo, F.M., et al.	<i>Effects of ibuprofen on the magnitude and duration of aspirin's inhibition of platelet aggregation: clinical consequences in stroke prophylaxis</i>	J Clin Pharmacol, 2008. 48(1): p. 117-22
Gladding, P.A., et al.	<i>The antiplatelet effect of six non-steroidal anti-inflammatory drugs and their pharmacodynamic interaction with aspirin in healthy volunteers</i>	Am J Cardiol, 2008. 101(7): p. 1060-3
Capone, M.L., et al.	<i>Pharmacodynamic interaction of naproxen with low-dose aspirin in healthy subjects</i>	J Am Coll Cardiol, 2005. 45(8): p. 1295-301
Schuijt, M.P., et al.	<i>The interaction of ibuprofen and diclofenac with aspirin in healthy volunteers</i>	Br J Pharmacol, 2009. 157(6): p. 931-4
Van Hecken, A., et al.	<i>Comparative inhibitory activity of rofecoxib, meloxicam, diclofenac, ibuprofen, and naproxen on COX-2 versus COX-1 in healthy volunteers</i>	J Clin Pharmacol, 2000. 40(10): p. 1109-20
Hohlfeld, T., et al.	<i>Pyrazolinone analgesics prevent the antiplatelet effect of aspirin and preserve human platelet thromboxane synthesis</i>	J Thromb Haemost, 2008. 6(1): p. 166-73

Tabelle 5: Tabellarische Übersicht ausgewählter Untersuchungen zur Interaktion zwischen *low-dose* ASS und NSAID als Ursache für *ASS-Non-Response*

Die dargestellten Arbeiten belegen die zentrale Bedeutung der Interaktion zwischen vielen, wenn auch nicht allen NSAIDs und ASS. Die Untersuchungen zeigen übereinstimmend, dass die Hemmung der Thrombozytenfunktion durch ASS bei Begleittherapie mit NSAID-Analgetika aufgehoben sein kann. Wie weiter oben erläutert, kann dies die Sekundärprävention kardiovaskulärer Ereignisse durch ASS in Frage stellen.

4.3 Interaktion von Metamizol mit der Thrombozytenaggregationshemmung durch ASS

Das zur Gruppe der Pyrazole zählende Metamizol wird an dieser Stelle separat betrachtet, weil es nicht in die Gruppe der nicht-steroidalen Antirheumatika gehört. Die vorliegende Untersuchung bestätigt, dass auch Metamizol die Thrombozytenfunktionshemmung durch ASS erheblich beeinträchtigen oder aufheben kann.

Hohlfeld et al. hatten im Jahr 2008 erstmalig beschrieben, dass Metamizol und andere Pyrazole, wie zum Beispiel Propyphenazon, *in vitro* die Hemmung der Plättchenfunktion durch ASS abschwächt oder ganz verhindert [21]. Aus *molecular-modeling* Analysen wurde geschlossen, dass 4-Methylaminoantipyrin (MAA), der aktive Metabolit des Metamizol, den Substratkanal der COX-1 besetzt und damit die Bindungsstelle von ASS blockiert. Dies wird auch dadurch bestätigt, dass Metamizol selbst in hoher Konzentration, ähnlich den NSAID-Analgetika, die COX-1 reversibel hemmt und eine eigene plättchenhemmende Wirkung besitzt [65]. Die Interaktion wurde bereits in Konzentrationen von MAA beobachtet, die die Thrombozytenfunktion nicht oder nur geringfügig hemmen [21].

Die vorliegende Arbeit konzentriert sich auf die Überprüfung der *in vitro* gezeigten Interaktion in einem kardiologischen Krankengut mit KHK unter Alltagsbedingungen im Rahmen einer Beobachtungsstudie unter klinischen Alltagsbedingungen. Hier ist eine hinreichende Hemmung der Plättchenfunktion essentiell für die Sekundärprävention kardio- und cerebrovaskulärer Ereignisse.

Das erzielte Ergebnis war beeindruckend: Von 36 KHK-Patienten, welche *low-dose* ASS in Kombination mit Metamizol erhielten, wiesen 18 Patienten (50%) trotz regelmäßiger Einnahme von ASS eine herabgesetzte bzw. gar keine Hemmung der Plättchenfunktion (Arachidonsäure induzierte Aggregation) und der thrombozytären Thromboxansynthese auf (vgl. Abb. 20 und 21). Diese Parameter der Thrombozytenaktivierung spiegeln die Cyclooxygenase-abhängige Aktivierung der Thrombozyten wieder und werden unter Dauertherapie mit *low-dose* ASS zu mindestens 90 % gehemmt [66]. Folglich ist hier von einer „*Non-Response*“ gegenüber ASS auszugehen. Die TXB₂-Konzentrationen im Plasma der KHK-Patienten, die zur ASS-Dauermedikation Metamizol einnahmen, waren statistisch signifikant höher als die der Kontroll-Gruppe unter alleiniger ASS-Einnahme (vgl. Abb. 20 und 21). Analog waren die Aggregationsmaxima signifikant höher in der Patientengruppe mit der Kombination aus ASS und Metamizol im Vergleich mit der Kontrollgruppe ohne Metamizol (vgl. Abb. 20). Selbst unter *in vitro* Zugabe von 30 bzw. 100 µM ASS ließen sich die Thromboxansynthese und Aggregation nicht vollständig hemmen. In der vorliegenden Arbeit wurde als aggregierender Agonist zur *in vitro* Stimulation der Thrombozyten Arachidonsäure gewählt. Diese aktiviert Thrombozyten ausschließlich TXA₂-abhängig. Insofern kann angenommen werden, dass die *Non-Response* gegenüber ASS auf dem Verlust der thrombozytären Sensitivität gegenüber ASS beruht.

Um experimentell zu überprüfen, dass bei den ASS-*Non-Respondern* unter Metamizol die thrombozytäre Aktivierung und Aggregation thromboxanabhängig und nicht durch andere Aktivierungswege (ADP, Thrombin, etc.) erfolgte, wurden alle zur Verfügung stehenden Plasmaproben *in vitro* auch mit dem TXA₂-Rezeptor-Antagonist und Thromboxansynthase-Hemmer Terbogrel inkubiert und anschließend mit Arachidonsäure stimuliert. Dies führte zu einer nahezu vollständigen Hemmung von Thromboxansynthese und Aggregation (vgl. Abb. 21). Dies bestätigt, dass die Thrombozytenaktivierung im PRP von Metamizol behandelten Patienten ausschließlich thromboxanabhängig erfolgte.

Hier stellt sich allerdings noch die Frage, warum „nur“ 50 % der Patienten mit Metamizol-Gebrauch ASS-*Non-Responder* waren. Eine mögliche Antwort darauf könnte die in dieser Beobachtungsstudie variierende Applikationsart und -Dosis sein, sowie das Darreichungsintervall des Metamizols. 75 % der Patienten erhielten das Metamizol in Tropfenform dargereicht, welche unter anderem bei Bedarf eingenommen wurden, so dass eine kontrollierte und zeitlich regelmäßige Einnahme, analog einer prospektiven klinischen Prüfung, hier nicht gegeben war (vgl. 3.1.1). Dies mag ein Nachteil des Studiendesign einer Beobachtungsstudie sein. Andererseits spiegelt eine Beobachtungsstudie die reale klinische Situation der Routinebehandlung wider.

Angesichts der variierenden Dosierungen und Einnahmezeitpunkte konnte keine Korrelation zwischen den Darreichungsformen (Tropfen, Tabletten), der Einnahmehäufigkeit sowie der Dosierung von Metamizol und der *Non-Response* gegenüber ASS nachgewiesen werden. Inwieweit diese Faktoren Einfluss auf die *ASS-Non-Response* haben wird Gegenstand zukünftiger Studien sein.

4.4 Weitere Erklärungsansätze der *ASS-Non-Response*

4.4.1 *ASS-Non-Compliance*

Außerhalb des klinisch stationären Aufenthaltes gibt es wenig praktikable Möglichkeiten, die kontinuierliche Einnahme von ASS zuverlässig zu überwachen.

Eine Studie von Newby et al. aus dem Jahr 2006 hatte gezeigt, dass nur 20 % der befragten KHK-Patienten außerhalb des klinischen Aufenthaltes ihre verordnete Wirkstoffkombination (ASS, β -Blocker, Statine) regelgerecht eingenommen hatten [67]. Ho et al. beschrieben in ihrer Multicenter-Studie aus dem Jahr 2006, dass nur zwei Drittel der 1521 eingeschlossenen Patienten einen Monat nach Entlassung ihre Medikation (ASS, β -Blocker, Statine) noch vollständig einnahmen. 12,1 % gaben an, sogar keines der drei genannten Medikamente mehr einzunehmen, wohingegen 3,7 % auf zwei der drei Präparate verzichteten. Und 17,9 % haben einen Wirkstoff ohne ärztliche Rücksprache ausgesetzt. Die Arbeit zeigte darüber hinaus, dass die *Compliance* für kardiovaskuläre Arzneimittel erheblich von Lebensumständen und Komorbidität abhängt [13]. Insofern ist die *Compliance* gegenüber ASS grundsätzlich auch als Ursache für *ASS-Non-Response* in der vorliegenden Arbeit zu diskutieren.

Jedoch ist die in dieser Arbeit beobachtete *ASS-Non-Response* durch *Non-Compliance* schwer zu erklären, da bei den berücksichtigten Patienten mittels täglicher Dispensierung und Überwachung der Einnahme von ASS durch das Pflegepersonal eine Therapie-Überwachung stattfand. Des Weiteren müssten sich ähnliche *Non-Responder*-Raten in den anderen NSAID-Gruppen abbilden. Durch den *in vitro*-Nachweis des pharmakodynamischen Interaktionsmechanismus kann *Non-Compliance* in dieser Arbeit als Ursache der *Non-Response* weitgehend ausgeschlossen werden.

Die *Non-Compliance* bleibt dennoch ein schwer zu beeinflussender Faktor. Die intensivierete Patientenschulung in Form von prägnanter und leicht verständlicher Patienteninformation durch den Hausarzt sowie die regelmäßige Evaluation der Einnahme der Medikation sind ein Ansatz, den es zu verfolgen und im Verlauf zu beurteilen gilt.

4.4.2 Erhöhter Thrombozytenumsatz/-verbrauch

Die Halbwertszeit der Umsetzung von Acetylsalicylsäure zu Salicylsäure ist mit 15 bis 20 Minuten kurz. Das bedeutet, dass im Dosierungsintervall (üblicherweise 24 Stunden) funktionstüchtige Thrombozyten neu gebildet werden, die im zirkulierenden Thrombozytenpool eine aktive (Thromboxan synthetisierende) Subfraktion darstellen.

Di Minno et al. hatten 2011 gezeigt, dass schon 4 bis 6 Stunden nach der letzten Einnahme von ASS erste Plättchen detektiert werden konnten, die eine funktionsfähige COX besaßen und sich demzufolge an der Aggregatbildung beteiligen konnten [68].

Bei Patienten, die an einer Diabetes mellitus assoziierten Angiopathie litten, war die Neubildungsrate der aggregationsfähigen Thrombozyten erhöht und der Anteil der inaktivierten Plättchen an der Gesamtplättchenzahl trotz täglicher Einnahme von Acetylsalicylsäure vermindert [69, 70]. Es konnte darüber hinaus nachgewiesen werden,

dass bei Patienten mit metabolischem Syndrom eine Heraufregulation von Oberflächenmolekülen wie P-Selektin und GPIIb/IIIa stattfindet [71]. Des Weiteren konnten erhöhte Konzentrationen von löslichem P-Selektin und CD40-Liganden nachgewiesen werden als biochemischer Marker erhöhter Plättchenaktivität [72]. Ergänzend wurde gezeigt, dass im Rahmen einer diabetischen Stoffwechselerkrankung vermehrt AGE (*advance glycation end products*) gebildet werden, die an der vermehrten Produktion von proinflammatorischen Zytokinen beteiligt sind bei Herabsetzung der endothelialen NO-Synthese [73, 74].

Smith et al. beschrieben in einer 2012 veröffentlichten Studie, dass mit ASS therapierte KHK-Patienten, die an einem metabolischen Syndrom litten, ein signifikant höheres Serum-TXB₂ aufwiesen als die KHK-Patienten, die nicht an einer begleitenden Stoffwechselstörung erkrankt waren. Dies wurde auf eine erhöhte Thrombozytengesamtzahl bei erhöhter Neubildungsrate zurückgeführt [70].

In der vorliegenden Arbeit litten sowohl in der Kontroll-Gruppe als auch in der Metamizol-Gruppe ungefähr ein Drittel der Patienten an Diabetes mellitus. Von den 11 Diabetikern in der Metamizol-Gruppe waren bei 8 die Thrombozyten ausreichend hemmbar, drei waren ASS-Non-Responder. In der Kontroll-Gruppe waren alle 13 Diabetiker durch ihre tägliche ASS-Medikation angemessen in ihrer Plättchenfunktion gehemmt (Abb. 23 und 24). Die Aggregationsmaxima der Diabetiker-Subgruppe mit Metamizoltherapie waren im Vergleich mit den Ergebnissen der Diabetiker aus der Kontroll-Gruppe signifikant höher ($p < 0,001$). Diese Ergebnisse legen nahe, besonders aufmerksam im Hinblick auf eine mögliche ASS-Non-Response bei KHK-Patienten mit der Komorbidität Diabetes mellitus im Rahmen der plättchenhemmenden Therapie zu sein.

4.4.3 Thrombozytenhyperreaktivität

Im Jahr 2012 beschrieben Martin et al. eine genetische Variation der Megakaryozyten bei KHK-Patienten, die ein akutes Koronarsyndrom erlitten hatten. Diese Zellen schnüren größere und Granula-dichtere Thrombozyten ab, die sich durch eine erhöhte Reaktivität auf Agonisten auszeichneten [75]. Ob makrozytäre Thrombozyten durch die tägliche Dosis von 100 mg ASS ausreichend in ihrer Funktion gehemmt werden können oder durch ihre Hyperreaktivität zur ASS-Non-Response beitragen, ist derzeit nicht beantwortet.

Calverley et al. beschrieben 2002, dass eine Sensibilisierung des thrombozytären Kollagenrezeptors GP VI im Rahmen eines kardiovaskulären Ereignisses stattfindet, was wiederum als Erklärung der Plättchenhyperreaktivität dient. Es bestand eine positive Korrelation zwischen dem Schweregrad des Ereignisses sowie der Anzahl der kardiovaskulären Risikofaktoren und dem Grad der Plättchensensibilisierung [76].

4.4.4 Genpolymorphismen bzw. Mutationen der Cyclooxygenase-1

2003 veröffentlichten Halsuhka et al. eine Arbeit, in der 38 gesunde Probanden auf funktionelle und genetische Polymorphismen der COX-1 untersucht wurden [42]. Die Autoren fanden, dass die Single-Nukleotid-Polymorphismen A-842G und C50T in einem vollständigen Bindungsungleichgewicht stehen. Dies hatte zur Folge, dass Probanden, die heterozygot für den A-842G/C50T Haplotyp waren, eine effektiver hemmbare Prostaglandinsynthese durch *in vitro* Addition von ASS aufwiesen, als Probanden, die homozygot für diesen Merkmalstyp waren.

Lordkipanidzé et. al beschrieben 2011 die 1622A/G-Mutation des P2RY1-Gens, welche zu einer inadäquaten Hemmung der Plättchenfunktion führte, definiert als eine Arachidonsäure induzierte Plättchenaggregation größer 20 % trotz ASS-Einnahme [77]. Weitere Genmutationen und Polymorphismen, die die Cyclooxygenase-1 betreffen, wurden in der Literatur beschrieben. Die zuvor genannten Mutationen stehen beispielhaft für weitere, mögliche Abweichungen im Genom der Cyclooxygenase. Inwieweit die Detektion dieser genetischen Variationen Bedeutung im klinischen Alltag hat, bleibt abzuwarten.

4.4.5 Intra- und interindividuelle Variabilität der pharmakokinetischen Eigenschaften von ASS

Nach einer einmaligen Dosis ASS wird nach ca. einer Stunde die maximale Plasmakonzentration erreicht [66]. Durch einen *First-Pass*-Effekt ergibt sich so eine orale Bioverfügbarkeit von im Mittel 50 %.

Benedek et al. untersuchten 1995 in einer kleinen Studie an 10 gesunden männlichen Probanden die individuellen Unterschiede der Pharmakokinetik und Pharmakodynamik oraler ASS-Gabe. Die maximale Plasmakonzentration sowie die Bioverfügbarkeit zeigten hier auffallend große individuelle Schwankungen. Eine unzureichende Thrombozytenaggregation war mit einer niedrigen Plasmakonzentration assoziiert [14].

Rocca et al. kamen zu ähnlichen Ergebnissen und führten mehrere Ursachen für eine variierende Bioverfügbarkeit an [78]. Als Grund für eine niedrige Bioverfügbarkeit wurde ein verstärkter First-Pass-Effekt ermittelt, insbesondere bei übergewichtigen Patienten. Vermehrtes Körperfett reguliert die leberspezifische humane Carboxylesterase-1 (HCE-1) herauf. Folglich wird ASS verstärkt deacetyliert und somit inaktiviert, bevor es den systemischen Blutkreislauf erreicht [79]. Des Weiteren werden Cytochrom-P450-Enzyme und die Phase-II-Konjugation verstärkt aktiviert.

Auch beeinflusst die Galenik die Bioverfügbarkeit der Acetylsalicylsäure. So werden magensaftresistente ASS-Tabletten im Duodenaltrakt aufgrund des alkalischen Milieus und der lokalen Carboxylesterasen vermindert resorbiert bzw. vermehrt inaktiviert. Dies führt zu einer niedrigeren Bioverfügbarkeit [80]. In der aktuellen Arbeit wurde jedoch nicht nach den verschiedenen Galenikformen unterschieden.

Im Umkehrschluss konnten Benedek et al. jedoch nicht belegen, dass eine geringe systemische Verfügbarkeit der Acetylsalicylsäure auch eine unzureichende Hemmung der Thrombozyten zur Folge hat. Nur 4 von 10 Proben mit geringer Plasmakonzentration zeigten auch eine unzureichende Aggregation. So rückt die Bedeutung der variierenden Pharmakokinetik als Begründung der *ASS-Non-Response* in den Hintergrund.

4.4.6 COX-1-unabhängige TXA₂-Synthesewege

Metabolische Störungen (Hypercholesterinämie [81], Diabetes mellitus [82], viszerale Adipositas, Hyperhomocysteinämie, etc.) sowie arterielle Hypertonie und Nikotin-Abusus [83] führen zur Arteriosklerose als chronisch inflammatorischen Prozess. Nahezu alle Probanden, die in die vorliegende Arbeit eingeschlossen wurden, litten gemäß den Einschlusskriterien mindestens an einem der oben genannten pathologischen Faktoren.

Damit eng verknüpft können aus freien Radikalen und der Lipidperoxidation auf nicht-enzymatischem Weg aus Arachidonsäure Isoprostane wie das 8-iso-PGF_{2α} generiert werden. In Anwesenheit von ADP, Kollagen oder Arachidonsäure in geringen Konzentrationen können so Isoprostane eine irreversible Plättchenhemmung triggern [84].

Cipollone et al. konnten im Jahr 2000 keinen signifikanten Unterschied in der Urin-Konzentration von 8-iso-PGF_{2α} zwischen den mit *low-dose* ASS behandelten und den nicht mit ASS behandelten Patienten mit stabiler KHK zeigen. Allerdings traten parallel signifikante Konzentrationsunterschiede des TXB₂ im Urin auf [85], was die oben formulierte Aussage der nicht-enzymatisch generierten Isoprostane als Trigger der irreversiblen Plättchenhemmung von Davi et al. aus dem Jahr 2007 stützte.

Schrör, Huber und Hohlfeld wiesen in einer Übersichtsarbeit auf eine lineare Beziehung zwischen der Urin-Konzentration des DH-TXB₂ und Isoprostanen in Patienten mit einer instabilen KHK hin, die eine tägliche antithrombozytäre Medikation von 100 mg ASS erhielten, im Vergleich zu Patienten mit einer stabilen KHK unter ASS-Therapie. Dies legte nahe, dass eine COX-1 unabhängige TXA₂-Synthese mit dem Schweregrad der kardiovaskulären Erkrankung korrelierte [40].

Da in der vorliegenden Arbeit keine Konzentrationsbestimmungen zum 8-iso-PGF_{2α} bzw. DH-TXB₂ vorgenommen wurden, kann dies hier nicht verifiziert werden. Auch wird in der Literatur die Beteiligung der Isoprostane an einer ASS-*Non-Response* kontrovers diskutiert [85].

Ein weiterer wichtiger Aspekt ist die Heraufregulation der COX-2 in Endothelzellen und Monozyten bzw. Makrophagen durch den chronisch inflammatorischen Prozess [86]. Bei hoher Affinität der Acetylsalicylsäure zur COX-1 können die kernhaltigen Zellen mittels COX-2 den Thrombozyten das Prostaglandin H₂ transzellulär zur Verfügung stellen, was die COX-1 gehemmten Blutplättchen wiederum zur TXA₂-Synthese verwenden können.

Durch die Verwendung von thrombozytenreichem Plasma in der vorliegenden Arbeit wurde der Kontakt zu Endothelzellen und Blutzellen weitgehend ausgeschlossen. Insofern war die Möglichkeit des transzellulären Metabolismus zwischen Endothel oder anderen vaskulären Zellen einerseits und Thrombozyten andererseits als Ursache für die hier beobachtete *Non-Response* gegenüber ASS weitgehend ausgeschlossen.

4.5 Evaluation der verschiedenen Biomarker zur Bestimmung der Thrombozytenfunktion im Hinblick auf die Validität der ASS-*Non-Response*

Durch die verschiedenen Möglichkeiten zur Messung der Plättchenfunktion stellte sich die Frage, wie sensitiv diese Tests in der qualitativen Darstellung der durch ASS erreichten Funktionshemmung waren, auch im Hinblick auf die Detektion von ASS-*Non-Respondern*. Lordkipanidzé et al. hatten im Jahr 2007 anhand von 201 Patienten, die an einer stabilen KHK litten, die geringe Korrelation der Messverfahren zu einander dargestellt, wenn es um die Identifikation von ASS-*Non-Respondern* geht. So variierte die Prävalenz der ASS-*Non-Response* zwischen 2,8 % und 59,5 %. Das Ergebnis von Lordkipanidzé et al. deckte sich mit der ASPECT Studie, in der Gurbel et al. ebenfalls große Varianzen in der Detektion der ASS-*Non-Response* zeigten [87]. Als Hauptgrund führten Lordkipanidzé et al. die unterschiedlichen Grenzwerte der jeweiligen Tests an, die keiner allgemeingültigen klinischen Validierung unterlagen [88].

Die in der vorliegenden Dissertation angewendete Methode der Turbidimetrie nach Born, mit Arachidonsäure als Stimulus thrombozytären Thromboxansynthese, verwandten Lordkipanidzé et al. als Referenzverfahren, welche in der Literatur mitunter als „Goldstandard“ beschrieben wurde [89, 90]. Kritisch betrachtet hat diese Methode, wie jeder andere Laborassay der Thrombozytenfunktion, den Nachteil, dass durch Venenpunktion die zu untersuchenden Thrombozyten aus ihrer natürlichen Umgebung (Blut, Gefäßwand) entfernt und so der physiologischen Umgebung entzogen werden. Es besteht auch die Möglichkeit, dass labile Faktoren wie Prostazyklin oder Stickstoffmonoxid (NO) bei der Aufbereitung des plättchenreichen Plasmas inaktiviert

werden, so dass die *in vitro* gemessene Plättchenaktivität die Verhältnisse *in vivo*, einschließlich der antiaggregatorischen Wirkung der ASS-Therapie, unter Umständen nicht korrekt abbildet [91]. Immerhin bleibt bei der Verwendung von thrombozytenreichem Plasma das physiologische Milieu hinsichtlich pH-Wert, Protein- und Elektrolytzusammensetzung sowie Temperatur während der Messung erhalten.

Die Vollblutaggregation eröffnet zwar die Möglichkeit, plättchenhemmende Effekte in einem physiologischeren Umfeld zu messen, jedoch ist die Interpretation hier dadurch erschwert, dass keine optische Erfassung der Plättchenaggregation mehr möglich ist. Die Vollblutaggregation basiert auf der Messung der elektrischen Leitfähigkeit, so dass hier Elektrodenoberflächen und elektrischer Stromfluss eine artifizielle Umgebung darstellen. Weitere Methoden, wie PFA-100[®] und VerifyNow Aspirin[®] beruhen auf der Thrombozytenaktivierung durch Scherkraft bzw. Agglutination von Partikeln. Sie werden zwar auch weithin verwendet, beinhalten aber ebenfalls Artefakte und liefern untereinander und mit anderen Verfahren wenig kongruente Ergebnisse [40, 88]. Im Vergleich zur Lichttransmissions-Aggregometrie deckt das PFA-100[®]-System eine wesentlich höhere Zahl an *Non-Respondern* auf, wahrscheinlich weil die hier erfassten Thrombozytenfunktionsparameter generell wenig sensitiv gegenüber der Hemmung der thrombozytären Thromboxansynthese durch ASS sind [88].

Mit der Durchflusszytometrie, die mittels monoklonaler Antikörper Veränderungen thrombozytärer Oberflächenmoleküle detektiert, kann man ebenfalls Rückschlüsse auf die Plättchenaktivität ziehen, weniger aber auf die Aktivierbarkeit der Plättchen [40]. Hohlfeld et al. konnten in einer früheren Arbeit mittels Durchflusszytometrie die Interaktion zwischen ASS und Metamizol aufzeigen. Dies geschah in Form von Messung der Expressionshemmung von P-Selektin auf der Thrombozytenoberfläche durch ASS [21].

Ein interessanter Ansatz zur Bestimmung der ASS-Wirkung auf die Thromboxansynthese *in vivo* ist die Bestimmung des 11-DH-TXB₂ im Urin. Allerdings unterliegt es, als eines von mehr als 20 Metaboliten des TXA₂, einer großen interindividuellen Variationsbreite. Zudem wird es durch Umweltfaktoren wie dem Rauchen beeinflusst. Des Weiteren produzieren COX-2 exprimierende Monozyten oder Endothelzellen das 11-DH-TXB₂, so dass nicht differenziert werden kann, welcher Anteil der COX-1 zu zuordnen ist [40].

Unter den vielen vorgenannten Methoden wurden im Rahmen der vorliegenden Dissertation die Lichttransmissions-Aggregometrie und die Bestimmung der Arachidonsäure-induzierten Thromboxansynthese ausgewählt, weil zum einen das Messverfahren am ehesten die Prävalenz der *Non-Response* abbildet [88, 92]. Die Arachidonsäure-induzierte *in vitro* Plättchenstimulation bildet am ehesten die chemische Reaktion unter natürlichen Voraussetzungen ab [40]. Zum anderen ist TXB₂ ein anerkannt, zuverlässiger und thrombozytenspezifischer Biomarker zur Beurteilung der ASS-Wirkung, da der Hauptwirkungsmechanismus von ASS auf der Hemmung der Thromboxansynthese beruht.

4.6 Pharmakologische Hemmung der Thrombozytenfunktion über COX-1-unabhängige Aktivierungswege

Vor dem Hintergrund der in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse schließt sich die Frage nach pharmakologischen Alternativen an, durch die eine effektive Hemmung der Plättchenfunktion erreicht werden kann, wenn Nicht-Opioid-Analgetika wie Metamizol mit dessen antithrombozytärer Wirkung interferieren. Andere Ansätze für die Hemmung der Thromboxan-induzierten Plättchenaktivierung sind die Hemmung des thrombozytären Enzyms Thromboxansynthase oder die Antagonisierung an thrombozytären Thromboxanrezeptoren. Eine Substanz, die beide pharmakologischen Eigenschaften mit

etwa vergleichbarer Potenz besitzt ist Terbogrel. Die Ergebnisse dieser Dissertation haben gezeigt, dass Terbogrel auch dann die Thrombozytenfunktion vollständig hemmt, wenn infolge der Interaktion mit Metamizol durch ASS keine Plättchenhemmung erreicht wird (vgl. Abb. 19 und 21). Die duale, hemmende Wirkungsweise dieser Substanz auf die Thromboxan-induzierte Plättchenaktivierung [93] wurde durch eine klinische Studie im Rahmen der Behandlung einer primär pulmonal arteriellen Hypertonie überprüft, musste aber wegen Nebenwirkungen früh beendet werden [94]. Eine im Jahr 2004 veröffentlichte Studie mit gesunden männlichen Probanden (n=80) konnte einen dosisabhängigen antithrombozytären Effekt mit erhöhter Prostazyklinfreisetzung bei geringem Nebenwirkungsprofil beschreiben, was Terbogrel zu einer möglichen Alternative in der antithrombozytären Therapie machen könnte [95]. Leider wurde diese Substanz jedoch nicht weiterentwickelt.

In dieser Arbeit wurde zur Überprüfung der Selektivität der ASS-*Non-Response* auf den Thrombozytenfunktionshemmer Ticagrelor (Brilique™) zurückgegriffen. Dieses Cyclopentyltriazolopyrimidin (CPTP) ist ein Inhibitor thrombozytärer P₂Y₁₂-Rezeptoren. Im Vergleich zu Clopidogrel zeigt Ticagrelor eine höhere Reduktion der kardiovaskulären Mortalität und Myokardinfarkten, dagegen nicht von Schlaganfällen [96]. In aktuellen Leitlinien wird Ticagrelor in Kombination mit ASS unter der Abwägung des Blutungsrisikos bei Behandlung des Akuten Koronarsyndroms dem Clopidogrel vorgezogen.

Unter diesem Gesichtspunkt konnte die vorliegende Dissertation *in vitro* zeigen (vgl. 3.9.2, Abb. 36), dass auch bei ASS-*Non-Respondern* unter Metamizol Ticagrelor eine effektive Plättchenhemmung erreicht. Auch dieser Befund bestätigt, dass die Interaktion mit Metamizol nur ASS, jedoch nicht andere Plättchenfunktionshemmer betrifft. Allerdings stellt Ticagrelor keine Alternative zu ASS dar, denn diese Substanz wurde nur in der Kombination mit ASS geprüft. Bisher fehlen Studien, die den Ersatz von ASS durch andere Plättchenfunktionshemmer analog der CARPIE-Studie (Clopidogrel) evaluieren [97].

Das Tirofiban (Aggrastat®) als weitere Alternative der Thrombozytenfunktionshemmung zeichnet sich durch seinen schnellen Wirkungseintritt (ungefähr 30 Minuten nach intravenöser Applikation ist 90 % der Thrombozytenfunktion gehemmt) und der kurzen Halbwertszeit aus. Es wird in der Therapie der instabilen Angina pectoris bzw. unter einer perkutanen koronaren Intervention ausschließlich als Infusionslösung eingesetzt. Die PRISM-Studie hat eine Risikoreduktion von 33 % durch die Kombination von Tirofiban und ASS gegenüber Heparin und ASS in den Endpunkten Tod, Myokardinfarkt und refraktäre Ischämie gezeigt [98]. Auch die PRISM-PLUS-Studie bestätigte diese Aussage [99].

In der *in vitro* Versuchsreihe zum selektiven GPIIb/IIIa-Rezeptor-Antagonist Tirofiban (vgl. 3.9.3) konnte die pharmakologische Wirkung unabhängig der Wechselwirkung zwischen ASS und Metamizol experimentell gezeigt werden (vgl. Abb. 38). Die Hemmung der Plättchenfunktion durch Tirofiban blieb trotz vorheriger Inkubation des PRP mit Plasma (PAP) von Metamizol-behandelten Patienten erhalten. Auch Tirofiban ist jedoch kein gleichwertiger Ersatz für ASS in der Monotherapie zur Sekundärprophylaxe. Zum einen ist es nur als Infusionslösung zur intravenösen Applikation erhältlich und zum anderen haben Studien wie die RESTORE-Studie keine kardiovaskuläre Risikoreduktion für diese Substanzgruppe gezeigt [100]. Die klinische Wirksamkeit ist nur für die Kombination mit ASS bei akutem Koronar-Syndrom belegt. GPIIb/IIIa-Rezeptor-Antagonisten stellen daher ebenfalls keine alternative zu ASS dar. Weitere Studien haben für die GPIIb/IIIa-Rezeptor-Antagonisten Orbofiban [101] und Xemilofiban [102] gegenüber ASS eine höhere kardiovaskuläre Mortalität gezeigt.

4.7 Schlussfolgerungen zur Sicherstellung der antithrombozytären Therapie unter Risikominimierung der Entwicklung einer ASS-Non-Response

In der vorangegangenen Diskussion ist die Stellung von ASS in der Sekundärprävention von kardio- bzw. cerebroembolischen Ereignissen mehrfach verdeutlicht worden. Obwohl es diverse Möglichkeiten zur pharmakologischen Plättchenhemmung gibt, sind diese nach Abwägung des Risiko-Nutzen-Profiles gegenüber ASS nicht gleichwertig.

Ebenso wenig sind NSAIDs und das Pyrazol Metamizol in der heutigen analgetischen sowie antiphlogistischen und antipyretischen Therapie sowohl im klinischen als auch im ambulanten Bereich zu ersetzen, aufgrund der guten analgetischen Wirkung und gastrointestinalen Verträglichkeit von Metamizol bei nur wenigen Kontraindikationen (vgl. 1.7). Dies belegt eine ungebrochene und eher noch steigende Verordnungszahl in der BRD (vgl. 1.0). Folglich muss in zukünftigen Untersuchungen nach Wegen gesucht werden, die eine Kombination von ASS und Analgetika wie Metamizol ohne Interaktion ermöglichen.

Eine kurzfristige, gleichzeitige Einnahme von ASS und Metamizol für wenige Tage ist möglicherweise weniger gravierend, weil die Wirkung von ASS wegen des irreversiblen Wirkungsmechanismus über mehrere Tage anhält [103].

Auch eine zeitlich versetzte Einnahme der um den Substratkanal der COX-1 konkurrierenden Wirkstoffe kann eine unerwünschte Arzneimittelwechselwirkung im Sinne der *ASS-Non-Response* minimieren. Unter Beachtung der jeweiligen Pharmakokinetik sollte ASS in der Medikationsplanung jedes Patienten zwei Stunden vor einem NSAID bzw. Metamizol genommen werden. Durch das Erreichen der maximalen Plasmakonzentration von ASS nach 60 Minuten bei einer HWZ von 15 bis 20 Minuten besteht innerhalb eines Zeitraumes von 120 Minuten zwischen der Einnahme von ASS und eines konkurrierenden Wirkstoffes am ehesten die Möglichkeit zur irreversiblen Acetylierung an der Serin-Bindungsstelle der thrombozytären COX-1. Des Weiteren gilt es zu beachten, dass die Einnahme eines NSAID bzw. Metamizol entsprechend der Pharmakokinetik des Wirkstoffes ebenso in ausreichendem zeitlichem Abstand vor ASS erfolgt sein muss. So sollte Ibuprofen nicht weniger als acht Stunden vor ASS gegeben werden. Gemäß einer Untersuchung von Capone et al. sollte Naproxen nicht innerhalb eines Intervalls von 120 Minuten vor und nach Einnahme von ASS eingenommen werden [18, 62, 66, 104].

Hohlfeld et al. diskutierten das stark variierende Interaktionspotenzial verschiedener NSAIDs, wonach die Auswahl eines NSAID bei notwendiger Kombination mit ASS getroffen werden sollte. So zeigte Paracetamol kein Interaktionspotenzial [103]. Dies konnte auch in der vorliegenden Dissertation bestätigt werden (vgl. 3.7). Saxena et al. aus der eigenen Arbeitsgruppe zeigten, dass Paracetamol, Diclofenac und Ketoprofen nicht mit ASS interferieren [105]. Allerdings basieren diese Ergebnisse im Wesentlichen nur auf *in vitro* Untersuchungen.

In diesem Zusammenhang verdient die Metabolisierung der NSAID Aufmerksamkeit. Das Cytochrom-P-450-Enzym CYP2C9 ist an der Verstoffwechslung vieler gängiger nicht-selektiver und selektiver NSAID wie Ibuprofen, Diclofenac, Indomethacin oder auch Celecoxib beteiligt. Die Genexpression von Enzymvarianten des CYP2C9 wie dem CYP2C9*1/*3 oder dem CYP2C9*3/*3 führten Rodrigues et al. [106] zur Hypothese der Abbauehemmung mit verlängerten Halbwertszeiten an, was eine Anpassung der zeitlichen Einnahmeabstände bei entsprechenden Metabolisationstypen zur Folge hätte. Zum Beispiel konnte für Ibuprofen eine veränderte Pharmakokinetik durch Genotypenvariation der CYP2C9 nachgewiesen werden.

Die erweiterte Schulung und Aufklärung der Patienten wie auch Ärzten und Pflegepersonals müssen zur Sensibilisierung im Umgang mit den untersuchten Pharmaka führen. Vor dem Hintergrund der beschriebenen *Compliance*-Problematik (vgl. 4.4.1) sind

eine genaue zeitliche Terminierung der Einnahme nach Medikamentenplan oder eine nachvollziehbare Dispensierung wichtig. Unterstützend könnte die Weiterentwicklung individueller Datenbanken beim Hausarzt, Apotheker und behandelnder Klinik sein, in denen die aktuell verordneten Medikamente samt Neben- und Wechselwirkungsprofil hinterlegt werden mit genauem Hinweis auf die Relevanz der zeitlich versetzten Einnahme bei detektierter gleichzeitiger Verordnung. Weiterhin sollte die Problematik Eingang in die Patienteninformation der jeweiligen Medikamente finden.

Es gilt zudem, dass ärztliche und auch pflegerische Personal für Komorbiditäten wie die Stoffwechselerkrankung Diabetes mellitus zu sensibilisieren. Wie in 4.4.2 beschrieben, ist eine diabetische Stoffwechsellage mit einer erhöhten Neubildungsrate und folglich erhöhter Thrombozytengesamtzahl verbunden. Es stehen früher aggregationsfähige, junge Thrombozyten zur Verfügung unter dauerhafter ASS-Medikation als es Di Minno et al. 2011 gezeigt hatten [68]. Damit erhöht sich der aggregationsfähige Anteil im Vergleich zu stoffwechselgesunden KHK-Patienten.

Eine weitere Überlegung wäre, das Einnahmeintervall bei Diabetes mellitus erkrankten KHK-Patienten zu verkürzen. Designierte Studien müssen zeigen, wie die orale Thrombozytenaggregationshemmung aufgrund der Hormoninbalance bei Patienten mit Diabetes mellitus einzustellen ist, um eine zuverlässige Thrombozytenhemmung durch ASS zu erreichen.

Ergänzend gilt es auf der Basis der experimentellen Nachweismethoden (vgl. 2.6.2.1 und 4.5) eine klinisch praktikable Detektionsmethode zu entwickeln, die ein kostengünstiges und sensitives Screeningverfahren darstellt, um eine ASS-*Non-Response* zumindest bei Patienten mit hohem arteriellen Thromboembolierisiko frühzeitig aufzudecken und gegebenenfalls weiterführende Plättchencharakteristika wie Genpolymorphismen oder Hyperreaktivität zu beschreiben. Als Konsequenz müsste anschließend eine Umstellung der Behandlung erfolgen durch Ersetzen des mit ASS um die Bindungsstelle konkurrierenden Wirkstoffes. Jeder Therapieansatz, der zur ASS-*Non-Response* führen kann, sollte zur Anwendung eines zu entwickelnden Testverfahrens vor, während und gegebenenfalls nach Therapieumstellung führen. Bis zu heutigen Tage ist eine schnelle und in der Routine praktikable Erfassung von ASS-*Non-Respondern* nicht möglich, so dass mit einer individuellen Reaktion auf eine im Einzelfall bestehende ASS-*Non-Response* noch nicht zeit- und situationsgerecht reagiert werden kann. Künftige Entwicklungen einer solchen Detektionsmethode müssen zeigen, ob ein Testverfahren in den klinischen Laboralltag etabliert werden kann.

Ein nächster Schritt zur Vermeidung einer ASS-*Non-Response* stellt die Dosiserhöhung der Acetylsalicylsäure oder Dosissenkung des begleitend verordneten NSAID bzw. Metamizol dar. Hohlfeld et al. konnte mittels einer *in vitro* Versuchsreihe zeigen, dass die Thromboxansynthese in gleichzeitiger Anwesenheit des Metamizols durch Dosiserhöhung der Acetylsalicylsäure supprimiert werden konnte, so dass eine vollständige Hemmung der Plättchenfunktion wieder hergestellt war [21]. Hier sollte im Rahmen der Schmerztherapie eine enge Zusammenarbeit mit dem Fachgebiet der Anästhesie/Schmerztherapie zur optimalen Dosierung erfolgen.

5 Literatur- und Quellenverzeichnis

1. Mueller RL, Scheidt S. History of drugs for thrombotic disease. Discovery, development, and directions for the future. *Circulation*. 1994;89:432-49.
2. Vane JR. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nat New Biol*. 1971;231:232-5.
3. Römer M. *Medikalisierung des Lebens - Zu: Illich, Ivan Die Nemesis der Medizin*. 1 ed. München: Grin Verlag; 2005.
4. Mehta SR, Tanguay JF, Eikelboom JW, Jolly SS, Joyner CD, Granger CB, et al. Double-dose versus standard-dose clopidogrel and high-dose versus low-dose aspirin in individuals undergoing percutaneous coronary intervention for acute coronary syndromes (CURRENT-OASIS 7): a randomised factorial trial. *Lancet*. 2010;376:1233-43.
5. Collaborative meta-analysis of randomised trials of antiplatelet therapy for prevention of death, myocardial infarction, and stroke in high risk patients. *BMJ*. 2002;324:71-86.
6. Uchiyama S, Nakamura T, Yamazaki M, Kimura Y, Iwata M. New modalities and aspects of antiplatelet therapy for stroke prevention. *Cerebrovasc Dis*. 2006;21 Suppl 1:7-16.
7. Hohlfeld T, Weber AA, Junghans U, Schumacher M, Boucher M, Schrör K, et al. Variable platelet response to aspirin in patients with ischemic stroke. *Cerebrovasc Dis*. 2007;24:43-50.
8. Mueller MR, Salat A, Stangl P, Murabito M, Pulaki S, Boehm D, et al. Variable platelet response to low-dose ASA and the risk of limb deterioration in patients submitted to peripheral arterial angioplasty. *Thromb Haemost*. 1997;78:1003-7.
9. Zimmermann N, Gams E, Hohlfeld T. Aspirin in coronary artery bypass surgery: new aspects of and alternatives for an old antithrombotic agent. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2008;34:93-108.
10. Krasopoulos G, Brister SJ, Beattie WS, Buchanan MR. Aspirin "resistance" and risk of cardiovascular morbidity: systematic review and meta-analysis. *BMJ*. 2008;336:195-8.
11. Snoep JD, Hovens MM, Eikenboom JC, van der Bom JG, Huisman MV. Association of laboratory-defined aspirin resistance with a higher risk of recurrent cardiovascular events: a systematic review and meta-analysis. *Arch Intern Med*. 2007;167:1593-9.
12. Schwartz KA, Schwartz DE, Barber K, Reeves M, De Franco AC. Non-compliance is the predominant cause of aspirin resistance in chronic coronary arterial disease patients. *J Transl Med*. 2008;6:46.
13. Ho PM, Spertus JA, Masoudi FA, Reid KJ, Peterson ED, Magid DJ, et al. Impact of medication therapy discontinuation on mortality after myocardial infarction. *Arch Intern Med*. 2006;166:1842-7.
14. Benedek IH, Joshi AS, Pieniaszek HJ, King SY, Kornhauser DM. Variability in the pharmacokinetics and pharmacodynamics of low dose aspirin in healthy male volunteers. *J Clin Pharmacol*. 1995;35:1181-6.
15. Li M, Shi J, Fu L, Wang H, Zhou B, Wu X. Genetic polymorphism of MMP family and coronary disease susceptibility: a meta-analysis. *Gene*. 2012;495:36-41.
16. Linden MD, Tran H, Woods R, Tonkin A. High platelet reactivity and antiplatelet therapy resistance. *Semin Thromb Hemost*. 2012;38:200-12.
17. Catella-Lawson F, Reilly MP, Kapoor SC, Cucchiara AJ, DeMarco S, Tournier B, et al. Cyclooxygenase inhibitors and the antiplatelet effects of aspirin. *N Engl J Med*. 2001;345:1809-17.

18. Capone ML, Sciulli MG, Tacconelli S, Grana M, Ricciotti E, Renda G, et al. Pharmacodynamic interaction of naproxen with low-dose aspirin in healthy subjects. *J Am Coll Cardiol.* 2005;45:1295-301.
19. Schuijt MP, Huntjens-Fleuren HW, de Metz M, Vollaard EJ. The interaction of ibuprofen and diclofenac with aspirin in healthy volunteers. *Br J Pharmacol.* 2009;157:931-4.
20. Rimon G, Sidhu RS, Lauver DA, Lee JY, Sharma NP, Yuan C, et al. Coxibs interfere with the action of aspirin by binding tightly to one monomer of cyclooxygenase-1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107:28-33.
21. Hohlfeld T, Zimmermann N, Weber AA, Jessen G, Weber H, Schrör K, et al. Pyrazolinone analgesics prevent the antiplatelet effect of aspirin and preserve human platelet thromboxane synthesis. *J Thromb Haemost.* 2008;6:166-73.
22. Andrews RK, Lopez JA, Berndt MC. Molecular mechanisms of platelet adhesion and activation. *Int J Biochem Cell Biol.* 1997;29:91-105.
23. Nieswandt B, Brakebusch C, Bergmeier W, Schulte V, Bouvard D, Mokhtari-Nejad R, et al. Glycoprotein VI but not alpha2beta1 integrin is essential for platelet interaction with collagen. *EMBO J.* 2001;20:2120-30.
24. Kulkarni S, Dopheide SM, Yap CL, Ravanat C, Freund M, Mangin P, et al. A revised model of platelet aggregation. *J Clin Invest.* 2000;105:783-91.
25. Gawaz MP. *Blood platelet - clinical relevance.* Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2010.
26. Schrör K, Seidel H. Blood-vessel wall arachidonate metabolism and its pharmacological modification in a new in vitro assay system. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1988;337:177-82.
27. Smith WL, Urade Y, Jakobsson PJ. Enzymes of the cyclooxygenase pathways of prostanoid biosynthesis. *Chem Rev.* 2011;111:5821-65.
28. Munoz J, Navarro C, Noriega V, Pinardi G, Sierralta F, Prieto JC, et al. Synergism between COX-3 inhibitors in two animal models of pain. *Inflammopharmacology.* 2010;18:65-71.
29. Simmons DL, Botting RM, Hla T. Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. *Pharmacol Rev.* 2004;56:387-437.
30. Karow T, Lang-Roth, R. *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie 2012.* 19 ed: Dr. med. Thomas Karow Verlag; 2011.
31. Kerola M, Vuolteenaho K, Kosonen O, Kankaanranta H, Sarna S, Moilanen E. Effects of nimesulide, acetylsalicylic acid, ibuprofen and nabumetone on cyclooxygenase-1- and cyclooxygenase-2-mediated prostanoid production in healthy volunteers ex vivo. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2009;104:17-21.
32. Landmesser U, Hornig B, Drexler H. Endothelial function: a critical determinant in atherosclerosis? *Circulation.* 2004;109:II27-33.
33. Winkelmann BR, von Holt K, Unverdorben M. Smoking and atherosclerotic cardiovascular disease: Part I: atherosclerotic disease process. *Biomark Med.* 2009;3:411-28.
34. Libby P, Ridker PM, Hansson GK. Inflammation in atherosclerosis: from pathophysiology to practice. *J Am Coll Cardiol.* 2009;54:2129-38.
35. Hamm CW, Bassand JP, Agewall S, Bax J, Boersma E, Bueno H, 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.

36. Baigent C, Blackwell L, Collins R, Emberson J, Godwin J, Peto R, et al. Aspirin in the primary and secondary prevention of vascular disease: collaborative meta-analysis of individual participant data from randomised trials. *Lancet*. 2009;373:1849-60.
37. Yusuf S, Zhao F, Mehta SR, Chrolavicius S, Tognoni G, Fox KK. Effects of clopidogrel in addition to aspirin in patients with acute coronary syndromes without ST-segment elevation. *N Engl J Med*. 2001;345:494-502.
38. Schrör K, Hohlfeld T, Weber AA. Aspirin resistance - does it clinically matter? *Clin Res Cardiol*. 2006;95:505-10.
39. Weber AA, Przytulski B, Schanz A, Hohlfeld T, Schrör K. Towards a definition of aspirin resistance: a typological approach. *Platelets*. 2002;13:37-40.
40. Schrör K, Huber K, Hohlfeld T. Functional testing methods for the antiplatelet effects of aspirin. *Biomark Med*. 2011;5:31-42.
41. Weber AA, Zimmermann KC, Meyer-Kirchrath J, Schrör K. Cyclooxygenase-2 in human platelets as a possible factor in aspirin resistance. *Lancet*. 1999;353:900.
42. Halushka MK, Walker LP, Halushka PV. Genetic variation in cyclooxygenase 1: effects on response to aspirin. *Clin Pharmacol Ther*. 2003;73:122-30.
43. Noda A, Goromaru T, Tsubone N, Matsuyama K, Iguchi S. In vivo formation of 4-formylaminoantipyrine as a new metabolite of aminopyrine. I. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 1976;24:1502-5.
44. Brune K, Alpermann H. Non-acidic pyrazoles: inhibition of prostaglandin production, carrageenan oedema and yeast fever. *Agents Actions*. 1983;13:360-3.
45. Brune K, Rainsford KD, Schweitzer A. Biodistribution of mild analgesics. *Br J Clin Pharmacol*. 1980;10 Suppl 2:279S-84S.
46. Pierre SC, Schmidt R, Brenneis C, Michaelis M, Geisslinger G, Scholich K. Inhibition of cyclooxygenases by dipyron. *Br J Pharmacol*. 2007;151:494-503.
47. Laporte JR, Carne X, Vidal X, Moreno V, Juan J. Upper gastrointestinal bleeding in relation to previous use of analgesics and non-steroidal anti-inflammatory drugs. Catalan Countries Study on Upper Gastrointestinal Bleeding. *Lancet*. 1991;337:85-9.
48. Hinz B, Cheremina O, Bachmakov J, Renner B, Zolk O, Fromm MF, et al. Dipyron elicits substantial inhibition of peripheral cyclooxygenases in humans: new insights into the pharmacology of an old analgesic. *FASEB J*. 2007;21:2343-51.
49. Schwabe U, Paffrath, D. *Arzneiverordnungs-Report 2011: Aktuelle Daten, Kosten, Trends und Kommentare 1st Edition* ed. Heidelberg: Springer-Verlag GmbH, Heidelberg; 2011.
50. Ibanez L, Vidal X, Ballarin E, Laporte JR. Agranulocytosis associated with dipyron (metamizol). *Eur J Clin Pharmacol*. 2005;60:821-9.
51. Eckle T, Ghanayim N, Trick M, Unertl K, Eltzschig HK. Intraoperative metamizol as cause for acute anaphylactic collapse. *Eur J Anaesthesiol*. 2005;22:810-12.
52. Garcia S, Canionero M, Lopes G. Dipyron-induced granulocytopenia: a case for awareness. *Pharmacotherapy*. 2006;26:440-2.
53. Lang RM, Bierig M, Devereux RB, Flachskampf FA, Foster E, Pellikka PA, et al. Recommendations for chamber quantification: a report from the American Society of Echocardiography's Guidelines and Standards Committee and the Chamber Quantification Writing Group, developed in conjunction with the European Association of Echocardiography, a branch of the European Society of Cardiology. *J Am Soc Echocardiogr*. 2005;18:1440-63.
54. Campeau L. Letter: Grading of angina pectoris. *Circulation*. 1976;54:522-3.

55. Bundesärztekammer (BÄK) KBK, Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF). Nationale VersorgungsLeitlinie Chronische KHK. 2013;2. Auflage.
56. 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;41:961-5.
57. Chen WH, Cheng X, Lee PY, Ng W, Kwok JY, Tse HF, et al. Aspirin resistance and adverse clinical events in patients with coronary artery disease. *Am J Med.* 2007;120:631-5.
58. Zoller B, Li X, Sundquist J, Sundquist K. Risk of subsequent coronary heart disease in patients hospitalized for immune-mediated diseases: a nationwide follow-up study from Sweden. *PLoS One.* 2012;7:e33442.
59. Radovits BJ, Popa-Diaconu DA, Popa C, Eijsbouts A, Laan RF, van Riel PL, et al. Disease activity as a risk factor for myocardial infarction in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2009;68:1271-6.
60. Rao GH, Johnson GG, Reddy KR, White JG. Ibuprofen protects platelet cyclooxygenase from irreversible inhibition by aspirin. *Arteriosclerosis.* 1983;3:383-8.
61. MacDonald TM, Wei L. Effect of ibuprofen on cardioprotective effect of aspirin. *Lancet.* 2003;361:573-4.
62. Gengo FM, Rubin L, Robson M, Rainka M, Gengo MF, Mager DE, et al. Effects of ibuprofen on the magnitude and duration of aspirin's inhibition of platelet aggregation: clinical consequences in stroke prophylaxis. *J Clin Pharmacol.* 2008;48:117-22.
63. Gladding PA, Webster MW, Farrell HB, Zeng IS, Park R, Ruijne N. The antiplatelet effect of six non-steroidal anti-inflammatory drugs and their pharmacodynamic interaction with aspirin in healthy volunteers. *Am J Cardiol.* 2008;101:1060-3.
64. Van Hecken A, Schwartz JI, Depre M, De Lepeleire I, Dallob A, Tanaka W, et al. Comparative inhibitory activity of rofecoxib, meloxicam, diclofenac, ibuprofen, and naproxen on COX-2 versus COX-1 in healthy volunteers. *J Clin Pharmacol.* 2000;40:1109-20.
65. Geisslinger G, Peskar BA, Pallapies D, Sittl R, Levy M, Brune K. The effects on platelet aggregation and prostanoid biosynthesis of two parenteral analgesics: ketorolac tromethamine and dipyrrone. *Thromb Haemost.* 1996;76:592-7.
66. Nagelschmitz J, Blunck M, Kraetzschmar J, Ludwig M, Wensing G, Hohlfeld T. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of acetylsalicylic acid after intravenous and oral administration to healthy volunteers. *Clin Pharmacol.* 2014;6:51-9.
67. Newby LK, LaPointe NM, Chen AY, Kramer JM, Hammill BG, DeLong ER, et al. Long-term adherence to evidence-based secondary prevention therapies in coronary artery disease. *Circulation.* 2006;113:203-12.
68. Di Minno G. Aspirin resistance and platelet turnover: a 25-year old issue. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2011;21:542-5.
69. Di Minno MN, Lupoli R, Palmieri NM, Russolillo A, Buonauro A, Di Minno G. Aspirin resistance, platelet turnover, and diabetic angiopathy: a 2011 update. *Thromb Res.* 2012;129:341-4.
70. Smith JP, Haddad EV, Taylor MB, Oram D, Blakemore D, Chen Q, et al. Suboptimal inhibition of platelet cyclooxygenase-1 by aspirin in metabolic syndrome. *Hypertension.* 2012;59:719-25.

71. Vaduganathan M, Alviar CL, Arikian ME, Tellez A, Guthikonda S, DeLao T, et al. Platelet reactivity and response to aspirin in subjects with the metabolic syndrome. *Am Heart J*. 2008;156:1002 e1- e7.
72. Natal C, Restituto P, Inigo C, Colina I, Diez J, Varo N. The proinflammatory mediator CD40 ligand is increased in the metabolic syndrome and modulated by adiponectin. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008;93:2319-27.
73. Ajjan R, Storey RF, Grant PJ. Aspirin resistance and diabetes mellitus. *Diabetologia*. 2008;51:385-90.
74. Schmidt AM, Yan SD, Wautier JL, Stern D. Activation of receptor for advanced glycation end products: a mechanism for chronic vascular dysfunction in diabetic vasculopathy and atherosclerosis. *Circ Res*. 1999;84:489-97.
75. Martin JF, Kristensen SD, Mathur A, Grove EL, Choudry FA. The causal role of megakaryocyte-platelet hyperactivity in acute coronary syndromes. *Nat Rev Cardiol*. 2012;9:658-70.
76. Calverley DC, Brass E, Hacker MR, Tsao-Wei DD, Espina BM, Pullarkat VA, et al. Potential role of platelet FcγRIIA in collagen-mediated platelet activation associated with atherothrombosis. *Atherosclerosis*. 2002;164:261-7.
77. Lordkipanidze M, Diodati JG, Palisaitis DA, Schampaert E, Turgeon J, Pharand C. Genetic determinants of response to aspirin: appraisal of 4 candidate genes. *Thromb Res*. 2011;128:47-53.
78. Rocca B, Petrucci G. Variability in the responsiveness to low-dose aspirin: pharmacological and disease-related mechanisms. *Thrombosis*. 2012;2012:376721.
79. Jernas M, Olsson B, Arner P, Jacobson P, Sjöström L, Walley A, et al. Regulation of carboxylesterase 1 (CES1) in human adipose tissue. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009;383:63-7.
80. Cox D, Maree AO, Dooley M, Conroy R, Byrne MF, Fitzgerald DJ. Effect of enteric coating on antiplatelet activity of low-dose aspirin in healthy volunteers. *Stroke*. 2006;37:2153-8.
81. Davi G, Alessandrini P, Mezzetti A, Minotti G, Bucciarelli T, Costantini F, et al. In vivo formation of 8-Epi-prostaglandin F2 alpha is increased in hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997;17:3230-5.
82. Davi G, Ciabattini G, Consoli A, Mezzetti A, Falco A, Santarone S, et al. In vivo formation of 8-iso-prostaglandin f2alpha and platelet activation in diabetes mellitus: effects of improved metabolic control and vitamin E supplementation. *Circulation*. 1999;99:224-9.
83. Morrow JD, Frei B, Longmire AW, Gaziano JM, Lynch SM, Shyr Y, et al. Increase in circulating products of lipid peroxidation (F2-isoprostanes) in smokers. Smoking as a cause of oxidative damage. *N Engl J Med*. 1995;332:1198-203.
84. Davi G, Patrono C. Platelet activation and atherothrombosis. *N Engl J Med*. 2007;357:2482-94.
85. Cipollone F, Ciabattini G, Patrignani P, Pasquale M, Di Gregorio D, Bucciarelli T, et al. Oxidant stress and aspirin-insensitive thromboxane biosynthesis in severe unstable angina. *Circulation*. 2000;102:1007-13.
86. Pamukcu B. A review of aspirin resistance; definition, possible mechanisms, detection with platelet function tests, and its clinical outcomes. *J Thromb Thrombolysis*. 2007;23:213-22.
87. Gurbel PA, Bliden KP, DiChiara J, Newcomer J, Weng W, Neerchal NK, et al. Evaluation of dose-related effects of aspirin on platelet function: results from the Aspirin-Induced Platelet Effect (ASPECT) study. *Circulation*. 2007;115:3156-64.
88. Lordkipanidze M, Pharand C, Schampaert E, Turgeon J, Palisaitis DA, Diodati JG. 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;28:1702-8.
89. Michelson AD. Platelet function testing in cardiovascular diseases. *Circulation*. 2004;110:e489-93.
 90. De Gaetano G, Cerletti C. Aspirin resistance: a revival of platelet aggregation tests? *J Thromb Haemost*. 2003;1:2048-50.
 91. Bhatt DL, Topol EJ. Scientific and therapeutic advances in antiplatelet therapy. *Nat Rev Drug Discov*. 2003;2:15-28.
 92. Hovens MM, Snoep JD, Eikenboom JC, van der Bom JG, Mertens BJ, Huisman MV. Prevalence of persistent platelet reactivity despite use of aspirin: a systematic review. *Am Heart J*. 2007;153:175-81.
 93. Muck S, Weber AA, Schrör K. Effects of terbogrel on platelet function and prostaglandin endoperoxide transfer. *Eur J Pharmacol*. 1998;344:45-8.
 94. Langleben D, Christman BW, Barst RJ, Dias VC, Galie N, Higenbottam TW, et al. Effects of the thromboxane synthetase inhibitor and receptor antagonist terbogrel in patients with primary pulmonary hypertension. *Am Heart J*. 2002;143:E4.
 95. Guth BD, Narjes H, Schubert HD, Tanswell P, Riedel A, Nehmiz G. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of terbogrel, a combined thromboxane A2 receptor and synthase inhibitor, in healthy subjects. *Br J Clin Pharmacol*. 2004;58:40-51.
 96. Husted S, van Giezen JJ. Ticagrelor: the first reversibly binding oral P2Y12 receptor antagonist. *Cardiovasc Ther*. 2009;27:259-74.
 97. A randomised, blinded, trial of clopidogrel versus aspirin in patients at risk of ischaemic events (CAPRIE). CAPRIE Steering Committee. *Lancet*. 1996;348:1329-39.
 98. A comparison of aspirin plus tirofiban with aspirin plus heparin for unstable angina. Platelet Receptor Inhibition in Ischemic Syndrome Management (PRISM) Study Investigators. *N Engl J Med*. 1998;338:1498-505.
 99. Inhibition of the platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor with tirofiban in unstable angina and non-Q-wave myocardial infarction. Platelet Receptor Inhibition in Ischemic Syndrome Management in Patients Limited by Unstable Signs and Symptoms (PRISM-PLUS) Study Investigators. *N Engl J Med*. 1998;338:1488-97.
 100. Effects of platelet glycoprotein IIb/IIIa blockade with tirofiban on adverse cardiac events in patients with unstable angina or acute myocardial infarction undergoing coronary angioplasty. The RESTORE Investigators. Randomized Efficacy Study of Tirofiban for Outcomes and REstenosis. *Circulation*. 1997;96:1445-53.
 101. Cannon CP, McCabe CH, Wilcox RG, Langer A, Caspi A, Berink P, et al. Oral glycoprotein IIb/IIIa inhibition with orbofiban in patients with unstable coronary syndromes (OPUS-TIMI 16) trial. *Circulation*. 2000;102:149-56.
 102. O'Neill WW, Serruys P, Knudtson M, van Es GA, Timmis GC, van der Zwaan C, et al. Long-term treatment with a platelet glycoprotein-receptor antagonist after percutaneous coronary revascularization. EXCITE Trial Investigators. Evaluation of Oral Xemilofiban in Controlling Thrombotic Events. *N Engl J Med*. 2000;342:1316-24.
 103. Hohlfeld T, Saxena A, Schrör K. High on treatment platelet reactivity against aspirin by non-steroidal anti-inflammatory drugs--pharmacological mechanisms and clinical relevance. *Thromb Haemost*. 2013;109:825-33.
 104. Ellison J, Dager W. Recent FDA warning of the concomitant use of aspirin and ibuprofen and the effects on platelet aggregation. *Prev Cardiol*. 2007;10:61-3.

105. Saxena A, Balaramnavar VM, Hohlfeld T, Saxena AK. Drug/drug interaction of common NSAIDs with antiplatelet effect of aspirin in human platelets. *Eur J Pharmacol.* 2013;721:215-24.
106. Rodrigues AD. Impact of CYP2C9 genotype on pharmacokinetics: are all cyclooxygenase inhibitors the same? *Drug Metab Dispos.* 2005;33:1567-75.

Danksagung

Zuallererst möchte ich meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. Thomas Hohlfeld, für die Möglichkeit danken, dass ich unter seiner Betreuung dieses Dissertationsthema ausarbeiten durfte. Es erfüllt mich mit Stolz und begleitet mich durch den klinischen Bezug des Themas stets in meinem praktischen Arbeitsalltag.

Dank seines Wissens und seiner Erfahrung konnte ich durch eine intensive Betreuung zu den vorliegenden Ergebnissen gelangen. Bei Fragen konnte ich mich jederzeit auf ein offenes Ohr verlassen, so dass kein Problem ungelöst blieb. Konstruktive Kritik und Diskussionen verliefen immer in einem menschlich sehr angenehmen Rahmen, wofür ich rückblickend sehr dankbar bin.

Ich blicke mit wohlwollen auf die Jahre gemeinsamer Zusammenarbeit zurück und möchte sie als Erfahrungs- und Wissenszuwachs nicht missen.

Weiter möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Jens W. Fischer als Direktor des Instituts für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie dafür danken, dass ich unter seiner Leitung die Möglichkeit zur Promotion erhalten und die Räumlichkeiten sowie die apparative Infrastruktur zur Verfügung gestellt bekommen habe, um meiner Forschungsarbeit nachzugehen.

Herrn Prof. Dr. med. Malte Kelm danke ich für die Möglichkeit, dass ich in seiner Abteilung die Probanden für unsere Studie akquirieren durfte. Dank ihm und seinen Mitarbeitern, insbesondere Herrn Dr. med. Amin Polzin, konnte eine reibungslose Selektion der Patienten erfolgen.

Ein ganz besonderer Dank gilt Frau Kirsten Bartkowski, die als „gute Seele“ im Labor zu bezeichnen ist. Ohne Ihre Mühe und Geduld sowie dem Willen, mir die experimentellen Abläufe nahe zu bringen, wäre meine Arbeit um ein vielfaches schwerer geworden. Ich konnte Frau Bartkowski stets um Hilfe bitten, ohne je eine negative Rückmeldung erhalten zu haben, auch wenn es ihr Arbeitsalltag eigentlich gar nicht zuließ. In diesem Zusammenhang möchte ich auch Frau Rüter für die ELISA-Messungen danken.

Zu guter Letzt möchte ich mich nochmals bei meinen Eltern, Bernd und Brigitte Richter bedanken, die mich in jeder Phase der Erarbeitung meiner Dissertation mit der richtigen Geste unterstützt haben. Ohne ihr zutun, wäre diese Arbeit für mich letztendlich nicht möglich geworden.

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen Medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

Kempfen, den

Stefan Bernd Richter

