

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

**Pharmakologische Interaktion des Analgetikums  
Propyphenazon mit der  
Thrombozytenfunktionshemmung durch  
Acetylsalicylsäure**

Dissertation

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

vorgelegt von  
Miriam Tienken

2020

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

gez.:

Dekan/in: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter/in: Prof. Dr. med. Thomas Hohlfeld

Zweitgutachter/in: Univ.-Prof. Dr. med. Hubert Schelzig

**- Für Erika Schulten -**

**Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:**

Posterpräsentation auf dem Kongress der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie, Herztage 2018, Berlin, 11. Oktober 2018

Tienken M, Twarock S, Hohlfeld T. Pharmakologische Interaktion des rezeptfreien Analgetikums Propyphenazon mit der Plättchenhemmung durch Acetylsalicylsäure.

Abstract publiziert in *Clinical Research in Cardiology*, Oktober 2018, Volume 107, Supplement 3: BS246

Tienken M, Twarock S, Hohlfeld T. Pharmakologische Interaktion des rezeptfreien Analgetikums Propyphenazon mit der Plättchenhemmung durch Acetylsalicylsäure.

## **Abstract in deutscher Sprache**

Vorarbeiten haben gezeigt, dass das Pyrazol-Analgetikum Metamizol in klinisch relevanter Konzentration die Hemmung der Thrombozytenfunktion durch Acetylsalicylsäure (ASS) teilweise oder ganz verhindert. Ob diese Arzneimittelinteraktion auch für das in Deutschland rezeptfrei erhältliche, zur Zahnschmerzbehandlung zugelassene Pyrazol Propyphenazon zutrifft, ist nicht bekannt.

Um dies zu untersuchen, wurde an thrombozytenreichem Plasma gesunder Spender durch Zusatz von Arachidonsäure oder Kollagen die Aggregation (Lichttransmissionsaggregometrie) und die Thromboxansynthese (TXB<sub>2</sub>, Immunoassay) induziert und die konzentrationsabhängige Hemmung der Blutplättchen *in vitro* durch ASS in Kombination mit Propyphenazon analysiert. Darüber hinaus wurde untersucht, ob Propyphenazon mit der Arachidonsäure-induzierten p-Selektinexpression interferiert (Durchflusszytometrie).

ASS allein hemmte erwartungsgemäß die Arachidonsäure- und Kollagen-induzierte Aggregation vollständig. In Gegenwart von Propyphenazon wurde die Hemmung durch ASS signifikant reduziert. Die Interaktion zwischen Propyphenazon und ASS betraf auch die Arachidonsäure- und Kollagen-induzierte TXA<sub>2</sub>-Synthese. Somit wurde in Gegenwart von ASS und Propyphenazon signifikant mehr TXB<sub>2</sub> gemessen als mit ASS allein. Mit dem TXA<sub>2</sub>-Rezeptorantagonisten Ramatroban und mit dem nicht selektiven Cyclooxygenase-Hemmer Indometazin war keine Interaktion nachweisbar. Propyphenazon allein erzielte eine (reversible) Hemmung der Arachidonsäure- und Kollagen-induzierten Aggregation in höheren Konzentrationen. Die Arachidonsäure-induzierte p-Selektinexpression wurde durch ASS und Propyphenazon allein inhibiert, hier konnte keine Interaktion beobachtet werden.

Das in Deutschland rezeptfrei erhältliche Analgetikum Propyphenazon kann, vergleichbar mit Metamizol, die Hemmung wesentlicher Parameter der Thrombozytenfunktion (Aggregation, Thromboxansynthese) durch ASS im Sinne einer unerwünschten Arzneimittelinteraktion *in vitro* abschwächen oder aufheben. Ein möglicher Mechanismus ist die Konkurrenz am aktiven Zentrum der thrombozytären Cyclooxygenase (COX-1). Dies kann bei Kombination von Propyphenazon mit ASS in einer unvollständigen und möglicherweise unzureichenden Plättchenhemmung durch ASS resultieren (1).

## **Abstract in englischer Sprache**

Preliminary studies have shown that the pyrazole analgesic metamizol (dipyrone) interferes with the inhibition of platelet thromboxane synthesis and aggregation by acetylsalicylic acid (ASA). The knowledge about a conceivable interaction between propyphenazone, an analgesic approved without a prescription in Germany for the treatment of toothache, and ASA is only insufficient.

To investigate this, arachidonic acid and collagen-induced aggregation (light transmission aggregometry) as well as platelet thromboxane formation (TXB<sub>2</sub>, immunoassay) were studied using platelet-rich plasma of healthy donors. These methods were served to determine the concentration-dependent inhibition of platelets *in vitro* by ASA with propyphenazone in a wide range of different concentrations. In addition, this work investigated whether propyphenazone interferes with arachidonic acid-induced platelet p-selectin expression (flow cytometry).

As expected, ASA alone completely inhibited arachidonic acid and collagen-induced aggregation. The presence of propyphenazone lead to significantly less inhibition by ASA. The interaction also affected arachidonic acid and collagen-induced TXA<sub>2</sub> synthesis. Thus, significantly more TXB<sub>2</sub> was measured in the presence of ASA and propyphenazone than with ASA alone. With the TXA<sub>2</sub> receptor antagonist ramatroban and with the non-selective COX inhibitor indomethacin no interaction was detectable. Propyphenazone alone achieved a (reversible) inhibition of arachidonic acid- and collagen-induced aggregation in higher concentrations. ASA and propyphenazone alone inhibited arachidonic acid-induced p-selectin expression, but there was no interaction.

The analgesic propyphenazone, which is available over the counter in Germany without prescription, can, similar to metamizol, reduce or eliminate the inhibition of essential parameters of platelet function (aggregation, thromboxane synthesis) by ASA *in vitro* in the sense of an undesired drug interaction. A possible mechanism is the competition at the active site of platelet cyclooxygenase (COX-1). This may result in insufficient platelet inhibition by ASA when propyphenazone is administered together with ASA for antiplatelet therapy (1).

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACD	Sodium Citrat-Citric Acid-Dextran
Ara	Arachidonsäure
ASS	Acetylsalicylsäure
BfArM	Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte
CD	Cluster of Differentiation
COX	Cyclooxygenase
DMSO	Dimethylsulfoxid
DuP-697	5-Brom-2-(4-Fluorphenyl)-3-(4-Methylsulfonyl) Thiophene
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
GP	Glykoprotein
HAPR	high-on Aspirin Plateled Reactivity
i.v.	intravenös
IgG	Immunglobulin G
Kol	Kollagen
MAA	4-Methylaminoantipyrin
n.s.	nicht signifikant
NS-398	N-(2-Cyclohexyloxy-4-Nitrophenyl) Methansulfonamide
NSAR	nichtsteroidalen Antirheumatika
PAP	plättchenarmes Plasma
PE	Phycoerythrin
PP	Propyphenazon
PRP	plättchenreiches Plasma
s.	siehe
SEM	Standard Error of the mean, Standardfehler
TM	Thrombozytenmedium
Tris-Puffer	Trishydroxymethylaminomethan-Puffer
TRPA1	Transient Rezeptor Potential Ankyrin 1
TXA <sub>2</sub> , TXB <sub>2</sub>	Thromboxan A <sub>2</sub> , Thromboxan B <sub>2</sub>
U/min	Umdrehungen/ Minute

## Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung .....	1
1.1. Problemstellung .....	1
1.2. Prinzipien der zellulären Hämostasie .....	1
1.3. Propyphenazon.....	2
1.4. Acetylsalicylsäure .....	8
1.5. Ziele der Arbeit .....	12
2. Material und Methoden .....	13
2.1. Allgemeines .....	13
2.2. Lichttransmissionsaggregometrie .....	19
2.3. Thromboxan B <sub>2</sub> Bestimmungen .....	27
2.4. Durchflusszytometrie .....	30
2.5. Auswertung der Ergebnisse.....	34
3. Ergebnisse .....	36
3.1. Messungen zur Interaktion von ASS und Propyphenazon.....	36
3.2. Messungen zur Hemmung der Thrombozyten durch Propyphenazon .....	45
3.3. Vergleich der Interaktion von ASS und Propyphenazon zur Hemmung der Thrombozyten durch Propyphenazon .....	52
3.4. Untersuchung möglicher Interaktionen von Propyphenazon mit Indometazin und Ramatroban .....	55
4. Diskussion.....	58
4.1. Interaktion zwischen ASS und Propyphenazon .....	58
4.2. Hemmung der Thrombozyten durch Propyphenazon und Vergleich zur Interaktion von ASS und Propyphenazon .....	62
4.3. Ramatroban und Indometazin .....	63
4.4. Bedeutung der untersuchten Parameter der Thrombozytenaktivierung .....	65
4.5. Ausblick: Möglichkeiten zur Vermeidung der Interaktion zwischen Propyphenazon und ASS .....	68
4.6. Offengebliebene Fragestellungen.....	70
4.7. Schlussfolgerung .....	71
5. Literaturverzeichnis .....	73
6. Anhang.....	83

# 1. Einleitung

## **1.1. Problemstellung**

Der Wirkstoff Propyphenazon ist im deutschen Handel als Demex® Zahnschmerztabletten rezeptfrei und als Monopräparat erhältlich (2). Laut Herstellerangaben sind zurzeit keine Wechselwirkungen mit anderen Arzneimitteln bekannt (2). Low-dose Acetylsalicylsäure (ASS) ist nach wie vor der häufigste verschriebene Thrombozytenaggregationshemmer (3). Arzneimittelinteraktionen zwischen low-dose ASS und bestimmten nichtsteroidalen Antirheumatika (NSAR) sowie Metamizol bezogen auf die Thrombozytenaggregationshemmung wurden bereits untersucht. Für verschiedene NSARs wurde gezeigt, dass sie bei gleichzeitiger Einnahme von ASS dessen thrombozytenhemmende Wirkung abschwächen oder aufheben können (4–10). Eine denkbare Wechselwirkung zwischen Propyphenazon und ASS, welches unter anderem zur Sekundärprävention kardiovaskulärer Erkrankungen (Apoplex, koronare Herzerkrankungen) verwendet wird (11), wurde bisher nicht untersucht .

Propyphenazon ist in Deutschland rezeptfrei verfügbar. Eine gleichzeitige Einnahme von ASS als Thrombozytenaggregationshemmer und Propyphenazon zur Linderung von Schmerzen z.B. bei Zahnschmerz ist denkbar und könnte sogar häufig vorkommen. Im Hinblick auf die möglichen Konsequenzen bei einer nicht ausreichenden Wirkung von ASS (Myokardinfarkt, Schlaganfall u.a.) ist die klinische Bedeutung dieser denkbaren Wechselwirkung hoch.

## **1.2. Prinzipien der zellulären Hämostase**

Die Thrombozytenadhäsion, -aktivierung und -aggregation sind entscheidend um Blutungen zu stoppen (12). Auf der einen Seite sind sie somit wesentlich für die Bildung des primären hämostatischen Gerinnsels (13). Auf der anderen Seite kann die Thrombozytenaggregation auch Gewebe schädigen, indem dadurch atherosklerotisch veränderte Gefäße verschlossen werden (12). Durch pathologische Blutplättchenaggregate und arterielle Thrombosen kann es zu Herzinfarkten und Schlaganfällen kommen (14).

Eine Schädigung der Integrität der Gefäßwand führt zur Exposition der subendothelialen extrazellulären Matrix, die die Adhäsion und Aggregation der Thrombozyten auslöst (12). Der initiale Kontakt von Plättchen mit der Gefäßwand ist ein komplexer Prozess mehrerer Adhäsivsubstrate, wie z.B. der von-Willebrand Faktor oder Kollagen und Rezeptoren auf der Plättchenoberfläche (13). Durch die Plättchenaktivierung wird p-Selektin auf der Oberfläche exprimiert und ausgeschüttet (15). Dieses Lektin spielt unter anderem in der Plättchen-Plättchen Interaktion eine Rolle (15). Als weitere Antwort auf die Blutplättchenaktivierung wird Thromboxan A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) produziert (16): Arachidonsäure wird aus der Thrombozytenmembran durch Phospholipasen mobilisiert (17). Im Anschluss wird die Arachidonsäure durch einen mehrstufigen Prozess in Prostaglandin H<sub>2</sub> umgewandelt, das in den Thrombozyten durch das Enzym Thromboxansynthase weiter zu TXA<sub>2</sub> umgesetzt wird (17). Dieses ist das vorherrschende Produkt der Cyclooxygenasen (COX) in humanen Thrombozyten (16).

Cyclooxygenasen (COX) sind mit der Zellmembran assoziierte, homodimere Peroxidase-Enzyme (17). Die COX-1 ist konstitutiv in allen Zellen exprimiert (aber unter bestimmten Bedingungen auch induzierbar) und die COX-2 ist nach einem entzündlichen Stimulus induzierbar (aber in einigen Geweben auch konstitutiv exprimiert) (18). Eine weitere Isoform scheint die COX-3 darzustellen, welche eine Variante der COX-1 ist und durch einige Analgetika inhibiert wird (19).

### **1.3. Propyphenazon**

#### **1.3.1. Historie der Pyrazolonderivate**

Propyphenazon ist ein Pyrazolonderivat (20), welches unter den nichtopioiden Analgetika zu den nicht-sauren antipyretischen Analgetika gezählt wird (21). Pyrazolone gehören zu den ältesten synthetisierten Arzneimitteln (22). Knorr stellte 1883 erstmals den Wirkstoff Phenazon (Antipyrin) für den klinischen Gebrauch her (22–24). Seither folgte die Synthese verschiedener Derivate: 1897 wurde das methylierte Stickstoffderivat Aminophenazon (Aminopyrin) eingeführt und in den 1970er Jahren auf Grund der Neigung zur Bildung von Nitrosaminen, welche nach Aktivierung kanzerogen wirken können (25), wieder vom Markt

genommen (23). Metamizol (Dipyrone) wird klinisch seit 1922 angewendet, jedoch ist es in vielen Ländern aufgrund des Agranulozytoserisikos nicht mehr erhältlich (23). In anderen Ländern hingegen ist Metamizol das führende Analgetikum bzw. Antipyretikum (23). In den 1930er Jahren wurde das Pyrazolonderivat Propyphenazon eingeführt (20, 26). Durch die Substitution am C-4 Atom des Phenazons (s. Abb. 1) entstanden bessere analgetische und antipyretische Eigenschaften und das Pharmakon zeigte eine entzündungshemmende Wirkung (22). Aufgrund von Patentrechten war die Verbreitung jedoch nicht so groß wie von z.B. Aminophenazon (26). Dieses Pyrazolonderivat wurde seit den 1970er Jahren weitestgehend durch Propyphenazon ersetzt, da eine potenziell tödliche Knochenmarkstoxizität und Kanzerogenität erkannt wurde (26, 27). Zudem wurden weitere Pyrazolone vom Markt genommen, weil ein mögliches Risiko für Blutdyskrasien bestand (24, 28). Phenazon hatte außerdem einen unangenehmen säuerlichen Geschmack (28). Propyphenazon hingegen wurde in den vergangenen Jahrzehnten in vielen Kombinationspräparaten angeboten (20). Allein in Westdeutschland existierten 1986 etwa 170 Analgetika, die zwischen 70 und 500 mg Propyphenazon enthielten (26).

### Strukturformel von Phenazon (links) und Propyphenazon (rechts)

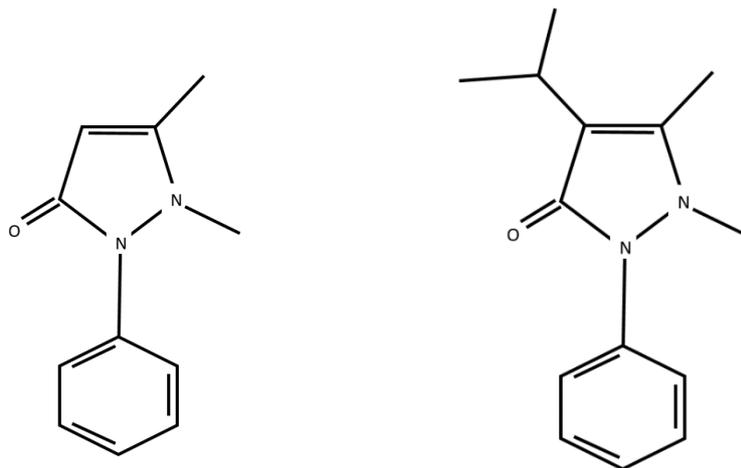


Abb. 1: „Strukturformel von Phenazon (links) und Propyphenazon (rechts)“ zeigt, dass durch Einführung einer Isopropylgruppe am C4-Atom des Phenazons Propyphenazon entsteht.

Für Propyphenazon und Phenazon wurde ebenfalls diskutiert, die Arzneimittel vom Markt zu nehmen (29). In einer Sitzung im Jahr 2012 wurde vom Sachverständigenausschuss für Verschreibungspflicht die Datenlage als sehr „dünn“ bezeichnet und empfohlen, dass diese Substanzen „ausgenommen“ werden sollten (29). Stattdessen wurde jedoch beschlossen, die Packungsgröße wie bei anderen Analgetika zu begrenzen (30). Die maximale Einnahmezeit von vier Tagen sollte auf mögliche Nebenwirkungen aufmerksam machen (30). Das Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte (BfArM) gab im Jahresbericht 2012 an, dass eine Umstellung auf Verschreibungspflicht für Propyphenazon und andere OTC-Analgetika nicht sinnvoll wäre, da so bei jedem auftretenden Schmerz ein Arzt aufgesucht werden müsste und der Andrang an den Praxen nicht zu bewerkstelligen wäre (30).

Heute ist mit dem Wirkstoff Propyphenazon in Deutschland das Monopräparat Demex®, welches 2002 auf dem deutschen Markt zugelassen wurde, erhältlich (31). Pyrazolone sind außerdem in einigen europäischen Ländern wie Frankreich, Spanien und Portugal, sowie in Afrika, Latein- und Südamerika zugelassen (32, 33).

Trotz der wechselhaften Geschichte der Pyrazolone werden laut Levy jährlich Kilotonnen dieser Pharmaka verkauft, darunter hauptsächlich Metamizol und Propyphenazon (23). Pyrazolonderivate gehören zu der erfolgreichsten Medikamentengruppe in der Schmerztherapie (24). Im Arzneiverordnungsreport, einer Zusammenstellung der in Deutschland zu Lasten von Krankenkassen ärztlich verordneten Arzneimittel, ist Propyphenazon aufgrund der rezeptfreien Abgabe nicht geführt (34). Unter den Pyrazolonderivaten wird es derzeit wahrscheinlich weniger häufig konsumiert (35). Das BfArM veröffentlichte 2012 Verkaufszahlen von „over the counter“-Analgetika (29). Demnach wurden im Jahr 2010 ca. 61.700 Packungen von Propyphenazon verkauft und 150 ärztlich verordnet (29). Im Vergleich wurden ca. 37,2 Mio. Packungen Ibuprofen verkauft (29).

### 1.3.2. Indikationen und Wirkmechanismus von Propyphenazon

Propyphenazon hat analgetische, antipyretische und schwach antiphlogistische Eigenschaften (31). Somit wird es zur Behandlung von leichten bis mäßigen Schmerzen und Fieber angewandt (31). Die antiinflammatorische, analgetische und antipyretische Wirkung von Propyphenazon ist im Vergleich schwächer als die von Ibuprofen und Aminophenazon (36).

Der Hersteller (Berlin-Chemie AG) bewirbt den speziellen therapeutischen Einsatz als Zahnschmerzmittel (31). Dieses Anwendungsgebiet wird durch die Studie von Boerlin et al. bestätigt, welche die analgetische Wirkung von Propyphenazon speziell nach oralchirurgischen Eingriffen untersuchten (26). Demzufolge ist die analgetische Potenz von Propyphenazon (basierend auf Milligramm) doppelt so hoch wie die von ASS (26). Weiterhin kann der Einsatz speziell als Zahnschmerzmittel durch das Vorhandensein von Transient Receptor Potential Ankyrin 1 (TRPA1) Kanälen in der dentalen Pulpa und in Odontoblasten begründet werden (s. Wirkmechanismus) (37).

Der genaue Wirkmechanismus von Pyrazolonderivaten ist noch immer nicht vollständig verstanden (24, 32). Es wird unter anderem auch eine zentrale Wirkung angenommen (38). Im Folgenden sollen mögliche Wirkungsmechanismen erläutert werden:

Es wird angenommen, dass Pyrazolonderivate die COX-1 und COX-2 inhibieren (32), jedoch scheint diese Inhibition eher schwach auszufallen (24). Mit Hilfe einer computergestützten, molekularen Docking Analyse konnte für Propyphenazon eine Wasserstoffbrückenbindung an Ser530 und Tyr385 der COX-1 gezeigt werden (7). Dies könnte die Vermutung einer Inhibition der COX-1 unterstützen. Durch die Klassifizierung unterschiedlicher Hyperreaktivitätsreaktionen (s. Nebenwirkungen) wurde ebenfalls eine COX-1 Hemmung von Propyphenazon angenommen (35). Außerdem führen Pyrazolonderivate zur Inhibition der Prostaglandinsynthese (39) und zu einer Thrombozytenaggregationshemmung (40), was die Hypothese einer reversiblen COX-1 Inhibition unterstützt. Diese Inhibition erfolgt über einen kürzeren Zeitraum und in einem geringeren Ausmaß als bei ASS (40).

COX-3 wird durch Pyrazolonderivate wie Metamizol und Phenazon ebenfalls gehemmt (19). Eine mögliche Inhibition dieses Enzyms durch Propyphenazon ist somit denkbar.

Die schwache Blockade der COX führt laut Nassini et al. auch zu einer schwachen antiinflammatorischen Wirkung, welche den starken analgetischen Effekt von Pyrazolonderivaten allein nicht erklärt (24). In einer tierexperimentellen Untersuchung erhoben Nassini et al. Daten, die als Hauptmechanismus der analgetischen Wirkung eine Blockade von TRPA1 Kanälen ermittelten (24). Diese Kanäle werden von einer Untergruppe von primären sensorischen Neuronen mit Zellkörpern in dorsalen Wurzelganglien exprimiert (24). Sowohl pharmakologische als auch genetische Befunde deuten darauf hin, dass TRPA1 Kanäle zu entzündlichen und neuropathischen Schmerzen beitragen (24). Somit käme es bei Propyphenazon zu einer Ausschaltung eines im Kontext des Zahnschmerzes wichtigen Schmerztransduktionsweges (24). Aufgrund der heterogenen Expression der Aminosäuresequenzen des TRPA1 Kanals kann von präklinischen Ergebnissen jedoch nicht unbedingt auf humane Wirkungen geschlossen werden (37).

### 1.3.3. Nebenwirkungen und Agranulozytoserisiko

Die Nebenwirkungen von Propyphenazon können in hämatologisch, kardiovaskulär und immunologisch eingeteilt werden (33):

Zu den hämatologischen Nebenwirkungen zählt die autoimmunhämolytische Anämie, welche in einem Case-Report von Rubio-Martinez et al. beschrieben wurde (41). Des Weiteren wird Propyphenazon mit einem Agranulozytoserisiko in Verbindung gebracht (40). Dieses wird für Pyrazolone bei kurzzeitigem Gebrauch und therapeutischen Dosen als gering angesehen (23, 32, 40). Speziell für Propyphenazon erscheint die Zuordnung von Agranulozytosen „anekdotisch“ (32). Ein möglicher Grund für das geringe Risiko kann in dem Metabolismus von Propyphenazon liegen (38). Es erfolgt kein Abbau zu 4-Aminophenazon, welches wahrscheinlich für die Agranulozytose verantwortlich ist (38). Nichtsdestotrotz wurde Propyphenazon aufgrund der möglichen hämatologischen Nebenwirkungen in einigen Ländern vom Markt genommen und die Anwendung und Weiterentwicklung dieses Pyrazolonderivats

zurückgestellt (24). Nach eingehenden Recherchen ist die Datenlage zum Agranulozytoserisiko speziell bei Propyphenazon jedoch gering.

Das kardiovaskuläre Risiko besteht aufgrund eines immunologisch induzierten Myokardinfarktes (Kounis Syndrom) (42). Es wird von ST-Strecken-Hebung und Brustschmerzen ca. 30 Minuten nach der Einnahme von Propyphenazon berichtet (42). Allerdings liegt nur ein einziger Fallbericht vor (42).

Immunologisch wird von IgE-vermittelten Anaphylaxien und von Typ 1 Hypersensitivitäten berichtet (20, 33). Hwang et al. untersuchten diese Hypersensitivitäten und teilte 12 Probanden in zwei Gruppen ein (35): Eine Gruppe reagierte nur auf Propyphenazon und nicht auf andere NSARs (35). Hierfür kann ein IgE-vermittelter Mechanismus verantwortlich sein (35). Die andere Gruppe zeigte Hypersensitivitätsreaktionen gegen multiple NSARs (35). Für diese Probanden wird die Hemmung der COX-1 als ursächlicher Mechanismus vermutet (35). Himly et al. postulierten, dass Propyphenazon selbst ein Antigen sei und somit zu systemischen allergischen Reaktionen bei bestimmten Individuen führe (20).

Zusätzlich sind noch weitere Risiken bekannt: Die am häufigsten auftretenden Nebenwirkungen sind Hautausschläge (23, 35, 39). Laut Packungsbeilage kommen diese jedoch nur in 1-10 von 10.000 Behandelten vor (2). Dennoch können ein Stevens-Johnson-Syndrom und die toxisch-epidermale Nekrolyse nicht ausgeschlossen werden (2). Diese und andere lebensbedrohliche Nebenwirkungen sind jedoch extrem selten (23).

Respiratorische, okuläre und gastrointestinale Reaktionen können ebenfalls auftreten (35). Gastrointestinale und renale Nebenwirkungen sind jedoch sehr selten (40). Ulzerationen wurden beim Gebrauch von Propyphenazon nicht festgestellt (40). Des Weiteren fördert der Wirkstoff nicht die Produktion von Nitrosaminen im sauren Magensaft und stellt somit kein Risiko für die Entstehung von Magentumoren dar (40).

Insgesamt wird das Arzneimittel damit gut vertragen (26), wobei nach eingehender Recherche ausreichend verlässliche Daten zu einer umfassenden Risikoeinschätzung von Propyphenazon fehlen.

#### 1.3.4. Pharmakokinetische Eigenschaften

Für Erwachsene wird eine Einzeldosis von 500 - 1000 mg Propyphenazon empfohlen (2). Das Dosierungsintervall sollte 4 Stunden nicht unterschreiten und richtet sich nach der Symptomatik sowie der maximalen Tagesdosis von 4000 mg (2). Die Verabreichung erfolgt oral und die Resorption ist rasch und vollständig (31), so dass die analgetische Wirkung von Propyphenazon nach ein bis zwei Stunden einsetzt (26). Die maximalen Plasmakonzentrationen nach oraler Gabe von 220 mg Propyphenazon betragen 6,5 - 15,2  $\mu\text{M}$  (22, 31). Nach der Gabe von 440 mg Propyphenazon betragen sie 15,2 - 54,3  $\mu\text{M}$  (22, 31). Maximale Plasmakonzentrationen werden 0,5 - 0,6 Stunden nach der Einnahme erreicht (22, 31). Im Gegensatz zu den meisten NSARs ist Propyphenazon nur minimal an Plasmaproteinen gebunden (39). In dieser Dissertation wird eine mögliche Interaktion bei Konzentrationen von 10 nM bis 100  $\mu\text{M}$  Propyphenazon untersucht.

Die enzymatische Umformung von Propyphenazon erfolgt vorwiegend in der Leber (31). Hierbei ist die Demethylierung am N-2-Atom der Hauptmetabolisierungsweg (22). Das Enolglucuronid von N-(2)-Desmethylpropyphenazon stellt den wichtigsten Metaboliten im Urin dar und macht ca. 80% aller Metabolite aus (22, 43, 44). Weiterhin treten verschiedene Hydroxylierungsprodukte in kleineren Mengen auf, welche teilweise frei und teilweise konjugiert sind (22). Die Plasmahalbwertszeit von Propyphenazon beträgt ein bis zwei Stunden (39).

### **1.4. Acetylsalicylsäure**

#### 1.4.1. Indikationen und Wirkmechanismus von Acetylsalicylsäure

Der Hauptteil der Verordnungen von Thrombozytenaggregationshemmern entfällt auf Präparate mit Acetylsalicylsäure (ASS) (3). ASS wurde 1897 von Felix Hoffmann oder Arthur Eichengrün im Auftrag der Farbenfabriken Friedrich Bayer & Co. synthetisiert (45). In den folgenden 50 Jahren wurde es ausschließlich als antiinflammatorisches, antipyretisches und analgetisches Arzneimittel eingesetzt (45). Seit vielen Jahren ist eine erhöhte Blutungsneigung bekannt (45). Sie galt zunächst als unerwünschter Nebeneffekt (45). Heute stellt die zugrunde liegende Hemmung der Plättchenfunktion einen eigenen

Anwendungsbereich dar, indem ASS zur Prävention kardiovaskulärer Ereignisse genutzt wird (45).

ASS gilt als „Goldstandard“ zur Prophylaxe und Behandlung von thrombotischen Gefäßverschlüssen, insbesondere von Angina pectoris und Myokardinfarkten (11, 45). Antagonisten an Thromboxanrezeptoren konnten in Bezug auf die Prävention thromboembolischer Ereignisse im Vergleich zu ASS nicht überzeugen (45). Weiterhin wird ASS zur Reduktion des Risikos eines Apoplex bzw. transitorischer Ischämien des ZNS und bei der Behandlung der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit eingesetzt (11, 45). Insgesamt wird das Risiko kardiovaskulärer Ereignisse durch ASS um ein Viertel gesenkt (11). Bei Hochrisikopatienten konnte die Gesamtmortalität durch ASS signifikant gesenkt werden (11). Auf der Grundlage von über 100 randomisierten Studien konnte ASS eine Reduktion der kardiovaskulären Mortalität um ca. 15% herbeiführen (46).

Einige Autoren diskutierten auch eine Anwendung von ASS bei gesunden Menschen (45). ASS scheint protektiv für kolorektale Karzinome zu sein (47) und eine Dosis von 40 mg ASS täglich Sorge für eine Reduktion des Myokardinfarkttrisikos (45). Überzeugende Daten, die eine Prävention auch bei gesunden Personen unterstützen, gibt es aber nicht.

Die antithrombotische Wirkung von ASS beruht auf der irreversiblen Hemmung der Thrombozytenfunktion durch kovalente Bindung der COX-1 (45, 48). Dies geschieht durch Acetylierung an der funktionell wichtigen Aminosäure Serin 529, welche sich in der Nähe des katalytischen Zentrums (Tyrosin 385) befindet (45, 49, 50). Somit wird der Zugang von dem biologischen Substrat Arachidonsäure zur katalytischen Stelle verhindert und es kommt zur Hemmung der thrombozytären Synthese von TXA<sub>2</sub> für die restliche Lebenszeit der Thrombozyten (6, 18, 45). ASS hemmt die konstitutive COX-1 etwa 150 bis 200 mal potenter als die induzierbare COX-2 (45). Es sind keine prostaglandinunabhängigen Wege der antithrombotischen Wirkung von ASS bekannt (45).

### 1.4.2. Dosierung und Nebenwirkungen

Durch die unterschiedliche Affinität zu COX-1 (antithrombotische Wirkung) und COX-2 (antiinflammatorische Wirkung) sind verschiedene Dosierungen von ASS nötig (45). Für eine langfristige Prävention vaskulärer Ereignisse bei Risikopatienten sind 75-150 mg ASS ausreichend, um die COX-1 der Thrombozyten nahezu vollständig zu hemmen (11). Zur Sekundärprävention von Myokardinfarkten wird somit eine Dosis von täglich 100 mg ASS empfohlen (45). Für den Einsatz zur Prävention zerebraler vaskulärer Ereignisse werden höhere Dosierungen von ASS diskutiert (45). In einer klinischen Situation, welche eine sofortige antithrombotische Wirkung erfordert, ist eine höhere Initialdosis von ca. 500 mg ASS nötig (11).

Um eine antiinflammatorische Wirkung zu erzielen, muss ASS ca. 10-100 mal höher dosiert werden als für eine antithrombotische Wirkung (46). Dies entspricht einer Tagesdosis von 6-8 g (51). Für eine analgetische Wirkung werden 0,5 g als Einzeldosis empfohlen (51). Die gastrointestinalen Nebenwirkungen von ASS, wie z.B. milde, aber irritierende Symptome im oberen Gastrointestinaltrakt, sind dosisabhängig (46, 52). So ist das Risiko für gastrointestinale Blutungen bei einem antiinflammatorischen Einsatz im Vergleich zu einem antithrombotischen Einsatz des Medikaments 5-6 mal höher (18). Es ist somit bei höherer Dosierung mit vermehrten Nebenwirkungen zu rechnen (4). Bezogen auf die analgetischen, antiinflammatorischen und antipyretischen Eigenschaften gibt es Unterschiede zwischen ASS und anderen Schmerzmedikationen (36). Die analgetische Potenz von beispielsweise Propyphenazon ist doppelt so hoch wie die von ASS (26).

### 1.4.3. High-on Aspirin Platelet Reactivity

Bezogen auf die Thrombozytenhemmung durch ASS wurde in den letzten Jahren wiederholt auf eine erhebliche interindividuelle Variabilität hinsichtlich der Hemmung der Thrombozytenfunktion durch ASS hingewiesen (sog. „ASS-Resistenz“ oder „high-on aspirin platelet reactivity“) (45). Studien zufolge wurde eine hohe Blutplättchenreaktivität mit einem erhöhten Risiko für thromboembolische Ereignisse bei Patienten, die ASS erhielten, festgestellt (46). Bei ausbleibender Hemmung der Thrombozytenfunktion durch ASS würde dies bedeuten, dass hiervon betroffene Patienten nicht vor vaskulären Ereignissen geschützt sind (45).

Für eine nicht erfolgreiche Hemmung der Thrombozytenfunktion durch ASS wurden ursächlich viele verschiedene Gründe vermutet, darunter Non-Compliance (53), Variabilität in der Bioverfügbarkeit (54), ein COX-1 unabhängiger pharmakologischer Angriffspunkt (55) sowie Genpolymorphismen von COX-1 und Wechselwirkungen mit anderen Arzneimitteln (17). Wie eingangs erwähnt, wurde für verschiedene NSARs gezeigt, dass sie bei gleichzeitiger Einnahme von ASS dessen thrombozytenhemmende Wirkung abschwächen oder aufheben können (4–10). An dieser Stelle ist insbesondere Metamizol hervorzuheben, welches Propyphenazon strukturell ähnelt. Dieses Pyrazolonderivat (in Form seines aktiven Metaboliten 4-Methylaminoantipyrin) verhindert die aspirininduzierte Hemmung der Thromboxansynthese (56). Hierfür waren niedrige mikromolare Konzentrationen notwendig, welche jedoch im therapeutischen Bereich liegen (56). Metamizol schwächte ebenfalls die Inhibierung sowohl der Thrombozytenaggregation als auch der p-Selektinexpression durch ASS weitgehend ab (56). In vorherigen Studien wurde außerdem gezeigt, dass eine Komedikation von Metamizol und ASS bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit dazu führen kann, dass die Wirkung von ASS vollständig aufgehoben wird (6). Ebenfalls betroffen sind Patienten mit Schlaganfall, wobei die pharmakodynamische Reaktion auf ASS beeinträchtigt wird (57). Einige Autoren warnen aufgrund dessen vor einer Behandlung mit Metamizol bei gleichzeitiger ASS-Medikation (6, 57). Eine „high-on aspirin platelet reactivity“ wäre somit auch durch eine Wechselwirkung von ASS und Propyphenazon denkbar.

#### 1.4.4. Metabolismus und Plasmakonzentrationen

ASS wird im oberen Dünndarm nahezu vollständig absorbiert (51). Maximale Plasmakonzentrationen werden ca. 0,5 Stunden nach der oralen Einnahme von 80 mg ASS erreicht (54). Während der Absorption und im Anschluss daran erfolgt eine hydrolytische Spaltung durch Carboxylesterasen im Darm, Portal-Venenblut und der Leber (51). Dies führt zu einer Umsetzung in Salicylsäure als primären Metaboliten (51). Die Deacetylierung geschieht mit einer Halbwertszeit von ca. 15-25 Minuten (17). Dieser Metabolit kann die COX-1 nicht mehr inhibieren, dafür jedoch die COX-2 (17, 45).

## **1.5. Ziele der Arbeit**

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wird eine mögliche Interaktion zwischen low-dose ASS und Propyphenazon *in vitro* untersucht. Ziel ist es zu prüfen, ob Propyphenazon - ähnlich wie im Vorfeld für Metamizol gezeigt wurde - mit der Hemmung der Thrombozytenfunktion durch ASS pharmakologisch interferiert. Hierfür sollen verschiedene Parameter der Thrombozytenaktivierung eingesetzt werden (Lichttransmissionsaggregometrie, Thromboxansynthese und Durchflusszytometrie).

Die Untersuchung soll die Aktivierung von Thrombozyten durch unterschiedliche Agonisten (Arachidonsäure oder Kollagen) berücksichtigen.

Vergleichend soll darüber hinaus auch die mögliche Interaktion zwischen Propyphenazon und dem NSAR-Analgetikum Indometazin sowie dem Thromboxanrezeptorantagonist Ramatroban (Bay U3405) untersucht werden, um die Mechanismen der Arzneimittelinteraktion einzugrenzen. Die Messungen sollen an Thrombozyten gesunder Spender durchgeführt werden.

Zusammenfassend ergeben sich folgende Ziele:

- Untersuchung einer pharmakologischen Interaktion von Propyphenazon mit der thrombozytenhemmenden Wirkung von ASS.
- Bestimmung der Konzentrations-Wirkungsbeziehung.
- Untersuchung einer (möglichen) Interaktion zwischen Propyphenazon und der thrombozytenhemmenden Wirkung des NSAR-Analgetikums Indometazin und des Thromboxanrezeptorantagonisten Ramatroban, um den pharmakologischen Interaktionsmechanismus einzugrenzen.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Allgemeines

#### 2.1.1. Probanden

Die vorliegende Arbeit wurde durch die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf nach rechtlichen und ethischen Kriterien geprüft und zustimmend bewertet (Votum vom 21.11.2016, Studiennummer 5750R, Registrierungs-ID 2016116011).

Für die Messungen waren nur gesunde, erwachsene und einwilligungsfähige Spender von Thrombozyten geeignet. Alle Probanden wurden über den Hintergrund und Ablauf der Studie, mögliche Risiken und Belastungen sowie Aspekte des Datenschutzes aufgeklärt und stimmten der Teilnahme mit einer schriftlichen, informierten Einwilligung zu.

Für die Spender von Thrombozyten galten folgende Einschlusskriterien:

- Alter  $\geq$  18 Jahre
- Einwilligungsfähigkeit
- Informierte Einwilligung

Darüber hinaus durfte keines der folgenden Ausschlusskriterien zutreffen:

- Im vorausgegangenen Zeitraum von 7 Tagen erfolgte eine Einnahme von ASS oder anderen Thrombozytenfunktionshemmern,
- Behandlung mit einem Nichtopioid-Analgetikum während der 2 vorausgehenden Tage,
- Therapie mit Antikoagulanzen (z.B. Vitamin K-Antagonisten, Heparine)
- Bekannte Veränderungen der Thrombozytenfunktion oder der Hämostase, z.B. durch Begleiterkrankungen,
- Begleiterkrankungen, die die Sicherheit von Spender oder Untersucher beeinträchtigen könnten.

Insgesamt nahmen 30 Thrombozytenspender teil. Davon waren 21 weiblich und 9 männlich. Das durchschnittliche Alter lag bei 27,5 Jahren, der Median betrug 24 Jahre.

### 2.1.2. Blutentnahme

Die Blutentnahme wurde in dem Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf durch einen Arzt unter Beachtung der Hygienevorschriften durchgeführt. Hierzu wurden Vacutainer Safety-Lok Butterflies (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA) verwendet.

Für die Thrombozytenaggregation wurden 30 ml Vollblut in Spritzen (Original Perfusor® Syringe 50 ml, Braun, Melsungen, Deutschland) mit Natrium Citrat-Citric Acid-Dextran (ACD, Konzentration und Herkunft können der Tabelle 1 und 2 entnommen werden) im Verhältnis Blut zu Citrat 1:10 verdünnt. Ein Schwenken der Spritze während der Entnahme förderte die Durchmischung von Blut und Citrat.

Für die Thromboxan B<sub>2</sub> (TXB<sub>2</sub>) Bestimmung wurden die Rückstände nach Ablauf der Thrombozytenaggregation verwendet.

Für die durchflusszytometrischen Messungen wurden ca. 10 ml Blut verwendet.

### 2.1.3. Plasmagewinnung

Im Anschluss an die Blutabnahme wurde das Citratblut aus der Spritze mit maximal 7 ml Volumen in mehrere 15 ml Falcon Röhren (Greiner centrifuge tubes 15 ml, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland) verteilt. Durch zehnmütige Zentrifugation mit 270 g bei 1200 U/min (Minifuge RF Heraeus, Hanau, Deutschland) wurde plättchenreiches Plasma (PRP) gewonnen. Dieses wurde vorsichtig vom Erythrozytensediment abgehoben und in ein weiteres Falcon Röhren überführt. Alle Pipettierarbeiten erfolgten mit Pipetten vom Typ Pipetman classic (Gilson, Limburg-Offheim, Deutschland) und vom Typ Eppendorf Reference (Eppendorf, Hamburg, Deutschland). Es wurden Pipettenspitzen in den Größen 1000 µl, 200 µl und 10/20 µl aus Polypropylen (TipOne®-Spitzen, Starlab, Hamburg, Deutschland) verwendet. Falls zu wenig PRP für die Versuchsreihe abgehoben werden konnte, wurden geringe Mengen des zentrifugierten Blutes mit maximal 1,8 ml auf mehrere 2 ml Eppendorf-Cups (Safe-Lock Tubes Eppendorf, Hamburg, Deutschland) verteilt. Diese wurden für 30-45 Sekunden mit 5000 g bei 5000 U/min in der Tischzentrifuge 5415

(Eppendorf, Hamburg, Deutschland) zentrifugiert. Das gewonnene PRP wurde dem Falcon Röhrchen mit PRP hinzugefügt.

Das verbliebene Citratblut wurde mit 1700 g bei 3000 U/min für weitere zehn Minuten zentrifugiert. Das so entstandene plättchenarme Plasma (PAP) wurde abgehoben und in ein Falcon Röhrchen überführt.

Das gewonnene PRP bzw. PAP wurde direkt nach der Präparation für die Messungen am Aggregometer bzw. am Durchflusszytometer verwendet. Bei mehreren Messreihen mit Blut eines Probanden wurden Aliquots des Citratvollblutes für maximal 3 Stunden gelagert und erst kurz vor den Messungen zentrifugiert.

#### 2.1.4. Substanzen und Lösungen

In Tabelle 1 sind alle verwendeten Substanzen mit Bezugsquellen aufgeführt.

**Tabelle 1: Verwendete Substanzen und Bezugsquellen**

Substanz	Bezugsquelle
Aspirin® i.v. 500 mg Acetylsalicylsäure als Lysinacetylsalicylat	Bayer, Leverkusen, Deutschland
Arachidonsäure	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Antikörper gegen Cluster of Differentiation 41 - Fluorescein- Isothiocyanat („CD41-FITC“)	Beckman Coulter, Brea, Krefeld, Deutschland
Antikörper gegen Cluster of Differentiation 62 Plateled - Phycoerythrin („CD62P-PE“)	Beckman Coulter, Brea, Krefeld, Deutschland
Citronensäure-Monohydrat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Ethanol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure Titriplex III	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Glukose	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Hydroxyethylpiperazinyl- ethansulfonsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland

**Fortsetzung Tabelle 1**

Substanz	Bezugsquelle
Immunglobulin G - PE (Mouse) (IgG-PE)	Beckman Coulter, Brea, Krefeld, Deutschland
Immunglobulin G - FITC (IgG-FITC)	Beckman Coulter, Brea, Krefeld, Deutschland
Indometazin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Isoton II Diluent	Beckman Coulter, Brea, Krefeld, Deutschland
Kaliumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kollagen	Takeda Austria GmbH, Linz, Österreich
Magnesiumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumacetat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumazid	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydroxid	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Paraformaldehyd 4%	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Propyphenazon	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Ramatroban (Bay U3405)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Tirofiban-Hydrochlorid als Aggrastat Infusionslösung 250 µg/ml	Iroko Cardio, jetzt Correvio International Sàrl, Genf, Schweiz
Trinatriumcitratdihydrat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Trishydroxymethylaminomethan	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

In Tabelle 2 sind alle verwendeten Lösungen mit den Zusammensetzungen aufgeführt. Zu Beginn eines Versuchstages wurden ASS und Indometazin eingewogen (Präzisionswaage Sartorius ED2202S-CW, Sartorius, Göttingen, Deutschland) und die Lösungen entsprechend der Angaben in Tabelle 2 hergestellt. Zudem wurde der Tris-Puffer zur Herstellung einer 50 mM Stammlösung zur Arachidonsäure zugefügt. Stammlösungen von

Propyphenazon und Ramatroban wurden wöchentlich neu angesetzt und zwischen den Versuchstagen bei -20 °C eingefroren. Die übrigen Lösungen wurden bei Bedarf neu hergestellt. Während der Messungen wurden die Lösungen ASS, Propyphenazon und Arachidonsäure auf Eis gelagert.

**Tabelle 2: Verwendete Lösungen**

Substanz	Lösungsmittel	Konzentration
<b>Acetylsalicylsäure</b>		
ASS (als Aspirin® i.v. 500 mg als Lysinacetylsalicylat Pulver)	TM	5 mM Stammlösung
<b>ACD</b>		
Trinatriumcitratdihydrat	Milli-Q	74,8 mM
Citronensäure-Monohydrat	Milli-Q	65 mM
Glukose	Milli-Q	111 mM
<b>Arachidonsäure</b>		
Arachidonsäure	Tris-Puffer	50 mM Stammlösung
<b>Alkoholische Natriumhydroxidlösung</b>		
Natriumhydroxid	Ethanol	100 mM
<b>EDTA</b>		
Ethylendiamintetraessigsäure Titrplex III	Milli-Q	77 mM
<b>Indometazin</b>		
Indometazin	Ethanol	50 mM
<b>Kollagen</b>		
Kollagen	Milli-Q	10 µg/ml Stammlösung
<b>Propyphenazon</b>		
Propyphenazon	DMSO	10 mM Stammlösung
<b>Ramatroban</b>		
Ramatroban	Stammlösung in NaOH, weitere Verdünnungen in TM	10 mM Stammlösung
<b>Tirofiban</b>		
Tirofibanhydrochlorid	Milli-Q	57 µM

## Fortsetzung Tabelle 2

Substanz	Lösungsmittel	Konzentration
<b>Thrombozytenmedium (TM), pH 7,4</b>		
Natriumchlorid (NaCl)	Milli-Q	134 mM
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO <sub>3</sub> )	Milli-Q	12 mM
Kaliumchlorid (KCl)	Milli-Q	2,9 mM
Natriumhydrogenphosphat (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Milli-Q	0,36 mM
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Milli-Q	1 mM
Hydroxyethylpiperazinyl-ethansulfonsäure	Milli-Q	5 mM
<b>Tris-Puffer, pH 7,4</b>		
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	Milli-Q	50 mM

### 2.1.5. Grundsätzliche Überlegungen

Die verwendete Methodik orientierte sich an den in Abschnitt 1.5 dargestellten Zielen dieser Arbeit. Die im Labor etablierten Versuchsprotokolle für die Lichttransmissionsaggregometrie, TXB<sub>2</sub>-Bestimmung und p-Selektinexpression wurden in Vorversuchen auf die Untersuchung der Interaktion zwischen ASS und Propyphenazon hin modifiziert bzw. optimiert. In allen Methoden wurde die Wirkung von ASS bzw. Propyphenazon jeweils allein und die Interaktion beider Substanzen untereinander untersucht.

Nachdem die Ergebnisse der Lichttransmissionsaggregometrie ausgewertet wurden und eine erhebliche konzentrationsabhängige Wechselwirkung zwischen ASS und Propyphenazon gezeigt werden konnte, wurde entschieden, auch die Interaktion mittels Thromboxansynthese und p-Selektinexpression zu untersuchen. Hier wurden nur definierte Konzentrationen von Propyphenazon eingesetzt, da die Interaktion im Rahmen der Aggregation bereits analysiert worden war und die interagierenden Konzentrationen dadurch bekannt waren. Auf diese Weise konnte die Anzahl der erforderlichen Blutabnahmen und die Belastung der Probanden reduziert werden.

Die oben beschriebene Interaktion zwischen ASS und Propyphenazon wirft die Frage auf, ob Propyphenazon eine entsprechende Interaktion auch mit anderen Inhibitoren der Cyclooxygenase oder mit Thromboxanrezeptorantagonisten

zeigt. Um dies zu untersuchen, wurden weitere Experimente mit dem COX-Inhibitor Indometazin bzw. dem selektiven Thromboxanrezeptorantagonisten Ramatroban durchgeführt. Diese Substanzen hemmen zwar ebenfalls die thromboxanvermittelte Thrombozytenaktivierung, unterscheiden sich jedoch von Propyphenazon durch einen anderen Typ der Hemmung (Indometazin: zeitabhängiger reversibler Inhibitor der Cyclooxygenase; Ramatroban: Antagonist am Thromboxanrezeptor).

In Vorversuchen wurden für die verwendeten Inhibitoren die minimalen Konzentrationen ermittelt, die eine vollständige Hemmung von Aggregation und Thromboxansynthese bewirken. Diese betragen (individuell jedoch variabel) für ASS 30  $\mu$ M, für Indometazin 300 nM und für Ramatroban 100 nM.

Für die Lichttransmissionsaggregometrie sowie für die Thromboxansynthese wurden sowohl Arachidonsäure als exogenes Substrat der Thromboxansynthese sowie Kollagen als Stimulus der Mobilisierung von Arachidonsäure aus thrombozytären Phospholipiden eingesetzt.

Da durch Vorversuche festgestellt wurde, dass bei der p-Selektinexpression in den für diese Untersuchung relevanten Konzentrationen von Kollagen keine ausreichende Stimulation der p-Selektinexpression zu erreichen ist, wurde in dieser Methode nur die Stimulation durch Arachidonsäure untersucht.

## ***2.2. Lichttransmissionsaggregometrie***

### ***2.2.1. Prinzip der Aggregometrie***

Zur Analyse der Thrombozytenfunktion wurde die Lichttransmissionsaggregometrie nach Born verwendet (58, 59). Dieses Verfahren misst die Änderung der optischen Dichte des Probenmaterials bei Thrombozytenaktivierung und -aggregation durch Bestimmung der Menge des transmittierten Lichts (58, 59). Diese Lichtintensität wird kontinuierlich photometrisch gemessen und aufgezeichnet, sodass sich nach Stimulation der Thrombozyten ein charakteristischer Verlauf zeigt (58, 59). Durch die Zugabe eines Agonisten kommt es zur Aktivierung der Thrombozyten und somit zur Formänderung der Blutplättchen (Bildung von Spikes und sphärischen Formen), dem sogenannten Shape Change (58, 59). Dadurch nimmt die Transmission des

Lichts ab und die optische Dichte des Probenmaterials zu (58, 59). Bei der Aggregation der Blutplättchen zeigt sich der gegenteilige Effekt: Die Transmission des Lichts nimmt zu, während die optische Dichte abnimmt (58, 59). Durch die Änderung der Transmission des Lichts kann so eine Steigung gemessen werden (58, 59). Diese spiegelt die Geschwindigkeit der zugrundeliegenden Aggregationsvorgänge wieder (58, 59).

### 2.2.2. Allgemeines Versuchsprotokoll

Für die Messungen wurde das Plättchenaggregometer APACT 4004 (LABiTec, Ahrensburg, Deutschland) verwendet. Die Messungen erfolgten in vier Messkanälen und wurden durch die APACT LPC Software aufgezeichnet. Das Plättchenaggregometer verwendet ein LED Photometer und enthält einen Magnetrührer zur Steigerung der Empfindlichkeit des Testansatzes. Die Proben wurden in Mikroküvetten (Cuvette micro mit Mixer im Dispo System, LABiTec, Ahrensburg, Deutschland) gemessen.

Zu Beginn jeder Messreihe wurde das Gerät geeicht. Hierzu wurden jeweils 200 µl PAP, sowie die entsprechenden Mengen an Lösungsmitteln für die unterschiedlichen Versuche (s. Tabelle 3-6) verwendet. Die PAP-Eichung diente der Ermittlung für den Wert der maximalen Lichttransmission.

Grundsätzlich wurden die Proben für vier Minuten bei 37 °C im Heizblock inkubiert. Im Anschluss wurden sie für zwei Minuten gerührt. Zeitgleich erfolgte der Beginn der Aufzeichnung der Messungen. Nach diesen 6 Minuten wurden die Proben durch Zugabe von 5 µl eines Agonisten (Arachidonsäure bzw. Kollagen) stimuliert. Die Messungen wurden für insgesamt 350 Sekunden aufgezeichnet. Im Anschluss an diese Zeit wurde die Aggregation durch Zugabe von 4 µl Indometazin (50 mM) und 15 µl EDTA (77 mM) gestoppt. Nach dem Umpipettieren der Proben in 2 ml Eppendorf-Cups folgte die Zentrifugation der Ansätze für 5 Minuten bei 15000 U/min in der Mikroliterzentrifuge (Mikro 200R, Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen, Deutschland). Im Anschluss wurde der Überstand abgehoben, in ein 0,5 ml Eppendorf-Cup überführt und auf Eis gelagert. Nach Abschluss der Messreihe wurden die Proben zur späteren Verwendung für die TXB<sub>2</sub> Bestimmungen bei -20 °C eingefroren.

### 2.2.3. Versuche zur Interaktion von ASS und Propyphenazon

Zunächst wurde das Plättchenaggregometer geeicht, indem 200 µl Probanden-PAP, 50 µl TM (Lösungsmittel für ASS) und 2,5 µl DMSO (Lösungsmittel für Propyphenazon) in eine Messküvette gefüllt wurden.

Die erste Messung bestand stets aus der Testung der Aggregation der Probe (im Folgenden Aggregationskontrolle). Hierfür wurde ein Ansatz aus 200 µl PRP, 50 µl TM und 2,5 µl DMSO gewählt. Nach dem oben beschriebenen zeitlichem Prinzip wurden 5 µl einer 50 mM Lösung Arachidonsäure zur Stimulation hinzugegeben. Dies ergibt eine Endkonzentration im Ansatz von 1 mM Arachidonsäure. Sofern keine Stimulation der Blutplättchen möglich war, wurden die Proben verworfen.

Mit einer zweiten Messung wurde die Hemmung der Blutplättchen durch ASS geprüft. Wie eingangs erwähnt wurde hierfür eine Endkonzentration im Ansatz von 30 µM ASS gewählt (s. Kapitel 2.1.5). Zur Prüfung der Hemmung der Blutplättchen durch ASS wurde ein Ansatz aus 200 µl PRP, 50 µl einer 150 µM ASS Lösung (Endkonzentration im Ansatz sind 30 µM ASS) und 2,5 µl DMSO mit 5 µl 50 mM Arachidonsäure stimuliert. Wenn bei einem Probanden eine vollständige Hemmung der Aggregation mit ASS nicht möglich war, wurde die Konzentration von ASS von 30 µM um 10 µM sukzessive gesteigert, bis eine vollständige Hemmung erreicht wurde. Wenn bei über 100 µM ASS keine Hemmung der Plättchen gegeben war, wurde die Versuchsreihe abgebrochen und die Proben wurden verworfen. Sofern ab einer bestimmten Konzentration eine Hemmung der Plättchen ersichtlich war, wurde mit der entsprechend ermittelten Konzentration weitergearbeitet.

Im Anschluss wurde die Interaktion der Pharmaka durch Stimulation mit 1 mM Arachidonsäure im Aggregationsansatz gemessen. Hierfür wurden 200 µl PRP, 50 µl der entsprechend ermittelten Konzentration ASS und 2,5 µl Propyphenazon unterschiedlicher Konzentrationen zusammen pipettiert. Die Versuchsreihen mit den genauen Konzentrationsangaben sind in Tabelle 3 dargestellt. Insgesamt wurde das Blut von 9 Probanden für diese Messungen verwendet. Zusätzlich wurde mit Blut von 4 Probanden eine Interaktion mit ASS bei 1 µM und bei 3 µM Propyphenazon im Aggregationsansatz untersucht. Anschließend wurde eine

weitere Aggregationskontrolle mit 1 mM Arachidonsäure im Aggregationsansatz durchgeführt, um die Aktivität der Blutplättchen nach dem Ende der Messreihe (ca. 1,5 Stunden) zu überprüfen und sicherzustellen, dass die Thrombozyten über die Zeitdauer der Messungen keinen wesentlichen Aktivitätsverlust zeigten (s. Kapitel 2.5. Auswertung der Ergebnisse).

Weiterhin wurden diese Messungen mit Kollagen als Stimulus durchgeführt (s. Tabelle 3). Hierzu erfolgte eine Stimulation mit 2 µg/ml Kollagen. Wenn keine Stimulation der Aggregation mit dieser Konzentration möglich war, so wurde sie um 1/3 µg/ml bis auf maximal 3,3 µg/ml erhöht. Im Anschluss wurde bei der jeweiligen Probe mit gleichbleibender Kollagenkonzentration weitergearbeitet.

**Tabelle 3: Zusammensetzung der Versuchsansätze zur Messung der Interaktion zwischen ASS (Lösungsmittel TM) und Propyphenazon (PP) (Lösungsmittel DMSO) durch Aktivierung der Aggregation mit Arachidonsäure (Ara) oder mit Kollagen (Kol) am Aggregometer. Die Konzentrationsangaben beziehen sich auf die Endkonzentrationen im Aggregationsansatz.**

Versuchsansatz mit 200 µl PRP	50 µl ASS/ TM	2,5 µl PP/ DMSO	5 µl Ara/ Kol
Aggregationskontrolle	TM	DMSO	1 mM Ara
Hemmung durch ASS	30 - 70 µM ASS	DMSO	1 mM Ara
Interaktion von ASS und Propyphenazon	30 - 70 µM ASS	10 nM PP	1 mM Ara
	30 - 70 µM ASS	30 nM PP	1 mM Ara
	30 - 70 µM ASS	100 nM PP	1 mM Ara
	30 - 70 µM ASS	300 nM PP	1 mM Ara
	30 - 70 µM ASS	1 µM PP	1 mM Ara
	30 - 70 µM ASS	3 µM PP	1 mM Ara
	30 - 70 µM ASS	10 µM PP	1 mM Ara
	30 - 70 µM ASS	30 µM PP	1 mM Ara
30 - 70 µM ASS	100 µM PP	1 mM Ara	1 mM Ara
Aggregationskontrolle	TM	DMSO	1 mM Ara

**Fortsetzung Tabelle 3**

Versuchsansatz mit 200 µl PRP	50 µl ASS/ TM	2,5 µl PP/ DMSO	5 µl Ara/ Kol
<b>Aggregationskontrolle</b>	<b>TM</b>	<b>DMSO</b>	<b>2 - 3,3 µg/ml Kol</b>
Hemmung durch ASS	30 - 70 µM ASS	DMSO	2 - 3,3 µg/ml Kol
Interaktion von ASS und Propyphenazon	30 - 70 µM ASS	10 nM PP	2 - 3,3 µg/ml Kol
	30 - 70 µM ASS	30 n M PP	2 - 3,3 µg/ml Kol
	30 - 70 µM ASS	100 nM PP	2 - 3,3 µg/ml Kol
	30 - 70 µM ASS	300 nM PP	2 - 3,3 µg/ml Kol
	30 - 70 µM ASS	1 µM PP	2 - 3,3 µg/ml Kol
	30 - 70 µM ASS	3 µM PP	2 - 3,3 µg/ml Kol
	30 - 70 µM ASS	10 µM PP	2 - 3,3 µg/ml Kol
	30 - 70 µM ASS	30 µM PP	2 - 3,3 µg/ml Kol
	30 - 70 µM ASS	100 µM PP	2 - 3,3 µg/ml Kol
<b>Aggregationskontrolle</b>	<b>TM</b>	<b>DMSO</b>	<b>2 - 3,3 µg/ml Kol</b>

2.2.4. Versuche zur Hemmung der Thrombozyten durch Propyphenazon

Es folgte die Überprüfung der Hemmung der Blutplättchen durch Propyphenazon. Hierfür wurden 200 µl PRP mit 50 µl TM und 2,5 µl Propyphenazon unterschiedlicher Konzentrationen in einen Ansatz pipettiert. Dies erfolgte durch Stimulation mit 1 mM Arachidonsäure oder 2-3,3 µg/ml Kollagen im Aggregationsansatz. Eine abschließende Aggregationskontrolle beendete die Versuchsreihe. Dies ist in Tabelle 4 dargestellt.

**Tabelle 4: Zusammensetzung der Versuchsansätze zur Messung der Plättchenhemmung durch Propyphenazon (PP) (Lösungsmittel DMSO) alleine durch Aktivierung der Aggregation mit 1 mM Arachidonsäure (Ara) oder 2-3,3 µg/ml Kollagen (Kol) am Aggregometer. Die Konzentrationsangaben beziehen sich auf die Endkonzentrationen im Aggregationsansatz.**

Versuchsansatz mit 200 µl PRP	50 µl TM	2,5 µl PP/ DMSO	5 µl Ara/ Kol
<b>Aggregationskontrolle</b>	<b>TM</b>	<b>DMSO</b>	<b>1 mM Ara</b>
Hemmung durch Propyphenazon	TM	10 nM PP	1 mM Ara
	TM	30 nM PP	1 mM Ara
	TM	100 nM PP	1 mM Ara
	TM	300 nM PP	1 mM Ara
	TM	1 µM PP	1 mM Ara
	TM	3 µM PP	1 mM Ara
	TM	10 µM PP	1 mM Ara
	TM	30 µM PP	1 mM Ara
TM	100 µM PP	1 mM Ara	
<b>Aggregationskontrolle</b>	<b>TM</b>	<b>DMSO</b>	<b>1 mM Ara</b>
<b>Aggregationskontrolle</b>	<b>TM</b>	<b>DMSO</b>	<b>2 - 3,3 µg/ml Kol</b>
Hemmung durch Propyphenazon	TM	10 nM PP	2 - 3,3 µg/ml Kol
	TM	30 nM PP	2 - 3,3 µg/ml Kol
	TM	100 nM PP	2 - 3,3 µg/ml Kol
	TM	300 nM PP	2 - 3,3 µg/ml Kol
	TM	1 µM PP	2 - 3,3 µg/ml Kol
	TM	3 µM PP	2 - 3,3 µg/ml Kol
	TM	10 µM PP	2 - 3,3 µg/ml Kol
	TM	30 µM PP	2 - 3,3 µg/ml Kol
TM	100 µM PP	2 - 3,3 µg/ml Kol	
<b>Aggregationskontrolle</b>	<b>TM</b>	<b>DMSO</b>	<b>2 - 3,3 µg/ml Kol</b>

### 2.2.5. Versuche zur Interaktion von Propyphenazon und Indometazin bzw. Ramatroban

Zur Eichung des Aggregometers wurden 200 µl PAP, 50 µl TM und 2,5 µl DMSO (Lösungsmittel) verwendet. Bei den Messungen mit Indometazin wurden, entsprechend den hier verwendeten Lösungsmitteln 2,5 µl Ethanol zugefügt, bei den Messungen mit Ramatroban wurden 2,5 µl TM zugefügt. Es folgte eine Aggregationskontrolle mit einem Ansatz aus 200 µl PRP, 50 µl TM und 2,5 µl DMSO sowie 2,5 µl Ethanol bzw. TM. Dieser wurde mit 1 mM Arachidonsäure im Aggregationsansatz stimuliert. Anschließend wurde die Hemmung der Blutplättchen allein durch Indometazin bzw. Ramatroban überprüft. Wie eingangs erwähnt wurden die minimalen „Hemmkonzentrationen“ durch Vorversuche bereits ermittelt. So wurde für Indometazin zunächst eine Konzentration von 300 nM im Aggregationsansatz gewählt. Wenn mit dieser Konzentration keine Hemmung der Blutplättchen ersichtlich war, wurde diese auf 1 µM gesteigert. Die entsprechende „Hemmkonzentration“ wurde anschließend verwendet um die Interaktion mit Propyphenazon zu überprüfen. Bei den Messungen mit Ramatroban wurden 100 nM im Aggregationsansatz verwendet, da bei dieser Konzentration die Blutplättchen bei allen Probanden gehemmt waren. Im Anschluss wurde die Interaktion der Pharmaka mit Propyphenazon untersucht. Die genauen Konzentrationen sind Tabelle 5 zu entnehmen. Eine abschließende Aggregationskontrolle beendete die Versuchsreihe.

Da sich bereits bei der Stimulation mit Arachidonsäure keine Arzneimittelinteraktion zwischen Indometazin bzw. Ramatroban und Propyphenazon zeigte, wurde auf die Messung mit Kollagen verzichtet. Auf diese Weise konnte die Anzahl der erforderlichen Blutabnahmen und die Belastung der Probanden reduziert werden.

**Tabelle 5: Zusammensetzung der Versuchsansätze zur Messung der Interaktion von Propyphenazon (PP) (Lösungsmittel DMSO) und Indometazin (In) (Lösungsmittel Ethanol) bzw. Ramatroban (Ra) (Lösungsmittel TM) am Aggregometer durch Aktivierung der Aggregation mit 1 mM Arachidonsäure (Ara). Die Konzentrationsangaben beziehen sich auf die Endkonzentrationen im Aggregationsansatz.**

Versuchs-ansatz mit 200 µl PRP	50 µl TM	2,5 µl In/Ethanol bzw. Ra/TM	2,5 µl PP/DMSO	5 µl Ara
<b>Aggregationskontrolle</b>	TM	Ethanol	DMSO	1 mM Ara
Hemmung durch Indometazin	TM	0,3 - 1 µM In	DMSO	1 mM Ara
Interaktion von Indometazin mit Propyphenazon	TM	0,3 - 1 µM In	10 nM PP	1 mM Ara
	TM	0,3 - 1 µM In	30 nM PP	1 mM Ara
	TM	0,3 - 1 µM In	100 nM PP	1 mM Ara
	TM	0,3 - 1 µM In	300 nM PP	1 mM Ara
	TM	0,3 - 1 µM In	1 µM PP	1 mM Ara
	TM	0,3 - 1 µM In	3 µM PP	1 mM Ara
	TM	0,3 - 1 µM In	10 µM PP	1 mM Ara
	TM	0,3 - 1 µM In	30 µM PP	1 mM Ara
	TM	0,3 - 1 µM In	100 µM PP	1 mM Ara
<b>Aggregationskontrolle</b>	TM	Ethanol	DMSO	1 mM Ara
<b>Aggregationskontrolle</b>	TM	TM	DMSO	1 mM Ara
Hemmung durch Ramatroban	TM	100 nM Ra	DMSO	1 mM Ara
Interaktion von Ramatroban mit Propyphenazon	TM	100 nM Ra	10 nM PP	1 mM Ara
	TM	100 nM Ra	30 nM PP	1 mM Ara
	TM	100 nM Ra	100 nM PP	1 mM Ara
	TM	100 nM Ra	300 nM PP	1 mM Ara
	TM	100 nM Ra	1 µM PP	1 mM Ara
	TM	100 nM Ra	3 µM PP	1 mM Ara
	TM	100 nM Ra	10 µM PP	1 mM Ara
	TM	100 nM Ra	30 µM PP	1 mM Ara
	TM	100 nM Ra	100 µM PP	1 mM Ara
<b>Aggregationskontrolle</b>	TM	TM	DMSO	1 mM Ara

## **2.3. Thromboxan B<sub>2</sub> Bestimmungen**

### 2.3.1. Prinzip der Thromboxan B<sub>2</sub> Bestimmungen

TXA<sub>2</sub> ist ein labiles Derivat der Prostaglandinsynthese und wird schnell in das chemisch stabile und biologisch relativ inaktive Hydratationsprodukt TXB<sub>2</sub> umgewandelt (60). Die Konzentration dieses Produktes wurde mit dem TXB<sub>2</sub> ELISA Kit 501020 (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, USA) bestimmt. Dieses Immunoassay basiert auf einem kompetitiven Mechanismus: TXB<sub>2</sub> und ein TXB<sub>2</sub>-Acetylcholinesterase-Konjugat (TXB<sub>2</sub>-Tracer) konkurrieren um eine begrenzte Anzahl von TXB<sub>2</sub>-spezifischen Bindungsstellen am Kaninchen-Antiserum (61). Die Anzahl der TXB<sub>2</sub>-Tracer ist konstant, die Konzentration von TXB<sub>2</sub> in den Proben hingegen variiert (61). Dadurch ist die Menge an TXB<sub>2</sub>-Tracer, die an die TXB<sub>2</sub>-spezifischen Stellen bindet, umgekehrt proportional zur Menge an TXB<sub>2</sub> in den Proben (61). Das TXB<sub>2</sub> (sowohl der Tracer als auch das freie TXB<sub>2</sub> aus den Proben) wird von polyklonalen Immunglobulinen (IgG) gebunden (61). Dieses IgG wird zuvor hinzugefügt (61). Anschließend wird die Probe gewaschen um alle nicht gebundenen Reagenzien zu entfernen (61). Zum Schluss wird das Ellmans Reagenz hinzugegeben, welches das Substrat der Acetylcholinesterase enthält (61). Dadurch kann die Acetylcholinesterase des TXB<sub>2</sub>-Tracers Acetylthiocholin zu Thiocholin umwandeln (61). Thiocholin reagiert weiter zu 5-Thio-2-Nitrobenzoesäure, welche über eine ausgeprägte Absorption bei 412 nm verfügt und eine gelbe Farbe aufweist (61). Die Intensität der Farbe, welche mittels Photometrie bestimmt wird, ist proportional zur Menge des gebundenen TXB<sub>2</sub>-Tracers und somit antiproportional zur freien TXB<sub>2</sub>-Menge (s. Abb. 2) (61).

## Prinzip der TXB<sub>2</sub> Bestimmung

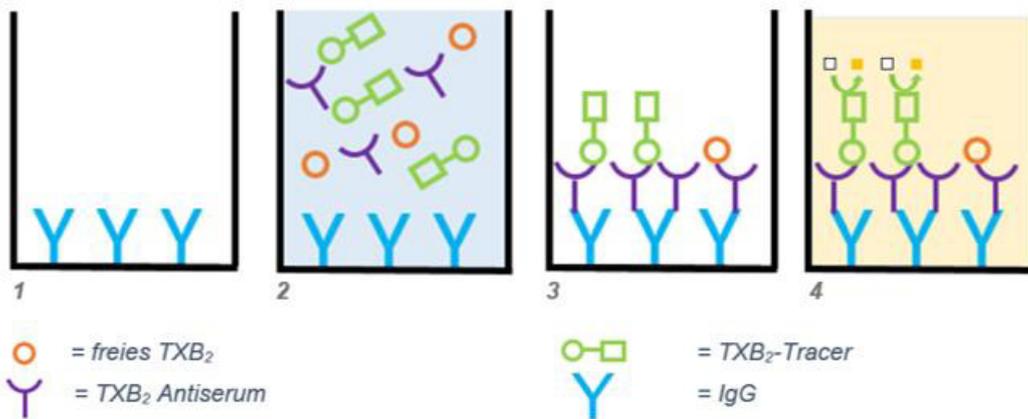


Abb. 2: „Prinzip der TXB<sub>2</sub> Bestimmung“

1: Vorbeschichtung der Platten mit IgG, welche gegen Kaninchenantiserum gerichtet sind

2: Zugabe von PAP (mit freiem TXB<sub>2</sub>), TXB<sub>2</sub>-Tracer (TXB<sub>2</sub>-Acetylcholinesterase Konjugat) und spezifisches TXB<sub>2</sub>-Antiserum

3: Konkurrenz um die Bindung von TXB<sub>2</sub> und dem TXB<sub>2</sub>-Tracer an das Antiserum, Auswaschen der Probe und Entfernung von nicht gebundenen Reagenzien

4: Zugabe von Ellmans Reagenz, wodurch Acetylcholin zu dem gelben Produkt 5-Thio-2-Nitrobenzoesäure umgewandelt wird. Die Gelbfärbung wird mittels Photometer bestimmt, wobei die Intensität der Farbe antiproportional zur freien TXB<sub>2</sub>-Menge ist. (61)

### 2.3.2. Durchführung der Messungen

Für die TXB<sub>2</sub> Bestimmungen wurde das eingefrorene, zellfreie Plasma der Aggregationsmessungen verwendet. Es wurden nur solche Proben ausgewählt, die bei Lichttransmissionsaggregationsmessungen folgende Kriterien erfüllten:

- Die Aggregationskontrollen vor und nach der Messreihe zeigten eine ähnliche Steigung und Amplitude (s. Kapitel 2.5. Auswertung der Ergebnisse).
- Es war keine Steigung bei alleiniger Zugabe von maximal 70 µM ASS, 1 µM Indometazin oder 100 nM Ramatroban ersichtlich (2. Messung „Hemmung durch ASS, Indometazin oder Ramatroban“).

Thromboxankonzentrationen wurden für folgende Messungen bestimmt:

- die Aggregationskontrolle
- die Hemmung durch ASS, Indometazin oder Ramatroban
- die Interaktion von ASS bzw. Indometazin oder Ramatroban mit 1 µM Propyphenazon
- die Hemmung der Plättchen durch 1 µM Propyphenazon.

Die definierte Konzentration von 1  $\mu$ M Propyphenazon wurde aufgrund der Vorversuche (Maximum der Interaktion bei der Lichttransmissionsaggregometrie) gewählt. Thromboxankonzentrationen unterhalb der Nachweisgrenze des Assays (1 ng/ml) wurde der Wert „0“ zugewiesen.

### 2.3.3. Vorversuche zum Vergleich der Stimulantien

In Vorversuchen wurde die Aktivierung der thrombozytären Thromboxansynthese durch die in dieser Arbeit verwendeten Agonisten (1 mM Arachidonsäure bzw. 2-3,3  $\mu$ g/ml Kollagen) miteinander verglichen (s. Abb. 3). Hier zeigte sich, dass bei der Stimulation durch Arachidonsäure erheblich höhere Konzentrationen von TXB<sub>2</sub> freigesetzt wurden als durch Kollagen. Beide Agonisten stimulierten die Aggregation unter den gewählten experimentellen Bedingungen jedoch thromboxanabhängig, so dass eine vollständige Hemmung durch ASS erreicht wurde.

#### **Vergleich der Aggregationen bei unterschiedlichen Stimulantien, gemessen an den TXB<sub>2</sub>-Konzentrationen**

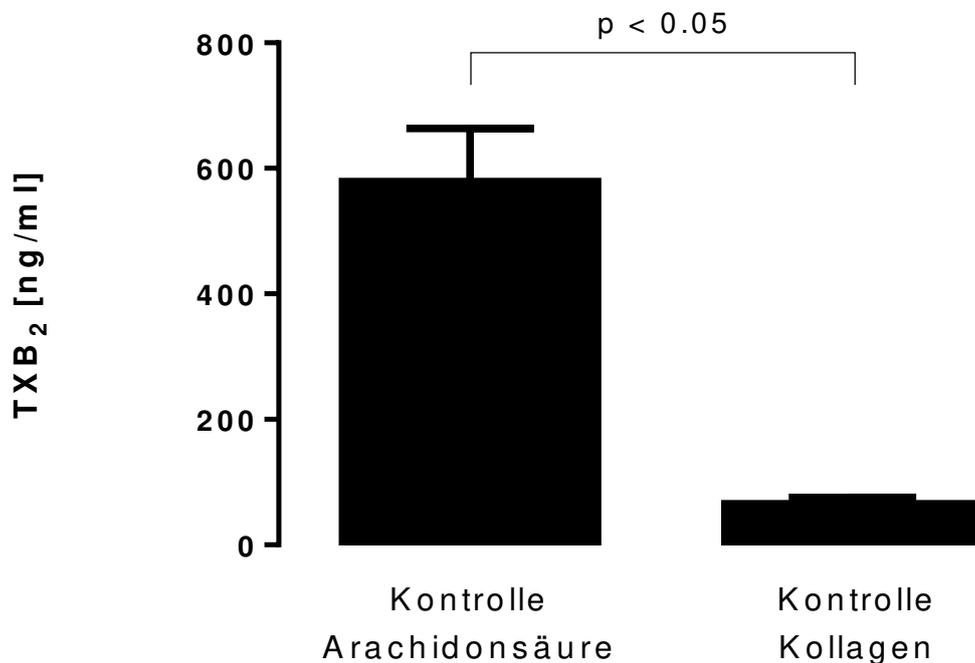


Abb. 3: „Vergleich der Aggregationen bei unterschiedlichen Stimulantien, gemessen an den TXB<sub>2</sub>-Konzentrationen“ beschreibt die TXB<sub>2</sub>-Konzentrationen (Mittelwert  $\pm$  SEM) in vitro. Die Klammer signalisiert statistische Signifikanz.

Links: Stimulation mit 1 mM Arachidonsäure (n = 14),  
Rechts: Stimulation mit 2 - 3,3  $\mu$ g/ml Kollagen (n = 6).

## **2.4. Durchflusszytometrie**

### 2.4.1. Prinzip der Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ermöglicht die Analyse phänotypischer Merkmale von Zellen (62). Dafür werden die Proben mit Antikörpern, welche mit Fluoreszenzfarbstoffen (Fluorochrome) konjugiert sind, vorbehandelt (63). Diese Antikörper mit den Fluorochromen binden an spezifische Oberflächenproteine von Zellen (in diesem Fall Cluster of Differentiation 41 und 62 p-Selektin, CD41 und CD62P) (63). Die Verwendung von mehreren Fluorochromen mit ähnlicher Anregungswellenlänge wie z.B. Fluoresceinisothiocyanat (FITC) und Phycoerythrin (PE) ermöglicht eine gleichzeitige Analyse mehrerer Zelleigenschaften (63). Durch eine solche Doppelmarkierungsbindung können Thrombozyten identifiziert werden (63). Mit Hilfe der Bestimmung des Oberflächenproteins CD62P kann die Thrombozytenaktivierung quantifiziert werden (64, 65). Ein Laser regt die Fluorochrome zu einem höheren Energielevel an, woraufhin diese nach der Rückkehr in den Ruhezustand Fluoreszenzlicht emittieren, welches vom Lichtdetektor erfasst wird (62, 66). So kann die p-Selektinexpression der Thrombozyten quantifiziert werden (62, 66).

### 2.4.2. Durchführung der Messungen

Für die durchflusszytometrischen Messungen wurde das Guava easyCyte5 (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) verwendet. Vor Versuchsbeginn wurde das Gerät mittels herstellereigener Beads auf Freigängigkeit der Kapillaren überprüft und kalibriert.

Nach der oben beschriebenen Blutplasmagewinnung wurde zunächst eine Aggregationskontrolle am Aggregometer durchgeführt. Falls die Probe dort keine Stimulation zeigte, wurde diese verworfen. Sofern die Bedingung der Aktivierbarkeit erfüllt war, erfolgte die Herstellung des „Grundansatzes“. Hierzu wurden 1,5 ml PRP und 15 µl Tirofiban in ein 2 ml Eppendorf-Cup pipettiert. Tirofiban ist ein GPIIb/IIIa Antagonist und sorgt für eine Thrombozytenaggregationshemmung (67, 68). Dieser Ansatz wurde 10 Minuten bei 37 °C im Eppendorf-Thermomixer (Typ 5436, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) inkubiert. Anschließend wurden daraus 200 µl PRP für den Ansatz

1 und 2 entnommen und zusammen mit 2 µl DMSO, sowie 4 µl TM in ein neues Eppendorf-Cup überführt. Für den Ansatz 3 wurden 100 µl PRP entnommen und 1 µl DMSO sowie 2 µl TM hinzugefügt. Der Ansatz 4 wurde analog zum Ansatz 1 und 2 hergestellt. Die weiteren Ansätze wurden variiert. Für jeden folgenden Ansatz wurden 100 µl PRP verwendet, 1 µl DMSO oder eine entsprechende Konzentration Propyphenazon und 2µl TM oder 30 bzw. 100 µM ASS.

Diese Ansätze wurden erneut über 10 Minuten bei 37 °C im Eppendorf-Thermomixer inkubiert. Anschließend wurden jeweils 50 µl der jeweiligen Ansätze entnommen und 1 µl Tris-Puffer bei Ansatz 1-3 zugefügt. In Ansatz 4 und allen folgenden Ansätzen wurde 1 µl einer 1 mM Arachidonsäurelösung hinzugefügt. Ansatz 3 stellt somit die „nicht stimulierte Kontrolle“, Ansatz 4 die „stimulierte Kontrolle“ dar. Sofern keine vermehrte p-Selektinexpression in Ansatz 4 im Vergleich zu Ansatz 3 zu sehen war, wurden die Proben verworfen.

Im Anschluss wurden die Ansätze erneut für 10 Minuten bei 37 °C inkubiert. Daraufhin erfolgte die Zugabe der mit Fluoreszenzfarbstoffen markierten Antikörper. In Ansatz 1 wurden 5 µl IgG-PE und 1 µl anti-CD41-FITC hinzu pipettiert. In Ansatz 2 wurden 5 µl anti-CD62P-PE und 1 µl IgG-FITC hinzugefügt. Diese Ansätze erfolgten zur Isotypenkontrolle, welche beweist, dass keine unspezifischen Bindungen vorliegen. In allen folgenden Ansätzen wurden zur Markierung 5 µl anti-CD62P-PE und 1 µl anti-CD41-FITC zugefügt. Die stimulierte Kontrolle wurde mit 3 Ansätzen hergestellt. Es folgte eine 10-minütige Inkubationszeit im Dunkeln bei 37 °C. Abschließend wurden zu jedem Ansatz jeweils 400 µl Isoton hinzugefügt. Eine tabellarische Darstellung des Versuchsprotokolls ist in Abb. 4 ersichtlich.

Da bei den ersten durchflusszytometrischen Messungen keine Interaktionen von Propyphenazon und ASS bezogen auf die thrombozytenhemmende Wirkung ersichtlich waren, wurde einmalig das Protokoll geändert. Hierzu wurde bei Proband Nummer 34 nach der Inkubation des „Grundansatzes“ zur Herstellung der Ansätze zunächst nur Propyphenazon bzw. DMSO hinzugegeben. Diese wurden weitere 5 Minuten bei 37 °C inkubiert. Dies sollte Propyphenazon einen zeitlichen „Vorsprung“ gegenüber ASS geben. Im Anschluss wurden ASS bzw. TM hinzugefügt und es wurde weiter nach Protokoll verfahren. Es zeigten sich

jedoch keine Änderungen der Messwerte, sodass im Folgenden das ursprüngliche Versuchsprotokoll entsprechend Abb. 4 gewählt wurde.

Die Hemmung der p-Selektinexpression wurde durch 30  $\mu\text{M}$  und 100  $\mu\text{M}$  ASS getestet. Des Weiteren wurde die Hemmung der p-Selektinexpression durch Propyphenazon bei Konzentrationen von 1 pM bis 3  $\mu\text{M}$  untersucht. Zusätzlich wurden 1 nM bis 3  $\mu\text{M}$  Propyphenazon mit 30  $\mu\text{M}$  oder 100  $\mu\text{M}$  ASS kombiniert. Insgesamt wurden 10 Messungen mit PRP von 7 Blutspendern am Durchflusszytometer durchgeführt.

## Versuchsprotokoll zur Messung der p-Selektinexpression

„Grundansatz“:  
1,5 ml PRP  
15 µl Tirofiban

↓ 10 min Inkubation bei 37°C

1 und 2: Isotypenkontrolle	3: nicht stimulierte Kontrolle	4: stimulierte Kontrolle	5: Versuchs- ansätze
200 µl PRP 2 µl DMSO 4 µl TM	100 µl PRP 1 µl DMSO 2 µl TM	200 µl PRP 2 µl DMSO 4 µl TM	100 µl PRP 1 µl PP / DMSO 2 µl ASS / TM

↓ 10 min Inkubation bei 37°C

1	2	3	4	5
50 µl PRP 1 µl Tris- Puffer	50 µl PRP 1 µl Tris- Puffer	50 µl PRP 1 µl Tris- Puffer	50 µl PRP 1 µl Ara	50 µl PRP 1 µl Ara

↓ 10 min Inkubation bei 37°C

1	2	3	(3x) 4	5
5 µl PRP 5 µl IgG-PE 1 µl anti- CD41-FITC	5 µl PRP 5 µl anti- CD62P-PE 1 µl IgG-FITC	5 µl PRP 5 µl anti- CD62P-PE 1 µl anti- CD41-FITC	5 µl PRP 5 µl anti- CD62P-PE 1 µl anti- CD41-FITC	5 µl PRP 5 µl anti- CD62P-PE 1 µl anti- CD41-FITC

↓ 10 min Inkubation bei 37°C (dunkel)

Zufügen von  
400 µl Isoton

Messungen am  
Durchflusszytometer

Abb. 4: „Versuchsprotokoll zur Messung der p-Selektinexpression“ beschreibt den zeitlichen Verlauf und die zugefügten Substanzen der Messreihen zur p-Selektinexpression.

## **2.5. Auswertung der Ergebnisse**

Die Werte der Lichttransmissionsaggregometrie (maximale Steigung der Aggregationskurve und Amplitude), der TXB<sub>2</sub> Bestimmungen (TXB<sub>2</sub>-Konzentrationen) und die der Durchflusszytometrie (prozentualer Anteil an CD62P positiven Thrombozyten) wurden in Mittelwert  $\pm$  Standardfehler (SEM) von der Anzahl der durchgeführten Versuche berechnet und angegeben.

Wie oben beschrieben, wurde die Testung der Aktivität der Thrombozyten mehrfach durchgeführt (Aggregationskontrolle). Solche Messreihen, bei denen sich die Kontrollmessungen vor und nach der Messreihe stark voneinander unterschieden, wurden in den statistischen Berechnungen nicht berücksichtigt. Für den Ausschluss dieser Extremwerte wurden, zur objektiven Bestimmung eines Referenzwertes, die Daten der Kontrollmessungen vor und nach den Messreihen für jede Methodik gesammelt und der prozentuale Anteil der 2. Aggregationskontrolle an der 1. Aggregationskontrolle errechnet (im Folgenden „prozentualer Kontrollwert“). Anschließend wurde für jede Methodik der Mittelwert sowie dessen Standardabweichung für den prozentualen Kontrollwert bestimmt. Als Referenz wurden alle Messreihen ausgeschlossen, bei denen dieser prozentuale Kontrollwert den Mittelwert  $\pm 2 \times$  Standardabweichung über- bzw. unterstieg. Dadurch wurden ca. 95% der Daten in der statistischen Auswertung berücksichtigt und solche Messreihen ausgeschlossen, bei denen die Aggregationskontrollen vor und nach der Messreihe sehr stark voneinander abwichen.

Die statistische Auswertung erfolgte mit IBM SPSS Statistics Version 24. Zunächst fand für zusammengehörige Messreihen die Prüfung auf Normalverteilung mittels Kolmogorov-Smirnov-Test und Shapiro-Wilks-Test statt. Für alle Messreihen gab es Datensätze mit einem Signifikanzniveau  $p < 0.05$ . Somit lag keine Normalverteilung vor. Daher wurden nicht-parametrische Tests durchgeführt. Zum Paarvergleich für verbundene Stichproben wurde der Wilcoxon Test verwendet. Für den Vergleich unverbundener Stichproben, beispielsweise bei der Analyse der unterschiedlichen Stimulantien, wurde der Mann-Whitney-U-Test angewandt.

Für den Vergleich der Plättchenaktivität (gemessen als Steigung der Aggregationskurve, TXB<sub>2</sub>-Konzentration, prozentualer Anteil an CD62P positiven Thrombozyten) wurden folgende Hypothesen formuliert:

- Die Plättchenaktivität ist in Gegenwart von ASS/ Indometazin/ Ramatroban niedriger als die Plättchenaktivität der Kontrollmessung ohne Zugabe dieser Substanzen.
- Die Plättchenaktivität in Gegenwart der Kombination von ASS und Propyphenazon ist höher als die Plättchenaktivität in Gegenwart von ASS allein (Arzneimittelinteraktion zwischen diesen Substanzen).
- Die Plättchenaktivität bei alleinigem Zusatz von Propyphenazon ist niedriger als die Plättchenaktivität der Kontrollmessung (Thrombozytenhemmung durch Propyphenazon).

Auf Grund der gerichteten Fragestellungen wurde einseitig getestet. Das Signifikanzniveau wurde auf  $p < 0.05$  festgelegt. Bei mehreren Paarvergleichen (Wilcoxon-Tests/ Mann-Whitney-U-Tests) wurde eine manuelle Bonferroni-Korrektur des Signifikanzniveaus vorgenommen. Hierzu wurden 2 Paarvergleiche bei den Konzentrationen 1  $\mu\text{M}$  und 3  $\mu\text{M}$  Propyphenazon gewählt ( $p < 0.025$ ). Gegebenenfalls wurden 3 Paarvergleiche mit einem Signifikanzniveau von  $p < 0.016$  gewählt.

Die Grafikerstellung erfolgte mittels GraphPad Prism 6.

## 3. Ergebnisse

### 3.1. Messungen zur Interaktion von ASS und Propyphenazon

#### 3.1.1 Stimulation der Thrombozyten mit Arachidonsäure

**Lichttransmissionsaggregometrie:** Die Thrombozyten zeigten erwartungsgemäß nach Zusatz von 1 mM Arachidonsäure in der Aggregationskontrolle (ohne Zugabe von Pharmaka) eine starke Aggregation, entsprechend einer maximalen Zunahme der Lichttransmission in der Registrierung des Schreibers von  $15,9 \pm 1,2$  cm/min ( $n = 12$ ). Bei einem der Probanden wichen die Kontrollmessungen (Stimulation mit 1 mM Arachidonsäure, keine Inhibitoren) zu Beginn und Ende des Protokolls stark voneinander ab (s. Kapitel 2.5.), so dass diese Messungen verworfen werden mussten. Bei PRP von 4 weiteren Probanden war eine Stimulation der Aggregation mit 1 mM Arachidonsäure nicht möglich. Diese Proben wurden ebenfalls nicht in die Auswertung einbezogen. Eine graphische Darstellung zeigt Abb. 5.

Wie erwartet wird die Arachidonsäure-induzierte Aggregation durch ASS signifikant gehemmt ( $p < 0.05$ , einseitig getestet). Die Zugabe von  $30 \mu\text{M}$  ASS führt bei 5 von 12 Probanden zu einer vollständigen Aggregationshemmung (Steigung = 0). In einem Fall muss (protokollgemäß) die Konzentration von  $30$  auf  $70 \mu\text{M}$  ASS erhöht werden, um die für das Experiment notwendige vollständige Hemmung der Aggregation zu erreichen. Die in allen Messungen im Mittel benötigte Konzentration von ASS, um eine vollständige Aggregationshemmung zu erreichen, beträgt  $43 \pm 4 \mu\text{M}$  ( $n = 12$ ).

Propyphenazon hebt bei 8 von 12 Probanden (66,7%) die vollständige Hemmung der Aggregation durch ASS im Sinne einer Interaktion zwischen diesen Substanzen auf. Die Interaktion ist konzentrationsabhängig. Das Maximum der Interaktion mit ASS liegt bei  $1 \mu\text{M}$  Propyphenazon. Hier ist die Aggregation im Vergleich zu ASS allein statistisch signifikant stärker als in der Kontrolle ohne Propyphenazon ( $p < 0.05$ , einseitig getestet). Bei dieser Konzentration von Propyphenazon werden im Durchschnitt ca. 60% der Aggregation der Kontrollmessungen erreicht. Bei dem PRP von 4 Probanden beträgt die Aggregation sogar über 90% der Kontrollmessungen. In Gegenwart sehr geringer

(10 nM) bzw. sehr hoher (100  $\mu$ M) Konzentrationen von Propyphenazon ist bei keinem Probanden eine Interaktion mit der Hemmung der Aggregation durch ASS ersichtlich (n = 8). Zusammengefasst nimmt die Interaktion von Propyphenazon mit der Thrombozytenhemmung durch ASS konzentrationsabhängig zunächst zu. Bei einer Konzentration von Propyphenazon von 1  $\mu$ M und darüber kehrt sich die Dosisabhängigkeit jedoch um und höhere Propyphenazon-Konzentrationen führen zu abnehmender Aggregation. Es resultiert insofern eine „glockenförmige“ Konzentrations-Wirkungsbeziehung (s. Abb. 5).

**Thrombozytäre Thromboxansynthese:** Bei den TXB<sub>2</sub> Bestimmungen zeigen sich in den Aggregationskontrollen Werte von 579,2  $\pm$  84,4 ng/ml (n = 14). Bei diesen Messungen wurden Werte eines Probanden ausgeschlossen, da sich die Aggregationskontrollen (vor und nach der Messreihe) zu stark voneinander unterschieden (s. Kapitel 2.5. Auswertung der Ergebnisse). Da nur solche Messreihen verwendet wurden, die bereits bei der Lichttransmissionsaggregometrie eine Aktivierbarkeit durch Arachidonsäure zeigten, wurden auch Messreihen, bei denen keine Stimulation der Aggregation möglich war, ausgeschlossen (s. Kapitel 2.3.2.). Alle Messreihen zeigten in Abwesenheit von ASS und Propyphenazon (Aggregationskontrolle) eine Arachidonsäure-induzierte Stimulation der thrombozytären Thromboxansynthese. Eine graphische Darstellung der Thromboxankonzentrationen findet sich in Abb. 6.

Durch die Zugabe von ASS ist TXB<sub>2</sub> in keiner Arachidonsäure-stimulierten Probe nachweisbar (n = 11). Es findet sich somit erwartungsgemäß signifikant weniger TXB<sub>2</sub> in den Proben mit ASS im Vergleich zur stimulierten Kontrolle (p < 0.05, einseitig getestet).

In Gegenwart von ASS und Propyphenazon ist bei 9 von 11 Probanden TXB<sub>2</sub> in der Probe nachweisbar. Hier liegen die TXB<sub>2</sub>-Konzentrationen zwischen 184,8 und 447,1 ng/ml. Nur bei zwei PRP-Proben wird in Gegenwart von Propyphenazon eine vollständige Hemmung der TX-Synthese erreicht. Die TXB<sub>2</sub>-Konzentrationen in den Proben mit ASS allein sind statistisch signifikant geringer als die TXB<sub>2</sub>-Konzentrationen in den Proben mit ASS in Kombination

mit 1  $\mu\text{M}$  Propyphenazon ( $p < 0.05$ , einseitig getestet). Insofern findet sich auch bei der thrombozytären Thromboxansynthese, ähnlich der Aggregation, eine erhebliche pharmakologische Interaktion zwischen ASS und Propyphenazon.

**Thrombozytäre p-Selektinexpression:** In den durchflusszytometrischen Messungen sind  $21\% \pm 4\%$  CD62P positive Thrombozyten in den stimulierten Kontrollen ( $n = 9$ ). Die p-Selektinexpression konnte in den Proben von 2 Probanden nicht durch Arachidonsäure stimuliert werden. Die Arachidonsäure-induzierte p-Selektinexpression wird durch 100  $\mu\text{M}$  ASS signifikant inhibiert ( $p < 0.05$ , einseitig getestet). Eine Interaktion von ASS und Propyphenazon ist jedoch nicht zu beobachten (s. Abb. 7).

**Arzneimittelinteraktion zwischen ASS und Propyphenazon bezogen auf deren thrombozytenhemmende Wirkung, gemessen an der maximalen Steigung im Lichttransmissionsaggregometer (Stimulation mit Arachidonsäure)**

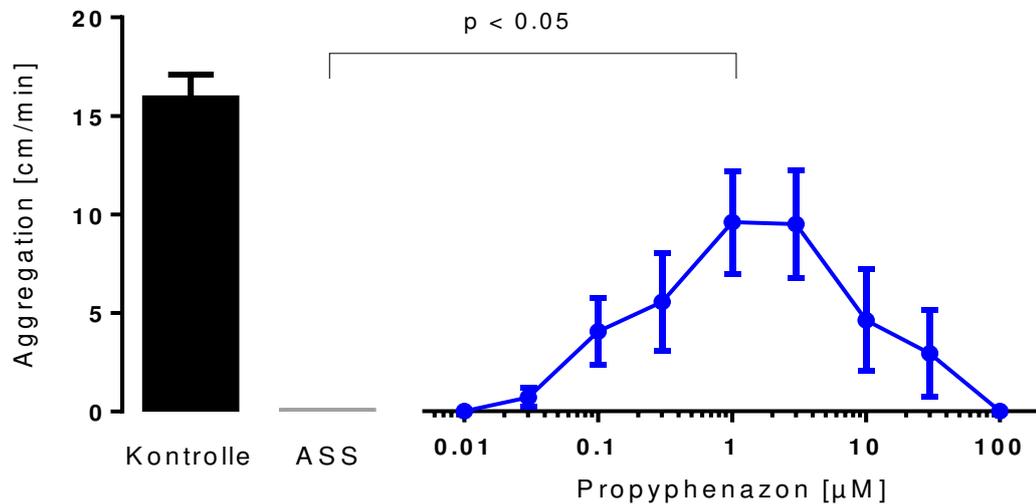


Abb. 5: „Arzneimittelinteraktion zwischen ASS und Propyphenazon bezogen auf deren thrombozytenhemmende Wirkung, gemessen an der maximalen Steigung im Lichttransmissionsaggregometer (Stimulation mit Arachidonsäure)“ zeigt die Thrombozytenaggregation (Mittelwert  $\pm$  SEM) in vitro nach Stimulation mit 1 mM Arachidonsäure. Die Klammer signalisiert statistische Signifikanz.

Links: Aggregationskontrolle ohne Zugabe von Pharmaka und in Gegenwart von 30 - 70  $\mu$ M ASS ( $n = 12$ ).

Rechts: konzentrationsabhängige Aggregation in Gegenwart von 10 nM - 100  $\mu$ M Propyphenazon und 30 - 70  $\mu$ M ASS ( $n = 8 - 12$ ).

**Arzneimittelinteraktion zwischen ASS und Propyphenazon bezogen auf deren thrombozytenhemmende Wirkung, gemessen an den TXB<sub>2</sub>-Konzentrationen (Stimulation mit Arachidonsäure)**

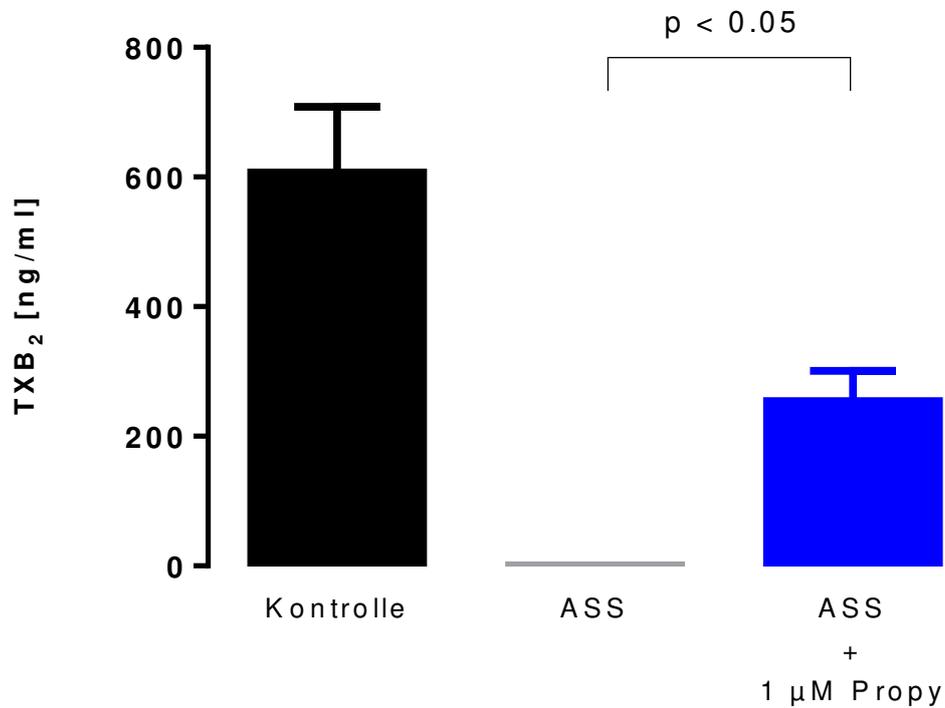


Abb. 6: „Arzneimittelinteraktion zwischen ASS und Propyphenazon bezogen auf deren thrombozytenhemmende Wirkung, gemessen an den TXB<sub>2</sub>-Konzentrationen (Stimulation mit Arachidonsäure)“ zeigt die TXB<sub>2</sub>-Konzentrationen (Mittelwert ± SEM) *in vitro* nach Stimulation mit 1 mM Arachidonsäure (n = 11). Die Klammer signalisiert statistische Signifikanz. Links: TXB<sub>2</sub>-Konzentrationen in der stimulierten Kontrollmessung ohne Zugabe von Pharmaka, Mitte: TXB<sub>2</sub>-Konzentrationen in Gegenwart von 30 - 70 µM ASS, Rechts: TXB<sub>2</sub>-Konzentrationen in Gegenwart von 1 µM Propyphenazon und 30 - 70 µM ASS.

**Arzneimittelinteraktion zwischen ASS und Propyphenazon bezogen auf deren thrombozytenhemmende Wirkung, gemessen an der p-Selektinexpression (Stimulation mit Arachidonsäure)**

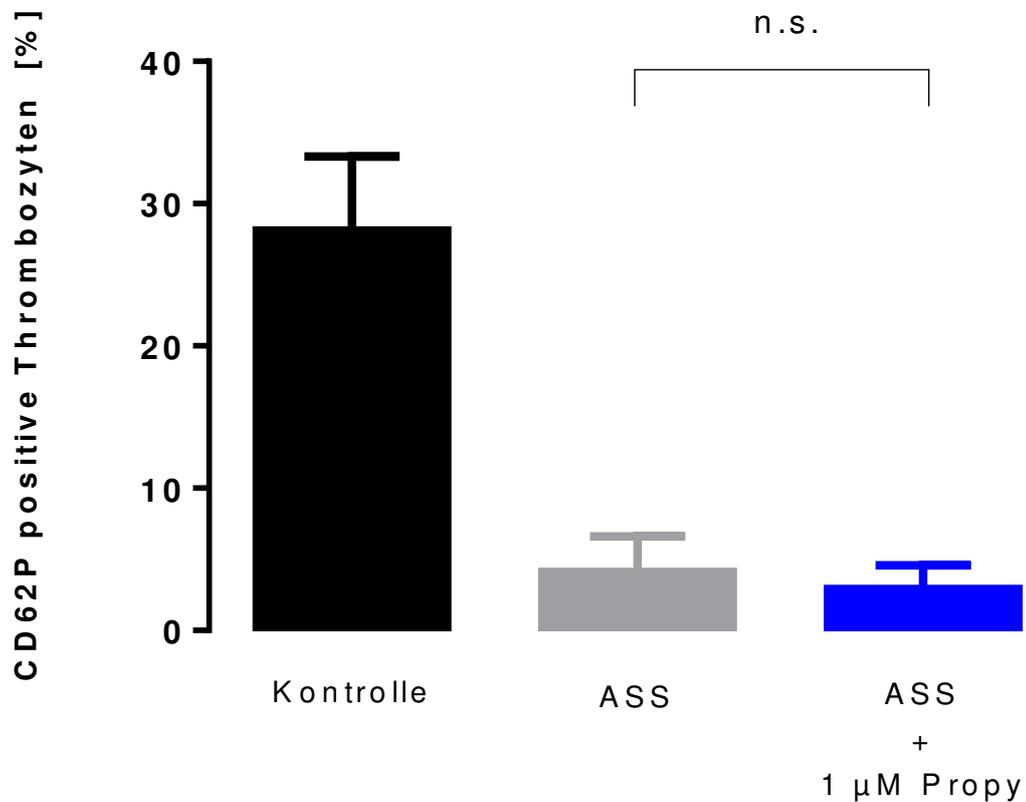


Abb. 7: „Arzneimittelinteraktion zwischen ASS und Propyphenazon bezogen auf deren thrombozytenhemmende Wirkung, gemessen an der p-Selektinexpression (Stimulation mit Arachidonsäure)“ zeigt den Anteil CD62P positiver Thrombozyten (Mittelwert  $\pm$  SEM) in vitro nach Stimulation mit 1 mM Arachidonsäure ( $n = 3 - 5$ ). Die Klammer signalisiert keine statistische Signifikanz.

Links: Anteil CD62P positiver Thrombozyten in der Kontrollmessung ohne Zugabe von Pharmaka,  
Mitte: Anteil CD62P positiver Thrombozyten in Gegenwart von 100  $\mu$ M ASS,  
Rechts: Anteil CD62P positiver Thrombozyten in Gegenwart von 1  $\mu$ M Propyphenazon und 100  $\mu$ M ASS.

### 3.1.2. Stimulation der Thrombozyten mit Kollagen

**Lichttransmissionsaggregometrie:** Stimulation des PRP mit Kollagen ergibt eine maximale Steigung der Aggregationskurve von  $14,3 \pm 0,8$  cm/min ( $n = 8$ ). Vollständige Aggregation wird durch  $2,7 \pm 0,2$   $\mu$ g/ml Kollagen erreicht. Eine komplette Hemmung der Aggregation durch 30-100  $\mu$ M ASS wird nur bei 8 der 15 PRP-Proben erreicht. Darin unterscheidet sich die Kollagen-induzierte Aggregation von der Stimulation mit Arachidonsäure, wo die Mehrzahl der untersuchten PRP-Proben durch diese Konzentration ASS hinsichtlich der Aggregation vollständig gehemmt wurden (s.o.). Dementsprechend mussten 3 Versuchsreihen abgebrochen werden (s. Kapitel 2.2.3. Versuche zur Interaktion von ASS und Propyphenazon). Eine graphische Darstellung der Messergebnisse durch Stimulation mit Kollagen gibt Abb. 8.

Ein Maximum der Interaktion zwischen Propyphenazon und ASS zeigt sich bei einer Konzentration von 1  $\mu$ M Propyphenazon. In Gegenwart von ASS ist die Aggregation bei dieser Konzentration von Propyphenazon signifikant höher als die Aggregation bei alleiniger Zugabe von ASS ( $p < 0.025$ , einseitig getestet). Die in diesen Messungen im Mittel benötigte Konzentration von ASS, um eine vollständige Aggregationshemmung zu erreichen, beträgt  $36 \pm 4$   $\mu$ M ( $n = 5$ ).

**Thrombozytäre Thromboxansynthese:** Bei den TXB<sub>2</sub>-Bestimmungen musste von 7 untersuchten PRP Proben eine aufgrund von stark schwankenden Aggregationskontrollen ausgeschlossen werden (s. Kapitel 2.5. Auswertung der Ergebnisse). Die Stimulation durch Kollagen führt in den Kontrollmessungen zu TXB<sub>2</sub>-Konzentrationen von  $66,0 \pm 9,4$  ng/ml ( $n = 6$ ). Erwartungsgemäß bewirkte  $33 \pm 2$   $\mu$ M ASS eine weitgehende Hemmung der TXB<sub>2</sub>-Synthese, so dass nur  $1,8 \pm 1,3$  ng/ml im Thrombozyten-Überstand nachweisbar sind. Die TXB<sub>2</sub>-Konzentrationen mit ASS sind somit signifikant niedriger als die der Kontrollmessungen ( $p < 0.05$ , einseitig getestet). Eine graphische Darstellung der Messergebnisse der TXB<sub>2</sub>-Konzentrationen im Überstand unter Stimulation mit Kollagen findet sich in Abb. 9.

In Proben mit ASS und 1  $\mu$ M Propyphenazon sind  $16,5 \pm 4,9$  ng/ml TXB<sub>2</sub> messbar. Die TXB<sub>2</sub>-Konzentrationen in Gegenwart von ASS alleine sind signifikant niedriger als die TXB<sub>2</sub>-Konzentrationen mit ASS und 1  $\mu$ M

Propyphenazon ( $1,8 \pm 1,3$  ng/ml bzw.  $16,5 \pm 4,9$  ng/ml,  $n = 6$ ,  $p < 0.05$ , einseitig getestet).

Die **thrombozytäre p-Selektinexpression** wurde, wie in Abschnitt 2.1.5. erwähnt, aufgrund von Vorversuchen, die bei Kollagen keine ausreichende Stimulation ergaben, nicht getestet.

**Arzneimittelinteraktion zwischen ASS und Propyphenazon bezogen auf deren thrombozytenhemmende Wirkung, gemessen an der maximalen Steigung im Lichttransmissionsaggregometer (Stimulation mit Kollagen)**

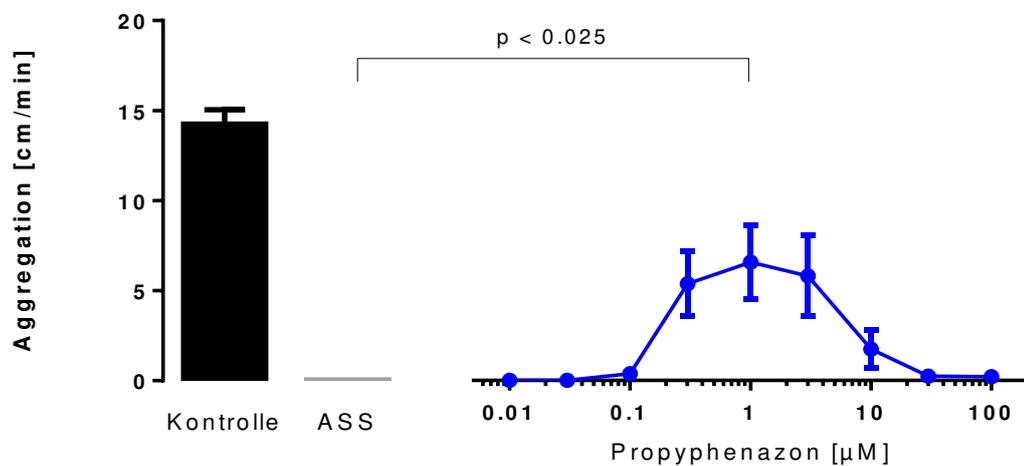


Abb. 8: „Arzneimittelinteraktion zwischen ASS und Propyphenazon bezogen auf deren thrombozytenhemmende Wirkung, gemessen an der p-Selektinexpression (Stimulation mit Kollagen)“ zeigt die Thrombozytenaggregation (Mittelwert  $\pm$  SEM) in vitro nach Stimulation mit 2 - 3,3  $\mu\text{g/ml}$  Kollagen ( $n = 8$ ). Die Klammer signalisiert statistische Signifikanz. Links: Aggregationskontrolle ohne Zugabe von Pharmaka und in Gegenwart von 30 - 60  $\mu\text{M}$  ASS, Rechts: konzentrationsabhängige Aggregation in Gegenwart von 10 nM - 100  $\mu\text{M}$  Propyphenazon und 30 - 60  $\mu\text{M}$  ASS ( $n = 8$ ).

**Arzneimittelinteraktion zwischen ASS und Propyphenazon bezogen auf deren thrombozytenhemmende Wirkung, gemessen an den TXB<sub>2</sub>-Konzentrationen (Stimulation mit Kollagen)**

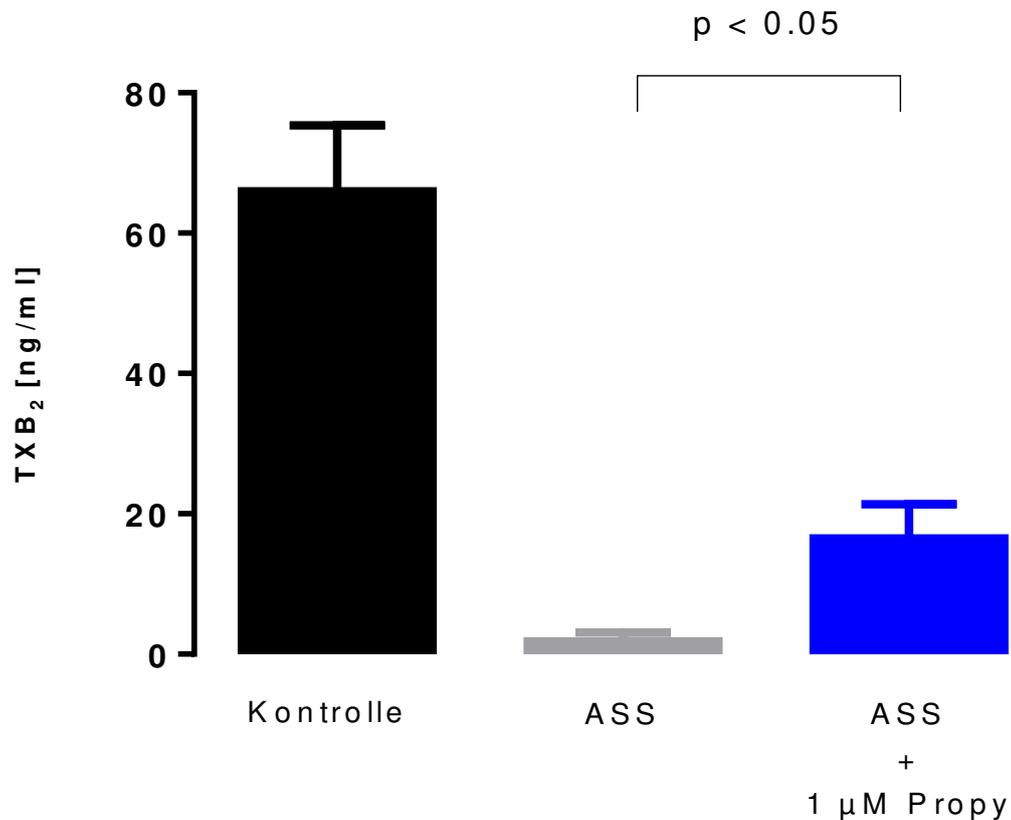


Abb. 9: „Arzneimittelinteraktion zwischen ASS und Propyphenazon bezogen auf deren thrombozytenhemmende Wirkung, gemessen an den TXB<sub>2</sub>-Konzentrationen (Stimulation mit Kollagen)“ zeigt die TXB<sub>2</sub>-Konzentrationen (Mittelwert ± SEM) in vitro nach Stimulation mit 2 - 3,3 µg/ml Kollagen (n = 6). Die Klammer signalisiert statistische Signifikanz.

Links: TXB<sub>2</sub>-Konzentrationen in der stimulierten Kontrollmessung ohne Zugabe von Pharmaka,

Mitte: TXB<sub>2</sub>-Konzentrationen in Gegenwart von 30 - 60 µM ASS,

Rechts: TXB<sub>2</sub>-Konzentrationen in Gegenwart von 1 µM Propyphenazon und 30 - 60 µM ASS.

## **3.2. Messungen zur Hemmung der Thrombozyten durch Propyphenazon**

Die zuvor beschriebene Interaktion von Propyphenazon und ASS legt nahe, dass Propyphenazon mit ASS an der COX-1 konkurriert. Insofern war von Interesse, in welchem Maß Propyphenazon selbst die Thrombozytenaggregation und Thromboxansynthese hemmt.

Für die Thromboxansynthese sowie die p-Selektinexpression, wurde wie in Kapitel 2.1.5. beschrieben, die konzentrationsabhängige Hemmung der Thrombozyten durch definierte Konzentrationen von Propyphenazon untersucht.

### **3.2.1. Stimulation mit Arachidonsäure**

**Lichttransmissionsaggrometrie:** In der Versuchsreihe durch Stimulation mit 1 mM Arachidonsäure und alleiniger Zugabe von Propyphenazon wird die Aggregation in der Lichttransmissionsaggrometrie durch Propyphenazon in Konzentrationen von 1  $\mu$ M im Vergleich zur Aggregationskontrolle signifikant gehemmt ( $15,1 \pm 1,4$  cm/min bzw.  $12,2 \pm 2,1$  cm/min,  $n = 10$ ,  $p < 0.05$ , einseitig getestet). Bei 10  $\mu$ M Propyphenazon ist die Aggregation bei der Hälfte der Proben vollständig gehemmt. Bei 30  $\mu$ M Propyphenazon sind nur noch zwei Aggregationen nicht vollständig gehemmt und bei 100  $\mu$ M Propyphenazon sind alle Proben vollständig gehemmt ( $n = 10$ ). Die Messreihe eines Probanden wurde aufgrund von stark unterschiedlichen Aggregationskontrollmessungen nicht in die Auswertung einbezogen (s. Kapitel 2.5). Die konzentrationsabhängige Hemmung der Aggregation durch Propyphenazon ist in Abb. 10 dargestellt.

**Thrombozytäre Thromboxansynthese:** Gegenüber den Kontrollmessungen führte 1  $\mu$ M Propyphenazon zu einer signifikanten Hemmung der thrombozytären Thromboxansynthese ( $579,2 \pm 84,4$  ng/ml bzw.  $416,4 \pm 80,3$  ng/ml,  $n = 7$ ,  $p < 0.05$ , einseitig getestet). Dies ist in Abb. 11 dargestellt.

**Thrombozytäre p-Selektinexpression:** Propyphenazon hemmt ebenfalls die p-Selektinexpression. Dies ist für die Konzentrationen 1 nM und 1  $\mu$ M statistisch signifikant ( $21,3 \pm 4,4\%$  bzw.  $16,8 \pm 5,8\%$  bei 1 nM und  $13,2 \pm 6,4\%$  bei 1  $\mu$ M,  $n = 6 - 9$ ,  $p < 0.016$ , einseitig getestet) (s. Abb. 12).

## Hemmung der Aggregation durch Propyphenazon, gemessen an der maximalen Steigung im Lichttransmissionsaggregometer (Stimulation mit Arachidonsäure)

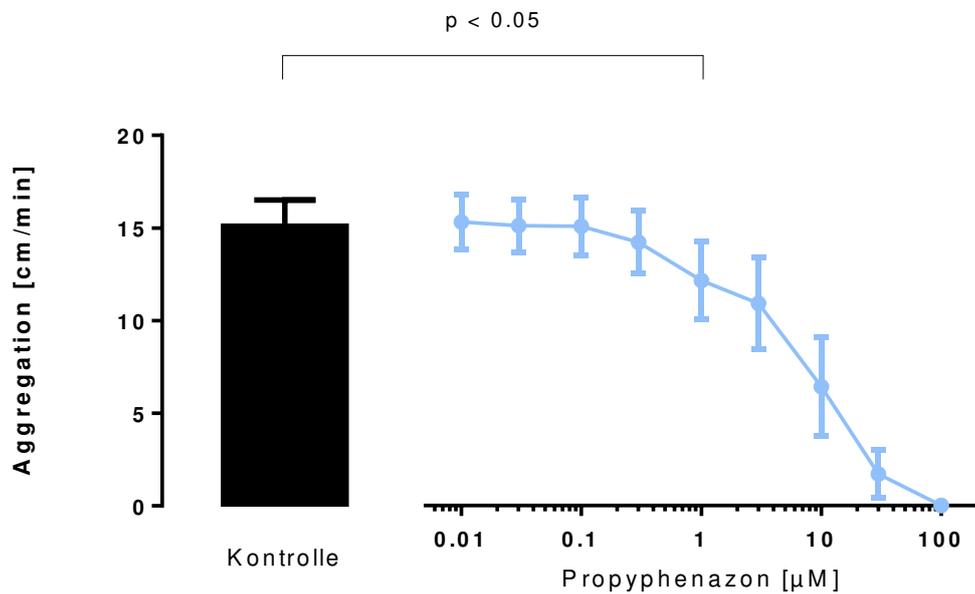


Abb. 10: „Hemmung der Aggregation durch Propyphenazon, gemessen an der maximalen Steigung im Lichttransmissionsaggregometer (Stimulation mit Arachidonsäure)“ zeigt die konzentrationsabhängige Thrombozytenaggregation (Mittelwert  $\pm$  SEM) *in vitro* nach Stimulation mit 1 mM Arachidonsäure in Gegenwart von Propyphenazon ( $n = 8 - 10$ ). Die Klammer signalisiert statistische Signifikanz.

Links: Aggregationskontrolle ohne Zugabe von Pharmaka,  
Rechts: konzentrationsabhängige Aggregation in Gegenwart von  
10 nM - 100 µM Propyphenazon.

**Hemmung der Aggregation durch Propyphenazon, gemessen an den TXB<sub>2</sub>-Konzentrationen (Stimulation mit Arachidonsäure)**

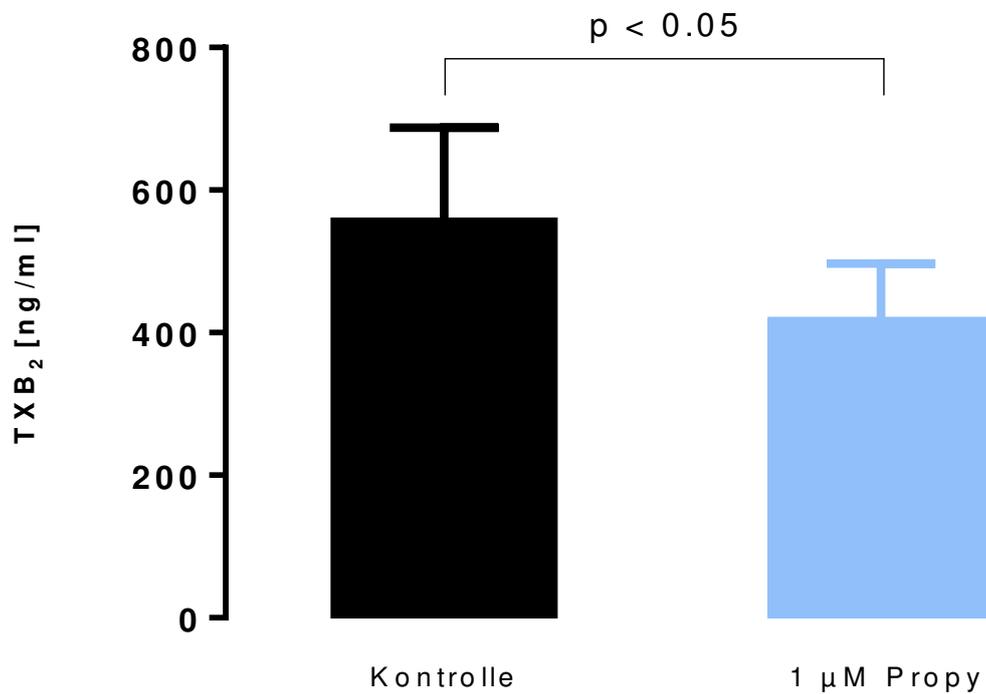


Abb. 11: „Hemmung der Aggregation durch Propyphenazon, gemessen an den TXB<sub>2</sub>-Konzentrationen (Stimulation mit Arachidonsäure)“ zeigt die TXB<sub>2</sub>-Konzentrationen (Mittelwert ± SEM) *in vitro* nach Stimulation mit 1 mM Arachidonsäure (n = 7). Die Klammer signalisiert statistische Signifikanz.

Links: TXB<sub>2</sub>-Konzentrationen in der Aggregationskontrolle ohne Zugabe von Pharmaka, Rechts: TXB<sub>2</sub>-Konzentrationen in Gegenwart von 1 µM Propyphenazon.

## Hemmung der Aggregation durch Propyphenazon, gemessen an den CD62P positiven Thrombozyten (Stimulation mit Arachidonsäure)

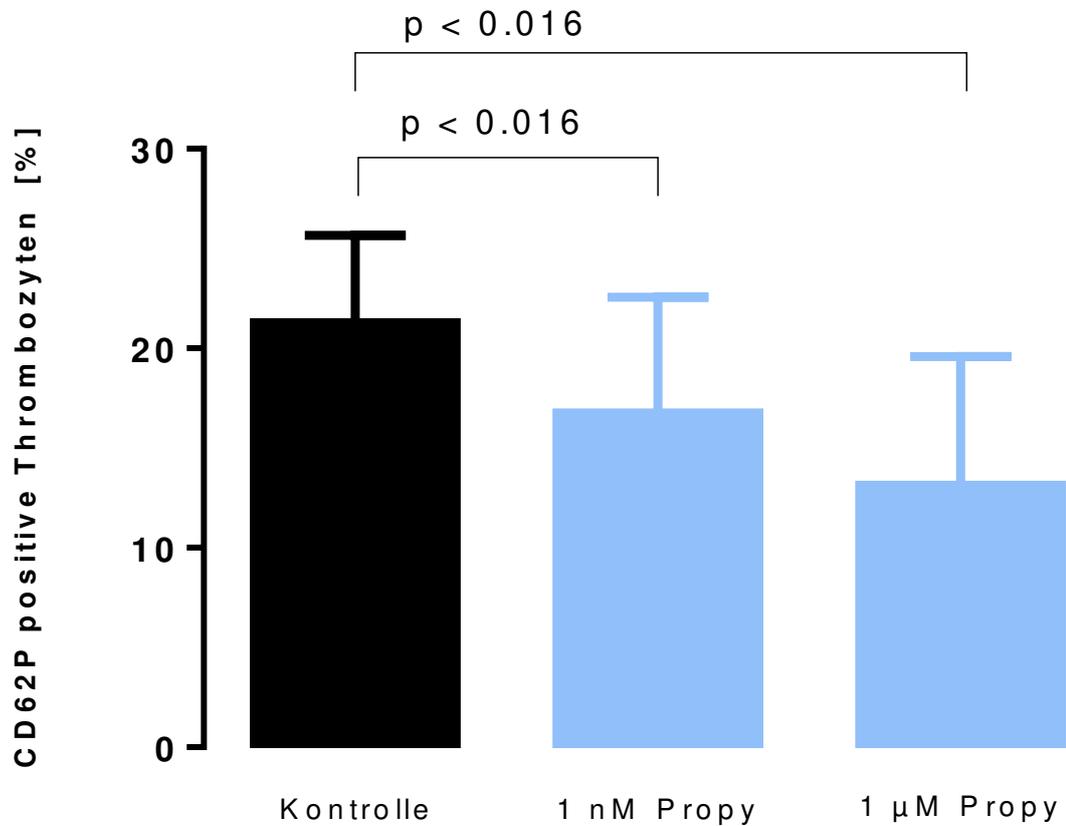


Abb. 12: „Hemmung der Aggregation durch Propyphenazon, gemessen an den CD62P positiven Thrombozyten (Stimulation mit Arachidonsäure)“ zeigt die konzentrationsabhängige p-Selektinexpression (Mittelwert  $\pm$  SEM) *in vitro* nach Stimulation mit 1 mM Arachidonsäure ( $n = 6 - 9$ ). Klammern signalisieren statistische Signifikanz.  
Links: Anteil CD62P positiver Thrombozyten in der Kontrollmessung ohne Zugabe von Pharmaka, Mitte & Rechts: Anteil CD62P positiver Thrombozyten in Gegenwart von 1 nM und 1  $\mu$ M Propyphenazon.

### 3.2.2. Stimulation mit Kollagen

**Lichttransmissionsaggregometrie:** Durch die Stimulation mit Kollagen zeigt sich eine signifikante, jedoch nicht vollständige Hemmung der Thrombozytenfunktion im Vergleich zur Kontrollmessung bei einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  und 3  $\mu\text{M}$  Propyphenazon ( $p < 0.025$ , einseitig getestet) (s. Abb. 13).

**Thrombozytäre Thromboxansynthese:** In den Thromboxanbestimmungen zeigt sich ebenfalls eine signifikante Hemmung der Thromboxan  $A_2$ -Synthese in Gegenwart von 1  $\mu\text{M}$  Propyphenazon ( $p < 0.05$ , einseitig getestet). Dies ist in Abb. 11 dargestellt.

Die **thrombozytäre p-Selektinexpression** wurde, wie in Abschnitt 2.1.5. erwähnt, aufgrund von Vorversuchen durch Stimulation mit Kollagen nicht getestet.

## Hemmung der Aggregation durch Propyphenazon, gemessen an der maximalen Steigung im Lichttransmissionsaggregometer (Stimulation mit Kollagen)

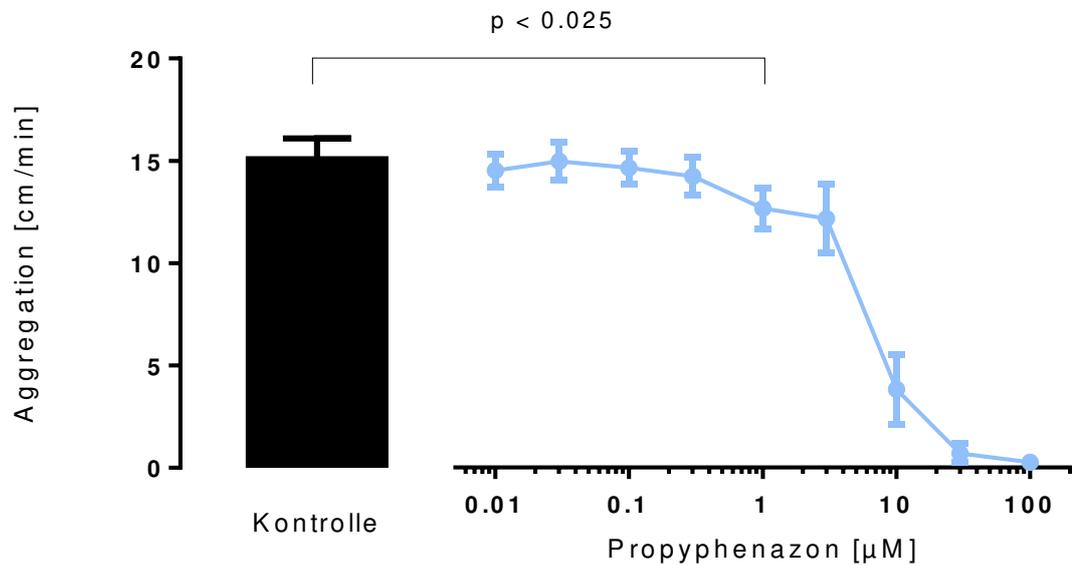


Abb. 13: „Hemmung der Aggregation durch Propyphenazon, gemessen an der maximalen Steigung im Lichttransmissionsaggregometer (Stimulation mit Kollagen)“ zeigt die konzentrationsabhängige Thrombozytenaggregation (Mittelwert  $\pm$  SEM) *in vitro* nach Stimulation mit 2 - 3,3  $\mu\text{g/ml}$  Kollagen in Gegenwart von Propyphenazon ( $n = 7$ ). Die Klammer signalisiert statistische Signifikanz.

Links: Aggregationskontrolle ohne Zugabe von Pharmaka,

Rechts: konzentrationsabhängige Hemmung der Aggregation durch 10 nM - 100  $\mu\text{M}$  Propyphenazon.

## Hemmung der Aggregation durch Propyphenazon, gemessen an den TXB<sub>2</sub>-Konzentrationen (Stimulation mit Kollagen)

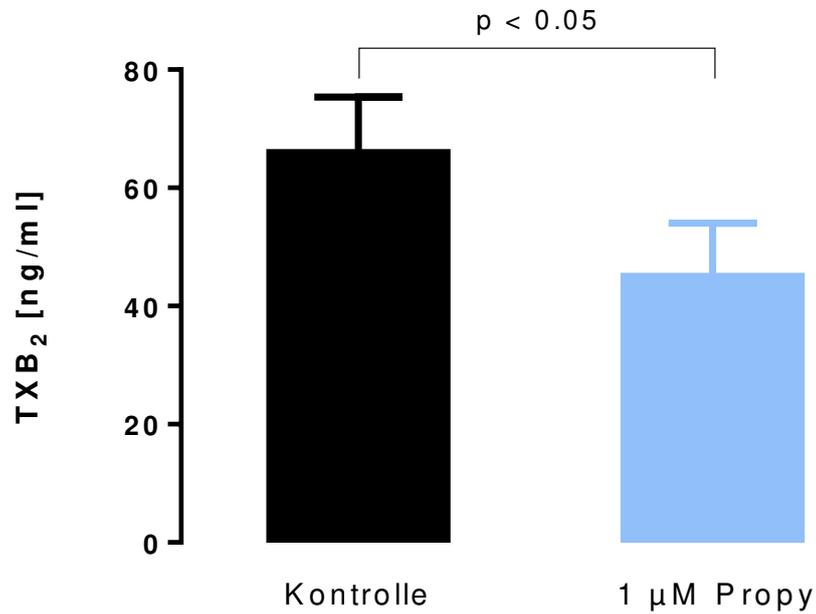


Abb. 14: „Hemmung der Aggregation durch Propyphenazon, gemessen an den TXB<sub>2</sub>-Konzentrationen (Stimulation mit Kollagen)“ zeigt die TXB<sub>2</sub>-Konzentrationen (Mittelwert ± SEM) *in vitro* nach Stimulation mit 2 - 3,3 µg/ml Kollagen (n = 6). Klammern signalisieren statistische Signifikanz.

Links: TXB<sub>2</sub>-Konzentrationen in der Aggregationskontrolle ohne Zugabe von Pharmaka, Rechts: TXB<sub>2</sub>-Konzentrationen in Gegenwart von 1 µM Propyphenazon.

### ***3.3. Vergleich der Interaktion von ASS und Propyphenazon zur Hemmung der Thrombozyten durch Propyphenazon***

Da für die Lichttransmissionsaggregometrie detaillierte Konzentrationswirkungskurven erstellt wurden, werden diese im Folgenden hinsichtlich konzentrationsabhängiger Interaktion von Propyphenazon mit ASS und der konzentrationsabhängigen Hemmung der Thrombozytenfunktion durch Propyphenazon allein miteinander verglichen.

#### **3.3.1. Stimulation mit Arachidonsäure**

In der Lichttransmissionsaggregometrie zeigt sich im Vergleich von den abhängigen Stichproben folgender Zusammenhang: Die Arachidonsäure-induzierte Aggregation in Gegenwart von 1 - 100  $\mu$ M Propyphenazon (n = 8 - 10) allein unterscheidet sich nicht wesentlich von der Aggregation in Gegenwart von Propyphenazon und ASS (n = 8 - 12). In diesem Konzentrationsbereich von Propyphenazon wird also keine Hemmung der Thrombozytenaggregation durch ASS erreicht. Eine graphische Darstellung aller Daten zu der Interaktion mit ASS bzw. Eigenhemmung von Propyphenazon ist in Abb. 15 ersichtlich.

**Vergleich der Interaktion von Propyphenazon und ASS mit der Hemmung der Aggregation durch Propyphenazon bezogen auf deren thrombozytenhemmende Wirkung, gemessen an der maximalen Steigung im Lichttransmissionsaggregometer (Stimulation mit Arachidonsäure)**

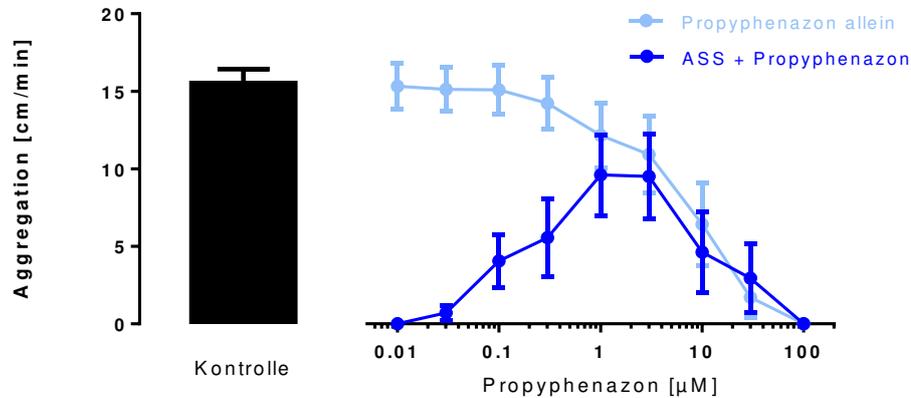


Abb. 15: „Vergleich der Interaktion von Propyphenazon und ASS mit der Hemmung der Aggregation durch Propyphenazon bezogen auf deren thrombozytenhemmende Wirkung, gemessen an der maximalen Steigung im Lichttransmissionsaggregometer (Stimulation mit Arachidonsäure)“ zeigt die konzentrationsabhängige Thrombozytenaggregation (Mittelwert  $\pm$  SEM) *in vitro* nach Stimulation mit 1 mM Arachidonsäure ( $n = 8 - 12$ ). Die Kurven aus Abb. 5 und Abb. 10 wurden übereinandergelegt, um den Zusammenhang zwischen der Hemmung der Aggregation durch Propyphenazon („Eigenhemmung“) und der Interaktion zwischen ASS und Propyphenazon zu veranschaulichen.

Links: Aggregationskontrolle ohne Zugabe von Pharmaka aus beiden Versuchsreihen (Interaktion und „Eigenhemmung“ durch Propyphenazon),

Rechts: Aggregation in Gegenwart von 30 - 70 µM ASS und 10 nM - 100 µM Propyphenazon (dunkelblau) und in Gegenwart von 10 nM - 100 µM Propyphenazon allein (hellblau).

### 3.3.2. Stimulation mit Kollagen

Bei der Stimulation mit Kollagen in der Lichttransmissionsaggregometrie zeigen sich in den Proben mit ASS und 1  $\mu\text{M}$  Propyphenazon signifikant niedrigere Werte als in den Proben mit 1  $\mu\text{M}$  Propyphenazon allein ( $p < 0.025$ , einseitig getestet,  $n = 7$ ). Eine graphische Darstellung gibt Abb. 16.

### **Vergleich der Interaktion von Propyphenazon und ASS mit der Eigenhemmung von Propyphenazon bezogen auf deren thrombozytenhemmende Wirkung, gemessen an der maximalen Steigung im Lichttransmissionsaggregometer (Stimulation mit Kollagen)**

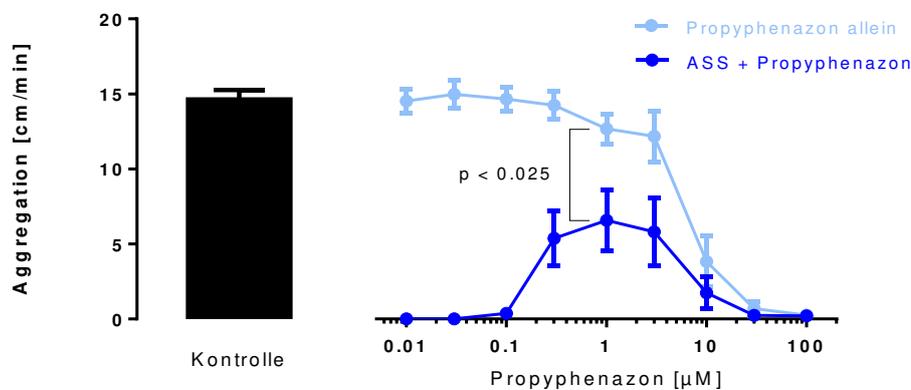


Abb. 16: „Vergleich der Interaktion von Propyphenazon und ASS mit der Eigenhemmung von Propyphenazon bezogen auf deren thrombozytenhemmende Wirkung, gemessen an der maximalen Steigung im Lichttransmissionsaggregometer (Stimulation mit Kollagen)“ zeigt die konzentrationsabhängige Thrombozytenaggregation (Mittelwert  $\pm$  SEM) *in vitro* nach Stimulation mit 2 - 3,3  $\mu\text{g/ml}$  Kollagen ( $n = 7 - 8$ ). Die Kurven aus Abb. 8 und Abb. 13 wurden übereinandergelegt, um den Zusammenhang zwischen der Hemmung der Aggregation durch Propyphenazon („Eigenhemmung“) und der Interaktion zwischen ASS und Propyphenazon zu veranschaulichen.

Links: Aggregationskontrolle ohne Zugabe von Pharmaka aus beiden Versuchsreihen (Interaktion und „Eigenhemmung“ durch Propyphenazon),

Rechts: Aggregation in Gegenwart von 30 - 60  $\mu\text{M}$  ASS und Propyphenazon (dunkelblau) und in Gegenwart von Propyphenazon allein (hellblau).

### **3.4. Untersuchung möglicher Interaktionen von Propyphenazon mit Indometazin und Ramatroban**

Die Interaktion zwischen ASS und Propyphenazon wirft die Frage auf, ob Propyphenazon eine entsprechende Interaktion auch mit anderen Inhibitoren der Cyclooxygenase oder mit pharmakodynamisch an anderer Stelle im Thromboxansystem angreifenden Thromboxanrezeptorantagonisten zeigt. Aufgrund dessen wurden weitere Experimente mit dem COX-Inhibitor Indometazin und dem selektiven Thromboxanrezeptorantagonisten Ramatroban durchgeführt.

Für Indometazin und Ramatroban wurden (wie in Kapitel 2.1.5. beschrieben) vor Beginn der Messungen bei jeder Präparation von PRP die minimalen, noch vollständig die Aggregation hemmenden Konzentrationen dieser Inhibitoren ermittelt. Bei Indometazin wurde eine vollständige Hemmung mit 300 nM (in Einzelfällen 1 µM) erreicht. Ramatroban erzielte eine vollständige Hemmung in einer Konzentration von 100 nM. Diese Konzentrationen wurden für die nachfolgenden Messungen verwendet.

Alle Proben mit Ramatroban bzw. Indometazin zeigen in Gegenwart von Propyphenazon (10 nM - 100 µM) in der Lichttransmissionsaggregometrie keine Aggregation. Somit ist weder für Indometazin noch für Ramatroban eine Interaktion mit Propyphenazon nachweisbar.

Die Thromboxanbestimmungen zeigen, dass Indometazin und Ramatroban die Thromboxansynthese vollständig hemmen und keine Interaktion mit Propyphenazon auftritt. Diese Ergebnisse sind in Abb. 17 - 20 dargestellt.

**Arzneimittelinteraktion zwischen Indometazin und Propyphenazon bezogen auf deren thrombozytenhemmende Wirkung, gemessen an der maximalen Steigung im Lichttransmissionsaggregometer (Stimulation mit Arachidonsäure)**

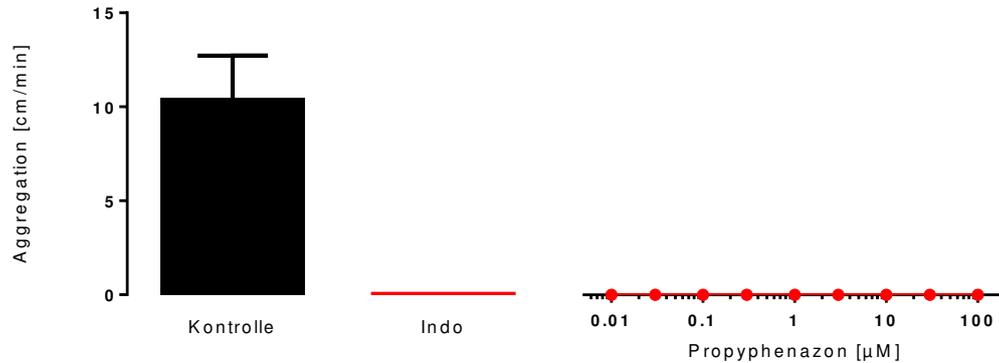


Abb. 17: „Arzneimittelinteraktion zwischen Indometazin und Propyphenazon bezogen auf deren thrombozytenhemmende Wirkung, gemessen an der maximalen Steigung im Lichttransmissionsaggregometer (Stimulation mit Arachidonsäure)“ zeigt die Thrombozytenaggregation (Mittelwert ± SEM) in vitro nach Stimulation mit 1 mM Arachidonsäure (n = 3).

Links: Aggregationskontrolle ohne Zugabe von Pharmaka und vollständige Hemmung durch 300 nM - 1 μM Indometazin (Indo),  
 Rechts: Messung der Aggregation in Gegenwart von 300 nM - 1 μM Indometazin und Propyphenazon (10 nM – 100 μM).

**Arzneimittelinteraktion zwischen Indometazin und Propyphenazon bezogen auf deren thrombozytenhemmende Wirkung, gemessen an den TXB<sub>2</sub>-Konzentrationen (Stimulation mit Arachidonsäure)**

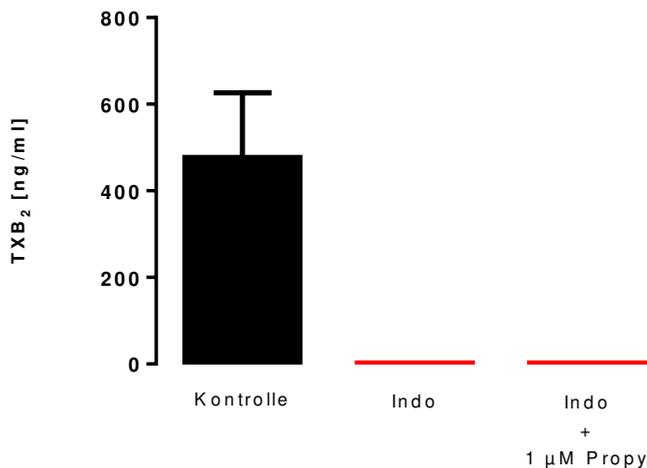


Abb. 18: „Arzneimittelinteraktion zwischen Indometazin und Propyphenazon bezogen auf deren thrombozytenhemmende Wirkung, gemessen an den TXB<sub>2</sub>-Konzentrationen (Stimulation mit Arachidonsäure)“ zeigt die TXB<sub>2</sub> Konzentrationen (Mittelwert ± SEM) in vitro nach Stimulation mit 2 - 3,3 μg/ml Kollagen (n = 3).

Links: TXB<sub>2</sub>-Konzentrationen in der Aggregationskontrolle ohne Zugabe von Pharmaka,  
 Mitte: TXB<sub>2</sub>-Konzentrationen in Gegenwart von 300 nM - 1 μM Indometazin (Indo),  
 Rechts: TXB<sub>2</sub>-Konzentrationen in Gegenwart von 300 nM - 1 μM Indometazin (Indo) und 1 μM Propyphenazon.

**Arzneimittelinteraktion zwischen Ramatroban und Propyphenazon bezogen auf deren thrombozytenhemmende Wirkung, gemessen an der maximalen Steigung im Lichttransmissionsaggregometer (Stimulation mit Arachidonsäure)**

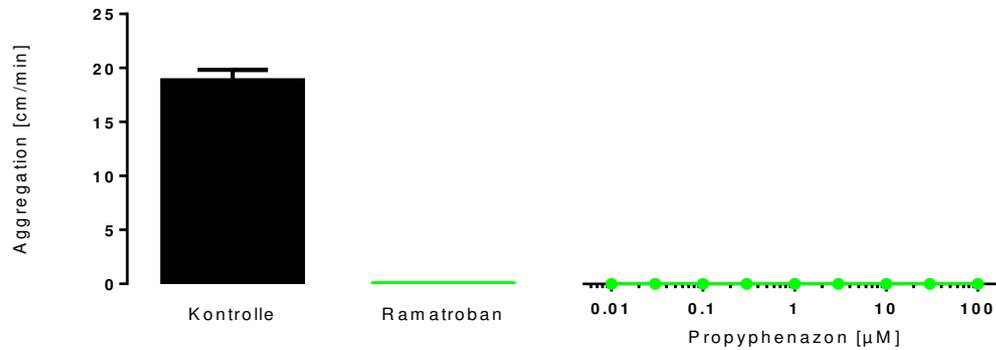


Abb. 19: „Arzneimittelinteraktion zwischen Ramatroban und Propyphenazon bezogen auf deren thrombozytenhemmende Wirkung, gemessen an der maximalen Steigung im Lichttransmissionsaggregometer (Stimulation mit Arachidonsäure)“ zeigt die Thrombozytenaggregation (Mittelwert  $\pm$  SEM) in vitro nach Stimulation mit 1 mM Arachidonsäure (n = 3):

Links: Aggregationskontrolle ohne Zugabe von Pharmaka und vollständige Hemmung durch 100 nM Ramatroban,

Rechts: Messung der Aggregation in Gegenwart von Propyphenazon (10 nM - 100 µM) und 100 nM Ramatroban.

**Arzneimittelinteraktion zwischen Ramatroban und Propyphenazon bezogen auf deren thrombozytenhemmende Wirkung, gemessen an den TXB<sub>2</sub>-Konzentrationen (Stimulation mit Arachidonsäure)**

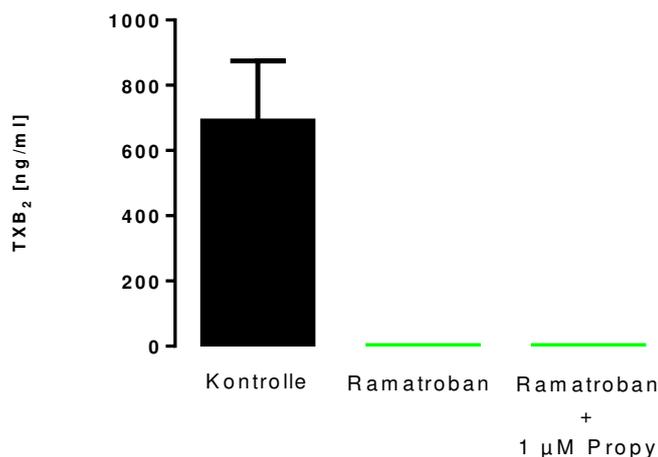


Abb. 20: „Arzneimittelinteraktion zwischen Ramatroban und Propyphenazon bezogen auf deren thrombozytenhemmende Wirkung, gemessen an den TXB<sub>2</sub>-Konzentrationen (Stimulation mit Arachidonsäure)“ zeigt die TXB<sub>2</sub>-Konzentrationen (Mittelwert  $\pm$  SEM) in vitro nach Stimulation mit 1 mM Arachidonsäure (n = 3).

Links: TXB<sub>2</sub>-Konzentrationen in der Aggregationskontrolle ohne Zugabe von Pharmaka,

Mitte: TXB<sub>2</sub>-Konzentrationen in Gegenwart von 100 nM Ramatroban,

Rechts: TXB<sub>2</sub>-Konzentrationen in Gegenwart von 1 µM Propyphenazon und 100 nM Ramatroban.

## 4. Diskussion

### 4.1. Interaktion zwischen ASS und Propyphenazon

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass Propyphenazon die Hemmung der Thrombozytenfunktion durch ASS im Sinne einer pharmakologischen Interaktion ganz oder teilweise aufheben kann. Diese Interaktion ist sowohl in der Lichttransmissionsaggregometrie als auch in der Thromboxansynthese mit Stimulation durch Arachidonsäure und Kollagen sichtbar. In der Durchflusszytometrie hingegen zeigt Propyphenazon bereits in geringen Konzentrationen eine Hemmung der p-Selektinexpression; Eine Interaktion ist hier jedoch nicht ersichtlich.

Wie eingangs erwähnt, konnten zahlreiche Studien eine Interaktion zwischen bestimmten NSAR-Analgetika und ASS (4–10) nachweisen. Kurth und Glynn et al. zeigten, dass bei einer Einnahme von NSAR über 60 Tage und länger in Kombination mit ASS ein fast 3-fach erhöhtes Risiko für Myokardinfarkte im Vergleich zu ASS ohne NSAR vorliegt (69). Darüber hinaus konnten zahlreiche Arbeiten Interaktionen mit ASS *in vitro* oder *in vivo* nachweisen. Diese betrafen beispielsweise Ibuprofen (10), Naproxen (70, 71) und Piroxicam (17). Von einem „Klasseneffekt“ der NSARs kann jedoch nicht ausgegangen werden, da anscheinend nicht alle NSARs eine solche Interaktion zeigen (4, 7, 70). Diclofenac, Indometazin, Flurbiprofen, Rofecoxib und einige weitere NSARs schwächen die thrombozytenhemmende Wirkung von ASS nach aktuellem Kenntnissstand nicht ab (7, 70, 72).

Für den aktiven Metabolit von Metamizol (4-Methylaminoantipyrin (MAA)), einem Pyrazolonderivat, konnte in mehreren Untersuchungen eine erhebliche pharmakologische Interaktion *in vitro* mit ASS nachgewiesen werden (5, 6, 17, 56, 57). MAA schwächt die plättchenhemmende Wirkung von ASS bei der Arachidonsäure-induzierten Aggregation, der Thromboxansynthese und der p-Selektinexpression ab oder verhindert diese vollständig (5). Auch ein sekundärer Metabolit von Metamizol (4-Acetyl-Aminoantipyrin) interagiert mit ASS (5). Jedoch sind 10-fach höhere Konzentrationen dieses Metaboliten hierfür nötig (5). Vorarbeiten des eigenen Labors deuteten bereits eine mögliche Interaktion zwischen ASS und Propyphenazon an (7), die in dieser Arbeit im

Detail untersucht wurden. Da auch Interaktionen mit den Pyrazolonen 4-Methylphenazon und 4-Bromophenazon beobachtet werden konnten, kann eventuell von einem Klasseneffekt der Pyrazolone ausgegangen werden (5).

Als Ursache der Arzneimittelinteraktion zwischen einem NSAR und ASS werden unterschiedliche pharmakologische Mechanismen diskutiert:

- Konkurrenz mit dem Angriff von ASS am aktiven Zentrum der COX-1
- „Cross-Talk“ zwischen den Untereinheiten der COX-1 und dadurch Einfluss auf die Aktivität der COX-1
- Verhinderung des Transports von ASS entlang der Plasmamembran zur intrazellulären COX-1

Verschiedene Autoren vermuteten die Arzneimittelinteraktion zwischen NSARs und ASS in der Konkurrenz am aktiven Zentrum der COX-1 (4, 6, 7, 17, 73). Bei Metamizol wurde die Interaktion aufgrund der reversiblen Bindung dieser Substanz an die COX-1 in enger Nachbarschaft zum Ort der Acetylierung der COX-1 durch ASS vermutet (6). Eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen Metamizol (oder anderen Analgetika) und der COX-1 könnte den Zugang von ASS zum aktiven Zentrum verhindern (6). Dadurch kann die Acetylierung von Serin 530 durch ASS nicht stattfinden (6). Folglich wird die COX-1 nur reversibel (durch Metamizol) gehemmt und die irreversible Wirkung von ASS verhindert (6). Eine 'in silico' Modellierung der Interaktion von Metamizol und COX-1 ergab Anhaltspunkte für die Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Metamizol und der COX-1, was zur Arzneimittelinteraktion mit ASS führen könnte (7). Saxena und Mitarbeiter beschrieben, wie eingangs erwähnt, auch eine Ausbildung von Wasserstoffbrücken zwischen Propyphenazon und der COX-1 mit Serin 530 und Tyrosin 385 (7). Somit könnte auch durch diese Substanz das pharmakologische Ziel der ASS blockiert werden (7).

ASS besitzt eine sehr viel kürzere Halbwertszeit als viele NSARs (17). Die Halbwertszeit von Propyphenazon beträgt ca. ein bis zwei Stunden (39), während die Halbwertszeit der Deacetylierung von Acetylsalicylsäure zu Salicylat ca. 15-25 Minuten beträgt (17). Salicylat kann die COX-1 in klinisch zu erwartender Konzentration nahezu nicht inhibieren (17, 45). Somit kann Propyphenazon selbst die COX-1 zwar vorübergehend reversibel hemmen,

infolge der verhältnismäßig kurzen Halbwertszeit von Propyphenazon würde sich die Aktivität des Enzyms und damit die Thrombozytenfunktion schnell wieder erholen. Andererseits wird durch Propyphenazon die Acetylierung der thrombozytären COX-1 durch ASS potentiell verhindert, mit dem Ergebnis einer unzureichenden irreversiblen Plättchenhemmung durch ASS.

Zusammengefasst ist damit zu erwarten, dass bei gleichzeitiger Gabe von ASS und Propyphenazon die irreversible (zirkadiane) Hemmung der Thrombozytenfunktion durch ASS verhindert wird. Die vorübergehende COX-Hemmung durch Propyphenazon dürfte sich in wenigen Stunden zurückbilden, so dass sich die Thrombozytenfunktion im Dosierungsintervall erholt und keine durchgehende Thrombozytenhemmung mehr besteht.

Weiteren Einfluss auf die Interaktion könnte die Selektivität gegenüber COX-Isoformen haben (73). So sollen NSARs mit einer hohen Affinität zur COX-2 und einer geringen Affinität zur COX-1 eine geringe Auswirkung auf die antithrombozytäre Wirkung von ASS haben (73). Auch Meek et al. unterstützen diese These (70). Diese Autoren untersuchten Ibuprofen und Naproxen als nichtselektive NSARs, sowie Etoricoxib und Meloxicam als NSARs mit einer niedrigen COX-1 Affinität (70). Die erste Gruppe von Substanzen beeinflusste die Aggregation und Adhäsion der Thrombozyten unter ASS Therapie, während die zweite Gruppe keine relevante Hemmung der ASS Wirkung zeigte (70). Im Gegensatz dazu konnte in einer Dissertation von Bagheri gezeigt werden, dass schwach affine COX-1 Hemmer (z.B. Celecoxib) stärker mit ASS interagieren als hoch affine COX-1 Hemmer (wie SC-560), die keine Interaktion mit ASS zeigen (4). Insofern scheint die Affinität zwischen NSAR oder Pyrazolon zum COX-Enzym nicht (allein) entscheidend für die Interaktion mit ASS zu sein.

Die Mechanismen der Interaktion könnten sogar noch deutlich komplexer sein. Eine mögliche Ursache könnte nämlich auch ein „Cross-Talk“ zwischen den beiden COX-Untereinheiten darstellen (4, 17). Es wurde postuliert, dass eine der Untereinheiten dieses dimeren Enzyms eine regulatorische Funktion besitzt, die andere Untereinheit eine katalytische Funktion (74). Sidhu und Mitarbeiter beschrieben darüber hinaus, dass einige NSARs nur an eine Untereinheit binden und dadurch die COX hemmen (75). Die gebundene Untereinheit könnte eine

allosterische und die andere eine katalytische Funktion ausüben (75). Je nachdem welcher Ligand an der allosterischen Untereinheit gebunden ist, kann dies dazu führen, dass die Aktivität der katalytischen Untereinheit erhöht, erniedrigt oder gar nicht beeinflusst wird (75). Ob Propyphenazon an nur eine COX-Untereinheit bindet und dadurch die Aktivität der COX-1 beeinflusst, ist nicht bekannt. Die Interaktion zwischen Propyphenazon und ASS allein ließe sich mit einer solchen Hypothese ebenfalls erklären, jedoch bedürfte es molekularer Untersuchungen, die weit über den Rahmen dieser Dissertation hinausgehen würden. Die in der vorliegenden Dissertation erhobenen Ergebnisse zur Eigenhemmung von Propyphenazon sprechen jedoch nicht dafür, dass Propyphenazon eine eigene aktivierende Wirkung auf die COX-1 ausübt. In dieser Arbeit konnte nur eine Thrombozytenhemmung durch Propyphenazon nachgewiesen werden (s. Abb. 10-14).

Im Zusammenhang der Interaktion des Metamizolmetaboliten MAA mit ASS wurde vermutet, dass der Transport von ASS zur intrazellulären COX-1 durch MAA verhindert werden könnte (5). Diese Vermutung wurde mit einem zellfreien Lumineszenz-basierten COX-Aktivitätsassay untersucht. Bei dieser Methodik zeigte sich trotz zellfreiem System eine signifikante Interaktion von MAA und ASS, sodass eine Interaktion auf Ebene des Zellmembrantransportes nicht bestätigt werden konnte (5). Für Propyphenazon liegen keine entsprechenden Untersuchungen im zellfreien System vor.

Im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen wurden nicht unerhebliche interindividuelle Unterschiede in der Interaktion von Propyphenazon und ASS beobachtet, auch wenn die Interaktion sowohl für die Aktivierung der Thrombozyten mit Arachidonsäure als auch mit Kollagen statistisch signifikant war. Bei einzelnen Probanden ergab sich allerdings keine Abschwächung der Wirkung von ASS durch Propyphenazon, bei anderen Probanden fanden sich stark ausgeprägte Interaktionen. Zusätzlich deuten die Ergebnisse an, dass diejenigen Probanden, die in der Lichttransmissionsaggregometrie keine Interaktion von ASS und Propyphenazon aufwiesen, auch in der TXB<sub>2</sub> Bestimmung keine Abschwächung der Wirkung von ASS zeigten. Diese interindividuellen Unterschiede könnten auf eine verschiedene Sensitivität der

Plättchen auf Arachidonsäure oder auf genetische Unterschiede des COX-1 Enzyms hinweisen (7).

Auf der Ebene der p-Selektinexpression konnte – im Unterschied zur Aggregation und Thromboxansynthese – keine Interaktion von ASS mit Propyphenazon beobachtet werden. Eine mögliche Erklärung könnte darin bestehen, dass Propyphenazon Thromboxan-unabhängig eine Hemmung der p-Selektinexpression bewirken könnte, die eine Interaktion „überdeckt“. Untersuchungen hierzu sind im Rahmen zukünftiger Forschung geplant.

#### ***4.2. Hemmung der Thrombozyten durch Propyphenazon und Vergleich zur Interaktion von ASS und Propyphenazon***

Propyphenazon allein hemmt die Aktivität der Blutplättchen nachweisbar in der Lichttransmissionsaggregometrie und der Thromboxanbestimmung bei Konzentrationen von mehr als 1  $\mu\text{M}$ . Dies gilt sowohl für die Stimulation der Aggregation mit Arachidonsäure als auch für die Stimulation mit Kollagen. In der p-Selektinexpression scheint Propyphenazon auch schon bei sehr geringen Konzentrationen (1 nM) einen hemmenden Einfluss zu haben.

Die vorliegenden Ergebnisse lassen sich mit der oben beschriebenen Hypothese einer Konkurrenz zwischen Propyphenazon und ASS am aktiven Zentrum der COX-1 vereinbaren. Zu berücksichtigen ist jedoch, dass Nicht-ASS-NSARs, also auch Propyphenazon, nicht als Ersatz für ASS als Thrombozytenhemmer eingesetzt werden können (17). Die Dauer der Wirkung wird hier durch die Plasmahalbwertszeit bestimmt, da sie im Gegensatz zu ASS die COX-1 reversibel hemmen (17). Dadurch wird die Thrombozytenaggregation durch die meisten NSARs nicht kontinuierlich gehemmt, wie dies bei ASS infolge des irreversiblen Mechanismus der Enzymhemmung der Fall ist (70).

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation fiel auf, dass die Konzentrations-Wirkungskurven zur Interaktion von Propyphenazon und ASS „glockenförmig“ verliefen (Abb. 5 und 8). Der aufsteigende Abschnitt kann durch die zuvor diskutierte Interaktion am COX-Enzym erklärt werden. Der absteigende Teil dieser Kurven erscheint zunächst überraschend. Eine Erklärung hierfür dürfte in der „Eigenhemmung“ von Propyphenazon liegen, die ab einer Konzentration von

ca. 1  $\mu\text{M}$  Propyphenazon beobachtet wurde. Dafür spricht ein Vergleich der Interaktion zwischen Propyphenazon und ASS mit der Hemmung durch Propyphenazon allein (s. Abb. 15). Der absteigende Teil der glockenförmigen Kurve der Interaktion umfasst denselben Konzentrationsbereich wie die Hemmung der Thrombozytenfunktion durch Propyphenazon allein (1-100  $\mu\text{M}$ ). Bei der Stimulation der Thrombozyten mit Arachidonsäure überlagern sich die entsprechenden Abschnitte der Interaktions- und Hemmkurve relativ genau.

Bei der Stimulation der Aggregation mit Kollagen sind die Differenzen in den Kurven größer, betreffen aber ebenfalls denselben Konzentrationsbereich (1-100  $\mu\text{M}$ , s. Abb. 16). Der Verlauf der Interaktionskurve „unterhalb“ der Kurve der Hemmung liegt hier vermutlich daran, dass die Hemmung der Aggregation durch Propyphenazon bei Stimulation durch Kollagen bereits unter geringeren Konzentrationen einsetzt. Kollagen stimulierte in den vorliegenden Untersuchungen die Thrombozyten deutlich weniger stark, was im Vergleich zu Arachidonsäure an einer wesentlich geringeren Aktivierung der Thromboxansynthese erkennbar ist (s. Abb. 3).

### ***4.3. Ramatroban und Indometazin***

Sowohl Ramatroban als auch Indometazin zeigen in der Lichttransmissionsaggregometrie sowie in den Thromboxanbestimmungen mit Propyphenazon keine Interaktion.

Ramatroban wirkt, wie eingangs erwähnt, als Thromboxanrezeptorantagonist und hemmt die thromboxanabhängige Aktivierung von Thrombozyten COX-1 unabhängig (76). Die vollständige Hemmung der Thromboxansynthese (s. Abb. 20) kann dadurch erklärt werden, dass die Hemmung der Feedbackaktivierung durch Thromboxan ihrerseits die thrombozytäre Thromboxansynthese hemmt (weniger Mobilisierung von Arachidonsäure aus endogenen Phospholipiden). Ramatroban ist kein Inhibitor der COX und auch kein Inhibitor der Thromboxansynthase. Ramatroban ist ebenfalls ein Antagonist an dem Prostaglandin D<sub>2</sub> Rezeptor, ein Rezeptor-homologes Molekül, das auf Th2-Zellen (CRTh2) exprimiert wird (77, 78). Dies scheint nach eingehender Recherche und aktueller Kenntnis jedoch im Kontext der Aktivierung von Thrombozyten keine Rolle zu spielen. Geht man davon aus, dass die Interaktion

auf Ebene der COX-1 stattfindet, so ist das oben genannte Ergebnis zu erwarten, denn ASS und Ramatroban hemmen die thromboxanabhängige Thrombozytenaktivierung an unterschiedlichen Zielstrukturen (COX-1 bzw. Thromboxanrezeptor). Dies ist vereinbar mit Vorbefunden zur Interaktion des Pyrazol-Analgetikums Metamizol (in Form des aktiven Metaboliten MAA). Auch für Metamizol wurde eine Interaktion mit der Antiplättchenwirkung von ASS gezeigt, jedoch nicht mit der Thrombozytenhemmung durch Terbogrel, einen kombinierten Antagonisten am Thromboxanrezeptor und Inhibitor der Thromboxansynthase (79).

Im Gegensatz zu vielen NSAR-Analgetika und Metamizol (5) wird die plättchenhemmende Wirkung von Indometazin durch Propyphenazon nicht beeinflusst. Im Rahmen dieser Dissertation war Indometazin interessant, weil diese Substanz einen von ASS und den meisten anderen NSARs unterschiedlichen Typ der Hemmung der COX-1 besitzt. Frühere Untersuchungen der Arbeitsgruppe konnten zeigen, dass Indometazin nicht mit der Thrombozytenhemmung durch ASS interferiert (7). Indometazin weist insofern einen ungewöhnlichen Typ der Hemmung an der COX-1 auf, als die Hemmung deutlich zunimmt, wenn das Enzym über eine längere Zeitdauer mit diesem Inhibitor vorinkubiert wurde („zeitabhängiger“ Hemmtyp) (80). Zugrunde liegt eine feste, jedoch nicht kovalente Bindung zwischen Inhibitor und Enzym (48). Die fehlende Interaktion von Propyphenazon mit der Thrombozytenhemmung durch Indometazin deutet darauf hin, dass Propyphenazon mit der kovalenten Acetylierung des Enzyms durch ASS auf der einen Seite und der nicht-kovalenten, aber ebenfalls zeitabhängigen Hemmung des Enzyms durch Indometazin auf der anderen Seite offenbar in unterschiedlicher Weise interagiert. Der molekulare Mechanismus der Bindung von NSAR-Substanzen ist bis heute nicht im Detail bekannt, so dass eine molekulare Erklärung für die fehlende Wechselwirkung von Propyphenazon und Indometazin aussteht. Möglicherweise überlappen sich die Bindungsdomänen von Propyphenazon und Indometazin nicht hinreichend oder die Substanzen interagieren mit dem Enzym über voneinander unterschiedliche, komplexe Mechanismen („Cross-talk“, s. oben).

## **4.4. Bedeutung der untersuchten Parameter der Thrombozytenaktivierung**

### **4.4.1. Lichttransmissionsaggregometrie**

Die Lichttransmissionsaggregometrie wird seit vielen Jahren als „Goldstandard“ betrachtet, um die Plättchenhemmung von ASS zu beurteilen (81). Die Methode ist gut charakterisiert und standardisiert, obwohl sie auf konkrete Fragestellungen hin jeweils angepasst werden muss. Nachteile sind die Notwendigkeit eines entsprechend ausgestatteten Labors, der Zeitaufwand und das benötigte Know-How (81). Breddin bezeichnete dieses Verfahren „bei richtiger Anwendung“ als eine einfache und verlässliche Methode, um die Funktion von Plättchen zu untersuchen (82). Entscheidend ist dabei unter anderem der verwendete Agonist (82).

In der vorliegenden Arbeit fiel auf, dass bei Verwendung von Kollagen als Stimulus der Thrombozytenaggregation sehr häufig keine vollständige Hemmung durch ASS – selbst in hohen Konzentrationen – erreicht werden konnte. Andererseits ist gut dokumentiert, dass die Arachidonsäure-induzierte Aggregation von Thrombozyten in besonderer Weise gegenüber der Hemmung durch ASS sensitiv ist und sich damit besonders eignet, um die Interaktion zwischen ASS und Propyphenazon zu untersuchen (17).

Kollagen stimuliert die Aggregation über verschiedene Signalproteine, wie Integrin  $\alpha 2\beta 1$ , GPIIb-V-IX und GPVI (83). Verschiedene intrazelluläre Signalwege werden hierdurch aktiviert, darunter auch Thromboxan-unabhängige Wege (17). Dies bedeutet, dass die Kollagen-induzierte Thrombozytenaktivierung nur teilweise durch ASS gehemmt werden kann und bei höheren Konzentrationen von Kollagen (10  $\mu\text{g/ml}$  und darüber) nur noch wenig oder gar nicht durch ASS gehemmt werden kann (durch Vorversuche verifiziert). In der vorliegenden Arbeit wurde dem dadurch Rechnung getragen, dass für die Stimulation der Thrombozyten eine niedrige Kollagenkonzentration (ca. 2  $\mu\text{g/ml}$ ) gewählt wurde. Da diese bei einigen Spendern jedoch noch nicht zur Thrombozytenaktivierung führte, wurde hier die verwendete Kollagenkonzentration in kleinen Schritten so weit erhöht, bis eine sichere Aggregationsreaktion nachweisbar war.

Unter diesen experimentellen Bedingungen konnte auch unter Stimulation der Thrombozyten durch Kollagen eine Interaktion zwischen ASS und Propyphenazon nachgewiesen werden (s. Abb. 8). Dieses Ergebnis ist insofern aber wichtig, als es zeigt, dass die beobachtete Interaktion auch bei Plättchenaktivierung über Thromboxan aus *endogener* Quelle – d.h. nicht nur durch *exogen* zugesetzte Arachidonsäure – nachweisbar ist. Da Kollagen (im Unterschied zu *exogener* Arachidonsäure) ein biologisch relevanter Thrombozytenagonist ist (83), unterstützt dies die klinische Bedeutung der beobachteten pharmakologischen Interaktion.

#### 4.4.2. Thromboxanbestimmung

Die TXB<sub>2</sub> Bestimmung ist ein spezifischer Test um die Aktivierung von Thrombozyten und deren Hemmung durch ASS zu analysieren (81, 84). TXB<sub>2</sub> ist der stabile Metabolit von TXA<sub>2</sub> (60). Dieses spielt eine wichtige Rolle in der Aktivierung von Thrombozyten und Vermittlung der Aggregation (49, 85), auch wenn viele weitere Agonisten, wie Kollagen, ADP, Thrombin und Serotonin ebenfalls bedeutsame (patho-) physiologische Aktivatoren der Thrombozytenfunktion sind (86).

ASS ist ein klinisch weithin etablierter Plättchenhemmer, der direkt die Thromboxansynthese hemmt (84). Insofern ist die Bestimmung von TXB<sub>2</sub> besonders gut als Biomarker für die Plättchenhemmung durch ASS geeignet (84). Man kann davon ausgehen, dass, wenn ASS die thrombozytäre Thromboxansynthese nicht weitgehend hemmt, auch kein Nutzen von ASS hinsichtlich der Verhinderung kardiovaskulärer Ereignisse zu erwarten ist (84).

Bisher wurden jedoch keine „Normalwerte“ für die Hemmung der thrombozytären Thromboxansynthese durch ASS definiert, da die thrombozytäre Thromboxansynthese stark von der verwendeten Methodik abhängt (84). Es besteht auch keine lineare Beziehung zwischen der Thromboxansynthese und der Hemmung der Thrombozytenaggregation (84). In der vorliegenden Arbeit wurden die Thrombozyten, um gut reproduzierbare Bedingungen der Bestimmung der Thromboxansynthese zu erreichen, mittels *exogen* zugesetzter Arachidonsäure oder *exogen* zugesetztem Kollagen aktiviert.

Dass die Thromboxansynthese ein gut geeigneter Marker für die Thrombozytenhemmung durch ASS ist, wird auch dadurch bestätigt, dass kürzlich eine große zulassungsrelevante Phase III-Studie für eine neu entwickelte, parenterale Zubereitung des Lysin-salzes von ASS als primären Studienendpunkt zur Beurteilung der antithrombotischen Wirksamkeit die Hemmung der Arachidonsäure-induzierten thrombozytären Thromboxansynthese verwendete (87).

TXA<sub>2</sub> aktiviert nicht nur Blutplättchen sondern führt auch zu einer Vasokonstriktion (16) und zeigt darüber hinaus wahrscheinlich zahlreiche direkte oder indirekte pro-inflammatorische Wirkungen am gesunden und atherosklerotisch veränderten Gefäßsystem (56).

Neben ASS wurden auch andere Wirkstoffe entwickelt, die die Bildung oder Wirkung von Thromboxan an Thrombozyten hemmen. So wurden TXA<sub>2</sub>-Synthase-Inhibitoren (z.B. Ozagrel, Furegrelat) und Antagonisten am Thromboxanrezeptor (z.B. Ramatroban, Sulotroban) entwickelt und klinisch bei der Behandlung von zerebrovaskulären Erkrankungen eingesetzt (77). Gegenüber bereits verfügbaren Therapiekonzepten wie ASS zeigten diese Substanzen keine eindeutigen Vorteile, sodass ASS noch immer als „Goldstandard“ gilt (11, 45).

#### 4.4.3. p-Selektinexpression

P-Selektin wird bei der Aktivierung von Thrombozyten an die Oberfläche transloziert und spielt bei der Aggregation der Plättchen eine wichtige Rolle (15). Zum einen ist es an der Thrombozyten-Thrombozyten-Interaktion beteiligt und zum anderen begünstigt es die Leukozytenrekrutierung, was wiederum zur Thrombogenese beiträgt und Thromben stabilisiert (15).

In der vorliegenden Arbeit führt Arachidonsäure zu einer erhöhten und ASS zu einer geringeren p-Selektinexpression. Diese Beobachtung wurde bereits in vorausgehenden Untersuchungen dokumentiert (5, 88, 89).

## **4.5. Ausblick: Möglichkeiten zur Vermeidung der Interaktion zwischen Propyphenazon und ASS**

### 4.5.1. Dosisänderung

Eine mögliche Vermeidung der in dieser Untersuchung beobachteten Interaktion mit ASS könnte entweder in der Erhöhung der ASS Konzentration oder in der Verringerung der Konzentration des konkurrierenden Propyphenazon liegen (17). In vorausgehenden Untersuchungen mit Metamizol konnte durch eine Steigerung der ASS Konzentration die Interaktion verhindert werden (5). Weitere Untersuchungen mit anderen Nichtopioidanalgetika zeigten ähnliche Ergebnisse (4, 90). Bei einer Dosissteigerung von ASS wäre, wie eingangs erwähnt, mit vermehrten Nebenwirkungen, wie z.B. gastrointestinalen Ulcera, zu rechnen (18) (Vgl. 1.4.2. Dosierung und Nebenwirkung).

Wird die Dosierung von Propyphenazon mit dem Ziel verringert, eine Interaktion mit ASS zu vermeiden, müsste darauf geachtet werden, dass dies nicht zu Lasten der analgetischen Wirkung geht. In der vorliegenden Untersuchung wurde eine Interaktion mit ASS bei Konzentrationen von Propyphenazon um etwa 1 µmol/l beobachtet (s. Abb. 5,6,8 und 9). Diese liegt etwa um das dreißigfache unterhalb der Konzentration ( $c_{\max}$ ) im Plasma nach einmaliger Propyphenazon-Dosis von 440 mg (vgl. Abschnitt 1.3.4). Insofern wäre zu befürchten, dass eine Dosisreduktion, die die Interaktion mit ASS vermeidet, auch zum Verlust der analgetischen Wirksamkeit von Propyphenazon führen würde.

Eine weitere, allerdings nur theoretische Möglichkeit wäre die Steigerung der Propyphenazon -Dosierung, um hierbei eine direkte Hemmung der thrombozytären COX-1 auszunutzen. Dies erscheint jedoch ebenfalls nicht als sinnvoll, wenn man davon ausgeht, dass Propyphenazon, wie andere NSARs (70), die COX-1 nur reversibel hemmt und eine vergleichsweise kurze Plasmahalbwertszeit aufweist (39), so dass im Dosierungsintervall eine teilweise oder vollständige Normalisierung der Thrombozytenaktivität mit entsprechendem Risiko für arterielle Thrombosen zu erwarten wäre.

#### 4.5.2. Verwendung eines anderen Analgetikums anstelle von Propyphenazon

Alternativ zu Propyphenazon könnte man selektive COX-2 Hemmer zur Schmerzlinderung in Kombination mit low-dose ASS verwenden. Jedoch wurden auch für manche selektive COX-2 Hemmer, wie DuP-697 und NS-398, eine Interaktion mit ASS beschrieben (91). Diese Substanzen hemmen die COX-2 irreversibel und die COX-1 nur moderat und reversibel (91) und schwächten in Kombination mit ASS dessen Wirkung ebenfalls ab. Ursache könnte auch hier eine Wechselwirkung an Bindungsstellen der COX-1 sein (91). Jedoch sind die Daten widersprüchlich. Gladding et al. beschrieben keine Interaktion von Celecoxib mit ASS (92). Rimon et al. hingegen berichten von einer Interaktion zwischen Celecoxib und ASS *in vitro*, indem das Coxib leicht an ein Monomer der COX-1 bindet (93). Auch andere selektive COX-2 Hemmer könnten im Rahmen einer Schmerztherapie eingesetzt werden (94), doch sind verfügbare Informationen über die Interaktion von Coxiben mit ASS nur spärlich.

Wie bereits erwähnt, wurden auch NSARs identifiziert, die keine Interaktion mit ASS zeigen. Zu nennen sind Diclofenac (94), SC-560 (nur experimentell zur Verfügung) (4), Paracetamol (56), Indometazin, Flurbiprofen, Ketoprofen und Ketorolac (7). Die Ursachen für das Fehlen der Interaktion sind bisher nicht abschließend geklärt. Für eine konkrete Empfehlung einer Alternative zu Propyphenazon wären auch klinische Studien notwendig.

#### 4.5.3. Verwendung eines anderen Thrombozytenfunktionshemmers anstelle von ASS

Die vorliegenden Ergebnisse mit Ramatroban (s. Abb. 19 und 20) legen nahe, dass eine Blutplättchenhemmung auf anderer Ebene (d.h. COX-unabhängig) die Interaktion vermeiden kann. Ramatroban ist jedoch in Deutschland nicht zugelassen. Clopidogrel und andere Antagonisten des thrombozytären P2Y<sub>12</sub>-Rezeptors) könnten in der Hemmung der Thrombozytenfunktion eine Alternative zu ASS darstellen (11). Studien, die eine Interaktion zwischen P2Y<sub>12</sub>-Inhibitoren (wie z.B. Clopidogrel) und Propyphenazon untersuchen, fehlen allerdings derzeit. Infolge des unterschiedlichen pharmakologischen Wirkmechanismus (95) ist eine Interaktion jedoch nicht zu erwarten.

#### 4.5.4. Zeitlich versetzte Einnahme der Arzneimittel

Liegt die Konkurrenz am aktiven Zentrum der COX-1, so besteht eine naheliegende Möglichkeit einer Vermeidung der Interaktion durch eine zeitlich versetzte Einnahme von ASS und Propyphenazon. In diesem Fall dürfte eine Interaktion vermeidbar sein, wenn ASS die COX-1 zu einem Zeitpunkt im Dosierungsintervall irreversibel acetyliert, in welchem die Plasmakonzentration von Propyphenazon deutlich unter 1 µmol/l beträgt. Dies kann am Ende eines entsprechend langen Dosierungsintervalls der Fall sein. Allerdings müsste eine entsprechende Einnahmepause von Propyphenazon vor der Verabreichung von ASS eingehalten werden. Ausgehend von einer maximalen Propyphenazon-Plasmakonzentration von 10 µmol/l nach einer Dosis von 220 mg (vgl. Abschnitt 1.3.4) ist mit einer Latenz von ca. 4 Halbwertszeiten (6 - 8 h) zu rechnen, bis die Plasmakonzentration unter 1 µmol/l gefallen und keine Interaktion mit ASS mehr zu erwarten ist.

Ob die Interaktion auf diese Weise tatsächlich umgangen werden kann, müsste durch klinische Untersuchungen geprüft werden. Immerhin liegt für das NSAID-Analgetikum Naproxen eine klinische Studie vor, die zeigt, dass dessen Interaktion mit ASS geringer ist, wenn ASS zwei Stunden vor diesem NSAR - also gegen Ende des Dosierungsintervalls - eingenommen wird (71).

Die in dieser Arbeit gezeigte Interaktion von ASS mit Propyphenazon wird voraussichtlich vor allem solche Patienten betreffen, die Propyphenazon über einen längeren Zeitraum einnehmen. Einzeldosen von Propyphenazon können die Wirkung von ASS wahrscheinlich nicht wesentlich abschwächen, da der Großteil der Thrombozyten unter Dauertherapie mit ASS irreversibel und langanhaltend gehemmt ist. Erst unter kontinuierlicher Behandlung mit Propyphenazon über mehrere Tage dürfte ein größerer Anteil zirkulierender Thrombozyten der irreversiblen Hemmung durch ASS entgehen. Auch dies bedürfte allerdings der Bestätigung durch entsprechende klinische Studien.

#### **4.6. Offengebliebene Fragestellungen**

Die Frage, wie relevant die Arzneimittelinteraktion für Propyphenazon klinisch tatsächlich ist, ist derzeit nicht beantwortet. Je nach verwendeter Methodik haben vorausgehende Untersuchungen sehr unterschiedliche Ausprägungen der

Arzneimittelinteraktion bzw. „high-on aspirin platelet reactivity“ ergeben (96). Bei der vorliegenden Arbeit handelt es sich um Messungen, die zwar an humanen Thrombozyten durchgeführt wurden, jedoch erfolgte die Exposition mit den untersuchten Wirkstoffen *in vitro*. Wie zuvor (Kapitel 4.6) dargelegt, bedürfte es klinischer Studien, um die Interaktion am Menschen zu bestätigen, die den Fokus der vorliegenden Dissertation überschreiten würden. Eine prospektive klinische Prüfung der Bedeutung dieser Interaktion könnte, wenn sie an ASS-behandelten Patienten mit kardiovaskulären Erkrankungen durchgeführt würde, zudem forschungsethische Probleme aufwerfen. Auch retrospektive Analysen könnten ein Risiko bei gleichzeitiger Gabe von Propyphenazon und ASS untersuchen, doch dürfte es aufgrund des rezeptfreien Verkaufs von Propyphenazon sehr schwierig sein, die dafür benötigten Daten zu erhalten. Für das Pyrazolonderivat Metamizol gibt es jedoch eine solche Studie. Diese konnte zeigen, dass Patienten mit koronarer Herzerkrankung bei einer Metamizol-ASS Komedikation ein höheres Mortalitätsrisiko zeigen als eine Vergleichsgruppe, die nur mit ASS therapiert wurde (97).

#### **4.7. Schlussfolgerung**

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass

- die thrombozytenhemmende Wirkung von ASS an humanen Thrombozyten in Gegenwart von Propyphenazon aufgehoben bzw. vermindert werden kann und dass diese Interaktion in Konzentrationen von Propyphenazon auftritt, die unter Standarddosierung erreicht werden,
- die Thrombozytenaktivierung durch verschiedene Agonisten (Arachidonsäure bzw. Kollagen) von dieser Interaktion betroffen ist,
- eine Konzentrations-Wirkungsbeziehung zwischen Propyphenazon und der Interaktion mit ASS dargestellt werden kann, die einen „glockenförmigen“ Verlauf zeigt und
- keine Interaktion zwischen Propyphenazon und Indometazin bzw. Ramatroban vorliegt, was auf einen substanzspezifischen Mechanismus der Interaktion auf Ebene der thrombozytären COX-1 hinweist.

Übertragen auf die klinische Anwendung im Rahmen der Analgesie z.B. nach dentalmedizinischen Eingriffen könnte Propyphenazon zu einer unzureichenden und unvollständigen Plättchenhemmung durch ASS führen. Die Kombination beider Präparate sollte insofern mit Vorsicht erfolgen, insbesondere auch im Hinblick auf die in Deutschland und anderen Ländern rezeptfreie und insofern nicht gut kontrollierte Vermarktung von Propyphenazon.

## 5. Literaturverzeichnis

1. Tienken M, Twarock S, Hohlfeld T. Pharmakologische Interaktion des rezeptfreien Analgetikums Propyphenazon mit der Plättchenhemmung durch Acetylsalicylsäure. *Clinical Research in Cardiology* 2018; (Volume 107, Supplement 3: BS246).
2. BERLIN-CHEMIE AG. DEMEX Zahnschmerztabletten  
Gebrauchsinformation: Information für den Anwender 2014:1–2.
3. Hein L, Wille H. Antithrombotika und Antihämorrhagika. In: Schwabe U, Paffrath D, Ludwig W-D, Klauber J, Hrsg. *Arzneiverordnungs-Report 2017*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2017. S. 361.
4. Bagheri S. NSAIDs verhindern die Thrombozytenaggregationshemmung durch Acetylsalicylsäure: Entwicklung eines enzymkinetischen Modells, experimentelle Überprüfung und mögliche Konsequenzen für die klinische Anwendung [Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf] 2015:4–58.
5. Hohlfeld T, Zimmermann N, Weber A-A, Jessen G, Weber H, Schrör K et al. Pyrazolinone analgesics prevent the antiplatelet effect of aspirin and preserve human platelet thromboxane synthesis. *J Thromb Haemost* 2008; 6(1):166–73.
6. Polzin A, Zeus T, Schrör K, Kelm M, Hohlfeld T. Dipyron (metamizole) can nullify the antiplatelet effect of aspirin in patients with coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 2013; 62(18):1725–6.
7. Saxena A. Insight into interactions between aspirin and nonsteroidal anti-inflammatory drugs [Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf] 2013:7–54.
8. Catella-Lawson F, Reilly MP, Kapoor SC, Cucchiara AJ, DeMarco S, Tournier B et al. Cyclooxygenase inhibitors and the antiplatelet effects of aspirin. *N Engl J Med* 2001; 345(25):1809–17.

9. Hong Y, Gengo FM, Rainka MM, Bates VE, Mager DE. Population pharmacodynamic modelling of aspirin- and Ibuprofen-induced inhibition of platelet aggregation in healthy subjects. *Clin Pharmacokinet* 2008; 47(2):129–37.
10. MacDonald TM, Wei L. Effect of ibuprofen on cardioprotective effect of aspirin. *The Lancet* 2003; 361(9357):573–4.
11. British Medical Journal. Collaborative meta-analysis of randomised trials of antiplatelet therapy for prevention of death, myocardial infarction, and stroke in high risk patients. *BMJ* 2002; 324(7330):71–86.
12. Nieswandt B, Brakebusch C, Bergmeier W, Schulte V, Bouvard D, Mokhtari-Nejad R et al. Glycoprotein VI but not alpha2beta1 integrin is essential for platelet interaction with collagen. *EMBO J* 2001; 20(9):2120–30.
13. Kulkarni S, Dopheide SM, Yap CL, Ravanat C, Freund M, Mangin P et al. A revised model of platelet aggregation. *Journal of Clinical Investigation* 2000; 105(6):783–91.
14. Stalker TJ, Traxler EA, Wu J, Wannemacher KM, Cermignano SL, Voronov R et al. Hierarchical organization in the hemostatic response and its relationship to the platelet-signaling network. *Blood* 2013; 121(10):1875–85.
15. Andre P. P-selectin in haemostasis. *Br J Haematol* 2004; 126(3):298–306.
16. FitzGerald GA. Mechanisms of platelet activation: thromboxane A2 as an amplifying signal for other agonists. *Am J Cardiol* 1991; 68(7):11B-15B.
17. Hohlfeld T, Saxena A, Schrör K. High on treatment platelet reactivity against aspirin by non-steroidal anti-inflammatory drugs--pharmacological mechanisms and clinical relevance. *Thromb Haemost* 2013; 109(5):825–33.
18. Baigent C, Patrono C. Selective cyclooxygenase 2 inhibitors, aspirin, and cardiovascular disease: a reappraisal. *Arthritis Rheum* 2003; 48(1):12–20.
19. Chandrasekharan NV, Dai H, Roos KLT, Evanson NK, Tomsik J, Elton TS et al. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99(21):13926–31.

20. Himly M, Jahn-Schmid B, Pittertschatscher K, Bohle B, Grubmayr K, Ferreira F et al. IgE-mediated immediate-type hypersensitivity to the pyrazolone drug propyphenazone. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2003; 111(4):882–8.
21. Mutschler E, Geisslinger G, Kroemer HK, Menzel S, Ruth P. Mutschler Arzneimittelwirkungen: Lehrbuch der Pharmakologie, der klinischen Pharmakologie und Toxikologie: mit einführenden Kapiteln in die Anatomie, Physiologie und Pathophysiologie. 10., vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage. Stuttgart: WVG Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft; 2013. S. 205.
22. Volz M, Kellner HM. Kinetics and metabolism of pyrazolones (propyphenazone, aminopyrine and dipyrone). *British Journal of Clinical Pharmacology* 1980; 10(S2):299S-308S.
23. Levy M. Hypersensitivity to pyrazolones. *Thorax* 2000; 55(90002):72S-74.
24. Nassini R, Fusi C, Materazzi S, Coppi E, Tuccinardi T, Marone IM et al. The TRPA1 channel mediates the analgesic action of dipyrone and pyrazolone derivatives. *Br J Pharmacol* 2015; 172(13):3397–411.
25. Kroeger-Koepke MB, Koepke SR, McClusky GA, Magee PN, Michejda CJ. alpha-Hydroxylation pathway in the in vitro metabolism of carcinogenic nitrosamines: N-nitrosodimethylamine and N-nitroso-N-methylaniline. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1981; 78(10):6489–93.
26. Boerlin V, Maeglin B, Hgler W, Kuhn M, Nesch E. Analgesic activity of propyphenazone in patients with pain following oral surgery. *Eur J Clin Pharmacol* 1986; 31(2):127–31.
27. Gilman A, Hrsg. *The pharmacological basis of therapeutics*. 7th ed. New York: Macmillan Publ; 1985. S. 691-692.
28. Graham GG, Scott FK. Mechanisms of action of paracetamol and related analgesics 2003; (Vol. 11, No. 4-6):401–13.
29. Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte. 69. Sitzung Sachverständigen-Ausschuss für Verschreibungspflicht nach § 53 Absatz 2 AMG; Bonn, Juni 2012:3–30.

30. Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte. Jahresbericht 2012/2013 2012/2013:8–95.
31. BERLIN-CHEMIE AG. DEMEX Zahnschmerztabletten: Fachinformation 2014:1–2.
32. Costa D, Marques AP, Reis RL, Lima, Jose L F C, Fernandes E. Inhibition of human neutrophil oxidative burst by pyrazolone derivatives. *Free Radic Biol Med* 2006; 40(4):632–40.
33. Aronson JK, Hrsg. Propyphenazone // Meyler's Side Effects of Drugs: The International Encyclopedia of Adverse Drug Reactions and Interactions. 16th ed. s.l.: Elsevier Science; 2016. (Meyler's Side Effects of Drugs).
34. Böger RH, Schmidt G. Analgetika. In: Schwabe U, Paffrath D, Ludwig W-D, Klauber J, Hrsg. *Arzneiverordnungs-Report 2017*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2017. S. 245–7.
35. Hwang E-K, Nam Y-H, Jin HJ, Shin YS, Ye Y-M, Park H-S. Clinical Features of Immediate Hypersensitivity to Isopropylantipyrine. *Allergy, Asthma & Immunology Research* 2012; 5(1):55–8.
36. Romer D. Pharmacological evaluation of mild analgesics. *British Journal of Clinical Pharmacology* 1980; 10(S2):247S-251S.
37. Andrade EL, Meotti FC, Calixto JB. TRPA1 antagonists as potential analgesic drugs. *Pharmacol Ther* 2012; 133(2):189–204.
38. Aktories K, Förstermann U, Hofmann F, Starke K, Forth W, Henschler D et al., Hrsg. *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. 12. Auflage; 2017. S. 199.
39. Brogden RN. Pyrazolone derivatives. *Drugs* 1986; 32 Suppl 4:60–70.
40. Brune K. The early history of non-opioid analgesics. *Acute Pain* 1997; 1(1):33–40.
41. Rubio-Martinez A, Garcia-Erce JA, Salvador C, Gomez-Arteta E, Gimeno JJ. Autoimmune haemolytic anaemia induced by propyphenazone. *Vox Sang* 1998; 75(3):257.

42. Akyel A, Alsancak Y, Yayla C, Sahinarslan A, Ozdemir M. Acute inferior myocardial infarction with low atrial rhythm due to propyphenazone: Kounis syndrome. *Int J Cardiol* 2011; 148(3):352–3.
43. Tateishi M, Koitabashi C, Ichihara S. New Metabolites of Isopropylantipyrine in the rat. *Biochemical Pharmacology* 1980; 29:2705–8.
44. Tateishi M, Shimizu H. The metabolism of isopropylantipyrine in the rat and man. *Xenobiotica* 1976; 6(4):207–15.
45. Schrör K. Aspirin and Platelets: The Antiplatelet Action of Aspirin and Its Role in Thrombosis Treatment and Prophylaxis. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* 1997; 23(4):349–54.
46. Eikelboom JW, Hirsh J, Spencer FA, Baglin TP, Weitz JI. Antiplatelet drugs: Antithrombotic Therapy and Prevention of Thrombosis, 9th ed: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines. *Chest* 2012; 141(2 Suppl):e89S-e119S.
47. Flossmann E, Rothwell PM. Effect of aspirin on long-term risk of colorectal cancer: consistent evidence from randomised and observational studies. *Lancet* 2007; 369(9573):1603–13.
48. GIERSE JK, KOBOLDT CM, WALKER MC, SEIBERT K, ISAKSON PC. Kinetic basis for selective inhibition of cyclo-oxygenases. *Biochem. J.* 1999; 339(3):607.
49. Patrono C. Aspirin as an antiplatelet drug. *N Engl J Med* 1994; 330(18):1287–94.
50. DeWitt DL, el-Harith EA, Kraemer SA, Andrews MJ, Yao EF, Armstrong RL et al. The aspirin and heme-binding sites of ovine and murine prostaglandin endoperoxide synthases. *J Biol Chem* 1990; 265(9):5192–8.
51. Schrör K. Acetylsalicylsäure. 2., vollst. neu überarb. und aktualisierte Aufl. Frechen: Schrör; 2011. S. 49-51.
52. Farrell B, Godwin J, Richards S, Warlow C. The United Kingdom transient ischaemic attack (UK-TIA) aspirin trial: final results. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1991; 54(12):1044–54.

53. Krasopoulos G, Brister SJ, Beattie WS, Buchanan MR. Aspirin "resistance" and risk of cardiovascular morbidity: systematic review and meta-analysis. *BMJ* 2008; 336(7637):195–8.
54. Benedek IH, Joshi AS, Pieniaszek HJ, King SY, Kornhauser DM. Variability in the pharmacokinetics and pharmacodynamics of low dose aspirin in healthy male volunteers. *J Clin Pharmacol* 1995; 35(12):1181–6.
55. Tantry US, Mahla E, Gurbel PA. Aspirin resistance. *Prog Cardiovasc Dis* 2009; 52(2):141–52.
56. Hohlfeld T, Schrör K. Inhibition of antiplatelet effects of aspirin by nonopioid analgesics. *Clin Pharmacol Ther* 2015; 97(2):131–4.
57. Dannenberg L, Erschoff V, Bonner F, Gliem M, Jander S, Levkau B et al. Dipyrono comedication in aspirin treated stroke patients impairs outcome. *Vascul Pharmacol* 2016; 87:66–9.
58. Born GVR, Cross MJ. The aggregation of blood platelets. *The Journal of Physiology* 1963; 168(1):178–95.
59. Born GVR, Dearnley R, Foulks JG, Sharp DE. Quantification of the morphological reaction of platelets to aggregating agents and of its reversal by aggregation inhibitors. 1977:193–212.
60. Patrono C, Ciabattoni G, Pugliese F, Pierucci A, Blair IA, FitzGerald GA. Estimated rate of thromboxane secretion into the circulation of normal humans. *Journal of Clinical Investigation* 1986; 77(2):590–4.
61. Cayman Chemical Company. Thromboxane B2 EIA Kit 2013:1–10.
62. Giesecke C, Kaiser T. Neue Spektren in der Durchflusszytometrie. *BIOspektrum* 2017; 23(6):658–61.
63. Paniccia R, Priora R, Liotta AA, Abbate R. Platelet function tests: a comparative review. *Vasc Health Risk Manag* 2015; 11:133–48.
64. Graff J. Close Relationship between the Platelet Activation Marker CD62 and the Granular Release of Platelet-Derived Growth Factor. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 2002; 300(3):952–7.

65. Leytin V, Mody M, Semple JW, Garvey B, Freedman J. Quantification of platelet activation status by analyzing P-selectin expression. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 273(2):565–70.
66. Nebe CT. *Durchflusszytometrische Messtechnik und Datenauswertung* 1996:111–3.
67. Moser M, Bertram U, Peter K, Bode C, Ruef J. Abciximab, Eptifibatide, and Tirofiban Exhibit Dose-dependent Potencies to Dissolve Platelet Aggregates. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 2003; 41(4):586–92.
68. Schmidt H, Estler C-J, Allendörfer J, Hrsg. *Pharmakologie und Toxikologie: Für Studium und Praxis ; mit 281 Tabellen. 6., vollst. überarb. und erw. Aufl.* Stuttgart: Schattauer; 2007. S. 407-518.
69. Kurth T, Glynn RJ, Walker AM, Chan KA, Buring JE, Hennekens CH et al. Inhibition of clinical benefits of aspirin on first myocardial infarction by nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Circulation* 2003; 108(10):1191–5.
70. Meek IL, Vonkeman HE, Kasemier J, Movig KLL, van de Laar, M A F J. Interference of NSAIDs with the thrombocyte inhibitory effect of aspirin: a placebo-controlled, ex vivo, serial placebo-controlled serial crossover study. *Eur J Clin Pharmacol* 2013; 69(3):365–71.
71. Anzellotti P, Capone ML, Jeyam A, Tacconelli S, Bruno A, Tontodonati P et al. Low-dose naproxen interferes with the antiplatelet effects of aspirin in healthy subjects: recommendations to minimize the functional consequences. *Arthritis Rheum* 2011; 63(3):850–9.
72. Greenberg HE, Gottesdiener K, Huntington M, Wong P, Larson P, Wildonger L et al. A new cyclooxygenase-2 inhibitor, rofecoxib (VIOXX), did not alter the antiplatelet effects of low-dose aspirin in healthy volunteers. *J Clin Pharmacol* 2000; 40(12 Pt 2):1509–15.
73. Ouellet M, Riendeau D, Percival MD. A high level of cyclooxygenase-2 inhibitor selectivity is associated with a reduced interference of platelet cyclooxygenase-1 inactivation by aspirin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98(25):14583–8.

74. Yuan C, Rieke CJ, Rimon G, Wingerd BA, Smith WL. Partnering between monomers of cyclooxygenase-2 homodimers. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2006; 103(16):6142.
75. Sidhu RS, Lee JY, Yuan C, Smith WL. Comparison of cyclooxygenase-1 crystal structures: cross-talk between monomers comprising cyclooxygenase-1 homodimers. *Biochemistry* 2010; 49(33):7069–79.
76. Kariyazono H, Nakamura K, Arima J, Ayukawa O, Onimaru S, Masuda H et al. Evaluation of anti-platelet aggregatory effects of aspirin, cilostazol and ramatroban on platelet-rich plasma and whole blood. *Blood Coagulation and Fibrinolysis* 2004; 15(2):157–67.
77. Ishizuka T, Matsui T, Okamoto Y, Ohta A, Shichijo M. Ramatroban (BAY u 3405): a novel dual antagonist of TXA<sub>2</sub> receptor and CRTh<sub>2</sub>, a newly identified prostaglandin D<sub>2</sub> receptor. *Cardiovasc Drug Rev* 2004; 22(2):71–90.
78. Sugimoto H, Shichijo M, Iino T, Manabe Y, Watanabe A, Shimazaki M et al. An orally bioavailable small molecule antagonist of CRTH<sub>2</sub>, ramatroban (BAY u3405), inhibits prostaglandin D<sub>2</sub>-induced eosinophil migration in vitro. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 2003; 305(1):347–52.
79. Polzin A, Richter S, Schrör K, Rassaf T, Merx MW, Kelm M et al. Prevention of dipyron (metamizole) induced inhibition of aspirin antiplatelet effects. *Thromb Haemost* 2015; 114(1):87–95.
80. Ouellet M, Percival MD. Effect of inhibitor time-dependency on selectivity towards cyclooxygenase isoforms. *Biochem. J.* 1995; 306 (Pt 1):247–51.
81. Mohring A, Playda K, Dannenberg L, Zako S, Schneider T, Bartkowski K et al. Thromboxane Formation Assay to Identify High On-Treatment Platelet Reactivity to Aspirin. *Pharmacology* 2017; 100(3-4):127–30.
82. Breddin HK. Can platelet aggregometry be standardized? *Platelets* 2005; 16(3-4):151–8.
83. Jiang P, Loyau S, Tchitchinadze M, Ropers J, Jondeau G, Jandrot-Perrus M. Inhibition of Glycoprotein VI Clustering by Collagen as a Mechanism of

Inhibiting Collagen-Induced Platelet Responses: The Example of Losartan. PLoS One 2015; 10(6):2.

84. Schrör K, Huber K, Hohlfeld T. Functional testing methods for the antiplatelet effects of aspirin. *Biomark Med* 2011; 5(1):31–42.
85. Escolar G, Albors M, Garrido M, Bioque G, Diaz Ricart M, Carretero M et al. Inhibition of platelet-vessel wall interactions by thromboxane receptor antagonism in a human in vitro system: potentiation of antiplatelet effects of aspirin. *Eur J Clin Invest* 1998; 28(7):562–8.
86. Offermanns S. Activation of platelet function through G protein-coupled receptors. *Circ Res* 2006; 99(12):1293–304.
87. Zeymer U, Hohlfeld T, Vom Dahl J, Erbel R, Munzel T, Zahn R et al. Prospective, randomised trial of the time dependent antiplatelet effects of 500 mg and 250 mg acetylsalicylic acid i. v. and 300 mg p. o. in ACS (ACUTE). *Thromb Haemost* 2017; 117(3):625–35.
88. Zimmermann N, Wenk A, Kim U, Kienzle P, Weber A-A, Gams E et al. Functional and biochemical evaluation of platelet aspirin resistance after coronary artery bypass surgery. *Circulation* 2003; 108(5):542–7.
89. Klinkhardt U, Bauersachs R, Adams J, Graff J, Lindhoff-Last E, Harder S. Clopidogrel but not aspirin reduces P-selectin expression and formation of platelet-leukocyte aggregates in patients with atherosclerotic vascular disease. *Clin Pharmacol Ther* 2003; 73(3):232–41.
90. Wong S, Morel-Kopp M-C, Chen Q, Appleberg M, Ward CM, Lewis DR. Overcoming aspirin resistance: increased platelet inhibition with combination aspirin and clopidogrel and high dose aspirin therapy in aspirin resistant patients with peripheral vascular disease. *Thromb Haemost* 2006; 95(6):1042–3.
91. Rosenstock M, Danon A, Rimon G. PGHS-2 inhibitors, NS-398 and DuP-697, attenuate the inhibition of PGHS-1 by aspirin and indomethacin without altering its activity. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1440(1):127–37.
92. Gladding PA, Webster MWI, Farrell HB, Zeng ISL, Park R, Ruijine N. The antiplatelet effect of six non-steroidal anti-inflammatory drugs and their

pharmacodynamic interaction with aspirin in healthy volunteers. *Am J Cardiol* 2008; 101(7):1060–3.

93. Rimon G, Sidhu RS, Lauver DA, Lee JY, Sharma NP, Yuan C et al. Coxibs interfere with the action of aspirin by binding tightly to one monomer of cyclooxygenase-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107(1):28–33.
94. FitzGerald GA. Parsing an enigma: the pharmacodynamics of aspirin resistance. *The Lancet* 2003; 361(9357):542–4.
95. Kugelgen I von. Pharmacology of P2Y receptors. *Brain Res Bull* 2019:1.
96. Helten C, Naguib D, Dannenberg L, Pohl M, Ayhan A, Hohlfeld T et al. Platelet function testing: dead or alive. *J Thromb Haemost* 2018; 16(5):984–6.
97. Achilles A, Mohring A, Dannenberg L, Piayda K, Levkau B, Hohlfeld T et al. Analgesic medication with dipyron in patients with coronary artery disease: Relation to MACCE. *Int J Cardiol* 2017; 236:76–81.

## 6. Anhang

### *Abbildungsverzeichnis*

- Abb. 1:** Strukturformel von Phenazon (links) und Propyphenazon (rechts) S. 3
- Abb. 2:** Prinzip der TXB<sub>2</sub> Bestimmung S. 28
- Abb. 3:** Vergleich der Aggregationen bei unterschiedlichen Stimulantien, gemessen an den TXB<sub>2</sub>-Konzentrationen S. 29
- Abb. 4:** Versuchsprotokoll zur Messung der p-Selektinexpression S. 33
- Abb. 5:** Arzneimittelinteraktion zwischen ASS und Propyphenazon bezogen auf deren thrombozytenhemmende Wirkung, gemessen an der maximalen Steigung im Lichttransmissionsaggregometer (Stimulation mit Arachidonsäure) S. 39
- Abb. 6:** Arzneimittelinteraktion zwischen ASS und Propyphenazon bezogen auf deren thrombozytenhemmende Wirkung, gemessen an den TXB<sub>2</sub>-Konzentrationen (Stimulation mit Arachidonsäure) S. 40
- Abb. 7:** Arzneimittelinteraktion zwischen ASS und Propyphenazon bezogen auf deren thrombozytenhemmende Wirkung, gemessen an der p-Selektinexpression (Stimulation mit Arachidonsäure) S. 41
- Abb. 8:** Arzneimittelinteraktion zwischen ASS und Propyphenazon bezogen auf deren thrombozytenhemmende Wirkung, gemessen an der maximalen Steigung im Lichttransmissionsaggregometer (Stimulation mit Kollagen) S. 43
- Abb. 9:** Arzneimittelinteraktion zwischen ASS und Propyphenazon bezogen auf deren thrombozytenhemmende Wirkung, gemessen an den TXB<sub>2</sub>-Konzentrationen (Stimulation mit Kollagen) S. 44
- Abb. 10:** Hemmung der Aggregation durch Propyphenazon, gemessen an der maximalen Steigung im Lichttransmissionsaggregometer (Stimulation mit Arachidonsäure) S. 46
- Abb. 11:** Hemmung der Aggregation durch Propyphenazon, gemessen an den TXB<sub>2</sub>-Konzentrationen (Stimulation mit Arachidonsäure) S. 47

- Abb. 12:** Hemmung der Aggregation durch Propyphenazon, gemessen an den CD62P positiven Thrombozyten (Stimulation mit Arachidonsäure) S. 48
- Abb. 13:** Hemmung der Aggregation durch Propyphenazon, gemessen an der maximalen Steigung im Lichttransmissionsaggregometer (Stimulation mit Kollagen) S. 50
- Abb. 14:** Hemmung der Aggregation durch Propyphenazon, gemessen an den TXB<sub>2</sub>-Konzentrationen (Stimulation mit Kollagen) S. 51
- Abb. 15:** Vergleich der Interaktion von Propyphenazon und ASS mit der Hemmung der Aggregation durch Propyphenazon bezogen auf deren thrombozytenhemmende Wirkung, gemessen an der maximalen Steigung im Lichttransmissionsaggregometer (Stimulation mit Arachidonsäure) S. 53
- Abb. 16:** Vergleich der Interaktion von Propyphenazon und ASS mit der Eigenhemmung von Propyphenazon bezogen auf deren thrombozytenhemmende Wirkung, gemessen an der maximalen Steigung im Lichttransmissionsaggregometer (Stimulation mit Kollagen) S. 54
- Abb. 17:** Arzneimittelinteraktion zwischen Indometazin und Propyphenazon bezogen auf deren thrombozytenhemmende Wirkung, gemessen an der maximalen Steigung im Lichttransmissionsaggregometer (Stimulation mit Arachidonsäure) S. 56
- Abb. 18:** Arzneimittelinteraktion zwischen Indometazin und Propyphenazon bezogen auf deren thrombozytenhemmende Wirkung, gemessen an den TXB<sub>2</sub>-Konzentrationen (Stimulation mit Arachidonsäure) S. 56
- Abb. 19:** Arzneimittelinteraktion zwischen Ramatroban und Propyphenazon bezogen auf deren thrombozytenhemmende Wirkung, gemessen an der maximalen Steigung im Lichttransmissionsaggregometer (Stimulation mit Arachidonsäure) S. 57
- Abb. 20:** Arzneimittelinteraktion zwischen Ramatroban und Propyphenazon bezogen auf deren thrombozytenhemmende Wirkung, gemessen an den TXB<sub>2</sub>-Konzentrationen (Stimulation mit Arachidonsäure) S. 57

## ***Danksagung***

Zunächst möchte ich Herrn Prof. Thomas Hohlfeld für die Bereitstellung des Themas, sowie für die sehr gute Betreuung danken.

Einen ganz wesentlichen Teil zum Erfolg dieser Doktorarbeit hat Kirsten Bartkowski mit der sehr netten Betreuung im Labor geleistet. Vielen Dank für die freundliche Unterstützung und den unermüdlichen Erklärungen bei meinen ersten Laborversuchen. Ein weiterer Dank geht an Sören Twarock für die zahlreichen Blutabnahmen für meine Dissertation und auch an die anderen Promotionsstudenten der Pharmakologie und Kardiologie, die für eine nette Atmosphäre im Labor und gegenseitige Unterstützung sorgten.

Außerdem möchte ich meinen Freunden danken, die mich während der gesamten Zeit unterstützt haben und mir abwechslungsreiche Mensapausen bescherten. Insbesondere möchte ich hier Efterpi-Maria Sampani und Alina Domdey erwähnen. Auch Hannah Echelmeyer hat mich jederzeit unterstützt und mich dazu ermutigt in der Pharmakologie nach einem Dissertationsthema zu fragen.

Weiterhin möchte ich allen Blutspendern auf diesem Wege noch einmal ganz herzlich für den Einsatz danken und allen weiteren Menschen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Zu guter Letzt gebührt meiner Familie ein großes Dankeschön, die mich während der gesamten Phase des Forschens und Schreibens ermutigt und unterstützt hat, wo sie konnten. Die persönlichen Gespräche mit jedem Einzelnen haben mir sehr geholfen dieses Projekt zu verwirklichen. Ich danke hier besonders Christel und Werner Tienken, Christoph Tienken, Erika Schulten und Henrik Mones. Danke für die tolle und liebevolle Unterstützung zu jeder Zeit!