

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

**Thrombozytäre Freisetzung von Malondialdehyd als Index
für die Thromboxan-Synthese: Experimentelle Untersuchung
an Thrombozytenreichem Plasma gesunder Spender**

Dissertation

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

vorgelegt von
Carolin Müller

2018

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

gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. Thomas Hohlfeld

Zweitgutachter: PD Dr. Tobias Zeus

Für meine Eltern

Zusammenfassung

Erkrankungen des kardiovaskulären Systems wie Myokardinfarkt, Schlaganfall und periphere arterielle Verschlusskrankheit zählen zu den häufigsten Erkrankungen. Sowohl zur Behandlung als auch zur Prävention werden Thrombozytenfunktionshemmer wie Acetylsalicylsäure (ASS) eingesetzt. Obwohl die Wirksamkeit von ASS gut belegt wurde, zeigten sich viele Fälle mit nicht ausreichender Wirkung („ASS-Nonresponse“ oder „ASS-Resistenz“). Hier besteht eine erhöhte Gefahr erneute kardiovaskuläre Ereignisse zu erleiden. Da zahlreiche Ursachen für „ASS-Nonresponse“ in Frage kommen, könnte ein pharmakologisches „Monitoring“ der Wirkung von ASS auf Thrombozyten sinnvoll sein. Nicht selten wurde hierzu die Bestimmung von Thromboxan (TX) B₂ als Biomarker für die Thrombozytenaktivierung und Inhibition der thrombozytären Cyclooxygenase (COX) eingesetzt. Die verfügbaren Methoden hierfür (Immunoassay, Chromatografie) sind aber kompliziert, zeitaufwändig und teuer. Eine Alternative könnte der Nachweis von Malondialdehyd (MDA), ein Nebenprodukt der TX-Synthese, sein. Dieses kann mit relativ einfacher Methodik fluoreszenz-photometrisch bestimmt werden. Die vorliegende Dissertation untersucht, ob die Bestimmung von MDA die erforderliche Sensitivität besitzt, um die Thrombozytenaktivierung in Gegenwart ausgewählter Agonisten und Inhibitoren laborchemisch zu erfassen.

Für die Untersuchung wurde plättchenreiches Plasma gesunder Probanden eingesetzt. Dieses wurde sowohl mit unterschiedlichen Stimulatoren (Arachidonsäure, Kollagen oder ADP) als auch mit verschiedenen Inhibitoren (ASS, Ozagrel und Cicaprost) versetzt. Mittels der Licht-Transmissions-Aggregometrie wurden Vollblutaggregationen durchgeführt und anschließend die Proben sowohl fluoreszenz-photometrisch, zur Bestimmung von MDA, als auch mittels eines Enzym-Immuno-Assays, zur TXB₂ Analyse, ausgewertet. Die Ergebnisse wurden hinsichtlich MDA und TXB₂ analysiert. Die Ergebnisse der Untersuchung zeigten eine insgesamt gute Übereinstimmung zwischen der MDA- und TXB₂-Synthese, weitgehend unabhängig vom verwendeten Stimulus. Auch in Gegenwart der untersuchten Inhibitoren ergab sich eine gut-übereinstimmende Hemmung von MDA und TXB₂, unabhängig vom pharmakologischen Wirkmechanismus. Die beobachteten Korrelationen zwischen MDA und TXB₂ waren durchgehend eng und statistisch signifikant.

Im Ergebnis scheint MDA ein nützlicher Biomarker zur Thrombozytenfunktionsanalytik bei Patienten mit erhöhtem kardiovaskulärem Risiko zu sein. Als Surrogat-Parameter zur Beurteilung der antithrombozytären Therapie mit ASS könnte diese Methode klinische Bedeutung gewinnen und eine Individualisierung der Therapie mit ASS leichter und schneller ermöglichen.

Abstract

Cardiovascular diseases like myocardial infarction, stroke and peripheral arterial occlusive disease are a frequent and important public health burden. For their prevention as well as treatment, antiplatelet drugs like acetylsalicylic acid (ASA) are commonly used. Although the effectiveness of ASA is well proven by numerous clinical trials, individual patients may not respond sufficiently by the expected inhibition of platelet function. This has been denoted „ASA nonresponse“ or „ASA resistance“. The risk of repeated cardiovascular events may be increased in these subjects. For the detection of „ASA nonresponse“ pharmacological monitoring of the expected effect of ASA on platelet function may be desirable. The determination of platelet thromboxane (TX) B₂ formation as a biomarker for cyclooxygenase (COX-1)-dependent platelet activation and inhibition of this enzyme by ASA has been used. The available procedures (immunoassay, chromatography) are complex, time-consuming and expensive. A by-product of platelet TX-synthesis is malondialdehyde (MDA). Hence, MDA detection may be an alternative biomarker instead of thromboxane. MDA can be easily detected by fluorescence photometry. The present study examines whether the determination of MDA is sufficiently sensitive to determine platelet-activation by a variety of selected agonists in absence or presence of various inhibitors of platelet function.

The experiments have been performed with platelet-rich plasma of healthy volunteers. This was mixed with various agonists (arachidonic acid, collagen or ADP) as well as with different inhibitors (ASA, ozagrel or cicaprost). With the help of light-transmission-aggregometry the whole-blood aggregation was determined. Thereafter, the samples were analysed for MDA (fluorescence photometry) as well as TXB₂ (immunoassay). The results of the analyses showed a remarkable accordance between the MDA and TXB₂ synthesis, widely independent of the used stimulators. Also, in the presence of the studied inhibitors there was a good and consistent inhibition of MDA and TXB₂, which was independent of the pharmacological mode of action. The observed correlations between MDA and TXB₂ were close and statistically significant.

As a result, MDA appears to be a favourable biomarker for antiplatelet therapy in patients with high cardiovascular risk. It may be useful as a surrogate parameter for the evaluation of the antithrombotic effects of ASA, which can be performed easier and faster than the detection of TXB₂.

Abkürzungen

ACD	Ascorbin-Citronensäure-Dextran
AChE	Acetylcholinesterase
ADP	Adenosindiphosphat, Adenosin-5'-diphosphorsäure
aqua dest.	Destilliertes Wasser
ARA	Arachidonsäure
Art.	Artikelnummer
ASS	Acetylsalicylsäure, Aspirin ^R
ATP	Adenosintri-phosphat
B₀	Maximum <i>Bindungswell</i>
b[0]	Steigung der Regressionslinie
b[1]	Achsenschnittpunkt der Regressionslinie mit der y-Achse
Blk	<i>Blank</i>
Ca²⁺	Calcium
CABG	<i>Coronary artery bypass graft</i> , Koronararterien-Bypass
CAD	<i>Coronary artery disease</i> , Koronare Herzkrankheit
COX	Cyclooxygenase
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTNB	5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EIA	Enzym-Immuno-Assay
Fa.	Firma
GP	Glykoprotein
H₂O	Wasser
HAPR	<i>High on aspirin platelet reactivity</i>
HCl	Chlorwasserstoff
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HHT	12(L)-Hydroxy-5,8,10-Heptadekatriensäure
HPLC	<i>High performance liquid chromatographie</i>
Indo	Indomethacin
KCl	Kaliumchlorid
KH₂PO₄	Kaliumdihydrogenphosphat
LTA	Licht-Transmissions-Aggregometrie
MDA	Malondialdehyd
MG	Molekulargewicht
MgCl₂	Magnesiumchlorid
MgCl₂ x 6H₂O	Magnesiumchlorid-Hexahydrat
Milli-Q-H₂O	Reinstwasser
N₂	Stickstoff
Na₂HPO₄	Dinatriumhydrogenphosphat
Na₂HPO₄ x H₂O	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO₃	Natriumhydrogencarbonat

NSAIDs	<i>Non-steroidal anti-inflammatory drugs</i>
NSB	Nicht-spezifisches Bindungswell
PAP	Plättchenarmes Plasma
PG	Prostaglandin
PGI₂	Prostaglandin I ₂ , Prostacyclin
PKC	Proteinkinase C
PLA₂	Phospholipase A ₂
PLC	Phospholipase C
PRP	Plättchenreiches Plasma
r²	Korrelationskoeffizient
RIA	Radioimmunoassay
SEM	<i>Standard error of means</i> , Standardfehler
Stlsg.	Stammlösung
TA	Totale Aktivität
TBA	Thiobarbitursäure
TCA	Trichloressigsäure
TEP	1,1,3,3-Tetraethoxypropan
TP-Rezeptor	Thromboxan-Rezeptor
TM	Thrombozytenmedium
TX	Thromboxan
TXA₂	Thromboxan A ₂
TXB₂	Thromboxan B ₂
vWF	von-Willebrand-Faktor

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	Hämostase.....	1
1.1.1	Die Bedeutung von Kollagen für die Hämostase.....	1
1.1.2	Der Einfluss von ADP auf die Hämostase	2
1.1.3	Arachidonsäuremetabolismus	2
1.2	Pharmakologische Hemmung der Thrombozytenfunktion	3
1.2.1	Acetylsalicylsäure (ASS)	4
1.2.2	Ozagrel	5
1.2.3	Cicaprost	5
1.2.4	„Nonresponse gegenüber Thrombozytenfunktionshemmern“	5
1.3	Ziele der Arbeit.....	8
2.	Material und Methoden	9
2.1	Versuchsdurchführung	9
2.1.1	Probanden.....	9
2.1.2	Übersicht über die durchgeführten Untersuchungen	9
2.2	Untersuchungsmaterialien	10
2.2.1	Substanzen	10
2.2.2	Lösungen.....	11
2.2.3	Labormaterialien	13
2.2.4	Geräte	13
2.3	Methoden.....	14
2.3.1	Blutentnahme	14
2.3.2	Plasmagewinnung	14
2.3.3	Thrombozytenfunktionsmessungen	15
2.3.3.1	Licht-Transmissions-Aggregometrie (LTA).....	15
2.3.3.2	Arachidonsäure-induzierte Aggregation	15
2.3.3.3	Kollagen-induzierte Aggregation.....	17
2.3.3.4	ADP-induzierte Aggregation	17
2.3.3.5	Auswertung der Aggregationskurven	18
2.3.4	MDA-Bestimmung.....	19
2.3.5	TXB ₂ -Bestimmung.....	20
2.3.6	Datenerfassung und statistische Auswertung.....	22

3.	Ergebnisse.....	24
3.1	Arachidonsäure-induzierte Aggregationen.....	24
3.1.1	Hemmung der Thrombozytenfunktion und thrombozytären MDA-Synthese durch ASS.....	26
3.1.1.1	Vergleich von ARA (NatuTec) und ARA (Roche, ASPItest).....	28
3.1.1.2	Vergleich der thrombozytären MDA- und TXB ₂ -Synthese.....	29
3.1.2	Ozagrel als Inhibitor der Thromboxan-Synthese.....	31
3.1.2.1	Vergleich der thrombozytären MDA- und TXB ₂ -Synthese.....	33
3.1.3	Beziehung zwischen MDA und Aggregation in Gegenwart unter- bzw. überschwelliger Konzentrationen von ARA (Roche, ASPItest).....	34
3.2	Kollagen-induzierte Aggregationen.....	35
3.2.1	Hemmung der Kollagen-induzierten MDA-Synthese durch ASS.....	37
3.2.2	Vergleich der thrombozytären MDA- und TXB ₂ -Synthese nach Thrombozytenstimulation durch Kollagen.....	39
3.3	ADP-induzierte Aggregationen.....	41
3.3.1	Hemmung der ADP-induzierten Thrombozytenfunktion und MDA-Synthese durch Cicaprost.....	43
3.3.2	Vergleich der thrombozytären MDA- und TXB ₂ -Synthese.....	45
4.	Diskussion.....	47
4.1	Die Bedeutung von Plättchenfunktionsparametern als Biomarker der ASS-Wirkung.....	47
4.2	TXB ₂ und MDA als Biomarker für das Monitoring der antithrombozytären Wirkung von ASS.....	49
4.3	Bedeutung der Aggregationsstimulatoren für den Nachweis von thrombozytär freigesetztem MDA.....	50
4.3.1	Arachidonsäure als Aggregationsstimulus.....	50
4.3.2	Kollagen und ADP als Agonisten der Thrombozytenaktivierung und ihr Einfluss auf die TXB ₂ - bzw. MDA-Synthese.....	51
4.3.3	Die Wahl des Aggregationsstimulus.....	52
4.4	Hemmstoffe des Arachidonsäuremetabolismus.....	52
4.4.1	Ozagrel als Inhibitor der Thromboxan-Synthese.....	52
4.4.2	Cicaprost.....	54
4.5	Kritische Bewertung der Methodik.....	55
4.5.1	Licht-Transmissions-Aggregometrie (LTA).....	55
4.5.2	Messeinschränkungen mit den Biomarkern MDA und TXB ₂	55

4.5.3 Messbedingungen bei gesunden Probanden	57
4.6 Ausblick.....	57
4.7 Schlussfolgerung	58
5. Literatur- und Quellenverzeichnis.....	60
6. Anhang	68

1. Einleitung

Die Einführung von Acetylsalicylsäure (ASS) zur Sekundärprophylaxe bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung und anderen kardiovaskulären Krankheiten war ein wichtiger Schritt in der Geschichte der medikamentösen Therapie von Herz-Kreislaufkrankheiten (1-3). Die Effektivität der plättchenhemmenden Wirkung wurde durch zahlreiche Studien belegt. So konnte gezeigt werden, dass eine antithrombotische Therapie bei kardiovaskulär erkrankten Patienten die Gefahr einen Myokardinfarkt, Schlaganfall oder den kardiovaskulär bedingten Tod zu erleiden, um im Durchschnitt 25 % reduziert (4, 5). Trotzdem bestehen große interindividuelle Unterschiede bezüglich der plättchenhemmenden Wirkung von ASS (3, 6). Vor allem zwischen Patientengruppen mit unterschiedlichen Krankheitsbildern ließen sich Unterschiede nachweisen. Der Begriff „Aspirin-Nonresponse“ oder „Aspirin-Resistenz“ hat sich in den vergangenen Jahren diesbezüglich etabliert. Es gibt Hinweise, dass ein vermindertes Ansprechen auf eine ASS-Therapie mit einer erhöhten Inzidenz von kardiovaskulären und ischämischen Ereignissen vergesellschaftet ist (2). Die optimalen Testmethoden zur Diagnostik von „Aspirin-Resistenz“ bleiben jedoch unklar (7, 8).

1.1 Hämostase

Der Begriff Hämostase bezeichnet die Blutstillung nach Verletzung oder krankheitsbedingten Veränderungen der Gefäßwände. Innerhalb dieses komplexen Prozesses wird eine primäre, reversible Phase von einer sekundären, irreversiblen Phase unterschieden. Kommt es innerhalb eines Gefäßes zu einer Verletzung, spielen die weißen Blutplättchen, die Thrombozyten, eine entscheidende Rolle. Diese heften sich an die verletzten Gefäßstellen, verklumpen miteinander (Aggregation) und bilden einen initialen Blutpfropf (9), der die Blutung zunächst stillt. Insgesamt ist die Hämostase ein komplexer Prozess, der durch ein Zusammenspiel von zahlreichen Proteinkomplexen, Enzymen und Adhäsionsmolekülen gekennzeichnet ist.

1.1.1 Die Bedeutung von Kollagen für die Hämostase

Die Ruptur einer Gefäßwand führt initial zu einer Freilegung von subendothelial gelegenen Kollagen. In Folge dessen lagern sich Thrombozyten in diesem Bereich an und es kommt zu einer Interaktion von Kollagen mit verschiedenen thrombozytären Rezeptoren. Entscheidend sind dabei das Integrin $\alpha_2\beta_1$ (10-12) und das Glykoprotein VI (GPVI) (10, 11, 13), welches an den Fc Rezeptor γ chain gekoppelt ist (14). Diese können direkt an Kollagenfibrillen binden. GPVI stellt in diesem Zusammenhang vermutlich den entscheidenden Schlüsselregulator dar (11, 15). Bindet Kollagen an diesen, wird eine Kaskade von Tyrosinphosphorylierungen ausgelöst, die die Proteinkinase C (PKC) aktiviert und zu einer Mobilisierung der Ca^{2+} Vorräte führt (16). Des Weiteren kommt es durch das thrombozytäre Glykoprotein Ib-V-IX (GPIb-V-IX)

und das Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ (GPIIb/IIIa) über den Kollagen gebundenen von-Willebrand-Faktor (vWF) zu einer indirekten Interaktion (17). Die Bindung von Kollagen an die spezifischen thrombozytären Rezeptoren bewirkt im Anschluss eine Aktivierung, Formveränderung („*shape change*“) und die damit verbundene Granulafreisetzung aus den Thrombozyten (18).

1.1.2 Der Einfluss von ADP auf die Hämostase

Während des Aktivierungsprozesses beginnen Thrombozyten ihre Granulainhaltsstoffe auszuschütten. Dabei unterscheiden sich die dichten Granula mit Inhaltsstoffen wie ATP, ADP, Ca^{2+} und Serotonin von den α -Granula, die verschiedene Enzyme, adhäsive Proteine, Wachstumsfaktoren, zytokinähnliche Proteine und Koagulationsfaktoren beinhalten (18).

Im Hinblick auf den komplexen Ablauf der Hämostase spielt Adenosindiphosphat, kurz ADP, eine zentrale Rolle (19). Nach der Freisetzung aus dem umliegenden Gewebe oder der dichten Granula kann es an drei unterschiedlichen thrombozytären Rezeptoren (P2X_1 , P2Y_1 und P2Y_{12}) binden (19, 20). Dabei stellt P2X_1 einen Ionenkanalrezeptor dar, der nach Bindung von ADP zum Einstrom von Ca^{2+} führt (19, 21). Im Gegensatz dazu sind P2Y_1 und P2Y_{12} G-Protein gekoppelte Rezeptoren. Die Bindung von ADP an den P2Y_1 Rezeptor bewirkt zunächst die Aktivierung der Phospholipase C (PLC), anschließend eine Ca^{2+} Mobilisierung aus den intrazellulären Speichern, den „*shape change*“ und letztendlich die Plättchenaggregation (19, 20, 22-24). Die Aktivierung von P2Y_{12} vermittelt über die Inhibition der Adenylatcyclase (20) eine Verstärkung der Plättchenaggregation (19). Insgesamt verstärkt die Granulasekretion den Aktivierungsprozess der Thrombozyten.

1.1.3 Arachidonsäuremetabolismus

Innerhalb der Aktivierungsphase der Thrombozyten kommt es zu einem komplexem enzymatischem Ablauf, der das Ziel verfolgt, zunächst Arachidonsäure (ARA) aus seiner veresterten Form an Membranphospholipide der Zellmembran heraus zu lösen, um nach der Bildung einer Reihe von verschiedenen Eikosanoiden als Endprodukt Thromboxan A_2 (TXA_2) zu erhalten. TXA_2 bindet nach seiner Freisetzung in das Plasma an einen spezifischen Rezeptor auf den Thrombozyten, den Thromboxan-Rezeptor (TP-Rezeptor), um eine Granulasekretion auszulösen, die anschließend zur Induktion der irreversiblen Plättchenaggregation führt (18, 25, 26).

Zunächst bewirkt der schon zuvor beschriebene erhöhte Ca^{2+} Spiegel eine Aktivierung der Phospholipase C (PLC), bzw. der Phospholipase A_2 (PLA_2), und damit die Freisetzung von ARA aus seiner veresterten Form an Membranphospholipide (27, 28). Katalysiert durch das Enzym Cyclooxygenase (COX) wird ARA im nächsten Schritt durch eine Zyklisierung und eine Oxygenierung an C-11 und C-15 zu Prostaglandin G_2

(PGG_2) umgewandelt (29, 30) (Abb. 1). Im menschlichen Organismus kommen verschiedene Cyclooxygenasen, die COX-1, 2 und 3, vor (29, 31), wobei die COX-1 die Entstehung von thrombozytären Thromboxan (TX) bevorzugt katalysiert.

Im weiteren Verlauf wird durch eine Reduzierung PGG_2 zu PGH_2 transformiert, welchem anschließend eine enzymatische oder nicht enzymatische Isomerisierung zu verschiedenen Prostaglandinen PGD_2 , PGE_2 und $\text{PGF}_{2\alpha}$ folgt (29, 32-34) (s. Abb. 1). PGH_2 wird zudem enzymatisch zu Prostacyclin (PGI_2) und TXA_2 umgewandelt, welche instabile Substanzen darstellen (29, 32, 33, 35). PGI_2 zerfällt innerhalb weniger Minuten zu $\text{PGF}_{1\alpha}$ (32).

In aktivierten Thrombozyten wird ARA hauptsächlich zu TXA_2 metabolisiert. Thrombozyten verfügen neben der COX-1 über das Enzym Thromboxansynthase (TX-Synthase), welches aus dem Substrat PGH_2 im gleichen Verhältnis 12(L)-Hydroxy-5,8,10-Heptadetriensäure (HHT), TXA_2 und Malondialdehyd (MDA) bildet (32, 36, 37). TXA_2 führt nach Abgabe in das umliegende Medium und der Aktivierung von Thromboxan-Rezeptoren (z.B. auf anderen Thrombozyten) über die Aktivierung der PLC (38) zur irreversiblen Plättchenaggregation (25). Aufgrund seiner Instabilität kommt es jedoch innerhalb kürzester Zeit (Minuten) zur Transformation von TXA_2 zum biologisch inaktiven, deutlich stabileren Thromboxan B_2 (TXB_2) (25, 27) (Abb. 1).

Insgesamt verstärkt TXA_2 die Plättchenaktivierung und ist essentiell für eine vollständige Aggregation der Thrombozyten (7, 25). Daneben wurden zusätzlich vasokonstriktorische, proliferations- und entzündungsfördernde Eigenschaften nachgewiesen (35, 39, 40).

Im Anschluss an die primäre Hämostase folgt die Einleitung der plasmatischen Gerinnungskaskade. Dabei kommt es durch Thrombin zur Bildung von Fibrin aus Fibrinogen, welches den Blutthrombus festigt und stabilisiert.

1.2 Pharmakologische Hemmung der Thrombozytenfunktion

Thrombozytenfunktionshemmer werden vor allem bei Patienten mit kardiovaskulären Erkrankungen eingesetzt, mit dem Ziel, arterielle Thrombosen zu verhindern. Durch den komplexen Ablauf der Hämostase ergeben sich innerhalb der primären und sekundären Hämostase jedoch unterschiedliche pharmakologische Angriffspunkte. Als klinisch besonders relevant hat sich die Hemmung des Arachidonsäuremetabolismus (ARA-Metabolismus) und die damit verbundene verminderte Synthese von TXA_2 als wichtiger Aggregationsverstärker erwiesen. Aber auch innerhalb des ARA-Metabolismus zeigen sich weitere mögliche Angriffspunkte für Thrombozytenfunktionshemmer (Abb. 1).

1.2.1 Acetylsalicylsäure (ASS)

ASS gehört zu der Gruppe der *NSAIDs* (*Non-steroidal anti-inflammatory drugs*) und stellt chemisch einen „Acetatester der Salicylsäure“ dar (41). Seine pharmakologischen Effekte sind vielfältig und reichen über analgetische, antiinflammatorische und antipyretische bis hin zu antithrombozytären Wirkungen (42, 43). Die medizinische Verabreichung von ASS hat sich daher schon lange etabliert. Besonders bei Patienten mit kardiovaskulären Erkrankungen wird ASS zur Hemmung der Metabolisierung von ARA zu Prostaglandinen und damit der Bildung von TXA₂ als Verstärker der arteriellen Thrombogenese routinemäßig eingesetzt. So reduziert ASS bei Patienten mit erhöhtem Risiko nachweislich die Gefahr des Auftretens eines Myokardinfarktes, Reinfarktes, Schlaganfalls oder Tod aus vaskulärer Ursache (5). Des Weiteren wird neuerdings auch ein begrenzter Nutzen bei der sekundären Prävention venöser Thrombosen diskutiert (44).

Der Wirkmechanismus von ASS beruht auf einer Acetylierung und damit irreversiblen Hemmung der COX-1 (45). Nahe dem aktiven Zentrum, am Serin 529, kommt es dabei zur Übertragung eines Acetatrestes (33, 46, 47). Da ARA im Folgenden nicht mehr im aktivem Zentrum binden kann, ist die Bildung der nachfolgenden Prostaglandine, einschließlich TXA₂, gehemmt (27, 48). Eine Interaktion mit dem thrombozytären TP-Rezeptor bleibt aus. Folglich kommt es zu keiner Aggregationsverstärkung mehr. Die Hemmung der thrombozytären COX-1 hält über die gesamte Lebenszeit (7 - 10 Tage) der Thrombozyten an (27, 49).

Heutzutage wird ASS vor allem als *low-dose* Therapie eingesetzt. Die meisten Literaturquellen empfehlen in diesem Zusammenhang eine tägliche ASS Dosis zwischen 75 und 100 mg (16, 50). Aktuelle Richtlinien befürworten eine Dosierung von 75 - 162 mg/d oder in Einzelfällen sogar bis zu 325 mg/d (51). Um eine sofortige Inhibition der TX-abhängigen Plättchenaggregation zu erzielen, wird bei akuten klinischen Situationen eine einmalige intravenöse Gabe von bis zu 500 mg angeraten (16, 52). Wenn der Verdacht eines Nichtansprechens besteht, kann in Einzelfällen die Dosis oder die Häufigkeit der Einnahme erhöht werden (43).

Die Wirksamkeit von ASS im Rahmen der Prävention kardiovaskulärer Ereignisse konnte bereits durch zahlreiche Studien belegt werden. So wurde bei einer Behandlung mit ASS über einen Zeitraum von zwei Jahren eine Risikoreduktion bezüglich des Auftretens von vaskulären Ereignissen von 16,0 auf 12,9 % nachgewiesen (5). Des Weiteren zeigte sich, dass ASS und andere antithrombozytäre Medikamente das Risiko eines ernsthaften vaskulären Ereignisses im Durchschnitt um 25 % reduzieren (4, 5). Bei Hochrisikopatienten verminderte sich das Risiko für Myokardinfarkte und Schlaganfälle sogar um 30 % (4). In diesem Zusammenhang konnte auch die Sterblichkeit deutlich vermindert werden (5).

1.2.2 Ozagrel

Ein Gleichgewicht zwischen der Produktion von TXA_2 in den Thrombozyten und PGI_2 in den Gefäßwänden ist für die Aufrechterhaltung der Hämostase von essentieller Bedeutung, denn durch ein Ungleichgewicht kann es zu einer erhöhten Produktion von TXA_2 und damit z.B. zu einem myokardialen Infarkt kommen (53). Der schon fast routinemäßige Einsatz von ASS bei myokardialen Erkrankungen kann somit durch die Hemmung der COX nicht nur zu einer verminderten Bildung von TXA_2 , sondern auch zu einer verminderten Synthese von PGI_2 in den Gefäßendothelien führen (27, 53).

Ozagrel ist ein 1-Alkyl-Imidazol-Derivat, welches als Inhibitor der TX-Synthese die Bildung von TXA_2 aus PGH_2 unterdrückt (Abb. 1) (54, 55). Andere Enzyme des ARA-Metabolismus wie die COX, die PGI_2 Synthetase oder die PGE_2 Isomerase werden nicht beeinflusst, jedoch könnte die unter Hemmung der thrombozytären TX-Synthese vermehrte Freisetzung von PGH_2 transzellulär eine Steigerung der vaskulären PGI_2 -Synthese bewirken (54). Klinisch ist Ozagrel mangels umfangreicher Studienergebnisse allerdings nicht in Gebrauch. Ob Ozagrel (oder andere TX-Synthasehemmstoffe) in Zukunft eine Behandlungsmöglichkeit bei zerebro- und kardiovaskulären Erkrankungen darstellen werden, bleibt abzuwarten (54).

1.2.3 Cicaprost

Cicaprost ist ein Prostacyclin- (PGI_2) Derivat, welches zwar ein hochpotenter Thrombozytenfunktionshemmer ist, jedoch wegen Zusatzwirkungen (z.B. starke Vasodilatation) klinisch zur Thrombozytenaggregationshemmung nicht angewendet wird. Das bevorzugt in der Gefäßwand gebildete PGI_2 stellt ein Endprodukt des ARA-Metabolismus dar (Abb. 1), welches eine vasodilatatorische Wirkung besitzt und zur Inhibition der Plättchenaggregation führt (35, 56). Zudem kann es eine unerwünschte Thrombozytenadhäsion unterdrücken oder auch eine bereits bestehende Aggregation hemmen. Chemisch erweist es sich durch seine kurze Halbwertszeit von zwei bis drei Minuten als instabil (32, 35). Anders als PGI_2 wird Cicaprost nach oraler Einnahme durch den Gastrointestinaltrakt komplett resorbiert und besitzt damit eine hohe Bioverfügbarkeit (56). Es ist metabolisch stabil und verfügt über eine Halbwertszeit von ein bis zwei Stunden, bis es vor allem über die Nieren ausgeschieden wird (56). Aufgrund dieser pharmakokinetischen Charakteristika könnte es ein oral wirksames Medikament zur Antiaggregationshemmung darstellen, wurde in dieser Indikation aber wegen unerwünschter Wirkungen (z.B. Hypotension) nicht weiterentwickelt (56, 57).

1.2.4 „Nonresponse gegenüber Thrombozytenfunktionshemmern“

Bezüglich Antithrombotika wurde wiederholt das Problem beschrieben, dass die Wirkstoffe ihr pharmakologisches Ziel, die Thrombozytenfunktionshemmung, nicht erreichen und dadurch nicht effektiv sind (47, 50, 58-60).

Insbesondere auch in Bezug auf ASS zeigten mehrere Studien, dass es individuell abhängig zu einem verminderten Ansprechen kommen kann. Metaanalysen umfangreicher Datensätze erwiesen zusätzlich, dass Patienten mit einer herabgesetzten im Labor erfassten Wirksamkeit von ASS einem erhöhten Risiko für kardiovaskuläre, zerebrovaskuläre und peripheren vaskulären Ereignissen unterliegen (2, 61, 62). Dabei ist das Risiko kardiovaskulärer Ereignisse durchschnittlich vierfach so hoch als bei Patienten, die auf eine ASS Einnahme laborchemisch ansprechen (61). Hierfür wurde der Begriff „ASS-Resistenz“ eingeführt.

Um eine differenziertere Definition der „ASS-Resistenz“ zu liefern, stellten Weber et al. 2002 ein Konzept zur Differenzierung durch drei verschiedene Untertypen auf (63). Ihre Ergebnisse beziehen sich dabei auf *in vivo* und *in vitro* Versuche mit PRP, die die TX-abhängige Thrombozytenaggregation und die TX-Synthese untersuchten:

- **Typ 1** stellt den pharmakokinetischen Typ dar, bei welchem es zur Abweichung der Aggregations- und TX-Hemmung *in vivo* und *in vitro* kommt. Ursächlich sind vermutlich intra- und interindividuelle Variabilitäten in der Pharmakokinetik.
- **Typ 2** stellt den pharmakodynamischen Typ dar. Bei diesem zeigt sich *in vivo* und *in vitro* eine Unfähigkeit von ASS die Aggregation und die TX-Bildung vollständig zu inhibieren.
- **Typ 3** stellt den pseudo-resistenten Typ dar. Dieser kennzeichnet sich durch eine normale TX-Hemmung *in vivo* und *in vitro*, jedoch eine erhöhte Thrombozytenaggregation.

Diese Einteilung deutet die Vielfältigkeit der Hintergründe einer „ASS-Resistenz“ an. So kann zum Beispiel ein gesteigerter Thrombozyten-Umsatz bei Patienten mit CAD („*coronary artery disease*“) die Ursache einer verminderten ASS-Wirksamkeit sein (64). Und auch zwischen verschiedenen Patientengruppen, wie bei Erkrankungen mit CAD, CABG („*coronary artery bypass grafting*“), Schlaganfall oder auch im Zusammenhang mit Diabetes, zeigten sich unterschiedliche Wirkungsgrade (5).

Heutzutage ist die Bezeichnung einer „ASS-Resistenz“ im Zusammenhang mit einer Medikamentenunwirksamkeit jedoch umstritten. In vielen Fällen ist der protektive Nutzen lediglich vermindert und kann durch eine erhöhte Dosis wieder zur vollen Wirksamkeit führen. Daher sprechen einige Autoren eher von einer „ASS-Nonresponse“ oder „*high on aspirin platelet reactivity*“ („HAPR“).

Die häufigsten Mortalitätsgründe in entwickelten Ländern stellen derzeit Herzinfarkte und Schlaganfälle dar (65, 66). Um das Risiko eines erneuten atherothrombotischen Ereignisses besser vorhersagen zu können, erscheinen Untersuchungen von Patienten unter der Einnahme von antithrombotischen Medikamenten grundsätzlich sinnvoll (8). Viele Studien beziehen sich bei der Diagnose einer unzureichenden ASS-Wirksamkeit auf eine noch vorhandene Plättchenaggregation. ASS hemmt jedoch zunächst die Bildung von TXA₂. Daraus ergibt sich eine Hemmung der Aggregation. Zumindest in

niedriger Dosis (um 100 mg) hat ASS keinen direkten Einfluss auf die Hämostase. Die Wirksamkeitsbeurteilung sollte daher idealerweise auf die COX-1-abhängige TXA₂ Produktion ausgerichtet sein (7, 58). So kann nur von einem Misserfolg bezüglich der Medikamenteneinnahme gesprochen werden, wenn das pharmakologische Ziel, die thrombozytäre COX-1, nicht ausreichend gehemmt wird (58).

Die optimale Testmethodik zur Erfassung der ASS-Wirkung ist daher aus pharmakologischer Sicht die spezifische Bestimmung der TX-Synthese. Der Nachweis kann dabei auf unterschiedliche Weise verlaufen. So kann mittels des Radioimmunoassay (RIA), des Enzym-Immuno-Assay (EIA) oder auch der *high performance liquid chromatographie (HPLC)* TXB₂, das stabile Abbauprodukt von TXA₂, ermittelt werden. Alle diese Verfahren sind jedoch sehr zeitaufwändig, schwierig in der Durchführung und kostenintensiv.

Aktuell wurde im Institut der Pharmakologie und Klinischen Pharmakologie in Düsseldorf ein Test entwickelt, der die TX-Plasmaspiegel durch ein optisches Verfahren indirekt erfasst. Dabei wird mittels Fluoreszenz MDA bestimmt. Dieses wird als ein eins-zu-eins Nebenprodukt bei der TX-Synthese angesehen. Könnte gezeigt werden, dass die Bildung von TXB₂ vergleichbar mit MDA wäre, könnte in Zukunft die aufwändige TXB₂-Bestimmung durch die MDA-Bestimmung abgelöst werden.

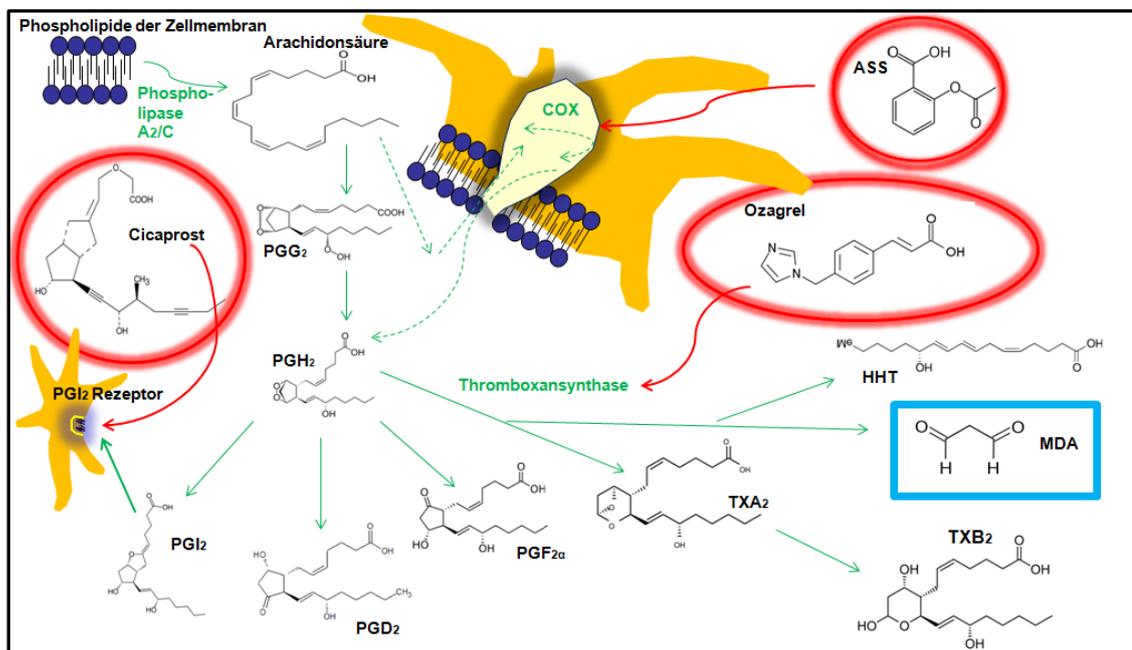


Abb. 1: Darstellung des Arachidonsäuremetabolismus mit den inhibitorischen Medikamenten: ASS, Ozagrel und Cicaprost

1.3 Ziele der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu untersuchen, ob der Nachweis von MDA eine einfachere Alternative zur TXB₂-Bestimmung ist. Da MDA ein Nebenprodukt der TXA₂-Synthese ist, wäre zu erwarten, dass sich die ermittelten MDA- bzw. TX-Konzentrationen unabhängig vom Mechanismus der Plättchenaktivierung (ARA, Kollagen, ADP) entsprechen. Zur wissenschaftlichen Validierung der neuen Methode sollte dies durch gezielte Experimente mit humanen Thrombozyten belegt werden.

Darüber hinaus war es Aufgabe dieser Untersuchung mittels MDA auch die Hemmung der Thrombozytenfunktion durch ausgewählte Wirkstoffe (ASS, Cicaprost, Ozagrel) zu untersuchen und die Sensitivität des Assays zu prüfen.

Die mit den verschiedenen Methoden:

- Licht-Transmissions-Aggregometrie zur Thrombozytenaggregationsmessung
- Fluoreszenz-photometrische Bestimmung von MDA
- TXB₂-Bestimmung mit einem Enzym-Immuno-Assay

ermittelten Ergebnisse sollten einander gegenübergestellt werden.

2. Material und Methoden

2.1 Versuchsdurchführung

2.1.1 Probanden

Die vorliegende Arbeit wurde durch die Ethikkommission der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf zustimmend bewertet (Studiennummer: 4504, interne Registrierungs-ID: 2014022184). Zur Durchführung der genannten Studie wurde bei 30 gesunden, freiwilligen Probanden jeweils 30 ml Blut aus der Armvene entnommen. Als Probanden standen die Mitarbeiter des Instituts der Pharmakologie und Klinischen Pharmakologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf sowie darüber hinaus Studierende zur Verfügung. Das Alter der Probanden lag zwischen 20 und 60 Jahren. Davon waren 2/3 weibliche- und 1/3 männliche Probanden. Die Freiwilligkeit der Teilnahme wurde gewahrt. Eine schriftliche informierte Einwilligung wurde eingeholt.

Die Einschlusskriterien der Blutentnahme der Probanden waren ein Lebensalter von oder über 18 Jahren sowie die Einwilligungsfähigkeit. Ausschlusskriterien stellten bekannte Störungen oder Erkrankungen der Hämostase dar. Zudem wurde kein Blut von Probanden untersucht, die innerhalb der letzten zehn Tage Medikamente, die die Thrombozytenfunktion beeinflussen, eingenommen hatten, wie z.B. ASS und Analgetika vom *NSAID*-Typ.

2.1.2 Übersicht über die durchgeführten Untersuchungen

In der vorliegenden Arbeit wurden *in vitro* Versuche mittels thrombozytenreichem Plasma gesunder Probanden durchgeführt, die die Aktivierung von Thrombozyten durch verschiedene Agonisten, Hemmung durch ausgewählte Inhibitoren und Messung der Freisetzung von Thromboxan (TX) und Malondialdehyd (MDA) beinhalteten. Es wurden drei verschiedene Aggregationsstimuli (ARA, Kollagen und ADP) und drei Aggregationsinhibitoren (ASS, Ozagrel und Cicaprost) verwendet.

Im Folgenden werden drei verschiedene experimentelle Untersuchungen mit unterschiedlichen Versuchsdurchführungen unterschieden:

1. Thrombozytäre Aggregationen *in vitro* mittels der Licht-Transmissions-Aggregometrie.
2. Fluoreszenz-photometrische Bestimmung von Malondialdehyd, welches während der Aggregation gebildet wird.
3. Bestimmung von Thromboxan B₂ (TXB₂) als direktes Abbauprodukt von Thromboxan A₂ (TXA₂), welches nur wenige Sekunden stabil ist und daher in Form von TXB₂ bestimmt werden muss.

Die angegebenen Aggregationsagonisten und -antagonisten wurden dabei in folgenden Kombinationen eingesetzt:

- Konzentrationswirkungsbeziehung der Thrombozytenaktivierung durch ARA
- Konzentrationswirkungsbeziehung der Thrombozytenfunktionshemmung durch ASS unter Stimulation mit ARA
- Konzentrationswirkungsbeziehung der Thrombozytenfunktionshemmung durch Ozagrel unter Stimulation mit ARA
- Konzentrationswirkungsbeziehung der Thrombozytenaktivierung durch Kollagen
- Konzentrationswirkungsbeziehung der Thrombozytenfunktionshemmung durch ASS unter Stimulation mit Kollagen
- Konzentrationswirkungsbeziehung der Thrombozytenaktivierung durch ADP
- Konzentrationswirkungsbeziehung der Thrombozytenfunktionshemmung durch Cicaprost unter Stimulation mit ADP

2.2 Untersuchungsmaterialien

2.2.1 Substanzen

32 % ige HCl	Pro Analysis, Merck, Darmstadt, Deutschland, Art. 1.00319
Acetylsalicylsäure (ASS)	Aspirin i.v. ^R , Bayer, Leverkusen, Deutschland
Adenosindiphosphat (ADP)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland, Art. A2754
Arachidonsäure (ARA)	ASPItest von Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland, Art. 06675816190 NatuTec, Oxford Biochemical Research, Michigan, USA, Art. #10AA
Cicaprost	Schering, Berlin, Bergkamen, Deutschland, Art. ZK 96.480
Citronensäure x H ₂ O	Merck, Darmstadt, Deutschland, Art. 1.00244
Glukose	Merck, Darmstadt, Deutschland, Art. 1.08337
HEPES	Sigma Chemical, St. Louis, USA, Art. H3375
Indomethacin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland, Art. I7378
KCl	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland, Art. P017.1
KH ₂ PO ₄	Merck, Darmstadt, Deutschland, Art. 4873
Kollagen (Typ 1)	Horm ^R Nycomed, Linz, Österreich

MgCl ₂ x 6H ₂ O	Merck, Darmstadt, Deutschland, Art. 1.05833
Milli-Q-H ₂ O (Reinstwasser)	Milli-Q-Brocel, Millipore, Merck, Darmstadt, Deutschland
Na ₂ HPO ₄ x H ₂ O	Merck, Darmstadt, Deutschland, Art. 6580
NaCl	Merck, Darmstadt, Deutschland, Art. 1.06404
NaHCO ₃	Merck, Darmstadt, Deutschland, Art. 1.06329
Ozagrel	Cayman/Biozol, Eching, Deutschland, Art. CAY70515-100
Terbogrel	Dr. Karl Thomae, Biberach, Deutschland, Art. 121946
Thiobarbitursäure (TBA)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland, Art. T5500
Tri-Natriumcitrat	Merck, Darmstadt, Deutschland, Art. 6446
Tris-Puffer	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland, Art. 4855.2
Ultrapure Wasser	Cayman Chemical Company, Ann Arbor, Michigan, USA, Art. 400000

2.2.2 Lösungen

0,6M HCl	7,317 ml 32 % iger HCl zu 100 ml aqua dest.
ADP	Stlsg.: 10 mM Für die Konzentrationswirkungskurve wurde die 10 mM Stlsg. auf 1, 2,5, 3, 5, 10, 20, 30 µM ADP weiter verdünnt.
ARA (ASPItest von Roche)	Das gelieferte Lyophilisat wurde laut Hersteller-vorschrift gelöst und für die Konzentrations-wirkungskurve mit MilliQ-H ₂ O auf die Endkonzentration von 100, 200, 300, 500, 750 und 1000 µM ARA verdünnt.
ARA (NatuTec)	Stlsg.: 100 mM in Ethanol. Die Stlsg. wurde mit NaOH unter Stickstoff versalzt, bei -20 °C gelagert und arbeitstäglich mit Tris-Puffer auf 50 mM verdünnt. Für die Konzentrationswirkungskurve wurde die 50 mM

	Lösung mit Tris-Puffer auf 100, 200, 300, 500, 750, 1000 μM ARA weiter verdünnt.
Ascorbin-Citronensäure-Dextran (ACD)	74,8 mM Tri-Natriumcitrat 65 mM Citronensäure x H_2O 111 mM Glukose x H_2O
ASS	0,5 g ASS in 1 g Aspirin i.v. ^R . Für die Konzentrationswirkungskurve wurde die 5 mM Stammlösung (Stlsg.) auf die Endkonzentration von 10, 30, 100, 300 μM ASS mit H_2O weiter verdünnt.
Cicaprost	Stlsg. in Ampulle des Herstellers = 133,4 μM Für die Konzentrationswirkungskurve wurde die Stlsg. mit TM auf 0,1, 0,3, 1, 3, 10, 30, 100 nM Cicaprost verdünnt. Die Verdünnungen wurden aliquotiert und bei -20 °C gelagert.
EDTA	77 mM Titriplex III
Indomethacin	50 mM in Ethanol.
Kollagen	1 mg/ml Stlsg. von Horm ^R Für die Konzentrationswirkungskurve wurde mittels des mitgelieferten Kollagenverdünners auf 1, 2, 3, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Kollagen weiter verdünnt.
Milli-Q- H_2O (Reinstwasser)	Verwendet für die Herstellung von Verdünnungsreihen und Puffer.
Ozagrel	Für die Konzentrationswirkungskurve wurde eine 10 mM Stlsg. auf die Endkonzentration von 0,03, 0,1, 0,3, 1, 3, 10 μM Ozagrel weiter verdünnt.
Phosphat-Puffer	0,01 M KH_2PO_4 0,05 M Na_2HPO_4 pH 7,4
Terbogrel	300 μM in Dimethylsulfoxid (DMSO).
Thiobarbitursäure (TBA)	0,53 % TBA in Phosphat-Puffer gelöst.
TM-Puffer	134 mM NaCl 12 mM NaHCO_3 2,9 mM KCl 0,36 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ 1 mM $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$

	5 mM HEPES pH 7,4
Trichloressigsäure (TCA)	20 % in 0,6 M HCL.
Tris-Puffer	50 mM pH 7,4

2.2.3 Labormaterialien

Eppendorf Behälter	Safe-Lock Tubes, 2,0, 1,5, 0,5 ml, Eppendorf
Falcon-Röhrchen	CELLSTAR ^R Tubes, 15 ml, Greiner bio-one
Flügelkanüle	BD Vacutainer ^R , 0,8 x 19 mm x 305 mm, Safety-Lok TM , Becton Dickinson
Mikroküvetten mit Rührstäbchen	DiaSys Greiner
Mikroplatten	96 <i>Well</i> , Schwarz, für die Fluoreszenzmessung, ThermoLab Systems
Pipetten	P20: pipetman, Gilson P200: pipetman, Gilson P1000: pipetman, Gilson
Pipettenspitzen	TipOne ^R , 200, 1000 µl, Starlabgroup
Spritze	Original-Perfusor ^R Syringe, 50 ml, Luer Lock, Braun
Thromboxane B ₂ EIA Kit	Art. 519031, Cayman Chemical

2.2.4 Geräte

Flachbettsschreiber	Model 621, Packard, Palo Alto, CA., USA
Fluoreszenzphotometer	Fluoroskan Ascent, Labsystems, Vantaa, Finnland
Graphik- und Statistiksoftware	SigmaPlot 11.0, Jandel Scientific, Systat Software, Erkrath, Deutschland
Laborrührer	Magnetrührer, IKA Combimag RCT, Janke und Kunkel, Staufen im Breisgau, Deutschland
pH Meter	pH211, Microprocessor pH Meter, Hanna instruments, Woonsocket, Rhode Island, USA

Thermomixer	5436, Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Vortex	REAX 2000, Heidolph, Schwabach, Deutschland
Waagen	ED2202S-CW, Sartorius, Göttingen, Deutschland Feinwaage, XS204 DeltaRange ^R , Mettler Toledo, Columbus, Ohio, USA
Zentrifugen	5415 R Mikrozentrifuge, Eppendorf, Hamburg, Deutschland Heraeus Minifuge RF, Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Zweikanalaggregometer	LABor APACT, LABor BioMedical Technologies, Ahrensburg, Deutschland

2.3 Methoden

2.3.1 Blutentnahme

Die Blutentnahme erfolgte über eine *Butterfly*-Kanüle (0,8 x 19 mm x 305 mm) in eine mit 1:10 Ascorbin-Citronensäure-Dextran (ACD) präparierte 50 ml Spritze.

2.3.2 Plasmagewinnung

Das in der Spritze gewonnene ACD-Blut wurde im Anschluss auf mehrere Falcon-Röhrchen verteilt.

Zur Gewinnung von plättchenreichem Plasma (PRP) wurde das ACD-Blut für 10 min mit 270 x g bei Raumtemperatur zentrifugiert. Anschließend wurde das PRP vorsichtig vom Erythrozytensediment abgehoben und in einem neuen Falcon-Röhrchen gesammelt.

Zur Gewinnung von plättchenarmem Plasma (PAP) wurde PRP 10 min mit 1700 x g bei Raumtemperatur zentrifugiert. Das PAP über dem *Buffycoat* wurde anschließend vorsichtig abgehoben und separat in einem neuen Falcon-Röhrchen gesammelt.

Im Folgenden beziehen sich alle Konzentrationsangaben auf die Endkonzentrationen in den Mikroküvetten des Zweikanalaggregometers.

2.3.3 Thrombozytenfunktionsmessungen

2.3.3.1 Licht-Transmissions-Aggregometrie (LTA)

Zur Erfassung der Thrombozytenfunktion wurde die Licht-Transmissions-Aggregometrie, ein turbimetrisches Verfahren nach Born, benutzt (67, 68). Die Methode beruht auf einer Änderung der Lichttransmission während der Aggregation durch eine Verklumpung der Thrombozyten (16). Diese Messungen wurden mit PRP durchgeführt.

Verwendet wurde ein Zweikanalaggregometer Labor APACT, welches mit einem Flachbetschreiber verbunden wurde. Der Schreiber wurde auf einen Papiervorschub von 0,5 mm/sec eingestellt. Zur Aufnahme der PRP-Suspension dienten DiaSys Greiner Mikroküvetten mit Rührstäbchen.

Zu Beginn jeder Versuchsreihe wurden Aggregometer und Schreiber geeicht. Dabei dienten jeweils eine Küvette mit 100 µl Thrombozytenmedium (TM) + 400 µl PRP und eine Weitere mit 100 µl TM + 400 µl PAP als Referenz. Die Lichttransmission durch die PAP Küvette wurde auf 100 % und die der PRP Küvette auf 0 % gesetzt. Diese Eichung blieb bis zum Versuchsende bestehen und wurde bei Wechsel zum Plasma eines anderen Probanden neu vorgenommen.

Im Anschluss wurde PRP mit dem TM oder mit einem *NSAID* gemischt. Diese Suspension wurde während der Versuchsdurchführung, unter ständigem Rühren mittels eines Magnetrührers bei 1000 U/min und 37 °C, mit einem Plättchen-Agonisten versetzt. Der jeweilige Plättchen-Agonist diente als Stimulus für die Thrombozyten. Durch die Koagulation der Thrombozyten kommt es zu einer Verringerung der optischen Dichte des PRP. Diese wurde photometrisch erfasst und mit Hilfe eines Schreibers registriert.

2.3.3.2 Arachidonsäure-induzierte Aggregation

Zu Beginn der Arbeiten wurde Arachidonsäure (ARA) des Herstellers NatuTec verwendet. Wie nachfolgend beschrieben, wurde später jedoch auf ARA eines anderen Herstellers umgestellt (Roche, ASPItest).

ARA wurde grundsätzlich unter Stickstoff gelagert, da jede Form der Oxidation vermieden werden sollte.

Ein Aggregationsansatz von 500 µl bestand immer aus 400 µl PRP und 100 µl TM. Je nach Versuchsansatz wurde TM durch einen Plättchen-Antagonisten ersetzt. Dieser Ansatz wurde zunächst in eine Mikroküvette mit Rührstäbchen pipettiert und 10 sec im Lichtkanal des Aggregometers bei 37 °C durchmischt. Im nächsten Schritt wurde die Mikroküvette in einen Heizblock umgelagert und dort bei 37 °C weitere 4 min inkubiert. Nach deren Ablauf wurde die Küvette wieder in den Lichtkanal gestellt, in

diesem wiederum 2 min bei 37 °C durchmischt und dann mit 10 µl der ARA-Stlsg. (1 mM) oder den ARA-Verdünnungen (100 - 750 µM) stimuliert. Die Aggregation wurde über 4 min aufgezeichnet und danach die Aggregationsreaktion und TX-Synthese durch die Zugabe von 7 µl Indomethacin (Indo) (0,7 mM) und 30 µl EDTA (4,62 mM) gestoppt.

Für die MDA- und TXB₂-Bestimmung wurde der Aggregationsansatz mit 13200 x g für 5 min bei 25 °C zentrifugiert. Die Thrombozyten wurden dadurch sedimentiert und anschließend entsorgt. Das nun zellfreie Plasma wurde für beide Bestimmungen aufgeteilt. Ein Teil wurde direkt für die MDA-Bestimmung verwendet und der Andere für eine spätere TXB₂-Bestimmung bei -20 °C eingefroren.

Bei der Aggregation mittels des Plättchen-Agonisten ARA (NatuTec) wurde zunächst mit unterschiedlichen Konzentrationen (100, 200, 300, 500, 750, 1000 µM) gearbeitet. Dies diente der Festlegung einer Konzentration des Agonisten für die späteren Versuche in Gegenwart von Inhibitoren der Thrombozytenaktivierung. Dabei sollte die gewählte Konzentration zu einer annähernd maximalen und reproduzierbaren Aggregation führen.

Im weiteren Verlauf der Untersuchungen fiel auf, dass ARA, welche vom Hersteller NatuTec bezogen wurde, Verunreinigungen enthielt, welche mit der MDA-Bestimmung interferierten. Daher wurden diese Bestimmungen mit ARA eines anderen Herstellers (Roche, ASPItest) wiederholt. Zur genaueren Untersuchung der Verunreinigung wurden des Weiteren Proben ohne Thrombozyten gemessen und später ausgewertet.

Für die folgenden thrombozytären Aggregationen wurde ARA in einer Konzentration von 1 mM eingesetzt, da nur diese bei allen Proben eine stabile, submaximale und reproduzierbare Aggregation induzierte.

Inhibition der Aggregation durch ASS und Ozagrel

Ziel der folgenden Bestimmungen war es Konzentrationswirkungskurven der Inhibitoren zu ermitteln. Dafür wurden verschiedene ASS- (10, 30, 100, 300 µM) und Ozagrel- (0,03, 0,1, 0,3, 1, 3, 10 µM) Konzentrationen eingesetzt. Als Agonist diente jeweils 1 mM ARA. Der Aggregationsablauf erfolgte wie bereits oben beschrieben. Es wurde mit einem Probevolumen von 500 µl gearbeitet, dass sich aus 400 µl PRP und 100 µl ASS oder 100 µl Ozagrel in den jeweiligen Konzentrationen (ASS: 10, 30, 100, 300 µM, Ozagrel: 0,03, 0,1, 0,3, 1, 3, 10 µM) zusammensetzte. Dieses wurde nach 6 min Durchmischung und Inkubation mit 1 mM ARA (10 µl) stimuliert. Nach Aufzeichnung der Aggregation für 4 min wurde diese mittels Indo (0,7 mM) und EDTA (4,62 mM) gestoppt.

Zunächst erfolgten alle durch ASS gehemmten thrombozytären Aggregationen mit 1 mM ARA von NatuTec. Auch diese Bestimmungen wurden mit ARA eines anderen Herstellers (Roche, ASPItest) wiederholt.

2.3.3.3 Kollagen-induzierte Aggregation

Auch bei Kollagen als Agonist wurden eingangs Aggregationen durchgeführt, um festzulegen mit welcher Kollagen-Konzentration gearbeitet werden soll. Dabei erfolgten die Aggregationen jeweils mit 400 µl PRP und 100 µl TM, das nach 6 min Durchmischung und Inkubation mit 1, 2, 3 oder 10 µg/ml Kollagen stimuliert wurde.

Für die folgenden Aggregationen wurde Kollagen in einer Konzentration von 2 µg/ml eingesetzt.

Inhibition der Aggregation durch ASS

Im weiteren Verlauf wurden die Aggregationen mittels ASS in den Konzentrationen von 10, 30, 100 oder 300 µM gehemmt. Die Stimulation erfolgte hier ausschließlich mit 2 µg/ml Kollagen, da diese Konzentration bei allen Probanden eine stabile Aggregation induzierte.

2.3.3.4 ADP-induzierte Aggregation

Die thrombozytären Aggregationen erfolgten auch hier zunächst mit verschiedenen ADP-Konzentrationen. Dabei wurde mit 1, 2,5, 3, 5, 10, 20 oder 30 µM ADP gearbeitet. Das Probenvolumen setzte sich aus 400 µl PRP und 100 µl TM zusammen, welches nach 6 min Durchmischung und Inkubation mit den jeweils unterschiedlichen ADP-Konzentrationen stimuliert wurde. Es zeigte sich, dass bei einer Stimulation mit 10 µM ADP immer eine stabile Aggregation erzielt wurde. Höhere ADP-Konzentrationen hingegen ließen keine wesentlichen Aggregationssteigerungen mehr zu. Daraufhin erfolgte die Durchführung aller weiteren Versuche mit 10 µM ADP.

Inhibition der Aggregation durch Cicaprost

Als Inhibitor wurde in den folgenden Aggregationen Cicaprost eingesetzt (0,1, 0,3, 1, 3, 10, 30 oder 100 nM). Das Probenvolumen setzte sich aus 400 µl PRP und 100 µl Cicaprost in der jeweiligen Konzentration zusammen, welches nach 6 min Durchmischung und Inkubation mit 10 µM ADP stimuliert wurde.

Darüber hinaus wurde in einem weiteren Aggregationsdurchlauf 100 nM Cicaprost mit 1 mM ARA stimuliert. Dies diente dem Nachweis von endogen freigesetzter ARA.

2.3.3.5 Auswertung der Aggregationskurven

Zur Auswertung der Aggregationskurven wurde deren maximale Steigung herangezogen. Bei den Aggregationskurven zeigte sich während der 30-sekündigen Aufzeichnung vor Zugabe des Stimulus eine Nulllinie. Nach der *in vitro* Applikation des jeweiligen Stimulus ließ sich meist ein „*shape change*“ erkennen (Abb. 2). Er ist auf eine abnehmende Lichttransmission zurückzuführen, die durch eine Formänderung der Plättchen vor der Aggregation entsteht. Stieg im weiteren Verlauf die Aggregationskurve nicht über den Nullwert an, wurde eine vollständige Hemmung der Aggregation angenommen (Abb. 3, grün). Stieg die Aggregationskurve jedoch an und fiel wieder ab, wurde eine „primäre“ Aggregation zugrunde gelegt (nicht dargestellt). Stieg die Kurve stetig weiter an oder erreichte ein Plateau, wurde dies als „sekundäre“ Aggregation bezeichnet. In Einzelfällen kam es zu Übergängen (biphasische Aggregation) (Abb. 3, rot).

Die Steigung der Kurve ist durch die Zunahme der Lichttransmission, aufgrund der Aggregation der Thrombozyten, gekennzeichnet. Bei der Bestimmung der Steigung wurde eine Tangente an der steilsten Stelle der Aggregationskurve angelegt und durch Fällung des Lots auf die Nulllinie die Steigung pro Minute ermittelt (Abb. 2). Sie stellt ein Maß für die Geschwindigkeit der Aggregation dar.

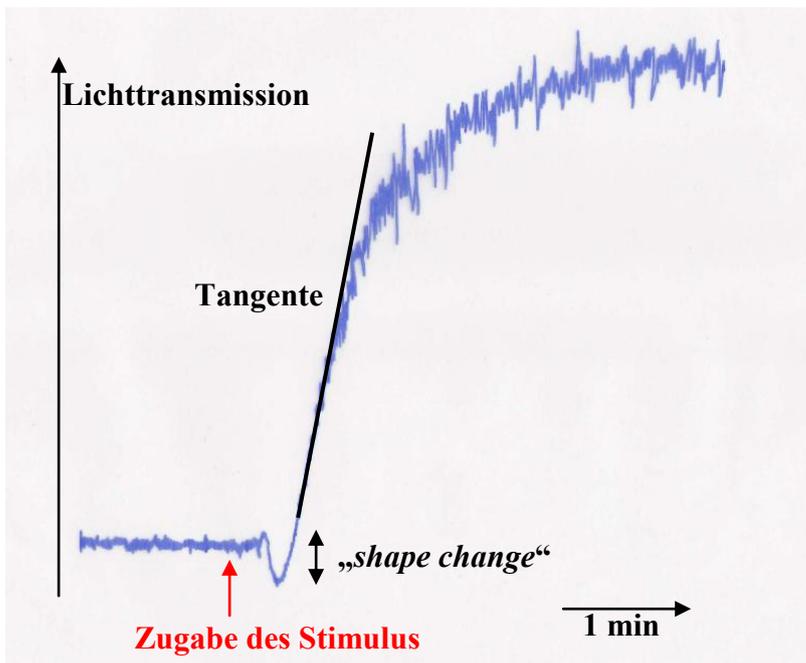


Abb. 2: Originalregistrierung einer Aggregation (blau) nach Gabe des Stimulus (ARA, Roche, ASPItest, 1 mM). Die maximale Steigung der Tangente (schwarz dargestellt) war ein Maß für die Geschwindigkeit der Aggregation.

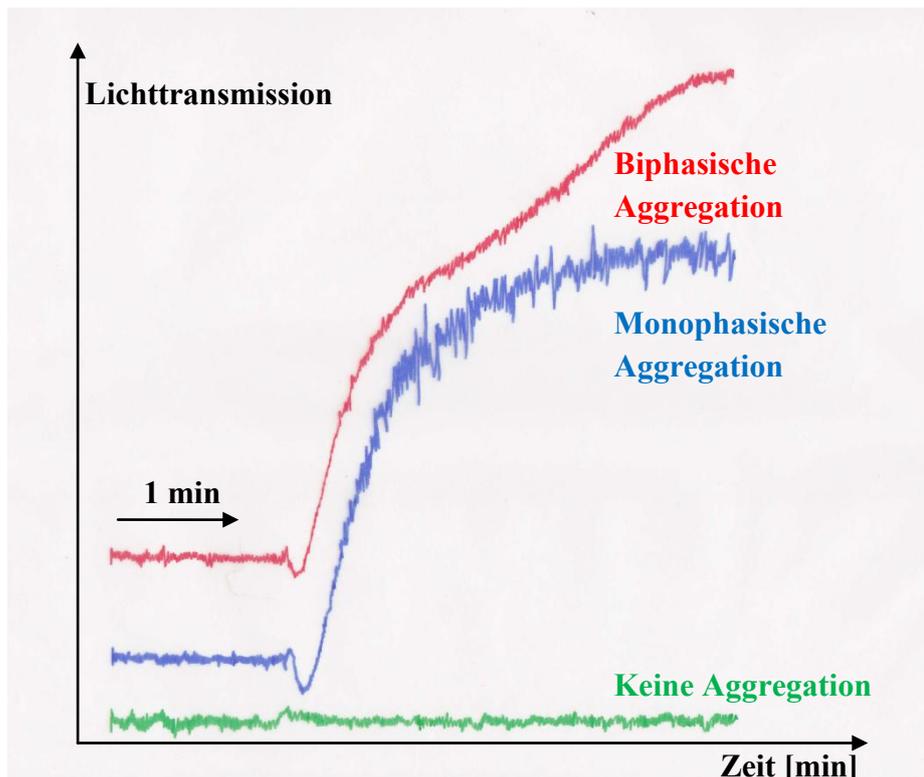


Abb. 3: Originale Beispiele von Aggregationskurven, welche irreversibel monophasisch, biphasisch verlaufen oder keine Aggregation zeigen. Auf eine Skalierung der Amplitude (Lichttransmission) wurde verzichtet.

2.3.4 MDA-Bestimmung

Wie bereits in 2.3.3.2 beschrieben, wurde nach Beendigung der Aggregation der Ansatz zentrifugiert und das plättchenfreie Plasma aufgeteilt. Ein Teil wurde für die spätere TX-Bestimmung bei -20 °C eingefroren, der andere Teil direkt für die fluoreszenzphotometrische MDA-Bestimmung verwendet.

Der für die MDA-Messung benötigte Leerwert (*Blank*) entspricht einem Aggregationsansatz von $500\text{ }\mu\text{l}$, jedoch ohne Zusatz des Agonisten. Um eine vollständige Hemmung der Thromboxan-abhängigen Thrombozytenaktivierung zu gewährleisten, wurden hier $100\text{ }\mu\text{M}$ Indo und $10\text{ }\mu\text{M}$ Terbogrel zugegeben. Davon wurden $200\text{ }\mu\text{l}$ für die MDA-Bestimmung eingesetzt.

Zudem wurden mittels 1,1,3,3-Tetraethoxypropan (TEP) Eichreihen für die MDA-Bestimmung erstellt. Diese wurden für die Berechnung der gemessenen Fluoreszenzen und deren Umrechnung in Molarität verwendet (Abb. 4). Die Eichreihen zeigten einen linearen Zusammenhang zwischen MDA-Fluoreszenz und Standardverdünnungen.

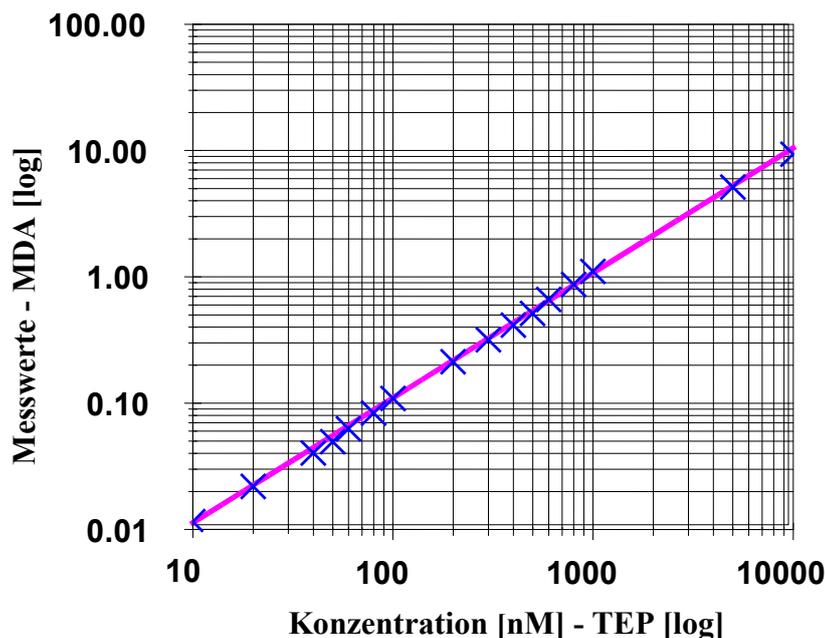


Abb. 4: Lineare TEP-Eichreihe (10 nM – 10 μ M) mit dem Korrelationskoeffizienten = 0,998

Für die Bestimmung von MDA wurden zu 200 μ l Aggregationsüberstand 120 μ l TCA pipettiert, kräftig geschüttelt und danach 10 min bei 4 °C mit 14000 x g das ausgefallene Protein sedimentiert. 200 μ l des so entstandenen Überstandes wurden mit 200 μ l TBA versetzt, gut gemischt und 30 min bei 70 °C inkubiert, dann für 5 min auf Eis gekühlt und für 10 min bei Raumtemperatur ruhen gelassen. Danach wurde die Probe fluoreszenz-photometrisch ($\lambda_{\text{excitation}}$: 520 nm, $\lambda_{\text{emission}}$: 555 nm) gemessen (Fluoroskan Ascent, Labsystems) und durch Bezug auf die lineare TEP-Reihe (10 nM - 10 μ M) und Verrechnung der Leerwerte die MDA-Konzentration bestimmt.

Es wurden gezielt Experimente durchgeführt, die die Beziehung zwischen MDA und der Aggregation analysierten, ohne gleichzeitig TX-Bestimmungen durchzuführen.

Vorversuche zur Stabilität von MDA zeigten einen geringen Konzentrationsabfall nach Lagerung der Proben bei -80 °C über 24 Stunden, jedoch eine weitgehende Stabilität über einen Zeitraum von ca. 85 min (siehe Tabelle 1). MDA wurde daraufhin immer am selben Versuchstag innerhalb dieses Zeitintervalls gemessen.

2.3.5 TXB₂-Bestimmung

Zur Bestimmung der thrombozytären TX-Synthese mittels TXB₂ im Überstand aktivierter Plättchen wurde ein Enzym-Immuno-Assay (EIA) verwendet (Thromboxane B₂ EIA Kit, Cayman Chemicals). Die Durchführung erfolgte gemäß den Anweisungen des Herstellers (s. Tabelle 1). Die Grundlage des Thromboxane B₂ EIA Kit ist die

Interaktion zwischen dem TXB₂-Acetylcholinesterase (AChE) Enzymkonjugat (TXB₂ *Tracer*) und dem TXB₂ in der Probe um TXB₂-spezifische Antiserum Bindungsstellen. Die Enzymreaktion kann photometrisch gemessen werden und dient als Nachweis für TXB₂.

Alle zu messenden Proben wurden tiefgekühlt (-20 °C) gelagert. Nach dem Auftauen wurden die Proben zunächst zentrifugiert (12000 rpm, 5 min). Im Anschluss wurden Vorverdünnungen (1:10, 1:100, 1:1000, 1:5000) hergestellt. Mittels 10 ng/ml *BulkStandard* und EIA Puffer wurden TXB₂ Standardreihen (1000, 500, 250, 125, 62,5, 31,3, 15,6, 7,8 pg/ml) erstellt. Als nächstes wurde eine Mikroplatte mit 96 *Wells* verwendet, deren Boden mit Antikörpern (IgG) beschichtet war. In jedes *Well* wurde 50 µl Probenlösung, 50 µl TXB₂ AChE *Tracer* und 50 µl TXB₂ EIA Antiserum pipettiert. Zudem musste jede Platte zwei *Blanks (Blk)*, zwei nicht-spezifische *Bindungswells (NSB)*, zwei maximum *Bindungswells (B₀)* und eine Totale Aktivität (TA) enthalten. Nachdem die acht TXB₂ Standardverdünnungen aufgetragen wurden, wurden 94 *Wells* mit Proben versetzt und die Mikrotiter wurden im Anschluss 18 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. In dieser Zeit bilden sich Antigen-Antikörper-Komplexe (*steady state*). Nach der Inkubation wurde die Platte gewaschen, um ungebundenes Material zu entfernen. Anschließend wurde 200 µl Ellman's Reagent pro *Well* (5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure, DTNB) und 5 µl *Tracer* zu TA hinzugegeben. Durch eine Reaktion der Antigen-Antikörper-Komplexe mit DTNB kommt es innerhalb von 60 - 90 min zur Bildung eines gelblichen Farbumschlags (TNB²⁻). Die Absorption dieses Farbumschlags auf der Mikroplatte wurde spektrophotometrisch bei 405 nm gemessen und anhand der TXB₂ Standardkurve quantifiziert. Das Ausmaß der Farbentwicklung ist dabei entgegengesetzt zur TXB₂-Konzentration in der Probe.

Im Unterschied zur MDA-Bestimmung, bei der im Durchschnitt 85 min bis zum Messergebnis benötigt werden, ist die Bestimmung von TXB₂ deutlich zeitintensiver. Im Durchschnitt beansprucht diese Messung 2 ½ Tage (s. Tabelle 1).

TXB₂-Bestimmung mittels des Thromboxane B₂ EIA KIT (Cayman)	Dauer	Fluoreszenz-photometrische MDA-Bestimmung	Dauer
• Auftauen der Proben	15 min	• Zugabe von Trichloressigsäure (TCA)	5 min
• Zentrifugieren der Proben	5 min	• Zentrifugieren der Proben	10 min
• Vorverdünnungen	30 min	• Zugabe von Thiobarbitursäure (TBA)	5 min
• Wartezeit	3 - 4 h	• Inkubation der Proben bei 70 °C	30 min
• Zugabe des TXB ₂ EIA Antiserums und TXB ₂ AChE Tracers auf die Mikroplatten	10 min	• Abkühlen der Proben	15 min
• Inkubation	18 h	• Pipettion des Aggregationsgemisches auf die Mikroplatten	10 min
• Waschen der Platten	15 min	• Fluoreszenz-photometrische MDA-Messung (Fluoroskan Ascent)	5 min
• Zugabe des Ellman's Reagent	10 min		
• Wartezeit	1,5 h		
• TXB ₂ -Messung mittels Eichreihen	1 h		
• Analyse	3 h		
Gesamte Messdauer	ca. 29 h	Gesamte Messdauer	ca. 85 min

Tabelle 1: Gegenüberstellung der Arbeitsschritte für die Bestimmung von TXB₂ (links, grün) und MDA (rechts, rot) sowie deren Zeitbedarf.

2.3.6 Datenerfassung und statistische Auswertung

Zunächst wurden alle erfassten Daten in Excel-Tabellen festgehalten und Mittelwerte, Standardabweichungen und Standardfehler (*standard error of means, SEM*) errechnet.

Die weitere statistische Auswertung erfolgte durch die integrierte Statistikfunktion des Programmpakets SigmaPlot 11.0 (Jandel Scientific, Systat Software). Dabei wurden

zunächst für jeden verwendeten Agonisten (ARA, Kollagen und ADP) und anschließend auch für jeden verwendeten Agonisten in Verbindung mit verschiedenen Inhibitorkonzentrationen (ASS, Ozagrel oder Cicaprost) jeweils Linien- und Streuungsdiagramme (*line and scatter plots*) mit mehrfachen Fehlerbalken (*multiple error bars*) erstellt. Die Symbolwerte bzw. -punkte entsprechen jeweils dem Mittelwert der Messung mit der entsprechenden Agonisten- bzw. Inhibitorkonzentration. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung (σ).

Die Aggregations- und MDA-Linien- und Streuungsdiagramme wurden ohne Inhibitor ausgewertet. Zur Messung der statistischen Signifikanz der Stimulation wurde die höchste Konzentration des Agonisten im gepaarten T-Test gegenüber der Kontrolle ohne Agonist statistisch geprüft. Bei nicht normal verteilten Daten (Varianzunterschieden) wurde der *Signed Rank* Test verwendet. Zur Vermeidung multipler Tests wurde auf eine Prüfung bei jeder der Agonistkonzentration verzichtet. Anschließend erfolgte die statistische Auswertung der Aggregations- und MDA-Linien- und Streuungsdiagramme bei zusätzlicher Verwendung eines Inhibitors ebenfalls mittels des gepaarten T-Test oder bei Varianzunterschieden, alternativ mittels des *Signed Rank* Test. Dabei wurde jeweils die Messung ohne Inhibitor im Vergleich zur maximalen Inhibitorkonzentration statistisch geprüft. Auch hier wurde zur Vermeidung multipler Tests auf eine Prüfung bei jeder Inhibitorkonzentration verzichtet.

Statistische Vergleiche der MDA- sowie TXB₂-Synthese zwischen verschiedenen Versuchsgruppen wurden mit dem T-Test (ungepaart) durchgeführt. Dabei wurde die MDA-Synthese bei Stimulation mit 10 µg/ml Kollagen und 1 mM ARA (ASPItest, Roche), die MDA-Synthese bei Stimulation mit 30 µM ADP und 1 mM ARA (ASPItest, Roche) sowie die TXB₂-Synthese bei Stimulation mit 300 µM ARA (ASPItest, Roche) und 3 µg/ml Kollagen statistisch ausgewertet.

Die Fluoreszenzmessungen von Leerwerten ohne Thrombozyten wurden mittels SigmaPlot durch ein einfaches Balkendiagramm dargestellt.

Um TXB₂ mit MDA unmittelbar miteinander vergleichen zu können, wurden alle TXB₂ Werte von ng/ml in nM (Einheit von MDA) umgerechnet. Anschließend wurden mittels SigmaPlot Streuungsdiagramme (*scatter plots*) mit einer einfachen Regression (*simple regression*) erstellt. Aus diesen wurden jeweils die Korrelationskoeffizienten errechnet und als r^2 angegeben sowie die Standardabweichung vom Mittelwert, der Schnittpunkt mit der y-Achse (b[0]) und die Steigung der Regressionsgeraden (b[1]) errechnet. Die Korrelationen wurden mittels des F-Tests, des Statistikmoduls in dem Grafikprogramm SigmaPlot, auf die statistische Signifikanz der linearen Regression hin überprüft.

P-Werte < 0,05 wurden als statistisch signifikant betrachtet.

3. Ergebnisse

Insgesamt wurde bei 30 gesunden Probandinnen und Probanden je 30 ml venöses Vollblut aus der Armvene entnommen und daraus plättchenreiches Plasma (PRP) gewonnen. Gemäß den Einschlusskriterien hatten alle Spender von Blutproben angegeben keine *NSAID*-Analgetika oder Antithrombotika angewendet zu haben. Alle im Rahmen dieser Dissertation verwendeten Präparationen von PRP zeigten in Kontrollbestimmungen mit den verwendeten Agonisten eine vollständige Aggregation.

3.1 Arachidonsäure-induzierte Aggregationen

Zu Beginn der Untersuchungen wurde Arachidonsäure (ARA) der Fa. NatuTec zur Induktion der Thromboxan (TX)-abhängigen Aggregation eingesetzt.

PRP wurde zunächst, ohne Zusatz eines Aggregationshemmers, mit je 0, 100, 200, 300, 500, 750 und 1000 μM ARA von NatuTec *in vitro* stimuliert. Nach Auswertung der Aggregationskurven der Licht-Transmissions-Aggregometrie zeigte sich, dass mit Zunahme der ARA-Konzentration die thrombozytäre Aktivität deutlich zunahm (Abb. 5, weiße Symbole). Die größte Steigung und damit die maximale Thrombozytenaggregation wurde durch eine Stimulation mit 1000 μM ARA erreicht, wobei sich bei Konzentrationen $> 500 \mu\text{M}$ annähernd ein Plateau zeigte.

Im Anschluss wurde die während der Aggregation gebildete Thiobarbitursäure-reaktive MDA mittels des Fluoroskan Ascent fluoreszenz-photometrisch bestimmt. Das Ergebnis ist in Abb. 6 dargestellt (weiße Symbole). Analog zur Thrombozytenaggregation nahm auch die Fluoreszenz mit steigender ARA-Konzentration zu, allerdings ohne dass ein Plateau erreicht wurde. Das Maximum entsprach einer MDA-Konzentration von ca. 3000 nM.

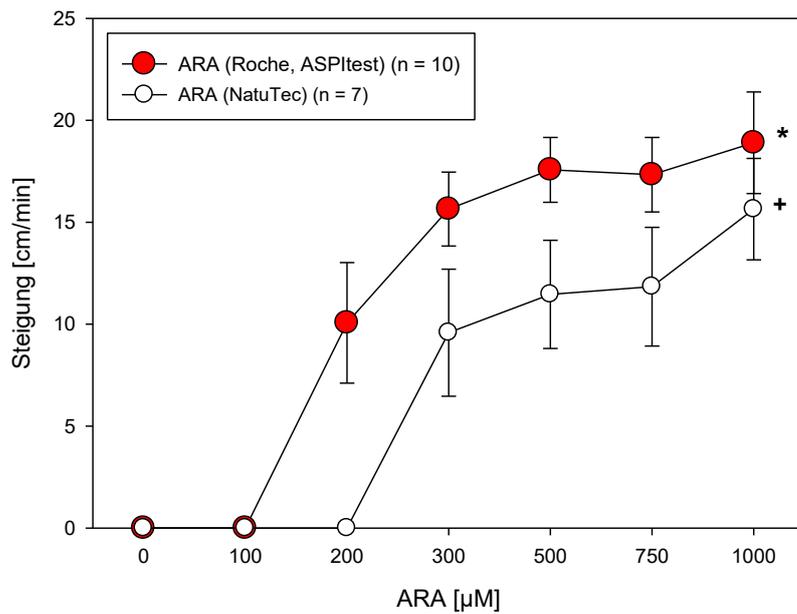


Abb. 5: Thrombozytenaggregation nach Stimulation mit Arachidonsäure (ARA). Es wurde ARA von zwei unterschiedlichen Herstellern (NatuTec oder Roche, ASPItest) eingesetzt. Als Maß für die Aggregation wurde die maximale Steigung der Aggregationskurven verwendet (s. Methodik).

*: $p < 0,001$ vs. Kontrolle (0 µM ARA, Roche, ASPItest)

+: $p = 0,002$ vs. Kontrolle (0 µM ARA, NatuTec)

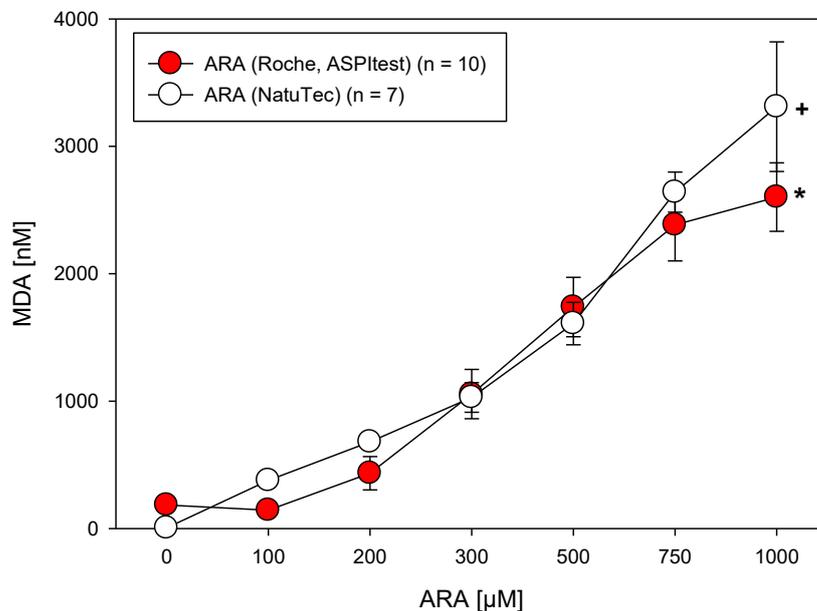


Abb. 6: Fluoreszenz-photometrische MDA-Bestimmung mit Arachidonsäure (ARA). Es wurde ARA von zwei unterschiedlichen Herstellern (NatuTec oder Roche, ASPItest) eingesetzt. Die Fluoreszenz wurde in MDA-Konzentrationen umgerechnet und in [nM] angegeben (s. Methodik).

*: $p < 0,001$ vs. Kontrolle (0 µM ARA, Roche, ASPItest)

+: $p = 0,001$ vs. Kontrolle (0 µM ARA, NatuTec)

Um bei allen weiteren Untersuchungen eine annähernd maximale thrombozytäre Aggregation und zugleich eine hohe MDA- und TXB₂-Synthese zu erzielen, wurde in allen weiteren Messungen ARA in einer Konzentration von 1000 µM eingesetzt.

3.1.1 Hemmung der Thrombozytenfunktion und thrombozytären MDA-Synthese durch ASS

Zur Untersuchung der thrombozytären Aggregationshemmung durch ASS wurde PRP mit aufsteigenden ASS-Konzentrationen (0, 10, 30, 100 und 300 µM) versetzt und mit 1 mM ARA *in vitro* stimuliert. Bei der Licht-Transmissions-Aggregometrie zeigte sich erwartungsgemäß, dass die Aggregation durch ASS konzentrationsabhängig gehemmt wurde (Abb. 7, weiße Symbole). Ab einer Konzentration von 100 µM ASS konnte keine Aggregation mehr ausgelöst werden. Die Thrombozyten waren vollständig gehemmt. Dies ließ erwarten, dass bei entsprechenden ASS-Konzentrationen auch die thrombozytäre MDA-Freisetzung weitgehend gehemmt sein sollte.

Anders als erwartet stellte sich jedoch heraus, dass trotz einer Aggregationshemmung mit 100 µM ASS und darüber relativ hohe MDA-Konzentrationen um 2000 nM nachgewiesen werden konnten (Abb. 8, weiße Symbole). Die *in vitro* Zugabe von 100 und 300 µM ASS reduzierte MDA nicht wesentlich, obwohl die Hemmung der Aggregation bei diesen ASS-Konzentrationen vollständig war.

Dies führte zu dem Verdacht, dass Thiobarbitursäure-reaktive Substanzen nicht-thrombozytärer Herkunft die Messergebnisse beeinflussten. Da MDA ein Produkt der Fettsäureoxidation ist, wurde vermutet, dass NatuTec ARA, MDA oder andere Thiobarbitursäure-reaktive Produkte im Sinne einer Verunreinigung beinhalten könnte. Um dies zu prüfen, wurden analoge Messungen mit ARA eines anderen Herstellers durchgeführt (ASPItest ARA der Fa. Roche). Analog zur Aggregation mit ARA von NatuTec wurde PRP zunächst ohne Zusatz eines Aggregationshemmers mit je 0 - 1000 µM ARA (Roche, ASPItest) *in vitro* stimuliert. Es zeigte sich, dass ARA (Roche, ASPItest) stärkere Aggregationen induzierte als ARA (NatuTec) (Abb. 5, rote Symbole). Darüber hinaus ließ sich, mit zunehmender ARA-Konzentration, eine geringere MDA-Synthese durch ARA (Roche, ASPItest) als bei ARA (NatuTec) nachweisen (Abb. 6, rote Kurve).

Nach Stimulation mit 1 mM ASPItest ARA wurde ASS zur Hemmung der Aggregation eingesetzt. Analog zur Stimulation mit NatuTec (1 mM) konnte bei steigender ASS-Konzentration eine Abnahme der thrombozytären Aggregation registriert werden (Abb. 7, blaue Symbole). Es wurde wieder eine vollständige Aggregationshemmung ab 100 µM ASS erzielt, jedoch zeigte die thrombozytäre MDA-Freisetzung ab Konzentrationen von 100 µM ASS bei ASPItest ARA eine nahezu vollständige Hemmung (Abb. 8, blaue Symbole).

Zusammenfassend ist festzustellen, dass ASPItest ARA (Roche) und NatuTec ARA erhebliche Unterschiede der gemessenen MDA-Konzentrationen zeigten, die insbesondere bei Hemmung der Thrombozyten durch ASS offensichtlich wurden.

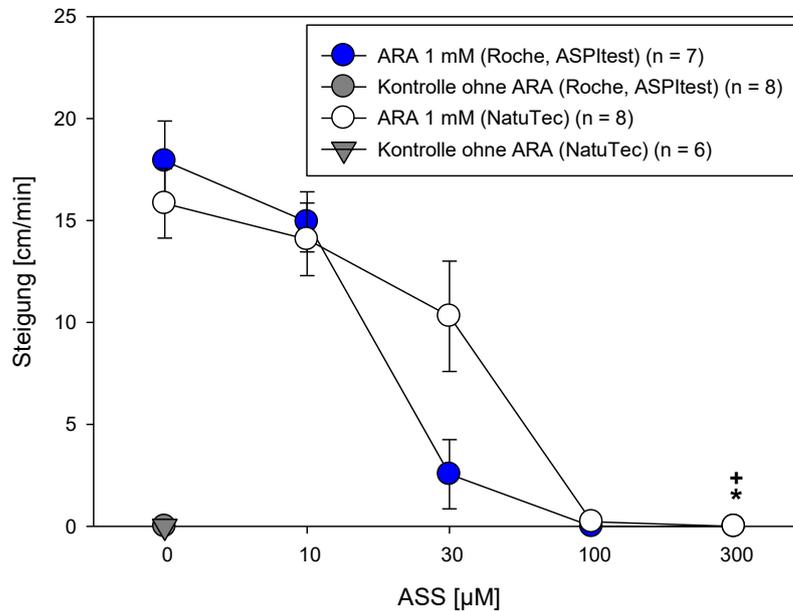


Abb. 7: Thrombozytenaggregation unter Hemmung von ASS (0 - 300 µM) und Stimulation mit ARA (1 mM). Es wurde ARA von zwei unterschiedlichen Herstellern (NatuTec oder Roche, ASPItest) eingesetzt. Als Maß für die Aggregation wurde die maximale Steigung der Aggregationskurven verwendet (s. Methodik).

*: $p < 0,001$ vs. 1 mM ARA (Roche, ASPItest), 0 µM ASS

+: $p < 0,001$ vs. 1 mM ARA (NatuTec), 0 µM ASS

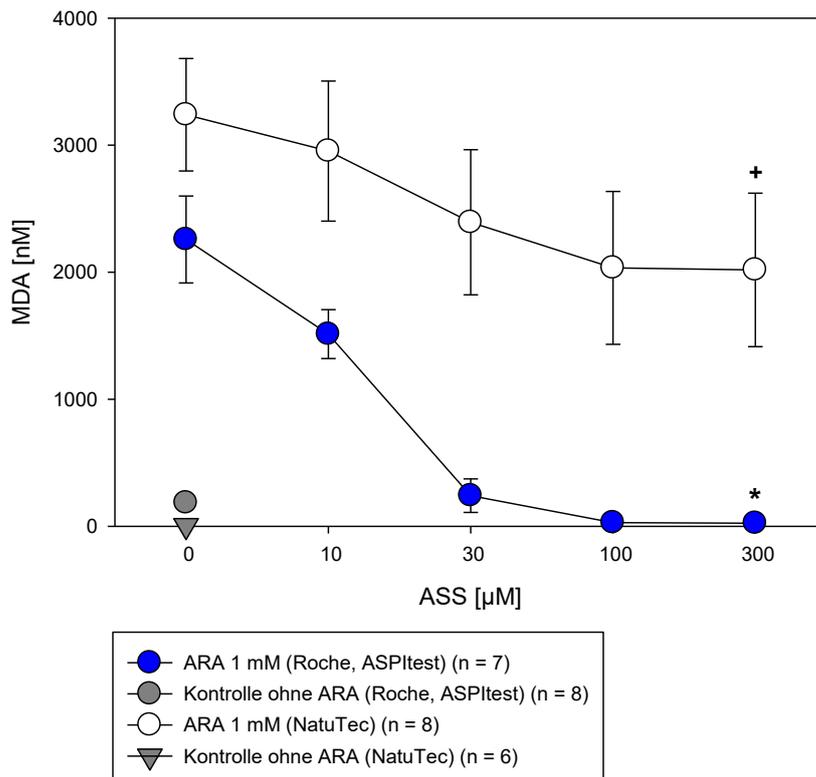


Abb. 8: Fluoreszenz-photometrische MDA-Bestimmung unter Hemmung von ASS (0 - 300 µM) und Stimulation mit ARA (1 mM). Es wurde ARA von zwei unterschiedlichen Herstellern (NatuTec oder Roche, ASPItest) eingesetzt. Die Fluoreszenz wurde in MDA-Konzentrationen umgerechnet und in [nM] angegeben (s. Methodik).

*: $p < 0,001$ vs. 1 mM ARA (Roche, ASPItest), 0 µM ASS

+: $p < 0,001$ vs. 1 mM ARA (NatuTec), 0 µM ASS

3.1.1.1 Vergleich von ARA (NatuTec) und ARA (Roche, ASPItest)

Um die Vermutung zu bestätigen, dass sich in der vom Hersteller NatuTec bezogenen ARA mit der MDA-Bestimmung interferierende Mengen von MDA oder anderen Thiobarbitursäure-reaktiven Substanzen befinden, wurden mittels des Fluoroskan Ascent-Geräts Leerwerte (*Blanks*) zur Bestimmung von MDA gemessen.

In Abb. 9 sind die Fluoreszenzmessungen der Leerwerte, jeweils in Gegenwart von ARA (NatuTec) bzw. ARA (ASPItest), dargestellt. Es konnte nachgewiesen werden, dass die Fluoreszenz der mit NatuTec ARA stimulierten Proben etwa 9-mal höher war als die mit ASPItest ARA stimulierten Ansätze. Auch ASPItest ARA (Roche) führte gegenüber der Kontrolle ohne ARA zu einer geringen Fluoreszenz-Zunahme. Im Vergleich zu den *Blanks* in Abwesenheit von ARA war nur eine minimal erhöhte Fluoreszenz nachzuweisen, die in den weiteren Untersuchungen vernachlässigt wurde (Abb. 9).

Alle folgenden Untersuchungen wurden ausschließlich mit ARA von Roche, ASPiTest durchgeführt.

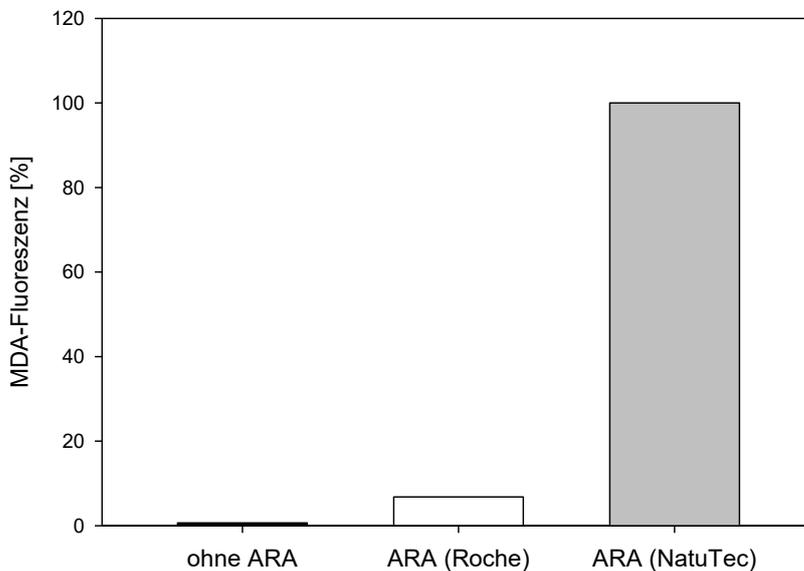


Abb. 9: Fluoreszenzmessungen (MDA) von Leerwerten ohne Thrombozyten mit unterschiedlichen Stimuli (10 µl ARA-NatuTec, 10 µl ARA-ASPiTest oder keinem Stimulus) mittels des Fluoroskan Ascent. Die Fluoreszenz wurde in [%] in Bezug auf ARA NatuTec angegeben.

3.1.1.2 Vergleich der thrombozytären MDA- und TXB₂-Synthese

Zunächst wurde PRP mit ARA (ASPiTest, Roche) in Konzentrationen von 100, 300 oder 1000 µM stimuliert und die konzentrationsabhängige Synthese von TXB₂ bestimmt. Mit steigender Konzentration von ARA zeigte sich, vergleichbar mit MDA (Abb. 6), dass die TXB₂-Synthese konzentrationsabhängig und weitgehend kongruent mit MDA zunahm (nicht dargestellt). In Abb. 10 ist der direkte Vergleich zwischen MDA und TXB₂ in diesen Experimenten dargestellt. Es ergab sich eine lineare Beziehung zwischen dem thrombozytär gebildeten, durch den Fluoreszenz-Assay bestimmten MDA und den in denselben Proben mittels EIA Kit gemessenen Konzentrationen von TXB₂. Die statistische Signifikanz der Korrelation war hoch ($r^2 = 0,95$, $p < 0,001$). Dabei stimmten die beobachteten molaren Konzentrationen von MDA und TXB₂ relativ gut miteinander überein, mit geringfügig (1,186-fach) höheren gemessenen Konzentrationen von TXB₂.

Die Korrelation zwischen MDA und TXB₂ wurde darüber hinaus in einem anderen Ansatz geprüft, bei welchem PRP mit ASS (0 - 100 µM) vorbehandelt und anschließend mit 1 mM ARA stimuliert wurde (Details siehe Methodik). Analog der Hemmung der MDA-Synthese durch ASS (Abb. 8, blaue Symbole) nahm auch die TXB₂-Synthese mit zunehmender ASS-Konzentration entsprechend der Hemmung der thrombozytären COX-1 durch ASS konzentrationsabhängig ab (nicht dargestellt).

Zum Vergleich der Konzentrationen von thrombozytär freigesetztem MDA und TXB₂ wurden diese wiederum einander gegenübergestellt (Abb. 11). Auch hier ergab sich eine enge Korrelation ($r^2 = 0,88$) mit hoher statistischer Signifikanz ($p < 0,001$). Die beobachteten molaren Konzentrationen von MDA und TXB₂ stimmten hier ebenfalls gut miteinander überein, wiederum mit geringfügig (1,014-fach) höheren gemessenen Konzentrationen von TXB₂.

Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass in zwei unterschiedlichen Versuchsansätzen (Variation der ARA-Konzentration bzw. der COX-Hemmung durch ASS) eine enge Korrelation zwischen thrombozytär freigesetztem TXB₂ und MDA besteht.

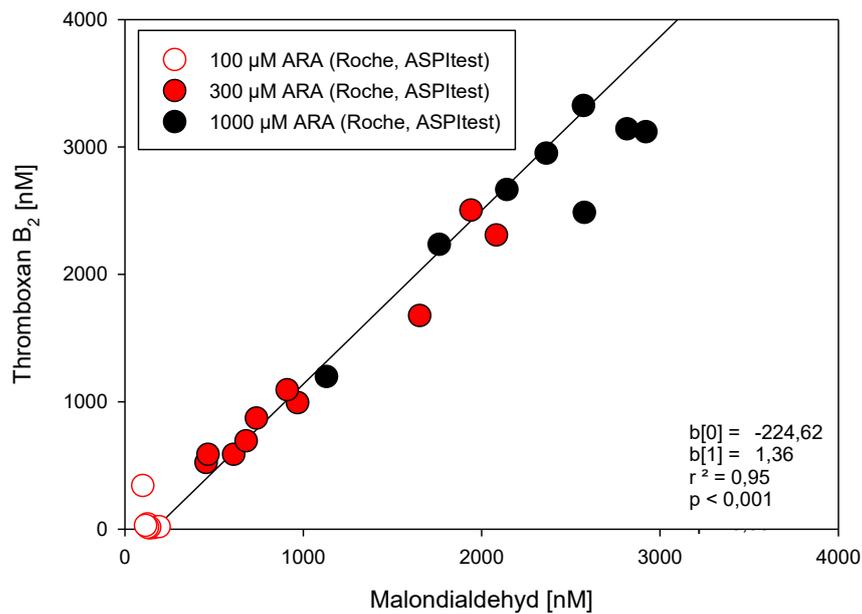


Abb. 10: Korrelation zwischen der thrombozytären MDA- und TXB₂-Synthese nach Stimulation mit 100, 300 oder 1000 µM ARA (Roche, ASPItest) ohne Zusatz eines Aggregationshemmers. Die Messungen wurden mit Proben von 7 Probanden durchgeführt.

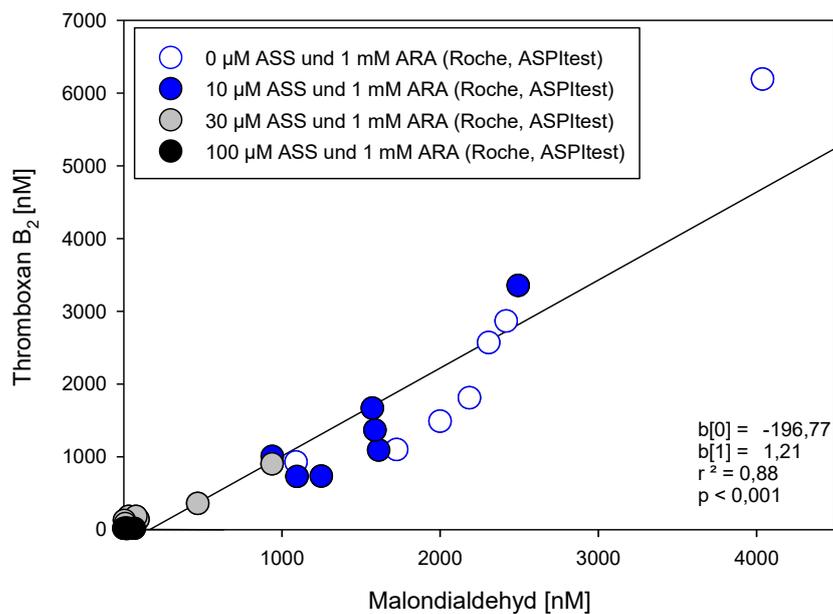


Abb. 11: Korrelation zwischen der thrombozytären MDA- und TXB₂-Synthese nach Stimulation mit 1 mM ARA (Roche, ASPItest) und gleichzeitiger Hemmung mit je 0, 10, 30 oder 100 µM ASS. Die Messungen wurden mit Proben von 7 Probanden durchgeführt.

Im Folgenden wurde weiter untersucht, ob eine entsprechende Korrelation zwischen MDA und TXB₂ auch dann beobachtet werden kann, wenn die thrombozytäre TX-Synthese *unabhängig* von der thrombozytären COX-1, entweder durch Hemmung der TX-Synthase (Ozagrel) oder durch Stimulation von Prostacyclin (IP)-Rezeptoren (Cicaprost), variiert wird.

3.1.2 Ozagrel als Inhibitor der Thromboxan-Synthese

In Vorversuchen wurde ermittelt, dass eine Hemmung der thrombozytären TXB₂-Synthese durch Ozagrel im Konzentrationsbereich zwischen 0 und 10 µM erfolgt. Die Stimulation des PRP erfolgte in diesen Experimenten jeweils mit 1 mM ARA (Roche, ASPItest).

Erwartungsgemäß zeigte sich mit zunehmender Ozagrel-Konzentration eine konzentrationsabhängige Hemmung der Aggregation (Abb. 12). Trotz Zugabe einer sehr hohen Konzentration von 10 µM Ozagrel konnte jedoch keine vollständige Aggregationshemmung erzielt werden. Die Aggregation blieb bei hohen Ozagrel-Konzentrationen stets über 5 cm/min. Dieser Befund ist durch den pharmakologischen Mechanismus der Hemmung durch diese Substanz erklärbar (siehe Diskussion 4.4.1).

Die Bestimmung der MDA-Konzentrationen, dargestellt in Abb. 13, korrespondierte insofern mit diesem Ergebnis, als mit höherer Konzentration von Ozagrel weniger

MDA detektiert wurde, d.h. Ozagrel die MDA-Synthese konzentrationsabhängig hemmte. Die Hemmung erfolgte in Konzentrationen von Ozagrel über 0,3 μM und war in den Konzentrationen 3 und 10 μM fast vollständig (Abb. 13).

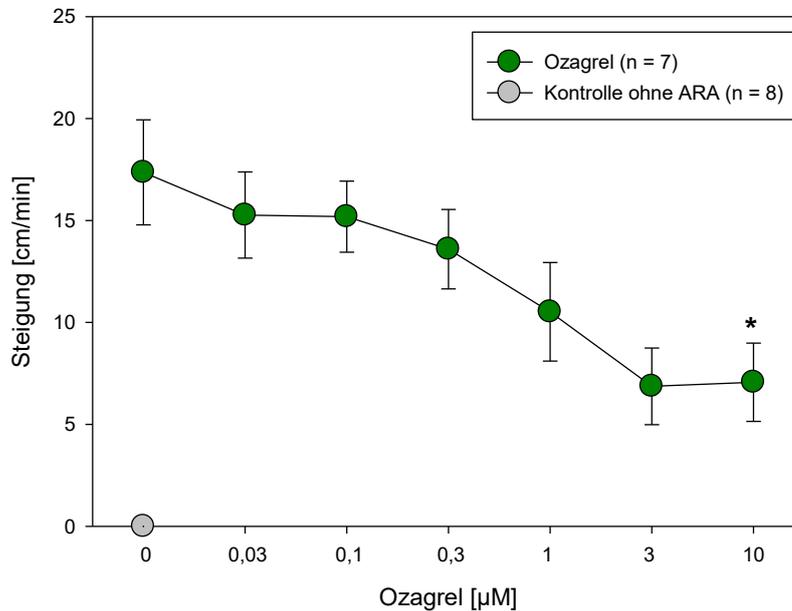


Abb. 12: Thrombozytenaggregation unter Hemmung von Ozagrel (0 - 10 μM) und Stimulation mit ARA (1 mM, Roche, ASPItest). Als Maß für die Aggregation wurde die maximale Steigung der Aggregationskurven verwendet (s. Methodik).

*: $p < 0,001$ vs. 1 mM ARA (Roche, ASPItest), 0 μM Ozagrel

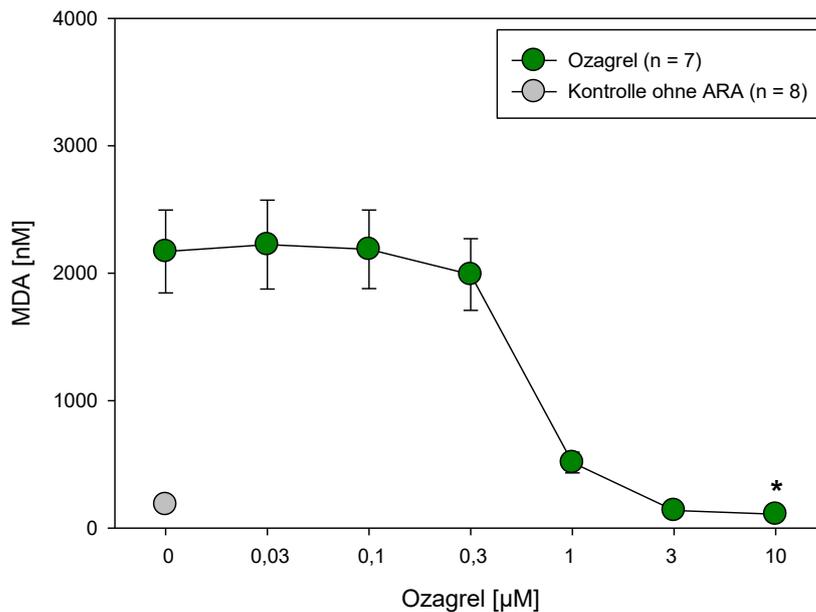


Abb. 13: Fluoreszenz-photometrische MDA-Bestimmung unter Hemmung von Ozagrel (0 - 10 µM) und Stimulation mit ARA (1 mM, Roche, ASPItest). Die Fluoreszenz wurde in MDA-Konzentrationen umgerechnet und in [nM] angegeben (s. Methodik).

*: $p < 0,001$ vs. 1 mM ARA (Roche, ASPItest), 0 µM Ozagrel

3.1.2.1 Vergleich der thrombozytären MDA- und TXB₂-Synthese

Alle mit 1 mM ARA (Roche, ASPItest) stimulierten und gleichzeitig durch 0, 0,1, 0,3, 1 und 3 µM Ozagrel gehemmten Proben wurden verwendet, um die TXB₂-Konzentrationen mittels Immunoassay zu bestimmen. Analog zur Abb. 13, bei der mit zunehmender Ozagrel-Konzentration die MDA-Synthese abnahm, konnte eine abnehmende TXB₂-Synthese beobachtet werden (nicht dargestellt).

Um die Korrelation zwischen dem thrombozytär gebildeten MDA und TXB₂ zu untersuchen, wurden diese in Beziehung zueinander gestellt. Die Bildung einer Regressionsgeraden diente dabei der Analyse des statistischen Zusammenhangs. Die Korrelation, ersichtlich in Abb. 14, zeigt eine annähernd lineare Beziehung zwischen der Bildung von MDA und TXB₂ ($r^2 = 0,87$) mit hoher statistischer Signifikanz ($p < 0,001$). Dabei korrelierten geringe MDA-Konzentrationen mit geringen TXB₂-Konzentrationen. Wie bereits zuvor beschrieben, ergab sich also eine gute quantitative Übereinstimmung zwischen TXB₂ und MDA. Die beobachteten molaren Konzentrationen von MDA und TXB₂ stimmten hier gut miteinander überein, mit geringfügig (1,072-fach) höheren gemessenen Konzentrationen von MDA. Die Betrachtung der Konzentrationen zeigte auch in diesen Experimenten deutlich, dass die gemessenen TXB₂- und MDA-Konzentrationen in enger Korrelation zueinander stehen.

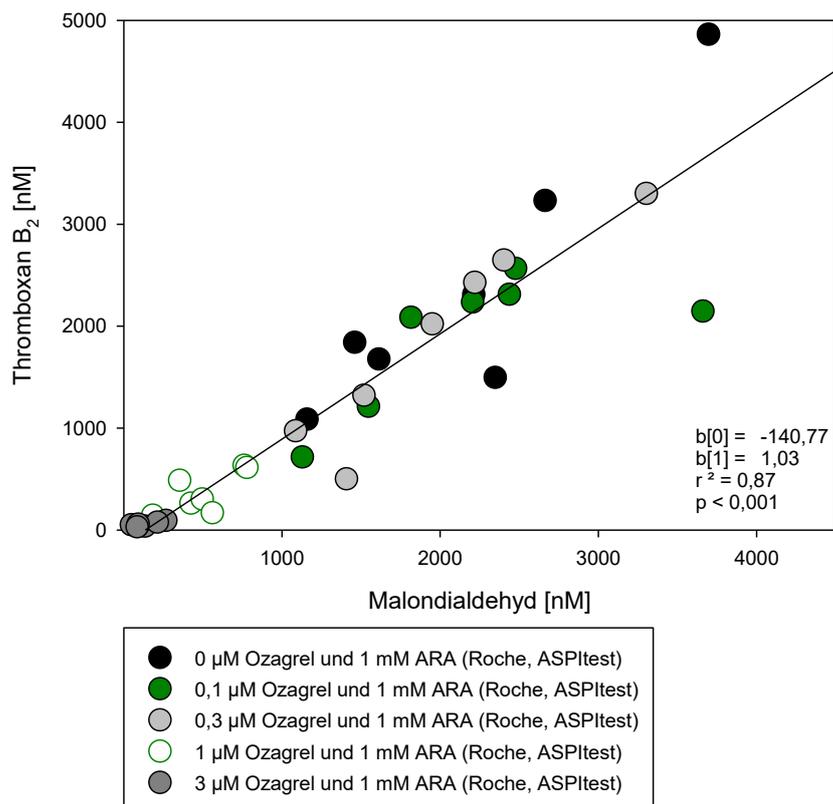


Abb. 14: Korrelation zwischen der thrombozytären MDA- und TXB₂-Synthese nach Stimulation mit 1 mM ARA (Roche, ASPItest) und gleichzeitiger Hemmung mit je 0, 0,1, 0,3, 1 oder 3 µM Ozagrel. Die Messungen wurden mit Proben von 7 Probanden durchgeführt.

3.1.3 Beziehung zwischen MDA und Aggregation in Gegenwart unter- bzw. überschwelliger Konzentrationen von ARA (Roche, ASPItest)

Unter Stimulation von Thrombozyten mit millimolaren ARA-Konzentrationen werden relativ hohe Konzentrationen von TX (und entsprechend auch MDA) generiert. Zur Charakterisierung des MDA-Assays war es von Interesse MDA-Bestimmungen auch in Gegenwart geringer bzw. unterschwelliger ARA-Konzentrationen durchzuführen, um zu überprüfen, ob die Empfindlichkeit des Assays ausreicht, um MDA im Bereich der Aktivierungsschwelle von Thrombozyten zu detektieren (Abb. 15).

In Abb. 15 lassen sich drei Bereiche bezüglich der Aktivierung der Thrombozyten unterscheiden: Zunächst zeigt sich, dargestellt im roten Bereich, eine nicht ausreichend starke Aktivierung, bei der keine Aggregation erfolgte. Die Bildung von MDA lag hier sehr niedrig, d.h. zwischen 0 und 150 nM. Der darauf folgende Bereich von 150 bis 300 nM umfasst eine „Grauzone“, in dem vermutlich abhängig von der individuellen thrombozytären Sensitivität der jeweiligen Spender eine Aktivierung oder keine Aktivierung erfolgte. Teilweise kam es hier zu einer Aggregation, andere Proben wiesen dagegen keine Aggregation auf. Unter Stimulation mit 300 µM ARA und darüber,

gekennzeichnet mit weißer Farbe, kam es in allen untersuchten Proben zu einer Aggregation. Es ergab sich eine signifikante statistische Korrelation zwischen MDA und der Aggregationsreaktion ($p < 0,001$).

Im Ergebnis zeigt dies, dass auch im Bereich geringer Konzentrationen von ARA, die im Bereich der Aktivierungsschwelle von Thrombozyten liegen, mittels des verwendeten Fluoreszenz-Assays eine Detektion von MDA möglich ist.

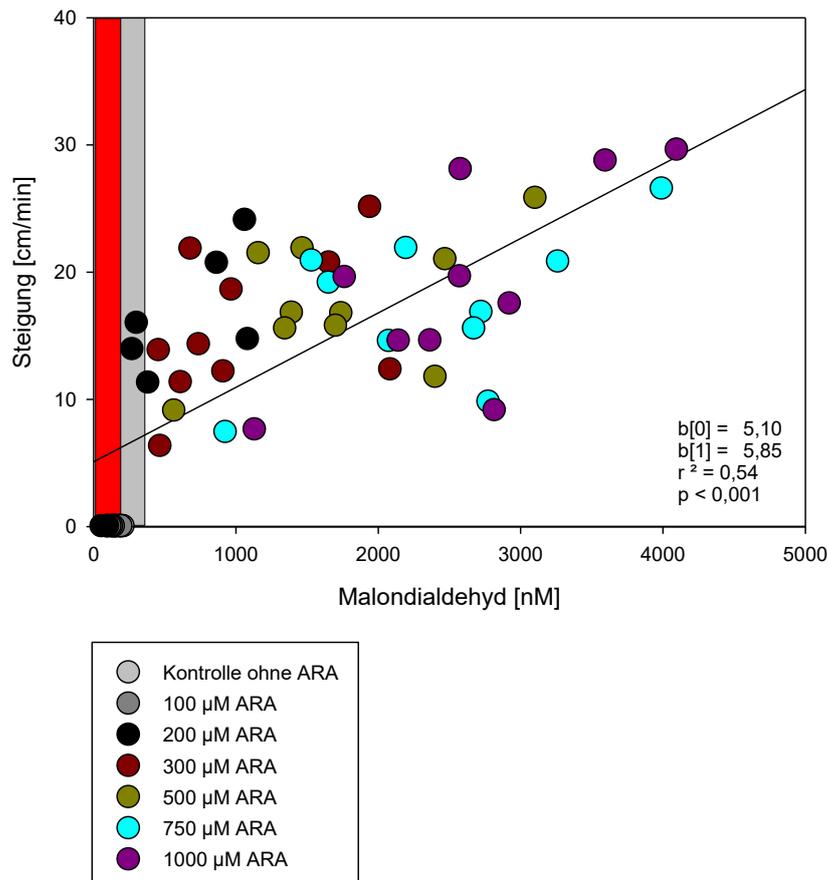


Abb. 15: Thrombozytenaggregation in Abhängigkeit von der im Überstand bestimmten MDA-Konzentration. Thrombozyten wurden mit 0 - 1000 μM ARA (Roche, ASPItest) *in vitro* stimuliert. Die gemessenen Aggregationen wurden als Maß für die thrombozytäre Aggregation mit den MDA-Konzentrationen korreliert (s. Methodik). Die Messungen wurden mit Proben von 8 - 10 Probanden durchgeführt. Farbige Schattierungen siehe Text.

3.2 Kollagen-induzierte Aggregationen

In Ergänzung zu den vorbeschriebenen Messungen mit ARA als Agonist der Thrombozytenaktivierung wurde weiter untersucht, ob MDA auch als Marker der Plättchenaktivierung durch Kollagen geeignet ist. Hierfür wurde zunächst ohne Zusatz eines Aggregationshemmers PRP mit Kollagen in den Konzentrationen 0, 1, 2, 3 und 10 $\mu\text{g/ml}$ *in vitro* stimuliert. Die Aggregationskurven der Licht-Transmissions-

Aggregometrie zeigten erwartungsgemäß eine konzentrationsabhängige Zunahme der Aggregation (Abb. 16). Bei einzelnen Probanden wurde bei Konzentrationen von 2 µg/ml Kollagen eine Steigung bis zu 17 cm/min registriert. In höherer Konzentration von Kollagen (2 - 10 µg/ml) flachte die Konzentrationswirkungsbeziehung ab, da das Aggregationsmaximum zunehmend erreicht wurde.

Die MDA-Synthese wurde in allen Proben im Anschluss an die Aggregation mittels des Fluoroskan Ascent bestimmt. Sie nahm mit steigender Kollagen-Konzentration und Aggregation ebenfalls zu. Die durch Kollagen-induzierte thrombozytäre MDA-Synthese war insgesamt deutlich geringer als unter Stimulation der Thrombozyten mit ARA ($p < 0,001$ bei Vergleich der mit 10 µg/ml Kollagen und 1000 µM ARA stimulierten PRP Proben) (Abb. 17).

In den nachfolgenden Versuchen, welche unter Kollagen-Stimulation die Hemmung der MDA-Synthese durch ASS untersuchten, wurde eine Kollagen-Konzentration von 2 µg/ml gewählt, da diese sowohl die Aggregation als auch die MDA-Synthese nur submaximal aktiviert.

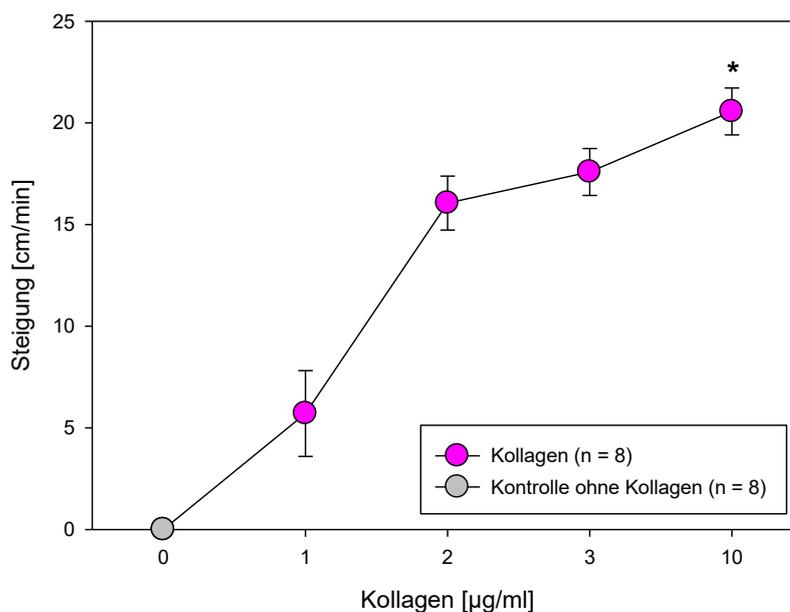


Abb. 16: Thrombozytenaggregation nach Stimulation mit Kollagen (0 - 10 µg/ml). Als Maß für die Aggregation wurde die maximale Steigung der Aggregationskurven verwendet (s. Methodik).

*: $p < 0,001$ vs. Kontrolle (0 µg/ml Kollagen)

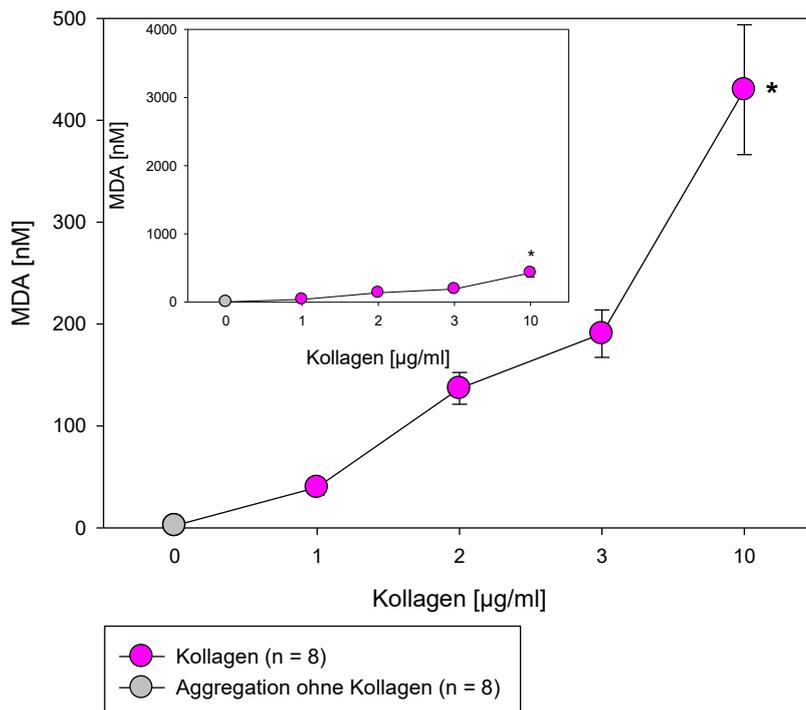


Abb. 17: Fluoreszenz-photometrische MDA-Bestimmung mit Kollagen (0 - 10 µg/ml). Zur genaueren Darstellung wurde der Maßstab angepasst. Zum Vergleich ist eine Darstellung mit dem bei Stimulation mit ARA gewählten Maßstab eingefügt. Die Fluoreszenz wurde in MDA-Konzentrationen umgerechnet und in [nM] angegeben (s. Methodik).

*: $p < 0,001$ vs. Kontrolle (0 µg/ml Kollagen)

3.2.1 Hemmung der Kollagen-induzierten MDA-Synthese durch ASS

Abb. 18 stellt die Hemmung der Kollagen-induzierten Aggregation durch ASS (0 - 300 µM) dar. Es zeigte sich erwartungsgemäß eine konzentrationsabhängige Hemmung der Aggregation. Ab 100 µM ASS ließ sich nur noch eine geringe Aggregation (2 cm/min) erkennen, jedoch ließ sich diese auch durch die *in vitro* sehr hohe ASS-Konzentration von 300 µM nicht vollständig hemmen.

Analog dazu gibt Abb. 19 die Synthese von MDA bei Stimulation mit 2 µg/ml Kollagen wieder. Ohne ASS wurden MDA-Konzentrationen um 200 nM beobachtet. Je höher die *in vitro* applizierte ASS-Konzentration war, desto stärker wurde die Synthese von MDA gehemmt. Die Hemmung war bei 100 und 300 µM ASS nahezu vollständig.

Insgesamt zeigen diese Messungen, dass MDA auch unter Stimulation mit Kollagen geeignet ist, die Hemmung von Thrombozyten durch ASS nachzuweisen. Jedoch wurden unter Kollagen-Stimulation deutlich geringere MDA-Konzentrationen gemessen als unter Stimulation mit ARA.

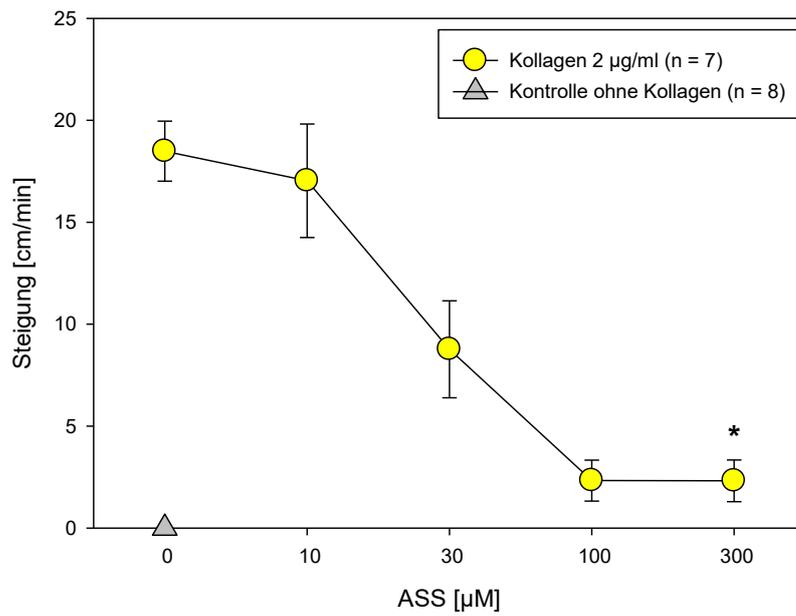


Abb. 18: Thrombozytenaggregation unter Hemmung von ASS (0 - 300 μM) und Stimulation mit Kollagen (2 $\mu\text{g/ml}$). Als Maß für die Aggregation wurde die maximale Steigung der Aggregationskurven verwendet (s. Methodik).

*: $p < 0,001$ vs. 2 $\mu\text{g/ml}$ Kollagen, 0 μM ASS

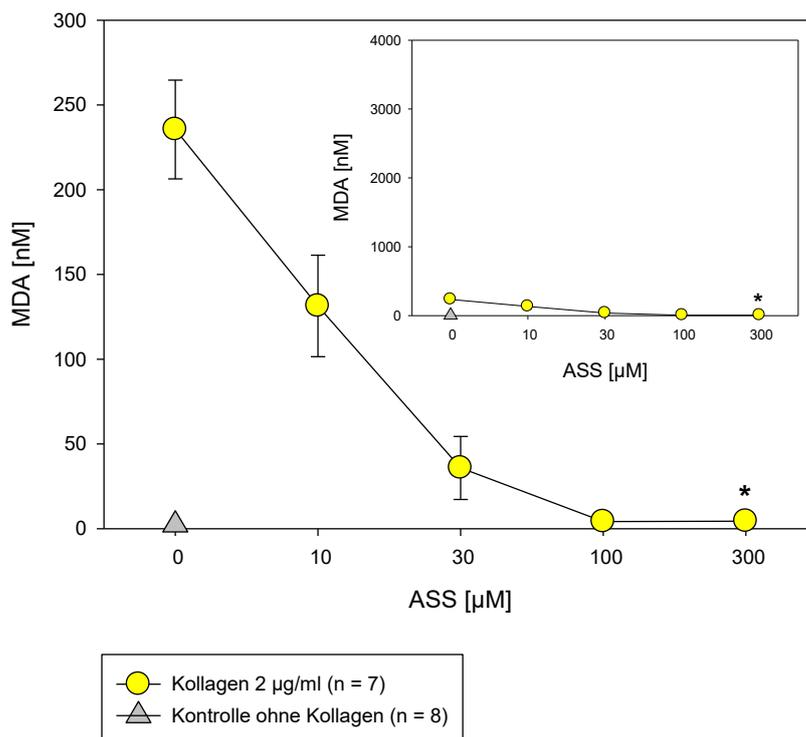


Abb. 19: Fluoreszenz-photometrische MDA-Bestimmung unter Hemmung von ASS (0 - 300 µM) und Stimulation mit Kollagen (2 µg/ml). Zur genaueren Darstellung wurde der Maßstab angepasst. Zum Vergleich ist eine Darstellung mit dem bei Stimulation mit ARA gewählten Maßstab eingefügt. Die Fluoreszenz wurde in MDA-Konzentrationen umgerechnet und in [nM] angegeben (s. Methodik). *: $p < 0,001$ vs. 2 µg/ml Kollagen, 0 µM ASS

3.2.2 Vergleich der thrombozytären MDA- und TXB₂-Synthese nach Thrombozytenstimulation durch Kollagen

Um MDA und TXB₂ während der Aggregation zu vergleichen, wurde zusätzlich zu MDA auch TXB₂ bestimmt. Die Messung umfasste zunächst alle Proben der Kollagen-Konzentrationswirkungskurve, die mit 1 und 3 µg/ml Kollagen stimuliert wurden. Hier zeigte sich, dass parallel mit MDA auch TXB₂ zunahm (nicht dargestellt). Vergleichbar mit der MDA-Bildung war auch die Synthese von TXB₂ deutlich geringer als unter Stimulation mit ARA ($p = 0,002$ bei Vergleich der TXB₂-Synthese bei Stimulation von PRP mit 300 µM ARA und 3 µg/ml Kollagen). Im Anschluss wurden die gebildeten MDA- und TXB₂-Konzentrationen gegenübergestellt. Dies ist in Abb. 20 dargestellt. Bei der Auswertung zeigte sich eine deutliche Korrelation ($r^2 = 0,73$) mit statistischer Signifikanz ($p < 0,001$). Ähnlich wie unter Stimulation mit ARA ergab sich eine gute Übereinstimmung zwischen MDA und TXB₂ mit geringfügig (1,053-fach) höheren Konzentrationen von TXB₂.

Des Weiteren wurden die mit 0, 10, 30 und 100 µM ASS gehemmten und mit 2 µg/ml Kollagen stimulierten Proben mittels des Thromboxane B₂ EIA Kit gemessen. Bei der

Auswertung wurde deutlich, dass, vergleichbar mit der geringen MDA-Bildung (unter 400 nM), auch wenig TXB₂ (unter 300 ng/ml, entspricht ca. 810 nM) während der Aggregation entstand (nicht dargestellt). Zugleich zeigte sich, wie zu erwarten, eine beständig abfallende TXB₂-Konzentration mit Zunahme der ASS-Konzentration (nicht dargestellt). Analog zum gebildeten MDA ließ sich bei ASS-Konzentrationen von 100 µM und darüber auch keine TXB₂-Synthese mehr nachweisen.

Die Korrelation von thrombozytär freigesetztem MDA und TXB₂ ist in Abb. 21 dargestellt. Es ergab sich eine statistisch signifikante, positive Korrelation ($r^2 = 0,84$) mit hoher Signifikanz ($p < 0,001$). Wie durch die Experimente der vorangehenden Abschnitte gezeigt, werden MDA und TXB₂ in zwar gleicher Größenordnung freigesetzt, jedoch mit um den Faktor 1,565 höheren Konzentrationen von TXB₂.

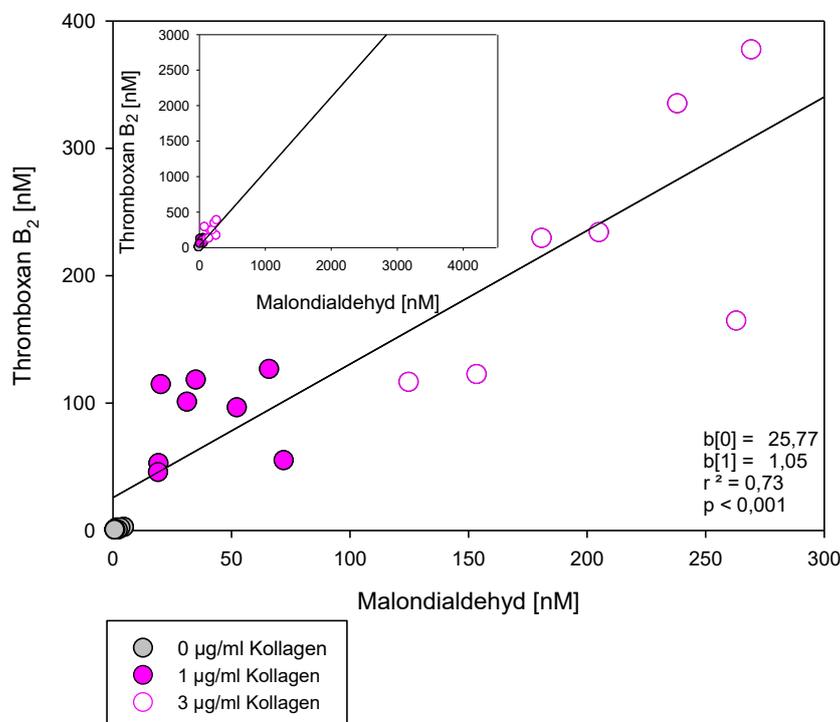


Abb. 20: Korrelation zwischen der thrombozytären MDA- und TXB₂-Synthese nach Stimulation mit 1 und 3 µg/ml Kollagen. Zur genaueren Darstellung wurde der Maßstab angepasst. Zum Vergleich ist eine Darstellung mit dem bei Stimulation mit ARA gewählten Maßstab eingefügt. Die Messungen wurden mit Proben von 8 Probanden durchgeführt.

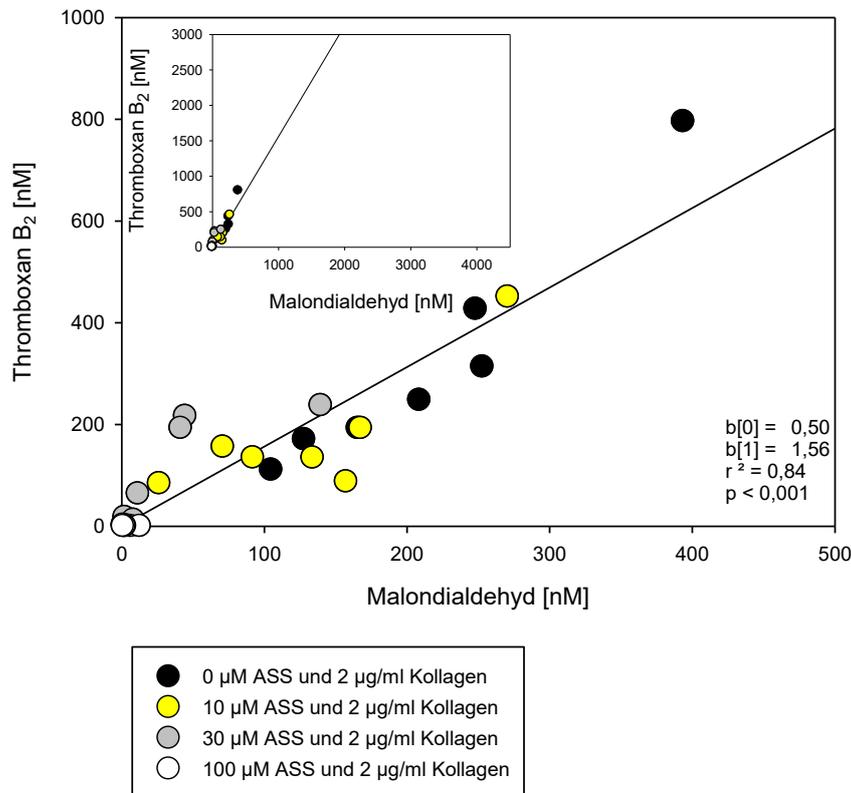


Abb. 21: Korrelation zwischen der thrombozytären MDA- und TXB₂-Synthese nach Stimulation mit 2 $\mu\text{g/ml}$ Kollagen und gleichzeitiger Hemmung mit je 0, 10, 30 oder 100 μM ASS. Zur genaueren Darstellung wurde der Maßstab angepasst. Zum Vergleich ist eine Darstellung mit dem bei Stimulation mit ARA gewählten Maßstab eingefügt. Die Messungen wurden mit Proben von 7 Probanden durchgeführt.

3.3 ADP-induzierte Aggregationen

Die Bestimmung von MDA wurde bei ADP-induzierter Aggregation ebenfalls untersucht, weil unter ADP-induzierter Plättchenaktivierung mit einer vergleichsweise geringen TX-Synthese zu rechnen ist. Insofern war von Interesse, ob die Detektion mittels MDA-Fluoreszenz die dafür notwendige hohe Sensitivität aufweist.

Hierfür wurde PRP zunächst ohne Zusatz eines Aggregationshemmers mit 0 - 30 μM ADP *in vitro* stimuliert. Die Aggregationskurven der Licht-Transmissions-Aggregometrie zeigten eine konzentrationsabhängige Zunahme der Aggregation (Abb. 22). Bei einzelnen Probanden wurde bei Konzentrationen von 10 μM ADP eine Steigung bis zu 17 cm/min registriert. Mit einer Konzentrationserhöhung auf 20 oder 30 μM ADP ergab sich nur noch eine geringfügige Aggregationszunahme.

Abb. 23 gibt die mit dem Fluoroskan Ascent fluoreszenz-photometrisch gemessene MDA nach *in vitro* Stimulation mit 0 - 30 μM ADP wieder. Sie nahm mit steigender

Konzentration ebenfalls zu. In Konzentrationen von 10 - 30 μM ADP zeigte sich nur noch eine geringe MDA-Zunahme. Wie erwartet, war die mit ADP-induzierte thrombozytäre MDA-Synthese wesentlich geringer, als unter Stimulation der Thrombozyten mit ARA ($p < 0,001$ bei Vergleich der MDA-Synthese mit 30 μM ADP und 1 mM ASPItest ARA stimulierten Proben).

Um in den folgenden Untersuchungen den Effekt des Inhibitors Cicaprost zu prüfen, wurde 10 μM ADP eingesetzt.

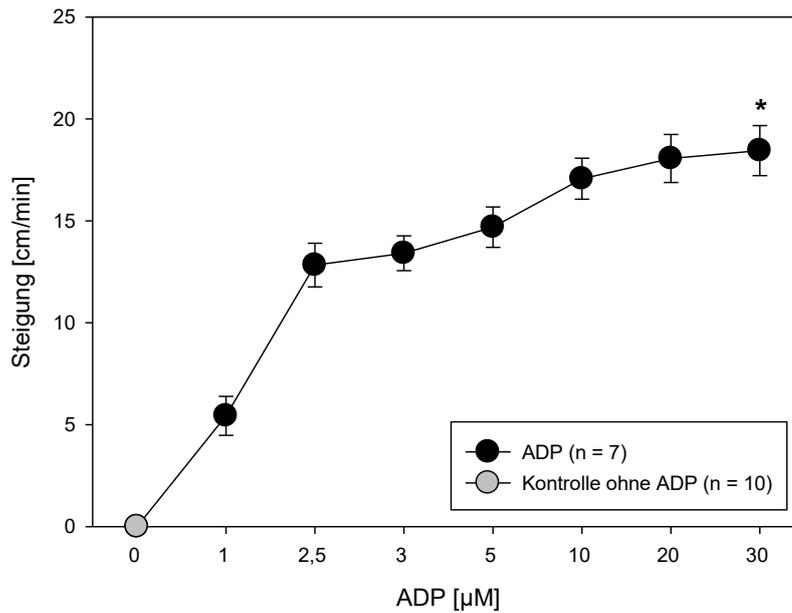


Abb. 22: Thrombozytenaggregation nach Stimulation mit ADP (0 - 30 μM). Als Maß für die Aggregation wurde die maximale Steigung der Aggregationskurven verwendet (s. Methodik).

*: $p < 0,001$ vs. Kontrolle (0 μM ADP)

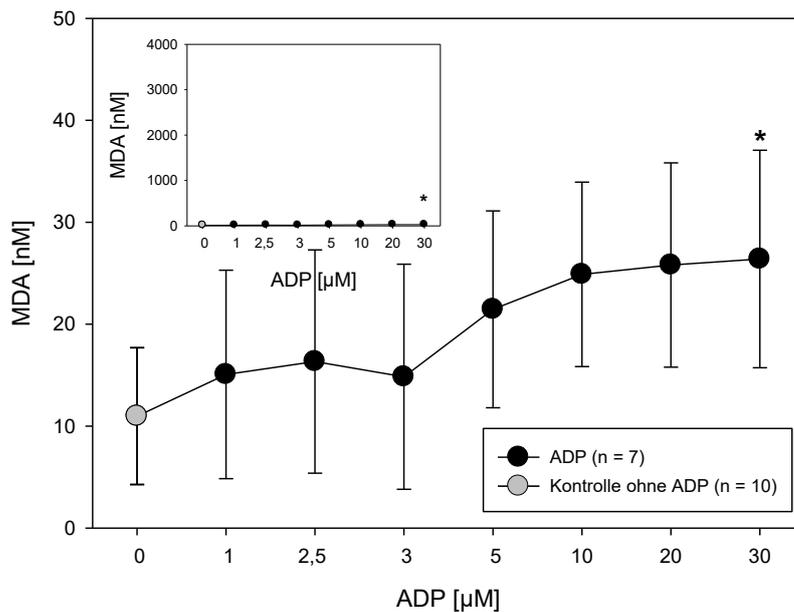


Abb. 23: Fluoreszenz-photometrische MDA-Bestimmung mit ADP (0 - 30 µM). Zur genaueren Darstellung wurde der Maßstab angepasst. Zum Vergleich ist eine Darstellung mit dem bei Stimulation mit ARA gewählten Maßstab eingefügt. Die Fluoreszenz wurde in MDA-Konzentrationen umgerechnet und in [nM] angegeben (s. Methodik).

*: $p < 0,001$ vs. Kontrolle (0 µM ADP)

3.3.1 Hemmung der ADP-induzierten Thrombozytenfunktion und MDA-Synthese durch Cicaprost

Abb. 24 stellt die Hemmung der ADP-induzierten Aggregationen durch das Prostazyklinmimetikum Cicaprost (0 - 30 nM) dar. Es zeigte sich eine konzentrationsabhängig abnehmende Aggregation ab 0,3 nM Cicaprost, die bei 30 nM Cicaprost vollständig gehemmt war.

Das Ergebnis der fluoreszenz-photometrischen MDA-Bestimmung ist in Abb. 25 dargestellt. Je höher die *in vitro* applizierte Cicaprost-Konzentration war, desto weniger MDA konnte nachgewiesen werden. Insofern war der MDA-Assay auch bei der geringen TX-Synthese in Gegenwart von ADP geeignet, die Hemmung durch Cicaprost zu zeigen.

In einigen zusätzlichen Versuchen wurde mit 100 nM Cicaprost (maximal) gehemmten Thrombozyten ARA in einer Konzentration von 1 mM zugesetzt (Roche, ASPItest). Hier zeigte sich eine vollständige Aggregationshemmung (Abb. 24, weißes Dreieck). In Abb. 25 wird jedoch deutlich, dass trotzdem im Durchschnitt 1234,6 nM (+/- 288,85) MDA nachgewiesen werden konnte. Dies ist ein interessanter Zusatzbefund der Rückschlüsse über den Ursprung der ARA zulässt (siehe Diskussion 4.4.2).

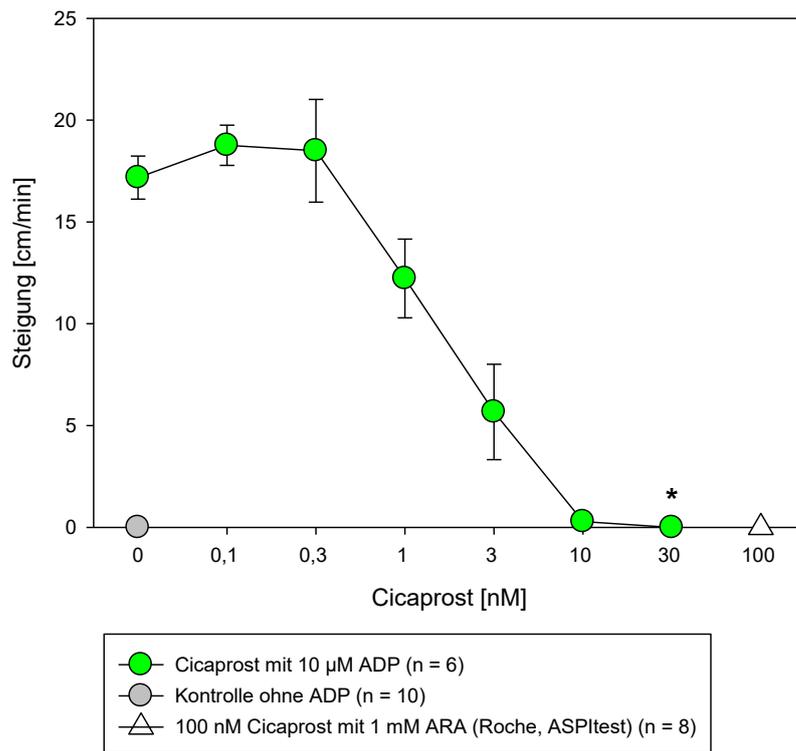


Abb. 24: Thrombozytenaggregation unter Hemmung von Cicaprost (0 - 100 nM) und Stimulation mit ADP (10 μM) oder ARA (1 mM, Roche, ASPItest). Als Maß für die Aggregation wurde die maximale Steigung der Aggregationskurven verwendet (s. Methodik).

*: $p < 0,001$ vs. 10 μM ADP, 0 μM Cicaprost

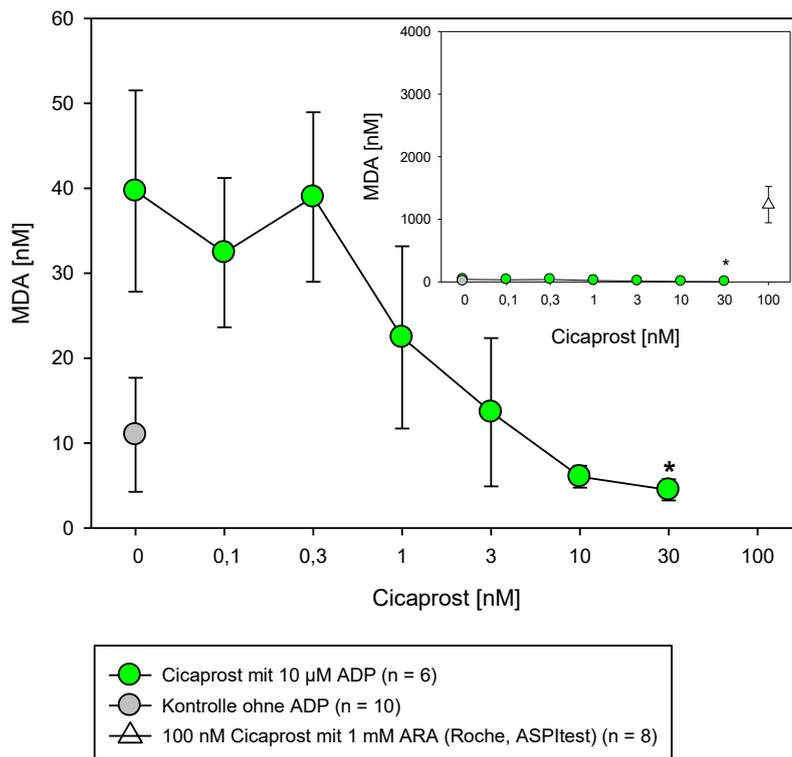


Abb. 25: Fluoreszenz-photometrische MDA-Bestimmung unter Hemmung von Cicaprost (0 - 100 nM) und Stimulation mit ADP (10 µM) oder ARA (1 mM, Roche, ASPItest). Zur genaueren Darstellung wurde der Maßstab angepasst. Zum Vergleich ist eine Darstellung mit dem bei Stimulation mit ARA gewählten Maßstab eingefügt. Die Fluoreszenz wurde in MDA-Konzentrationen umgerechnet und in [nM] angegeben (s. Methodik).

*: $p = 0,033$ vs. 10 µM ADP, 0 µM Cicaprost

3.3.2 Vergleich der thrombozytären MDA- und TXB₂-Synthese

Zur weiteren Untersuchung der Korrelation von MDA und TXB₂ wurden von allen mit 0, 1, 3 und 10 nM Cicaprost gehemmten Proben die TXB₂-Konzentrationen mittels Immunoassay bestimmt (nicht dargestellt).

Im Anschluss wurden die nachgewiesenen MDA- und TXB₂-Konzentrationen gegenübergestellt (Abb. 26). Als Ergebnis zeigte sich, dass die Bildung von MDA und TXB₂ statistisch signifikant ($p < 0,001$) miteinander korreliert war ($r^2 = 0,81$). Die gemessenen TX-Konzentrationen waren um den Faktor 1,511 höher als die MDA-Konzentrationen.

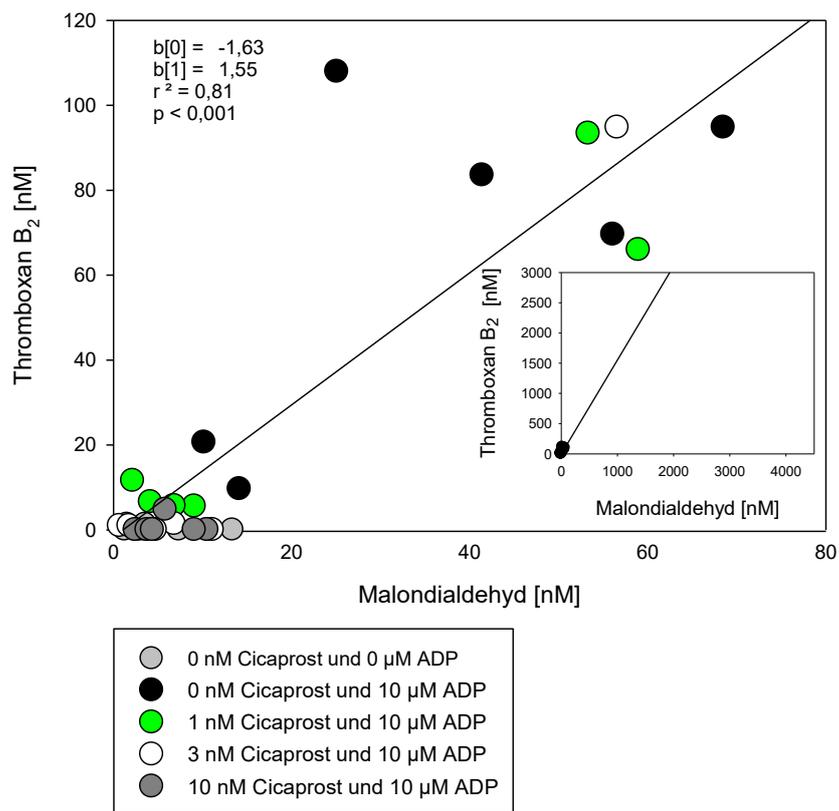


Abb. 26: Korrelation zwischen der thrombozytären MDA- und TXB₂-Synthese nach Stimulation mit 10 μM ADP und gleichzeitiger Hemmung mit je 0, 1, 3 oder 10 nM Cicaprost. Zur genaueren Darstellung wurde der Maßstab angepasst. Zum Vergleich ist eine Darstellung mit dem bei Stimulation mit ARA gewählten Maßstab eingefügt. Die Messungen wurden mit Proben von 6 Probanden durchgeführt.

4. Diskussion

Als Hauptergebnis zeigt die vorliegende Arbeit, dass die Synthese von MDA und diejenige von TXB₂ im plättchenreichen Plasma (PRP) eng miteinander korreliert sind. Die Übereinstimmung von MDA- der TXB₂-Synthese war weitgehend unabhängig vom Mechanismus der Plättchenaktivierung (ARA, Kollagen, ADP). Die Hemmung der Thrombozytenfunktion durch verschiedene Thrombozytenfunktionshemmer mit unterschiedlichen pharmakologischen Wirkmechanismen (ASS, Ozagrel, Cicaprost) zeigten eine konzentrationsabhängige und ebenfalls im Wesentlichen übereinstimmende Hemmung von MDA und TXB₂. Die Inhibition der Synthese von MDA und TXB₂ korrelierte durchgehend statistisch signifikant.

Darüber hinaus bestand, mit Ausnahme von Ozagrel, auch eine gute Übereinstimmung bei der Bildung von TXB₂ und MDA mit der *in vitro* gemessenen thrombozytären Aggregation.

4.1 Die Bedeutung von Plättchenfunktionsparametern als Biomarker der ASS-Wirkung

ASS ist ein Plättchenfunktionshemmer, der für die kardiovaskuläre Prävention eine große Bedeutung hat (4, 5). Die Erkenntnis, dass es individuell zu Unterschieden in der Wirksamkeit kommen kann, führte zur Entwicklung von einer Vielzahl diagnostischer Methoden, mit dem Ziel schlecht ansprechende Patienten („Nonresponder“) zu identifizieren, um die Effektivität der atherothrombotischen Prophylaxe zu steigern (3). So könnte bei betroffenen Patienten z.B. eine dauerhafte Medikamentenumstellung auf andere Thrombozytenfunktionshemmer oder eine Dosisanpassung von ASS sinnvoll sein (69, 70). Bisherige Laboranalysen von Plättchenfunktionsparametern lieferten diesbezüglich jedoch kontroverse Ergebnisse. Die bisher verfügbaren Daten zugunsten eines prognostischen Nutzens verschiedener Messmethoden und Biomarker Bewertung des klinischen Therapieerfolgs mit ASS sind bisher noch spärlich (71).

Zu den aktuell eingesetzten analytischen Methoden zur Wirksamkeitskontrolle von ASS zählen z.B. das Bedside-Testverfahren des Verify-Now^C-Assays oder der Platelet-Function-Analyzer (PFA-100) sowie die Impedanzaggregometrie (Multiplate) und die Licht-Transmissions-Aggregometrie nach Born (LTA). Diese müssen jedoch mit Vorsicht betrachtet werden. Mehrere Autoren zeigten, dass Ergebnisse dieser Methoden oft nicht zu übereinstimmenden Ergebnissen führen (6, 72-74). So beobachteten Larsen et al. deutliche Unterschiede bezüglich der Thrombozytenaggregation bei Messungen mit Multiplate und dem Verify-Now^C-Assay (75). Auch Gurbel et al. wiesen in einer umfangreichen Studie nach, dass die Prävalenz von „ASS-Resistenz“ stark vom Assay abhängig ist (76). Dafür verantwortlich sind höchstwahrscheinlich der Mangel an generell akzeptierten Normwerten, die eine Standardisierung und damit einen Vergleich zwischen den verschiedenen Laboratorien erschweren, sowie die Tatsache, dass verschiedene Tests unterschiedliche Teilfunktionen oder Aktivierungswege von

Thrombozyten erfassen (6, 70). Zudem werden unterschiedliche Stimulus-Konzentrationen verwendet, wodurch es ebenfalls zu Abweichungen kommt (77). Insgesamt schwankt daher die Prävalenz im Labor nachgewiesener „ASS-Resistenz“ oder „ASS-Nonresponse“ in unterschiedlichen Studien zwischen 5 und 70 % (47, 73, 78, 79).

Ein Schwachpunkt könnte auch die Methodik sein, welche vor allem vor dem Hintergrund des klinischen *Outcome* in Frage zu stellen ist (80). Die meisten Tests zur Erfassung der pharmakologischen Effektivität von ASS nehmen Bezug auf die verbleibende thrombozytäre Reaktivität (7). Die unzureichende Hemmung der TX-Synthese als Folge der irreversiblen Blockierung der COX durch ASS wird durch funktionelle Testmethoden nicht erfasst. So war die Korrelation zwischen TX-Metaboliten und Assays der Plättchenfunktion nur relativ schwach (81). Ursächlich könnte der nicht-lineare Zusammenhang zwischen TX und der thrombozytären Aggregation sein, wodurch mindestens 95 % der TX-Synthese gehemmt sein muss, um eine funktionelle Inhibition der Aggregation zu erreichen (3, 70, 82).

Schrör et al. zeigten, dass ASS bei einer Stimulation durch ADP die thrombozytäre Aggregation nicht vollständig inhibiert (42). Dies lässt sich damit erklären, dass ASS durch die irreversible Acetylierung der COX ausschließlich die Synthese des endogenen Thrombozytenaktivators TXA₂ unterdrückt. Hämostase und Thrombozytenfunktion sind jedoch durch eine Vielzahl von endogen freigesetzten Mediatoren gekennzeichnet, die ihrerseits zur Thrombozytenaktivierung beitragen (1, 47, 83). Darin eingeschlossen sind beispielsweise ADP (58, 83, 84), das, wie auch Thrombin oder Kollagen, Thrombozyten weitgehend TX-unabhängig aktiviert (1, 80). So zeigten z.B. Cattaneo et al., dass die Stimulation einer PRP-Suspension mit 10 µmol/l ADP zu einer vollständigen Aggregation führte, die weitestgehend unabhängig von der TXA₂-Synthese war (58).

Dies entspricht auch den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit: Abb. 22 stellt eine konzentrationsabhängige *in vitro* Stimulation einer PRP-Suspension mit ADP dar. Die Stimulierung mit 10 µM ADP bewirkte eine vollständige thrombozytäre Aggregation. Entsprechendes zeigt sich in Abb. 24 (0 nM Cicaprost). Dagegen ergab der Immunoassay nur eine sehr geringe thrombozytäre TXB₂-Synthese. Bei einer PRP Stimulation mittels ADP (10 µM) ohne Zugabe eines Thrombozytenhemmstoffs kam es nur zu einer thrombozytären TXB₂-Bildung zwischen 9,6 und 107,9 nM (Abb. 26), was im Durchschnitt ca. 2 % der in Gegenwart von ARA gemessenen Konzentration entsprach. Da trotzdem eine normale Aggregation sichtbar ist, wird die Unabhängigkeit von der TX-Synthese bestätigt.

Insgesamt zeigt sich also, dass funktionelle Thrombozytenassays, wie z.B. die Aggregation, zum Monitoring der Plättchenfunktion nur begrenzt geeignet sind und den pharmakologischen Mechanismus der Hemmung durch ASS nicht vollständig abbilden. Plättchenfunktionsanalysen werden auch aus diesem Grund bislang nicht für ein routinemäßiges klinisches Monitoring eingesetzt.

4.2 TXB₂ und MDA als Biomarker für das Monitoring der antithrombozytären Wirkung von ASS

Aus pharmakologischer Sicht ist die Erfassung von TXB₂, als direktes Abbauprodukt von TXA₂, zur Analyse der ASS-Wirkung insofern essentiell, als die Hemmung der Thrombozytenfunktion durch ASS auf der Hemmung der TX-Synthese beruht.

Diesbezüglich existieren verschiedene Methoden, um TXB₂ zu bestimmen. Zum Einen ist eine Messung mittels *high performance liquid chromatographie (HPLC)* möglich, die jedoch zur Detektion mit ausreichend hoher Sensitivität eine Derivatisierung von TXB₂ voraussetzt (85). Des Weiteren ist die Bestimmung mittels Massenspektrometrie möglich. Dabei wird der Analyt zunächst ionisiert, im elektrischen Feld beschleunigt, fragmentiert, nach Masse und Ladung selektiert und elektronisch detektiert (86). Voraussetzung dafür ist ein geeignetes Labor mit einer entsprechenden apparativen und personellen Ausstattung. Ein weiteres Verfahren ist die Erfassung von TXB₂ mittels Immunoassay (z.B. Radio- oder Enzym-Immuno-Assay) (87). Immunoassays sind ebenfalls aufwändig, da Eichkurven mit Standardverdünnungen nötig sind, der enge Messbereich oft Wiederholungsmessungen mit angepassten Probenverdünnungen verlangt und viele Störgrößen (z.B. Kreuzreaktivitäten) zu berücksichtigen sind.

Alle oben genannten Assays können für die TXB₂-Bestimmung verwendet werden und die ASS-Wirksamkeit ermitteln, sind jedoch zeitaufwändig, kostenintensiv und für einen routinemäßigen Assay kaum geeignet. Ein deutlich einfacheres Verfahren könnte die Bestimmung des Biomarkers MDA sein, ein Nebenprodukt der TX-Synthese. MDA ist schon lange auch als Produkt der Lipidperoxidation bekannt (88) und wird laboranalytisch als Marker für die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies weithin genutzt. Die Detektion von MDA ist grundsätzlich mit *HPLC* möglich, kann sehr viel einfacher aber auch nach Reaktion mit Thiobarbitursäure durch photometrische oder fluoreszenz-photometrische Bestimmung erfolgen (88).

Grundannahme der vorliegenden Dissertation war, dass MDA als Nebenprodukt der TX-Synthese im Verhältnis eins-zu-eins mit TXB₂ gebildet wird (Einleitung 1.2.4/ 1.3). Dies konnte in der vorliegenden Arbeit anhand der durchgeführten *in vitro* Versuche mit PRP gesunder Probanden grundsätzlich bestätigt werden. In Abb. 10 ist ersichtlich, dass die Stimulierung von PRP mit ARA eine enge Korrelation zwischen MDA und TXB₂ ($r^2 = 0,95$) erkennen ließ und dies auch in ASS-gehemmten Proben von PRP bestätigt werden konnte ($r^2 = 0,88$, $p < 0,001$, Abb. 11). Dabei stimmten die beobachteten molaren Konzentrationen von MDA und TXB₂ jeweils mit nur geringfügig höheren gemessenen Konzentrationen von TXB₂ (1,186-fach in Abb. 10 und 1,014-fach in Abb. 11) relativ gut miteinander überein.

4.3 Bedeutung der Aggregationsstimulatoren für den Nachweis von thrombozytär freigesetztem MDA

4.3.1 Arachidonsäure als Aggregationsstimulus

Nach Freisetzung von ARA aus den Membranphospholipiden (endogen) oder nach Zugabe von ARA (exogen) zum PRP der Probanden wird TXA₂ gebildet. Dieses verstärkt anschließend durch Bindung an den TP-Rezeptor und einer Kaskade von weiteren Reaktionen die Aggregation. Die Ergebnisse bewirkten dabei ein konzentrationsabhängiges Aggregationssignal, gemessen als maximale Steigung der registrierten Aggregationskurve (Abb. 5). Die unter Stimulation mit ARA synthetisierte MDA und TXB₂ korrelierten eng und mit hoher statistischer Signifikanz miteinander (Abb. 10). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Sensitivität der MDA-Bestimmung ausreicht, um auch geringe MDA-Konzentrationen bei niedrig gewählten ARA-Konzentrationen zu bestimmen, die im Bereich der Aktivierungsschwelle von Thrombozyten liegen (Abb. 15).

Die vorliegende Arbeit zeigt darüber hinaus, dass die Herkunft der als Agonist verwendeten ARA kritisch ist. So kam es in der vorliegenden Arbeit bei Messungen mit ARA von zwei verschiedenen Quellen (Roche, ASPItest und NatuTec) in Gegenwart von ASS zu erheblichen Unterschieden der nachgewiesenen MDA-Konzentrationen. Zunächst bewirkte eine *in vitro* Zugabe von 100 und 300 µM ASS zum PRP gesunder Probanden und Stimulierung mit ARA (NatuTec und ASPItest) eine vollständige Hemmung der Thrombozytenaggregation (Abb. 7). Dies spiegelte sich bezüglich ASPItest ARA von Roche auch bei der MDA-Synthese wieder. Erwartungsgemäß war hier die MDA-Synthese in Gegenwart von ASS-Konzentrationen > 30 µM vollständig gehemmt. Hingegen konnte bei Verwendung der NatuTec ARA trotz einer Inhibition mit 100 und 300 µM ASS weiterhin MDA in unerwartet hoher Konzentration nachgewiesen werden (Abb. 8).

Um dies genauer zu untersuchen, wurden Messungen mit thrombozytenfreiem Plasma unter Zusatz der unterschiedlichen Arachidonsäuren durchgeführt. ARA von NatuTec bewirkte im MDA-Assay eine erhebliche, von Thrombozyten offenbar unabhängige Reaktivität (Abb. 9). Da sowohl bei der Verarbeitung, als auch bei der Lagerung von ARA (NatuTec) jede Form der Oxidation vermieden wurde und aus früheren Untersuchungen keine Probleme bekannt sind, kann vermutet werden, dass eine Verunreinigung der verwendeten Charge mit Thiobarbitursäure-reaktiven Produkten vorlag. Selbstverständlich sind valide Ergebnisse nur mit einer kontaminationsfreien ARA zu erwarten. Da ARA (ASPItest) keine relevante Kontamination aufwies, wurde in der vorliegenden Arbeit ausschließlich diese verwendet.

4.3.2 Kollagen und ADP als Agonisten der Thrombozytenaktivierung und ihr Einfluss auf die TXB₂- bzw. MDA-Synthese

Wie bereits frühere Arbeiten der Arbeitsgruppe am Institut für Pharmakologie zeigten, führt eine Aggregationsstimulation mit Kollagen zu einer deutlich geringeren TX-Synthese als die ARA-induzierte Thrombozytenstimulation (89). Dies zeigen auch die vorliegenden Daten. Obwohl sich anhand der Aggregation eine maximale Aktivierung von Thrombozyten darstellt (Abb. 16), war die TX-Synthese gegenüber Stimulation mit ARA deutlich geringer (Abb. 20). Eine Stimulation mit 1 µg/ml Kollagen führte lediglich zu TXB₂-Konzentrationen zwischen 45,1 - 126,1 nM. 3 µg/ml Kollagen bewirke zwar eine etwas höhere TXB₂-Synthese (zwischen 115,9 - 376,9 nM), dies entspricht jedoch lediglich 7,1 % der durchschnittlichen TXB₂-Synthese bei mit 1 mM ARA-induzierten Aggregationen. Das Gleiche lässt sich auch bezüglich der MDA-Bildung erkennen (Abb. 17). Des Weiteren zeigte die Zugabe von ASS eine konzentrationsabhängige Abnahme von MDA und TXB₂, die ab Konzentrationen von über 100 µM ASS annähernd 0 war (Abb. 19).

Mit Vergleich der thrombozytären Aggregation in Abb. 18 wird deutlich, dass trotz vollständiger Hemmung der TX- und MDA-Synthese (Abb. 19, 21) durch ASS die Kollagen-induzierte Aggregation nicht ganz aufgehoben werden konnte. Dies kann dadurch erklärt werden, dass Kollagen ein Agonist ist, der zum Einen zur Synthese von TXB₂ und MDA führt, zum Anderen jedoch auch über davon unabhängige andere Aktivierungsmechanismen verfügt. So können an freiliegenden Kollagenfibrillen (Typ 1 und 2) Thrombozyten via Integrin $\alpha_2\beta_1$, GPVI, GPIb-V-IX und Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ (GPIIb/IIIa) binden, die über eine TX-unabhängige Signaltransduktion aktiviert werden sowie α - und dichte Granula freisetzen und zur Aggregationsreaktion führen (12). Bei dem verwendeten Kollagen von Horm^R handelt es sich um ein Typ 1 Kollagen. Binden Thrombozyten an dieses, kann es zur Freisetzung der dichten Granula kommen, die unter anderem ADP enthalten (18, 19, 90). ADP führt durch seine Bindung an thrombozytäre Rezeptoren wiederum zu einer Aggregationsverstärkung via P2Y₁₂ Rezeptoren. Eine vollständige Aggregationshemmung durch ASS ist infolgedessen nicht zu erwarten.

Auch beim Aggregationsstimulus ADP ist trotz maximaler Aggregation die MDA- und TXB₂-Synthese gering (Abb. 22, 23). Ursächlich ist auch hier, dass beide Agonisten die Aggregation vorwiegend TX-unabhängig aktivieren (80). ADP bindet nach seiner Freisetzung vor allem an den P2Y₁₂ Rezeptor, der an bestimmte Signalwege in den Thrombozyten gekoppelt ist (Einleitung 1.1.2). Diese führen zu einer raschen Aggregation. Phospholipasen, die als Enzyme für die Freisetzung von ARA aus der Zellwand der Thrombozyten und damit deren TX-Synthese verantwortlich sind, werden durch die Bindung an den P2Y₁₂ Rezeptor kaum beeinflusst. In Folge dessen wird unter Stimulation mit ADP nur wenig TX freigesetzt.

Insgesamt zeigten ADP und Kollagen eine konzentrationsabhängige und miteinander korrelierte Freisetzung von MDA und TXB₂ (Abb. 20, 21, 26).

4.3.3 Die Wahl des Aggregationsstimulus

Voraussetzung für die Untersuchung der Thrombozytenhemmung durch ASS ist eine Stimulation der Thrombozyten durch einen geeigneten Agonisten (8). Die richtige Wahl des Aggregationsstimulus ist für die Bestimmung der Plättchen-TX-Synthesekapazität über die fluoreszenz-photometrische Bestimmung von MDA von essentieller Bedeutung. Obwohl alle verwendeten Stimulatoren eine konzentrationsabhängige Aktivierung zeigten, ist die durch Kollagen und ADP synthetisierte MDA und TXB₂ deutlich geringer als bei Verwendung von ARA (siehe 4.3.2). Geringe Kollagen-Konzentrationen können über endogen freigesetzte ARA zwar zu einer weitgehend TX-abhängigen Stimulation führen, die TX-Synthese ist dabei aber trotzdem im Vergleich zur Stimulation mit ARA gering (8). ADP und Kollagen sind daher weniger gut als Agonisten geeignet, um die Inhibition der thrombozytären COX-1 durch ASS nachzuweisen (60). Dahingegen ist ARA zur Induktion einer Aggregation in PRP aufgrund der hohen Sensitivität gegenüber der Hemmung durch ASS gut geeignet (47, 58, 80).

ARA ist das primäre Substrat des ARA-Metabolismus und wird zur Metabolisierung durch die thrombozytäre COX-1 zur Synthese von TXA₂ und MDA benötigt. Es sollte sich beim Monitoring der Plättchenfunktion durch MDA also ebenfalls als guter Agonist eignen. Dies konnten die vorliegenden Ergebnisse bestätigen (Abb. 10, 11). Die MDA- und TXB₂-Synthese korrelierte linear ($r^2 = 0,95/0,88$) und mit hoher statistischer Signifikanz. Allerdings zeigen die vorliegenden Daten bezüglich ADP und Kollagen ebenfalls, trotz deutlich geringerer MDA- und TXB₂-Synthese, eine enge und immer noch statistisch signifikante Übereinstimmung. Daher scheinen auch diese Stimulatoren geeignet zu sein, um die Plättcheninhibition durch ASS zu detektieren.

4.4 Hemmstoffe des Arachidonsäuremetabolismus

Um die Korrelation bezüglich der Synthese bzw. Hemmung von MDA und TXB₂ unter variierenden Bedingungen, d.h. auch bei Verwendung von anderen Inhibitoren als ASS, zu prüfen, wurden Ozagrel und Cicaprost als weitere im ARA-Metabolismus angreifende Hemmstoffe verwendet und ihr Einfluss auf die Agonist-induzierte MDA- und TXA₂-Synthese untersucht. Diese Inhibitoren hemmen die TX-Synthese unabhängig von der thrombozytären COX-1. Insgesamt zeigte sich sowohl mit Ozagrel, als auch mit Cicaprost ebenfalls eine Korrelation bezüglich der Synthese von MDA und TXB₂ (Abb. 14, 26).

4.4.1 Ozagrel als Inhibitor der Thromboxan-Synthese

Ozagrel hemmt das Enzym TX-Synthase und verhindert somit die Umsetzung des Substrates PGH₂ zum Produkt TXA₂. In der vorliegenden Arbeit wurde von der Hypothese ausgegangen, dass TXB₂, das stabile Abbauprodukt von TXA₂, und MDA

im etwa gleichen Verhältnis während einer thrombozytären Aggregation gebildet werden. Dieses eins-zu-eins Verhältnis wurde zuerst von Hecker et al. in den 70er Jahren beschrieben (37, 91). Auch Heptinstall et al. zeigten eine übereinstimmende TXB₂- und MDA-Synthese (92).

Die in der vorliegenden Arbeit ermittelten Ergebnisse zeigen in Bezug auf die simultane Synthese von MDA und TXB₂ in Gegenwart von Ozagrel eine ebenfalls hohe Übereinstimmung. Abb. 13 und 14 illustrieren, dass ab einer Verwendung von 3 µM Ozagrel die thrombozytäre Synthese von TXB₂ und MDA nahezu vollständig gehemmt war.

Im Gegensatz dazu wird bei der Betrachtung der Aggregationshemmung jedoch deutlich, dass trotz einer Konzentrationserhöhung auf 10 µM Ozagrel und annähernd vollständiger Hemmung der MDA- und TXA₂-Synthese keine vollständige Aggregationshemmung erzielt werden konnte (Abb. 12). Bei Ozagrel verhalten sich insofern die (inkomplette) Hemmung der Thrombozytenaggregation und die (vollständige) Hemmung der TXB₂- und MDA-Bildung unterschiedlich. Zu vergleichbaren Ergebnissen kamen auch Heptinstall et al., die ähnliche Ergebnisse für den TX-Synthasehemmer UK-34787 zeigten (92). Ursächlich dafür ist vermutlich, dass PGH₂, das Produkt der COX-1, ebenfalls ein Agonist am TP-Rezeptor ist und daher auch ohne Umsetzung durch die thrombozytäre TX-Synthase eine Aggregation induziert (30, 93). Unter anderem beschrieben Hamberg et al., dass PGG₂ und PGH₂ eine Plättchenaggregation bewirkten (30). Dadurch, dass bei Hemmung der TX-Synthase die Umsetzung von PGH₂ zu TXB₂ gehemmt wird und PGH₂ annähernd equipotent die Aggregation aktiviert, kommt es hier zu keiner vollständigen Aggregationshemmung. Insofern ist die thrombozytäre TXA₂-Synthese (oder deren indirekte Bestimmung via MDA) in Gegenwart von TX-Synthasehemmern kein geeigneter Biomarker der Thrombozytenaktivierung.

Trotzdem könnten TX-Synthasehemmer ein potentiell sinnvolles pharmakologisches Wirkprinzip sein. Zum Einen bindet PGH₂ nicht nur an den gleichen Rezeptor wie TXA₂ (94), sondern kann in der Gefäßwand zu vasodilatierenden Prostaglandinen (z.B. PGI₂) umgesetzt werden (35). Dieses hemmt ähnlich dem in dieser Dissertation verwendeten Cicaprost die Aggregation (35, 56, 95). Daneben können andere Plättchenfunktionshemmer mit TX-Synthaseinhibitoren kombiniert werden. Vor diesem Hintergrund führten Nagatsuka et al. Studien bei Patienten mit chronisch ischämischer zerebrovaskulärer Krankheit durch. Sie untersuchten zum Einen den Effekt des TX-Synthase-Hemmstoffes Ozagrel allein auf die Thrombozyten und zum Anderen die Kombination von Ozagrel und *low-dose* ASS (96). Im Ergebnis war die endotheliale PGI₂ Bildung unbeeinflusst, aber trotzdem durch die zusätzliche Gabe von ASS die thrombozytäre Aggregation vermindert. Daraus schlossen die Autoren, dass dies ein neuer Ansatz für die antithrombotische Therapie darstellen könnte (96). Ähnliche Ergebnisse wurden von Bertele et al. beschrieben (97). Da im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit die Bewertung des Biomarkers MDA stand, wurden keine weiteren

Untersuchungen zur Effektivität der Thrombozytenfunktionshemmung bei kombinierter Anwendung von Inhibitoren des thrombozytären ARA-Metabolismus durchgeführt.

4.4.2 Cicaprost

PGI₂ und TXA₂ sind Produkte von ARA, welche von zellmembranständigen Phospholipiden freigesetzt werden (32, 98). Sie stellen innerhalb der Hämostase biologische „Gegenspieler“ dar. TXA₂ führt nach Freisetzung zu einer Verstärkung der Thrombozytenaggregation (7, 25), wohingegen PGI₂ die Plättchenaggregation inhibiert (35, 56). Da PGI₂ instabil ist (57), kam es zur Entwicklung von stabilen PGI₂ Derivaten, wie z.B. Cicaprost. Belch et al. zeigten 1993 durch Studien an Probanden, dass die orale Einnahme von 7,5 bzw. 10 µg Cicaprost dreimal am Tag zur Thrombozytenhemmung und Vasodilatation führte (57). Des Weiteren konnten Braun et al. bei mit Cicaprost behandelten Kaninchen eine antiatherosklerotische Wirkung sowie eine verminderte Plättchenaggregation, ATP Sekretion und TXB₂-Bildung nachweisen (99). Konzentrationen zwischen 10 und 30 nM Cicaprost genügten in diesen Arbeiten für eine potente Inhibition der Aggregation, was mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit übereinstimmt (vgl. Abb. 24). Auch die MDA- und TXB₂-Synthese konnte durch Cicaprost potent gehemmt werden (Abb. 25, 26). Die Entwicklung von Cicaprost wurde später allerdings nicht mehr fortgeführt, da diese Substanz als hochwirksamer Vasodilatator unerwünschte vaskuläre Wirkungen zeigte (57). Dennoch war für die vorliegende Arbeit von Interesse, ob MDA auch unter Prostazyklinrezeptor-vermittelter Thrombozytenfunktionshemmung einen Biomarker für die TX-Synthese und Thrombozytenfunktion darstellt.

Als weiteren Versuch dieser Arbeit wurden deshalb einzelne, mit 1 mM ARA stimulierte Proben mit 100 nM Cicaprost inhibiert. Dies führte einerseits zu einer vollständigen Aggregationshemmung (Abb. 24, weißes Dreieck). Andererseits war trotz vollständiger Hemmung der Aggregation mittels Fluoreszenz-Photometrie MDA in relativ hoher Konzentration nachweisbar (Abb. 25, eingefügte Darstellung). Da Cicaprost zu einer cAMP-vermittelten Hemmung der Plättchenaktivierung und damit auch zu einer Inhibition der Freisetzung von endogener ARA führt, handelte es sich dabei am wahrscheinlichsten um MDA, welches in Folge der exogenen Stimulation mit 1 mM ARA durch ruhende Thrombozyten gebildet wurde. In Gegenwart von 1 mM ARA (ASPItest) als Agonist wurde unter den in dieser Arbeit verwendeten Versuchsbedingungen in Abwesenheit von Inhibitoren eine Synthese von durchschnittlich 2601,8 nM MDA gemessen (Abb. 6). Dementsprechend ist anzunehmen, dass bei Plättchenstimulation mit ARA etwa die Hälfte der zu MDA bzw. TX umgesetzten ARA exogenen und die andere Hälfte über thrombozytäre Phospholipasen bereitgestellt wird.

4.5 Kritische Bewertung der Methodik

4.5.1 Licht-Transmissions-Aggregometrie (LTA)

In der vorliegenden Arbeit wurde die Licht-Transmissions-Aggregometrie (LTA) nach Born für die Untersuchung der thrombozytären Aggregationen verwendet. Diese ist wohl die am besten etablierte Methode zur Untersuchung der Thrombozytenfunktion („Goldstandard“). Allerdings ist zu bedenken, dass jede *ex vivo* oder *in vitro* Untersuchung an Thrombozyten von der *in vivo* Situation abweichen kann (3, 69, 70), denn dabei werden die Thrombozyten zunächst aus ihrem natürlichen Milieu herausgelöst (69, 70). Die Wechselbeziehungen zwischen Blutzellen, dem Gefäßendothel sowie instabilen endogenen Mediatorsubstanzen, die nach Blutabnahme teils inaktiviert werden, sind im PRP nicht mehr vorhanden (69, 70). Auch die Effekte der Lipämie, der Hämolyse oder die Kontamination mit anderen Blutzellen, bei denen bekannt ist, dass sie die Plättchenfunktion modulieren, sind im PRP größtenteils limitiert (16). Des Weiteren unterliegen Thrombozyten *in vivo* mechanischen und chemischen Einflüssen, die die Aktivierbarkeit verändern (3), und die *in vitro* nicht naturgetreu nachzubilden sind. Durch das Rühren der PRP-Suspension werden Scherkräfte durch den Blutfluss nur sehr eingeschränkt imitiert (68). Die dadurch entstehende Schubspannung ist trotz allem wahrscheinlich geringer als unter physiologischen Bedingungen (1). Auch die kombinierte Aktivierung der Thrombozyten durch verschiedene Stimulatoren (70), wie sie im lebenden Organismus abläuft, wird nicht berücksichtigt. *In vitro* wird in der Regel nur ein einziger Aggregations-Agonist eingesetzt (3). Vor diesem Hintergrund ist auch die Freisetzung von ARA aus der Plättchenmembran *in vivo* einer von mehreren Mechanismen der Plättchenaktivierung (3). Die *in vivo* ablaufende thrombozytäre Aggregation lässt sich damit nur begrenzt mit der *in vitro* Situation vergleichen. Dass die TX-abhängige Plättchenaktivierung pathophysiologische Bedeutung hat, zeigen andererseits viele klinische Studien, die die Reduktion kardiovaskulärer Ereignisse durch ASS belegt haben (4, 5).

Insgesamt ist die LTA ein artifizielles System (16), welches in Grenzen zur Untersuchung der Thrombozytenfunktion auf Medikamenteninhibition geeignet ist, die physiologischen und pathophysiologischen Verhältnisse im intakten Organismus aber nur begrenzt widerspiegelt (58).

4.5.2 Messeinschränkungen mit den Biomarkern MDA und TXB₂

Obwohl sich zur Diagnostik der Medikamentenwirksamkeit (insbesondere ASS) sowohl MDA als auch TXB₂ gut eignen würden, ist die Extrapolation von Biomarkern auf Krankheitsprozesse immer mit Einschränkungen behaftet. Trotz einer signifikanten Übereinstimmung zwischen TXB₂ und MDA war in der vorliegenden Arbeit bei fast allen Korrelationen eine leichte Verschiebung des Verhältnisses zugunsten TXB₂ ersichtlich. Mit Ausnahme der Messungen von PRP mit Ozagrel und ARA, bei denen

eine 1,072-fache Tendenz zugunsten MDA bestand, zeigen alle anderen Vergleiche etwas höhere Konzentrationen von TXB₂. Insgesamt bestand eine gute Übereinstimmung zwischen MDA und TXB₂.

In Bezug auf eine mögliche Überschätzung von TXB₂ bieten sich verschiedene Erklärungsansätze. Hier könnten beispielsweise Kreuzreaktivitäten mit anderen COX-Metaboliten die Ursache sein. So kann es laut Herstellerangaben des verwendeten TXB₂-Immunoassays (Cayman) zu Kreuzreaktivitäten von TXB₂ mit PGD₂ und PGE₂ kommen. Da für Thrombozyten keine relevante Synthese dieser Prostaglandine bekannt ist - PGD₂ entsteht vor allem in menschlichen Mastzellen und PGE₂ in Endothelzellen (100) - dürfte dies im Rahmen dieser Arbeit aber keine Bedeutung haben.

Auch eine Unterschätzung der Konzentration MDA wäre denkbar. Zwar beobachteten Smith et al. bei Messungen von MDA in PRP innerhalb einer Stunde keine Degradation und schlossen daraus, dass MDA im menschlichen Plasma stabil anzusehen sei (101), doch ist bekannt, dass die Lagerung biologischer Proben zur Bestimmung von MDA anspruchsvoll ist (102, 103). Die mittels des fluoreszenz-photometrischen MDA Assays durchgeführten Messungen dauerten im Durchschnitt 85 Minuten (vgl. Material und Methoden Tabelle 1). Nach eigenen Kontrollbestimmungen war MDA über diese Zeit jedoch stabil.

Den in dieser Arbeit beobachteten relativ geringen Abweichungen vom erwarteten eins-zu-eins Verhältnis zwischen MDA und TXB₂ könnten die genannten Ursachen zugrunde liegen. Allerdings spricht gegen eine systematische Fehlerursache, dass bei identischer Methodik - außer den verschiedenen Inhibitoren - Abweichungen in beide Richtungen vorkamen. Die Beobachtung, dass nur in Gegenwart von Ozagrel höhere Konzentrationen von MDA gefunden wurden, könnte auch daraus resultieren, dass diese Substanz das in der Literatur beschriebene eins-zu-eins-Verhältnis (37, 91) von TXB₂ zu MDA zugunsten von MDA verändert. Aus den bisher verfügbaren Daten zum pharmakologischen Mechanismus der Hemmung der TX-Synthese durch Ozagrel lässt sich jedoch hierfür kein molekularer Mechanismus ableiten (104).

Im Rahmen dieser Arbeit als besonders wichtig erwies sich die beobachtete Kontamination der als Stimulus eingesetzten ARA eines Herstellers (NatuTec). Hier bedarf es entsprechender Vorversuche, die sicherstellen, dass in diesem Assay eine hinreichend „saubere“ ARA eingesetzt wird. Dies war im Rahmen dieser Arbeit bei der ARA von Roche (ASPItest) der Fall.

Insgesamt veranschaulichen die vorliegenden Ergebnisse eine enge Korrelation zwischen MDA und TXB₂. Etwas größere Verschiebungen zeigten sich insbesondere aber bei niedrigen MDA- und TXB₂-Konzentrationen, wie unter Stimulation mit Kollagen und Plättchenhemmung durch ASS (1,565-fach höhere TXB₂-Konzentration) und Cicaprost mit ADP (1,511-fach höhere TXB₂-Konzentration). Diese größeren Abweichungen resultieren vermutlich daraus, dass die anteilig relativ hohe Streuung der Messwerte bei geringen Konzentrationen einen größeren Messfehler zur Folge hatte.

4.5.3 Messbedingungen bei gesunden Probanden

Bei den Aggregationsmessungen der vorliegenden Studie wurde mit Blutproben gesunder Probanden gearbeitet. Es ist bekannt, dass das Monitoring der Plättchenfunktion das klinische Risiko für arterielle oder venöse Thrombosen abbildet. Zudem stellt sich die Frage der Reproduzierbarkeit von Untersuchungen der Plättchenfunktion bei gesunden Personen in Bezug auf die Thrombozytenfunktion bei Patienten. Um die Erkenntnisse der vorliegenden Dissertation in den klinischen Alltag übertragen zu können, sind weitere Messungen anhand Patientenproben erforderlich. In Zusammenarbeit mit der Klinik für Kardiologie, Pneumologie und Angiologie des Universitätsklinikums der HHU Düsseldorf werden entsprechende Untersuchungen an Patienten bereits durchgeführt und in naher Zukunft zur Weiterführung der oben genannten Ergebnisse sowie der Beurteilung der klinischen Situation zur Verfügung stehen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Blutproben von verschiedenen Probanden eingesetzt. Da jeweils nur begrenzte Blutmengen zur Verfügung standen, war es nicht möglich mit dem Blut eines Probanden alle geplanten Messungen durchzuführen. Die ermittelten Messwerte wurden daher aus Bestimmungen an PRP von mehreren Probanden gemittelt. Durch die gewählte Größe der Versuchsgruppen von ($n = 6 - 10$) sind jedoch repräsentative Versuchsergebnisse zu erwarten.

4.6 Ausblick

Vor dem Hintergrund, dass „ASS-Nonresponse“ potentiell das Risiko atherothrombotischer Ereignisse erhöhen kann, ist die Möglichkeit eines individuellen Monitoring der Plättchenfunktion interessant. Da eine große Anzahl von Patienten mit ASS routinemäßig behandelt wird, wäre ein Monitoring jedes behandelten Patienten unrealistisch. Speziell bei gefährdeten Patienten wäre dies ggf. aber sinnvoll. So ist bekannt, dass Patienten auch unter der Einnahme von Aggregationshemmern akute kardiovaskuläre Ereignisse erleiden können. Bei „Nonrespondern“ könnte eine Diagnostik bezüglich der ASS-Wirksamkeit auf die Thrombozytenfunktion zur Sicherung der Effektivität der artherothrombotischen Prophylaxe (8, 78) von Bedeutung sein. Auch Patienten, die zusätzliche Risikofaktoren wie Diabetes mellitus, Hypertonie, Hypercholesterämie, erhöhte laborchemische Risikomarker (z.B. CRP), Tabakkonsum oder Kombinationen solcher Risikofaktoren aufweisen, könnten profitieren. Bei Hochrisikopatienten führen einzelne Kliniken bereits ein Monitoring der Plättchenfunktion durch. Bisher liegen aber nahezu keine Daten über den Nutzen eines solchen Monitorings vor, wodurch die klinische Relevanz unsicher ist.

Zahlreiche Studien belegen auch, dass bei Patienten mit *CAD* oder nach koronarer Bypassoperation die plättchenhemmende Wirkung aufgrund eines verstärkten Thrombozytenumsatzes vermindert ist (64). Grove et al. schlugen vor, dass in solchen Situationen eine einmal tägliche Einnahme von ASS möglicherweise nicht ausreichend

sei und mehrfach tägliche Dosierung ggf. Vorteile haben könnte (64). Nach entsprechender Bestimmung der thrombozytären TX-Synthese könnten folglich die Dosis und Dosisintervalle verifiziert und die Therapie individuell adjustiert werden. Bei Patienten mit stabiler *CAD* wurde ein Nichtansprechen von ASS beschrieben, welches durch eine höhere Dosis (300 mg ASS) überwunden werden konnte (105). Weiterhin ist bekannt, dass Patienten mit *CABG* (*coronary artery bypass graft*/ Koronararterien-Bypass) postoperativ häufig zu einem erhöhten Thrombozyten-Umsatz neigen. Zimmermann et al. zeigten diesbezüglich, dass konventionelle ASS-Dosierungen oft unwirksam sind (106), wobei im letzteren Fall auch Interaktionen mit *NSAID*-Analgetika eine Rolle spielen. In diesem Zusammenhang könnte ein Monitoring ebenfalls sinnvoll sein (106).

Patienten mit Vorhofflimmern und akutem Koronarsyndrom erhalten meistens orale Antikoagulantien in Kombination mit Thrombozytenfunktionshemmern. Entsprechend besteht ein erhöhtes Blutungsrisiko. Auch in diesem Fall wäre es wertvoll, individuell die Effektivität von ASS zur Bewertung des Blutungsrisikos zu kennen.

In all diesen Situationen könnte der in dieser Dissertation beschriebene Nachweis von MDA zur indirekten Bestimmung der thrombozytären TX-Synthese von Nutzen sein. Ob eine Verwendung der fluoreszenz-photometrischen MDA-Bestimmung darüber hinaus zur Erkennung einer Thrombozyten-Hyperreaktivität bei Verdacht auf eine kardiovaskuläre Erkrankung verwendbar ist, bleibt zu untersuchen.

Schließlich wurden für ASS bereits andere Anwendungsbereiche beschrieben. So berichten einige Studien über eine mögliche Tumorprävention durch ASS im Dickdarm oder auch bei anderen Krebsarten (107-109). In diesem Zusammenhang ist der Angriffspunkt von ASS zwar noch unklar, es ist aber zu vermuten, dass auch hier die irreversible Hemmung der COX von Bedeutung ist. Auch die Anwendung von ASS zur Risikoreduktion von Präeklampsie, intrauterinen Wachstumsretardierung, Alzheimer-Krankheit oder anderen neurodegenerativen Erkrankungen wird diskutiert (110-115). Dementsprechend wäre in Zukunft vielleicht auch in diesen Bereichen ein Monitoring der Wirkung von ASS, auch zur Bestimmung der Einnahmetreue von Patienten, durch das Verfahren der fluoreszenz-photometrischen MDA-Bestimmung vorstellbar.

Das hier beschriebene Verfahren könnte, in Form eines standardisierten Geräts für die fluoreszenz-photometrische indirekte Bestimmung von TX, genutzt werden. Vor diesem Hintergrund wird in Kooperation mit dem Physikalischen Institut der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität bereits ein System entwickelt, welches die erforderlichen Kriterien erfüllen soll.

4.7 Schlussfolgerung

Abschließend lässt sich zusammenfassen, dass ein geeigneter Test zur Plättchenfunktionsdiagnostik kostengünstig, schnell und leicht durchführbar,

reproduzierbar, hinreichend genau und standardisierbar sein sollte (7). Die *in vitro* Experimente im Rahmen dieser Dissertation zeigen hinsichtlich der Bestimmung von MDA als möglicher Surrogat-Parameter zur Beurteilung der therapeutischen Effektivität von ASS vielversprechende Ergebnisse.

Alle verwendeten Untersuchungsbedingungen konnten eine eindeutige Korrelation zwischen MDA und TXB₂ zeigen. Sowohl die pharmakologische Hemmung (ASS, Ozagrel und Cicaprost) als auch die Verwendung verschiedener Aktivatoren der Thrombozytenfunktion (ARA und Kollagen) bestätigten dies. Die leichte, schnelle und kostengünstige Durchführung der MDA Analyse beinhaltet viele Vorteile (siehe Tabelle 1).

Schon Smith et al. vermuteten bereits im Jahre 1976, dass die MDA-Bestimmung ein sinnvoller, „qualitativer Test“ zur Untersuchung der Thrombozytenfunktion sein könnte (101). Systematische Untersuchungen wurden jedoch bisher nicht durchgeführt. Diese „Lücke“ füllt die vorliegende Dissertation.

5. Literatur- und Quellenverzeichnis

1. Pettersen AA, Arnesen H, Seljeflot I. A brief review on high on-aspirin residual platelet reactivity. *Vascul Pharmacol.* 2015;67-69:6-9.
2. 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. *Archives of internal medicine.* 2007;167(15):1593-9.
3. Schrör K, Huber K, Hohlfeld T. Functional testing methods for the antiplatelet effects of aspirin. *Biomark Med.* 2011;5(1):31-42.
4. Antiplatelet Trialists' Collaboration. Collaborative overview of randomised trials of antiplatelet therapy--I: Prevention of death, myocardial infarction, and stroke by prolonged antiplatelet therapy in various categories of patients. *BMJ (Clinical research ed).* 1994;308(6921):81-106.
5. Antiplatelet Trialists' Collaboration. Collaborative meta-analysis of randomised trials of antiplatelet therapy for prevention of death, myocardial infarction, and stroke in high risk patients. *BMJ (Clinical research ed).* 2002;324(7329):71-86.
6. 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. *European heart journal.* 2007;28(14):1702-8.
7. Cattaneo M. Resistance to antiplatelet drugs: molecular mechanisms and laboratory detection. *J Thromb Haemost.* 2007;5 Suppl 1:230-7.
8. Hohlfeld T. Aspirin-Resistenz / Aspirin resistance. *J Lab Med.* 2006;30(5)302-309.
9. Bizzozero J. Ueber einen neuen Formbestandtheil des Blutes und dessen Rolle bei der Thrombose und der Blutgerinnung. *Arch Pathol Anat.* 1882;90(2):261-332.
10. Grüner S, Prostedna M, Aktas B, Moers A, Schulte V, Krieg T, et al. Anti-glycoprotein VI treatment severely compromises hemostasis in mice with reduced alpha2beta1 levels or concomitant aspirin therapy. *Circulation.* 2004;110(18):2946-51.
11. 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(9):2120-30.
12. Santoro SA. Identification of a 160,000 dalton platelet membrane protein that mediates the initial divalent cation-dependent adhesion of platelets to collagen. *Cell.* 1986;46(6):913-20.
13. Moroi M, Jung SM, Okuma M, Shinmyozu K. A patient with platelets deficient in glycoprotein VI that lack both collagen-induced aggregation and adhesion. *The Journal of clinical investigation.* 1989;84(5):1440-5.
14. Gibbins JM, Okuma M, Farndale R, Barnes M, Watson SP. Glycoprotein VI is the collagen receptor in platelets which underlies tyrosine phosphorylation of the Fc receptor gamma-chain. *FEBS Lett.* 1997;413(2):255-9.

15. Massberg S, Gawaz M, Grüner S, Schulte V, Konrad I, Zohlnhofer D, et al. A crucial role of glycoprotein VI for platelet recruitment to the injured arterial wall in vivo. *J Exp Med.* 2003;197(1):41-9.
16. Waksman R, Gurbel PA, Gaglia MA (ed). *Antiplatelet therapy in cardiovascular disease.* Wiley, Chichester, 2014.
17. Savage B, Almus-Jacobs F, Ruggeri ZM. Specific synergy of multiple substrate-receptor interactions in platelet thrombus formation under flow. *Cell.* 1998;94(5):657-66.
18. Gawaz M. *Das Blutplättchen : Physiologie, Pathophysiologie, Membranrezeptoren, antithrombozytäre Wirkstoffe und antithrombozytäre Therapie bei koronarer Herzerkrankung.* Thieme, Stuttgart, 1999.
19. Cattaneo M, Gachet C. ADP receptors and clinical bleeding disorders. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999;19(10):2281-5.
20. Daniel JL, Dangelmaier C, Jin J, Ashby B, Smith JB, Kunapuli SP. Molecular basis for ADP-induced platelet activation. I. Evidence for three distinct ADP receptors on human platelets. *J Biol Chem.* 1998;273(4):2024-9.
21. MacKenzie AB, Mahaut-Smith MP, Sage SO. Activation of receptor-operated cation channels via P2X1 not P2T purinoceptors in human platelets. *J Biol Chem.* 1996;271(6):2879-81.
22. Jin J, Kunapuli SP. Coactivation of two different G protein-coupled receptors is essential for ADP-induced platelet aggregation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(14):8070-4.
23. Jin J, Daniel JL, Kunapuli SP. Molecular basis for ADP-induced platelet activation. II. The P2Y1 receptor mediates ADP-induced intracellular calcium mobilization and shape change in platelets. *J Biol Chem.* 1998;273(4):2030-4.
24. Leon C, Hechler B, Vial C, Leray C, Cazenave JP, Gachet C. The P2Y1 receptor is an ADP receptor antagonized by ATP and expressed in platelets and megakaryoblastic cells. *FEBS Lett.* 1997;403(1):26-30.
25. Hamberg M, Svensson J, Samuelsson B. Thromboxanes: a new group of biologically active compounds derived from prostaglandin endoperoxides. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1975;72(8):2994-8.
26. Hung SC, Ghali NI, Venton DL, Le Breton GC. Specific binding of the thromboxane A2 antagonist 13-azaprostanoic acid to human platelet membranes. *Biochim Biophys Acta.* 1983;728(2):171-8.
27. Moncada S, Vane JR. Unstable metabolites of arachidonic acid and their role in haemostasis and thrombosis. *Br Med Bull.* 1978;34(2):129-35.
28. Moriyama T, Wada K, Oki M, Matsuura T, Kito M. The mechanism of arachidonic acid release in collagen-activated human platelets. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry.* 1994;58(1):93-8.
29. Vane JR, Bakhle YS, Botting RM. Cyclooxygenases 1 and 2. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1998;38:97-120.
30. Hamberg M, Svensson J, Wakabayashi T, Samuelsson B. Isolation and structure of two prostaglandin endoperoxides that cause platelet aggregation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1974;71(2):345-9.

31. Chandrasekharan NV, Dai H, Roos KL, Evanson NK, Tomsik J, Elton TS, et al. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(21):13926-31.
32. Moncada S. Eighth Gaddum Memorial Lecture. University of London Institute of Education, December 1980. Biological importance of prostacyclin. *Br J Pharmacol*. 1982;76(1):3-31.
33. Patrono C, Collier B, FitzGerald GA, Hirsh J, Roth G. Platelet-active drugs: the relationships among dose, effectiveness, and side effects: the Seventh ACCP Conference on Antithrombotic and Thrombolytic Therapy. *Chest*. 2004;126(3 Suppl):234s-64s.
34. Otto JC, Smith WL. Prostaglandin endoperoxide synthases-1 and -2. *Journal of lipid mediators and cell signalling*. 1995;12(2-3):139-56.
35. Moncada S, Gryglewski R, Bunting S, Vane JR. An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. *Nature*. 1976;263(5579):663-5.
36. Hammarström S. Biosynthesis and biological actions of prostaglandins and thromboxanes. *Arch Biochem Biophys*. 1982;214(2):431-45.
37. Hecker M, Haurand M, Ullrich V, Diczfalussy U, Hammarström S. Products, kinetics, and substrate specificity of homogeneous thromboxane synthase from human platelets: development of a novel enzyme assay. *Arch Biochem Biophys*. 1987;254(1):124-35.
38. Siess W, Siegel FL, Lapetina EG. Arachidonic acid stimulates the formation of 1,2-diacylglycerol and phosphatidic acid in human platelets. Degree of phospholipase C activation correlates with protein phosphorylation, platelet shape change, serotonin release, and aggregation. *J Biol Chem*. 1983;258(18):11236-42.
39. Shi H, Yokoyama A, Kohno N, Hirasawa Y, Kondo K, Sakai K, et al. Effect of thromboxane A2 inhibitors on allergic pulmonary inflammation in mice. *The European respiratory journal*. 1998;11(3):624-9.
40. Kobayashi T, Tahara Y, Matsumoto M, Iguchi M, Sano H, Murayama T, et al. Roles of thromboxane A(2) and prostacyclin in the development of atherosclerosis in apoE-deficient mice. *The Journal of clinical investigation*. 2004;114(6):784-94.
41. Schrör K. *Acetylsalicylic Acid*. 2nd ed. Wiley, Weinheim, 2016.
42. Schrör K. Aspirin and platelets: the antiplatelet action of aspirin and its role in thrombosis treatment and prophylaxis. *Semin Thromb Hemost*. 1997;23(4):349-56.
43. Cai G, Zhou W, Lu Y, Chen P, Lu Z, Fu Y. Aspirin resistance and other aspirin-related concerns. *Neurol Sci*. 2016;37(2):181-9.
44. Becattini C, Agnelli G, Schenone A, Eichinger S, Bucherini E, Silingardi M, et al. Aspirin for preventing the recurrence of venous thromboembolism. *N Engl J Med*. 2012;366(21):1959-67.

45. Roth GJ, Stanford N, Majerus PW. Acetylation of prostaglandin synthase by aspirin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1975;72(8):3073-6.
46. Loll PJ, Picot D, Garavito RM. The structural basis of aspirin activity inferred from the crystal structure of inactivated prostaglandin H2 synthase. *Nature structural biology*. 1995;2(8):637-43.
47. Zimmermann N, Weber AA, Hohlfeld T. Aspirin "resistance". *Herz*. 2008;33(4):270-8.
48. Smith JB, Willis AL. Aspirin selectively inhibits prostaglandin production in human platelets. *Nature: New biology*. 1971;231(25):235-7.
49. Patrono C. Aspirin as an antiplatelet drug. *N Engl J Med*. 1994;330(18):1287-94.
50. Patrono C, Garcia Rodriguez LA, Landolfi R, Baigent C. Low-dose aspirin for the prevention of atherothrombosis. *N Engl J Med*. 2005;353(22):2373-83.
51. Smith SC, Jr., Allen J, Blair SN, Bonow RO, Brass LM, Fonarow GC, et al. AHA/ACC guidelines for secondary prevention for patients with coronary and other atherosclerotic vascular disease: 2006 update: endorsed by the National Heart, Lung, and Blood Institute. *Circulation*. 2006;113(19):2363-72.
52. 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.
53. Naito J, Komatsu H, Ujiie A, Hamano S, Kubota T, Tsuboshima M. Effects of thromboxane synthetase inhibitors on aggregation of rabbit platelets. *Eur J Pharmacol*. 1983;91(1):41-8.
54. Hiraku S, Taniguchi K, Wakitani K, Omawari N, Kira H, Miyamoto T, et al. Pharmacological studies on the TXA2 synthetase inhibitor (E)-3-[p-(1H-imidazol-1-ylmethyl)phenyl]-2-propenoic acid (OKY-046). *Jpn J Pharmacol*. 1986;41(3):393-401.
55. Cayman Chemical. Ozagrel [Internet] [03.11.2017]. Available from: <https://www.caymanchem.com/product/70515>.
56. Hildebrand M, Staks T, Schütt A, Matthes H. Pharmacokinetics of 3H-cicaprost in healthy volunteers. *Prostaglandins*. 1989;37(2):259-73.
57. Belch JJ, McLaren M, Lau CS, Mackay IR, Bancroft A, McEwen J, et al. Cicaprost, an orally active prostacyclin analogue: its effects on platelet aggregation and skin blood flow in normal volunteers. *Br J Clin Pharmacol*. 1993;35(6):643-7.
58. Cattaneo M. Aspirin and clopidogrel: efficacy, safety, and the issue of drug resistance. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24(11):1980-7.
59. Andersen K, Hurlen M, Arnesen H, Seljeflot I. Aspirin non-responsiveness as measured by PFA-100 in patients with coronary artery disease. *Thromb Res*. 2002;108(1):37-42.
60. Grosser T, Fries S, Lawson JA, Kapoor SC, Grant GR, FitzGerald GA. Drug resistance and pseudoresistance: an unintended consequence of enteric coating aspirin. *Circulation*. 2013;127(3):377-85.

61. Krasopoulos G, Brister SJ, Beattie WS, Buchanan MR. Aspirin "resistance" and risk of cardiovascular morbidity: systematic review and meta-analysis. *BMJ (Clinical research ed)*. 2008;336(7637):195-8.
62. Eikelboom JW, Hirsh J, Weitz JI, Johnston M, Yi Q, Yusuf S. Aspirin-resistant thromboxane biosynthesis and the risk of myocardial infarction, stroke, or cardiovascular death in patients at high risk for cardiovascular events. *Circulation*. 2002;105(14):1650-5.
63. Weber AA, Przytulski B, Schanz A, Hohlfeld T, Schrör K. Towards a definition of aspirin resistance: a typological approach. *Platelets*. 2002;13(1):37-40.
64. Grove EL, Hvas AM, Mortensen SB, Larsen SB, Kristensen SD. Effect of platelet turnover on whole blood platelet aggregation in patients with coronary artery disease. *J Thromb Haemost*. 2011;9(1):185-91.
65. Ruggeri ZM. Platelets in atherothrombosis. *Nature medicine*. 2002;8(11):1227-34.
66. Statistisches Bundesamt. Pressemitteilung vom 6. Dez. 2012, 425/12: "Todesfälle 2011 leicht rückläufig – häufigste Todesursache Herz-/Kreislaufkrankungen".
67. Born GV. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature*. 1962;194:927-9.
68. Born GV, Cross MJ. The Aggregation of blood platelets. *J Physiol*. 1963;168:178-95.
69. Schrör K, Weber AA, Hohlfeld T. Aspirin "resistance". *Blood Cells Mol Dis*. 2006;36(2):171-6.
70. Schrör K, Hohlfeld T, Weber AA. Aspirin resistance - does it clinically matter? *Clinical research in cardiology : official journal of the German Cardiac Society*. 2006;95(10):505-10.
71. Mayer K, Bernlochner I, Braun S, Schulz S, Orban M, Morath T, et al. Aspirin treatment and outcomes after percutaneous coronary intervention: results of the ISAR-ASPI registry. *J Am Coll Cardiol*. 2014;64(9):863-71.
72. 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. *American heart journal*. 2007;153(2):175-81.
73. Muir AR, McMullin MF, Patterson C, McKeown PP. Assessment of aspirin resistance varies on a temporal basis in patients with ischaemic heart disease. *Heart*. 2009;95(15):1225-9.
74. Zimmermann N, Kurt M, Winter J, Gams E, Wenzel F, Hohlfeld T. Detection and duration of aspirin resistance after coronary artery bypass grafting. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*. 2008;135(4):947-8.
75. Larsen SB, Neergaard-Petersen S, Grove EL, Kristensen SD, Hvas AM. Increased platelet aggregation and serum thromboxane levels in aspirin-treated patients with prior myocardial infarction. *Thrombosis and haemostasis*. 2012;108(1):140-7.
76. 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(25):3156-64.
77. Geisler T, Gawaz M. [Resistance to antiplatelet substances-a real clinical problem]. *Herz*. 2008;33(4):260-8.
 78. Gum PA, Kottke-Marchant K, Welsh PA, White J, Topol EJ. A prospective, blinded determination of the natural history of aspirin resistance among stable patients with cardiovascular disease. *J Am Coll Cardiol*. 2003;41(6):961-5.
 79. Gum PA, Kottke-Marchant K, Poggio ED, Gurm H, Welsh PA, Brooks L, et al. Profile and prevalence of aspirin resistance in patients with cardiovascular disease. *Am J Cardiol*. 2001;88(3):230-5.
 80. Hohlfeld T, Saxena A, Schrör K. High on treatment platelet reactivity against aspirin by non-steroidal anti-inflammatory drugs-pharmacological mechanisms and clinical relevance. *Thrombosis and haemostasis*. 2013;109(5):825-33.
 81. Frelinger AL, Li Y, Linden MD, Tarnow I, Barnard MR, Fox ML, et al. Aspirin 'resistance': role of pre-existent platelet reactivity and correlation between tests. *J Thromb Haemost*. 2008;6(12):2035-44.
 82. Reilly IA, FitzGerald GA. Inhibition of thromboxane formation in vivo and ex vivo: implications for therapy with platelet inhibitory drugs. *Blood*. 1987;69(1):180-6.
 83. Sibbing D, Massberg S. Plättchenaggregationshemmer. *Kardiologe*. 2012;6(5):399-411.
 84. Braun D, Schulz C, Sibbing D, Massberg S. [Periinterventional antiplatelet therapy: from bench to bedside]. *Herz*. 2012;37(2):128-35.
 85. Toyooka T. Use of derivatization to improve the chromatographic properties and detection selectivity of physiologically important carboxylic acids. *Journal of chromatography B, Biomedical applications*. 1995;671(1-2):91-112.
 86. Hamberg M, Svensson J, Samuelsson B. Prostaglandin endoperoxides. A new concept concerning the mode of action and release of prostaglandins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1974;71(10):3824-8.
 87. Granström E, Kindahl H, Samuelsson B. Radioimmunoassay for Thromboxane B₂. *Analytical Letters*. 1976;9(7):611-27.
 88. Janero DR. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radical Biology and Medicine*. 1990;9(6):515-40.
 89. 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(1):43-50.
 90. Holmsen H. Collagen-induced release of adenosine diphosphate from blood platelets incubated with radioactive phosphate in vitro. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation*. 1965;17:239-46.
 91. Hecker M, Ullrich V. On the mechanism of prostacyclin and thromboxane A₂ biosynthesis. *J Biol Chem*. 1989;264(1):141-50.

92. Heptinstall S, Bevan J, Cockbill SR, Hanley SP, Parry MJ. Effects of a selective inhibitor of thromboxane synthetase on human blood platelet behaviour. *Thrombosis Research*. 1980;20(2):219-30.
93. Mayeux PR, Morton HE, Gillard J, Lord A, Morinelli TA, Boehm A, et al. The affinities of prostaglandin H₂ and thromboxane A₂ for their receptor are similar in washed human platelets. *Biochemical and biophysical research communications*. 1988;157(2):733-9.
94. Halushka PV. Pharmacology of thromboxane A₂ receptor antagonists. *Zeitschrift fur Kardiologie*. 1989;78 Suppl 3:42-7.
95. Bunting S, Gryglewski R, Moncada S, Vane JR. Arterial walls generate from prostaglandin endoperoxides a substance (prostaglandin X) which relaxes strips of mesenteric and coeliac arteries and inhibits platelet aggregation. *Prostaglandins*. 1976;12(6):897-913.
96. Nagatsuka K, Uyama O, Nakabayashi S, Yoneda S, Kimura K, Kamada T. A new approach to antithrombotic therapy--evaluation of combined therapy of thromboxane synthetase inhibitor and very low dose of aspirin. *Stroke*. 1985;16(5):806-9.
97. Bertele V, Falanga A, Tomasiak M, Dejana E, Cerletti C, de Gaetano G. Platelet thromboxane synthetase inhibitors with low doses of aspirin: possible resolution of the "aspirin dilemma". *Science*. 1983;220(4596):517-9.
98. Moncada S. Biology and therapeutic potential of prostacyclin. *Stroke*. 1983;14(2):157-68.
99. Braun M, Hohlfeld T, Kienbaum P, Weber AA, Sarbia M, Schrör K. Antiatherosclerotic effects of oral cicaprost in experimental hypercholesterolemia in rabbits. *Atherosclerosis*. 1993;103(1):93-105.
100. Schrör K. [Eicosanoids and essential fatty acids of the cardiovascular system]. *Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin*. 1986;92:610-8.
101. Smith JB, Ingerman CM, Silver MJ. Malondialdehyde formation as an indicator of prostaglandin production by human platelets. *J Lab Clin Med*. 1976;88(1):167-72.
102. Kumar A, Dhillon BS, Rao DN, Menon G, Shankar H, Dhaliwal LK, et al. Temporal trends of malondialdehyde in stored human plasma. *Indian journal of clinical biochemistry : IJCB*. 2012;27(4):405-9.
103. Lee DM. Malondialdehyde formation in stored plasma. *Biochemical and biophysical research communications*. 1980;95(4):1663-72.
104. Sathler PC, Santana M, Lourenco AL, Rodrigues CR, Abreu P, Cabral LM, et al. Human thromboxane synthase: comparative modeling and docking evaluation with the competitive inhibitors Dazoxiben and Ozagrel. *J Enzyme Inhib Med Chem*. 2014;29(4):527-31.
105. Meen O, Brosstad F, Khiabani H, Gjertsen E, Lauritsen ME, Pedersen TM, et al. No case of COX-1-related aspirin resistance found in 289 patients with symptoms of stable CHD remitted for coronary angiography. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation*. 2008;68(3):185-91.

106. Zimmermann N, Kienzle P, Weber AA, Winter J, Gams E, Schrör K, et al. Aspirin resistance after coronary artery bypass grafting. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*. 2001;121(5):982-4.
107. Tougeron D, Sha D, Manthravadi S, Sinicrope FA. Aspirin and colorectal cancer: back to the future. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2014;20(5):1087-94.
108. Schrör K, Rauch BH. [Aspirin and prevention of colorectal carcinomas]. *Der Internist*. 2013;54(7):884-91.
109. Kim SE. The benefit-risk consideration in long-term use of alternate-day, low dose aspirin: focus on colorectal cancer prevention. *Annals of gastroenterology : quarterly publication of the Hellenic Society of Gastroenterology*. 2014;27(1):87-8.
110. Talari H, Mesdaghinia E, Abedzadeh Kalahroudi M. Aspirin and preeclampsia prevention in patients with abnormal uterine artery blood flow. *Iranian Red Crescent medical journal*. 2014;16(8):e17175.
111. Bujold E, Morency AM, Roberge S, Lacasse Y, Forest JC, Giguere Y. Acetylsalicylic acid for the prevention of preeclampsia and intra-uterine growth restriction in women with abnormal uterine artery Doppler: a systematic review and meta-analysis. *Journal of obstetrics and gynaecology Canada : JOGC = Journal d'obstetrique et gynecologie du Canada : JOGC*. 2009;31(9):818-26.
112. Bujold E, Roberge S, Lacasse Y, Bureau M, Audibert F, Marcoux S, et al. Prevention of preeclampsia and intrauterine growth restriction with aspirin started in early pregnancy: a meta-analysis. *Obstetrics and gynecology*. 2010;116(2 Pt 1):402-14.
113. Bujold E. Low-dose aspirin reduces morbidity and mortality in pregnant women at high-risk for preeclampsia. *Evidence-based nursing*. 2015;18(3):71.
114. Berk M, Dean O, Drexhage H, McNeil JJ, Moylan S, O'Neil A, et al. Aspirin: a review of its neurobiological properties and therapeutic potential for mental illness. *BMC medicine*. 2013;11:74.
115. Drochioiu G, Tudorachi L, Murariu M. NOSH aspirin may have a protective role in Alzheimer's disease. *Medical hypotheses*. 2015;84(3):262-7.

6. Anhang

Diese Dissertation wurde auf dem Symposium der medRSD am 20.04.2016 präsentiert und erhielt den ersten Preis für das beste Poster.



BESTES POSTER

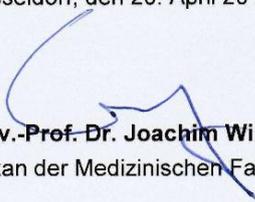
Symposium der medRSD 2016

Frau Carolin Müller

wird für das beste Poster des Symposiums der medRSD 2016 ausgezeichnet.

Der Preis beinhaltet einen Gutschein der Lehmanns Buchhandlung im Wert von 200 €.

Düsseldorf, den 20. April 2016


Univ.-Prof. Dr. Joachim Windolf
Dekan der Medizinischen Fakultät

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich herzlichst bei Herrn Prof. Dr. Hohlfeld für die Bereitstellung des Themas und darüber hinaus für die hervorragende Unterstützung und Betreuung über die gesamte Zeit der Promotion hinweg bedanken.

Ein weiterer Dank gilt Kirsten Bartkowski, die mir bei den experimentellen Untersuchungen im Labor jederzeit zur Seite stand und mich auch im Anschluss beim Schreibprozess immer wieder positiv bekräftigt und bestärkt hat.

Darüber hinaus gilt ein besonderer Dank meiner Familie und meinem Freund, die mich immer wieder motiviert und an mich geglaubt haben.