

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

Klinisch-pharmakologische Untersuchung der Interaktion von  
Metamizol mit low-dose Acetylsalicylsäure an Blutplasma nach  
aortokoronarer Bypassoperation

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

Christof Matthias Dücker

2019

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

gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Thomas Hohlfeld

Zweitgutachter: PD Dr. (HR) Goran Pavlaković, Ph.D.(USA)

Meinen Eltern in Liebe und Dankbarkeit.

# I Zusammenfassung

*Low-dose* Acetylsalicylsäure ist der am häufigsten verschriebene Thrombozytenaggregationshemmer. Es ist bekannt, dass das Analgetikum Metamizol über den Metaboliten Methylaminoantipyrin (MAA) die Thrombozytenaggregationshemmung durch Acetylsalicylsäure (ASS) aufheben kann [1]. Für kardiochirurgische Patienten wurde ein solcher Nachweis bisher jedoch noch nicht erbracht. An vielen Standorten ist eine Komedikation mit ASS und Metamizol daher weiterhin üblich. Durch Kooperation mit dem Universitätsklinikum Heidelberg konnten Plasmaproben ASS- und Metamizol-komedizierter kardiochirurgischer Patienten nach Bypassoperation gewonnen werden. Da Thrombozyten *ex vivo* rasch an Aktivierbarkeit verlieren, musste das Probenmaterial thrombozytenfrei nach Düsseldorf überführt werden. Es konnte eine lichttransmissionsaggregometrische Methodik zur Thrombozytenaggregationstestung in einem Ansatz mit Patientenplasma und Thrombozyten gesunder Probanden etabliert werden. ASS führte hier *in vitro* zu einer vollständigen Aggregationshemmung. Diese Aggregationshemmung wurde durch Zugabe von Patientenplasma mit MAA (unter analgetischer Therapie mit Metamizol), nicht jedoch durch Zugabe von Plasma ohne MAA (keine Metamizolgabe), aufgehoben ( $p < .05$ ). Die Stärke der Thrombozytenaggregation nahm in Abhängigkeit der MAA-Konzentration im Patientenplasma zu. Dies zeigte sich im Gruppenvergleich ( $p < .05$ ) und korrelativ ( $r = .493$ ,  $p < .05$ ). Die Ergebnisse konnten zudem in einer weiteren lichttransmissionsaggregometrischen Testung an zuvor nicht getestetem Probenmaterial repliziert werden ( $p < .05$ ). Durch Verwendung von Thrombozyten nur eines gesunden Probanden konnte die Streuung der Daten reduziert werden, so dass eine noch deutlichere Konzentrations-Wirkungsbeziehung nachweisbar war ( $r = .564$ ,  $p < .05$ ).

Die Interaktion von MAA und ASS konnte darüberhinaus methodenübergreifend durch Bestimmung der thrombozytären Thromboxansynthese (Immunoassay,  $p < .05$ ) und P-Selektinexpression (Durchflusszytometrie,  $p < .05$ ) bestätigt werden.

Während die Interaktion von ASS und Metamizol im kardiochirurgischen Patientengut damit *in vitro* belegt werden konnte, stehen randomisierte klinische Endpunktstudien zur Interaktion von ASS und Metamizol gegenwärtig noch aus.

## II Abstract

Low-dose acetylsalicylic acid is the most commonly prescribed antiplatelet agent. It is known that the analgesic metamizol mitigates the antiplatelet effect of acetylsalicylic acid (ASA) via its metabolite methylaminoantipyrine (MAA). For patients after coronary artery surgery this effect has not been proven though. Therefore, comedication with ASA and metamizol is still frequently used in many hospitals.

In cooperation with the University Hospital of Heidelberg we could obtain plasma samples of patients after coronary bypass surgery. These patients were simultaneously treated with low-dose ASA and metamizol according to routine clinical requirements.

Because platelets cannot be conserved adequately, the samples were depleted from platelets ahead of transport to Dusseldorf. We developed a method for testing the effect of patients' plasma on the aggregation of platelets from healthy volunteers via light transmission aggregometry.

ASA led to a complete inhibition of platelet aggregation in vitro. This inhibition was attenuated or abolished by incubation with patient plasma containing MAA, but not by incubation with MAA free patient samples ( $p < .05$ ). The platelet aggregation increased with higher MAA concentration. This could be shown by group comparison ( $p < .05$ ) as well as by means of correlation ( $r = .493$ ,  $p < .05$ ). In addition, the results were replicated by light transmission aggregometry of samples not tested before, reducing variance of data by use of platelets from only one healthy volunteer and showing an even stronger dose-effect-relationship ( $r = .564$ ,  $p < .05$ ). Finally the mitigating effect of MAA on platelet inhibition by ASA was also shown by assessment of platelet thromboxane formation (immunoassay,  $p < .05$ ) and platelet P-selectin expression (flow-cytometry,  $p < .05$ ).

Whereas our in vitro results clearly demonstrate the interaction of metamizol and low-dose ASA in cardiac surgery, in vivo studies with clinical endpoints are not available yet. In light of our results those studies should definitely be performed.

### III Abkürzungen

AA	Aminoantipyrin
AAA	Acetylaminoantipyrin
ASA	Acetylsalicylic acid (im englischen abstract)
ASS	Acetylsalicylsäure
CD	Cluster of differentiation
CD40-L	Ligand am cluster of differentiation 40
COX	Cyclooxygenase
COX-1	Cyclooxygenase-1
COX-2	Cyclooxygenase-2
CYP2C19	Cytochrome P450 2C19
DDD	Defined daily dose
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked-immunosorbent assay
FAA	Formylaminoantipyrin
HPLC	High performance liquid chromatography
MAA	Methylaminoantipyrin
n	Stichprobengröße
PAP	Plättchenarmes Plasma
PFA	Paraformaldehyd
PRP	Plättchenreiches Plasma
SD	Standard deviation, Standardabweichung
SE	Standard error, Standardfehler
TM	Thrombozytenmedium
TXA <sub>2</sub>	Thromboxan A <sub>2</sub>
TXB <sub>2</sub>	Thromboxan B <sub>2</sub>
UPS	United Parcel Service of America

## IV Inhalt

1	Einleitung.....	1
1.1	Thrombusbildung.....	3
1.2	Verfahren zur Messung der Thrombozytenfunktion.....	7
1.3	Acetylsalicylsäure (ASS).....	11
1.4	Metamizol.....	14
1.5	Interaktionen zwischen Metamizolmetaboliten und Acetylsalicylsäure.....	15
1.6	Zielstellung und geplantes Vorgehen.....	17
2	Allgemeine Methodik.....	19
2.1	Probanden.....	19
2.2	Material.....	19
2.2.1	Substanzen und Lösungen.....	20
2.3	Patientenproben.....	21
2.4	Probandenproben.....	23
2.5	Lichttransmissionsaggregometrie.....	23
2.5.1	Versuchsansätze.....	23
2.5.2	Messung.....	26
2.5.3	Auswertung.....	26
2.5.4	TXB <sub>2</sub> -Messung.....	27
2.6	Methodik der Durchflusszytometrie.....	29
2.6.1	Material.....	29
2.6.2	Durchführung.....	30
2.6.3	Datenerfassung mittels Durchflusszytometrie.....	32
2.7	Hypothesen und statistische Auswertung.....	35
3	Ergebnisse.....	39
3.1	Metamizolmetaboliten aller Patientenproben.....	39
3.1.1	Metamizolmetaboliten in den Patientenproben der exploratorischen Testung.....	39
3.1.2	Metamizolmetaboliten in den Patientenproben der konfirmatorischen Testung.....	40
3.1.3	Metamizolmetaboliten in den Patientenproben der durchflusszytometrischen Testung.....	40
3.2	Ergebnisse aus exploratorischer lichttransmissions-aggregometrischer Messung und TXB <sub>2</sub> -Messung.....	41
3.2.1	Vergleich interagierender und nicht interagierender Probanden.....	46
3.3	Ergebnisse der konfirmatorischen lichttransmissionsaggregometrischen Testung.....	50
3.4	Ergebnisse der durchflusszytometrischen Testung.....	52
4	Diskussion.....	56
4.1	Entwicklung einer Methodik zur Untersuchung von Plasmaproben von Patienten an Thrombozyten gesunder Probanden.....	56
4.2	Nachweis einer in vitro Interaktion von MAA und ASS für kardiochirurgische Patienten.....	57
4.2.1	Mögliche Risiken für kardiochirurgische Patienten.....	60
4.2.2	Prävalenz der Interaktion.....	60
4.3	Etablierung einer Konzentrations-Wirkungs-Beziehung für den Metamizolmetaboliten MAA.....	62
4.4	Limitationen der Befunde.....	63
4.5	Relevanz der Befunde und Ausblick.....	64
5	Anhang.....	67
5.1	Metamizol-Dosierung am OP-Tag und 10 postoperativen Tagen.....	68
5.2	Bezugsquellen der Substanzen.....	69
5.3	Zusammensetzung der Lösungen.....	70
5.4	Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	72
6	Literatur.....	75
	Danksagung.....	81

# 1 Einleitung

Vorarbeiten haben gezeigt, dass Metamizol (z.B. Novalgin®) über den Metaboliten Methylaminoantipyrin (MAA) mit Acetylsalicylsäure (ASS) interagiert. Genauer gesagt kann Metamizol die ASS-vermittelte Thrombozytenaggregationshemmung abschwächen oder aufheben. Hieraus könnten sich Risiken für Patienten ergeben, die eine Schmerzbehandlung mit Metamizol erhalten und gleichzeitig auf eine Thrombozytenaggregationshemmung angewiesen sind. Einige relevante Patientenpopulationen wurden bereits im Hinblick auf potentielle Interaktion von Metamizol und ASS untersucht. So konnte die Interaktion für Patienten mit koronarer Herzkrankheit, Schlaganfall sowie Schmerzpatienten mit begleitender vaskulärer Erkrankung oder nach gefäßchirurgischem Eingriff *in vitro* nachgewiesen werden [2-4]. Ein solcher Nachweis steht hingegen für die hochrelevante Gruppe kardiochirurgischer Patienten noch aus. Wilczynski und Kollegen konnten zwar in einer aktuellen Studie an kardiochirurgischen Patienten keinen signifikanten Effekt postoperativer Metamizolanalgesie auf die thrombozytenaggregationshemmende Wirkung von ASS nachweisen, dieser Befund ist jedoch dadurch zu erklären, dass eine ASS *loading dose* der Metamizolgabe um mindestens sechs Stunden vorausging [5]. Es bleibt also zu hinterfragen, welche Befunde sich unter anderer Applikationspraxis ergeben hätten. Auch die eher niedrigen Besetzungszahlen mit je 20 Patienten in Test- und Kontrollgruppe könnten, wie die Autoren selber anmerken, ebenfalls zu einem fehlenden Effektnachweis beigetragen haben.

Kardiochirurgische Patienten, insbesondere Patienten nach aortokoronarer Bypassoperation, tragen ein hohes Risiko thromboembolischer Komplikationen. In der Vergangenheit wurde die Thrombozytenaggregationshemmung mittels ASS wegen befürchteter Blutungskomplikationen perioperativ oft pausiert [6]. Im Rahmen der *Multicenter Study of Perioperative Ischemia* konnte jedoch gezeigt werden, dass die perioperative ASS-Therapie mit einer signifikanten Reduktion der Mortalität im Rahmen koronarer Bypassoperationen verbunden ist [7]. Mit größter Wahrscheinlichkeit ist hierfür die Thrombozytenaggregationshemmung durch ASS verantwortlich. Passend hierzu wiesen Mangano et al. eine signifikante Reduktion perioperativer Infarktkomplikationen wie Herzinfarkt, Darminfarkt und Apoplex ohne begleitenden Anstieg von

Blutungskomplikationen nach [7]. Auch wenn es sich hierbei um Befunde nicht-interventioneller Studien handelt, spricht die Datenlage, wie auch metaanalytisch bestätigt, für eine perioperative Fortsetzung der ASS-Therapie [8].

Neben der Minderung des perioperativen Herzinfarkttrisikos im Allgemeinen konnte auch ein prophylaktischer Effekt der ASS-Therapie auf die Verschlussraten von Bypassgefäßen im ersten postoperativen Jahr nachgewiesen werden [6, 9, 10]. Nach aortokoronarer Bypassoperation ist die prophylaktische Behandlung mit ASS daher seit langem therapeutischer Standard. Andere Antithrombotika, wie beispielsweise Clopidogrel, werden als Komedikation erwogen. Ein therapeutischer Zusatznutzen ist jedoch nicht sicher bestätigt [11].

Aufgrund der großen Bedeutung von ASS in der Behandlung nach aortokoronarer Bypassoperation ist eine mögliche Wirkbeeinträchtigung beispielsweise durch Arzneimittelinteraktionen von erheblicher klinischer Bedeutung. Da bei postoperativen Patienten Metamizol häufig zur analgetischen Behandlung eingesetzt wird [12], ist eine Komedikation von ASS und Metamizol für kardiochirurgische Patienten nicht unüblich und kommt angesichts der effektiven analgetischen Wirksamkeit in der klinischen Routine sogar relativ häufig vor (vergleiche beispielsweise [13]).

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Untersuchung der *in vitro* Interaktion von ASS und Metamizol bei kardiochirurgischen Patienten. Aufgrund bekannter Nebenwirkungen von Metamizol (z.B. Agranulozytose) und der beschriebenen Möglichkeit der Interaktion von ASS und Metamizol wird in der Klinik für Kardiovaskuläre Chirurgie des Universitätsklinikums Düsseldorf bei Patienten mit erforderlicher Thrombozytenaggregationshemmung die postoperative Analgesie mit anderen Analgetika und nur ausnahmsweise mit Metamizol durchgeführt. Der Verzicht auf die Komedikation von ASS und Metamizol liegt aber im Ermessen der behandelnden Ärzte, da keine gezielten klinischen Endpunktstudien zur Interaktion von ASS und Metamizol vorliegen.

In anderen Kliniken ist die Komedikation mit ASS und Metamizol bei postoperativen kardiochirurgischen Patienten durchaus in der Routine etabliert. Im Rahmen einer Zusammenarbeit mit der Klinik für Herzchirurgie des Universitätsklinikums Heidelberg konnten daher Plasmaproben postoperativ mit Metamizol- und ASS behandelter kardiochirurgischer Patienten für eine *in vitro* Untersuchung der Interaktion von ASS und Metamizol erhalten werden (s. Methodik).

Die *in vitro* Untersuchung der Interaktion von ASS und Metamizol erfolgt für gewöhnlich an thrombozytenreichem Plasma unmittelbar nach Entnahme des Blutes beim Patienten. Grund hierfür ist der rasche Verlust der Aktivierbarkeit von Thrombozyten *ex vivo* nach der Blutentnahme. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde daher ein neuer Versuchsansatz zum Nachweis der Interaktion von ASS und Metamizol etabliert, bei welchem konserviertes Plasma kardiochirurgischer Patienten an tagesaktuell gewonnenen Thrombozyten gesunder Probanden untersucht wurde.

In den nachfolgenden einleitenden Abschnitten soll der wissenschaftliche Hintergrund der vorliegenden Arbeit dargestellt werden. Es sollen zunächst die Vorgänge bei der Thrombusbildung und die Verfahren zur Messung der Thrombozytenaggregation vorgestellt werden. Die nachfolgenden Abschnitte behandeln die Pharmakologie und klinische Bedeutung von ASS und Metamizol sowie den bisherigen Forschungsstand zur Interaktion von ASS und Metamizol.

## 1.1 Thrombusbildung

Arterielle Thrombusbildung ist eine häufige Ursache von Myokardinfarkt, Schlaganfall und peripheren Gefäßverschlüssen. Verfahren zur Erfassung der Thrombozytenfunktion leisten einen wichtigen Beitrag zum Verständnis der Pathophysiologie thromboembolischer Ereignisse.

Die klassische Einteilung von Thromben erfolgt nach makro- und mikroskopischem Erscheinungsbild. Man unterscheidet thrombozytenreiche weiße Thromben von fibrin- und erythrozytenreichen roten Thromben. Weiße Thromben finden sich vornehmlich im arteriellen Gefäßbett, rote Thromben im venösen Gefäßbett. Pathophysiologisch betrachtet führt die primäre Hämostase zur Bildung eines weißen Thrombus, die sekundäre Hämostase zu Bildung eines roten Thrombus. Diese dichotome Betrachtungsweise ist gleichwohl stark vereinfachend und wird dem heutigen Verständnis der pathophysiologischen Vorgänge nicht mehr gerecht [14, 15]. Die pharmakologische Behandlung lässt die klassische Zweiteilung jedoch weiterhin erkennen. Behandlung und Prophylaxe arterieller thrombotischer Ereignisse erfolgt mittels

Thrombozytenaggregationshemmung (ggf. in Kombination mit Antikoagulantien), die Behandlung und Prophylaxe venöser thrombotischer Ereignisse erfolgt mittels Antikoagulation.

Nachfolgend sollen die physiologischen Vorgänge im Rahmen der arteriellen Thrombusbildung genauer dargestellt werden. Arterielle Thrombusbildung wird vor allem durch Gefäßverletzungen initiiert. Diese können traumatisch bedingt sein. Häufiger entstehen Gefäßverletzungen jedoch ohne äußere Einflussnahme. In sklerotisch veränderten Gefäßen kommt es durch Schwankungen des Gefäßkalibers zu vermehrtem Scherstress. Dieser kann die Ruptur sklerotischer Plaques bewirken [16].

Die Thrombusbildung in Folge von Gefäßwandverletzungen erfolgt in drei Schritten: Thrombozytenadhäsion, Thrombozytenaktivierung und Thrombozytenaggregation. Für eine grafische Darstellung sei auf Abbildung 1 verwiesen. Auslöser der Thrombusbildung im Rahmen der Gefäßverletzung ist die vermehrte Freisetzung von von-Willebrand-Faktor aus zerstörten Endothelzellen und die Freilegung der extrazellulären Matrix. Die Thrombozyten binden über den Glykoprotein-1b-Rezeptor an von-Willebrand-Faktor, dieser bindet wiederum an Kollagen und vermittelt so eine vorübergehende Adhäsion der Thrombozyten an die extrazelluläre Matrix. Diese Adhäsion ist instabil. Es kommt daher zu einer Abrollbewegung der Thrombozyten [17, 18]. Die Flussgeschwindigkeit der Thrombozyten wird so verlangsamt [16, 19]. Der thrombozytäre Glykoprotein-VI-Rezeptor ist nun trotz seiner vergleichsweise geringen Affinität in der Lage, in direkter Weise an das Kollagen der extrazellulären Matrix zu binden. Hieraus resultiert eine dauerhafte Thrombozytenadhäsion am Endothel.

Die Bindung thrombozytärer Oberflächenrezeptoren an Kollagen und von-Willebrand-Faktor bewirkt eine Thrombozytenaktivierung [20]. Diese geht mit einem intrazellulären Calciumanstieg einher. Die Thrombozyten nehmen nun sphärische Form an. Zusätzlich kommt es zur Aktivierung von Glykoprotein-IIb/IIIa-Rezeptoren an der Thrombozytenoberfläche [21, 22]. Die Glykoprotein-IIb/IIIa-Rezeptoren binden nun an plasmaständiges Fibrinogen. Fibrinogen bewirkt eine Quervernetzung von Thrombozyten. Es entstehen Thrombozytenaggregate. In den aktivierten Thrombozyten kommt es darüber hinaus zur Freisetzung von P-Selektin aus den  $\alpha$ -Granula. P-Selektin wird an die Oberfläche der Thrombozyten verlagert [23]. Wie P-Selektin wird auch der Ligand an P-

Selektin (CD40-L) in Folge der Aktivierung von Thrombozyten an deren Oberfläche verlagert und kann membranständig exprimiert werden [24]. Durch die Verbindung von P-Selektin und dem P-Selektin-Liganden, steigt die Stabilität der Thrombozytenaggregate [23]. P-Selektin und der P-Selektin-Ligand werden zum Teil auch in löslicher Form sezerniert [24].

Die Aktivierung der Thrombozyten hat über die bereits genannten Effekte hinaus eine Phospholipase-A<sub>2</sub>-vermittelte Abspaltung von Arachidonsäure aus membranständigen Phospholipiden zur Folge. Arachidonsäure wird in das thrombozytäre Zytosol freigesetzt. Über die thrombozytäre Cyclooxygenase-1 erfolgt eine Umsetzung von Arachidonsäure in Prostaglandin-H<sub>2</sub>. Prostaglandin-H<sub>2</sub> wird durch die Thromboxansynthase in Thromboxan A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) umgesetzt. TXA<sub>2</sub> wird von den Thrombozyten freigesetzt und kann an thrombozytäre Thromboxan (TP)-Rezeptoren binden. Diese Bindung bewirkt eine Thrombozytenaktivierung [25]. Es wirkt somit im Sinne einer feedback-Verstärkung. Systemische Effekte von TXA<sub>2</sub> werden durch rasche Hydrolyse zum pharmakologisch unwirksamen Thromboxan B<sub>2</sub> (TXB<sub>2</sub>) unterbunden [26].

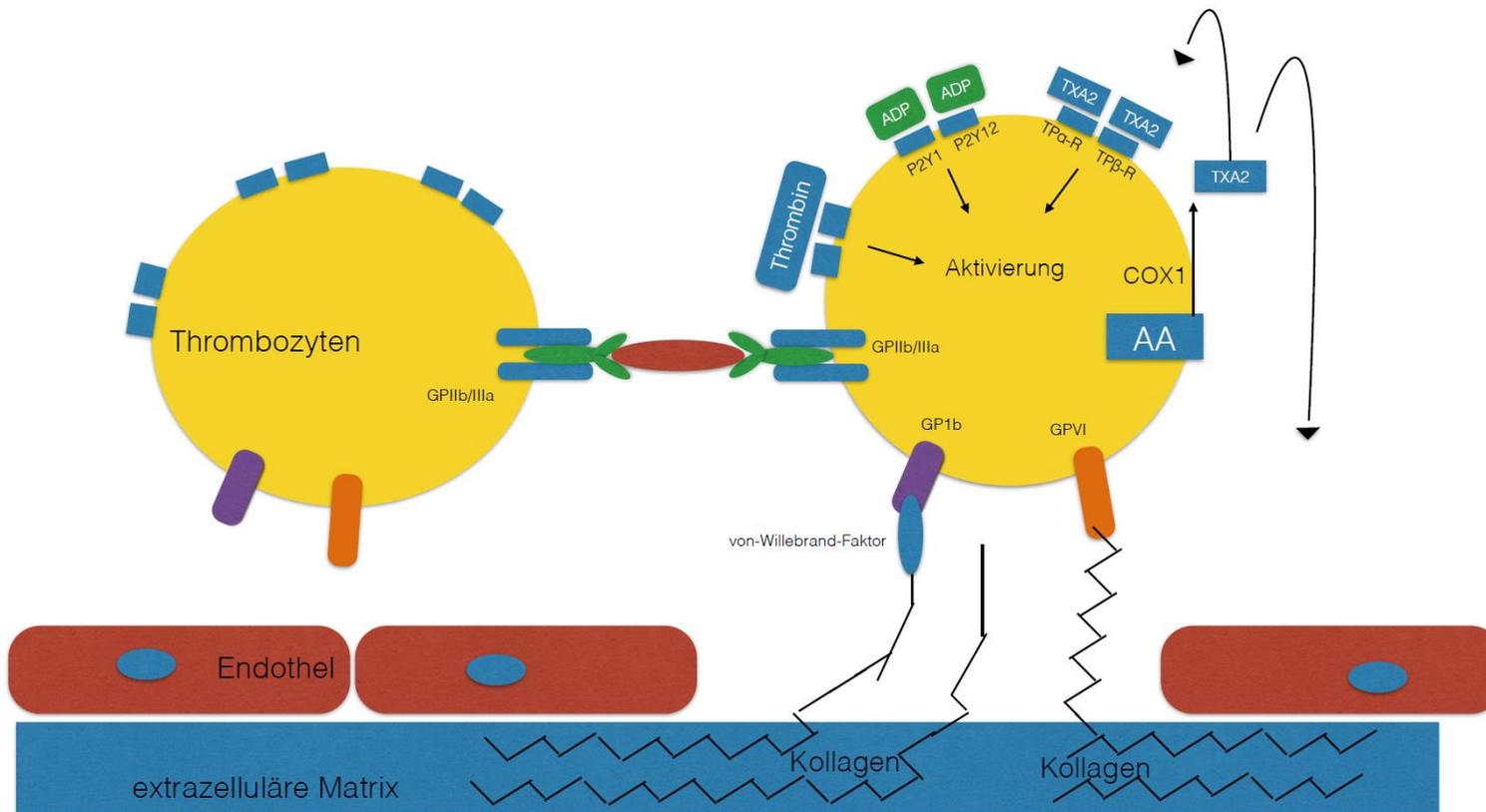


Abb. 1: Darstellung der Thrombozytenadhäsion, -aktivierung und -aggregation (modifiziert nach [27]). GP=Glykoprotein, AA=arachidonic acid, TX=Thromboxan, ADP=Adenosindiphosphat, P wie in P2Y1= Purinorezeptor.

## 1.2 Verfahren zur Messung der Thrombozytenfunktion

Das erste und lange Zeit einzige Verfahren zur Erfassung der Thrombozytenfunktion ist die Bestimmung der Blutungszeit [28, 29]. Erst mit der Einführung der Lichttransmissionsaggregometrie durch Born wurde eine detailliertere Analyse der Thrombozytenfunktion möglich [30]. Neuere Verfahren wie *Impedance whole blood aggregometry*, PFA-100 und ROTEM platelet ermöglichen inzwischen *point of care testing*. Die Lichttransmissionsaggregometrie nach Born hat in Klinik und Forschung jedoch weiterhin einen hohen Stellenwert [28].

Die Lichttransmissionsaggregometrie nach Born wurde 1963 entwickelt [30]. Die Messung erfolgt an plättchenreichem Plasma (PRP), welches durch selektive Zentrifugation aus Citratblut gewonnen wird. Bei Thrombozytenaktivierung und -aggregation kommt es zu einer Veränderung der optischen Dichte des Probenmaterials. Diese Änderung wird in der Lichttransmissionsaggregometrie erfasst. Im Rahmen der Lichttransmissionsaggregometrie wird PRP in einer Messküvette in den Messkanal eines Aggregometers eingebracht. Es erfolgt die Bestimmung der Menge des durch die Küvette transmittierten Lichts. Durch Hinzugabe eines Stimulus kann eine Thrombozytenaggregation herbeigeführt werden. Dies hat eine Änderung der Lichttransmission zur Folge. Die Änderung der Transmission wird durch einen Schreiber erfasst und zeigt einen charakteristischen Verlauf. Nach Zugabe des aggregationsfördernden Stimulus zeigt sich eine Abnahme der Transmission durch Zunahme der optischen Dichte des Probenmaterials. Dies wird durch den sogenannten *Shape-Change* bewirkt [31], die aktivierten Thrombozyten nehmen sphärische Form an.

Auf die Thrombozytenaktivierung folgt die Thrombozytenaggregation. Im Rahmen der Thrombozytenaggregation nimmt die optische Dichte des Probenmaterials ab. Die Geschwindigkeit der Transmissionsänderung spiegelt die Geschwindigkeit der zugrundeliegenden Aggregationsvorgänge wider und lässt sich durch die Steigung des Schreiberausschlages erfassen. Eine charakteristische Aufzeichnung einer Thrombozytenaggregation sowie die erforderlichen Hilfslinien zur Erfassung relevanter Parameter sind in Abbildung 2 a-c dargestellt.

Die Stimulation von Thrombozyten, wie hier im Rahmen der Lichttransmissionsaggregometrie, hat, wie oben ausgeführt, die Freisetzung von TXA<sub>2</sub> zur Folge. Der Metabolit TXB<sub>2</sub> lässt sich nachfolgend aus dem Probenmaterial als Marker für die Stärke der Plättchenaktivierung bestimmen (sog. *'thromboxane formation assay'* [32]).

Die Lichttransmissionsaggregometrie stellt zwar auch den Vorgang der Thrombozytenaktivierung dar, quantifizierbar wird aber vor allem die Thrombozytenaggregation erfasst. Im Gegensatz hierzu lässt sich mittels Durchflusszytometrie insbesondere die Thrombozytenaktivierung quantitativ erfassen. Wie oben im Rahmen der Darstellung der Vorgänge bei Thrombozytenaktivierung und –aggregation bereits erläutert, kommt es in Folge der Thrombozytenaktivierung zur Freisetzung von P-Selektin aus den  $\alpha$ -Granula der Thrombozyten. P-Selektin wird daraufhin an die Oberfläche der Thrombozyten verlagert [23]. Die P-Selektin Expression wiederum kann durchflusszytometrisch quantifiziert werden. Es erfolgt hierbei eine Markierung von P-Selektin mittels fluoreszenzmarkierter Antikörper. Im Rahmen der durchflusszytometrischen Messung können die Fluoreszenzfarbstoffe mittels einer Lichtquelle angeregt werden, bei Rückkehr in den unangeregten Zustand emittieren sie Licht mit charakteristischer Wellenlänge, auf Basis dessen die P-Selektin-Expression dann quantifiziert werden kann [33].

Lichttransmissionsaggregometrie, Thromboxanfreisetzung im Rahmen der Lichttransmissionsaggregometrie und Durchflusszytometrie mit Quantifizierung der P-Selektin-Expression sind in Bezug auf ihre diagnostische, prognostische und therapieleitende Anwendbarkeit gut untersucht und werden gelegentlich auch im klinischen *setting* verwendet [24]. Für P-Selektin und dessen Liganden konnte gezeigt werden, dass sie im Rahmen von thrombotischen Erkrankungen, Gerinnungsstörungen sowie im Rahmen des Koronarsyndroms, aber auch von Autoimmunerkrankten und Tumorerkrankten vermehrt exprimiert werden [24]. Durchflusszytometrie wird darüber hinaus in der Transfusionsmedizin zum Ausschluss vorzeitiger Aktivierung von Thrombozyten eingesetzt [33].

Für die Lichttransmissionsaggregometrie weist nach einer Übersichtsarbeit von Koltai und Kollegen eine größere Zahl von Studien auf eine prognostische Bedeutung gesteigerter Aggregation in der Vorhersage von Stentthrombosen hin. Größere randomisierte Studien

mit Optimierung der Plättchenhemmung auf Basis von Thrombozytenfunktionstests konnten zwar nach Angaben von Koltai keine Vorteile in der gemonitorten Gruppe finden [33], Monitoring erfolgte in diesen Studien allerdings auf Basis des VerifyNow-Verfahrens und nicht auf Basis von Lichttransmissionsaggregometrie [34, 35].

Auch die Messung von TXB<sub>2</sub> bietet sich als Verfahren zum Monitoring der Plättchenhemmung an, eine Messung kann via Erfassung von Thromboxanabbauprodukten ohne vorherige Stimulation erfolgen oder, wie oben ausgeführt, als *thromboxane formation assay* [32, 36]. Wie auch für die Lichttransmissionsaggregometrie liegt die Schwierigkeit bei der Messung von Thromboxan in der Standardisierung und der Festlegung eines *cut-off* Wertes zur Erfassung von Therapieversagen im Rahmen der Plättchenhemmung. Mohring und Kollegen geben jedoch, basierend auf der Korrelation mit Befunden aus der Lichttransmissionsaggregometrie, eine Empfehlung für einen *cut-off* Wert zur klinischen Testung [32]. Die klinischen Ergebnisse hierzu bleiben abzuwarten, das *thromboxane formation assay* gehört jedoch wie die Lichttransmissionsaggregometrie zu den vielversprechenden Kandidaten für das Monitoring der Plättchenhemmung durch ASS.

Änderung der Lichttransmission von plättchenreichem Plasma im Rahmen der Thrombozytenaggregation

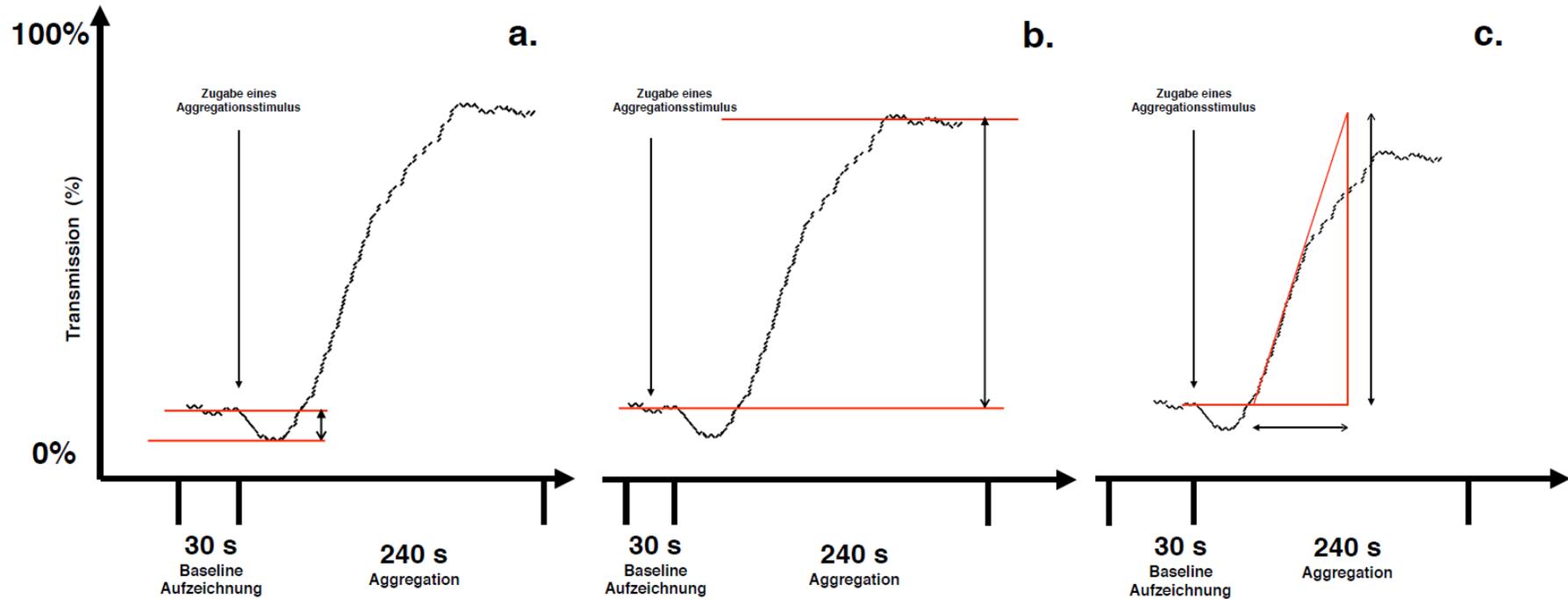


Abb. 2: In a.-c. findet sich die charakteristische Veränderung der Lichttransmission dargestellt. Die schwarzen Registrierungen zeigen die Veränderung der Lichttransmission nach Zugabe eines Aggregationsstimulus. Der Zeitpunkt der Zugabe des Aggregationsstimulus ist durch schwarze Pfeile mit einer Pfeilspitze markiert. Auf der Ordinate ist die Lichttransmission durch die Messküvette in Prozent des emittierten Lichts abgetragen. Die Abszisse gibt die Zeit in Sekunden an. a. Die roten Hilfslinien fassen die Amplitude des *Shape-Change* ein. Der schwarze Doppelpfeil gibt die Amplitude des *Shape-Change* an. b. Die roten Hilfslinien fassen die Amplitude der Aggregation ein. Der schwarze Doppelpfeil gibt die Amplitude der Aggregation an. c. Die roten Hilfslinien dienen der Erfassung der Steigung der Aggregation mittels Steigungsdreieck. Die rote Tangente legt sich der Schreiberlinie an der Stelle stärkster Steigung an. Die schwarzen Doppelpfeile geben die Messungen des Steigungsdreiecks wieder.

## 1.3 Acetylsalicylsäure (ASS)

In ihrer klassischen Indikation bei der Behandlung entzündlicher Schmerzen steht ASS inzwischen in starker Konkurrenz zu anderen Pharmaka mit günstigeren Wirkungs- und Nebenwirkungsprofilen. ASS ist jedoch weiterhin der am häufigsten verschriebene Thrombozytenaggregationshemmer [37]. Als Thrombozytenaggregationshemmer wird ASS zur Akutbehandlung von Infarkten, zur Sekundärprophylaxe atherothrombotischer Ereignisse und zum Erhalt der Durchgängigkeit arterieller, venöser und prothetischer Bypässe eingesetzt [6, 38-41]. Der prophylaktische Nutzen von ASS ist für kardiovaskuläre, zerebrale und peripher arterielle Ereignisse überzeugend belegt [6, 40-45].

ASS wird bereits kurz nach oraler Aufnahme zu ihrem Hauptmetaboliten Salicylsäure deacetyliert [46]. ASS und Salicylsäure liegen mehrheitlich an Plasmaeiweiße gebunden vor, ihre Ausscheidung erfolgt überwiegend renal [47]. Die Wirkung von ASS beruht auf einer irreversiblen Hemmung der Cyclooxygenase (COX). ASS wirkt 166-fach potenter bei der Hemmung des in Thrombozyten prädominanten Isoenzym Cyclooxygenase-1 (COX-1) als bei der Hemmung der vornehmlich entzündungsrelevanten Cyclooxygenase-2 (COX-2) [48-50]. Die unterschiedliche Wirkpotenz von ASS erklärt sich durch Unterschiede in den aktiven Zentren der beiden Isoenzyme [51, 52].

Die COX verfügt als Homodimer über zwei aktive Zentren. ASS wirkt durch Hemmung des aktiven Zentrums, das die Umsetzung von Arachidonsäure zu Prostaglandin  $G_2$  katalysiert [53]. Das durch ASS hemmbare aktive Zentrum der COX liegt am Ende eines hydrophoben Kanals im Inneren des Enzymproteins. ASS blockiert diesen Kanal durch Acetylierung eines Serinrests [54, 55]. Diese Acetylierung ist irreversibel. Da Thrombozyten über keinen Zellkern verfügen, können keine weiteren COX-Enzyme synthetisiert werden, die ASS-Wirkung ist folglich irreversibel. Es kann kein Prostaglandin- $G_2$  mehr gebildet werden. Dem zweiten aktiven Zentrum der COX, das die Umwandlung von Prostaglandin  $G_2$  in Prostaglandin  $H_2$  katalysiert, steht kein Substrat mehr zur Verfügung [53]. Auch der Thromboxansynthese steht dann kein Prostaglandin  $H_2$  zur Umwandlung in  $TXA_2$  zur Verfügung. Die feedback-Verstärkung der Thrombozytenaggregation durch  $TXA_2$  entfällt. In Abhängigkeit der Zahl gehemmter

Thrombozyten folgt also eine thrombozytäre Aggregationshemmung, die erst durch Synthese neuer Thrombozyten im Knochenmark wieder abklingt.

Unzureichende Hemmung der Thrombozytenaggregation unter ASS wurde als „Aspirinresistenz“ bezeichnet [27]. Diese Bezeichnung ist jedoch unpräzise. Die Bezeichnung pharmakologischer *Nonresponse* ist vorzuziehen und gegenüber klinischer Aspirin-*Nonresponse* abzugrenzen. Klinische ASS-*Nonresponse* ist hierbei als das Auftreten thromboembolischer Komplikationen trotz low-dose ASS-Therapie definiert. Pharmakologische *Nonresponse* ist dann von klinischer Relevanz, wenn sie eine Vorhersage klinischer *Nonresponse* erlaubt. Auf Basis der pharmakologischen *Nonresponse* könnte ggf. eine Therapieanpassung erfolgen, bevor es zu thromboembolischen Komplikationen bei dem Patienten/der Patientin kommt. Wie bereits weiter oben diskutiert, sprechen einige Befunde für eine prognostische Anwendbarkeit, die Befundlage unterscheidet sich jedoch je nach verwendetem Verfahren zur Bestimmung pharmakologischer *Nonresponse* und gewähltem *cut-off* Kriterium zur Definition einer pharmakologischen *Nonresponse* [33].

Mögliche Ursachen einer pharmakologischen *Nonresponse* sind Tachyphylaxie, gesteigerte TXA<sub>2</sub>-Produktion im Rahmen von Entzündungen, Polymorphismen der COX-1, vermehrte Aktivität von Effluxtransportern von ASS und gesteigerter esterasevermittelter ASS-Metabolismus [27, 39]. Darüber hinaus können auch Arzneimittelinteraktionen zu pharmakologischer (und auch klinischer) ASS-*Nonresponse* führen. Für eine Reihe von Nichtopioid-Analgetika wurde eine pharmakodynamische Interaktion mit ASS beschrieben. Dies betrifft zum Beispiel die nichtsteroidalen Antirheumatika Ibuprofen, Indometacin, Thiaprofensäure, Naproxen, Nimesulid, Oxaprozin, Flufenaminsäure, Piroxicam und Celecoxib [56, 57]. Ursache der Interaktionen ist möglicherweise die Bindung dieser Pharmaka an die COX mittels Wasserstoffbrücken [56]. Diese verhindert die Acetylierung der COX-1 durch ASS und somit die ASS-induzierte irreversible Thrombozytenaggregationshemmung. Zwar hemmen die genannten nichtsteroidalen Antirheumatika die COX in hohen Konzentrationen ihrerseits, diese Hemmung ist jedoch reversibel [56]. Auch für Metamizol, genauer für den Metamizolmetaboliten Methylaminoantipyrin (MAA) ist eine Interaktion mit ASS nachweisbar [2, 3, 56].

Entwicklung der Verordnung nicht opioider Analgetika

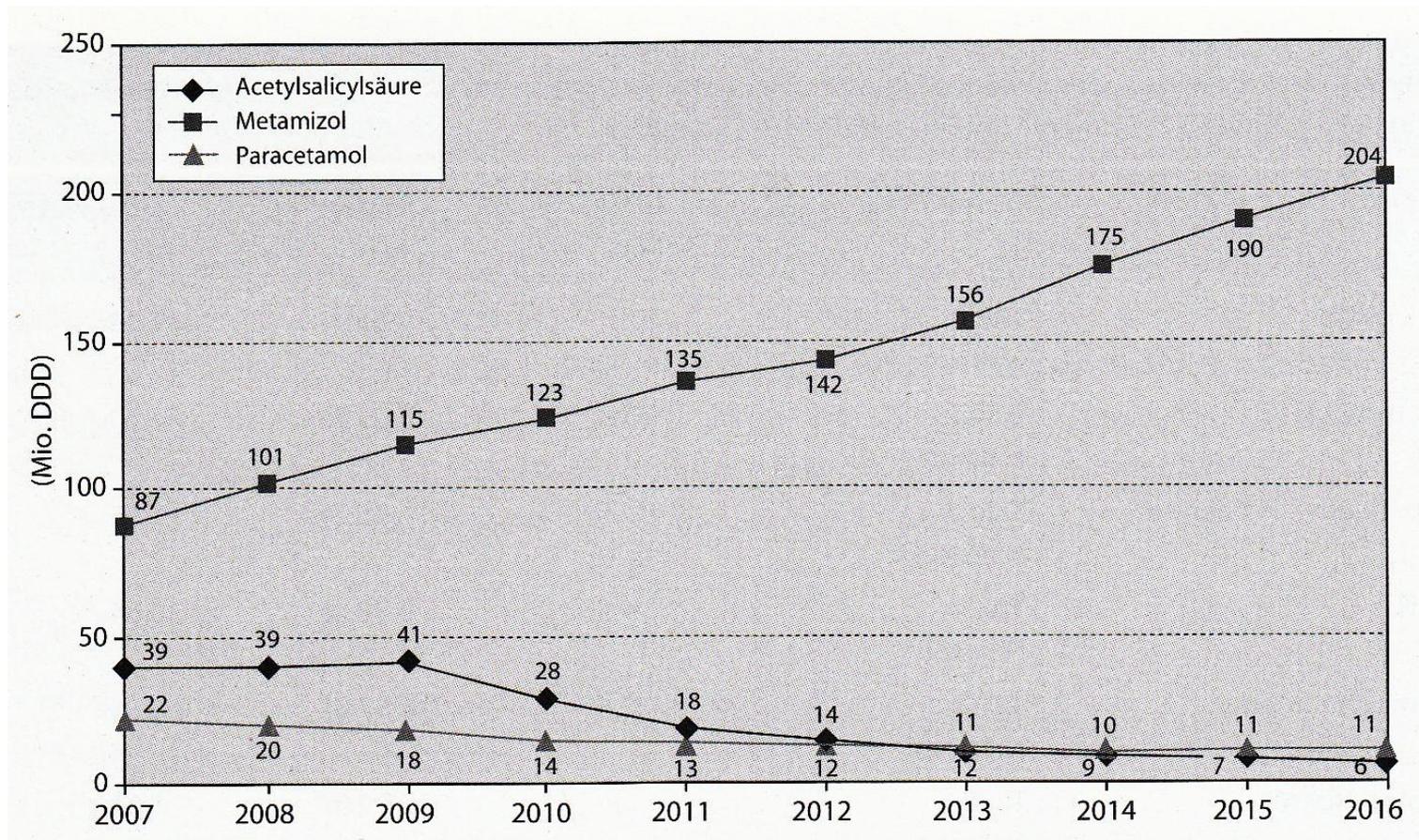


Abb. 3: Verordnungen von nichtopioiden Analgetika 2007 bis 2016. Gesamtverordnungen nach definierten Tagesdosen, aus [58]. DDD=Defined daily doses.

## 1.4 Metamizol

Metamizol zählt zur Gruppe nicht-opioider Analgetika. Zu den Anwendungsgebieten gehören akute und chronische Schmerzzustände, insbesondere Koliken und Tumorschmerzen. Schwerpunkt der Wirksamkeitsstudien und zentrales Indikationsgebiet von Metamizol ist jedoch die Behandlung postoperativer Schmerzen [12]. Auch für Metamizol ist eine Interaktion mit ASS nachweisbar [2, 3, 56]. Die Interaktion von Metamizol, genauer seinem Metaboliten MAA und ASS, ist von großer Relevanz, da eine Komedikation mit *low-dose* ASS häufig ist.

Eine Zulassung von Metamizol für die Anwendung am Menschen besteht innereuropäisch in Deutschland, Polen, Spanien und Russland, darüber hinaus in Teilen Asiens und Amerikas. In einigen Ländern wurde die Zulassung wegen des Agranulozytoserisikos zurückgezogen. Hierunter fallen die USA, Schweden, Großbritannien, Iran, Japan und Australien [59, 60]. In Deutschland verzeichnet Metamizol steigende Verordnungszahlen, siehe auch Abbildung 3. Von 2005 bis 2014 kam es zu einem 2,6-fachen Anstieg der Gesamtverordnungen nach definierten Tagesdosen. Metamizol lag 2014 auf Platz 20 der Medikamente mit den höchsten Nettokosten für die gesetzlichen Krankenkassen [37]. Metamizol kann oral, aber auch intravenös als Kurzinfusion verabreicht werden. Es wird nach intravenöser Gabe binnen 15 Minuten, nach oraler Gabe bereits im Verdauungstrakt und vor Erreichen des portalvenösen und systemischen Kreislaufs zu 4-Methylaminoantipyrin (MAA) hydrolysiert [59]. Die Halbwertszeit von MAA liegt bei 2,6-3,5 Stunden [61]. MAA wird zu Formylaminoantipyrin (FAA) oder Aminoantipyrin (AA) umgesetzt. Während FAA einen Endmetaboliten darstellt, kann AA durch Acetylierung in Acetylaminoantipyrin (AAA) verstoffwechselt werden. Da große interindividuelle Unterschiede bei der Acetylierungsgeschwindigkeit bestehen, ist das Verhältnis von AA und AAA variabel [61]. Die Plasmaproteinbindung der Metamizolmetabolite beträgt 57,6% für MAA, 47,9% für AA, 17,8% für FAA und 14,2% für AAA [61].

MAA und AA sind pharmakologisch wirksam. FAA und AAA verfügen über eine deutlich geringere pharmakologische Potenz [61]. Metamizol wirkt spasmolytisch, antipyretisch und analgetisch. Der spasmolytische Effekt von Metamizol beruht auf der Hemmung der

Inositoltriphosphatbildung [62]. Die antipyretische Wirkung von Metamizol wird mit einer zentralen Hemmung der Prostaglandinsynthese erklärt [63]. Der zentrale Mechanismus der analgetischen Wirkung ist umstritten. Eine analgetische Wirkung über das endogene Opioidsystem [64] wird ebenso diskutiert wie ein Wirkweg über metabotrope Glutamatrezeptoren [65]. Die Annahme, die analgetische Wirkung von Metamizol beruhe auf einem peripheren antientzündlichen Effekt, wird stark in Zweifel gezogen [60, 66].

## 1.5 Interaktionen zwischen Metamizolmetaboliten und Acetylsalicylsäure

Die Interaktion von ASS und MAA ist *in vitro* mittels Lichttransmissionsaggregometrie und PFA-100 für gesunde Probanden gut belegt [1-3, 57]. Für Schlaganfall-Patienten konnten Hinweise für ein besseres neurologisches Outcome ASS-monotherapierter gegenüber ASS- und Metamizol-komedizierten Patienten erbracht werden [3]. Prospektive Beobachtungsdaten zeigen zudem einen Zusammenhang zwischen ASS-Metamizol-Komedikation und ischämischen Ereignissen sowie Mortalität [67].

Unterschiedliche Mechanismen werden für die Interaktion von MAA und ASS diskutiert [1, 68]. *In silico* docking Studien zeigen, dass MAA über seinen lipophilen Phenylring und durch seine Methylreste den Substratkanal des ersten aktiven Zentrums der COX ausfüllt. Die Carbonylgruppe von MAA liegt in unmittelbarer Nähe des Serin 530 der COX. ASS kann daher an dieser Position keine Acetylierung vornehmen [1]. Für eine grafische Darstellung der sterischen Hemmung sei auf Abbildung 4 verwiesen.

Strukturmodell eines Monomers der Cyclooxygenase-1 mit Bindung von MAA

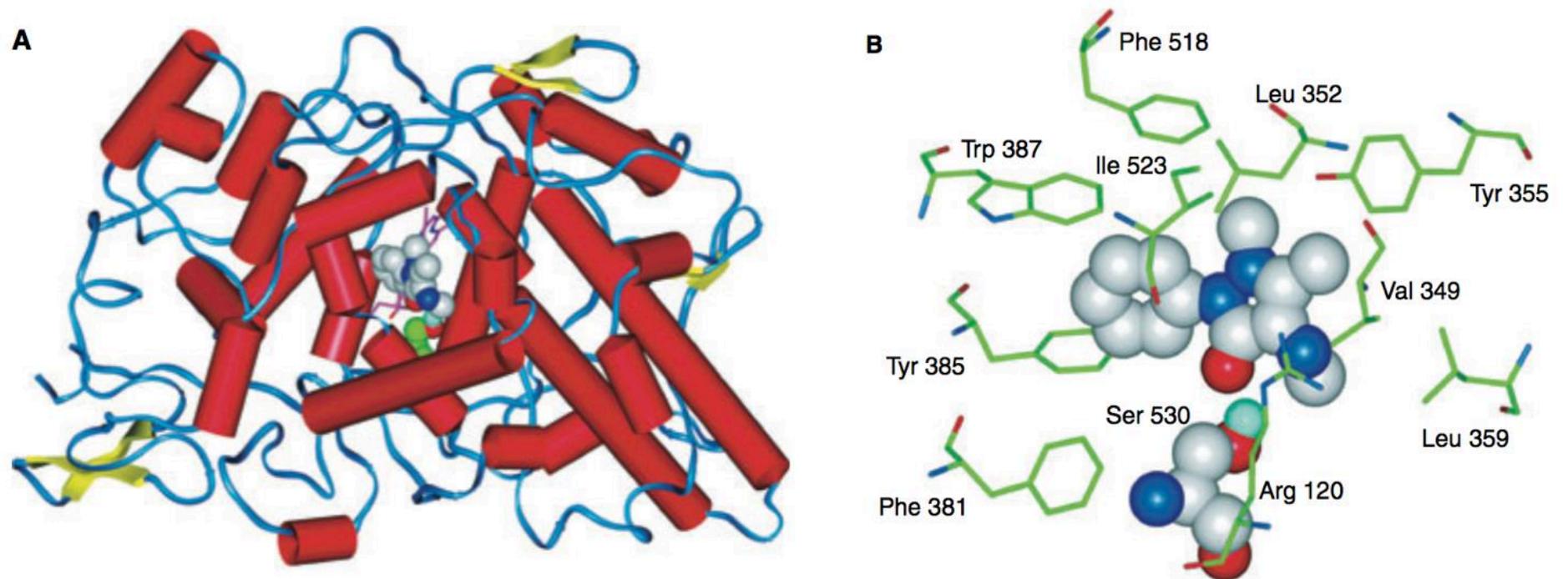


Abb. 4: Strukturmodell eines Monomers der Cyclooxygenase-1. A. Im Bereich des hydrophoben Kanals befindet sich MAA. Die Alpha-Helices sind rot, die Beta-Stränge gelb und die Peptidhauptkette blau dargestellt. B: Weiter vergrößerte Detaildarstellung der Bindung von MAA. Die Aminosäuren im Bereich der Bindung sind grün dargestellt. MAA und *Serin 530* sind als Kalottenmodell abgebildet. Kohlenstoffatome sind weiß, Wasserstoffatome von MAA blau und Sauerstoffatome rot dargestellt. Der Wasserstoff des *Serin 530*, der an der Wasserstoffbrückenbindung zur Carbonyl-Gruppe des MAA beteiligt ist, findet sich türkis dargestellt, aus [1]. Arg=Arginin, Ile=Isoleucin, Leu=Leucin, Phe=Phenylalanin, Ser=Serin, Trp=Tryptophan, Tyr=Tyrosin, Val=Valin.

Im lichttransmissionsaggregometrischen Versuch lässt sich zeigen, dass die MAA-induzierte Hemmung der Wirkung von ASS bereits in niedrigen Konzentrationsbereichen von 3  $\mu$ M MAA auftritt. Die Halbwertszeit von MAA liegt bei 2.6-3.5 h [61]. Die Wirkung einer low-dose ASS-Gabe könnte folglich negativ durch eine Metamizol-Gabe beeinflusst werden, wenn die Metamizol-Gabe der ASS-Gabe vorausging. Auch die gleichzeitige Gabe von ASS und Metamizol über den Zeitraum einer Woche kann die ASS-induzierte Plättchenhemmung aufheben [69]. Dies ist deshalb zu erwarten, weil die Halbwertszeit von ASS mit ca. 15 Minuten deutlich kürzer ist als die Halbwertszeit von Metamizol. Die Metamizol-Hemmung thrombozytärer COX-1 über dauert also die Zeit, über die ASS im Plasma für die Acetylierung des Enzyms zur Verfügung steht [54, 70]. Erfolgt die Komedikation von ASS und Metamizol jedoch um 30 Minuten zeitversetzt, so ist die ASS-induzierte Aggregationshemmung wirksam, wenn ASS vor Metamizol verabreicht wird, nicht jedoch bei umgekehrter Einnahmereinfolge [69].

## 1.6 Zielstellung und geplantes Vorgehen

Wie einleitend dargestellt, soll in der vorliegenden Arbeit der Nachweis einer Interaktion von MAA aus Plasmaproben kardiochirurgischer Patienten und ASS an Thrombozyten gesunder Spender erbracht werden. Drei Ziele sollen hierfür verfolgt werden:

1. Es soll eine Methodik etabliert werden, die die Untersuchung von Plasmaproben von Patienten an Thrombozyten gesunder Probanden erlaubt.
2. Es soll der Nachweis einer Interaktion von Metamizol mit ASS in der hoch relevanten Population kardiochirurgischer Patienten *in vitro* erbracht werden und die Frage geklärt werden: Könnte Metamizol die Thrombozytenaggregationshemmung durch ASS verhindern?
3. Es soll eine Konzentrations-Wirkungs-Beziehung für den Metamizolmetaboliten MAA und die Aufhebung ASS-induzierter Plättchenhemmung erarbeitet werden.

Durch Kooperation mit der Klinik für Herzchirurgie des Universitätsklinikums Heidelberg (Prof. Dr. med N. Zimmermann) konnten 242 venöse Vollblutproben von 84 kardiochirurgischen mit Metamizol behandelten Patienten erhalten werden, um hieran die Sensitivität von Thrombozyten gegenüber ASS zu untersuchen, indem Patientenplasma mit

definierten Konzentrationen von ASS exponiert wird. Als „*Read-out*“ für die Interaktion von Metamizol und ASS sollen Thrombozyten gesunder Probanden eingesetzt werden.

Die Messungen sollen zunächst im Rahmen einer exploratorischen Testung an Thrombozyten eines Kollektivs gesunder Probanden geeignete Versuchsbedingungen für einen Interaktionsnachweis etablieren und eine initiale Aussage zur Interaktion zwischen Metamizol und ASS liefern.

Im Rahmen einer konfirmatorischen Testung an Thrombozyten eines *einzig* gesunden Probanden soll in einem zweiten Schritt die ggf. beobachtete Interaktion nachfolgend bestätigt werden. Durch Beschränkung auf nur einen Thrombozytenspender ist eine deutliche Reduktion der Varianz der Daten zu erwarten. Hierdurch sollte der eindeutigere Nachweis einer klaren Konzentrations-Wirkungsbeziehung ermöglicht werden.

Zur weiteren Validierung der Befunde soll neben dem Interaktionsnachweis mittels Lichttransmissionsaggregometrie ein zusätzlicher Interaktionsnachweis mittels durchflusszytometrischer Untersuchung der thrombozytären P-Selektinexpression und *Enzymimmunoassay* zum Nachweis der thrombozytären Thromboxansynthese erbracht werden.

## 2 Allgemeine Methodik

### 2.1 Probanden

Das Protokoll der vorliegenden Studie steht im Einklang mit der Deklaration von Helsinki und wurde durch die Ethikkommissionen der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf und Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg zustimmend bewertet (Studiennummer 5749R, Registrierungs-ID 2016116013, positives Votum der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf; Zeichen S-197/2014, positives Votum der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg). Die Patienten und Probanden wurden vorab über Zweck der Studie, Risiken bei Teilnahme und ihr Recht auf Widerruf der Teilnahme aufgeklärt und ihre schriftliche Einwilligung eingeholt.

Ausschlusskriterien für Patienten waren bekannte Störungen der Thrombozytenfunktion. Ausschlusskriterien für Probanden waren bekannte Störungen der Thrombozytenfunktion, Einnahme von ASS oder Metamizol binnen der letzten sieben Tage, Behandlung mit nicht-steroidalen Antirheumatika innerhalb der letzten zwei Tage sowie Behandlung mit Thrombozytenaggregationshemmern oder Antikoagulantien. Die exploratorische lichttransmissionsaggregometrische Testreihe erfolgte an Thrombozyten von sieben gesunden Probandinnen und vier gesunden Probanden.

Die konfirmatorische lichttransmissionsaggregometrische Testreihe erfolgte an Thrombozyten eines gesunden Probanden. Die durchflusszytometrische Testung erfolgte an Thrombozyten von je zwei gesunden Probandinnen und Probanden.

### 2.2 Material

Genauere Angaben zu den Bezugsquellen der Substanzen inklusive Bestellnummern finden sich unter 5.2 im Anhang, genauere Angaben über Verdünnungsverhältnisse und Zusammensetzungen der Lösungen finden sich unter 5.3 im Anhang, weitergehende Angaben zu den verwendeten Geräten, insbesondere zur verwendeten *high performance liquid chromatography*-Anlage (HPLC-Anlage) finden sich unter 5.4 im Anhang.

## 2.2.1 Substanzen und Lösungen

Im folgenden werden die im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten Substanzen und Lösungen genauer eingeführt. Materialien, die ausschließlich im Thromboxanassay und in der Durchflusszytometrie eingesetzt wurden, werden in Abschnitt 2.5.4 und 2.6.1 eingeführt.

### **Pufferlösungen**

Das Thrombozytenmedium, im Folgenden TM-Puffer genannt und der Trishydroxymethylaminomethanpuffer, im Folgenden Tris-Puffer genannt, wurden entsprechend den Angaben unter 5.3 im Anhang hergestellt. Nach Herstellung wurden sie bei 4-8°C gelagert.

### **Aggregationsstimulus**

Arachidonsäure (Oxford Biomedical Research, Rochester Hills, Michigan, USA) wurde als Stammlösung 100 mM in Ethanol erworben und bei -20°C unter Stickstoffatmosphäre gelagert. Die Stammlösung wurde nach Zugabe von 100 µl 100mM alkoholischer Natriumhydroxid-Lösung unter N<sub>2</sub> eingedampft. Das Salz wurde in 200 µl Tris-Puffer zur Erzeugung einer 5 mM Lösung gelöst und im Versuchsansatz 1:5 zu einer Konzentration von 1 mM verdünnt.

### **Acetylsalicylsäure**

ASS (Bayer, Leverkusen, Deutschland) wurde als wasserlösliches Lysinsalz (0.5 g ASS in 1 g Aspisol) erworben, bei 4-8 °C gelagert und vor Verwendung im Verhältnis 1.8 mg/1 ml in TM-Puffer zur Erzeugung einer 5 mM ASS-Stammlösung in Lösung gebracht. Durch Zugabe von TM-Puffer wurde nachfolgend eine 150 µM ASS-Lösung erzeugt und im Versuchsansatz 1:5 zu einer Konzentration von 30 µM verdünnt.

### **Indometacin**

Indometacin (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) wurde als in Ethanol lösliches Salz erworben. Die Lagerung erfolgte trocken und bei Raumtemperatur. Vor Verwendung wurde Indometacin im Verhältnis 18 mg/1 ml in Ethanol (Merck Millipore, Billerica, Massachusetts, USA) gelöst. Im Versuchsansatz ergab sich durch weitere Verdünnung eine Endkonzentration von 10 mM.

### **Ethylendiamintetraessigsäure**

Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) wurde als Ethylendinitrilotetraessigsäuredinatriumsalz-Dihydrat Titriplex III bezogen (Merck Millipore, Billerica, Massachusetts, USA) und in Milli-Q zur Erzeugung einer 77 mM Konzentration gelöst. Die Lagerung des Salzes und der Lösung erfolgte bei Raumtemperatur.

### **Methylaminoantipyrin**

Methylaminoantipyrin wurde freundlicherweise von Herrn Professor Dr. H. Weber (Institut für Pharmazeutische Chemie der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät, HHU Düsseldorf) aus eigener Synthese zur Verfügung gestellt und als 10 mM Stammlösung in Dimethylsulfoxid (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) bei 4-8°C gelagert.

## **2.3 Patientenproben**

Alle Patientenproben entstammen dem kardiochirurgischen Patientengut der Klinik für Herzchirurgie des Universitätsklinikums Heidelberg. Es wurden 242 Plasmaproben von 83 kardiochirurgischen Patienten (21 Frauen) nach Bypassoperation gewonnen. Bei vier Patienten erfolgte die Operation als *off-pump coronary artery bypass grafting*. Das mittlere Patientenalter lag bei 68.3 Jahren (*range* 37- 88 Jahre). Es erfolgten pro Patient insgesamt maximal drei venöse Vollblutentnahmen. Die Blutentnahmen erfolgten um 7:30 Uhr morgens. Die erste Entnahme erfolgte am ersten bis dritten postoperativen Tag, die zweite Entnahme erfolgte am vierten bis sechsten postoperativen Tag, die dritte Entnahme erfolgte am siebten bis zehnten postoperativen Tag. Das Vollblut wurde im Anschluss an jede Entnahme durch selektive Zentrifugation bei 1700 g für 10 Minuten in thrombozytenarmes Plasma umgesetzt, in der Folge als PAP, plättchenarmes Plasma bezeichnet. Nach Zentrifugation wurden die Proben bei -20 °C gelagert. Die Überführung nach Düsseldorf erfolgte via UPS unter Kühlung mittels Trockeneis.

Alle Patienten erhielten entsprechend der klinischen Routinebehandlung eine analgetische Therapie mit Metamizol, eine low-dose Therapie mit ASS (100 mg per os) und eine effektive Heparin-Therapie. Die vorliegende Studie beeinflusste die medikamentöse Behandlung nicht. Die Metamizol-Gabe erfolgte entweder intravenös um 6 Uhr, 14 Uhr

und 24 Uhr oder oral um 8 Uhr, 13 Uhr und 24 Uhr. Die Dosierung variierte je nach Bedarf des Patienten zwischen 0 und 4 g Metamizol pro Tag. Eine Darstellung der applizierten Dosierungen für den Tag der Operation und zehn postoperative Tage findet sich im Anhang unter 5.1.

Die *low-dose* ASS-Gabe erfolgte um 13 Uhr. Bei zwölf Patienten wurde eine duale Antiplättchentherapie durchgeführt, bei neun Patienten mit ASS und Clopidogrel, bei acht Patienten mit ASS und Ticagrelor. Eine weitergehende gerinnungswirksame Behandlung wurde bei acht Patienten eingesetzt, zwei Patienten erhielten Prothrombinkomplexkonzentrat und Fibrinogen, ein Patient Prothrombinkonzentrat und Fibrinogen, zwei Patienten Faktor XIII, ein Patient erhielt Phenprocumon.

Die Konzentrationsmessungen der Metamizolmetabolite im Patientenplasma erfolgten per HPLC-Messung (Säule: EC 125/4 Nucleodur C18 Pyramid, 3 µm; Pumpe: L 6200 Intelligent Pump; UV-Detektor: LaChrom UV-VIS Detektor L7420, Merck Hitachi, für weitergehende Angaben siehe auch im Anhang unter 5.4) am Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf. Bestimmt wurden die freien Konzentrationen von Methylaminoantipyrin (MAA), Aminoantipyrin (AA) und Acetylaminoantipyrin (AAA). Zur Vorbereitung des Probenmaterials für die HPLC-Messung freier Metamizolmetabolitkonzentrationen erfolgte eine Ultrafiltration mittels Nanosep 3K Omega (Pall Corporations, Port Washington, New York, USA) durch Zentrifugation über 1-2 Stunden mit 10000 rpm bei 20°C in einer Zentrifuge vom Typ Mikro 200R (Hettich, Mülheim an der Ruhr, Deutschland). Bei einigen Proben kam es im Rahmen der HPLC-Messungen zu Überlagerungen, so dass bei unklarer *Peakidentifizierung* einzelne Messwerte verworfen werden mussten. Hieraus ergeben sich in späteren statistischen Analysen minimal unterschiedliche Stichprobengrößen. Auf eine Messung von Formylaminoantipyrin (FAA) wurde verzichtet, da die Konzentrationen unterhalb der Nachweisgrenze der uns zur Verfügung stehenden HPLC-Geräte lagen. Für MAA als zentralen Metaboliten der Interaktion mit ASS wurde die Reversibilität der Proteinbindung im Vorfeld weiterer Untersuchungen nachgewiesen.

## 2.4 Probandenproben

Die Blutentnahmen bei den gesunden Probanden erfolgten mittels Vacutainer Safety-Lok *Butterflies* (Beckton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA) wahlweise in *Vacutainer* plus Citratröhrchen (Beckton Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA ) oder Spritzen mit Acid-Citrat-Dextrose-Stabilisator (Verdünnung Blut zu Citrat jeweils 1:10). Die Durchmischung von Vollblut und Citrat wurde während der Abnahme durch leichtes Kippen des Behältnisses gefördert. Die bei Probanden jeweils entnommenen Vollblutmengen lagen zwischen 20 und 40 ml.

Im Anschluss an die Entnahme erfolgte eine Zentrifugation des Vollblutes mit 270 g für zehn Minuten. Alle Zentrifugationsschritte erfolgten bei 25°C mit einer Zentrifuge vom Typ Minifuge RF (Heraeus, Hanau, Deutschland). Nach Zentrifugation wurde plättchenreiches Plasma (PRP) als Überstand gewonnen. Alle Pipettierarbeiten erfolgten mit Pipetten vom Typ Pipetman classic (Gilson, Middleton, Wisconsin, USA). Nach Gewinnung des Überstandes erfolgte eine Zentrifugation der Restmenge mit 1700 g für zehn Minuten. Nach Zentrifugation wurde plättchenarmes Plasma (PAP) als Überstand gewonnen. Die verbliebenen erythrozytenreichen Restmengen wurden verworfen.

## 2.5 Lichttransmissionsaggregometrie

### 2.5.1 Versuchsansätze

Zu Beginn einer Versuchsreihe wurde eine der vorliegenden Menge Probanden-PRP entsprechende Anzahl Patientenproben der Kühlung entnommen und mittels eines Heizblocks vom Typ Thermomomixer 5436 (Firma Eppendorf, Hamburg, Deutschland) bei 23 °C erwärmt. Die weitere Lagerung bis zur Versuchsdurchführung erfolgte auf Eis. Die Aggregation erfolgte turbidimetrisch unter Verwendung eines Aggregometers vom Typ APACT (Labor, Hamburg, Deutschland) mit zwei Messkanälen. Die Aufzeichnung erfolgte mit einem XY-Schreiber vom Typ Packard model 621 (Packard Instrument Company, später Packard BioScience, jetzt PerkinElmer, Waltham, Massachusetts, USA). Die Eichung des Schreibers wurde für jeden Probanden mittels PRP und PAP vorgenommen. Die PRP –Eichung erfolgte mit 360 µl Probanden-PRP, 40 µl Probanden-

PAP und 100 µl TM-Puffer. Die PAP-Eichung erfolgte mit 400 µl Probanden-PAP und 100 µl TM-Puffer.

Im Anschluss an die Kalibration des XY-Schreibers wurde die Aggregationsfähigkeit des Probanden-PRP überprüft. Hierfür erfolgte eine Aggregationstestung mit 100 µl reinen TM-Puffers, 40 µl Probanden-PAP und 360 µl des Probanden-PRP. Diese Bedingung wird im Folgenden als Aggregationskontrolle bezeichnet. Im Anschluss an den Nachweis der Aggregationsfähigkeit erfolgte eine Testung der Hemmbarkeit der Aggregation mittels ASS. Hierfür erfolgte eine Aggregationstestung mit 100 µl 150 µM ASS-Lösung, 40 µl Probanden-PAP und 360 µl Probanden-PRP. Dieser Versuchsansatz wird im Folgenden als Hemmungskontrolle bezeichnet. Eine Fortsetzung der Versuchsreihe mit Patientenproben erfolgte bei einer Amplitude des Schreiberauschlages größer 5 cm in der Aggregationskontrolle und einer Amplitude des Schreiberauschlages von 0 cm in der Hemmungskontrolle.

Die Testung der Patientenproben erfolgte mittels zweier Ansätze: Ein Ansatz mit 100 µl TM-Puffer, 40 µl Patienten-PAP und 360 µl Probanden-PRP, im Folgenden als Aggregationsbedingung bezeichnet und ein Ansatz mit 100 µl 150 µM ASS-Lösung, 40 µl Patienten-PAP und 360 µl Probanden-PRP, im Folgenden als Interaktionsbedingung bezeichnet. Eine Darstellung der Zusammensetzung von Eichproben, Aggregations-, Hemmungskontrolle, Aggregations- und Interaktionsbedingung findet sich in Abbildung 5.

Die gewählten Verdünnungsverhältnisse von Patienten-PAP in Probanden-PRP ergaben sich aus Vorversuchen mit Probanden-PAP und Probanden-PRP. Bei Verdünnungen von 1:3 und 1:7 Probanden-PAP zu Probanden-PRP waren als Folge der deutlich reduzierten Thrombozytenzahl keine beziehungsweise nur sehr schwache Aggregationen nachweisbar. Erst bei Mischungen im Verhältnis 1:10 Probanden-PAP zu Probanden-PRP bestand verlässliche Aggregationsfähigkeit.

Übersicht über die Versuchsansätze im Rahmen der Lichttransmissionsaggregometrie, einschließlich Kontrollen

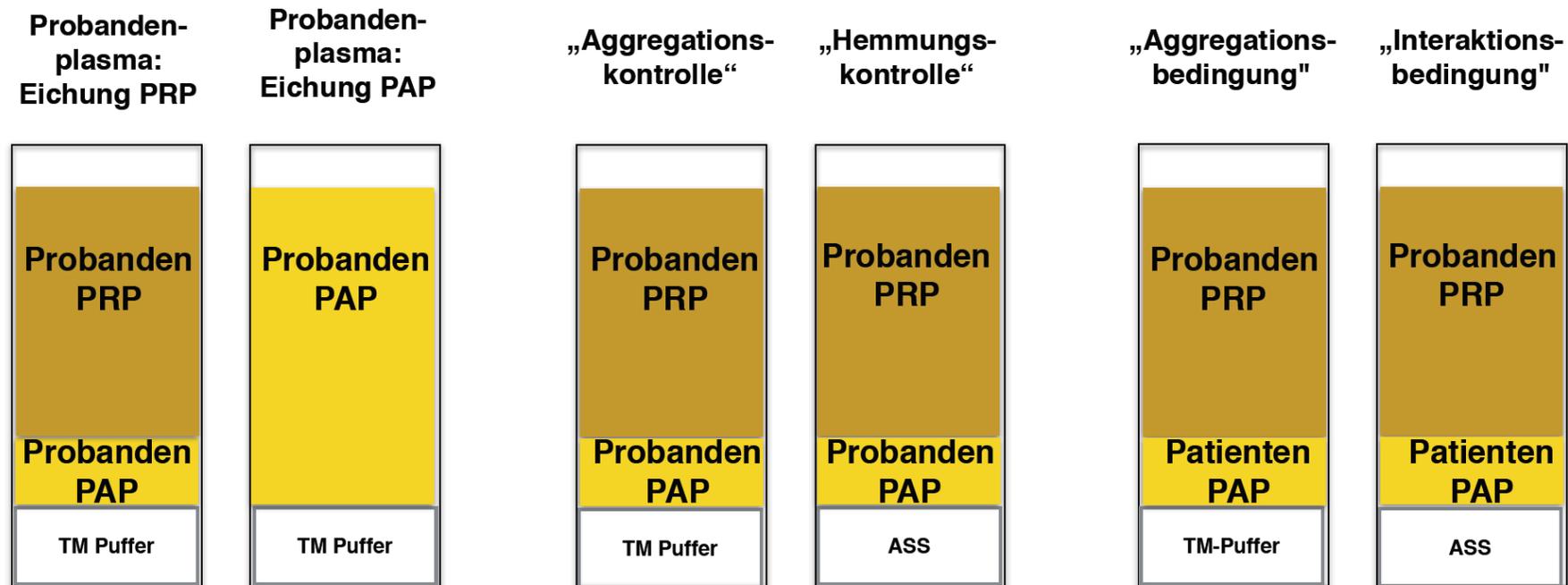


Abb. 5: Dargestellt sind die in den Küvetten der Lichttransmissionsaggregometrie erzeugten Ansätze für die Eichung des Aggregometers und für die Messungen im Rahmen der Versuchsreihen. Die Darstellung der unterschiedlichen Substanzen in den Küvetten entspricht von unten nach oben der Reihenfolge der durchgeführten Pipettiervorgänge. PRP=Plättchenreiches Plasma, PAP=Plättchenarmes Plasma, ASS=Acetylsalicylsäure, TM=Thrombozytenmedium.

## 2.5.2 Messung

Nach Abschluss der Pipettierarbeiten durch Zugabe des PRP in den Probenansatz wurden die Messküvetten in die Messvorrichtung des Aggregometers eingebracht. Nach 10-sekündiger magnetgestützter Durchmischung im Messkanal wurden die Proben in den Heizblock des Aggregometers überführt und über vier Minuten auf 36.3°C erwärmt. Es folgte die Überführung der Proben in den Messkanal. Nach zwei Minuten wurde die Aggregation durch Zugaben von 10 µl 50 mM Lösung von Arachidonsäure in Tris-Puffer stimuliert. 30 Sekunden vor Stimulation wurde der Vorschub des Schreibers zwecks Erfassung einer *baseline* gestartet. Vier Minuten nach Stimulation wurde die Aggregation mit 30 µl 77 mM Lösung von EDTA in Milli-Q und 7 µl 50 mM Lösung von Indometacin in Ethanol beendet. Der Inhalt der Messküvetten wurde in 1.5 ml Eppendorf-Cups überführt und mit einer Zentrifuge vom Typ Centrifuge 5415 (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) 4 Minuten lang bei 13200 Umdrehungen/min zentrifugiert. 0.5 ml des Überstandes wurden in ein 0.5 ml Eppendorf-Cup überführt und für die spätere Thromboxanmessung bei -20 °C gelagert.

## 2.5.3 Auswertung

Die Quantifizierung der Aggregation erfolgte durch Erfassung von Steigung und Amplitude des Schreiberausschlages nach Stimulation der Probe. Die maximale Aggregation wurde unmittelbar abgelesen. Nur wenn die Amplitude der Aggregation Werte größer 0 cm erreichte, wurde eine Auswertung der Steigung der Aggregation vorgenommen. Eine exemplarische Darstellung des Vorgehens zur Erfassung von Steigung und Amplitude mit den erforderlichen Hilfslinien findet sich in Abbildung 2. Die Steigung des Schreiberausschlages wurde als primäres Maß zur Auswertung der Lichttransmissionsaggregometrie gewählt.

Für den Fall, dass bei einigen Probanden keine Interaktion von ASS und MAA nachweisbar sei, wurden explorative Vergleiche interagierender und nicht interagierender Probanden vorgesehen. Als „interagierender Proband“ wurde ein Proband definiert, wenn in Gegenwart von ASS und MAA in mindestens zwei Aggregationen eine Steigung von größer 0 cm/min nachweisbar war.

Die Auswertungen des Effektes der MAA-Konzentration auf die Aggregation unter ASS sollte auf Basis logarithmierter MAA-Konzentrationen erfolgen. Durch Addition von 1 zu den MAA-Konzentrationen vor Berechnung des Logarithmus wurden auch Konzentrationen von 0  $\mu$ M MAA in die Auswertung eingeschlossen.

## 2.5.4 TXB<sub>2</sub>-Messung

Die eingefrorenen Überstände der Proben aus der lichttransmissionsaggregometrischen Testung wurden nach Abschluss der Versuchsreihen auf ihre TXB<sub>2</sub> Konzentration untersucht. Eine Erfassung von TXA<sub>2</sub> ist nicht sinnvoll, da TXA<sub>2</sub> unmittelbar in TXB<sub>2</sub> umgesetzt wird. Die Messung von TXB<sub>2</sub> wurde als *enzyme-linked immunosorbent assay* mit Hilfe eines Thromboxane B<sub>2</sub> *ELISA Kit* (501020, Cayman Chemical Company, Ann Arbor, USA) durchgeführt. Es handelt sich um ein kompetitives Acetylcholinesterase-basiertes Assay. Die Messung erfolgt hierbei wie nachfolgend beschrieben: TXB<sub>2</sub>-haltiges PAP-Probenmaterial und ein TXB<sub>2</sub>-Acetylcholinesterase-Konjugat werden zusammen mit einem vom Kaninchen stammenden Antiserum gegen TXB<sub>2</sub> auf Platten mit murinem Immunglobulin G mit Bindungsfähigkeit für das Antiserum gegeben. In einem Waschschrift mit einer Pufferlösung werden alle nicht durch Bindung am murinen Immunglobulin fixierten Substanzen von der Platte entfernt. Nach Zugabe von Ellmans Reagenz, bestehend aus Acetylthiocholin und 5,5'-dithiobis-2-Nitrobenzoesäure, katalysiert Acetylcholinesterase die Hydrolyse von Acetylthiocholin zu Thiocholin. Thiocholin reagiert mit 5,5'-dithiobis-2-Nitrobenzoesäure unter Freisetzung von 2-Nitro-5-Thiobenzoat. 2-Nitro-5-Thiobenzoat verfügt über eine starke Absorption bei 412nm. Die Absorption ist positiv mit der Acetylcholinesterase-Konzentration korreliert.

Messung von TXB<sub>2</sub> durch ein *enzyme-linked immunosorbent assay*

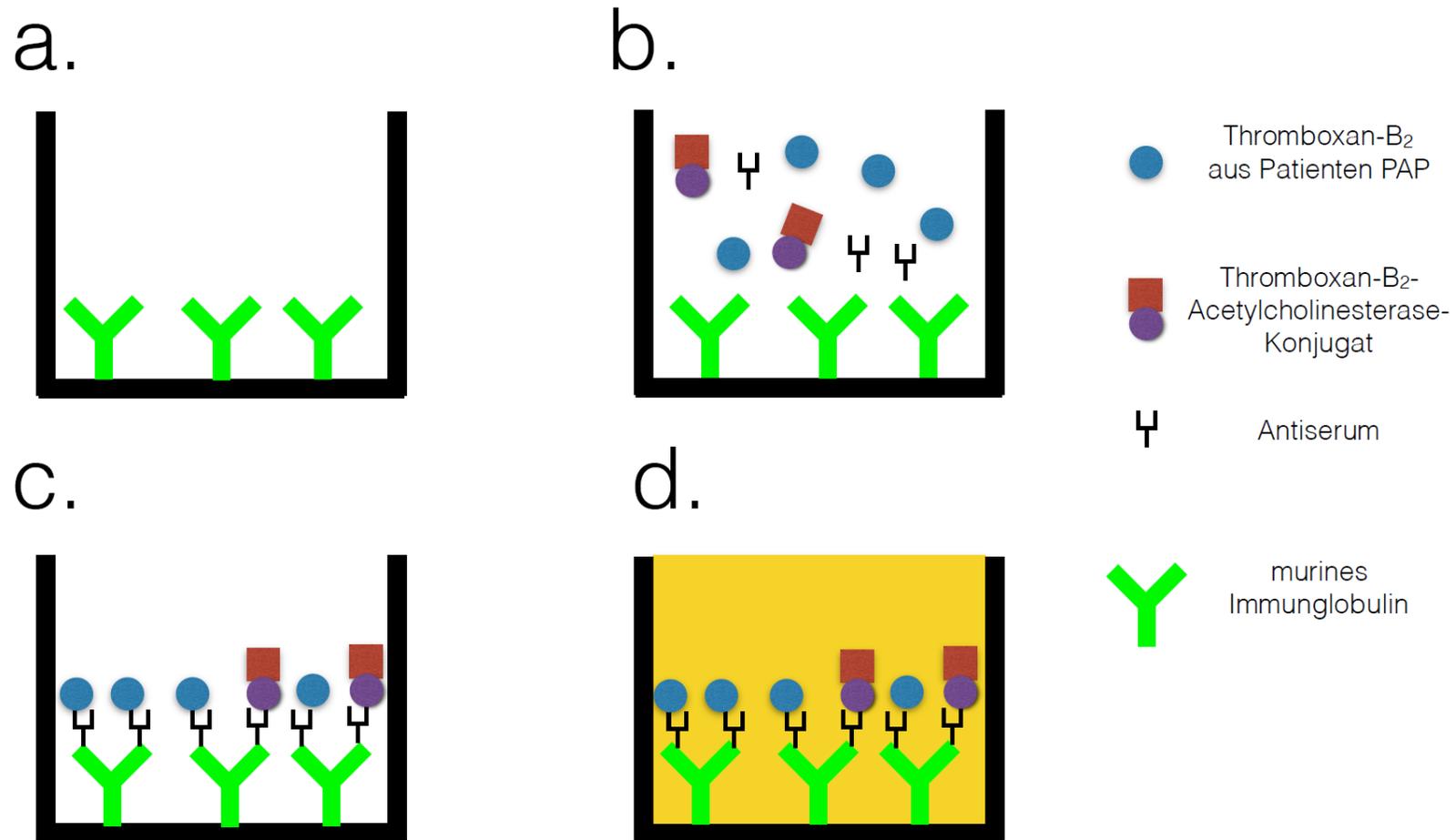


Abb. 6: Schematische Darstellung der Durchführung des TXB<sub>2</sub> *enzyme-linked immunosorbent assay*. Die Darstellung entspricht der Illustration im kit booklet des Herstellers.

- An Platten fixiertes gegen Kaninchenantiserum gerichtetes murines Immunglobulin G.
- Zugabe von PAP mit enthaltenem freien TXB<sub>2</sub>, Zugabe von TXB<sub>2</sub>-Acetylcholinesterase-Konjugat und Zugabe von Kaninchenantiserum.
- TXB<sub>2</sub> oder TXB<sub>2</sub>-Acetylcholinesterase-Konjugat binden an Kaninchenantiserum. Kaninchenantiserum bindet an murines Immunglobulin. Durch einen Waschschrift liegen keine ungebundenen Substanzen mehr vor.
- Nach Zugabe von Ellmans Reagenz verändert sich die Absorption. Der Grad der Absorption steigt in Abhängigkeit der via Antiserum am murinen Immunglobulin gebundenen TXB<sub>2</sub>-Acetylcholinesterase-Konjugate.

Da das unmarkierte TXB<sub>2</sub> der Patientenproben mit dem TXB<sub>2</sub> -Acetylcholinesterase-Konjugat um die Bindung durch das Kaninchenantiserum und nachfolgend um die Bindung am murinen Immunglobulin konkurriert, verhält sich die Acetylcholinesterase-Konzentration auf der Platte nach dem Waschschrift invers zur TXB<sub>2</sub> -Konzentration in der Probe. Aus einer hohen TXB<sub>2</sub> -Konzentration folgt daher eine verminderte Lichtabsorption. Mit Hilfe von Eichkurven kann die TXB<sub>2</sub>-Konzentration in der Probe ermittelt werden. Für eine grafische Darstellung der Bindungsmuster im Rahmen des *Assays* sei auf Abbildung 6 verwiesen.

Da durch Lieferengpässe des Herstellers nur eine begrenzte Anzahl von TXB<sub>2</sub> -*Testkits* zur Verfügung stand, erfolgte die Testung an einer Zufallstichprobe von je 12 Proben aus 5 MAA -Konzentrationsbereichen. Als Konzentrationsbereiche wurden MAA-Konzentrationen von 0 µM, 0-1 µM MAA, 1-3 µM MAA, 3-10 µM MAA und größer 10 µM MAA gewählt.

## 2.6 Methodik der Durchflusszytometrie

### 2.6.1 Material

Die zur Durchflusszytometrie verwendeten Substanzen und Lösungen entsprechen jenen der lichttransmissionsaggregometrischen Testung. Zusätzlich wurden Tirofiban (Iroko Cardio, jetzt Correvio International Sàrl, Genf, Schweiz), ein Glykoprotein-IIb/IIIa-Antagonist zur Hemmung der Thrombozytenaggregation, Phykoerythrin-konjugierter CD62P-Antikörper (Beckman Coulter; Brea, Kalifornien, USA) zur Markierung von P-Selektin, Phykoerythrin-konjugierte IgG1(Mouse)-Antikörper (Beckman Coulter; Brea, Kalifornien, USA) als Isotypenkontrolle und Phykoerythrin-markierte CD41-Antikörper (Beckman Coulter; Brea, Kalifornien, USA) zur Markierung von Thrombozyten eingesetzt. Die Durchflusszytometriemessung erfolgte an einem Zytometer Guava easyCyte5 (Merck Millipore, Billerica, Massachusetts, USA). Das Gerät wurde versuchstäglich mittels der herstellereigenen *beads* kalibriert.

## 2.6.2 Durchführung

Die Ansätze für die Durchflusszytometrie entsprachen in den Konzentrationsverhältnissen den Ansätzen für die Lichttransmissionsaggregometrie.

Im Folgenden werden zunächst die Ansätze der Kontrollbedingungen dargestellt, eine Illustration findet sich in Abbildung 7: In einem Ansatz 1 wurden zunächst 90  $\mu\text{l}$  PRP gesunder Probanden, 10  $\mu\text{l}$  PAP gesunder Probanden, 1  $\mu\text{l}$  verdünntes Tirofiban (Verdünnung von Tirofiban 1:10 in  $\text{H}_2\text{O}$ ) und 1  $\mu\text{l}$  TM-Puffer oder 1  $\mu\text{l}$  ASS-Lösung in TM-Puffer für 10 Minuten bei 37 °C in einem Eppendorf-Thermomixer inkubiert. Nach der Inkubation wurden je 20  $\mu\text{l}$  von Ansatz 1 (20  $\mu\text{l}$  des Ansatzes 1 mit ASS-Lösung in TM-Puffer und 20  $\mu\text{l}$  des Ansatzes 1 mit reinem TM-Puffer) mit 5 mM Arachidonsäurelösung in Tris-Puffer stimuliert (stimulierte Bedingungen). In Kontrollen hierzu wurden je 20  $\mu\text{l}$  von Ansatz 1 (20  $\mu\text{l}$  des Ansatzes 1 mit ASS-Lösung in TM-Puffer und 20  $\mu\text{l}$  des Ansatzes 1 mit reinem TM-Puffer) mit reinem Tris-Puffer verdünnt (unstimulierte Bedingungen). Somit lagen nun in Ansatz 2 folgende Bedingungen vor: Die ASS-haltige Arachidonsäure-stimulierte Bedingung, die ASS-haltige unstimulierte Bedingung, die ASS-freie Arachidonsäure-stimulierte Bedingung und die ASS-freie unstimulierte Bedingung.

Sämtliche Bedingungen aus Ansatz 2 wurden für 10 Minuten bei 37 °C im Eppendorf-Thermomixer inkubiert. Fünf  $\mu\text{l}$  jeder Bedingung wurden zur Erzeugung des Ansatzes 3 nachfolgend mit 1  $\mu\text{l}$  Phykoerithrin-konjugiertem CD62-Antikörper erneut für 10 Minuten bei 37 °C im Eppendorf-Thermomixer inkubiert. Zusätzlich wurden zwei weitere ASS-freie unstimulierte Probenansätze mit CD41-Antikörpern oder IgG1(Mouse)-Antikörpern anstelle von CD62-Antikörper inkubiert. In Ansatz 3 lagen also folgende Bedingungen vor: Die ASS-haltige Arachidonsäure-stimulierte und CD62-markierte Bedingung, im Folgenden stimulierte Hemmungskontrolle genannt, die ASS-haltige unstimulierte und CD62-markierte Bedingung, im Folgenden unstimulierte Hemmungskontrolle genannt, die ASS-freie Arachidonsäure-stimulierte und CD62-markierte Bedingung, im Folgenden stimulierte Aktivierungskontrolle genannt und die ASS-freie unstimulierte und CD62-markierte Bedingung, im Folgenden unstimulierte Aktivierungskontrolle genannt. Die ASS-freie unstimulierte und CD41-markierte Bedingung, im Folgenden CD41-Kontrolle

genannt, dient dem Nachweis, dass tatsächlich Thrombozyten erfasst werden. Die ASS-freie unstimulierte und IgG1(Mouse)-markierte Bedingung, im Folgenden Isotypenkontrolle genannt, dient der Kontrolle unspezifischer Bindungen.

Im Anschluss an die Inkubation wurde allen Bedingungen 1  $\mu$ l PFA 4% zur Fixation und 1.5ml Isoton hinzugegeben. Der hierdurch erzeugte Ansatz 4 wurde mit Hilfe einer Pipette durchmischt und unmittelbar darauf durchflusszytometrisch untersucht.

Neben den Kontrollbedingungen wurden die nachfolgend dargestellten Testbedingungen erzeugt, eine Illustration findet sich in Abbildung 8: In einem Ansatz 1 wurden zunächst 90  $\mu$ l PRP gesunder Probanden, 10  $\mu$ l Patienten-PAP, 1  $\mu$ l verdünntes Tirofiban (Verdünnung von Tirofiban 1:10 in H<sub>2</sub>O) und 1  $\mu$ l TM-Puffer oder 1  $\mu$ l ASS-Lösung in TM-Puffer für 10 Minuten bei 37 °C in einem Eppendorf-Thermomixer inkubiert. Das hinzugefügte Patienten-PAP unterschied sich im Hinblick auf die enthaltene MAA-Konzentration, so dass vier Konzentrationsbedingungen vorlagen: Eine Bedingung mit 0  $\mu$ M MAA, eine Bedingung niedriger MAA-Konzentration (Patientenproben mit 1-10  $\mu$ M MAA), eine Bedingung mittlerer MAA-Konzentration (Patientenproben mit 40-60  $\mu$ M MAA) und eine Bedingung hoher MAA-Konzentration (Patientenproben mit MAA-Konzentrationen von 100  $\mu$ M und mehr). Nach der Inkubation wurden je 20  $\mu$ l von Ansatz 1 (20  $\mu$ l des Ansatzes 1 mit ASS-Lösung in TM-Puffer und 20  $\mu$ l des Ansatzes 1 mit reinem TM-Puffer) mit 5 mM Arachidonsäurelösung in Tris-Puffer stimuliert (stimulierte Bedingungen). In Kontrollen hierzu wurden je 20  $\mu$ l von Ansatz 1 (20  $\mu$ l des Ansatzes 1 mit ASS-Lösung in TM-Puffer und 20  $\mu$ l des Ansatzes 1 mit reinem TM-Puffer) mit reinem Tris-Puffer verdünnt (unstimulierte Bedingungen).

Somit lagen nun in Ansatz 2 folgenden Bedingungen vor: Die ASS-haltige Arachidonsäure-stimulierte Bedingung für 0  $\mu$ M MAA, für niedrige, mittlere und hohe MAA-Konzentrationen, die ASS-haltige unstimulierte Bedingung für 0  $\mu$ M MAA, für niedrige, mittlere und hohe MAA-Konzentrationen, die ASS-freie Arachidonsäure-stimulierte Bedingung für 0  $\mu$ M MAA, für niedrige, mittlere und hohe MAA-Konzentrationen und die ASS-freie unstimulierte Bedingung für 0  $\mu$ M MAA, für niedrige, mittlere und hohe MAA-Konzentrationen. Die ASS-haltige Arachidonsäure-stimulierte Testbedingung wird im Folgenden stimulierte Interaktionsbedingung genannt, die ASS-haltige unstimulierte Bedingung wird im Folgenden unstimulierte Interaktionsbedingung,

die ASS-freie Arachidonsäure-stimulierte Testbedingung wird im Folgenden stimulierte Aktivierungsbedingung genannt, die ASS-freie unstimulierte Bedingung wird im Folgenden unstimulierte Aktivierungsbedingung genannt.

Sämtliche Bedingungen aus Ansatz 2 wurden für 10 Minuten bei 37 °C in einem Eppendorf-Thermomixer inkubiert. Fünf µl jeder Bedingung wurden zur Erzeugung des Ansatzes 3 nachfolgend mit 1 µl Phykoerithrin-konjugiertem CD62-Antikörper erneut für 10 Minuten bei 37 °C im Eppendorf-Thermomixer inkubiert. Im Anschluss an die Inkubation wurde allen Bedingungen 1 µl PFA 4% zur Fixation und 1,5ml Isoton hinzugegeben. Der hierdurch erzeugte Ansatz 4 wurde mit Hilfe einer Pipette durchmischt und unmittelbar darauf durchflusszytometrisch untersucht.

### 2.6.3 Datenerfassung mittels Durchflusszytometrie

Im Rahmen jeder Testung erfolgte zunächst ein *gating* auf Basis der CD41-Kontrolle, zur Sicherstellung der Erfassung von Thrombozyten. Innerhalb des gates wurde nur jene Fluoreszenzintensität erfasst, die die unspezifische Fluoreszenzintensität der Isotypenkontrolle überstieg. Durch Vergleich einer stimulierten CD61-markierten Aktivierungskontrolle mit einer stimulierten Isotypenkontrolle wurde zusätzlich nachgewiesen, dass die Zunahme der CD61-Expression durch Stimulation der Probe nicht auf einer Zunahme unspezifischer Bindung beruht.

Die Messungen erfolgten auf Basis des logarithmisch verstärkten gelben Fluoreszenzkanals. Als Parameter der statistischen Analyse wurde der prozentuale Anteil aktivierter Thrombozyten über die Expression von CD62 erfasst.

### Kontrollbedingungen in der Durchflusszytometrie

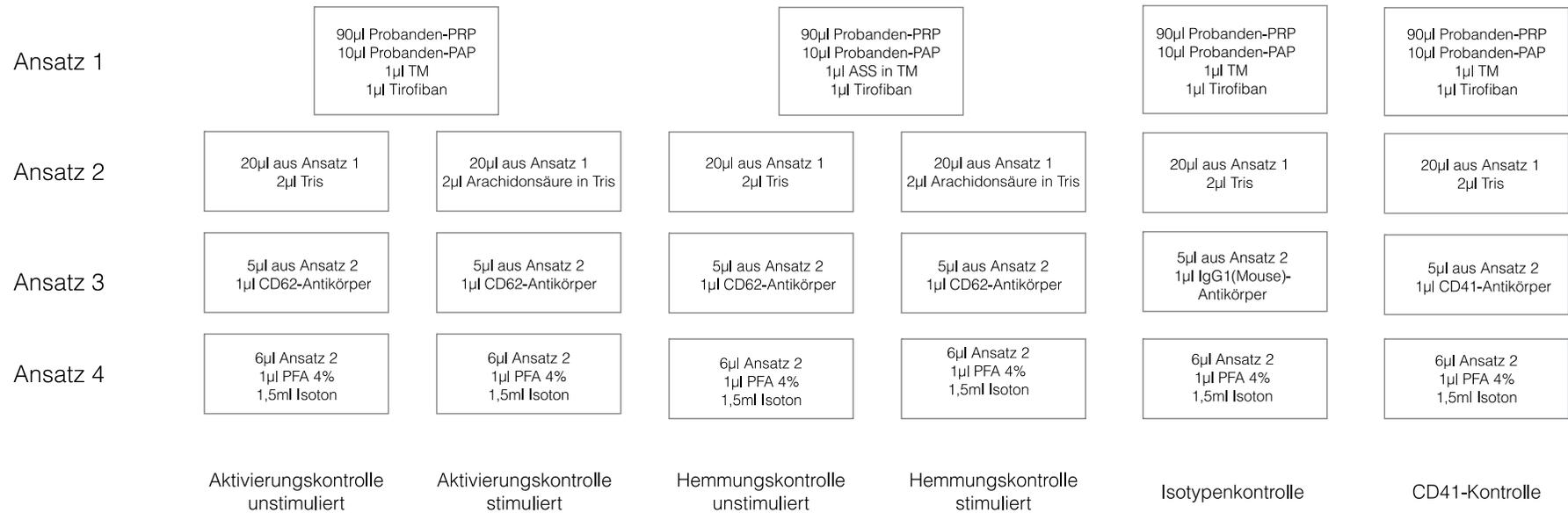


Abb. 7: Dargestellt sind die Durchführungsschritte zur Erzeugung der Versuchsansätze in unstimulierter (Zugabe von Tris-Puffer) und stimulierter (Zugabe von Arachidonsäure in Tris-Puffer) Aktivierungs- (Probanden-PAP, kein ASS) beziehungsweise Hemmungskontrolle (Probanden-PAP mit ASS) sowie zur Erzeugung der Versuchsansätze für Isotypenkontrolle und CD41-Kontrolle. PRP=Plättchenreiches Plasma, PAP=Plättchenarmes Plasma, ASS=Acetylsalicylsäure, TM=Thrombozytenmedium, Tris=Trispuffer, CD=cluster of differentiation.

## Versuchsbedingungen in der Durchflusszytometrie



Durchführung für die Bedingungen:  
 MAA = 0µM  
 niedrige MAA-Konzentration  
 mittlere MAA-Konzentration  
 hohe MAA-Konzentration

Abb. 8: Dargestellt sind die Durchführungsschritte zur Erzeugung der Versuchsansätze in unstimulierter (Zugabe von Tris-Puffer) und stimulierter (Zugabe von Arachidonsäure in Tris-Puffer) Aktivierungs- (Patienten-PAP, kein ASS) beziehungsweise Interaktionsbedingung (Patienten-PAP mit ASS). Sämtliche dargestellten Ansätze wurden für alle vier Bedingungen unterschiedlicher MAA-Konzentrationen erzeugt: MAA-Konzentrationen von 0 µM, niedrige MAA-Konzentrationen, mittlere MAA-Konzentrationen und hohe MAA-Konzentrationen. PRP=Plättchenreiches Plasma, PAP=Plättchenarmes Plasma, ASS=Acetylsalicylsäure, TM=Thrombozytenmedium, Tris=Trispuffer, CD=*cluster of differentiation*.

## 2.7 Hypothesen und statistische Auswertung

Im folgenden sollen die zentralen Hypothesen und die für die statistische Testung vorgesehenen Verfahren genannt werden. Ein Übersichtsschema zur grundlegenden Studienkonzeption, den zentralen Gruppenvergleichen und regressionsanalytischen Verfahren findet sich in Abbildung 9.

Entsprechend der Annahme, dass MAA-haltiges Patientenplasma die ASS-induzierte Aggregationshemmung der Thrombozyten gesunder Probanden aufhebt, ist folgendes Befundmuster zu erwarten:

1. Eine Thrombozytenaggregation unter ASS bei Zugabe von MAA-haltigem Patienten-PAP.
2. Ein Ausbleiben der Thrombozytenaggregation unter ASS bei Zugabe von MAA-freiem Patienten-PAP

Dies soll im inferenzstatistischen Gruppenvergleich nachgewiesen werden.

Es ist mit einer rechtsschiefen Verteilung der Thrombozytenaggregation unter Zugabe MAA-freien Patienten-PAPs zu rechnen, da die Aggregation keine negativen Werte annehmen kann. Die Testung erfolgt daher nicht-parametrisch mittels Mann-Whitney U-Test. Als primärer Vergleich soll der Test auf einem Alphaniveau von .05 erfolgen.

Aufgrund der geringen Zahl von Patientenproben mit MAA-Konzentration von 0  $\mu\text{M}$  soll dieses Ergebnis durch zusätzliche Vergleiche von Versuchsansätzen höherer mit Versuchsansätzen niedrigerer MAA-Konzentration bestätigt werden. Es sollen hierbei Aggregationen bei Konzentrationen von weniger als 1  $\mu\text{M}$  MAA mit Aggregationen bei Konzentrationen von mehr als 1  $\mu\text{M}$  MAA und Aggregationen bei Konzentrationen von mehr als der medianen MAA-Konzentration aller Ansätze mit Konzentrationen von weniger als der medianen MAA-Konzentration aller Ansätze verglichen werden. Grund für den zusätzlichen Vergleich von Ansätzen mit weniger und mehr als 1  $\mu\text{M}$  MAA ist, dass viele Proben MAA-Konzentrationen aufweisen, die nur geringfügig größer als 0  $\mu\text{M}$  MAA sind, während die Anzahl von Patientenproben mit MAA-Konzentrationen von 0  $\mu\text{M}$  MAA gering war. Aufgrund der exploratorischen Natur der Vergleiche ist keine Alphakorrektur vorgesehen. Diese paarweisen Gruppenvergleiche sollen ebenfalls mittels Mann-Whitney U-Test erfolgen.

Entsprechend der Annahme, dass MAA-haltiges Patientenplasma die ASS-induzierte Aggregationshemmung der Thrombozyten gesunder Probanden in konzentrationsabhängiger Weise aufhebt, ist als Befundmuster zu erwarten, dass die Thrombozytenaggregation unter ASS bei Zugabe von Patienten-PAP in Abhängigkeit der hierin enthaltenen MAA-Konzentration zunimmt. Dies soll im inferenzstatistischen Vergleich von Gruppen unterschiedlicher MAA-Konzentrationen mittels Kruskal-Wallis-Test nachgewiesen werden. Zur Bestätigung dieses Befundes wird auch ein Gruppenvergleich der gemessenen Thromboxankonzentrationen durchgeführt. Da es sich um exploratorische Vergleiche handelt, ist keine Alphakorrektur vorgesehen.

Zusätzlich soll eine exploratorische korrelative Auswertung erfolgen. Die logarithmierten MAA-Konzentrationen sollten hier mit der Aggregation in der Interaktionsbedingung (Patienten-PAP und ASS im Ansatz) korrelieren, die lineare Regression sollte eine positive Steigung zeigen. Durch Addition von 1 zu den MAA-Konzentrationen vor Berechnung des Logarithmus werden auch Konzentrationen von 0  $\mu\text{M}$  MAA in die Auswertung eingeschlossen. Die korrelative Analyse soll zunächst auf Basis aller Probanden und dann separat nur auf Basis der Probanden mit Interaktion von MAA und ASS am Testtag erfolgen.

Die Hypothesen in der konfirmatorischen Testung an Thrombozyten eines einzigen gesunden Probanden entsprechen jenen der exploratorischen Testung. Aufgrund der zu erwartenden geringeren Streuung der Daten sollte jedoch ein deutlicherer Dosis-Wirkungs-Effekt (MAA-Konzentration und Aggregationsstärke unter ASS) nachweisbar sein. Da für die konfirmatorische Testung keine ungetesteten Proben mit MAA-Konzentrationen von 0  $\mu\text{M}$  mehr vorlagen, erfolgt der statistische Vergleich hier zwischen Proben hoher und Proben niedriger MAA-Konzentration. Die Trennung in „hoch“ und „niedrig“ erfolgt auf Basis des Medians der MAA-Konzentration der getesteten Proben. Der statistische Vergleich erfolgt mittels gerichtetem Mann-Whitney U-Test zu einem Signifikanzniveau von .05. Wie in der exploratorischen Testreihe soll der Zusammenhang von MAA-Konzentrationen mit der Aggregation unter ASS zusätzlich mittels Korrelation und Regression analysiert werden. Der Nachweis eines positiven linearen Zusammenhanges von MAA-Konzentration und Aggregation ist als das zentrale Ergebnis der konfirmatorischen Versuchsreihe zu betrachten. Die Testung erfolgt zum Alphaniveau von .05. Aufgrund der gegenüber der explorativen Testung verminderten Streuung ist für

die konfirmatorische Testung ein stärkerer Zusammenhang zwischen MAA-Konzentration und Aggregation zu erwarten.

In Analogie zur den Ergebnissen aus der Lichttransmissionsaggregometrie ist in der Durchflusszytometrie eine Steigerung der P-Selektin-Expression durch Stimulation mit Arachidonsäure zu erwarten. Eine vorherige Inkubation mit ASS sollte diesen Effekt aufheben. Bei Zugabe MAA-haltigen Patienten-PAPs sollte eine Steigerung der P-Selektin-Expression durch Stimulation mit Arachidonsäure jedoch auch bei vorheriger Inkubation mit ASS auftreten. Mit zunehmender MAA-Konzentration sollte die P-Selektin-Expression hierbei zunehmen. Da bei der P-Selektin-Expression von einer Normalverteilung auszugehen ist, erfolgt die statistische Auswertung mit Hilfe parametrischer Verfahren. Da an jedem Thrombozytenspender Proben jeder der vier MAA-Konzentrationen (0  $\mu$ M MAA, niedrige MAA-Konzentration, mittlere MAA-Konzentration, hohe MAA-Konzentration) getestet wurden, soll die Analyse mit Tests für abhängige Daten erfolgen. Der Nachweis der Stimulierbarkeit der Testbedingungen ohne ASS im Ansatz soll mittels gerichteter t-Tests zum Vergleich von stimulierter (Arachidonsäurestimulation) und unstimulierter (Zugaben von reinem Trispuffer) Aktivierungskontrolle erfolgen. Die Erfolgskontrolle der ASS-induzierten Thrombozytenaggregationshemmung soll durch gerichteten t-Test zum Vergleich der stimulierten Aggregationskontrolle (kein ASS) mit der stimulierten Hemmungskontrolle (ASS im Ansatz) erfolgen. Primärer statistischer Endpunkt ist der Vergleich der P-Selectin-Expression unter ASS zwischen Bedingungen unterschiedlich hoher MAA-Konzentration. Dieser Vergleich erfolgt mittels messwiederholter einfaktorieller Varianzanalyse zum Alphaniveau von .05.

Im Rahmen der deskriptiven Statistik werden Mittelwerte mit zugehörigem Standardfehler berichtet (SE, *standard error of the mean*), da dies eine grobe Einschätzung statistischer Signifikanz erlaubt. Einzige Ausnahme hiervon sind die Angaben von Metabolitkonzentrationen, hier werden die Standardabweichungen berichtet (SD, *standard deviation*), da keine inferenzstatistische Analyse erfolgt und die Standardabweichung die Dimension der Daten erhält. Um Missinterpretation zu vermeiden, erfolgt stets eine Angabe, ob es sich bei Streuungsdaten um Standardfehler oder Standardabweichungen handelt.

Studienkonzept

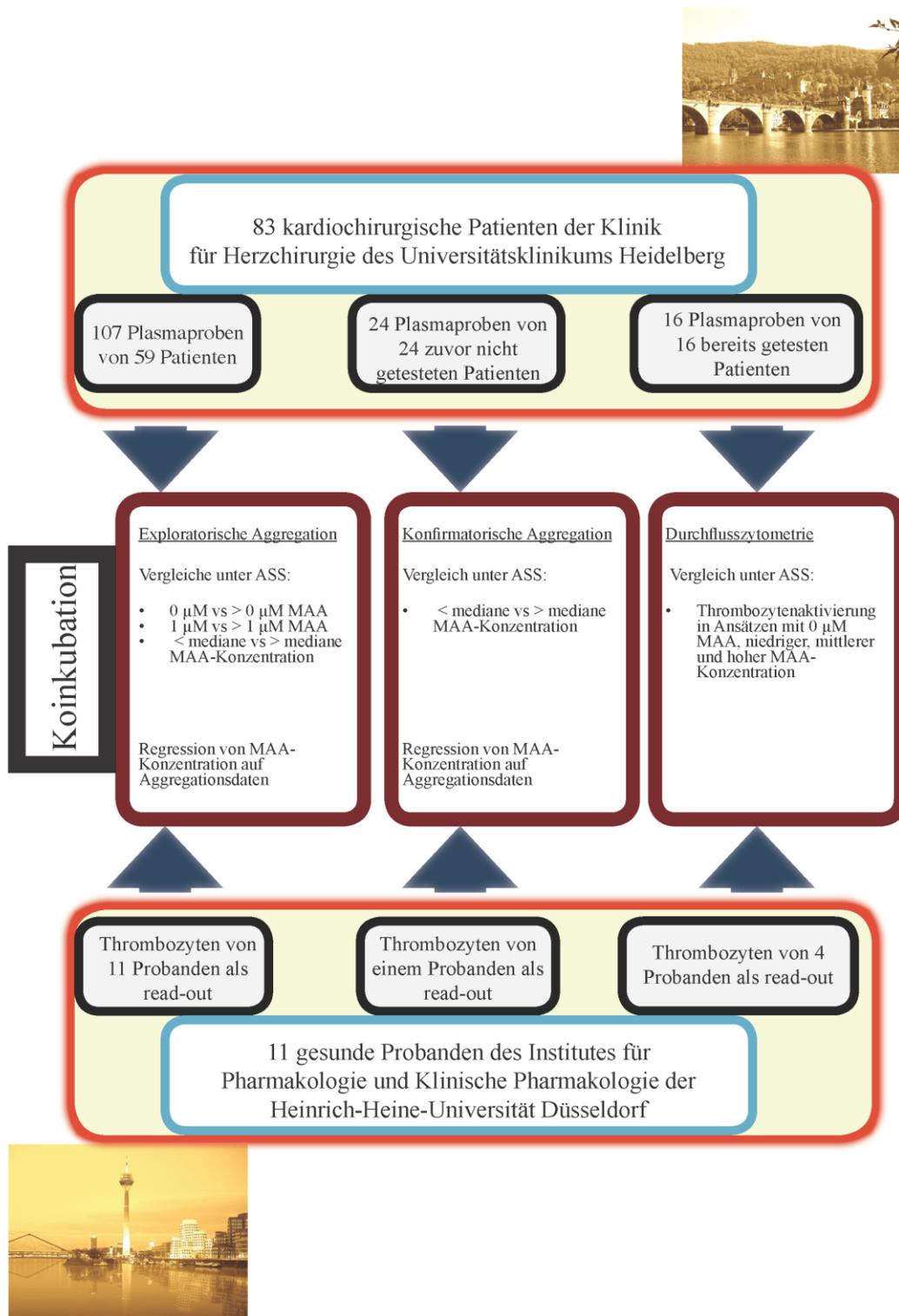


Abb. 9: Darstellung des grundlegenden Studienkonzeptes und zentraler statistischer Analysen.

## 3 Ergebnisse

Im folgenden Ergebnisteil werden zunächst die Ergebnisse der HPLC-Messungen der Metamizolmetaboliten in den Patientenproben vorgestellt. Auf die Darstellung des gesamten Probenpools folgt eine separate Charakterisierung der in der exploratorischen und konfirmatorischen Lichttransmissionaggregometrie untersuchten Proben sowie eine Charakterisierung der Proben, die in der Durchflusszytometrie getestet wurden. Nachfolgend werden dann die Ergebnisse der exploratorischen lichttransmissionsaggregometrischen Testung sowie der Thromboxanmessung vorgestellt. Dem folgt die Präsentation der Ergebnisse der konfirmatorischen Lichttransmissionsaggregometrie sowie der durchflusszytometrischen Testung.

### 3.1 Metamizolmetaboliten aller Patientenproben

Wie einleitend erwähnt, wird Metamizol zu Methylaminoantipyrin (MAA) hydrolysiert. MAA wird zu Aminoantipyrin (AA) umgesetzt, welches durch Acetylierung in Acetylaminoantipyrin (AAA) verstoffwechselt wird. Die Plasmakonzentration der Patientenproben lag für MAA im Mittel bei 74.2  $\mu\text{M}$  (Max = 649.8  $\mu\text{M}$ , Min = 0  $\mu\text{M}$ , SD = 62.7  $\mu\text{M}$ ), für AA bei 14  $\mu\text{M}$  (Max = 142.1  $\mu\text{M}$ , Min = 0  $\mu\text{M}$ , SD = 16.7  $\mu\text{M}$ ) und für AAA bei 80,5  $\mu\text{M}$  (Max = 400.5  $\mu\text{M}$ , Min = 0  $\mu\text{M}$ , SD = 63  $\mu\text{M}$ ). Zu beachten ist allgemein, dass die hier angegebenen Konzentrationen den Messungen im Patientenplasma entsprechen, durch die erforderliche Verdünnung im Rahmen der Versuchsansätze ergeben sich für die Testreihen um den Faktor 13 geringere Konzentrationen.

#### 3.1.1 Metamizolmetaboliten in den Patientenproben der exploratorischen Testung

Die exploratorische Testung erfolgte an 107 Plasmaproben von 59 unterschiedlichen Patienten und 16 PRP-Proben von 7 gesunden Probandinnen und 4 gesunden Probanden. In den Patientenproben der exploratorischen Testung lag die Plasmakonzentration für MAA im Mittel bei 74  $\mu\text{M}$  (Max = 649.8  $\mu\text{M}$ , Min = 0  $\mu\text{M}$ , SD = 85.1  $\mu\text{M}$ ), für AA bei

13.1  $\mu\text{M}$  (Max = 142.1  $\mu\text{M}$ , Min = 0  $\mu\text{M}$ , SD = 21.2  $\mu\text{M}$ ) und für AAA bei 69.9  $\mu\text{M}$  (Max=304.1  $\mu\text{M}$ , Min = 0  $\mu\text{M}$ , SD = 57.7  $\mu\text{M}$ ).

An diesen 107 Patientenproben erfolgten 121 lichttransmissionsaggregometrische Messungen in der Interaktionsbedingung (Patienten-PAP, ASS im Ansatz). Zehn Proben wurden zweifach gemessen, zwei Proben dreifach. Die Mehrfachmessungen hatten unterschiedliche Gründe. Sechs der zweifach gemessenen Proben und eine dreifach gemessene Probe enthielten 0  $\mu\text{M}$  MAA. Wurden diese Proben bei einem Probanden getestet, der in der gesamten Testreihe keine Interaktion zeigte, fand eine erneute Testung bei einem Probanden mit Interaktion statt, um die Reproduzierbarkeit des Ausbleibens einer Interaktion in Abwesenheit von MAA zu verifizieren. Bei den verbleibenden vier zweifach getesteten Proben fand eine Mehrfachtestung statt, um Probandenplasma über die gesamte Breite im Patientengut vorkommender MAA-Konzentrationen zu testen. Eine dreifach getestete Probe enthielt mit 649.8  $\mu\text{M}$  eine besonders hohe MAA-Konzentration und wurde wiederholt getestet, um zu prüfen, ob diese hohe Konzentration von MAA die Aggregation hemmt.

### 3.1.2 Metamizolmetaboliten in den Patientenproben der konfirmatorischen Testung

In den Patientenproben der konfirmatorischen Testung lag die freie Plasmakonzentration für MAA im Mittel bei 82.9  $\mu\text{M}$  (Max = 164.9  $\mu\text{M}$ , Min = 31  $\mu\text{M}$ , SD = 39.6  $\mu\text{M}$ ), für AA bei 15.4  $\mu\text{M}$  (Max = 36.9  $\mu\text{M}$ , Min = 2.1  $\mu\text{M}$ , SD = 10.8  $\mu\text{M}$ ) und für AAA bei 95.6  $\mu\text{M}$  (Max = 400.5  $\mu\text{M}$ , Min = 39.6  $\mu\text{M}$ , SD = 72.9  $\mu\text{M}$ ).

Die konfirmatorische Versuchsreihe erfolgte an 24 Proben von 24 unterschiedlichen Patienten und PRP-Proben eines gesunden Probanden. Alle Patientenproben wurden am 2. postoperativen Tag entnommen. Von den 24 Patienten waren keine Proben im Rahmen der explorativen Versuchsreihe getestet worden.

### 3.1.3 Metamizolmetaboliten in den Patientenproben der durchflusszytometrischen Testung

In den Patientenproben der durchflusszytometrischen Testung lag die freie Plasmakonzentration für MAA im Mittel bei 46  $\mu\text{M}$  (Max = 206.1  $\mu\text{M}$ ,

Min = 0  $\mu$ M, SD = 59.1  $\mu$ M), für AA bei 10.5  $\mu$ M (Max = 61.3  $\mu$ M, Min = 10.5  $\mu$ M, SD = 16.6  $\mu$ M) und für AAA bei 74.3  $\mu$ M (Max = 215.6  $\mu$ M, Min = 0  $\mu$ M, SD = 67.2  $\mu$ M). Die durchflusszytometrische Testung erfolgte an 16 Proben von 16 unterschiedlichen Patienten und PRP-Proben von 2 gesunden Probandinnen und 2 gesunden Probanden. Alle Patientenproben wurden am 3. postoperativen Tag entnommen.

### 3.2 Ergebnisse aus exploratorischer lichttransmissions-aggrometrischer Messung und TXB<sub>2</sub>-Messung

Zunächst werden die Ergebnisse der Kontrollbedingungen vorgestellt, ehe die Interaktion von ASS und MAA dargestellt wird. Nachfolgend werden die Befunde zur Konzentrations-Wirkungs-Beziehung (MAA-Konzentration und Aggregation unter ASS) in Gruppenvergleichen (Bedingungen aufsteigender MAA-Konzentration) und mittels korrelativer Analyse untersucht. Alle nachfolgenden Angaben zu MAA-Konzentrationen entsprechen den Konzentrationen in den Versuchsansätzen (nach Verdünnung der Patientenproben).

In den Bedingungen ohne ASS (Aggregationskontrolle mit Probanden-PAP und Aggregationsbedingung mit Patienten-PAP) zeigte sich erwartungsgemäß eine Aggregation. In den Bedingung mit ASS und ohne MAA ergab sich eine erfolgreiche Hemmung der Aggregation. Dies zeigte sich sowohl für die Hemmungskontrolle mit Probanden-PAP als auch für die Interaktionsbedingung mit Patienten-PAP mit einer MAA-Konzentration von 0  $\mu$ M. Bei MAA-Konzentrationen größer 0  $\mu$ M im zugefügten Patienten-PAP zeigte sich in der Interaktionsbedingung (Patienten-PAP und ASS im Ansatz) jedoch eine signifikante Aggregation im Sinne einer Interaktion, d.h. Abschwächung der Hemmung durch ASS in Gegenwart von Metamizol. Eine Darstellung findet sich in Abbildung 10 a.

Aufgrund der geringen Anzahl von Patientenproben mit MAA-Konzentrationen von 0  $\mu$ M erfolgte zusätzlich der Vergleich der Aggregationen in der Interaktionsbedingung (Patienten-PAP und ASS im Ansatz) für MAA-Konzentrationen kleiner 1  $\mu$ M und größer 1  $\mu$ M im Ansatz, dargestellt in Abbildung 10 b, sowie für MAA-Konzentrationen oberhalb und unterhalb der medianen Konzentration aller getesteten Patientenproben, dargestellt in

Abbildung 10 c. Auch hier zeigten sich eine signifikant stärkere Aggregation in den Bedingungen mit der jeweils höheren MAA-Konzentration.

Der Vergleich der Aggregation unter ASS für Subgruppen aufsteigender MAA-Konzentrationen zeigte im Konzentrationsbereich bis 10  $\mu\text{M}$  MAA, dass mit höherer MAA-Konzentration eine stärkere Aggregation in der Lichttransmissionsaggregometrie verbunden war, siehe Abbildung 11 a. In höheren MAA-Konzentrationen (ab 10  $\mu\text{M}$ ) deutete sich hierbei ein Plateau bzw. eine Hemmung der Aggregation an. Entsprechendes galt für die TXB<sub>2</sub>-Konzentrationen. Hier zeigte sich unter ASS eine Zunahme des gebildeten TXB<sub>2</sub> mit Zunahme der MAA-Konzentration im Ansatz, siehe Abbildung 11 b. Die Unterschiede in Aggregation beziehungsweise Thromboxankonzentration zwischen Bedingungen unterschiedlicher MAA-Konzentration waren jeweils statistisch signifikant (Kruskal-Wallis Test,  $p < .05$ ).

Eine gleichgeartete Konzentrations-Wirkungsbeziehung unter ASS mit Zunahme der Aggregation mit steigender MAA-Konzentration zeigte sich auch in der korrelativen Analyse. Die Korrelation von logarithmierter MAA-Konzentration und gemessener Aggregation lag bei .416 ( $p < .05$ ) über alle Probanden und bei .493 ( $p < .05$ ) über die am Testtag interagierenden Probanden. Eine grafische Darstellung der Befunde für alle Probanden findet sich in Abbildung 12 a, für die interagierenden Probanden in Abbildung 12 b.

Gruppenvergleiche der Aggregationen in der exploratorischen Phase

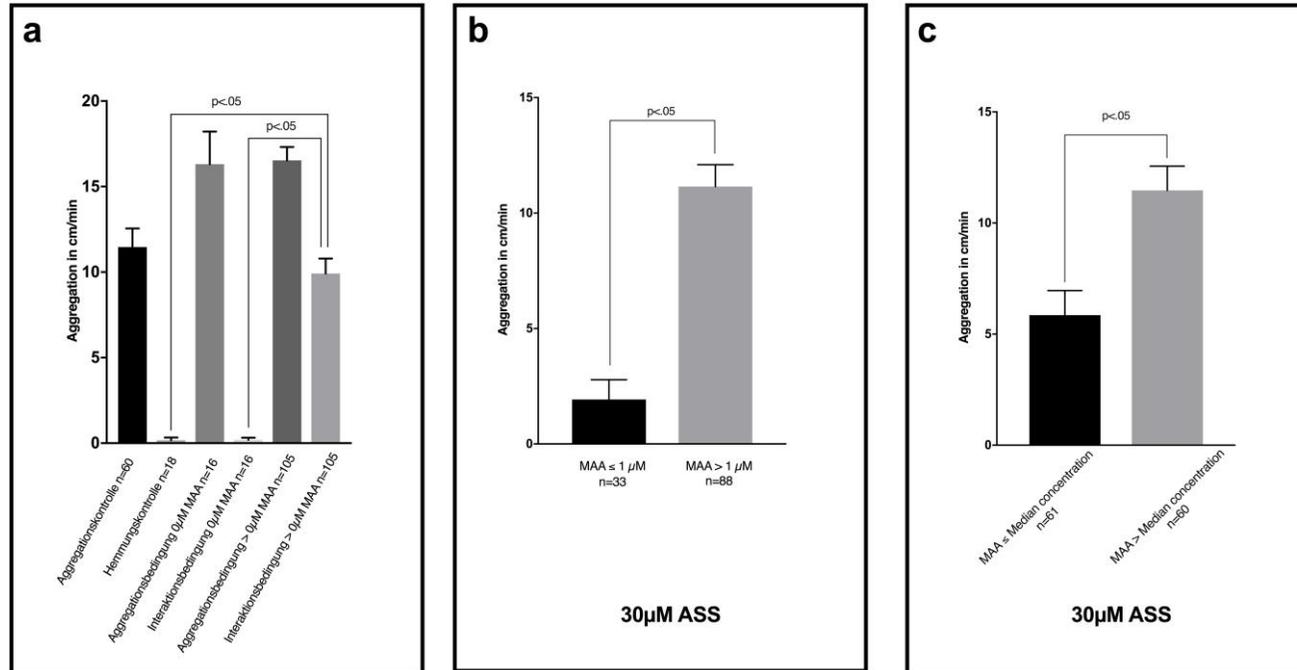


Abb. 10 :

- Darstellung der Aggregation in Aggregationskontrolle (Probanden-PAP, kein ASS), Hemmungskontrolle (Probanden-PAP und ASS) sowie in Aggregationsbedingung (Patienten-PAP, kein ASS) und Interaktionsbedingung (Patienten-PAP und ASS), getrennt für Patienten-PAP mit 0 μM MAA und Patienten-PAP mit Konzentrationen größer 0 μM MAA. Die Fehlerbalken stellen die Standardfehler dar. Die *p*-Werte entsprechen der Signifikanztestung mittels Mann-Whitney U-Test.
- Darstellung der Aggregation in der Interaktionsbedingung (Patienten-PAP und ASS), getrennt für Ansätze mit MAA-Konzentrationen kleiner 1 μM MAA und Ansätze mit Konzentrationen größer 1 μM MAA. Die Fehlerbalken stellen die Standardfehler dar. Die *p*-Werte entsprechen der Signifikanztestung mittels Mann-Whitney U-Test.
- Darstellung der Aggregation in der Interaktionsbedingung (Patienten-PAP und ASS), getrennt für Patienten-PAP mit MAA-Konzentrationen kleiner beziehungsweise größer der medianen MAA-Konzentration aller getesteten Proben. Die Fehlerbalken stellen die Standardfehler dar. Die *p*-Werte entsprechen der Signifikanztestung mittels Mann-Whitney U-Test. Konzentrationsangaben in μM=mikroMolar.

Aggregation und Thromboxankonzentration unter ASS in Testungen mit aufsteigender MAA-Konzentration in der exploratorischen Phase

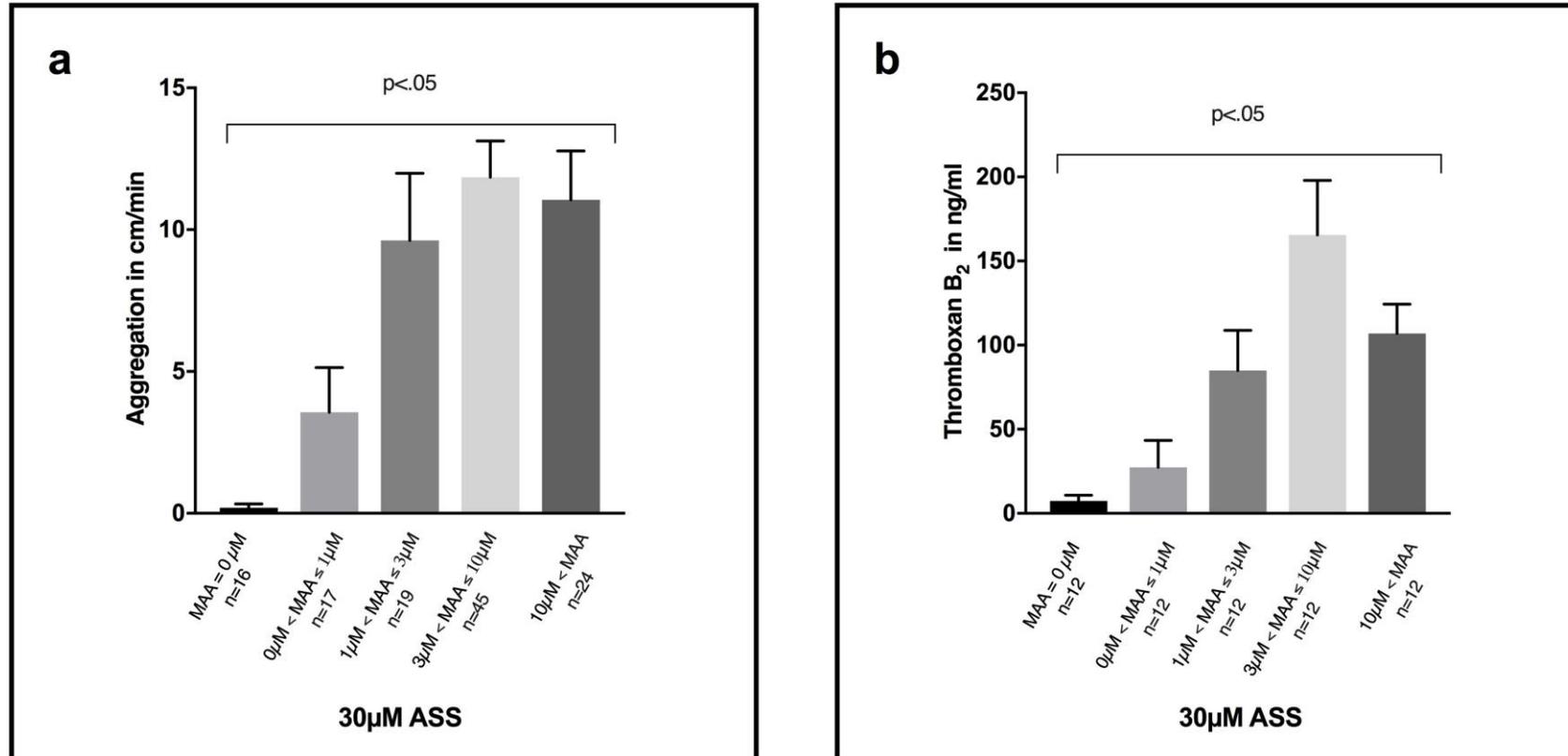


Abb. 11:

- Darstellung der über alle Messungen der Interaktionsbedingung (Patienten-PAP und ASS) gemittelten Aggregation getrennt für alle Testungen in den angegebenen MAA-Konzentrationsintervallen. Die Fehlerbalken stellen die Standardfehler dar. Der  $p$ -Wert entspricht der Signifikanztestung mittels Kruskal-Wallis Test.
- Darstellung der über alle Messungen der Interaktionsbedingung (Patienten-PAP und ASS) gemittelten Thromboxankonzentrationen (TXB<sub>2</sub>) getrennt für alle Testungen in den angegebenen MAA-Konzentrationsintervallen. Die Fehlerbalken stellen die Standardfehler dar. Der  $p$ -Wert entspricht der Signifikanztestung mittels Kruskal-Wallis Test.

Aggregation unter ASS in Abhängigkeit der MAA-Konzentration in der exploratorischen Phase

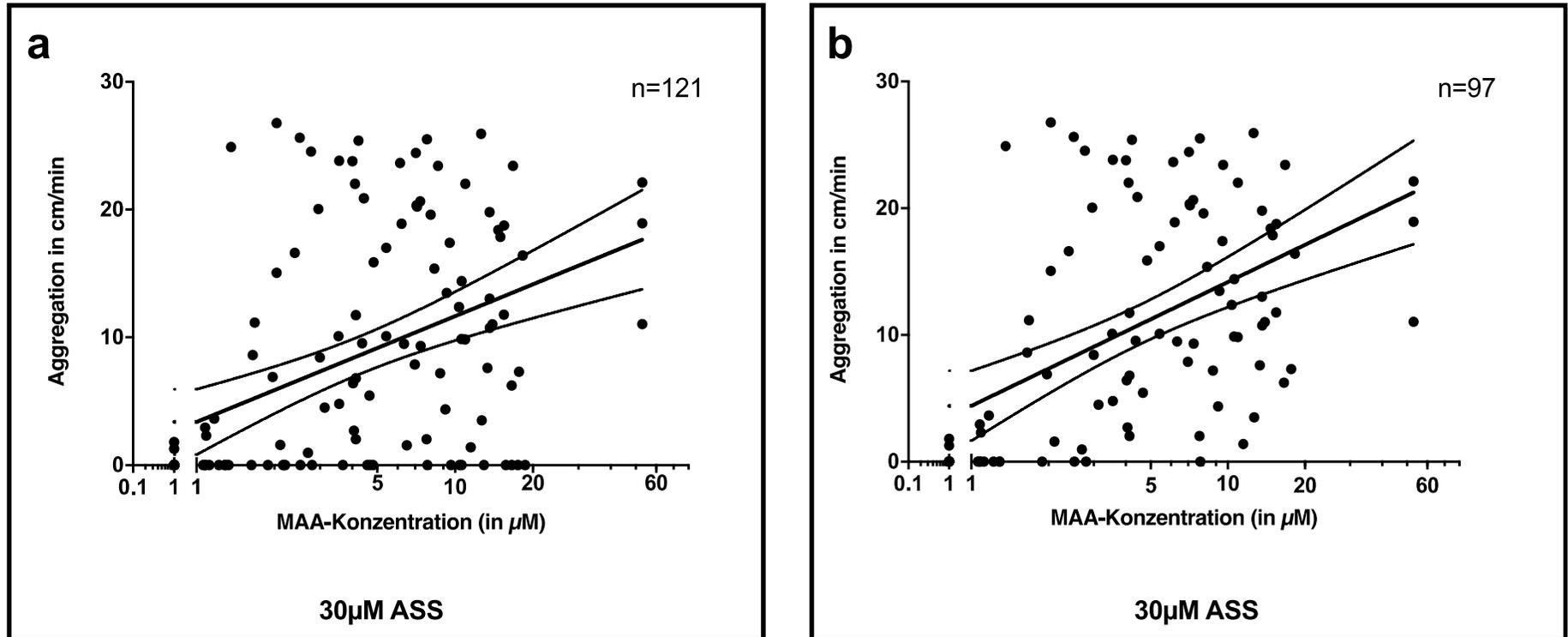


Abb. 12: Dargestellt sind die Aggregationen in der Interaktionsbedingung (Patienten-PAP und ASS) als Streudiagramm. Jeder Punkt stellt eine Aggregation dar. Auf der Ordinate sind die gemessenen Werte der Aggregation (Steigung) abgetragen, auf der Abszisse die MAA-Konzentrationen logarithmiert dargestellt. Die Gerade entspricht der Regressionsgeraden, darunter und darüber dargestellt die Grenzen des zugehörigen 95%-Konfidenzintervalls.

- a. Darstellung für alle Probanden (121 Messungen).
- b. Darstellung nur für die interagierenden Probanden (97 Messungen).

Die multiple Regression der Aggregation auf Basis der logarithmierten Konzentrationen von MAA, AA und AAA bestätigte die Konzentrations-Wirkungs-Beziehung. Nur die Regressionskoeffizienten für die Konzentrationen von MAA und AAA unterschieden sich signifikant von 0 ( $p < .05$ ). Die Berechnung des multiplen Korrelationskoeffizienten ergab einen Wert von .58. Bei Berechnung der Regression nur für die interagierenden Probanden unterschied sich nur der Regressionskoeffizient für den Prädiktor MAA-Konzentration signifikant von 0 ( $p < .05$ ). Der multiple Korrelationskoeffizient ergab hier einen Wert von .535.

### 3.2.1 Vergleich interagierender und nicht interagierender Probanden

Im Rahmen der Untersuchungen fiel auf, dass Thrombozyten einiger gesunder Probanden generell keine Interaktion zwischen ASS und MAA zeigten. Eine Interaktion war im Rahmen der vorliegenden Arbeit in drei Viertel aller Thrombozytenspenden nachweisbar. Bei vier von 11 spendenden Probanden war jedoch keine Interaktion von MAA und ASS nachzuweisen. Drei der nicht interagierenden Spender spendeten zu einem späteren Zeitpunkt erneut. Diese Spenden zeigten wieder die erwartete Interaktion.

Da sich der Eindruck ergab, dass eine Interaktion insbesondere bei Probanden mit allgemein besser aggregierenden Thrombozyten eintrat, nahmen wir eine ergänzende explorative Analyse der Aggregationen in der Aggregationsbedingung (Patienten-PAP, kein ASS im Ansatz) vor. Eine Darstellung der Aggregation in Abhängigkeit der MAA-Konzentration getrennt nach interagierenden und nicht-interagierenden Probanden für die Aggregationsbedingung (Patienten-PAP, kein ASS im Ansatz) findet sich in Abbildung 13 a. Die Aggregation lag für interagierende Probanden im Mittel bei 19.26 cm/min, für nicht-interagierende Probanden im Mittel bei 5.39 cm/min. Der Mann-Whitney U-Test ergab einen signifikanten Unterschied ( $p < .05$ ).

Aggregationen unter ASS für interagierende und nicht-interagierende Probanden der exploratorischen Phase in Abhängigkeit der MAA-Konzentration

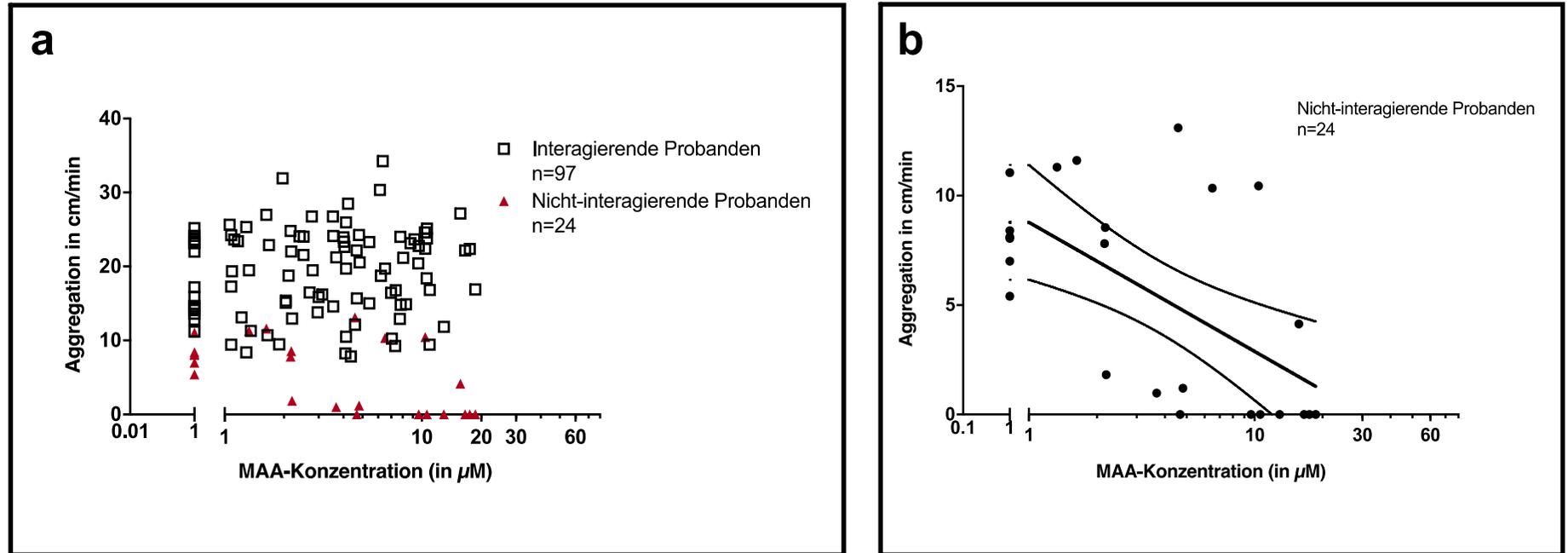


Abb. 13

- Darstellung nur für die interagierenden Probanden (97 Messungen). Dargestellt sind Aggregationen interagierender Probanden (schwarze Rechtecke) ( $n = 97$ ) beziehungsweise nicht-interagierender Probanden (rote Dreiecke) ( $n = 24$ ) in der Aggregationsbedingung (Patienten-PAP, kein ASS) als Streudiagramm. Jedes Symbol stellt eine Messung dar. Auf der Ordinate ist die Aggregation, auf der Abszisse die MAA-Konzentration logarithmisch dargestellt.
- Darstellung identisch zu a, die Punkte stellen ausschließlich Aggregationen für nicht-interagierende Probanden dar. In Ergänzung zu Abbildung a: Die Gerade entspricht der Regressionsgeraden, die gebogenen Linien fassen das zugehörige 95%-Konfidenzintervall ein.

Die Korrelation von Aggregation und logarithmierter MAA-Konzentration in Ansätzen ohne ASS war negativ für nicht-interagierende Probanden, entsprechend einer Abnahme der Aggregation mit ansteigender MAA-Konzentration ( $.567, p < .05$ ). Eine graphische Darstellung findet sich in Abbildung 13 b. Für interagierende Probanden ergab sich hingegen kein statistischer Zusammenhang von MAA-Konzentration und Aggregation in Ansätzen ohne ASS. Hier zeigte sich also keine Abnahme der Aggregation mit Zunahme der MAA Konzentration in Ansätzen ohne ASS, siehe Abbildung 13 a.

Eine Darstellung der mittleren Aggregation getrennt nach interagierenden und nicht-interagierenden Probanden für die Aggregationskontrolle (Probanden-PAP, kein ASS) findet sich in Abbildung 14. Auch hier zeigt sich eine mit 16.51 cm/min im Mittel stärkere Aggregation für interagierende Probanden im Vergleich zu nicht-interagierenden Probanden (mittlere Aggregation hier bei 7.55 cm/min). ( $p < .05$ ).

Aggregationen ohne ASS für interagierende und nicht-interagierende Probanden in der exploratorischen Phase

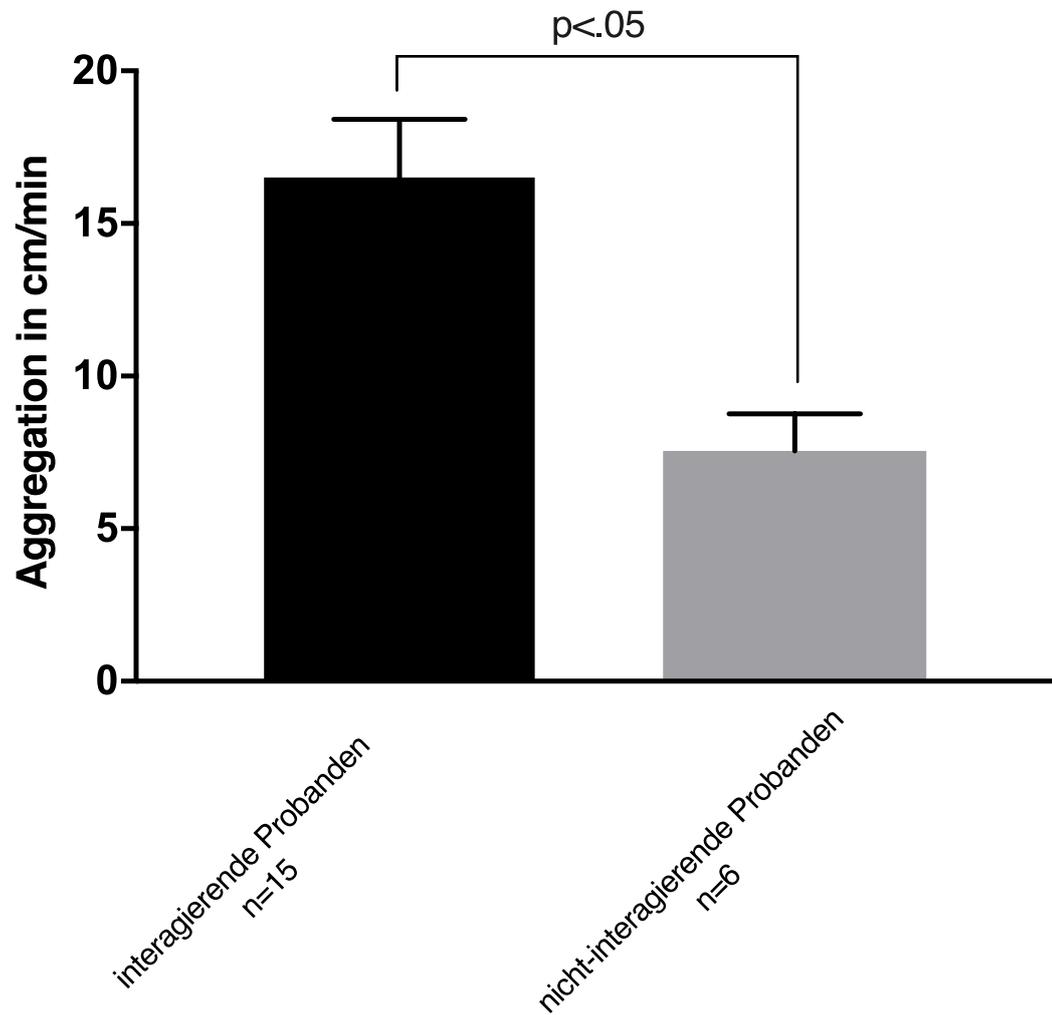


Abb. 14: Darstellung der über alle Messungen der Aggregationskontrolle (Probanden-PAP, kein ASS) gemittelten Aggregationen getrennt für alle Testungen interagierender Probanden (n = 15) und nicht-interagierender Probanden (n = 6). Die Fehlerbalken stellen die Standardfehler dar. Der  $p$ -Wert entspricht der Signifikanztestung mittels Mann-Whitney U-Test.

### 3.3 Ergebnisse der konfirmatorischen lichttransmissionsaggregometrischen Testung

Zur unabhängigen Bestätigung der Ergebnisse der exploratorischen Testung erfolgte die konfirmatorische Bestimmung der Interaktion von ASS und Metamizol auf Basis von 24 Proben, die von 24 in der exploratorischen Untersuchung noch nicht getesteten Patienten stammten. Dies war erforderlich, da die Ergebnisse – wie zuvor dargestellt – auch durch die thrombozytäre Reaktivität der zum Nachweis der Interaktion eingesetzten Thrombozyten gesunder Probanden beeinflusst wurde. Messungen von 4 Proben konnten wegen fehlender Aktivierbarkeit der Probanden-Thrombozyten nicht verwendet werden.

Die Aggregation unter ASS war in der Bedingung mit MAA-Konzentrationen unterhalb der medianen MAA-Konzentration aller Proben signifikant geringer als in der Bedingung mit MAA-Konzentrationen oberhalb der medianen MAA-Konzentration (Mann-Whitney U-Test,  $p < .05$ ). Eine Darstellung der Ergebnisse findet sich in Abbildung 15 a.

Aggregation unter ASS in Abhängigkeit der MAA-Konzentration in der konfirmatorischen Phase

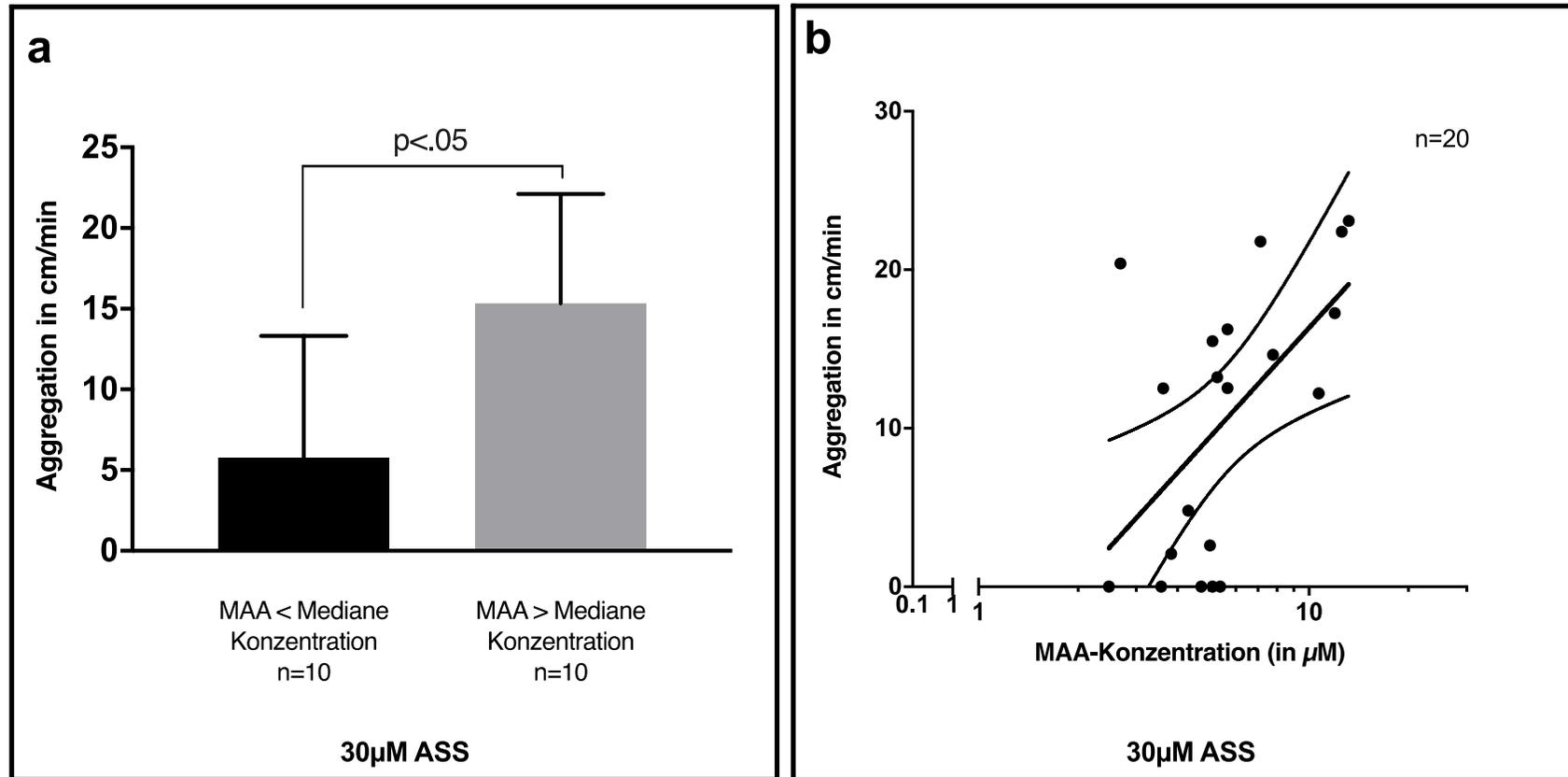


Abb. 15:

- Darstellung der Aggregation in der Interaktionsbedingung (Patienten-PAP und ASS) für alle Ansätze mit MAA-Konzentrationen höher bzw. niedriger als die mediane MAA-Konzentration (n je = 10). Die Fehlerbalken stellen die Standardfehler dar. Der  $p$ -Wert entspricht der Signifikanztestung mittels Mann-Whitney U-Test.
- Dargestellt sind die Aggregationen in der Interaktionsbedingung (Patienten-PAP und ASS) als Streudiagramm (n = 20). Jeder Punkt stellt eine Messung dar. Auf der Ordinate sind die gemessenen Steigungen abgetragen, auf der Abszisse die MAA-Konzentrationen auf logarithmischer Achse dargestellt. Die Gerade entspricht der Regressionsgeraden, die gebogenen Linien fassen das zugehörige 95%-Konfidenzintervall ein.

Die Konzentrations-Wirkungsbeziehung für MAA und Aggregation unter ASS ergab für logarithmierte MAA-Konzentrationen eine Korrelation von .564 ( $p < .05$ ). Die multiple Regression auf Basis der logarithmierten Konzentrationen von MAA, AA und AAA zur Vorhersage der Steigung in der Interaktionsbedingung ergab einen multiplen Korrelationsquotient von .570. Nur der Regressionskoeffizient für den Prädiktor MAA-Konzentration unterschied sich signifikant von 0 ( $p < .05$ ). Eine graphische Darstellung findet sich in Abbildung 15 b.

### 3.4 Ergebnisse der durchflusszytometrischen Testung

In der Aktivierungskontrolle (Probanden-PAP, kein ASS) ergab sich ein signifikanter Effekt der Stimulation mit Arachidonsäure. Der prozentuale Anteil aktivierter Thrombozyten, erfasst über die P-Selektin-Expression, betrug hier in der unstimulierten Bedingung 2.75 % (SE = 1.22), in der stimulierten Bedingung 18.82 % (SE = 5.68,  $p < .05$ ). Der Vergleich der Arachidonsäure-stimulierten Aktivierungskontrolle (Probanden-PAP, kein ASS) mit der Arachidonsäure-stimulierten Hemmungskontrolle (Probanden-PAP, ASS im Ansatz) ergab einen signifikanten Effekt der ASS-Hemmung, der Anteil aktivierter Thrombozyten betrug in der stimulierten Aktivierungskontrolle 18.82 % (SE = 5.68), in der stimulierten Hemmungskontrolle 3.52 % (SE = 0.89,  $p < .05$ ). Die Darstellung eines repräsentativen Befundes findet sich in Abbildung 16.

## Fluoreszenzintensität in den Kontrollbedingungen der Durchflusszytometrie

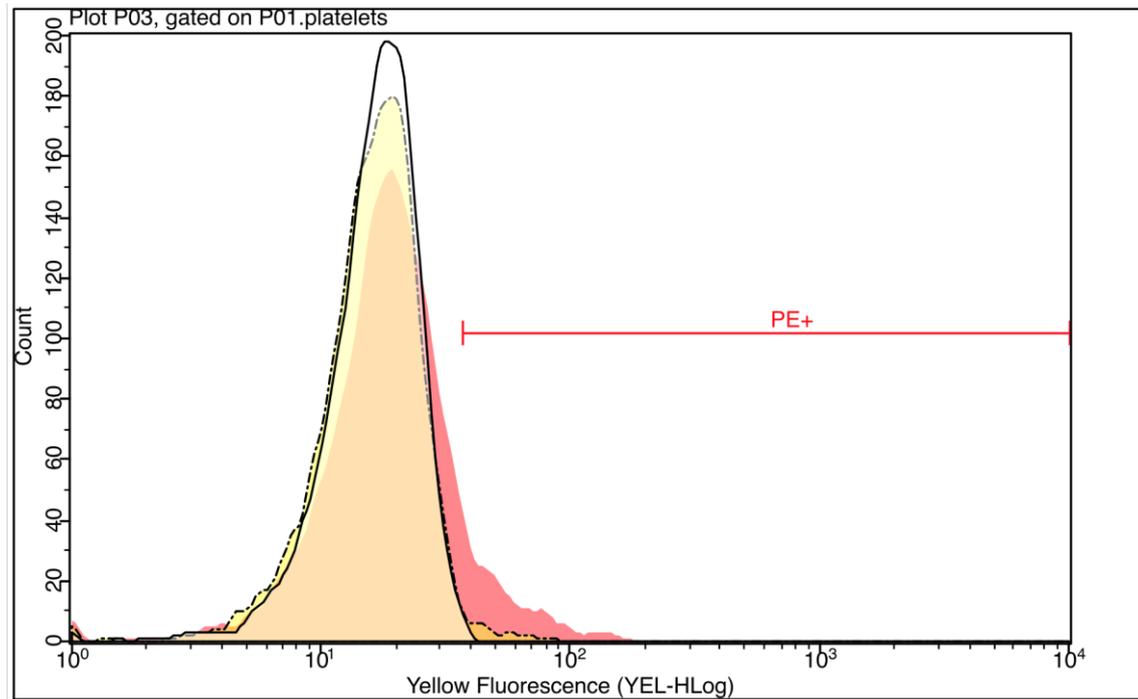


Abb. 16: Darstellung repräsentativer Histogramme der Fluoreszenzintensitäten, basierend auf der Markierung von P-Selektin, der Kontrollbedingungen (mit Probanden-PAP) in der Durchflusszytometrie. Die weiße Fläche, umgeben von der durchgezogenen Linie, stellt die unstimulierte Aktivierungskontrolle (keine Arachidonsäurestimulation, kein ASS) dar, die gelbe Fläche, umgeben von der gestrichelten Linie, stellt die Arachidonsäure-stimulierte Hemmungskontrolle (ASS im Ansatz) dar. Die rote Fläche stellt die stimulierte Aktivierungskontrolle (Arachidonsäurestimulation, kein ASS) dar.

Die rote Markierung gibt den Bereich an, in dem die Fluoreszenzintensität basierend auf der P-Selektin-Expression die Fluoreszenzintensität unspezifischer Bindungen übersteigt, PE+ steht für Phykoerythrin positiv (Phykoerythrin ist der eingesetzte Fluoreszenzfarbstoff). Die Ordinate gibt die *Counts* an, die Abszisse stellt den dekadischen Logarithmus der Fluoreszenzintensität des gelben Kanals dar.

## Fluoreszenzintensität in den Testbedingungen der Durchflusszytometrie

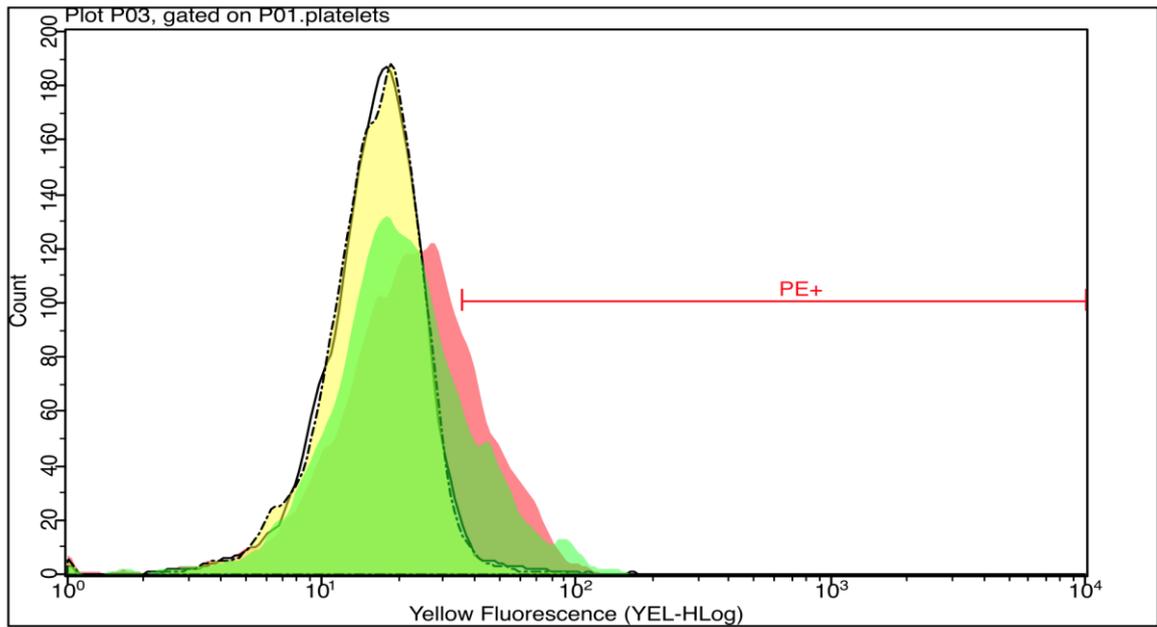


Abb. 17: Darstellung repräsentativer Histogramme der Fluoreszenzintensitäten einer Testung mit Thrombozyten des selben Spenders, basierend auf der Markierung von P-Selektin in der stimulierten Interaktionsbedingung (Patienten-PAP, ASS im Ansatz, Arachidonsäurestimulation). Die weiße Fläche, umgeben von der durchgezogenen Linie, stellt die Bedingung mit 0  $\mu$ M MAA dar, die gelbe Fläche, umgeben von der gestrichelten Linie, stellt die Bedingung mit niedriger MAA-Konzentration dar. Die grüne Fläche stellt die Bedingung mit mittlerer MAA-Konzentration dar. Die rote Fläche stellt die Bedingung mit hoher MAA-Konzentration dar. Für Angaben zu den Konzentrationsbereichen in den Bedingungen niedriger, mittlerer und hoher Konzentration siehe unter 2.6.2 Durchführung. Darstellung ansonsten äquivalent zu Abb. 16, zusätzliche Informationen s. Abbildung 16.

Vergleiche durchflusszytometrischer Messungen mit unterschiedlich hohen MAA-Konzentrationen im Ansatz ergaben in der stimulierten Interaktionsbedingung (Patienten-PAP, ASS im Ansatz, Arachidonsäurestimulation) signifikante Unterschiede im Ausmaß der Thrombozytenaktivierung, erfasst über die P-Selektin-Expression. Der prozentuale Anteil aktivierter Thrombozyten betrug in der Bedingung mit Konzentration von 0  $\mu$ M MAA 5.22 % (SE = 1.20), in der Bedingung mit niedriger MAA-Konzentration 5.16 % (SE = 3.05), in der Bedingung mit mittlerer MAA-Konzentration 13.07 % (SE = 4.69) und in der Bedingung mit hoher MAA-Konzentration 13.92 % (SE = 3.85) ( $p < .05$ ). Die Darstellung eines repräsentativen Befundes hierfür findet sich in Abbildung 17.

## 4 Diskussion

Die vorliegende Dissertation verfolgte drei Zielsstellungen:

1. Entwicklung einer Methodik zur Untersuchung von Plasmaproben von Patienten an Thrombozyten gesunder Probanden.
2. *In vitro* Nachweis einer Interaktion von Metamizol mit ASS in der hoch relevanten Population kardiochirurgischer Patienten.
3. Nachweis und Charakterisierung einer Konzentrations-Wirkungs-Beziehung dieser Interaktion für den Metamizolmetaboliten MAA.

In den drei nachfolgenden Abschnitten werden die sich im Rahmen dieser Zielsetzungen ergebenden Schlussfolgerungen diskutiert. Im Anschluss werden die Limitationen, die Relevanz der Befunde sowie die darüber hinaus reichenden Perspektiven dargestellt.

### 4.1 Entwicklung einer Methodik zur Untersuchung von Plasmaproben von Patienten an Thrombozyten gesunder Probanden

Eine besondere methodische Problemstellung bestand darin, dass Aggregation und Thromboxansynthese nur an frischen Patiententhrombozyten über einen Zeitraum von maximal wenigen Stunden untersucht werden können. Dies konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit durch Verwendung von Thrombozyten gesunder Probanden umgangen werden. Mit den in Vorversuchen ermittelten Konzentrationsverhältnissen von Patienten-PAP zu Probanden-PRP konnten in dieser Arbeit erfolgreich Aggregationen, *thromboxane formation assays* und durchflusszytometrische Untersuchungen durchgeführt werden um zu klären, ob die Hemmung der Thrombozytenfunktion durch ASS in Gegenwart von Metamizol oder dessen Metaboliten im Plasma der kardiochirurgischen Patienten beeinträchtigt oder gar aufgehoben wird.

Die Grenze eines solchen „Mischansatzes“ für die Lichttransmissionsaggregometrie ergab sich aus der verminderten Aggregationsfähigkeit der Probandenthrombozyten mit zunehmender Verdünnung. Wie im Methodenabschnitt erwähnt, ergab sich aus Vorversuchen, dass bei Verdünnungen kleiner als 1:10 (Probanden-PAP:Probanden-PRP)

in vielen der untersuchten Ansätze keine Thrombozytenaggregation mehr auftrat. Hieraus folgte, dass Patienten-PAP in einem Mischansatz nicht unerheblich zu verdünnen war, so dass Metamizol und dessen Metabolite zwar in „realen“ Konzentrationsverhältnissen, aber circa 1/10 geringeren absoluten Konzentrationen untersucht werden mussten. Mit einer Lyophilisation der Plasmaproben von Patienten war das Problem der Verdünnung nicht zu lösen, da dies eine unerwünschte Aufkonzentrierung von Plasmaproteinen und anderen Plasmabestandteilen zur Folge gehabt hätte.

Für die Messungen in der vorliegenden Arbeit zeigte sich die Verdünnung der Patientenproben, wie nachfolgend dargestellt, jedoch als vorteilhaft, da die Verdünnung zu einer Verlagerung in Konzentrationsbereiche mit größerer Linearität der Konzentrations-Wirkungs-Beziehung führte.

## 4.2 Nachweis einer *in vitro* Interaktion von MAA und ASS für kardiochirurgische Patienten

Es konnte gezeigt werden, dass eine deutliche Interaktion von MAA mit ASS dann zu erwarten ist, wenn die Konzentration freien MAAs im Ansatz (also nach Verdünnung) zwischen 0.36  $\mu\text{M}$  und 51.98  $\mu\text{M}$  liegt. Diese Interaktion war effektstark und reproduzierbar. Die Interaktion von MAA und ASS trat in Lichttransmissionsaggregometrie, Thromboxanmessung und Durchflusszytometrie in den gleichen Konzentrationsbereichen des Metamizol-Hauptmetaboliten MAA auf.

Überträgt man die in der vorliegenden Arbeit *in vitro* ermittelten Konzentrationsbereiche deutlicher Interaktion von MAA und ASS auf postoperative kardiochirurgische Patienten, so ergibt sich das nachfolgende Bild:

Am ersten bis dritten postoperativen Tag lag die MAA-Konzentration bei 24 % der Patienten in einem Bereich, der aufgrund der Ergebnisse dieser Dissertation eine deutliche Interaktion mit der Thrombozytenhemmung durch ASS erwarten lässt. Am vierten bis sechsten postoperativen Tag lag die MAA-Konzentration bei 32 % der Patienten und am siebten bis zehnten postoperativen Tag bei 50 % der Patienten in einem Bereich, der auf Basis der vorliegenden *in vitro* Befunde eine deutliche Interaktion mit der Thrombozytenhemmung durch ASS erwarten lässt. Am ersten bis sechsten postoperativen

Tag lag die MAA-Konzentration bei nur 1.2 % der Patienten unter 0.36  $\mu\text{M}$  und damit in einem Bereich, in dem *in vitro* keine Interaktion zu erwarten ist. Am siebten bis zehnten postoperativen Tag lag dieser Anteil bei 12.8%. Zusammenfassend liegen bei Metamizolanalgesie also bei einem hohen Anteil von Patienten Plasmakonzentrationen von MAA vor, die mit einem erhöhten Risiko für eine unvollständige Thrombozytenhemmung durch ASS verbunden ist. Eine grafische Darstellung findet sich in Abbildung 18.

Bei sehr hohen MAA-Konzentrationen ist eine Eigenhemmung der Thrombozytenaggregation durch MAA zu erwarten. Der Bereich der Eigenhemmung konnte aufgrund der notwendigen Verdünnung der Patientenproben nicht genauer bestimmt werden, beginnt jedoch, wie separate Messungen mit MAA (Reinsubstanz, nicht gezeigt) ergaben, bei einer MAA-Konzentration von ca. 100  $\mu\text{M}$ . Im Konzentrationsbereich dieser Eigenhemmung durch MAA könnte für die Patienten ein zeitweiliger Schutz vor thromboembolischen Ereignissen infolge direkter Hemmung der Thromboxansynthese durch MAA bestehen.

Die Thrombozytenaggregationshemmung durch MAA ist jedoch im Gegensatz zu der durch ASS reversibel, d.h. sie könnte durch lokal hohe Konzentrationen des COX-Substrates Arachidonsäure überwunden werden. Initial hohe und damit aggregationshemmende MAA-Plasmakonzentrationen können zudem aufgrund der relativ kurzen Halbwertszeit von MAA (2.6-3.5 h [71]) im Dosierungsintervall und bei Beendigung der Metamizolanalgesie zwangsläufig in einen Bereich ohne MAA-Eigenhemmung abfallen, wo die thrombozytäre Thromboxansynthese infolge der Interaktion mit ASS ungehemmt ablaufen kann.

Prozentsatz von Patienten mit MAA-Konzentrationen im Bereich nachgewiesener *in vitro* Interaktion mit ASS

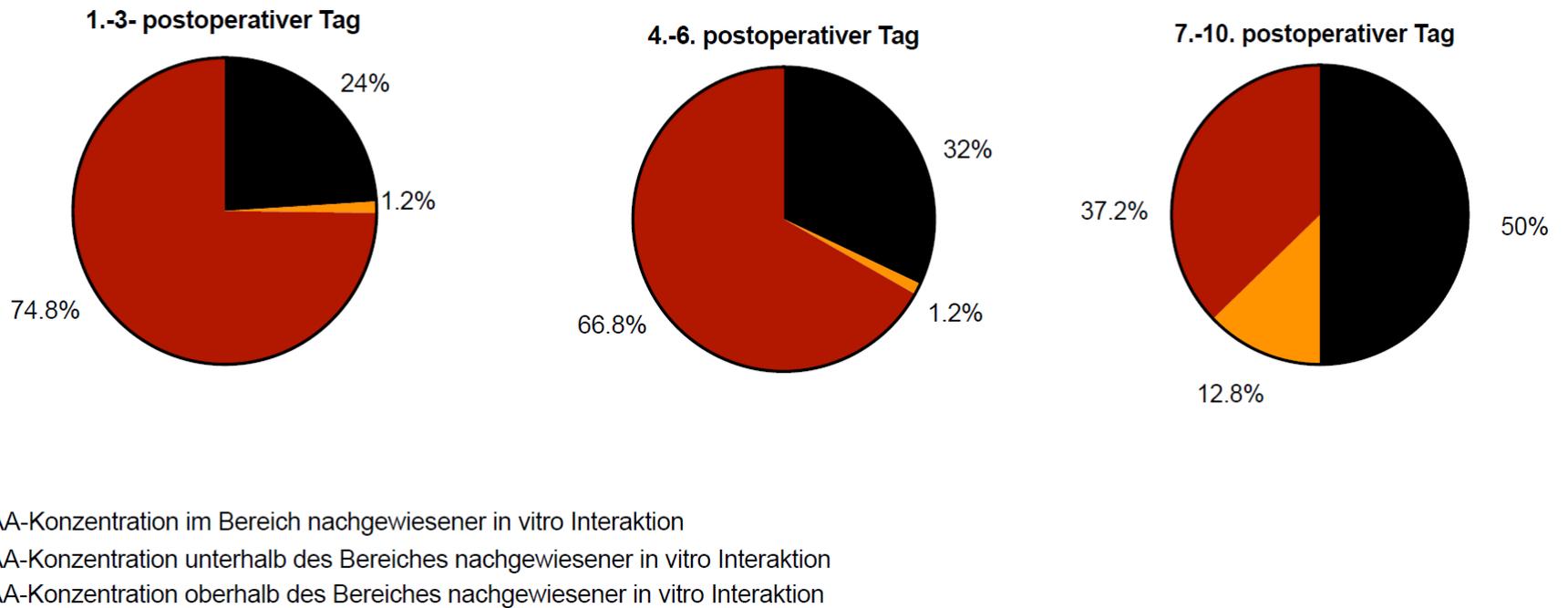


Abb. 18: Dargestellt ist, getrennt nach postoperativen Tagen, der Prozentsatz an Patienten mit MAA-Konzentration im Bereich nachgewiesener *in vitro* Interaktion mit ASS (schwarz), im Konzentrationsbereich unterhalb nachgewiesener *in vitro* Interaktion (orange) und im Konzentrationsbereich oberhalb nachgewiesener *in vitro* Interaktion (dies umfasst den Konzentrationsbereich der Eigenhemmung durch MAA sowie einen Konzentrationsbereich, in dem eine Interaktion zu erwarten ist, der aufgrund der erforderlichen Verdünnung in dieser Arbeit jedoch nicht erfasst werden konnte).

## 4.2.1 Mögliche Risiken für kardiochirurgische Patienten

Doch welche Risiken ergeben sich aus einer unzureichenden postoperativen ASS-Therapie für Patienten nach aortokoronarer Bypassoperation? Zwar wurden hierzu bisher keine dezidierten Studien durchgeführt. Doch liegt eine Antwort auf diese Frage nahe, wenn man die Ergebnisse der Studien heranzieht, die den Nutzen postoperativer Plättchenhemmung untersucht haben. Es wurde gezeigt, dass eine präoperativ eingeleitete Plättchenhemmung mittels ASS frühe Verschlussraten (binnen 60 Tagen nach Operation) von Venenbypässen um 5-8%, je nach exaktem Therapieregime, herabsetzten [9]. Die Fortsetzung einer Therapie mit ASS reduziert im ersten Jahr nach Operation die Verschlussrate statistisch signifikant von 27% auf 16% [72]. Ein Beginn der Medikation mit ASS binnen der ersten 48h Stunden nach Bypassoperation und Durchführung über die Dauer des Krankenhausaufenthaltes führt den Daten einer großen Beobachtungsstudie zufolge zudem zu einer beachtlichen Senkung der Mortalität von 4% auf 1.3%, einer Senkung der Infarktrate von 5.4% auf 2.8%, einer Senkung der Schlaganfälle von 2.6% auf 1.3% und zu einer Senkung postoperativen Nierenversagens von 3.4 auf 0.9% [7]. Eine unzureichende Plättchenhemmung ist also ein klinisch außerordentlich relevanter Risikofaktor nicht nur für Bypassverschluss, sondern auch für weitergehende thromboembolische Ereignisse im Rahmen des postoperativen Verlaufs.

Aus diesen Gründen wird die präoperative Einleitung und postoperative Fortsetzung einer ASS-Therapie nach koronararterieller Bypassoperation empfohlen [73]. Der Verlust der Plättchenhemmung durch Komedikation mit Metamizol könnte also zum Anstieg der Mortalität und häufigerem Auftreten der oben genannten Komplikationen im Vergleich zu einer erfolgreichen Thrombozytenhemmung mit ASS führen.

## 4.2.2 Prävalenz der Interaktion

Wie oben dargestellt, konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die Interaktion von MAA und ASS in Aggregation, Thromboxanmessung und Durchflusszytometrie, also methodenübergreifend, nachweisbar ist. Zudem konnte gezeigt werden, dass diese Interaktion *in vitro* in Konzentrationsbereichen auftritt, die auch *in vivo* regelhaft in der analgetischen Behandlung erreicht werden. Es bleibt zu fragen, bei wem die Interaktion von ASS und MAA auftritt. Ergibt sich der Interaktionseffekt aus Daten

weniger, aber ungemein stark interagierender Thrombozytenspender oder ist der Interaktionseffekt an Thrombozyten aller Spender nachweisbar?

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass der Interaktionseffekt probandenübergreifend auftritt. Eine Interaktion war, wie oben dargelegt, im Rahmen der vorliegenden Arbeit in 75% aller Thrombozytenspenden nachweisbar. Zwar ließ sich bei vier von 11 spendenden Probanden zunächst keine Interaktion von MAA und ASS nachweisen, bei drei dieser vier Probanden, traten jedoch im Rahmen weiterer Thrombozytenspenden Interaktionen auf (der vierte Proband spendete keine weiteren Thrombozyten). Doch warum war in Einzelfällen keine Interaktion von ASS und MAA nachweisbar? Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten an, dass eine geringe Aggregationsfähigkeit der Probandenthrombozyten für das Ausbleiben der Interaktion an einzelnen Versuchstagen verantwortlich ist. Eine nur geringe Aggregationsfähigkeit der Thrombozyten könnte beispielsweise zu einer Verschiebung der entsprechenden Aggregation in den Bereich der MAA-Eigenhemmung geführt haben.

In einer vorausgehenden Untersuchung von Bagheri konnte experimentell und mittels einer auf Simulation beruhenden mathematischen Modellierung gezeigt werden, dass eine Interaktion von ASS und nicht steroidalen Antiphlogistika bei höheren Konzentrationen von Arachidonsäure stärker ausgeprägt ist. Folglich könnte auch eine für einige Probanden zu geringe Arachidonsäure-Stimulation im Einzelfall zum fehlenden Nachweis einer Interaktion geführt haben [74].

Zwar erlauben die Befunde der vorliegenden Arbeit keine direkten Rückschlüsse auf die Prävalenz der *in vitro* Interaktion von MAA und ASS an Thrombozyten kardiochirurgischer Patienten, es besteht jedoch Grund zu der Annahme, dass die Prävalenz dieser Interaktion in der Patientenpopulation noch höher sein dürfte als in der Gruppe gesunder Thrombozytenspender. Wie oben dargestellt, legen die Ergebnisse dieser Arbeit einen Zusammenhang zwischen der allgemeinen Aggregationsfähigkeit der Thrombozyten und dem Auftreten einer Interaktion zwischen MAA und ASS nahe. Die allgemeine Thrombozytenaggregationsfähigkeit könnte bei aortokoronaren Bypasspatienten infolge des fortgeschrittenen Stadiums der kardiovaskulären Erkrankung stärker sein als in gesunden Vergleichspopulationen. Bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit liegt oft eine thrombozytäre Hyperreaktivität vor. Durch Gefäßstenosen

kommt es zu gesteigertem vaskulären Scherstress. Zusätzlich tragen oxidativer Stress und eine im Patientenkollektiv häufig vergesellschaftete Hyperglykämie, beispielsweise über eine gesteigerte Expression von Glykoprotein VI auf der Thrombozytenoberfläche, zur thrombozytären Hyperreaktivität bei [75, 76]. Thrombozytäre Hyperreaktivität besteht bei Patienten mit koronaren Herzerkrankungen oft auch unter der Therapie mit ASS oder Clopidogrel fort [77]. Auch im kardiochirurgischen Krankengut vorliegende postoperative Veränderungen, wie eine reaktive Thrombozytose, die insbesondere auch nach Operationen mit Herzlungenmaschine auftritt [78], sowie die in der operativen Medizin oft hohen benötigten Dosierungen von Analgetika, einschließlich Metamizol, tragen zu einem erhöhten Risiko arterieller thrombotischer Ereignisse bei.

### 4.3 Etablierung einer Konzentrations-Wirkungs-Beziehung für den Metamizolmetaboliten MAA

Über den reinen Nachweis einer Interaktion von ASS und MAA aus Plasmaproben kardiochirurgischer Patienten hinaus konnte in der vorliegenden Arbeit der Nachweis einer Konzentrations-Wirkungsbeziehung erbracht werden. Es konnte über Gruppenvergleiche und Regression nachgewiesen werden, dass die *in vitro* Aggregation von Thrombozyten unter ASS (30  $\mu\text{M}$ ) im Bereich von MAA-Konzentrationen zwischen 0.36  $\mu\text{M}$  und 51.98  $\mu\text{M}$  zunimmt. Eine lineare Beziehung von logarithmierter MAA-Konzentration und Aggregationsstärke konnte den Dosis-Wirkungs-Zusammenhang in der exploratorischen Phase der vorliegenden Arbeit am besten beschreiben. Dieser Zusammenhang konnte in der konfirmatorischen Phase bestätigt werden. Bei zusätzlicher Testung von Probenmaterial mit höheren MAA-Konzentrationen wäre eine verbesserte Prädiktion durch Verwendung einer Funktion mit Sättigung zu erwarten. Bei weiterer Steigerung des untersuchten Konzentrationsbereichs müsste sich aufgrund der direkten COX-Hemmung durch MAA in hohen Konzentrationen ein umgekehrt u-förmiger Zusammenhang zwischen MAA-Konzentration und Thrombozytenaggregation ergeben, ein Befundmuster, das Saxena und Kollegen für Oxaprozin und Celecoxib nachweisen konnten [79].

## 4.4 Limitationen der Befunde

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte der *in vitro* Nachweis der Interaktion von MAA aus Plasmaproben kardiochirurgischer Patienten und ASS mit Thrombozyten gesunder Spender für unterschiedliche Parameter der Thrombozytenaktivierung erbracht werden.

Bezüglich der Übertragbarkeit der Ergebnisse in den klinischen Kontext ergeben sich Einschränkungen aus der Verwendung von Thrombozyten gesunder Probanden (wie bereits weiter oben thematisiert). Wie allgemein für *in vitro* Studien, bestehen Einschränkungen der Extrapolierbarkeit von *in vitro* Daten in die *in vivo* Situation. Lichttransmissionsaggregometrie, das *thromboxane formation assay* und Durchflusszytometrie mit Quantifizierung der P-Selektin-Expression sind allerdings, wie einleitend zu dieser Arbeit erwähnt, mit klinischen Befunden korreliert. Vorangegangene Studien wiesen die Korrelation von *in vitro* Ergebnissen der Lichttransmissionsaggregometrie mit klinisch relevanten Endpunkten nach. In einer größeren Zahl von Studien konnte die prognostische Bedeutung der Lichttransmissionsaggregometrie in der Vorhersage von Stentthrombosen nachgewiesen werden [3, 80-82]. Auch für lösliches P-Selectin konnte die Korrelation mit *in vivo* Daten erbracht werden [82, 83]. Für P-Selektin und den Liganden an P-Selektin ist nachgewiesen, dass sie beispielsweise bei thrombotischen Erkrankungen, Gerinnungsstörungen und bei Patienten mit akutem Koronarsyndroms vermehrt exprimiert werden [24].

Auch wenn die Übertragbarkeit der vorliegenden *in vitro* Befunde auf die *in vivo* Situation mit der allgemeinen Unsicherheit einer Extrapolation verbunden ist, spricht die Verwendung etablierter und *in vivo* korrelierter Verfahren also für eine klinische Bedeutung der vorliegenden Ergebnisse. Zusätzliche Sicherheit bezüglich der klinischen Bedeutung der Interaktion von MAA und ASS ist wahrscheinlich nur mit klinischen Daten (Studien) oder durch weitergehende Standardisierung der *in vitro* Methodik, sowie durch Etablierung von *in vitro* Normwerten verbunden mit *in vitro-in vivo* Korrelationsstudien zu erreichen [84].

Auf der Seite klinischer Befunde weisen prospektive Beobachtungsdaten für KHK-Patienten auf einen Zusammenhang zwischen ASS-MAA-Komedikation und ischämischen Ereignissen sowie Mortalität hin [67], prospektive randomisierte klinische

Endpunktstudien liegen jedoch noch nicht vor. Randomisierte klinische Endpunktstudien mit ausreichender Teststärke wären für den zweifelsfreien Nachweis der Interaktion und ihrer klinischen Relevanz wünschenswert. Die Koapplikation müsste hierbei allerdings idealerweise der gegenwärtigen klinischen Praxis entsprechen und nicht bereits im Vorfeld vom Gedanken geleitet sein, eine Interaktion durch vorangehende *ASS loading dose* zu umgehen. Ein solches Studiendesign würde jedoch bedeuten, Studienpatienten einem höheren Thromboserisiko auszusetzen und scheint auch angesichts der gegenwärtigen Befundlage nicht mehr ethisch vertretbar, so dass man den gegenwärtigen Stand der Forschung zur Interaktion von ASS und MAA vielleicht mit folgendem Dilemma umschreiben kann: „Wir wissen zu wenig, um uns der klinischen Relevanz zu 100% sicher zu sein, wir wissen zu viel, um die hierfür erforderlichen klinischen Randomisationsstudien noch ethisch vertreten zu können“.

## 4.5 Relevanz der Befunde und Ausblick

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass auf Basis der Befunde der vorliegenden Arbeit zu kardiochirurgischen Patienten und basierend auf Befunden zur Interaktion von ASS und MAA in anderen Patientengruppen von einer Komedikation mit ASS und Metamizol eher abzuraten ist. Hieraus ergibt sich die Frage, welche Therapiealternativen bestehen. Die Therapiemöglichkeiten umfassen den Ersatz von ASS, beispielsweise durch Gabe von ADP-Rezeptor-Antagonisten wie Clopidogrel (auch zusätzlich zur ASS-Therapie als duale Plättchenhemmung möglich) sowie den Ersatz von Metamizol durch andere nichtsteroidale Analgetika oder Opioid-Analgetika.

Betrachten wir zunächst die Alternativen zu einer ausschließlich ASS-basierten Plättchenhemmung. Bezüglich der dualen Plättchenhemmung mit ASS und ADP-Antagonisten sprechen metaanalytische Daten für eine Minderung von Bypassverschlüssen und Minderung der Mortalität ohne Zunahme schwerer Blutungen unter dualer Plättchenhemmung gegenüber ASS-Monotherapie [85]. Mehrere größere Beobachtungsstudien sprechen gegen vermehrte Blutungen oder verschlechtertes allgemeines Outcome unter postoperativer dualer Plättchenhemmung, verglichen mit alleiniger Thrombozytenfunktionshemmung durch ASS [86-89]. Insbesondere für Risikopatienten mit reaktiver Thrombozytose konnte gezeigt werden, dass eine duale

Plättchenhemmung mit ASS und Clopidogrel gegenüber einer „reinen“ ASS-Behandlung zu einer geringeren Inzidenz von Bypassverschlüssen führt [90]. Gleiches konnte in einer anderen Studie für Radialis-Bypässe gezeigt werden [91]. Eine duale Plättchenhemmung könnte sich also gegebenenfalls auch in der Risikogruppe der ASS-Metamizol-komedizierten Patienten als sinnvoll erweisen, dementsprechende Empfehlungen bedürften jedoch vorheriger Abklärung durch entsprechende prospektive klinische Studien. Nur für präoperativ begonnene duale Plättchenhemmung konnte in einer retrospektiven Beobachtungsstudie gezeigt werden, dass mit einem höheren Blutungsrisiko, wenn auch nicht mit einer signifikanten Zunahme der Mortalität gegenüber einer ASS-Monotherapie, zu rechnen ist [92].

Ein wohl naheliegenderer Umgang mit der Problematik der Interaktion von ASS und Metamizol ist jedoch im Ersatz der Metamizolanalgesie zu sehen. Dies gilt auch, weil Clopidogrel durch das polymorphe Cytochrom P450 2C19 (CYP2C19) in seinen aktiven Metaboliten überführt wird. Hieraus ergeben sich Problematiken verminderter Wirkung für sogenannte *poor metabolizer* und bei Komedikation mit Inhibitoren von CYP2C19. Unter letzteres fallen gängige Medikamentengruppen wie Protonenpumpenhemmer [93, 94].

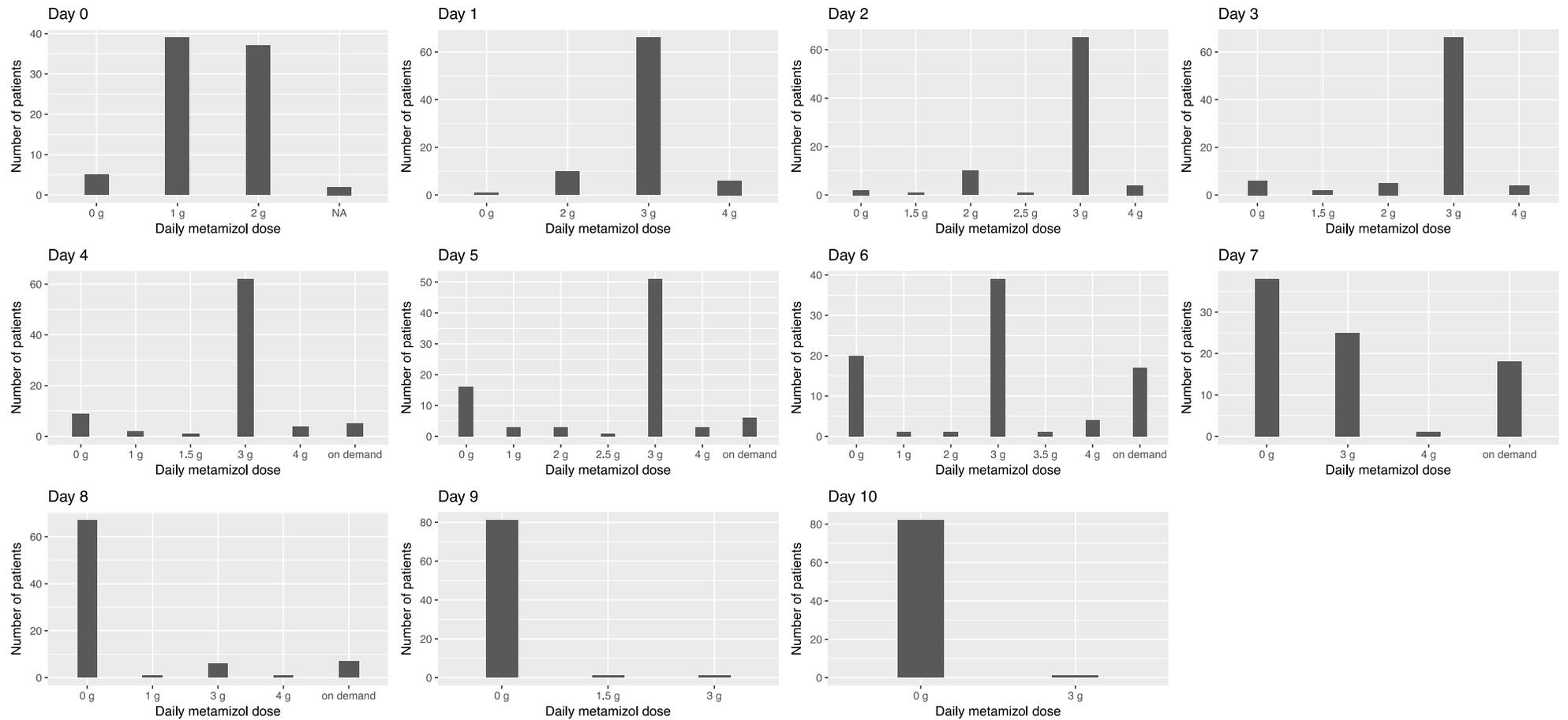
Metamizolfreie Analgesie nach koronararterieller Bypassoperation ist in der Praxis umfangreich erprobt, da in vielen Ländern (USA, Australien, Skandinavien) überhaupt keine Arzneimittelzulassung für Metamizol besteht. Als Alternative zu Metamizol kommen vornehmlich Opiate/Opioide in Betracht, zum einen, weil andere nichtsteroidale Analgetika ebenfalls zu Interaktionen mit ASS führen können [79], zum anderen, weil nationale Gesundheitsbehörden wie die Federal Drug Agency im Jahr 2005 für die USA basierend auf Zwischenfällen mit COX-2 Inhibitoren die Empfehlung ausgesprochen hat, nichtsteroidale Analgetika nach koronararterieller Bypassoperation als kontraindiziert zu deklarieren [95].

Bei Entscheidung zu Gunsten einer Opioidanalgesie ist die ideale Applikationsart zu diskutieren. Zwar zeigen einige Studiendaten, dass patientenkontrollierte Analgesie zu besserer Schmerzkontrolle führen kann [96], andererseits kann nachweislich auch eine durch das Pflegepersonal kontrollierte Anästhesie zu sehr guten analgetischen Ergebnissen führen [97]. Bei Bedenken bezüglich potentieller Atemdepression unter hochdosierter Opioid-Therapie wären regionalanästhetische Verfahren zur Senkung des Opioidbedarfs zu

erwägen [98]. Aufgrund der großen Zahl von Ländern ohne Zulassung für Metamizol liegen große Erfahrungswerte zur opioidbasierten Analgesie nach Bypassoperation vor, die eine Ersetzbarkeit der Metamizolanalgesie nahelegen. Zwar mag die Neigung zur vermehrten Verschreibung von Metamizol, „eine Metamizolepidemie“, verglichen mit einer Opioidepidemie das geringere Übel sein, für kardiochirurgische Patienten könnte jedoch durchaus anderes gelten [99, 100].

## 5 Anhang

## 5.1 Metamizol-Dosierung am OP-Tag und 10 postoperativen Tagen



Verteilung der verabreichten Dosierungen für Tag 0 (=Tag der OP) und die nachfolgenden zehn postoperativen Tage.

## 5.2 Bezugsquellen der Substanzen

Substanz	Bezugsquelle	Bestellnummer
Acetonitril	VWR, Radnor, Pennsylvania	83713.320
Acetylsalicylsäure als Aspirin i.v. 500mg	Bayer, Leverkusen, Deutschland	
Antipyrin	Professor Dr. H. Weber, Institut für Pharmazeutische Chemie, HHU Düsseldorf	
Arachidonsäure	Oxford Biomedical Research, Rochester Hills, Michigan, USA Merck Millipore, Billerica, Massachusetts, USA	AA10
CD41-PE	Beckman Coulter, Brea, Kalifornien, USA	A07781
CD62-PE	Beckman Coulter, Brea, Kalifornien, USA	IM1759U
Citronensäuremonohydrat	Merck Millipore, Billerica, Massachusetts, USA	100244
Dimethylsulfoxid	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	472301
Ethanol	Merck Millipore, Billerica, Massachusetts, USA	100983
Ethylendiamintetraessigsäure Titriplex III	Merck Millipore, Billerica, Massachusetts, USA	8418
Glucose	Merck Millipore, Billerica, Massachusetts, USA	108337
Hydroxyethylpiperazinyl-Ethansulfonsäure	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	H-3375
IgG1(Mouse)-PE	Beckman Coulter, Brea, Kalifornien, USA	A07796
Indometacin	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	2001865
Isoton II Diluent	Beckman Coulter, Brea, Kalifornien, USA	
Kaliumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland	P017.1
Magnesiumchlorid	Merck Millipore, Billerica, Massachusetts, USA	1058330250
Metamizol als Novaminsulfon-ratiopharm 500 mg/ml Tropfen	Ratiopharm, Ulm, Deutschland	
Methylaminoantipyrin	Professor Dr. H. Weber, Institut für Pharmazeutische Chemie, HHU Düsseldorf	
Natriumacetat	Merck Millipore, Billerica, Massachusetts, USA	6281
Natriumazid	Merck Millipore, Billerica, Massachusetts, USA	1066880
Natriumchlorid	Merck Millipore, Billerica, Massachusetts, USA	106404
Natriumhydrogencarbonat	Merck Millipore, Billerica, Massachusetts, USA	106329
Natriumhydrogenphosphat	Merck Millipore, Billerica, Massachusetts, USA	1370181000
Natriumhydroxid	Merck Millipore, Billerica, Massachusetts, USA	1064621000
Paraformaldehyd 4%	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland	P087.5
Tirofiban-Hydrochlorid als Aggrastad Infusionslösung 250 µg/ml	Iroko Cardio, jetzt Correvio International Sàrl, Genf, Schweiz	
Trinatriumcitratdihydrat	Merck Millipore, Billerica, Massachusetts, USA	1370425000
Trishydroxymethylaminomethan	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland	48552

## 5.3 Zusammensetzung der Lösungen

### Acetylsalicylsäure als Aspisol

Stoff	Konzentration	Molekulargewicht
Acetylsalicylsäure als Aspisol	0.5g/1 g	180 g/mol

### Alkoholische Natriumhydroxidösung

Stoff	Verdünnungsverhältnis	Molekulargewicht
100 mM NaOH x Ethanol	0.4g/100 ml	40.0 g/mol

### Acid-Citrat-Dextrose-Stabilisator

Stoff	Konzentration	Verdünnungsverhältnis	Molekulargewicht
Natriumcitrat x H <sub>2</sub> O	74.8 mM	1.930 g/100 ml	258.06 g/mol
Citrat x H <sub>2</sub> O	65 mM	1.249 g/100 ml	192.12 g/mol

### Antipyrin-Stammlösung

Stoff	Konzentration	Verdünnungsverhältnis	Molekulargewicht
Antipyrin x H <sub>2</sub> O	10 mM	1.882 mg/1 ml	188.2 g/mol

### EDTA

Stoff	Konzentration	Verdünnungsverhältnis	Molekulargewicht
Titriplex III x Mili-Q	77 mM	2.866 g/100 ml	372.24 g/mol

### Indometacin

Stoff	Verdünnungsverhältnis	Molekulargewicht
50 mM Indometacin x Ethanol	18 mg/1 ml	357.8 g/mol

### MAA-Stammlösung

Stoff	Konzentration	Verdünnungsverhältnis	Molekulargewicht
MAA x H <sub>2</sub> O	10 mM	2.537 mg/1 ml	253.73 g/mol

### TM-Puffer pH 7.4

Stoff	Verdünnungsverhältnis	Molekulargewicht
134 mM NaCl	7.8400 g/l	58.44 g/mol
12 mM NaHCO <sub>3</sub>	1.0080 g/l	84.01 g/mol
2.9 mM KCl	0.2160 g/l	74.56 g/mol
0.36 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	0.0497 g/l	137.99 g/mol
1 mM MgCl <sub>2</sub> x H <sub>2</sub> O	0.2030 g/l	203.31 g/mol
5 mM HEPES	1.1920 g/l	238.30 g/mol

### Tris-Puffer pH 7.4

Stoff	Verdünnungsverhältnis	Molekulargewicht
50 mM Trishydroxymethylaminomethan x Mili-Q	6.057 g/l	121.14 g/mol

## 5.4 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Gerätetyp	Modell	Hersteller
Aggregometer	APACT	Labor, Hamburg, Deutschland
<i>Butterflies</i> zur Blutentnahme	Vacutainer Safety-Lok <i>Butterflies</i>	Beckton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA
Citratröhrchen	Vacutainer plus Citratröhrchen mit 2.7 ml	Beckton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA
Durchflusszytometer	Guava easyCyte5	Merck Millipore, Billerica, Massachusetts, USA
Eppendorf Cups	Safe-Lock Tubes 2.0 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Eppendorf Cups	Safe-Lock Tubes 1.5 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Eppendorf Cups	Safe-Lock Tubes 0.5 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Falcons	Greiner centrifuge tubes 15 ml	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Feinwaage	XS204 DeltaRange	Mettler-Toledo, Columbus, Ohio, USA
Heizblock	Thermomixer 5436	Firma Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Küvetten	Cuvette micro mit Mixer im Dispo System	LabiTec, Ahrensburg, Deutschland
Pipetten	Pipetman classic	Gilson, Middleton, Wisconsin, USA
Pipettenspitzen	1000 µl Graduated Tip, 1000 Tips Bag	Starlab, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen	200 µl Graduated Tip, 1000 Tips Bag	Starlab, Hamburg, Deutschland
Schreiber	Packard model 621	Packard Instrument Company, später Packard BioScience, jetzt PerkinElmer, Waltham, Massachusetts, USA
Spritzen	Braun Injekt 20ml, Luer solo	Braun, Melsungen, Deutschland
Spritzen	Braun Injekt 10ml, Luer solo	Braun, Melsungen, Deutschland
Spritzen	Braun U-40 Insulin, 40 I.U.	Braun, Melsungen, Deutschland

Spritzen	Priginal Perfusor Syringe 50 ml, Luer lock	Braun, Melsungen, Deutschland
Stoppuhr	Hanhart Mesotron Quartz	Hanhart, Gütenbach, Deutschland
Thromboxan B <sub>2</sub> Messung	Thromboxane B <sub>2</sub> ELISA Kit 501020	Cayman Chemical, Ann Arbor, USA
Vortex	REAX 2000	Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland
Zentrifuge	Minifuge RF	Heraeus, Hanau, Deutschland
Zentrifuge	Centrifuge 5415	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge	Mikro 200R	Hettich Lab Technology, Mülheim an der Ruhr, Deutschland

## HPLC

### Säule

EC 125/4 Nucleodur C18 Pyramid, 3 µm

REF 760260.40

SN E 10080315

Lot 4025

seit dem 04.01.2011 in Gebrauch

mit wässrigem Eluenten

Länge: 125mm Durchmesser: 4mm Säulenvolumen: 2.11 ml

### Eluent

Eine mobile Phase, kein Gradient:

87% Natrium-Acetat (30 mM) MG: 82.04 g/mol

13% Acetonitril

0.02% (w/n) NaN<sub>3</sub> (200 mg/L gegen Verkeimen des Puffers)

ph 5.6

### Pumpe

L 6200 Intelligent Pump, Merck Hitachi

Flow: 0.5 ml/min Druck: 200mbar, Betrieb mit 80-120mbar

### UV-Detektor

LaChrom UV-VIS Detektor L7420, Merck Hitachi)

WL 257nm

**Injektionspritze**

100 µl Hamilton Typ 1710 N pst 3

Länge: 51mm, Durchmesser: 0.72mm

**Eichreihen**

Proteinfreie Probe

500 µl PAP + 5 µl Antipyrin

Überführung in Microsep 3K Omega (Pall, VWR, Trenngrenze MWCO 3k, grau,  
Bestellnummer: 516-8488)

Im Verlauf Microsep 3K nicht mehr verfügbar, dann:

Überführung in Nanosep 3K Omega (Pall, VWR, Trenngrenze MWCO 3k, grau  
Bestellnummer: 516-0584)

Zentrifugation 1-2h 10000rpm 20°C (Mikro 200R, Hettich)

## 6 Literatur

1. Hohlfeld, T., et al., *Pyrazolinone analgesics prevent the antiplatelet effect of aspirin and preserve human platelet thromboxane synthesis*. Journal of Thrombosis and Haemostasis, 2008. **6**(1): p. 166-173.
2. Polzin, A., et al., *Dipyron (metamizole) can nullify the antiplatelet effect of aspirin in patients with coronary artery disease*. Journal of the American College of Cardiology, 2013. **62**(18): p. 1725-1726.
3. Dannenberg, L., et al., *Dipyron comedication in aspirin treated stroke patients impairs outcome*. Vascular Pharmacol, 2016. **87**: p. 66-69.
4. Schmitz, A., et al., *Dipyron (metamizole) markedly interferes with platelet inhibition by aspirin in patients with acute and chronic pain: A case-control study*. Eur J Anaesthesiol, 2017. **34**(5): p. 288-296.
5. Wilczynski, M., et al., *Metamizole and Platelet Inhibition by Aspirin Following On-Pump Coronary Artery Bypass Grafting*. J Cardiothorac Vasc Anesth, 2017.
6. Zimmermann, N., E. Gams, and T. Hohlfeld, *Aspirin in coronary artery bypass surgery: new aspects of and alternatives for an old antithrombotic agent*. European Journal of Cardio-Thoracic Surgery, 2008. **34**(1): p. 93-108.
7. Mangano, D.T. and G. Multicenter Study of Perioperative Ischemia Research, *Aspirin and mortality from coronary bypass surgery*. N Engl J Med, 2002. **347**(17): p. 1309-17.
8. Biondi-Zoccai, G.G.L., et al., *A systematic review and meta-analysis on the hazards of discontinuing or not adhering to aspirin among 50 279 patients at risk for coronary artery disease*. European Heart Journal, 2006. **27**(22): p. 2667-2674.
9. Goldman, S., et al., *Improvement in early saphenous vein graft patency after coronary artery bypass surgery with antiplatelet therapy: results of a Veterans Administration Cooperative Study*. Circulation, 1988. **77**(6): p. 1324-32.
10. Goldman, S., et al., *Saphenous vein graft patency 1 year after coronary artery bypass surgery and effects of antiplatelet therapy. Results of a Veterans Administration Cooperative Study*. Circulation, 1989. **80**(5): p. 1190-7.
11. Hage, A., et al., *Eight-year follow-up of the Clopidogrel After Surgery for Coronary Artery Disease (CASCADE) trial*. J Thorac Cardiovasc Surg, 2018. **155**(1): p. 212-222 e2.
12. Kötter, T., et al., *Metamizole-associated adverse events: a systematic review and meta-analysis*. PloS one, 2015. **10**(4): p. e0122918.
13. Behnke, H., et al., *Postoperative pain therapy in minimally invasive direct coronary arterial bypass surgery. I.v. opioid patient-controlled analgesia versus intercostal block*. Anaesthesist, 2002. **51**(3): p. 175-9.
14. Lijfering, W.M., et al. *Relationship between venous and arterial thrombosis: a review of the literature from a causal perspective*. in *Seminars in thrombosis and hemostasis*. Semin Thromb Hemost, 2011. **37**(8): p.885-96.
15. Jerjes-Sanchez, C., *Venous and arterial thrombosis: a continuous spectrum of the same disease?* Eur Heart J, 2005. **26**(1): p. 3-4.
16. Goto, S., et al., *Distinct mechanisms of platelet aggregation as a consequence of different shearing flow conditions*. J Clin Invest, 1998. **101**(2): p. 479.
17. Frenette, P.S., et al., *Platelets roll on stimulated endothelium in vivo: an interaction mediated by endothelial P-selectin*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1995. **92**(16): p. 7450-7454.

18. Romo, G.M., et al., *The glycoprotein Ib-IX-V complex is a platelet counterreceptor for P-selectin*. Journal of Experimental Medicine, 1999. **190**(6): p. 803-814.
19. Kulkarni, S., et al., *A revised model of platelet aggregation*. Journal of Clinical Investigation, 2000. **105**(6): p. 783.
20. Stalker, T.J., et al., *Platelet signaling*. Handb Exp Pharmacol, 2012. (210):p 59–85.
21. MA, Y.Q., J. Qin, and E. Plow, *Platelet integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3: activation mechanisms*. Journal of Thrombosis and Haemostasis, 2007. **5**(7): p. 1345-1352.
22. Hechler, B. and C. Gachet, *P2 receptors and platelet function*. Purinergic signalling, 2011. **7**(3): p. 293.
23. Merten, M. and P. Thiagarajan, *P-selectin expression on platelets determines size and stability of platelet aggregates*. Circulation, 2000. **102**(16): p. 1931-1936.
24. Au, A.E. and E.C. Josefsson, *Regulation of platelet membrane protein shedding in health and disease*. Platelets, 2017. **28**(4): p. 342-353.
25. FitzGerald, G.A., *Mechanisms of platelet activation: thromboxane A2 as an amplifying signal for other agonists*. Am J Cardiol, 1991. **68**(7): p. B11-B15.
26. Needleman, P., et al., *Identification of an enzyme in platelet microsomes which generates thromboxane A2 from prostaglandin endoperoxides*. Nature, 1976. **261**(5561): p. 558-560.
27. Du, G., Q. Lin, and J. Wang, *A brief review on the mechanisms of aspirin resistance*. International journal of cardiology, 2016. **220**: p. 21-26.
28. Paniccia, R., et al., *Platelet function tests: a comparative review*. Vascular health and risk management, 2015. **11**: p. 133.
29. Duke, W., *The relation of blood platelets to hemorrhagic disease: description of a method for determining the bleeding time and coagulation time and report of three cases of hemorrhagic disease relieved by transfusion*. J Am Med Assoc, 1910. **55**(14): p. 1185-1192.
30. Born, G. and M. Cross, *The aggregation of blood platelets*. J Physiol, 1963. **168**(1): p. 178-195.
31. Born, G., et al., *Quantification of the morphological reaction of platelets to aggregating agents and of its reversal by aggregation inhibitors*. J Physiol, 1978. **280**(1): p. 193-212.
32. Mohring, A., et al., *Thromboxane Formation Assay to Identify High On-Treatment Platelet Reactivity to Aspirin*. Pharmacology, 2017. **100**(3-4): p. 127-130.
33. Koltai, K., et al., *Platelet Aggregometry Testing: Molecular Mechanisms, Techniques and Clinical Implications*. Int J Mol Sci, 2017. **18**(8).
34. Collet, J.P., et al., *Bedside monitoring to adjust antiplatelet therapy for coronary stenting*. N Engl J Med, 2012. **367**(22): p. 2100-9.
35. Cayla, G., et al., *Platelet function monitoring to adjust antiplatelet therapy in elderly patients stented for an acute coronary syndrome (ANTARCTIC): an open-label, blinded-endpoint, randomised controlled superiority trial*. Lancet, 2016. **388**(10055): p. 2015-2022.
36. Lopez, L.R., et al., *Platelet thromboxane (11-dehydro-Thromboxane B2) and aspirin response in patients with diabetes and coronary artery disease*. World J Diabetes, 2014. **5**(2): p. 115-27.
37. Schwabe and Paffrath, *Arzneiverordnungs-Report 2015*. 2015: Berlin, Springer, p. 311-313.
38. Bedenis, R., et al., *Antiplatelet agents for preventing thrombosis after peripheral arterial bypass surgery*. Cochrane Database Syst Rev., 2015. **19**(2):CD000535.
39. Floyd, C.N. and A. Ferro, *Mechanisms of aspirin resistance*. Pharmacology & Therapeutics, 2014. **141**(1): p. 69-78.

40. Karmali, K.N., et al., *Drugs for primary prevention of atherosclerotic cardiovascular disease: an overview of systematic reviews*. JAMA Cardiology, 2016. **1**(3): p. 341-349.
41. Sutcliffe, P., et al., *Aspirin for prophylactic use in the primary prevention of cardiovascular disease and cancer: a systematic review and overview of reviews*. Health technology assessment (Winchester, England), 2013. **17**(43): p. 1.
42. Schrör, K. *Aspirin and platelets: the antiplatelet action of aspirin and its role in thrombosis treatment and prophylaxis*. in *Seminars in thrombosis and hemostasis*. 1997. , 1997. **23**(4): p. 349-56.
43. Schrör, K., *Acetylsalicylic acid*. 2016: New Jersey Wiley-Blackwell: p. 56.
44. Diener, H., et al., *European Stroke Prevention Study 2. Dipyridamole and acetylsalicylic acid in the secondary prevention of stroke*. J Neurological Sci, 1996. **143**(1): p. 1-13.
45. Baigent, C., et al., *Aspirin in the primary and secondary prevention of vascular disease: collaborative meta-analysis of individual participant data from randomised trials*. Lancet, 2009. **373**(9678): p. 1849–1860.
46. Freissmuth, M. and S. Böhm, *Pharmakologie und Toxikologie*. 2012: Berlin: Springer-Verlag: p. 870.
47. Levy, G., *Clinical pharmacokinetics of aspirin*. Pediatrics, 1978. **62**(5s): p.867-872.
48. Mitchell, J.A., et al., *Selectivity of nonsteroidal antiinflammatory drugs as inhibitors of constitutive and inducible cyclooxygenase*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1993. **90**(24): p. 11693-11697.
49. Zidar, N., et al., *Cyclooxygenase in normal human tissues—is COX-1 really a constitutive isoform, and COX-2 an inducible isoform?* J Cell Mol Med, 2009. **13**(9b): p. 3753-3763.
50. Rocca, B., et al., *Cyclooxygenase-2 expression is induced during human megakaryopoiesis and characterizes newly formed platelets*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2002. **99**(11): p. 7634-7639.
51. Luong, C., et al., *Flexibility of the NSAID binding site in the structure of human cyclooxygenase-2*. Nature Structural & Molecular Biology, 1996. **3**(11): p. 927-933.
52. Kurumbail, R.G., et al., *Structural basis for selective inhibition of cyclooxygenase-2 by anti-inflammatory agents*. Nature, 1996. **384**(6610): p. 644.
53. Simmons, D.L., R.M. Botting, and T. Hla, *Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition*. Pharmacological Reviews, 2004. **56**(3): p. 387-437.
54. Loll, P.J., D. Picot, and R.M. Garavito, *The structural basis of aspirin activity inferred from the crystal structure of inactivated prostaglandin H2 synthase*. Nature Structural & Molecular Biology, 1995. **2**(8): p. 637-643.
55. Rowlinson, S.W., et al., *Spatial Requirements for 15-(R)-Hydroxy-5Z, 8Z, 11Z, 13E-eicosatetraenoic Acid Synthesis within the Cyclooxygenase Active Site of Murine COX-2 WHY ACETYLATED COX-1 DOES NOT SYNTHESIZE 15-(R)-HETE*. J Biol Chem, 2000. **275**(9): p. 6586-6591.
56. Saxena, A., et al., *Drug/drug interaction of common NSAIDs with antiplatelet effect of aspirin in human platelets*. European journal of pharmacology, 2013. **721**(1): p. 215-224.
57. Gladding, P.A., et al., *The antiplatelet effect of six non-steroidal anti-inflammatory drugs and their pharmacodynamic interaction with aspirin in healthy volunteers*. Am J Cardiol, 2008. **101**(7): p. 1060-1063.
58. Schwabe, U., et al., *Arzneiverordnungs-Report 2018*. 2018: Berlin, Springer-Verlag: p. 299.

59. Jasiocka, A., T. Maślanka, and J. Jaroszewski, *Pharmacological characteristics of metamizole*. Polish Journal of Veterinary Sciences, 2014. **17**(1): p. 207-214.
60. Hinz, B., et al., *Dipyrone elicits substantial inhibition of peripheral cyclooxygenases in humans: new insights into the pharmacology of an old analgesic*. FASEB J, 2007. **21**(10): p. 2343-51.
61. Zylber-Katz, E., L. Granit, and M. Levy, *Formation and excretion of dipyrone metabolites in man*. Eur J Clin Pharmacol, 1992. **42**(2): p. 187-191.
62. Gulmez, S.E., H. Gurdal, and F.C. Tulunay, *Airway smooth muscle relaxations induced by dipyrone*. Pharmacology, 2006. **78**(4): p. 202-208.
63. Shimada, S.G., I.G. Otterness, and J.T. Stitt, *A study of the mechanism of action of the mild analgesic dipyrone*. Inflammation Research, 1994. **41**(3): p. 188-192.
64. Hernández, N. and H. Vanegas, *Antinociception induced by PAG-microinjected dipyrone (metamizol) in rats: involvement of spinal endogenous opioids*. Brain Res, 2001. **896**(1): p. 175-178.
65. Siebel, J.S., A. Beirith, and J.B. Calixto, *Evidence for the involvement of metabotropic glutamatergic, neurokinin 1 receptor pathways and protein kinase C in the antinociceptive effect of dipyrone in mice*. Brain Res, 2004. **1003**(1): p. 61-67.
66. Nassini, R., et al., *The TRPA1 channel mediates the analgesic action of dipyrone and pyrazolone derivatives*. Br J Pharmacol, 2015. **172**(13): p. 3397-3411.
67. Achilles, A., et al., *Analgesic medication with dipyrone in patients with coronary artery disease: Relation to MACCE*. Int J Cardiol, 2017. **236**: p. 76-81.
68. Pierre, S., et al., *Inhibition of cyclooxygenases by dipyrone*. Br J Pharmacol, 2007. **151**(4): p. 494-503.
69. Polzin, A., et al., *Prevention of dipyrone (metamizole) induced inhibition of aspirin antiplatelet effects*. Thromb Haemost, 2015. **114**(1): p. 87-95.
70. Rowland, M. and S. Riegelman, *Pharmacokinetics of acetylsalicylic acid and salicylic acid after intravenous administration in man*. J Pharmaceutical Sci, 1968. **57**(8): p. 1313-1319.
71. Zylber-Katz, E., L. Granit, and M. Levy, *Formation and excretion of dipyrone metabolites in man*. Eur J Clin Pharmacol, 1992. **42**(2): p. 187-91.
72. Chesebro, J.H., et al., *Effect of dipyridamole and aspirin on late vein-graft patency after coronary bypass operations*. N Engl J Med, 1984. **310**(4): p. 209-14.
73. Hillis, L.D., et al., *2011 ACCF/AHA Guideline for Coronary Artery Bypass Graft Surgery. A report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. Developed in collaboration with the American Association for Thoracic Surgery, Society of Cardiovascular Anesthesiologists, and Society of Thoracic Surgeons*. J Am Coll Cardiol, 2011. **58**(24): p. e123-210.
74. Bagheri, S., *NSAIDs verhindern die Thrombozytenaggregationshemmung durch Acetylsalicylsäure: Entwicklung eines enzymkinetischen Modells, experimentelle Überprüfung und mögliche Konsequenzen für die klinische Anwendung*, in *Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie*. 2015, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf: Düsseldorf.
75. Arthur, J.F., K. Jandeleit-Dahm, and R.K. Andrews, *Platelet Hyperreactivity in Diabetes: Focus on GPVI Signaling-Are Useful Drugs Already Available?* Diabetes, 2017. **66**(1): p. 7-13.
76. Fuentes, E. and I. Palomo, *Role of oxidative stress on platelet hyperreactivity during aging*. Life Sci, 2016. **148**: p. 17-23.
77. Dillinger, J.G., et al., *High platelet reactivity on aspirin in patients with acute ST elevation myocardial infarction*. Thromb Res, 2016. **144**: p. 56-61.

78. Zimmermann, N., et al., *Is cardiopulmonary bypass a reason for aspirin resistance after coronary artery bypass grafting?* Eur J Cardiothorac Surg, 2005. **27**(4): p. 606-610.
79. Saxena, A., et al., *Drug/drug interaction of common NSAIDs with antiplatelet effect of aspirin in human platelets.* Eur J Pharmacol, 2013. **721**(1-3): p. 215-24.
80. Ashley, K.E. and A.M. Lincoff, *Pharmacologic inhibition of platelet function: correlation between in vitro tests of platelet function and clinical outcomes.* Am J Cardiovasc Drugs, 2008. **8**(5): p. 283-95.
81. Valles, J., et al., *Partial inhibition of platelet thromboxane A2 synthesis by aspirin is associated with myonecrosis in patients with ST-segment elevation myocardial infarction.* Am J Cardiol, 2007. **99**(1): p. 19-25.
82. Larsen, S.B., et al., *Increased platelet aggregation and serum thromboxane levels in aspirin-treated patients with prior myocardial infarction.* Thromb Haemost, 2012. **108**(1): p. 140-7.
83. Cangemi, R., et al., *Platelet activation is associated with myocardial infarction in patients with pneumonia.* J Am Coll Cardiol, 2014. **64**(18): p. 1917-25.
84. Le Quellec, S., et al., *Comparison of current platelet functional tests for the assessment of aspirin and clopidogrel response. A review of the literature.* Thromb Haemost, 2016. **116**(4): p. 638-50.
85. Agarwal, N., et al., *Meta-Analysis of Aspirin Versus Dual Antiplatelet Therapy Following Coronary Artery Bypass Grafting.* Am J Cardiol, 2018. **121**(1): p. 32-40.
86. Kim, D.H., et al., *Aspirin and clopidogrel use in the early postoperative period following on-pump and off-pump coronary artery bypass grafting.* J Thorac Cardiovasc Surg, 2009. **138**(6): p. 1377-1384.
87. Straus, S., et al., *A Difference in Bleeding and Use of Blood and Blood Products in Patients who Were Preoperatively on Aspirin or Dual Antiplatelet Therapy Before Coronary Artery Bypass Grafting.* Med Arch, 2018. **72**(1): p. 31-35.
88. Ebrahimi, R., et al., *Comparison of Outcomes and Costs Associated With Aspirin +/- Clopidogrel After Coronary Artery Bypass Grafting.* Am J Cardiol, 2018. **121**(6): p. 709-714.
89. Gurbuz, A.T., et al., *Postoperative clopidogrel improves mid-term outcome after off-pump coronary artery bypass graft surgery: a prospective study.* Eur J Cardiothorac Surg, 2006. **29**(2): p. 190-5.
90. Kayacioglu, I., et al., *The Role of Clopidogrel and Acetylsalicylic Acid in the Prevention of Early-Phase Graft Occlusion Due to Reactive Thrombocytosis after Coronary Artery Bypass Operation.* Heart Surg Forum, 2008. **11**(3):E152-7.
91. Kulik, A., et al., *Aspirin plus clopidogrel versus aspirin alone after coronary artery bypass grafting: the clopidogrel after surgery for coronary artery disease (CASCADE) Trial.* Circulation, 2010. **122**(25): p. 2680-7.
92. Tomsic, A., et al., *Coronary artery bypass grafting-related bleeding complications in patients treated with dual antiplatelet treatment.* Eur J Cardiothorac Surg, 2016. **50**(5): p. 849-856.
93. Notarangelo, F.M., et al., *Pharmacogenomic Approach to Selecting Antiplatelet Therapy in Patients With Acute Coronary Syndromes: The PHARMCLO Trial.* J Am Coll Cardiol, 2018. **71**(17): p. 1869-1877.
94. Frelinger, A.L., 3rd, et al., *A randomized, 2-period, crossover design study to assess the effects of dexlansoprazole, lansoprazole, esomeprazole, and omeprazole on the steady-state pharmacokinetics and pharmacodynamics of clopidogrel in healthy volunteers.* J Am Coll Cardiol, 2012. **59**(14): p. 1304-11.

95. Kulik, A., et al., *Non-steroidal anti-inflammatory drug administration after coronary artery bypass surgery: utilization persists despite the boxed warning*. *Pharmacoepidemiol Drug Saf*, 2015. **24**(6): p. 647-53.
96. Imantalab, V., et al., *Comparing the Effectiveness of Patient Control Analgesia Pump and Bolus Morphine in Controlling Pain After Cardiopulmonary Bypass Graft Surgery*. *Anesth Pain Med*, 2017. **7**(5): p. e12756.
97. Sondekoppam, R.V., et al., *Pain and inflammatory response following off-pump coronary artery bypass grafting*. *Curr Opin Anaesthesiol*, 2014. **27**(1): p. 106-15.
98. Elmore, B., et al., *Pain Management Following Thoracic Surgery*. *Thorac Surg Clin*, 2015. **25**(4): p. 393-409.
99. Reist, L., et al., *Dipyrone is the preferred nonopioid analgesic for the treatment of acute and chronic pain. A survey of clinical practice in German-speaking countries*. *Eur J Pain*, 2018. **22**(6): p. 1103-1112.
100. deShazo, R.D., et al., *Backstories on the US Opioid Epidemic. Good Intentions Gone Bad, an Industry Gone Rogue, and Watch Dogs Gone to Sleep*. *Am J Med*, 2018. **131**(6): p. 595-601.

## Danksagung

Für die Möglichkeit zur Dissertation am Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie möchte ich mich bei Herrn Professor Dr. J. Fischer bedanken.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. T. Hohlfeld für das Thema der Dissertation und die hervorragende Betreuung im Rahmen der Dissertation. Insbesondere auch die konstruktiven kritischen Anmerkungen zu dem Manuskript der Dissertation sowie zum Poster waren stets ein großer Erkenntnisgewinn für mich.

Mein Dank gilt außerdem Herrn Professor Dr. N. Zimmermann für das Probenmaterial aus Heidelberg und die minutiöse Dokumentation, die schon alleine, aber insbesondere auch parallel zur klinischen Tätigkeit, allerhöchsten Respekt abnötigt.

Bei Frau Kirsten Bartkowski möchte ich mich ganz besonders bedanken, für die hervorragenden Einführungen in die Labortätigkeiten und ihren fachlichen Rat. Insbesondere möchte ich mich aber auch dafür bedanken, dass sie eine Laboratmosphäre von fachlicher Präzision mit so angenehmem Umgang und Humor vereint.

Zuletzt möchte ich mich selbstverständlich auch bei den Heidelberger Patienten und Düsseldorfer Probanden bedanken, ohne die alle Seiten hier leer wären.