

Aus der Klinik für Kardiologie, Pneumologie und Angiologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Univ.-Prof. Dr. Malte Kelm

Plättchenreaktivität und Aspirinmedikation bei Patienten mit
chronischer Niereninsuffizienz und Hämodialyse

Dissertation

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

vorgelegt von

Philipp Mourikis

2020

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: PD Dr. med. Amin Polzin

Zweitgutachter: PD Dr. med. Johannes Schneppendahl

Publikationen

- Dannenberg L, Wolff G, Naguib D, Pöhl M, Zako S, Helten C, **Mourikis P**, Levkau B, Hohlfeld T, Zeus T, Kelm M, Schulze V, Polzin A. Safety and efficacy of Tirofiban in STEMI-patients. *Int J Cardiol.* 2019 Jan 1;274:35-39.
- Dannenberg L, Petzold T, Achilles A, Naguib D, Zako S, Helten C, M'Pembele R, **Mourikis P**, Podsvyadek Y, Grandoch M, Levkau B, Zeus T, Kelm M, Hohlfeld T, Polzin A. Dose reduction, oral application, and order of intake to preserve aspirin antiplatelet effects in dipyron co-medicated chronic artery disease patients. *Eur J Clin Pharmacol.* 2019 Jan;75(1):13-20.
- Polzin A, Helten C, Dannenberg L, **Mourikis P**, Naguib D, Achilles A, Knoop B, Zako S, Rehder S, Görlinger K, Levkau B, Zeus T, Kelm M, Hohlfeld T, Hoffmann T. Platelet Reactivity in Patients on Aspirin and Clopidogrel Therapy Measured by a New Bedside Whole-Blood Assay. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2019 Jan;73(1):40-47.
- Dannenberg L, **Mourikis P**, Naguib D, Zako S, Helten C, M'Pembele R, Trojovsky K, Konsek D, Wolff G, Brockmeyer M, Schulze V, Levkau B, Hohlfeld T, Zeus T, Kelm M, Polzin A. Antiplatelet effects of aspirin and clopidogrel after left atrial appendage (LAA) occluder implantation. *Int J Cardiol.* 2019 Jan 15;275:95-100.
- Dannenberg L, Zako S, **Mourikis P**, Veulemans V, Kelm M, Zeus T, Polzin A. Oral Anticoagulation Therapy and Progression of Calcific Aortic Valve Stenosis: Factor Xa versus Factor IIa Inhibition? *Pharmacology.* 2019 Jun 11:1-2.
- Dannenberg L, Metzen D, Zako S, Pöhl M, **Mourikis P**, Helten C, Trojovsky K, Naguib D, Konsek D, Knoop B, Ayhan A, Hohlfeld T, Petzold T, Levkau B, Veulemans V, Zeus T, Kelm M, Polzin A. Enhanced Platelet Reactivity under Aspirin Medication and Major Adverse Cardiac and Cerebrovascular Events in Patients with Coronary Artery Disease. *Pharmacology.* 2019 Oct 22:1-5.
- **Mourikis P**, Helten C, Dannenberg L, Hohlfeld T, Stegbauer J, Petzold T, Levkau B, Zeus T, Kelm M, Polzin A. Platelet reactivity in patients with chronic kidney disease and hemodialysis. *J Thromb Thrombolysis.* 2019 Nov 6.
- Petzold T, Thienel M, Dannenberg L, **Mourikis P**, Helten C, Ayhan A, M'Pembele R, Achilles A, Trojovsky K, Konsek D, Zhang Z, Regenauer R, Pircher J, Ehrlich A, Lüsebrink E, Nicolai L, Stocker TJ, Brandl R, Röschenthaler F, Strecker J, Saleh I, Spannagl M, Mayr CH, Schiller HB, Jung C, Gerdes N, Hoffmann T, Levkau B, Hohlfeld T, Zeus T, Schulz C, Kelm M, Polzin A. Rivaroxaban Reduces Arterial Thrombosis by Inhibition

of FXa-Driven Platelet Activation via Protease Activated Receptor-1. *Circ Res.* 2020 Feb

- **Mourikis P**, Zako S, Dannenberg L, Helten C, Naguib D, Hohlfeld T, Petzold T, Levkau B, Zeus T, Kelm M, Polzin A. Aspirin antiplatelet effects are associated with body weight. *Vascul Pharmacol.* 2020 Feb-Mar
- Busch L, Stern M, Dannenberg L, **Mourikis P**, Gröne M, Özaslan G, Heinen Y, Heiss C, Sansone R, Polzin A, Kelm M. Impact of high on-treatment platelet reactivity after angioplasty in patients with peripheral arterial disease. *Platelets.* 2020 Apr 7
- Petzold T, Thienel M, Dannenberg L, **Mourikis P**, Helten C, Ayhan A, M'Pembele R, Achilles A, Trojovky K, Zhang Z, Regenauer R, Pircher J, Ehrlich A, Lüsebrink E, Nicolai L, Stocker TJ, Brandl R, Rösenthaller F, Strecker J, Saleh I, Spannagl M, Mayr CH, Schiller HB, Jung C, Gerdes N, Hoffmann T, Levkau B, Hohlfeld T, Zeus T, Schulz C, Kelm M, Polzin A. Response by Petzold et al to Letter Regarding Article, "Rivaroxaban Reduces Arterial Thrombosis by Inhibition of FXa-Driven Platelet Activation via Protease Activated Receptor-1". *Circ Res.* 2020 Apr 10
- Petzold T, Dannenberg L, Thienel M, Ahlbrecht S, **Mourikis P**, Helten C, M'Pembele R, Achilles A, Zikeli D, Zhang Z, Lüsebrink E, Nicolai L, Saleh I, Jung C, Gerdes N, Hoffmann T, Levkau B, Hohlfeld T, Zeus T, Schulz C, Kelm M, Polzin A. Response by Petzold et al to Letter Regarding Article, "Rivaroxaban Reduces Arterial Thrombosis by Inhibition of Fxa-Driven Platelet Activation via Protease Activated Receptor-1". *Circ Res.* 2020 May 8
- **Mourikis P**, Zako S, Dannenberg L, Nia AM, Heinen Y, Busch L, Richter H, Hohlfeld T, Zeus T, Kelm M, Polzin A. Lipid lowering therapy in cardiovascular disease: From myth to molecular reality. *Pharmacol Ther.* 2020 May 31
- Helten C, Mourikis P, Dannenberg L, M'Pembele R, Trojovsky K, Ayhan A, Kohlmorgen C, Grandoch M, Levkau B, Veulemans V, Petzold T, Hohlfeld T, Kelm M, Zeus T, Polzin A. A novel mechanism of ACE inhibition-associated enhanced platelet reactivity: disproof of the ARB-MI paradox? *Eur J Clin Pharmacol.* 2020 Jun 5

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

- **Mourikis P**, Helten C, Dannenberg L, Hohlfeld T, Stegbauer J, Petzold T, Levkau B, Zeus T, Kelm M, Polzin A. Platelet reactivity in patients with chronic kidney disease and hemodialysis. *J Thromb Thrombolysis.* 2019 Nov 6.

Zusammenfassung

Die chronische Niereninsuffizienz ist ein wichtiger und häufiger Risikofaktor für die Entstehung einer koronaren Herzkrankheit. Kardiovaskuläre Ereignisse sind die häufigste Todesursache für Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz. Zudem steigt das Risiko ein ischämisches Ereignis zu erleiden um ein Vielfaches, sobald eine terminale Niereninsuffizienz, bzw. eine Dialysepflichtigkeit besteht. Thrombozyten sind der zentrale Faktor in der Entstehung ischämischer Ereignisse. Insbesondere eine erhöhte Thrombozytenreaktivität wird mit dieser assoziiert. Gleichzeitig ist die Thrombozytenaggregationshemmung mit Acetylsalicylsäure zentraler Baustein in der Sekundärprophylaxe ischämischer Ereignisse.

Im klinisch-translationalen Teil dieser Arbeit wurde bei 22 Patienten mit koronarer Herzkrankheit und terminaler Niereninsuffizienz die Plättchenreaktivität vor, während und 24 Stunden nach Hämodialyse mittels Lichttransmissionsaggregometrie bestimmt. Dabei zeigte sich, dass es während der Hämodialyse zu keiner Veränderung der Plättchenreaktivität kommt, während 24 Stunden nach Hämodialyse die Plättchenreaktivität geringer und die pharmakodynamische Antwort auf Acetylsalicylsäure stärker ausgeprägt ist. Diese Veränderungen gehen einher mit einer Abnahme der Indoxylsulfat-Plasmaspiegel und legen nahe, dass die Hämodialyse einen positiven Einfluss auf die generell erhöhte Plättchenreaktivität bei chronischer Niereninsuffizienz hat.

Im experimentellen Teil dieser Arbeit konnte zudem gezeigt werden, dass das Urämietoxin Indoxylsulfat die Plättchenaggregation und –adhäsion signifikant steigert und den Effekt von Acetylsalicylsäure *in-vitro* verringern kann.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sollten bei antithrombotischen Regimen von Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz in Betracht gezogen werden.

Abstract

Chronic kidney disease is an important and frequent risk factor for the development of coronary artery disease. Cardiovascular events are the most common cause of death in patients with chronic kidney disease and the risk for ischemic events even increases by a multiple if hemodialysis is necessary. Platelets are the crucial factor in pathogenesis of ischemic events and especially increased platelet reactivity is associated with ischemic events. Therefore, platelet inhibition with acetylsalicylic acid is the backbone of secondary prophylaxis of ischemic events.

In the first part of this study, 22 patients with coronary artery disease and end-stage renal disease were included. Platelet reactivity was measured by light transmission aggregometry before, during und 24 hours after hemodialysis. During hemodialysis no change in platelet reactivity was observed, while 24 hours after hemodialysis platelet reactivity was decreased and pharmacodynamic response to acetylsalicylic acid was improved. Furthermore, plasma levels of indoxylsulfate were lower 24 hours after hemodialysis. That suggests a positive effect of the hemodialysis on the platelet reactivity in patients with chronic kidney disease.

In the second part of this study, it could be shown that indoxylsulfate enhanced platelet reactivity and adhesion and reduced the effect of acetylsalicylic acid *in-vitro*. The results of this study should be considered regarding antithrombotic therapy in patients with chronic kidney disease.

Abkürzungsverzeichnis

AA	Arachidonsäure
ACE	Angiotensin-converting-enzyme
ACS	Akutes Koronarsyndrom
ADP	Adenosindiphosphat
AK	Antikörper
AP	alkalische Phosphatase
ASS	Acetylsalicylsäure
AT	Angiotensin
BMI	Body mass index
BSA	bovines Serumalbumin
CABG	coronary artery bypass graft
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CCS	Canadian Cardiovascular Society
CK	Creatin-Kinase
CKD	chronic kidney disease
COX-1	Cyclooxygenase-1
CRP	C-reaktives Protein
DAPT	Duale Antiplättchentherapie
DM	Diabetes mellitus
DMSO	Dimethylsulfoxid
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
F	Faktor
FACS	fluorescence activated cell sorting
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GFR	glomeruläre Filtrationsrate
GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
gp	Glykoprotein
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
Hb	Hämoglobin
HbA1c	glykiertes Hämoglobin
Hcy	Homocystein
HD	Hämodialyse
HDL	high density lipoprotein
HTPR	high on-treatment platelet reactivity
Hkt	Hämatokrit
IS	Indoxylsulfat
KHK	koronare Herzkrankheit
LDL	low density lipoprotein
LTA	Lichttransmissionsaggregometrie
LVEF	Linksventrikuläre Ejektionsfraktion
NMH	niedermolekulares Heparin
NYHA	New York Heart Association
MCGN	minimal change Glomerulonephritis
MoA	Maximum of aggregation
OAT	organischer Anionentransporter
PAP	Plättchenarmes Plasma
PAR-1	Protease-aktivierter Rezeptor 1
PBS	Phosphate buffered saline
PCI	percutaneous coronary intervention
PDGF	platelet derived growth factor

PE	Phycoerythrin		
PF4	Plättchenfaktor		4
PPI	Protonenpumpeninhibitor		
PRP	Plättchenreiches		Plasma
UFH	unfraktioniertes		Heparin
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System		
ROS	Reaktive		Sauerstoffspezies
rpm	rounds	per	minute
SD	standard		deviation
SGLT	sodium dependent glucose transporter		
TAH	Thrombozytenaggregationshemmung		
TF	tissue		factor
TMAO	Trimethylaminoxid		
TXA2	Thromboxan		A2
VKA	Vitamin-K-Antagonist		
vSMC	vascular smooth muscle		cells
vWF	von-Willebrand-Faktor		
μ	Mikro		

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Koronare Herzkrankheit	1
1.1.1 Epidemiologie und Risikofaktoren der KHK	1
1.2 Thrombozyten	2
1.2.1 Zellbasiertes Modell der Gerinnung.....	2
1.2.2 Thrombozytenaggregationshemmung	4
1.2.3 Acetylsalicylsäure (ASS)	5
1.2.4 <i>High On-Treatment Platelet Reactivity (HTPR)</i>	5
1.3. Chronische Niereninsuffizienz	5
1.3.1 CKD und das kardiovaskuläre System	7
1.4 Ziele der Dissertation	8
2 Material und Methoden	9
2.1 Studiendesign	9
2.1.1 Klinisch-translatinaler Teil	9
2.1.2 Experimenteller Teil	9
2.2 Patientenkollektiv	9
2.3 Material	11
2.3.1 Substanzen	11
2.4 Methoden	13
2.4.3 Durchflusszytometrie (FACS).....	15
2.4.4 Flusskammerversuche.....	16
2.4.5 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) zur Messung von Indoxylsulfat	18
2.5 Statistische Analyse	19
3 Ergebnisse	20
3.1. Patientencharakteristika	20
3.2 Ergebnisse der LTA im Patientenkollektiv	26
3.3 Ergebnisse der Durchflusszytometrie im Patientenkollektiv	28
3.4 HTPR im Patientenkollektiv	29
3.5 IS-Spiegel im Patientenkollektiv	29
3.6 Einfluss von IS auf die Plättchenreaktivität	31
3.7 Einfluss von IS auf die Plättchenadhäsion	35
4 Diskussion	38
5 Literatur- und Quellenverzeichnis	46

1 Einleitung

Die chronische Niereninsuffizienz (CKD) ist assoziiert mit einem erhöhten Risiko für das Auftreten einer koronaren Herzkrankheit (KHK) und kardiovaskuläre Ereignisse sind die häufigste Todesursache für Patienten mit CKD¹. Gleichzeitig sind Blutungen eine häufige Komplikation bei CKD². Dies legt eine insgesamt veränderte Blutgerinnung nahe. In der vorliegenden Arbeit soll daher der Einfluss der CKD und der intermittierenden Hämodialyse (HD) auf die Thrombozytenfunktion evaluiert werden. Dazu wurde die Arbeit in einen klinischen Teil, der die Auswirkung der HD auf die Plättchenfunktion und die Wirkung von Acetylsalicylsäure (ASS) als Thrombozytenaggregationshemmer untersucht, und einen experimentellen Teil, in dem die Veränderung der Thrombozytenfunktion durch das Urämietoxin Indoxylsulfat (IS) im Vordergrund steht, aufgeteilt.

1.1 Koronare Herzkrankheit

1.1.1 Epidemiologie und Risikofaktoren der KHK

Die koronare Herzkrankheit stellt eine Erkrankung mit hoher gesellschaftlicher Relevanz dar. Alleine in Deutschland liegt die Lebenszeitprävalenz der KHK bei 40-79-jährigen Erwachsenen bei ca. 9,3%³. Die KHK und ihre Folgeerkrankungen wie der akute Myokardinfarkt und die Herzinsuffizienz sind häufigsten Todesursachen in Deutschland. 2015 starben laut statistischem Bundesamt 76.013 Patienten an einer chronischen ischämischen Herzkrankheit, 49.210 an einem akuten Myokardinfarkt und 47.414 an einer Herzinsuffizienz. Auch weltweit gehört die KHK und ihre Folgen zu den führenden Todesursachen⁴ und sogar in Entwicklungsländern haben kardiovaskuläre Todesursachen Infektionskrankheiten als häufigste Todesursache überholt⁵.

Für die KHK als koronare Manifestation einer Atherosklerose besteht eine Reihe von Risikofaktoren. Neben metabolischen Veränderungen wie Diabetes Mellitus, Übergewicht und hohen LDL-Spiegeln tragen ein arterieller Hypertonus und Tabakrauchen maßgeblich zu der Entwicklung einer KHK bei.⁶ Weiterhin sind eine

positive Familienanamnese⁷, ein zunehmendes Alter⁸ und eine chronische Niereninsuffizienz (CKD)⁹ wichtige Risikofaktoren.

1.2 Thrombozyten

Thrombozyten oder auch Blutplättchen bzw. nur Plättchen genannt, sind kernlose und flache Blutzellen mit einem Durchmesser von etwa 2-4µm¹⁰. Plättchen entstehen im Rahmen der Thrombopoese, in Zuge derer sich kernlose Fragmente unter dem Einfluss von Thrombopoietin von Megakaryozyten im Knochenmark abspalten und die Blutplättchen bilden¹¹. Als weiterer Bildungsort für Plättchen wurde in jüngerer Zeit die Lunge identifiziert, die ebenfalls Megakaryozyten enthält und unter bestimmten Bedingungen zur Thrombopoese fähig ist¹². Plättchen weisen eine Lebensdauer von ca. 10 Tagen im Blut auf, bevor sie durch das retikuloendotheliale System der Milz und in der Leber abgebaut werden^{13,14}. Der Normwert für die Plättchenanzahl im Blut gesunder Menschen liegt zwischen 150.000-450.000/µl¹⁵. Neben der essentiellen Bedeutung von Blutplättchen für die Hämostase, auf die im weiteren Verlauf dieser Arbeit eingegangen wird, verfügen Blutplättchen über eine Vielzahl von weiteren physiologischen Funktionen. Hierbei stehen insbesondere eine Beteiligung an der Immunabwehr und inflammatorischen Prozessen im Fokus¹⁶. Plättchen interagieren über eine Vielzahl von Faktoren wie z.B. Toll-like-Rezeptoren mit Bakterien und sind über die Sekretion von antimikrobiellen Stoffen entscheidend an der Immunabwehr beteiligt¹⁷. Auf Aktivierung hin sekretieren Plättchen außerdem eine Reihe von Entzündungsmediatoren und bilden so einen wichtigen Teil inflammatorischer Prozesse¹⁸.

1.2.1 Zellbasiertes Modell der Gerinnung

Die Unterteilung der Blutgerinnung in eine primäre und sekundäre Hämostase und wiederum die Unterteilung der sekundären Hämostase in ein extrinsisches und ein intrinsisches System wird aktuell als eher artifiziell angesehen. Es scheint eher ein zellbasiertes Modell sein. Dies verläuft weniger kaskadenartig, sondern in einzelnen Phasen, die sich zeitlich überlappen und nebeneinander ablaufen.

Die Blutgerinnung beginnt mit der Phase der Initiation. Der zentrale Faktor der Initiation ist der *tissue factor* (TF; FIII). Der TF ist ein Membranprotein, welches von perivaskulären Zellen wie Fibroblasten und vaskulären glatten Muskelzellen¹⁹, Endothelzellen²⁰ und Immunzellen wie Monozyten²¹ exprimiert wird. Bei Kontakt des TF z.B. nach Endothelläsion mit dem Blutstrom bindet der TF den Gerinnungsfaktor VII (FVII) und es findet eine Aktivierung durch Proteasen zum FVIIa statt²². Der TF/FVIIa-Komplex aktiviert anschließend die Faktoren X (FX) und IX (FIX) zu FXa und FIXa. FXa wiederum aktiviert in der Gegenwart von Calciumionen (Ca^{2+}) und negativ geladenen Phospholipiden der Zellwand im Komplex mit aktiviertem Faktor V (FVa) Prothrombin zu Thrombin²³.

In der Phase der Amplifikation binden Plättchen am Ort der Gefäßverletzung an die subendotheliale Matrix. Dabei wird die Bindung an den von-Willebrand-Faktor (vWF) via Glykoprotein-Ib-IX-V (gplb/IX) und die Bindung an subendotheliales Kollagen via dem Glykoprotein VI (gpVI) und dem Integrin- $\alpha 2\beta 1$ vermittelt²⁴. Die kleine Menge an Thrombin, die am Ende der Initiationsphase gebildet wurde, aktiviert nun die Gerinnungsfaktoren V, VIII und XI (FV, FVII, FXI), die Thrombozyten über den Protease-aktivierten Rezeptor 1 (PAR-1)²⁵ und spaltet den Gerinnungsfaktor VIII (FVIII) vom vWF ab und aktiviert ihn zu FVIIIa²⁶. Nach Aktivierung sekretieren Thrombozyten α - und δ -Granula mit Mediatoren, die inflammatorische und koagulatorische Funktionen haben. Hierbei werden aus α -Granula vWF, Prothrombin, Fibrinogen, Fibronectin, *platelet-derived growth factor* (PDGF), Plättchenfaktor 4 (PF4), P-Selectin, FV, FXI und FXIII freigesetzt. Aus den dichten δ -Granula werden Adenosindiphosphat (ADP), Serotonin und Calcium freigesetzt.²⁷ FXa, FVa und FVIIIa sind nun auf der Oberfläche des Thrombozyten gebunden und es beginnt die Phase der Propagation.

Der sekretierte FXI wird durch Thrombin zu FXIa aktiviert. Dieser wiederum aktiviert FIX zu FIXa, welcher mit FVIIIa, Ca^{2+} und negativen Phospholipiden der Thrombozytenmembran einen Komplex bildet, der die Umwandlung von FX zu FXa katalysiert. Die folgenden großen Mengen an FXa bilden sofort den bereits oben genannten Komplex mit FVa, Ca^{2+} und negativen Phospholipiden der Thrombozytenmembran, sodass große Mengen Thrombin aus Prothrombin produziert werden. Dieser *thrombin burst* ist essentiell für die Ausbildung eines stabilen Thrombus. Thrombin hat die abschließende Funktion die Umwandlung von Fibrinogen zu Fibrin zu katalysieren, welches für die weitere Stabilisierung des

Thrombus und die Quervernetzung von Thrombozyten via Glykoprotein IIb/IIIa (gpIIb/IIIa) verantwortlich ist.^{28, 29}

1.2.2 Thrombozytenaggregationshemmung

Die Thrombozytenaggregationshemmung (TAH) als antithrombotische Therapie ist unverzichtbar in der Sekundärprophylaxe kardiovaskulärer Ereignisse. Dies rührt insbesondere daher, dass Thrombozyten eine zentrale Rolle in der Pathogenese ischämischer Ereignisse, wie einem akuten Myokardinfarkt spielen.³⁰ Klinisch relevant sind hierbei insbesondere irreversible Cyclooxygenase-1-(COX-1)-Inhibitoren, wie Acetylsalicylsäure, auf die im weiteren Verlauf genauer eingegangen wird. Weiterhin werden ADP-Rezeptor-Antagonisten und gpIIb/IIIa-Inhibitoren routinemäßig eingesetzt.

ADP-Rezeptor-Antagonisten blockieren die Bindung von ADP an den P2Y₁₂-Rezeptor auf Thrombozyten. Dieser Rezeptor ist ein G_i-Protein-gekoppelter Rezeptor (GPCR), welcher nach Aktivierung über eine Verringerung der zytosolischen Konzentration von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) zur Thrombozytenaktivierung und -aggregation führt.³¹ Vertreter dieser Wirkstoffklasse sind die peroral wirksamen Stoffe Clopidogrel, Prasugrel und Ticagrelor und das intravenös wirksame Cangrelor, die sich hinsichtlich ihres Metabolismus, der Reversibilität und der Stärke der Rezeptorblockade unterscheiden.³²

Antagonisten des gpIIb/IIIa verhindern die Quervernetzung von Thrombozyten via Fibrin, welches an das gpIIb/IIIa bindet. Vertreter dieser Wirkstoffklasse sind der monoklonale Antikörper Abciximab, das Peptid Eptifibatid und der am häufigsten verwendete Stoff Tirofiban. Diese drei haben gemein, dass sie alle nur zur intravenösen Anwendung zur Verfügung stehen. Ihre Indikation beschränkt sich auf wenige Situationen wie z.B. während einer perkutanen Koronarintervention (PCI) als *bail out* Therapie.^{33, 34}

Weitläufige Indikationen der TAH sind die KHK³⁵, die Sekundärprophylaxe ischämischer Ereignisse, das akute Koronarsyndrom (ACS)³⁶ und das Verhindern einer Stentthrombose nach PCI³⁴.

1.2.3 Acetylsalicylsäure (ASS)

Die chemische Grundlage der Acetylsalicylsäure (ASS) ist die Salicylsäure, welche erstmals 1838 aus Weidenrinde isoliert werden konnte, nachdem zuvor bereits seit über 1500 Jahren vor Christus der analgetische Effekt und seit etwa hundert Jahren auch der antipyretische Effekt der Weide bzw. ihrer Rinde bekannt war³⁷. Im Jahr 1897 gelang Bayer schließlich die Acetylierung der Salicylsäure und damit die Herstellung von ASS³⁸. ASS ist ein irreversibler COX-1-Inhibitor, der über Acetylierung der Serins an der Stelle 530 im aktiven Zentrum der COX-1 wirkt³⁹. Dies führt zu einer verringerten Umsetzung von Arachidonsäure (AA) zu Prostaglandin H₂, welches die Vorstufe des vor allem in Thrombozyten gebildeten Thromboxan A₂ (TXA₂) ist⁴⁰. TXA₂ selbst wirkt als autokrines Hormon über den TXA₂-Rezeptor aktivierend auf Thrombozyten⁴¹.

ASS ist in seiner antithrombozytären Dosis von 100mg/d oral Mittel der Wahl in der Sekundärprophylaxe ischämischer Ereignisse und in einer intravenösen Dosis von 500mg ein wichtiger Bestandteil der akuten Behandlung des ACS³⁶.

1.2.4 High On-Treatment Platelet Reactivity (HTPR)

Die interindividuelle pharmakodynamische Antwort auf ASS variiert sehr stark. Eine unzureichende Plättcheninhibition durch ASS wird *high on-treatment platelet reactivity* (HTPR) genannt⁴². Eine HTPR gegenüber ASS geht einher mit einem erhöhten Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse^{43, 44}. Gründe für eine HTPR gegenüber ASS sind z.B. Medikamenteninteraktionen mit nichtsteroidalen Antirheumatika wie Ibuprofen⁴⁵ oder Metamizol⁴⁶. Desweiteren führen Komorbiditäten wie ein Diabets Mellitus Typ 2 zu einer hohen Rate an HTPR⁴⁷. Weiterhin konnte für Patienten mit CKD gezeigt werden, dass die antithrombozytären Effekte von ASS eingeschränkt sind^{48, 49}.

1.3. Chronische Niereninsuffizienz

Die chronische Niereninsuffizienz ist durch eine pathologische Nierenstruktur oder -funktion für mehr als drei Monate mit einer Bedeutung für die Gesundheit gekennzeichnet. Zur Diagnosestellung werden die Marker der glomerulären Filt-

rationsrate (GFR) in ml/min pro 1,73 m² und die Albuminausscheidung im Urin in mg/l angewandt.⁵⁰ Tabelle 1 zeigt die Einteilung der CKD in verschiedene Stadien anhand dieser Laborparameter.

				Albuminausscheidung im Urin in mg/l		
				A1	A2	A3
				Normal bis leicht erhöht	Mäßig erhöht	Schwer erhöht
				<30	30-300	>300
GFR in ml/min/1,73m ²	G1	Normal oder hoch	>90	1 bei CKD	1	2
	G2	Leicht erniedrigt	60-89	1 bei CKD	1	2
	G3a	Leicht bis mäßig erniedrigt	45-59	1	2	3
	G3b	Mäßig bis schwer erniedrigt	30-44	2	3	3
	G4	Schwer erniedrigt	15-29	3	3	4+
	G5	Nierenversagen	<15	4+	4+	4+

Tabelle 1: Stadien der chronischen Niereninsuffizienz nach KDIGO (nach: Stevens PE et al. Evaluation and management of chronic kidney disease: synopsis of the kidney disease: improving global outcomes 2012 clinical practice guideline. Ann Intern Med. 2013 Jun 4;158(11):825-30.) (GFR = glomeruläre Filtrationsrate)

Die Prävalenz der CKD ist sowohl in Deutschland als auch den USA in den letzten Jahrzehnten angestiegen. Eine eingeschränkte Nierenfunktion wird je nach Studie und Register für ca. 10-25% der Bevölkerung angenommen^{51, 52, 53}. Die häufigsten Gründe für eine CKD in der westlichen Welt sind Diabetes Mellitus, arterielle Hypertonie und Glomerulonephritiden⁵⁴. Insbesondere im Stadium 5 der CKD ist eine Nierenersatztherapie notwendig. Hierzu stehen einerseits die Nierentransplantation und andererseits die HD zur Verfügung.⁵⁵ Auf Grund einer begrenzten Anzahl an Spenderorganen und steigender Inzidenz an Patienten mit eingeschränkter Nierenfunktion ist aktuell aber insbesondere die HD die primäre Therapie⁵⁶.

1.3.1 CKD und das kardiovaskuläre System

Patienten mit CKD haben ein erhöhtes Risiko, an einer KHK zu erkranken. Außerdem stellen kardiovaskuläre Ereignisse die häufigste Todesursache bei diesen Patienten dar.¹ Dieses erhöhte kardiovaskuläre Risiko ist durch verschiedene pathophysiologische Veränderungen im Rahmen der CKD bedingt. Aspekte wie eine endotheliale Dysfunktion, chronische Inflammation, eine erhöhte Generierung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und Dysbalancen im Calcium-Phosphat-Stoffwechsel begünstigen das Auftreten und beschleunigte Fortschreiten einer Atherosklerose.⁵⁷

Therapeutisch sind die Möglichkeiten für Patienten mit einer terminalen Niereninsuffizienz limitiert. Da der Bedarf an Spenderorganen kontinuierlich steigt, und schon jetzt der Großteil der Patienten auf Wartelisten steht ist eine Nierentransplantation nur für einen Bruchteil der Patienten eine Option⁵⁸. Als weitere Therapieoption steht die intermittierende Hämodialyse (HD) zur Verfügung, die effektiv niedermolekulare Stoffe, die bei Patienten mit CKD akkumulieren, aus dem Blut entfernt⁵⁹. Desweiteren ist die HD einer konservativen, rein medikamentösen Therapie klar überlegen⁶⁰. Diese konservative Therapie besteht vor allem in der Kontrolle von Risikofaktoren, wie Diabetes Mellitus und arterieller Hypertonie und der Blockade des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS)⁵⁰.

In jüngster Zeit hat insbesondere das Urämietoxin IS an Aufmerksamkeit gewonnen und wird als möglicher Grund für die vielfältigen kardiovaskulären Beeinträchtigungen bei CKD angesehen⁶¹. IS ist ein Abbauprodukt des Tryptophanmetabolismus und akkumuliert bei CKD⁶². Ebenfalls konnte für IS gezeigt werden, dass es vielfältige negative Einflüsse auf das kardiovaskuläre System besitzt, wie z.B. die Hochregulation von TF auf glatten Gefäßmuskelzellen (vSMC)⁶³ und Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen⁶⁴, die Generierung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS)⁶⁵ und die Steigerung der Proliferation von vSMC⁶⁶.

1.4 Ziele der Dissertation

In der vorliegenden Dissertation werden die folgenden Fragestellungen untersucht:

1. Welchen Einfluss hat die intermittierende HD auf die allgemeine Plättchenreaktivität bei Patienten mit CKD und KHK?
2. Welchen Einfluss hat die HD auf die pharmakodynamische Antwort auf ASS?
3. Ist IS ein potenzieller Mediator in der Vermittlung einer HTPR gegenüber ASS?
4. Beeinflusst IS die Thrombozytenaggregation und –adhäsion von humanen Plättchen in-vitro und welche Rolle spielt ASS in diesem Zusammenhang?

2 Material und Methoden

2.1 Studiendesign

Die vorliegende Dissertation gliedert sich in zwei Teile. Zum Ersten erfolgte eine klinisch-translationalen Untersuchung, bei der Patienten mit dialysepflichtiger CKD, KHK und ASS-Medikation eingeschlossen wurden. Hierbei wurde der Einfluss der HD auf die Plättchenreaktivität und die pharmakodynamische Antwort auf ASS untersucht. Der experimentelle zweite Teil fußt auf *in-vitro* Untersuchungen zum Einfluss des Urämietoxins IS auf die Funktion humaner Plättchen.

2.1.1 Klinisch-translationaler Teil

Für den klinisch-translationalen Teil der vorliegenden Arbeit wurden dialysepflichtige Patienten mit KHK und ASS-Medikation eingeschlossen. Die Patienten wurden von den kardiologischen Stationen MI03, ME06, ME08 und ME09 eingeschlossen und wurden auf der Dialysestation MD01 des Universitätsklinikums Düsseldorf dialysiert. Nach schriftlicher und mündlicher Aufklärung wurde den Patienten unmittelbar vor Beginn der HD, zwei Stunden nach Beginn der HD und 24 Stunden nach der HD Blut entnommen.

2.1.2 Experimenteller Teil

Im experimentellen Teil dieser Arbeit wurde der Einfluss des Urämietoxins IS auf die Funktion humaner Plättchen untersucht. Hierzu wurde nach schriftlicher und mündlicher Aufklärung gesunden Probanden Blut entnommen und der Einfluss von IS auf die Plättchenfunktion mittels Lichttransmissionsaggregometrie (LTA) und Flußkammerversuchen evaluiert.

2.2 Patientenkollektiv

Einschlusskriterien für den klinisch-translationalen Teil waren:

- Niereninsuffizienz im Endstadium und Hämodialyse
- Koronare Herzkrankheit (1 bis 3 – Gefäßerkrankung)

- Alter \geq 18 Jahre
- einwilligungsfähig

Ausschlusskriterien für den klinisch-translationalen Teil waren:

- bewusstlose und nicht einwilligungsfähige Patienten
- jede Begleiterkrankung, die mit den geplanten Messungen an Thrombozyten interferieren könnte

Einschlusskriterien für Probanden für den experimentellen Teil waren:

- Alter \geq 18 Jahre
- einwilligungsfähig

Ausschlusskriterien für Probanden für den experimentellen Teil waren:

- bekannte Störung oder Erkrankung der Hämostase
- jede kardiovaskuläre Erkrankung
- Einnahme von Medikamenten innerhalb der vorausgehenden sieben Tage, welche potentiell die Thrombozytenfunktion verändern (insbes. Thrombozytenfunktionshemmer und NSAID-Analgetika).

Das gesamte Studiendesign ist an der Deklaration von Helsinki orientiert. Desweiteren ist die Studie durch die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf genehmigt (Studiennummer: 5506R)

Vor Blutentnahme wurde jeder Patient und Proband schriftlich und mündlich über die Blutentnahme aufgeklärt. Eine schriftliche Einverständniserklärung liegt von jedem Patienten und Probanden vor.

Angaben zu Patientencharakteristika wie Vorerkrankungen und Komedikation wurden den Arztbriefen des stationären Aufenthalts entnommen. Klassische Parameter die routinemäßig im Rahmen des stationären Aufenthalts bestimmt wurden (Hämoglobin, Zellzahlen, Herzenzyme, Entzündungsparameter, Nierenparameter, Leberparameter, Stoffwechselprofil) wurden im Zentrallabor des Universitätsklinikums Düsseldorf ermittelt (Zentralinstitut für klinische Chemie und Laboratoriumsdiagnostik).

2.3 Material

2.3.1 Substanzen

Substanz	Hersteller und Herkunftsort
Acetylsalicylsäure (ASS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Adenosin 5`-Diphosphat (ADP)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Arachidonsäure	Oxford Biomedical Research, Ox- ford/Michigan, USA
Aqua, dest. (Milli-Q)	Millipore-Anlage, innerhalb des Instituts
Bovines Serumalbumin (BSA)	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Calcein, AM	Thermo Fisher Scientific Inc., Wal- tham, Massachusetts, USA
CD41-FITC-Antikörper	Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland
CD62-PE-Antikörper	Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland
Dimethyl-Sulfoxide (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Dulbecco's phosphate buffered sa- line (PBS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Dulbecco's phosphate buffered sa- line (PBS) modified without calcium chloride and magnesium chloride	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Ethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
IgG-FITC-Antikörper	Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland
IgG-PE-Antikörper	Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland
Isoton II BD FACSTFlow	Beckman Coulter, Krefeld,

	Deutschland
Isotone Glucoselösung	BioTop Medical, Leiden, Niederlande
Kalium 3-Indoxylsulfat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Kollagen HORM®	Nycomed, Linz, Österreich
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Tirofiban	
TRAP-6	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Tris	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

2.3.2 Lösungen und Puffer

Alkoholische NaOH: Lösung von 100mM NaOH in Ethanol

Arachidonsäure (AA): Stammlösung 100mM in Ethanol. Gebrauchslösung: 100µl AA-Stammlösung + 100µl alkoholische NaOH. Anschließendes Versalzen unter N₂ und lichtgeschützte Lagerung bei -20°C. Lösung der Gebrauchslösung in 200µl Tris am Tag des Versuchs.

Acetylsalicylsäure-Stammlösung: 5mM Stammlösung ASS durch Lösen von 1,8mg ASS in 1ml TM. 1,5mM Gebrauchslösung ASS durch Verdünnen der Stammlösung 1:3,33 in TM. Daraus folgt bei einem Verdünnungsfaktor von 1:5 im Versuchsansatz eine Endkonzentration von 300µM. Für eine Endkonzentration von 100µM und 30µM im Ansatz wird die Gebrauchslösung weiter 1:3 oder 1:10 mit TM verdünnt.

Adenosindiphosphat (ADP)-Stammlösung: 10mM Stammlösung ADP durch Lösen von 4,27mg ADP in 1ml MilliQ. 500µM Gebrauchslösung durch Verdünnen der Stammlösung 1:40 in MilliQ. Daraus folgt bei einem Verdünnungsfaktor von 1:50 im Versuchsansatz eine Endkonzentration von 5µM.

Calcein: 4mM Stammlösung Calcein durch Lösen von 1mg Reinsubstanz in 250µl DMSO. Anschließendes aliquotieren der Stammlösung zu 25µl pro Aliquot, um die Aliquots frisch am Versuchstag aufzutauen.

Indoxylsulfat (IS)-Stammlösung: 25mM Arbeitslösung IS durch Lösen von 6,3mg IS in 1ml MilliQ. Daraus folgt bei einem Verdünnungsfaktor von 1:50 im Versuchsansatz eine Endkonzentration von 500µM. Für die Endkonzentrationen 250µM und 125µM wird die Arbeitslösung 1:2 bzw. 1:4 in MilliQ verdünnt.

Thrombozytenmedium-Puffer (pH=7,4):

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

2.4 Methoden

2.4.1 Probengewinnung und -aufbereitung

Zur Blutentnahme wurde entweder Vollblut aus der Dialyseeinheit mittels Punktionskanüle in Vacutainer® (BD Vacutainer® Systems, Plymouth, UK) aufgenommen oder mittels aseptischer Punktion aus einer peripheren Vene. Als Antikoagulanzen zur Hemmung der Gerinnung im Probenröhrchen dient Natriumcitrat 129 mM im Verhältnis von 1:10. Für die Lichttransmissionsaggregometrie und die Durchflusszytometrie wurde plättchenreiches Plasma (PRP) benötigt. Dazu wurde das Vollblut in den Vacutainern® bei 1200rpm für zehn Minuten zentrifugiert. Der anschließend entstandene Überstand entspricht dem PRP und wurde mittels einer 1000µl-Pipette (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) in ein 15ml-Zentrifugationsröhrchen (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland) überführt. Zur Gewinnung von plättchenarmen Plasma (PAP), welches der Ei-

chung des Aggregometers dient, wurden 500µl PRP bei 13200rpm für 5 Minuten in einem 1,5ml Reaktionsgefäß (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) zentrifugiert, sodass sich ein Zellpellet am Boden des Reaktionsgefäßes gebildet hat und der entstandene Überstand als PAP abpipettiert werden konnte.

2.4.2. Lichttransmissionsaggregometrie

Zur Bestimmung der Thrombozytenreaktivität wurde die Lichttransmissionsaggregometrie (LTA) nach Born angewandt⁶⁷. Für diese Messung wurde ein Aggregometer APACT 4004 (Labitec, Ahrensburg, Deutschland) verwendet. Mittels dieses Aggregometers lassen sich vier Versuchsansätze gleichzeitig messen. Grundlegendes Prinzip dieser Messmethode ist die Detektierung von Licht, welches durch die Probenküvette strahlt. Durch die Änderung der Dichte der Probe (PRP) durch die Aggregation der Thrombozyten ändert sich die Transmission des Lichtes. Anhand dieser Änderung berechnet das System die Thrombozytenaggregation und ermittelt diese als *maximum of aggregation* (MoA) in Prozent. Zu Beginn der Messung muss das Aggregometer mit PRP als Nullwert und PAP als 100%-Wert geeicht werden. Jeder Versuchsansatz besteht aus 200µl PRP und 50µl TM. Diese Proben werden in Küvetten für vier Minuten bei 37°C inkubiert und im Anschluss für weitere zwei Minuten bei 37°C zusätzlich mit Hilfe eines im System integrierten Magnetrührers (1000U/min) gerührt. Bei Minute sechs des Messdurchlaufs erfolgt die Hinzugabe der Stimuli zur Induktion der Thrombozytenaggregation. Hierzu wurden je 5µl AA, ADP und Kollagen genutzt. Von Minute sechs bis Minute zehn erfasst das Aggregometer die Dichteänderung der Probe und zeichnet diese in Form einer Aggregationskurve auf. Eine typische Aggregationskurve beginnt mit einem *shape change* der Thrombozyten. Dabei sinkt die Kurve kurzzeitig auf negative Werte, um anschließend in Abhängigkeit der Plättchenreaktivität anzusteigen. Eine typische Aggregationskurve ist in der folgenden Abbildung gezeigt. (s. Abb. 1)

Zur Evaluation des Einflusses von IS auf die Plättchenreaktivität mit und ohne ASS wurden die PRP-Proben vor Beginn der Aggregation mit 125µM, 250µM und 500µM IS für 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Für die Versuchsansätze, in denen zusätzlich ASS genutzt wurde, wurden die Proben für zehn Minuten mit 30µM,

100µM und 300µM ASS bei 37°C inkubiert und anschließend für 15 Minuten mit IS inkubiert.

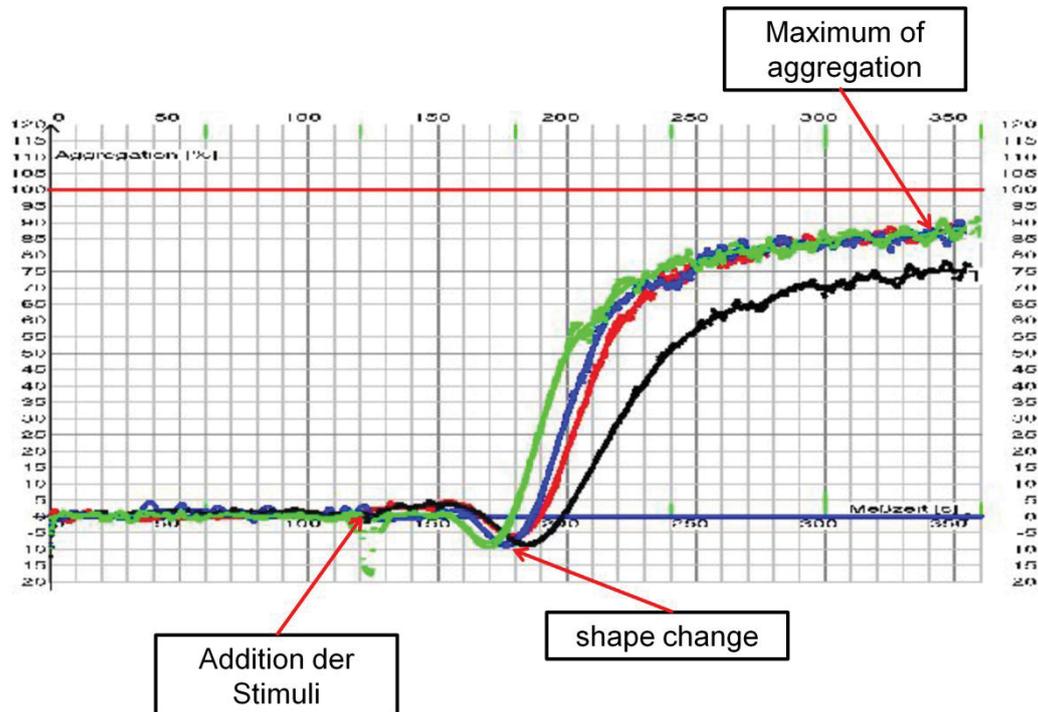


Abbildung 1: Typische, mit dem APACT 4004 Aggregometer, aufgenommene Aggregationskurven. Gezeigt sind der Zeitpunkt der Addition der Stimuli, der *shape change* und das *maximum of aggregation*.

2.4.3 Durchflusszytometrie (FACS)

Zur Evaluation der basalen Plättchenreaktivität wurde mittels *fluorescence activated cell sorting* (FACS) die Expression von P-Selectin (CD62) auf Thrombozyten gemessen. Diese Messungen wurden an einem Guava® easyCyte 5 (Merck, Darmstadt, Deutschland) Durchflusszytometer durchgeführt. Grundprinzip dieser Methode ist, dass Zellen in einer Suspension mit spezifischen fluoreszenzmarkierten Antikörpern (AK) gefärbt und anschließend einzeln durch eine Kapillare gesogen werden. Anschließend treffen Laserstrahlen verschiedener Wellenlängen auf die einzelnen Zellen und regen so die fluoreszenzmarkierten AK an, Licht zu emittieren. Dieses emittierte Licht wird gemessen und erlaubt die Quantifizierung der Expression der gefärbten Oberflächenmoleküle.

In dieser Arbeit wurde ein Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-markierter CD41-AK verwendet, um Thrombozyten zu identifizieren. Desweiteren wurde ein Phycoerythrin (PE)-markierter CD62-AK verwendet, um die Expression von P-Selectin zu quantifizieren. Als Negativkontrollen wurden entsprechende Isotypen für die angewandten Fluorochrome FITC und PE genutzt. Für die Messungen wurde wie bereits oben beschrieben PRP generiert. 5µl PRP wurden anschließend mit 1µl des CD41-AK und 5µl des CD62-AK für 15 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze mit je 500µl Isoton (Isoton II BD FACSTFlow, Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland) verdünnt. Diese Suspension wurde im folgenden Schritt in ein Messgefäß überführt und anschließend am Guava® easyCyte 5 gemessen. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der InCyte™ Software (Merck, Darmstadt, Deutschland) am Guava® easyCyte 5. Zellen, die sowohl CD41-positiv als auch CD62-positiv waren, wurden als P-Selectin-exprimierende Thrombozyten ermittelt. Die Quantifizierung erfolgte im prozentualen Anteil der P-Selectin-exprimierenden Thrombozyten im Vergleich zu allen Thrombozyten.

2.4.4 Flusskammerversuche

Für die Messung der Thrombozytenadhäsion wurde das BioFlux™ 200 (Fluxion Biosciences, Alameda, Kalifornien, USA) verwendet. Das BioFlux™ 200 ist ein Flusskammersystem bei dem über eine Pumpe ein veränderbarer Scherstress eingestellt werden kann, mit dem eine Probe durch ein Kapillarsystem fließt. Für die Evaluation der Thrombozytenadhäsion wurden *low shear*-Platten (BioFlux 200 48-well low-shear plate, Fluxion Biosciences, Alameda, Kalifornien, USA) verwendet. Diese Platten bestehen aus *inlet wells* und *outlet wells*, die über ein Kapillarsystem miteinander verbunden sind. Eine schematische Darstellung dieses Aufbaus wird in Abbildung 2 dargestellt.

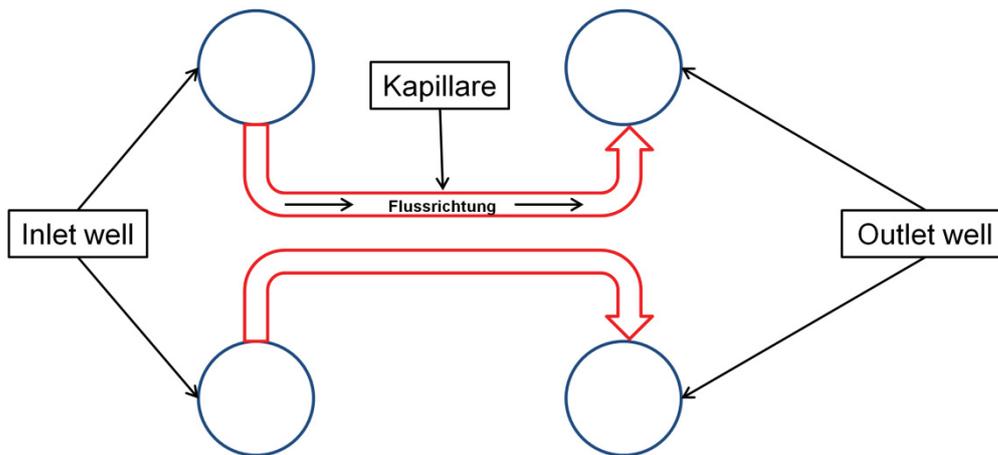


Abbildung 2: Schematische, vereinfachte Darstellung des Flusskammersystems.

Die Vorbereitung der Platten für die Messungen umfassen drei Schritte. Als Erstes wurde das Kapillarsystem mit Kollagen beschichtet. Dazu wurde eine Kollagenlösung (100µg/ml) 1:10 in einer Glucoselösung verdünnt. 50µl dieser Kollagenarbeitslösung werden in das *inlet well* pipettiert und mit einem Scherstress von 2 DYN/cm² durch das Kapillarsystem befördert, bis sich der innere Anteil des *outlet wells* unter mikroskopischer Kontrolle (Nikon Eclipse TE2000-U, Minato, Tokio, Japan) mit Flüssigkeit gefüllt hat. Anschließend wurde die Platte für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und die Kollagenlösung aus den *wells* mittels einer Pumpe abgesaugt. Die Beschichtung der Kapillare mit Kollagen dient als Stimulator für die Thrombozytenadhäsion. Der zweite Schritt umfasst das Waschen der Platte. Hierzu wurden 200µl *Dulbecco's phosphate buffered saline* (PBS) in das *inlet* und das *outlet well* gegeben und umgehend mit der Pumpe abgesaugt. Anschließend wurden 1000µl PBS in das *inlet well* gegeben und für zehn Minuten bei 5DYN/cm² durch das Kapillarsystem befördert. Anschließend wird die gesamte Flüssigkeit aus den *wells* abgesaugt.

Im letzten Schritt wurde die restliche Oberfläche der Kapillare, die bei der Beschichtung mit Kollagen frei geblieben ist geblockt. Hierzu wurde eine 0,5%ige Lösung von bovinem Serumalbumin (BSA) in PBS hergestellt und 1000µl in das *inlet well* gegeben. Diese Lösung wurde bei 5DYN/cm² für 15 Minuten durch die Kapillare gespült. Nach Ablauf der 15 Minuten wurde die Platte noch zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und konnte nun zur Messung verwendet werden.

Zur Vorbereitung der Proben wurde Blut in Citratröhrchen entnommen und in einer Verdünnung von 1:1000 mit 4mM Calceinlösung gefärbt. Diese Färbung wurde für 30 Minuten im Dunkeln inkubiert. Um den Einfluss von IS auf die Thrombozytenadhäsion zu untersuchen wurden die entsprechenden Proben 15 Minuten vor Beginn der Messung mit 125µM, 250µM und 500µM IS inkubiert. Desweiteren wurde einigen Proben ASS 20 Minuten vor Beginn der Messung hinzugefügt, um zu untersuchen, ob IS die Thrombozytenhemmung durch ASS entgegenwirkt. 500µl dieser Probe wurden nun in das *inlet well* pipettiert und für zehn Minuten bei 10DYN/cm² durch das Kapillarsystem gespült. Nach diesen zehn Minuten wurde das Blut aus den *wells* mit einer Pipette abgenommen und beide *wells* mehrfach mit PBS ohne Calcium und Magnesium gewaschen. Zum Abschluss wurden 500µl PBS in das *inlet well* gegeben und bei 5DYN/cm² unter mikroskopischer Kontrolle durch die Kapillare gespült, bis alle nicht-adhärenen Zellen aus den Kapillarsystem herausgespült wurden.

Zur Auswertung der Messungen wurden Bilder der Kapillare mit dem Nikon Eclipse TE2000-U Mikroskop und der NIS-Elements Imaging Software (Nikon, Minato, Tokio, Japan) aufgenommen. Durch die Färbung mit Calcein fluoreszieren die adhärenen Thrombozyten grün, sobald man sie mit einem grünen Laser bestrahlt. Die Auswertung der Bilder erfolgte über die BioFlux-Montage™ Software. Hierbei wurde bestimmt, welcher Anteil der Kapillare in Prozent von Thrombozyten bedeckt ist. Dabei würde eine komplett bedeckte Kapillare 100% entsprechend, während keine Adhäsion 0% entsprechen würde.

2.4.5 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) zur Messung von Indoxylsulfat

Um die Plasmaspiegel von IS bei den eingeschlossenen Patienten zu messen, wurde ein Enzyme-linked Immunosorbent Assays (ELISA) verwendet. Das humane IS ELISA Kit (MyBioSource, San Diego, Kalifornien, USA) wurde der beigelegten Anleitung entsprechend durchgeführt. Zur Generierung von Plasma wurde Vollblut für zehn Minuten bei 3000rpm zentrifugiert, abgehoben und in einem 1,5ml Reaktionsgefäß bei -80°C bis zur Messung gelagert. Vor Benutzung der Materialien wurden alle Materialien und Proben auf Raumtemperatur erhitzt. Je 50µl der Standardlösungen wurden für die Ermittlung einer Standardreihe benutzt. Für die Messung der Proben wurden ebenfalls je 50µl pro Probe verwen-

det. Nachdem 50µl jeder Probe in je ein *well* pipettiert wurden, wurden weitere 100µl HRP-konjugiertes Reagenz zu jedem *well* hinzugefügt. Anschließend wurde die Platte für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Nachfolgend erfolgten vier Waschschritte, um die nicht gebundenen Substanzen zu entfernen. Im nachfolgenden Schritt wurde erst 50µl der Chromogen Lösung A und dann 50µl der Chromogen Lösung B zu den *wells* hinzugefügt und für 15 Minuten im Dunkeln bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die chemische Reaktion durch Addition von 50µl Stopplösung gestoppt und die optische Dichte mittels FLUOstar® Omega Microplate Reader (BMG LABTECH GmbH, Ortenberg, Deutschland) ausgelesen. Anhand der Standardreihe wurden über die MARS Datenanalyse Software (BMG LABTECH GmbH, Ortenberg, Deutschland) die Messergebnisse der Proben berechnet.

2.5 Statistische Analyse

Zur statistischen Analyse der erhobenen Daten wurden die Programme GraphPad Prism® (GraphPad Software Inc., San Diego, Kalifornien, USA) und IBM SPSS® (New York, USA) genutzt. Die Prüfung der Normalverteilung erfolgte mittels Histogrammen, Q-Q-Plots und dem Kolmogorov-Smirnov-Tests. Gepaarte t-Tests wurden für die Analyse normalverteilter Daten genutzt, während nicht-normalverteilte Daten mittel Wilcoxon matched paris test analysiert wurden. Ein Chi²-Test wurde genutzt, um die Verteilung eines bestimmten Merkmals zu analysieren und Korrelationen wurden mit Hilfe der Pearson-Korrelation analysiert. P-Werte <0.05 wurden als statistisch signifikant erachtet.

3 Ergebnisse

3.1. Patientencharakteristika

Die eingeschlossenen Patienten repräsentieren ein typisches kardiologisches Patientenkollektiv. Das mittlere Alter betrug 69.8 ± 9.7 Jahre, 15 (68.2%) waren männlich und der mittlere Body Mass Index (BMI) lag bei 26.4 ± 4.9 . 16 (72.7%) Patienten zeigten eine arterielle Hypertonie, elf (50%) einen Diabetes Mellitus, vier (18.2%) waren übergewichtig mit einem BMI >30 und sechs (27.3%) waren Raucher. An Vorerkrankungen bestanden bei zehn (45.5%) Patienten ein stattgehabter Myokardinfarkt, bei 15 (68.2%) eine perkutane Koronarintervention (PCI) und fünf (22.7%) Patienten hatten bereits einen coronar-arteriellen Bypass.

Charakteristika	total n=22
Alter - Jahre (mean \pm SD)	69.8 \pm 9.7
männlich – no (%)	15 (68.2%)
Body mass index (mean \pm SD)	26.4 \pm 4.9
Kardiovaskuläre Risikofaktoren – no. (%)	
Arterielle Hypertonie	16 (72.7%)
Diabetes mellitus	11 (50%)
Adipositas (BMI >30)	4 (18.2%)
Raucher	6 (27.3%)
Kardiovaskuläre Krankheitsgeschichte – no. (%)	
Z.n. Myokardinfarkt	10 (45.5%)
Z.n. PCI	15 (68.2%)
Z.n. CABG	5 (22.7%)
Z.n. Stroke	0 (0%)

Tabelle 2: Allgemeine Charakteristika, kardiovaskuläre Risikofaktoren und kardiovaskuläre Krankheitsgeschichte der eingeschlossenen Patienten. (SD = standard deviation, BMI = body mass index, Z.n. = Zustand nach, PCI = percutaneous coronary intervention = perkutane Koronarintervention, CABG = coronary artery bypass graft = coronar-arterieller Bypass)

Klinisch präsentierten sich fünf (22.7%) Patienten mit einer Eingefäß-KHK, zwei (9.1%) mit einer Zweigefäß-KHK und 15 (68.2%) mit einer Dreigefäß-KHK. Bezüglich pektanginöser Beschwerden präsentierten sich zwei (9.1%) Patienten mit Symptomatik bei schwerer körperlicher Belastung (Canadian Cardiovascular Society = CCS 1), zwei (9.1%) Patienten mit Beschwerden bei moderater körperlicher Belastung (CCS 2), ein (4.5%) Patient mit Beschwerden bei leichter körperlicher Belastung und ein (4.5%) Patient mit pektanginösen Ruhebeschwerden (CCS 4). Acht (36.4%) der Patienten präsentierten sich mit einer Herzinsuffizienz Stadium NYHA I, vier (18.2%) Patienten mit NYHA II, acht (36.4%) Patienten mit NYHA III und zwei (9.1%) der Patienten mit NYHA IV. Echokardiographisch zeigte sich bei sieben (31.8%) der Patienten eine linkventrikuläre Ejektionsfraktion (LVEF) unter 45%, bei vier (18.2%) Patienten sogar eine LVEF kleiner 30%. Die restlichen elf (50%) Patienten zeigten keine eingeschränkte LVEF.

Klinische Präsentation – no. (%)

Koronare Herzkrankheit

Eingefäß	5 (22.7%)
Zweigefäß	2 (9.1%)
Dreigefäß	15 (68.2%)
CCS-Score	
CCS 0	16 (72.7%)
CCS 1	2 (9.1%)
CCS 2	2 (9.1%)
CCS 3	1 (4.5%)
CCS 4	1 (4.5%)
NYHA-Stadium	
NYHA I	8 (36.4%)
NYHA II	4 (18.2%)
NYHA III	8 (36.4%)
NYHA IV	2 (9.1%)

LV-EF <45%	7 (31.8%)
LV-EF <30%	4 (18.2%)

Tabelle 3: Klinische Präsentation der eingeschlossenen Patienten. (CCS = Canadian Cardiovascular Society, NYHA = New York Heart Association, LV-EF = linksventrikuläre Ejektionsfraktion)

Bei Einschluss in die Studie zeigte sich bei den Patienten eine typische kardiologische Medikation, die den bestehenden Komorbiditäten entsprach. Wie zu erwarten erhielten alle 22 (100%) Patienten ASS, zusätzlich erhielten sieben (31.8%) weitere Patienten einen P2Y12-Inhibitor zur dualen Antiplättchentherapie (DAPT). Die weitere Medikation ist in Tabelle 4 dargestellt.

Komedikation – no. (%)

AT-II-Rezeptor-Inhibitor	3 (13.6%)
ACE- Inhibitor	9 (40.9%)
ASS	22 (100%)
P2Y12-inhibitor	7 (31.8%)
VKA	2 (9.1%)
Beta-Blocker	17 (77.3%)
Calcium-Antagonist	10 (45.5%)
Diuretika	20 (90.9%)
Statine	15 (68.2%)
Oral Antidiabetika	1 (4.5%)
Insulin	4 (18.2%)
PPI	21 (95.5%)
NMH	3 (13.6%)
UFH	6 (27.3%)
Metamizol	3 (13.6%)
Opioide	6 (27.3%)

Tabelle 4: Komedikation der Patienten. (AT = Angiotensin, ACE = Angiotensin-converting enzyme, ASS = Acetylsalicylsäure, VKA = Vitamin K-Antagonist, PPI = Protonenpumpen-Inhibitor, NHM = niedermolekulares Heparin, UFH = unfraktioniertes Heparin)

Im Aufnahmelabor der Patienten zeigte sich ein verminderter Hämoglobinwert von 10.3 ± 1.9 g/dl und ein verminderter Hämatokrit von 32.4 ± 5.6 %. In Bezug auf die Niereninsuffizienz der Patienten zeigte sich ein mittleres Kreatinin von 4.75 ± 2.91 mg/dl, ein mittlerer Harnstoff von 94.63 ± 60.73 mg/dl und eine mittlere GFR von 19.7 ± 9.3 ml/min. Die weiteren Parameter des Aufnahmelabors sind in Tabelle 5 gezeigt.

Laborwerte – (mean \pm SD)

Hb [g/dl]	10.3 ± 1.9
Hkt [%]	32.4 ± 5.6
Thrombozyten [x1000/ μ l]	254.6 ± 103.5
Leukozyten [x1000/ μ l]	9.2 ± 3.2
Triglyceride [md/dl]	124.4 ± 61.5
LDL [mg/dl]	65.7 ± 24.6
HDL [mg/dl]	39.4 ± 17.4
HbA1c [%]	5.5 ± 1.1
CRP [mg/dl]	5.1 ± 6.7
Procalcitonin [ng/ml]	42.5 ± 29
CK [U/l]	155.6 ± 244.4
Kreatinin [mg/dl]	4.75 ± 2.91
Harnstoff [mg/dl]	94.63 ± 60.73
GFR [ml/min]	19.7 ± 9.3
Harnsäure [mg/dl]	5.8 ± 3.3
GOT [U/l]	27.2 ± 14.9
GPT [U/l]	29.2 ± 56.4

AP [U/l]	104.5 ± 29.5
Na [mmol/l]	137.4 ± 4
K [mmol/l]	4.8 ± 0.9
Cl [mmol/l]	101.1 ± 5.3
Ca [mmol/l]	1.9 ± 0.4
PO ₄ ³⁻ [mmol/l]	1.6 ± 0.9

Tabelle 5: Laborwerte zum Zeitpunkt der Aufnahme der eingeschlossenen Patienten. (SD = standard deviation, Hb = Hämoglobin, Hkt = Hämatokrit, LDL = low density lipoprotein, HDL = high density lipoprotein, HbA1c = glykiertes Hämoglobin, CRP = C-reaktives Protein, CK = Creatinkinase, GFR = glomeruläre Filtrationsrate, GOT = Glutamat-Oxalacetat-Transaminase, GPT = Glutamat-Pyruvat-Transaminase, AP = alkalische Phosphatase, Na = Natrium, K = Kalium, Cl = Chlorid, Ca = Calcium, PO₄³⁻ = Phosphat)

Die mittlere Zeit, seit der die Patienten dialysepflichtig sind, beträgt 41.4 ± 91.8 Monate. Sieben (31.8%) der Patienten hatten als Gefäßzugang für die Hämodialyse einen Brescia-Cimino-Shunt, während die anderen 15 (68.2%) einen zentralen Venenkatheter (Demers-Katheter) hatten. Ätiologisch basiert die terminale Niereninsuffizienz bei sieben (31.8%) der Patienten auf einer diabetischen Nephropathie, bei fünf (22.7%) auf einer hypertensiven Nephropathie und bei acht (36.4%) Patienten ist die Ätiologie ungeklärt. Die Auswertung der Blutgasanalyse, die zu Beginn der Hämodialyse durchgeführt wurde, findet sich in Tabelle 6.

Zeit seit Dialysepflichtigkeit (mean ± SD)	41.4 ± 91.8 Monate
Gefäßzugang – no (%)	total n=22
Brescia-Cimino-Shunt	7 (31.8%)
Demers-Katheter	15 (68.2%)
Venöse Blutgasanalyse – (mean ± SD)	
pH	7.4 ± 0.1
pCO ₂ [mmHg]	40.43 ± 6.8
pO ₂ [mmHg]	55.75 ± 23.5
Hb [g/dl]	9.2 ± 1.6

sO ₂ [%]	78.1 ± 16.5
BE [mmol/l]	0.02 ± 3
HCO ₃ ⁻ [mmol/l]	24.2 ± 2.5
Ätiologie der terminalen Niereninsuffizienz – (mean ± SD)	
Ungeklärte Genese	8 (36.4%)
Diabetische Nephropathie	7 (31.8%)
Hypertensive Nephropathie	5 (22.7%)
Alport-Syndrom	1 (4.5%)
MCGN	1 (4.5%)

Tabelle 6: Details bezüglich der Hämodialyse. (SD = standard deviation, pCO₂ = CO₂-Partialdruck, pO₂ = Sauerstoffpartialdruck, Hb = Hämoglobin, sO₂ = Sauerstoffsättigung, BE = Base Excess, HCO₃⁻ = Hydrogencarbonat, MCGN = minimal change Glomerulonephritis)

3.2 Ergebnisse der LTA im Patientenkollektiv

Zur Bestimmung der Plättchenreaktivität wurde vor, während und 24 Stunden nach HD eine LTA mit verschiedenen Stimuli durchgeführt. In der AA-induzierten Aggregation zeigte sich ein signifikanter Abfall zwischen vor und 24 Stunden nach der HD (MoA_{pre} : 27.36% \pm 25.23% vs. MoA_{post} : 19.94% \pm 21.83%, $p=0.031$). 24 Stunden nach HD war die AA-induzierte Aggregation ebenfalls signifikant geringer als während der HD ($\text{MoA}_{\text{during}}$: 28.05% \pm 23.5% vs. MoA_{post} : 19.94% \pm 21.83%, $p=0.042$). Vor und während der HD unterschied sich die AA-induzierte Aggregation nicht (MoA_{pre} : 27.36% \pm 25.23% vs. $\text{MoA}_{\text{during}}$: 28.05% \pm 23.5%, $p=0.822$).

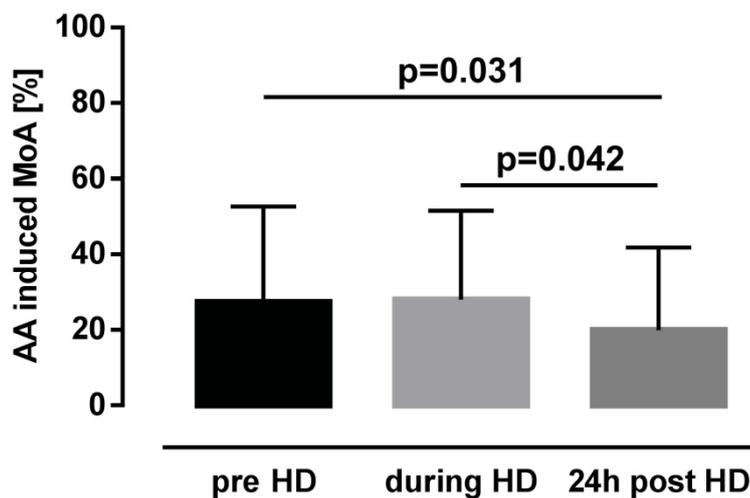


Abbildung 3: Arachidonsäure-induzierte Aggregation vor, während und 24 Stunden nach Hämodialyse. (AA = Arachidonsäure, MoA = maximum of aggregation, HD = Hämodialyse)

In der ADP-induzierten Aggregation zeigte sich ein signifikanter Abfall zwischen vor und 24 Stunden nach HD (MoA_{pre} : 65.36 % \pm 12.88% vs. MoA_{post} : 60.28% \pm 15.13%, $p=0.043$). Zwischen den Zeitpunkten vor und während der HD zeigte sich ein leichter Trend zu einer geringeren ADP-induzierten Aggregation während der HD (MoA_{pre} : 65.36 % \pm 12.88% vs. $\text{MoA}_{\text{during}}$: 61.55% \pm 17.17%, $p=0.089$). Zwischen den Zeitpunkten während und 24 Stunden nach der HD bestand kein signifikanter Unterschied ($\text{MoA}_{\text{during}}$: 61.55% \pm 17.17% vs. MoA_{post} : 60.28% \pm 15.13%, $p=0.486$).

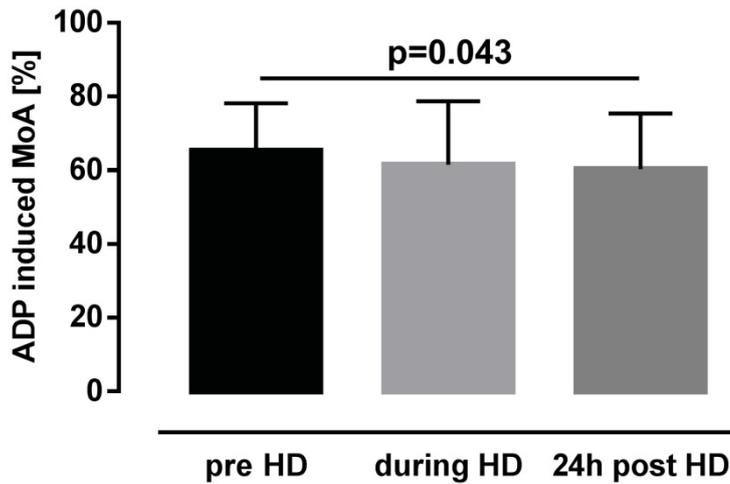


Abbildung 4: Adenosindiphosphat-induzierte Aggregation vor, während und 24 Stunden nach Hämodialyse. (ADP = Adenosindiphosphat, MoA = maximum of aggregation, HD = Hämodialyse)

In der Kollagen-induzierten Aggregation zeigte sich zwischen keinem der drei Messzeitpunkte ein signifikanter Unterschied. (MoA_{pre}: 62.18 % ± 18.14% vs. MoA_{post}: 61.17% ± 18.34%, p=0.91. MoA_{pre}: 62.18 % ± 18.14% vs. MoA_{during}: 64.82% ± 18.31%, p=0.375. MoA_{during}: 64.82% ± 18.31% vs. MoA_{post}: 61.17% ± 18.34%, p=0.329).

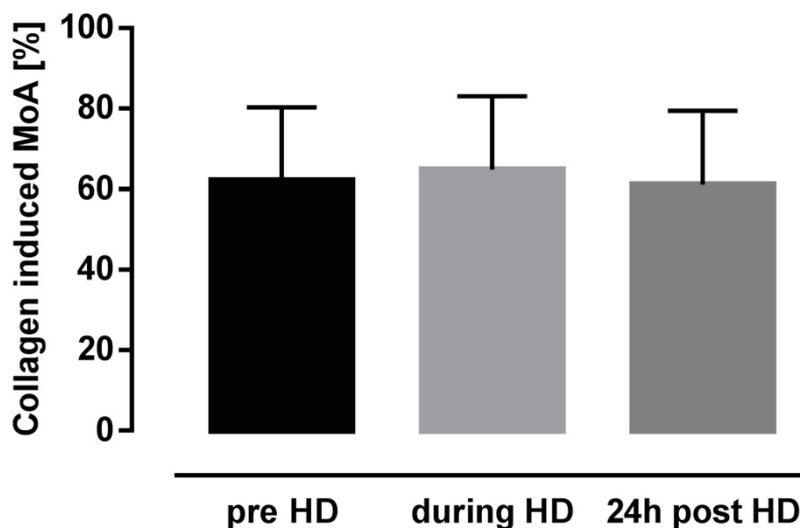


Abbildung 5: Kollagen-induzierte Aggregation vor, während und 24 Stunden nach Hämodialyse. (MoA = maximum of aggregation, HD = Hämodialyse)

3.3 Ergebnisse der Durchflusszytometrie im Patientenkollektiv

In der durchflusszytometrischen Messung der Oberflächenexpression von P-Selectin auf Thrombozyten zeigte sich ein signifikanter Abfall der Expression zwischen den Zeitpunkten vor und während der HD (CD62P_{pre}: 31.56% ± 18.99% vs. CD62P_{during}: 23.97% ± 15.28%, p=0.026). Die Expression von P-Selectin war 24 Stunden nach der HD ebenfalls signifikant geringer als vor der HD (CD62P_{pre}: 31.56% ± 18.99% vs. CD62P_{post}: 24.72% ± 16.15%, p=0.024). Während und 24 Stunden nach der HD unterschied sich die Expression von P-Selectin nicht (CD62P_{during}: 23.97% ± 15.28% vs. CD62P_{post}: 24.72% ± 16.15%, p=0.724).

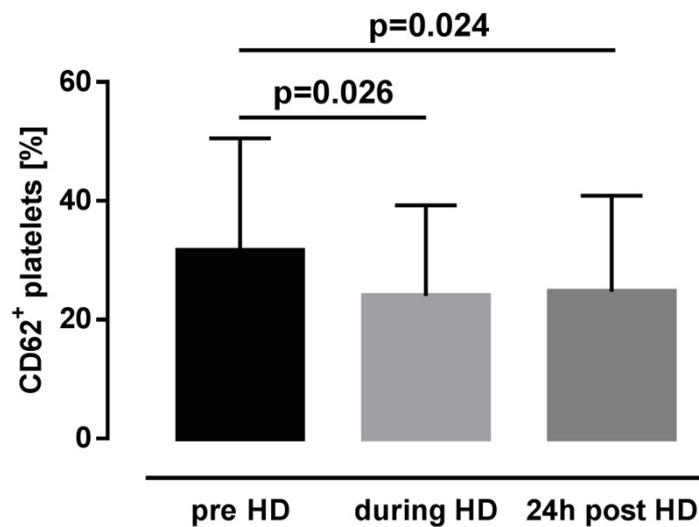


Abbildung 6: Durchflusszytometrisch bestimmter Anteil an P-Selectin-exprimierenden Thrombozyten vor, während und 24 Stunden nach Hämodialyse. (CD62 = P-Selectin, HD = Hämodialyse)

3.4 HTPR im Patientenkollektiv

Der Anteil an Patienten, die eine HTPR gegenüber ASS zeigen, ist signifikant unterschiedlich zwischen den Zeitpunkten. Vor der HD haben zwölf (54%) und während der HD zehn (46%) Patienten eine HTPR gegenüber ASS. 24 Stunden nach HD dagegen ist der Anteil an Patienten mit HTPR auf vier (18%) gesunken. Dieser Unterschied ist signifikant im Chi² mit p=0.0369.

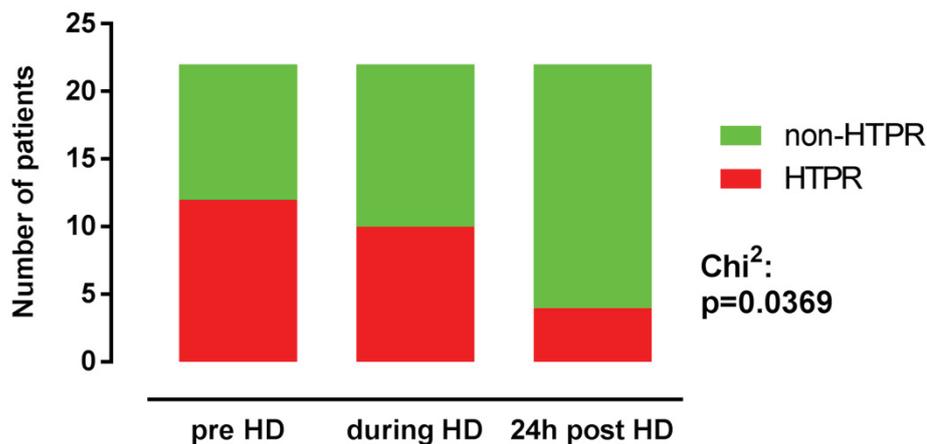


Abbildung 7: Anzahl der Patienten mit einer HTPR (rot) bzw. ohne HTPR (grün) vor während und 24 Stunden nach Hämodialyse. (HD = Hämodialyse, HTPR = high on-treatment platelet reactivity)

3.5 IS-Spiegel im Patientenkollektiv

Die mittels ELISA gemessenen Plasmaspiegel von IS waren 24 Stunden nach HD signifikant geringer als vor HD (IS_{pre} : 6.186 µg/ml ± 3.4 µg/ml vs. IS_{post} : 4.192 µg/ml ± 2.878 µg/ml, p=0.014) und während der HD (IS_{during} : 7.184 µg/ml ± 3.546 µg/ml vs. IS_{post} : 4.192 µg/ml ± 2.878 µg/ml, p=0.026). Die gemessenen IS-Spiegel vor und während der HD unterschieden sich nicht signifikant (IS_{pre} : 6.186 µg/ml ± 3.4 µg/ml vs. IS_{during} : 7.184 µg/ml ± 3.546 µg/ml, p=0.354). Desweiteren zeigte sich eine signifikante Korrelation zwischen gemessenen IS-Spiegeln und der AA-induzierten Aggregation (r=0.3216, R²=0.1034, p=0.0333).

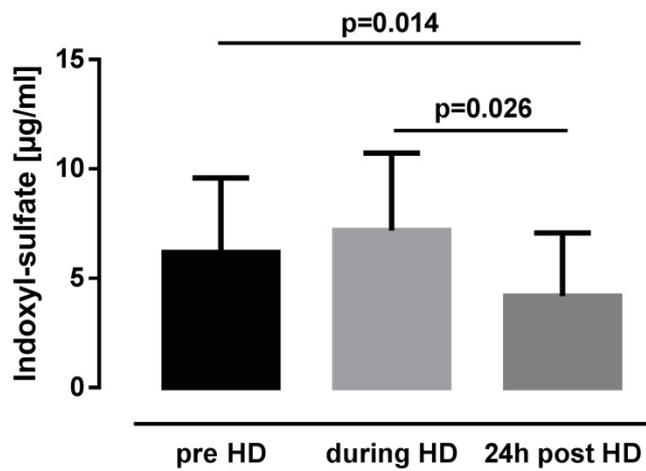


Abbildung 8: Indoxylsulfat-Plasmaspiegel vor, während und 24 Stunden nach HD. (HD = Hämodialyse)

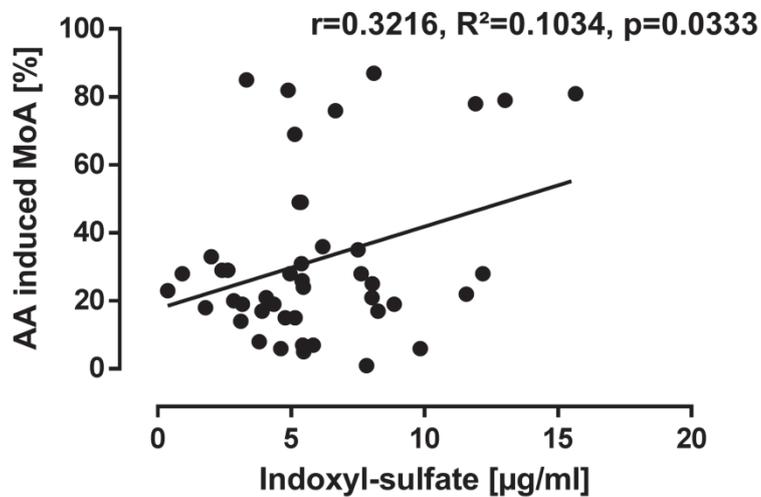


Abbildung 9: Pearson-Korrelation zwischen den gemessenen Indoxylsulfat-Spiegeln und der Arachidonsäure-induzierten Aggregation. (AA = Arachidonsäure, MoA = maximum of aggregation)

3.6 Einfluss von IS auf die Plättchenreaktivität

In *in-vitro* Untersuchungen mit dem Blut gesunder Probanden wurde der Einfluss von IS auf die Plättchenaggregation untersucht. IS erhöht in den Konzentrationen 125µM (MoA_{Con}: 50.28% ± 39.29% vs. MoA_{IS125}: 71.85% ± 28.3%, p=0.032), 250µM (MoA_{Con}: 50.28% ± 39.29% vs. MoA_{IS250}: 77.72% ± 22.24%, p=0.015) und 500µM (MoA_{Con}: 50.28% ± 39.29% vs. MoA_{IS500}: 77.29% ± 22.51%, p=0.015) signifikant die AA-induzierte Plättchenaggregation.

In der ADP-induzierten Aggregation zeigte sich ein signifikanter Anstieg der Aggregation nach Vorinkubation mit 500µM IS (MoA_{Con}: 61.1% ± 22.32% vs. MoA_{IS500}: 77.4% ± 11.89%, p=0.017). Sowohl nach einer Vorinkubation mit 125µM IS (MoA_{Con}: 61.1% ± 22.32% vs. MoA_{IS125}: 70.2% ± 21.96, p=0.112) als auch mit 250µM IS (MoA_{Con}: 61.1% ± 22.32% vs. MoA_{IS250}: 67.04% ± 21.92%, p=0.201) zeigte sich ein Anstieg der Aggregation, der jedoch keine statistische Signifikanz erreicht.

Eine Vorinkubation mit 500µM IS erhöhte ebenfalls signifikant die Kollagen-induzierte Aggregation (MoA_{Con}: 64.17% ± 29.23% vs. MoA_{IS500}: 80.93% ± 10.52%, p=0.041), während 125µM IS (MoA_{Con}: 64.17% ± 29.23% vs. MoA_{IS125}: 73.71% ± 27.59, p=0.15) und 250µM IS (MoA_{Con}: 64.17% ± 29.23% vs. MoA_{IS250}: 80.02% ± 11.88%, p=0.155) ebenfalls einen Trend zeigten, die Kollagen-induzierte Aggregation zu steigern, dieser jedoch nicht statistisch signifikant war.

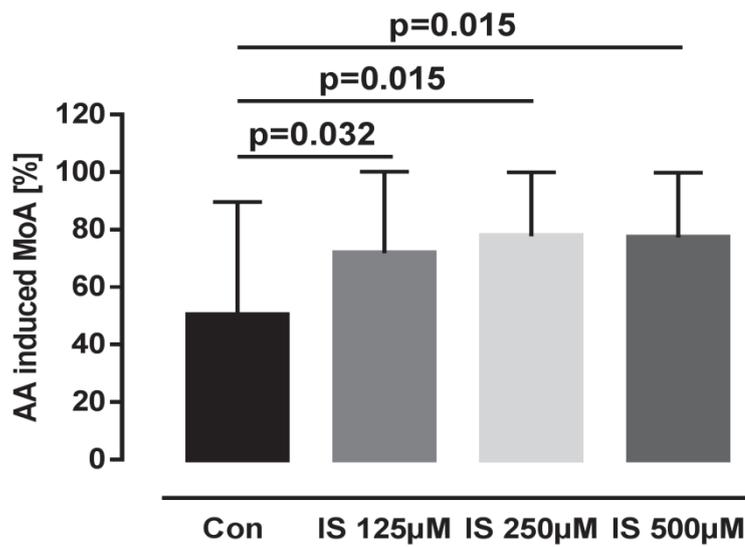


Abbildung 10: Einfluss von verschiedenen Konzentrationen Indoxylsulfat auf die Arachidonsäure-induzierte Aggregation bei Plättchen gesunder Probanden. (AA = Arachidonsäure, MoA = maximum of aggregation, Con = Kontrolle, IS = Indoxylsulfat, µM = Mikromolar)

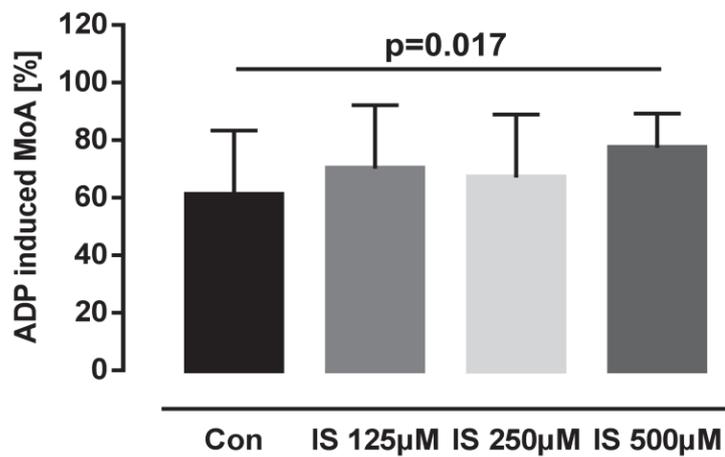


Abbildung 11: Einfluss von verschiedenen Konzentrationen Indoxylsulfat auf die Adenosindiphosphat-induzierte Aggregation bei Plättchen gesunder Probanden. (ADP = Adenosindiphosphat, MoA = maximum of aggregation, Con = Kontrolle, IS = Indoxylsulfat, µM = Mikromolar)

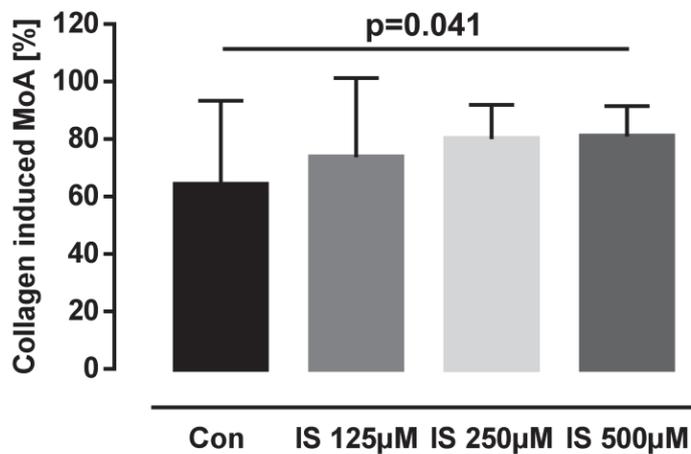


Abbildung 12: Einfluss von verschiedenen Konzentrationen Indoxylsulfat auf die Kollagen-induzierte Aggregation bei Plättchen gesunder Probanden. (MoA = maximum of aggregation, Con = Kontrolle, IS = Indoxylsulfat, µM = Mikromolar)

IS erhöht konzentrationsabhängig die AA-induzierte Aggregation bei Plättchen gesunder Probanden, die *in-vitro* mit 30µM ASS vorbehandelt wurden. 125µM IS erhöhte die AA-induzierte Aggregation nicht signifikant (MoA_{Con}: 30.41% ± 39.03% vs. MoA_{IS125}: 53.72% ± 39.75%, p=0.109). Eine Vorinkubation mit 250µM IS (MoA_{Con}: 30.41% ± 39.03% vs. MoA_{IS250}: 60.27% ± 31.69%, p=0.049) und 500µM (MoA_{Con}: 30.41% ± 39.03% vs. MoA_{IS500}: 76.78% ± 10.15%, p=0.009) erhöhten die AA-induzierte trotz Vorbehandlung mit 30µM ASS signifikant.

Nach *in-vitro* Behandlung der Plättchen mit 100µM ASS zeigte sich eine signifikante Steigerung der AA-induzierten Aggregation bei allen Konzentrationen an IS im Vergleich zur Kontrolle (MoA_{Con}: 14.98% ± 25.45% vs. MoA_{IS125}: 39.04% ± 39.26%, p=0.037. MoA_{Con}: 14.98% ± 25.45% vs. MoA_{IS250}: 40.35% ± 38.38%, p=0.032. MoA_{Con}: 14.98% ± 25.45% vs. MoA_{IS500}: 41.18% ± 32.82%, p=0.009.).

Im dritten Versuchsansatz, in dem die Plättchen mit einer Dosis von 300µM ASS vorbehandelt wurden zeigte sich zwischen der Kontrolle und den Plättchen, die mit 125µM IS inkubiert wurden (MoA_{Con}: 7.38% ± 3.36% vs. MoA_{IS125}: 7.1% ± 3.67%, p=0.829) sowie zwischen der Kontrolle und den mit 250µM IS behandelten Plättchen (MoA_{Con}: 7.38% ± 3.36% vs. MoA_{IS250}: 9.65% ± 5.16%, p=0.266)

kein signifikanter Unterschied in der AA-induzierten Aggregation. Die Plättchen, die mit 500µM IS vorinkubiert wurden zeigten eine signifikant erhöhte AA-induzierte Aggregation im Vergleich zur Kontrolle (MoA_{Con} : 7.38% ± 3.36% vs. MoA_{IS500} : 20.55% ± 16.28%, $p=0.048$).

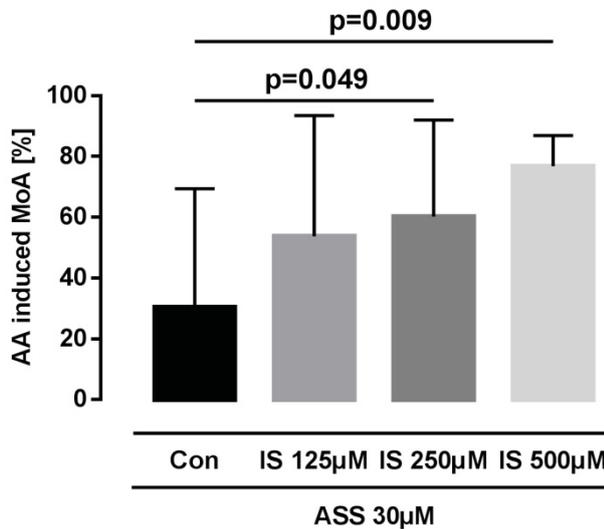


Abbildung 13: Einfluss von verschiedenen Konzentrationen Indoxylsulfat auf die Arachidonsäure-induzierte Plättchenaggregation gesunder Probanden nach *in-vitro* Vorbehandlung der Plättchen mit 30µM Acetylsalicylsäure. (AA = Arachidonsäure, MoA = maximum of aggregation, ASS = Acetylsalicylsäure, Con = Kontrolle, µM = Mikromolar)

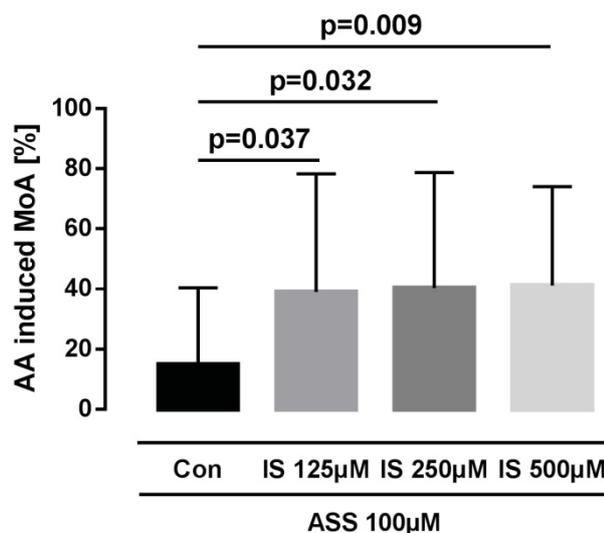


Abbildung 14: Einfluss von verschiedenen Konzentrationen Indoxylsulfat auf die Arachidonsäure-induzierte Plättchenaggregation gesunder Probanden nach *in-vitro* Vor-

behandlung der Plättchen mit 100µM Acetylsalicylsäure. (AA = Arachidonsäure, MoA = maximum of aggregation, ASS = Acetylsalicylsäure, Con = Kontrolle, µM = Mikromolar)

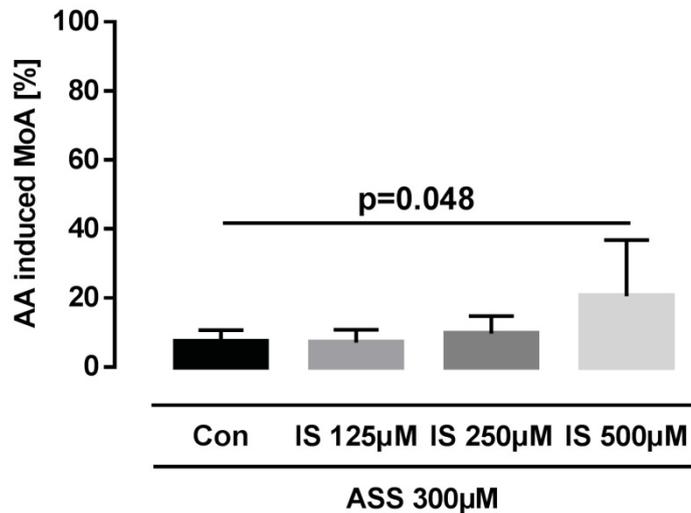


Abbildung 15: Einfluss von verschiedenen Konzentrationen Indoxylsulfat auf die Arachidonsäure-induzierte Plättchenaggregation gesunder Probanden nach *in-vitro* Vorbehandlung der Plättchen mit 300µM Acetylsalicylsäure. (AA = Arachidonsäure, MoA = maximum of aggregation, ASS = Acetylsalicylsäure, Con = Kontrolle, µM = Mikromolar)

3.7 Einfluss von IS auf die Plättchenadhäsion

Indoxylsulfat erhöht konzentrationsabhängig die in der Flusskammer gemessene Plättchenadhäsion. Nach einer Inkubation mit 125µM IS zeigt sich eine nicht signifikante Steigerung der Adhäsion im Vergleich zur Kontrolle ($Area_{Con}: 18.31\% \pm 13.98\%$ vs. $Area_{IS125}: 35.45\% \pm 28.1\%$, $p=0.169$). Nach Inkubation mit 250µM IS war die Adhäsion signifikant höher als in der Kontrolle ($Area_{Con}: 18.31\% \pm 13.98\%$ vs. $Area_{IS250}: 48.24\% \pm 20.02\%$, $p=0.015$) und nach Inkubation mit 500µM IS zeigte sich ebenfalls eine signifikante Steigerung der Plättchenadhäsion ($Area_{Con}: 18.31\% \pm 13.98\%$ vs. $Area_{IS500}: 61.31\% \pm 24.23\%$, $p=0.026$).

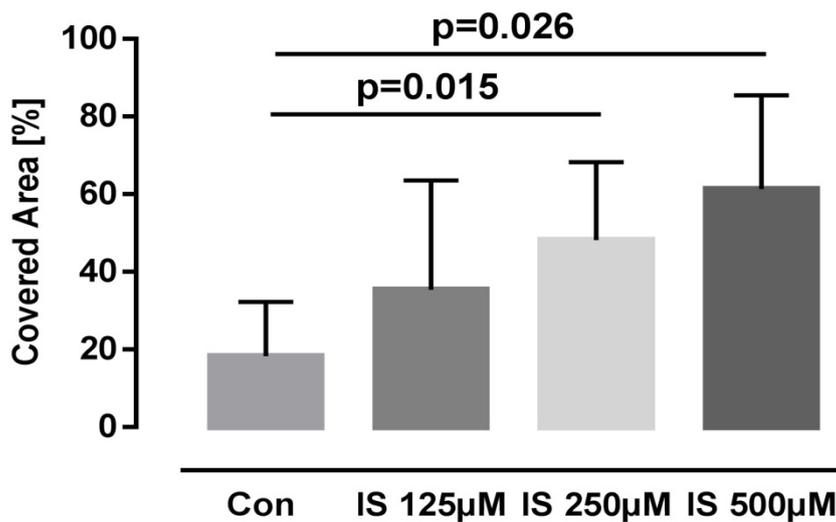


Abbildung 16: Einfluss verschiedener Konzentrationen Indoxylsulfat auf die Plättchenadhäsion gesunder Probanden. (Con = Kontrolle, IS = Indoxylsulfat, µM = Mikromolar)

Der gleiche Versuchsaufbau wurde ebenfalls mit Plättchen gesunder Probanden durchgeführt, die *in-vitro* mit ASS behandelt wurden. Hierbei zeigte sich eine signifikant höhere Adhäsion im Vergleich zur Kontrolle nach Inkubation mit 125µM IS (Area_{Con}: 16.78% ± 20.59% vs. Area_{IS125}: 40.1% ± 29.34%, p=0.017), 250µM IS (Area_{Con}: 16.78% ± 20.59% vs. Area_{IS250}: 34.49% ± 20.26%, p=0.026) und 500µM IS (Area_{Con}: 16.78% ± 20.59% vs. Area_{IS500}: 37.71% ± 27.93%, p=0.009).

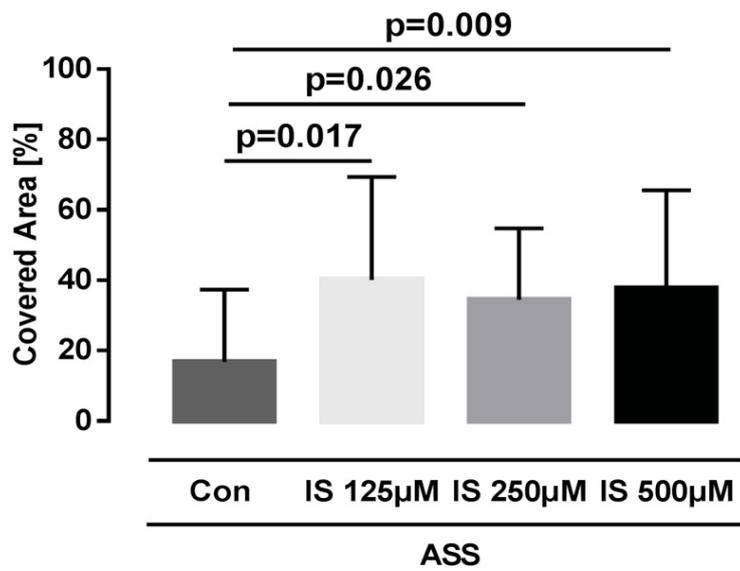


Abbildung 17: Einfluss verschiedener Konzentrationen Indoxylsulfat auf die Plättchenadhäsion gesunder Probanden nach *in-vitro* Behandlung mit Acetylsalicylsäure. (ASS = Acetylsalicylsäure, Con = Kontrolle, IS = Indoxylsulfat, µM = Mikromolar)

4 Diskussion

4.1 Plättchenfunktion bei Patienten mit CKD und HD

Die CKD ist ein wichtiger Risikofaktor für eine KHK⁶⁸ und kardiovaskuläre Ereignisse wie den akuten Myokardinfarkt⁶⁹. Dabei steigt das Risiko an einem kardiovaskulären Tod zu versterben mit abnehmender Nierenfunktion an⁷⁰. Dementsprechend sind insbesondere dialysepflichtige Patienten von einem hohen kardiovaskulären Risiko betroffen. Auf Grund der hohen Prävalenz einer eingeschränkten Nierenfunktion⁵¹⁻⁵³ ist es von entscheidender Bedeutung die Pathophysiologie der hohen kardiovaskulären Mortalität bei Patienten mit CKD zu verstehen und potenzielle therapeutische Ansätze zu entwickeln.

Blutplättchen sind entscheidend an der Pathogenese kardiovaskulärer Ereignisse beteiligt³⁰. Daher ist es wenig überraschend, dass eine gesteigerte Plättchenreaktivität mit einer erhöhten Rate an ischämischen Ereignissen einhergeht^{71, 72}. Bei Patienten mit CKD und HD ist die Plättchenreaktivität in verschiedenen Studien mit unterschiedlichen Plättchenfunktionstests im Vergleich zu Gesunden erhöht⁷³⁻⁷⁶. In der vorliegenden Studie zeigte sich eine vergleichbar hohe Plättchenreaktivität bei den Patienten, ausgenommen bei der AA-induzierten Aggregation, was sich durch die durchgehende Einnahme von ASS erklärt.

Bezüglich der Veränderung der Plättchenreaktivität durch die HD zeigt sich in der Literatur ein uneinheitliches Bild. Auf der einen Seite gibt es Studien, die während der HD keine Veränderung der Plättchenfunktion gefunden haben^{77, 78}. Dies geht mit unseren Ergebnissen in der LTA einher. Sowohl die AA-, als auch die ADP- und die Kollagen-induzierte Plättchenaggregation zeigten keinen signifikanten Unterschied zwischen dem Baselinewert vor der HD und der Aggregation während der HD. Eine weitere Studie zeigten einen Abfall der P-Selectin-Expression unmittelbar nach der HD⁷⁹, was konsistent mit dem Abfall der P-Selectin-Expression während und 24 Stunden nach HD in unserer Studie war. Schoorl et al. dagegen konnten in ihrer Studie einen Anstieg der P-Selectin-Expression während der HD zeigen⁸⁰. Der entscheidende Unterschied zwischen der Studie von Schoorl et al. und unserer Untersuchung ist jedoch, dass Patienten mit ASS-Medikation ausgeschlossen wurden und demnach ein Patientenkollektiv unter-

sucht wurde, das sich deutlich von unserem unterscheidet. Die ASS-Medikation der Patienten in unserer Studie könnte dazu geführt haben, dass die Plättchenaktivierung während der HD ausbleibt. Durch die extrakorporale Zirkulation während der HD kommen die Plättchen in Kontakt mit künstlichen Oberflächen und werden einem hohen Scherstress ausgesetzt⁸¹. Während hoher Scherstress Plättchen direkt aktivieren kann⁸², wird über den Kontakt des Blutes mit den negativ geladenen, künstlichen Oberflächen des Dialysesystems FXII aktiviert, was letztlich zur Bildung von Thrombin führt und so ebenfalls die Plättchenaggregation initiieren kann⁸³. Durch die Plättcheninhibition durch ASS ist es potenziell möglich, dass die Clearance prothrombotischer urämischer Stoffe überwiegt und so zu einer Senkung der P-Selectin-Expression während und 24 Stunden nach der HD führt. Die Clearance prothrombotischer Stoffe könnte außerdem eine Erklärung für die signifikant geringere AA- und ADP-induzierte Aggregation 24 Stunden nach HD sein. Hierbei könnten verschiedene urämische Toxine verantwortlich sein. In der Literatur ist insbesondere für Homocystein (Hcy)⁸⁴ und Trimethylaminoxid (TMAO)⁸⁵ beschrieben, dass sie die Plättchenreaktivität erhöhen. Desweiteren akkumulieren beide Stoffe bei Patienten mit eingeschränkter Nierenfunktion, werden jedoch durch die HD effektiv in ihren Plasmaspiegeln verringert^{86, 87}. Die Senkung dieser urämischen Toxine durch die HD könnte ein möglicher Grund für die verringerte P-Selectin-Expression und AA- und ADP-induzierte Aggregation nach der HD sein. Insbesondere für Hcy ist bekannt, dass der Plasmaspiegel mit dem Spiegel an löslichem P-Selectin korreliert, welches ebenfalls ein Marker für Plättchenaktivierung darstellt⁸⁸. Auf den Einfluss von IS, einem weiteren Urämietoxin, wird in den Kapiteln 4.4 und 4.5 eingegangen.

4.2 Einfluss der HD auf die pharmakodynamische Antwort auf ASS

ASS ist unbestritten der wichtigste Baustein in der Sekundärprophylaxe kardiovaskulärer Ereignisse^{89, 90}. Gleichzeitig variiert die interindividuelle pharmakodynamische Antwort auf ASS sehr stark. Eine insuffiziente Plättchenhemmung mit residualer Plättchenaktivität wird *high on-treatment platelet reactivity* (HTPR) genannt⁴⁴. Diese HTPR ist assoziiert mit einem erhöh-

ten Risiko für ischämische Ereignisse trotz Einnahme der antithrombozytären Medikation^{43, 44, 91}.

Pathophysiologisch gibt es verschiedene Gründe für das Auftreten einer HTPR. Interaktionen mit Medikamenten, wie z.B. Ibuprofen^{92, 93} und Metamizol⁴⁶, die ebenfalls die COX als Zielstruktur haben und dadurch die irreversible Acetylierung der COX-1 durch ASS blockieren, sind ein häufiger Grund für das Auftreten einer HTPR. Ein erhöhter Plättchen-*turnover*, wie er z.B. bei Patienten mit einem coronar-arteriellen Bypass (CABG)⁹⁴, terminaler Niereninsuffizienz^{95, 96}, Dialyse⁹⁶ oder Diabetes Mellitus Typ II (DM II)⁹⁷ zu finden ist, ist ein weiterer Grund für eine HTPR, da durch die vermehrte Thrombopoese nicht alle Plättchen eines 24 Stunden Zyklus durch ASS gehemmt werden können, da die Halbwertszeit von ASS sehr kurz ist⁹⁸. Desweiteren ist ein erhöhter Plättchen-*turnover* mit einem erhöhten COX-1-Level assoziiert⁹⁹, sodass die Standarddosis von 100mg ASS nicht ausreichen könnte, um den gesamten Gehalt an COX-1 zu inhibieren. Oxidativer Stress und eine daraus folgende generalisierte Inflammation können zu einer extrathrombozytären Thromboxan-Synthese führen, welche nicht durch ASS inhibiert werden kann¹⁰⁰. Dies ist zum Beispiel beim DM II beschrieben¹⁰¹. Denkbar wäre, dass ein erhöhter oxidativer Stress und eine generalisierte Inflammation auch bei Patienten mit CKD zu einer HTPR beitragen, da beide Aspekte wichtige pathologische Elemente einer CKD und insbesondere in terminalen Stadien von großer Bedeutung sind^{102, 103}.

Bei Patienten mit CKD ist eine HTPR gegenüber ASS häufig. Die Rate an Patienten mit einer HTPR in unserer Studie von etwa 50% ist vergleichbar mit bereits bestehenden Untersuchungen^{48, 49, 104}. Bisher sind jedoch Daten zum Einfluss der HD auf die pharmakodynamische Antwort auf ASS limitiert. Unsere Studie konnte zeigen, dass 24 Stunden nach HD die Rate an HTPR gegenüber ASS signifikant geringer ist als vor der HD (54% vs. 18%). Nach intensiver Literaturrecherche fand sich keine Studie, die ein ähnliches Studiendesign zeigte. Nichtsdestotrotz gibt es Arbeiten, die den Einfluss der HD auf die pharmakodynamische Antwort aus ASS untersucht haben. Jedoch konnten diese Studien keinen Einfluss der HD auf die ASS-Wirkung zeigen^{77, 104, 105}. Dies geht mit unserem Ergebnis einher, dass während der HD kein Unterschied in der pharmakodynamischen Antwort im Vergleich zu vor der HD besteht. Größter Unterschied zwischen den zitierten

Studien und der vorliegenden Arbeit ist daher, dass in den Studien nur die Veränderung zwischen vor und unmittelbar nach der HD verglichen wurde, während sich in unserer Studie erst ein Effekt 24 Stunden nach HD zeigte. Dies könnte insbesondere damit zusammenhängen, dass die Einnahme der 100mg ASS am Tag des dritten Messzeitpunktes (24 Stunden nach HD) zu einer suffizienteren Hemmung der Thrombozyten führt. Desweiteren ist die Vergleichbarkeit der Studien eingeschränkt, da in allen Arbeiten unterschiedliche Verfahren zur Messung der pharmakodynamischen Antwort auf ASS genutzt wurden. Potenzielle Gründe für die verbesserte Plättchenhemmung durch ASS 24 Stunden nach HD könnte zum Beispiel die Clearance von urämischen Toxinen sein, die einerseits sterisch die COX-1-Inhibition durch ASS behindern oder andererseits zu einer generalisierten erhöhten Plättchenreaktivität beitragen. In Bezug auf die erhöhte Plättchenreaktivität könnten die bereits erwähnten Stoffe Hcy, TMAO und IS eine Rolle spielen. Ergänzend sinkt der Anteil an retikulierten, also jungen Plättchen nach der HD¹⁰⁶, sodass die HD einen Einfluss auf den Platelet-*turnover* hat. Die Autoren dieser Studie führen als möglichen Mechanismus an, dass die HD direkt retikulierte Plättchen entfernt. Weiterhin wäre jedoch auch denkbar, dass urämische Toxine, welche die Thrombopoese antreiben, entfernt werden und so der Anteil an retikulierten Plättchen sinkt. Zukünftige Studien sind hier wichtig, um zu zeigen, ob und welche urämischen Toxine Effekte auf die Thrombopoese haben und inwieweit diese von der HD beeinflusst werden. Wir konnten zeigen, dass der Plasma-IS-Spiegel signifikant mit der AA-induzierten Aggregation korreliert und somit ein entscheidender Faktor in der Pathogenese einer HTPR bei Patienten mit CKD und HD sein könnte. Der direkte Einfluss von IS auf die Plättchenaggregation konnte im experimentellen Teil dieser Arbeit gezeigt werden und liegt darin, dass IS zu einer erhöhten Plättchenreaktivität führt, was eine HTPR begünstigen kann. Ob IS einen Einfluss auf die Thrombopoese hat ist nicht bekannt, jedoch konnte gezeigt werden, dass IS einen Einfluss auf die Bildung von Leukozyten hat und somit Effekte im Knochenmark an blutbildenden Zellen vermitteln kann¹⁰⁷. In diesem Mausmodell konnten erhöhte Konzentrationen an neutrophilen Granulozyten im Blut und erhöhte Konzentrationen an myeloischen Vorläuferzellen im Knochenmark nachgewiesen werden. Beide Ergebnisse waren assoziiert mit einem erhöhten IS-Spiegel. Da Thrombozyten ihren Ursprung ebenfalls in der myeloischen Vorläuferzelle haben wäre es interes-

sant zu sehen, ob und inwiefern IS die Thrombopoese und den Anteil an retikulierten Plättchen beeinflusst.

Wenig überraschend ist, dass eine HTPR gegenüber ASS auch im Kollektiv der Patienten mit CKD ein unabhängiger Risikofaktor für kardiovaskuläre Ereignisse und Tod ist¹⁰⁸. Dies wirft die Frage auf, wie sich die pharmakodynamische Antwort auf ASS in diesem Kollektiv verbessern lässt. Ein Ansatzpunkt wäre die Medikation von einmal täglich auf zweimal täglich zu ändern. Die Hypothese hinter diesem Konzept ist es, dem erhöhten Plättchen-*turnover* entgegenzuwirken und so mehr Plättchen innerhalb von 24 Stunden suffizient zu hemmen. Bei Patienten mit DM II konnte bereits in vielen Studien gezeigt werden, dass eine ASS-Medikation zweimal täglich zu einer suffizienteren Plättchenhemmung und einer geringeren Rate an HTPR führt, als eine einmal tägliche Medikation¹⁰⁹⁻¹¹¹. Dem-entsprechende Studien für Patienten mit CKD und HD fehlen. In Zukunft sollten solche Studien einerseits zeigen, ob die labortechnisch bestimmte pharmakodynamische Antwort auf ASS durch ein solches Konzept bei Patienten mit CKD und HD verbessert wird und andererseits, ob dieses Konzept einen positiven Einfluss auf die Rate an kardiovaskulären Ereignissen und die Sterblichkeit hat. Eine weitere, logistisch schwer umzusetzende Option wäre, die HD-Frequenz bei Patienten mit CKD und KHK zu erhöhen. Die klassische Frequenz beträgt dreimal wöchentlich. Eine randomisierte Studie aus dem Jahr 2010 hat die klassische Frequenz mit einem intensivierten HD-Schema (sechsmal wöchentlich) verglichen. Diese Studie konnte zeigen, dass das höher frequentierte Schema zu einer Reduktion bzgl. der Endpunkte Tod und linksventrikuläre Masse führt¹¹². Unglücklicherweise gibt es keine Studien, die ein klassisches mit einem intensivierten HD-Schema bzgl. ischämischer Endpunkte vergleichen. Unterstützend für ein intensiviertes HD-Schema ist ebenfalls, dass Patienten mit einem Schema mit drei dialysefreien Tagen eine höhere Sterblichkeit an dialysefreien Tagen zeigen als Patienten mit einem Schema mit zwei dialysefreien Tagen¹¹³. Insgesamt wäre anzunehmen, dass ein intensiviertes HD-Schema zu einer permanent verbesserten pharmakodynamischen Antwort auf ASS führen könnte, was in weiteren Studien gezeigt werden muss.

4.3 IS und Plättchenreaktivität

Im experimentellen Teil dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass IS die Aggregation durch verschiedene Stimuli signifikant erhöht und insbesondere die AA-induzierte Aggregation trotz Behandlung der Plättchen mit ASS signifikant steigert. IS hat seinen Ursprung in mit der Nahrung aufgenommenem Tryptophan, welches von Bakterien im Colon zu Indol umgesetzt wird. Dieses Indol wird anschließend resorbiert und in der Leber oxidiert und sulfatiert, sodass IS entsteht¹¹⁴. Bei erhaltener Nierenfunktion wird IS aktiv mittels der organischen Anionentransporter 1 und 3 (OAT1, OAT3) in die Tubuluszellen aufgenommen und anschließend per tubulärer Sekretion renal eliminiert^{115, 116}. Bei CKD ist dieser Mechanismus hingegen eingeschränkt und IS akkumuliert im Plasma. Auf Grund der hohen Proteinbindung von IS ist außerdem die dialytische Clearance im Vergleich zu Harnstoff geringer, sodass auch bei Patienten mit HD IS weiter akkumuliert.¹¹⁷ Nichtsdestotrotz konnten wir in dieser Arbeit zeigen, dass 24 Stunden nach HD der IS-Plasmaspiegel signifikant geringer war als vor der HD und die Senkung des IS-Plasmaspiegels der bekannten Größenordnung entspricht¹¹⁸. Desweiteren korreliert der IS-Plasmaspiegel gut mit der AA-induzierten Aggregation, welche 24 Stunden nach HD ebenfalls signifikant geringer war. Insgesamt ist daher anzunehmen, dass die gesteigerte Plättchenreaktivität durch IS ein wichtiger Faktor ist, der dazu beiträgt, dass IS mit kardiovaskulären Ereignissen assoziiert ist¹¹⁹, ein unabhängiger Risikofaktor für eine in-Stent Restenose nach PCI ist¹²⁰ und mit der Schwere der Atherosklerose korreliert¹²¹, da Plättchen entscheidend an der Pathogenese einer Atherosklerose beteiligt sind^{122, 123}. Die Ergebnisse dieser Arbeit legen außerdem nahe, dass IS ein wichtiger Faktor bei der Entstehung einer HTPR gegenüber ASS in Patienten mit CKD zu sein scheint. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass IS die allgemeine Plättchenreaktivität erhöht und so auf der einen Seite die Plättchen, welche nicht durch ASS gehemmt sind, aktiver werden und andererseits durch ASS gehemmte Plättchen über andere Aktivierungswege stärker stimuliert werden können, was dadurch gestützt wird, dass auch die ADP- und Kollagen-induzierte Aggregation durch IS signifikant gesteigert wird. Diese Hypothese wird weiterhin dadurch gestärkt, dass auch die Plättchenadhäsion in der kollagen-beschichteten Flusskammer signifikant durch IS gesteigert wird. Dies lässt annehmen, dass insbe-

sondere die kollagenvermittelte Plättchenaktivierung eine wichtige Rolle in der Wirkung von IS spielen könnte. Weitere Studien sollten hier zeigen, ob IS die kollageninduzierten Signalwege im Plättchen beeinflusst oder ob IS die Expression von Kollagenrezeptoren wie gpVI auf dem Plättchen steigert.

Es ist bekannt, dass IS die kollageninduzierte Reaktivität muriner Plättchen erhöht und im Mausmodell desweiteren zu einer verstärkten Thrombusbildung und P-Selectin-Expression beiträgt. In dieser Arbeit wird vor allem die Hochregulation der Kinase p38 für diesen Effekt verantwortlich gemacht, welche für die Generierung reaktiver Sauerstoffspezies verantwortlich ist.¹²⁴ Ob IS auch in humanen Plättchen p38 hochreguliert, ist nicht bekannt. Eine weitere Arbeit konnte in einem Rattenmodell ebenfalls eine verstärkte Thrombusformation und eine erhöhte kollageninduzierte Plättchenaggregation zeigen¹²⁵. Beide Studien haben jedoch die Plättchenaggregation in Vollblut untersucht, während in der vorliegenden Arbeit die Aggregation mit PRP durchgeführt wurde. In dem Rattenmodell von Karbowska et al. wurde die Aggregation ebenfalls in PRP evaluiert, wobei sich jedoch kein Effekt von IS auf die Aggregation zeigte. Die Autoren erklären dies damit, dass der Effekt von IS auf die Plättchenaggregation nicht direkt über die Thrombozyten vermittelt wird, sondern IS einen Effekt auf Erythrozyten hat, welcher wiederum die Plättchenaggregation steigert. Sowohl die Ergebnisse von Yang et al. in ihrem Mausmodell, die eine Hochregulation von p38 im Plättchen gefunden haben, als auch die Ergebnisse dieser Arbeit, die einen Effekt von IS auf die Plättchenreaktivität in PRP gezeigt hat, sprechen dafür, dass IS einen direkten Effekt auf Thrombozyten hat. Weiterhin ist bekannt, dass IS die Expression von TF auf vSMC erhöht⁶³. Auch Plättchen sind in der Lage TF zu exprimieren und somit die Bildung von FXa zu induzieren, welcher wiederum vermehrt Thrombin produziert, was zur Verstärkung der Thrombozytenaggregation führt¹²⁶. Ob IS auch die Expression von TF auf Plättchen verstärkt und somit über diesen Mechanismus zu einer erhöhten Plättchenreaktivität beiträgt, ist bisher nicht bekannt.

Diese und weitere negative Effekte, die IS auf das kardiovaskuläre System vermittelt, werfen die Frage auf, ob IS als therapeutisches Target adressiert werden kann. Hierbei wurde in der Vergangenheit vor allem AST-120 untersucht. AST-120 ist ein orales Adsorbent, welches aus Kohlenstoff besteht und im Darm Vor-

stufen von IS bindet und somit die IS-Plasmaspiegel senkt.¹²⁷ Während eine Reihe kleinerer Studien und Tierexperimente positive Effekte von AST-120 auf renale und kardiovaskuläre Parameter darstellen¹²⁸, ließen sich positive Effekte auf renale Endpunkte in großen Phase III Studien nicht nachweisen¹²⁹. Unglücklicherweise fehlen große randomisierte Studien, die den Effekt von AST-120 auf kardiovaskuläre Endpunkte untersuchen. Desweiteren wäre es interessant zu sehen, ob eine Therapie mit AST-120 die erhöhte Plättchenreaktivität bei Patienten mit CKD über die Senkung der IS-Plasmaspiegel verringern kann. Interessanter Weise senkt der *sodium-glucose cotransporter 2 (SGLT2)*-Inhibitor Canaglifozin die IS-Plasmaspiegel in einem Adenin-induzierten CKD-Modell in Ratten über die Veränderung des intestinalen Mikrobioms¹³⁰. Auch wenn dieser Effekt bisher nicht im Menschen nachgewiesen wurde, wäre die Senkung der IS-Plasmaspiegel durch SGLT2-Inhibitoren und eine damit verbundene Senkung der Plättchenreaktivität eine mögliche Erklärung für das signifikant bessere kardiovaskuläre Outcome von Patienten mit einer GFR von 30-60ml/min/1.73m² in der CANVAS-Studie aus dem Jahr 2017, in der Canaglifozin mit einem Placebo verglichen wurde¹³¹. Leider lässt sich anhand dieser Studie nicht sagen, ob das verbesserte kardiovaskuläre Outcome durch eine Verringerung der Rate an ischämischen Ereignissen zustande gekommen ist. Ob und inwieweit die Senkung von IS zu den positiven renalen und kardiovaskulären Effekten von SGLT2-Inhibitoren beiträgt, muss in zukünftigen Studien adressiert werden.

4.5 Schlussfolgerungen

Die vorliegende Arbeit hat einen positiven Einfluss der HD auf die Plättchenfunktion und die pharmakodynamische Antwort auf ASS bei Patienten mit KHK und CKD gezeigt und IS als einen zentralen Faktor in der generell erhöhten Plättchenreaktivität bei Patienten mit CKD identifiziert.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sollten insbesondere bei der antithrombotischen Therapie von Patienten mit einer terminalen Niereninsuffizienz in Betracht gezogen werden, um ein optimales antithrombotisches Regime für diese Hochrisikogruppe zu entwickeln.

5 Literatur- und Quellenverzeichnis

1. Cai Q, Mukku VK and Ahmad M. Coronary artery disease in patients with chronic kidney disease: a clinical update. *Curr Cardiol Rev.* 2013;9:331-9.
2. Lutz J, Menke J, Sollinger D, Schinzel H and Thurmel K. Haemostasis in chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant.* 2014;29:29-40.
3. Gosswald A, Schienkiewitz A, Nowossadeck E and Busch MA. [Prevalence of myocardial infarction and coronary heart disease in adults aged 40-79 years in Germany: results of the German Health Interview and Examination Survey for Adults (DEGS1)]. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz.* 2013;56:650-5.
4. Joseph P, Leong D, McKee M, Anand SS, Schwalm JD, Teo K, Mentz A and Yusuf S. Reducing the Global Burden of Cardiovascular Disease, Part 1: The Epidemiology and Risk Factors. *Circ Res.* 2017;121:677-694.
5. Poole-Wilson P. The prevention of cardiovascular disease worldwide: whose task and WHO's task? *Clin Med (Lond).* 2005;5:379-84.
6. Thomas H, Diamond J, Vieco A, Chaudhuri S, Shinnar E, Cromer S, Perel P, Mensah GA, Narula J, Johnson CO, Roth GA and Moran AE. Global Atlas of Cardiovascular Disease 2000-2016: The Path to Prevention and Control. *Glob Heart.* 2018;13:143-163.
7. Weijmans M, van der Graaf Y, Reitsma JB and Visseren FL. Paternal or maternal history of cardiovascular disease and the risk of cardiovascular disease in offspring. A systematic review and meta-analysis. *Int J Cardiol.* 2015;179:409-16.
8. Nichols M, Townsend N, Scarborough P and Rayner M. Cardiovascular disease in Europe 2014: epidemiological update. *Eur Heart J.* 2014;35:2950-9.
9. Gansevoort RT, Correa-Rotter R, Hemmelgarn BR, Jafar TH, Heerspink HJ, Mann JF, Matsushita K and Wen CP. Chronic kidney disease and cardiovascular risk: epidemiology, mechanisms, and prevention. *Lancet.* 2013;382:339-52.
10. Krishnegowda M and Rajashekaraiyah V. Platelet disorders: an overview. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2015;26:479-91.
11. Kaushansky K. Thrombopoiesis. *Semin Hematol.* 2015;52:4-11.
12. Lefrancais E, Ortiz-Munoz G, Caudrillier A, Mallavia B, Liu F, Sayah DM, Thornton EE, Headley MB, David T, Coughlin SR, Krummel MF, Leavitt AD, Passegue E and Looney MR. The lung is a site of platelet biogenesis and a reservoir for haematopoietic progenitors. *Nature.* 2017;544:105-109.
13. Harker LA. The kinetics of platelet production and destruction in man. *Clin Haematol.* 1977;6:671-93.
14. Kaplan JE and Saba TM. Platelet removal from the circulation by the liver and spleen. *Am J Physiol.* 1978;235:H314-20.
15. Ross DW, Ayscue LH, Watson J and Bentley SA. Stability of hematologic parameters in healthy subjects. Intraindividual versus interindividual variation. *Am J Clin Pathol.* 1988;90:262-7.
16. Jenne CN, Urrutia R and Kubes P. Platelets: bridging hemostasis, inflammation, and immunity. *Int J Lab Hematol.* 2013;35:254-61.
17. Cox D, Kerrigan SW and Watson SP. Platelets and the innate immune system: mechanisms of bacterial-induced platelet activation. *J Thromb Haemost.* 2011;9:1097-107.

18. Weyrich AS and Zimmerman GA. Platelets: signaling cells in the immune continuum. *Trends Immunol.* 2004;25:489-95.
19. Mackman N, Tilley RE and Key NS. Role of the extrinsic pathway of blood coagulation in hemostasis and thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27:1687-93.
20. Eisenreich A, Bogdanov VY, Zakrzewicz A, Pries A, Antoniak S, Poller W, Schultheiss HP and Rauch U. Cdc2-like kinases and DNA topoisomerase I regulate alternative splicing of tissue factor in human endothelial cells. *Circ Res.* 2009;104:589-99.
21. Bogdanov VY, Balasubramanian V, Hathcock J, Vele O, Lieb M and Nemerson Y. Alternatively spliced human tissue factor: a circulating, soluble, thrombogenic protein. *Nat Med.* 2003;9:458-62.
22. Rao LV and Rapaport SI. Activation of factor VII bound to tissue factor: a key early step in the tissue factor pathway of blood coagulation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988;85:6687-91.
23. Smith SA, Travers RJ and Morrissey JH. How it all starts: Initiation of the clotting cascade. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 2015;50:326-36.
24. Dubois C, Panicot-Dubois L, Merrill-Skoloff G, Furie B and Furie BC. Glycoprotein VI-dependent and -independent pathways of thrombus formation in vivo. *Blood.* 2006;107:3902-6.
25. Martorell L, Martinez-Gonzalez J, Rodriguez C, Gentile M, Calvayrac O and Badimon L. Thrombin and protease-activated receptors (PARs) in atherothrombosis. *Thromb Haemost.* 2008;99:305-15.
26. Saenko EL, Shima M, Gilbert GE and Scandella D. Slowed release of thrombin-cleaved factor VIII from von Willebrand factor by a monoclonal and a human antibody is a novel mechanism for factor VIII inhibition. *J Biol Chem.* 1996;271:27424-31.
27. Golebiewska EM and Poole AW. Platelet secretion: From haemostasis to wound healing and beyond. *Blood Rev.* 2015;29:153-62.
28. Yip J, Shen Y, Berndt MC and Andrews RK. Primary platelet adhesion receptors. *IUBMB Life.* 2005;57:103-8.
29. Hoffman M and Monroe DM, 3rd. A cell-based model of hemostasis. *Thromb Haemost.* 2001;85:958-65.
30. Harker LA and Ritchie JL. The role of platelets in acute vascular events. *Circulation.* 1980;62:V13-8.
31. Foster CJ, Prosser DM, Agans JM, Zhai Y, Smith MD, Lachowicz JE, Zhang FL, Gustafson E, Monsma FJ, Jr., Wiekowski MT, Abbondanzo SJ, Cook DN, Bayne ML, Lira SA and Chintala MS. Molecular identification and characterization of the platelet ADP receptor targeted by thienopyridine antithrombotic drugs. *J Clin Invest.* 2001;107:1591-8.
32. Thomas MR and Storey RF. The future of P2Y12 receptor antagonists. *Platelets.* 2015;26:392-8.
33. Yang M, Huo X, Miao Z and Wang Y. Platelet Glycoprotein IIb/IIIa Receptor Inhibitor Tirofiban in Acute Ischemic Stroke. *Drugs.* 2019;79:515-529.
34. Neumann FJ, Sousa-Uva M, Ahlsson A, Alfonso F, Banning AP, Benedetto U, Byrne RA, Collet JP, Falk V, Head SJ, Juni P, Kastrati A, Koller A, Kristensen SD, Niebauer J, Richter DJ, Seferovic PM, Sibbing D, Stefanini GG, Windecker S, Yadav R, Zembala MO and Group ESCSD. 2018 ESC/EACTS Guidelines on myocardial revascularization. *Eur Heart J.* 2019;40:87-165.
35. Task Force M, Montalescot G, Sechtem U, Achenbach S, Andreotti F, Arden C, Budaj A, Bugiardini R, Crea F, Cuisset T, Di Mario C, Ferreira JR,

Gersh BJ, Gitt AK, Hulot JS, Marx N, Opie LH, Pfisterer M, Prescott E, Ruschitzka F, Sabate M, Senior R, Taggart DP, van der Wall EE, Vrints CJ, Guidelines ESCCfP, Zamorano JL, Achenbach S, Baumgartner H, Bax JJ, Bueno H, Dean V, Deaton C, Erol C, Fagard R, Ferrari R, Hasdai D, Hoes AW, Kirchhof P, Knuuti J, Kolh P, Lancellotti P, Linhart A, Nihoyannopoulos P, Piepoli MF, Ponikowski P, Sirnes PA, Tamargo JL, Tendera M, Torbicki A, Wijns W, Windecker S, Document R, Knuuti J, Valgimigli M, Bueno H, Claeys MJ, Donner-Banzhoff N, Erol C, Frank H, Funck-Brentano C, Gaemperli O, Gonzalez-Juanatey JR, Hamilos M, Hasdai D, Husted S, James SK, Kervinen K, Kolh P, Kristensen SD, Lancellotti P, Maggioni AP, Piepoli MF, Pries AR, Romeo F, Ryden L, Simoons ML, Sirnes PA, Steg PG, Timmis A, Wijns W, Windecker S, Yildirir A and Zamorano JL. 2013 ESC guidelines on the management of stable coronary artery disease: the Task Force on the management of stable coronary artery disease of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J.* 2013;34:2949-3003.

36. Roffi M, Patrono C, Collet JP, Mueller C, Valgimigli M, Andreotti F, Bax JJ, Borger MA, Brotons C, Chew DP, Gencer B, Hasenfuss G, Kjeldsen K, Lancellotti P, Landmesser U, Mehilli J, Mukherjee D, Storey RF, Windecker S and Group ESCSD. 2015 ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation: Task Force for the Management of Acute Coronary Syndromes in Patients Presenting without Persistent ST-Segment Elevation of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J.* 2016;37:267-315.

37. Buchanan WW and Kean WF. The treatment of acute rheumatism by salicin, by T.J. Maclagan--The Lancet, 1876. *J Rheumatol.* 2002;29:1321-3.

38. Desborough MJR and Keeling DM. The aspirin story - from willow to wonder drug. *Br J Haematol.* 2017;177:674-683.

39. Loll PJ, Picot D and Garavito RM. The structural basis of aspirin activity inferred from the crystal structure of inactivated prostaglandin H2 synthase. *Nat Struct Biol.* 1995;2:637-43.

40. Patrono C, Davi G and Ciabattoni G. Thromboxane biosynthesis and metabolism in relation to cardiovascular risk factors. *Agents Actions Suppl.* 1992;37:10-7.

41. Bhagwat SS, Hamann PR, Still WC, Bunting S and Fitzpatrick FA. Synthesis and structure of the platelet aggregation factor thromboxane A2. *Nature.* 1985;315:511-3.

42. Spiliopoulos S and Pastromas G. Current status of high on-treatment platelet reactivity in patients with coronary or peripheral arterial disease: Mechanisms, evaluation and clinical implications. *World J Cardiol.* 2015;7:912-21.

43. Komosa A, Siller-Matula JM, Lesiak M, Michalak M, Kowal J, Maczynski M, Siniawski A, Mularek-Kubzdela T, Wisniewski S and Grajek S. Association between high on-treatment platelet reactivity and occurrence of cerebral ischemic events in patients undergoing percutaneous coronary intervention. *Thromb Res.* 2016;138:49-54.

44. Krasopoulos G, Brister SJ, Beattie WS and Buchanan MR. Aspirin "resistance" and risk of cardiovascular morbidity: systematic review and meta-analysis. *BMJ.* 2008;336:195-8.

45. MacDonald TM and Wei L. Is there an interaction between the cardiovascular protective effects of low-dose aspirin and ibuprofen? *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2006;98:275-80.

46. Dannenberg L, Petzold T, Achilles A, Naguib D, Zako S, Helten C, M'Pembale R, Mourikis P, Podsvyadek Y, Grandoch M, Levkau B, Zeus T, Kelm M, Hohlfeld T and Polzin A. Dose reduction, oral application, and order of intake to preserve aspirin antiplatelet effects in dipyron co-medicated chronic artery disease patients. *Eur J Clin Pharmacol*. 2018.
47. Simpson SH, Abdelmoneim AS, Omran D and Featherstone TR. Prevalence of high on-treatment platelet reactivity in diabetic patients treated with aspirin. *Am J Med*. 2014;127:95 e1-9.
48. Polzin A, Dannenberg L, Sansone R, Levkau B, Kelm M, Hohlfeld T and Zeus T. Antiplatelet effects of aspirin in chronic kidney disease patients. *J Thromb Haemost*. 2016;14:375-80.
49. Angiolillo DJ, Bernardo E, Capodanno D, Vivas D, Sabate M, Ferreira JL, Ueno M, Jimenez-Quevedo P, Alfonso F, Bass TA, Macaya C and Fernandez-Ortiz A. Impact of chronic kidney disease on platelet function profiles in diabetes mellitus patients with coronary artery disease taking dual antiplatelet therapy. *J Am Coll Cardiol*. 2010;55:1139-46.
50. Stevens PE, Levin A and Kidney Disease: Improving Global Outcomes Chronic Kidney Disease Guideline Development Work Group M. Evaluation and management of chronic kidney disease: synopsis of the kidney disease: improving global outcomes 2012 clinical practice guideline. *Ann Intern Med*. 2013;158:825-30.
51. Coresh J, Selvin E, Stevens LA, Manzi J, Kusek JW, Eggers P, Van Lente F and Levey AS. Prevalence of chronic kidney disease in the United States. *JAMA*. 2007;298:2038-47.
52. Murphy D, McCulloch CE, Lin F, Banerjee T, Bragg-Gresham JL, Eberhardt MS, Morgenstern H, Pavkov ME, Saran R, Powe NR, Hsu CY, Centers for Disease C and Prevention Chronic Kidney Disease Surveillance T. Trends in Prevalence of Chronic Kidney Disease in the United States. *Ann Intern Med*. 2016;165:473-481.
53. Kraus D and Wanner C. [Epidemiology of Chronic Kidney Disease - Ever More Patients?]. *Dtsch Med Wochenschr*. 2017;142:1276-1281.
54. Webster AC, Nagler EV, Morton RL and Masson P. Chronic Kidney Disease. *Lancet*. 2017;389:1238-1252.
55. National Kidney F. KDOQI Clinical Practice Guideline for Hemodialysis Adequacy: 2015 update. *Am J Kidney Dis*. 2015;66:884-930.
56. Chan CT, Blankestijn PJ, Dember LM, Gallieni M, Harris DCH, Lok CE, Mehrotra R, Stevens PE, Wang AY, Cheung M, Wheeler DC, Winkelmayer WC, Pollock CA and Conference P. Dialysis initiation, modality choice, access, and prescription: conclusions from a Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Controversies Conference. *Kidney Int*. 2019;96:37-47.
57. Cheung AK, Sarnak MJ, Yan G, Dwyer JT, Heyka RJ, Rocco MV, Teehan BP and Levey AS. Atherosclerotic cardiovascular disease risks in chronic hemodialysis patients. *Kidney Int*. 2000;58:353-62.
58. Matas AJ, Smith JM, Skeans MA, Thompson B, Gustafson SK, Stewart DE, Cherikh WS, Wainright JL, Boyle G, Snyder JJ, Israni AK and Kasiske BL. OPTN/SRTR 2013 Annual Data Report: kidney. *Am J Transplant*. 2015;15 Suppl 2:1-34.
59. Clark WR, Gao D, Neri M and Ronco C. Solute Transport in Hemodialysis: Advances and Limitations of Current Membrane Technology. *Contrib Nephrol*. 2017;191:84-99.

60. Reindl-Schwaighofer R, Kainz A, Kammer M, Dumfarth A and Oberbauer R. Survival analysis of conservative vs. dialysis treatment of elderly patients with CKD stage 5. *PLoS One*. 2017;12:e0181345.
61. Leong SC and Sirich TL. Indoxyl Sulfate-Review of Toxicity and Therapeutic Strategies. *Toxins (Basel)*. 2016;8.
62. Niwa T. Indoxyl sulfate is a nephro-vascular toxin. *J Ren Nutr*. 2010;20:S2-6.
63. Ng HY, Bolati W, Lee CT, Chien YS, Yisireyili M, Saito S, Pei SN, Nishijima F and Niwa T. Indoxyl Sulfate Downregulates Mas Receptor via Aryl Hydrocarbon Receptor/Nuclear Factor-kappa B, and Induces Cell Proliferation and Tissue Factor Expression in Vascular Smooth Muscle Cells. *Nephron*. 2016;133:205-12.
64. Ito S, Osaka M, Edamatsu T, Itoh Y and Yoshida M. Crucial Role of the Aryl Hydrocarbon Receptor (AhR) in Indoxyl Sulfate-Induced Vascular Inflammation. *J Atheroscler Thromb*. 2016;23:960-75.
65. Diaz-Ricart M. Indoxyl sulfate, a uremic trigger for platelets. *Blood*. 2017;129:2599-2600.
66. Yamamoto H, Tsuruoka S, Ioka T, Ando H, Ito C, Akimoto T, Fujimura A, Asano Y and Kusano E. Indoxyl sulfate stimulates proliferation of rat vascular smooth muscle cells. *Kidney Int*. 2006;69:1780-5.
67. Born GV. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature*. 1962;194:927-9.
68. Sarnak MJ, Levey AS, Schoolwerth AC, Coresh J, Culleton B, Hamm LL, McCullough PA, Kasiske BL, Kelepouris E, Klag MJ, Parfrey P, Pfeffer M, Raij L, Spinosa DJ, Wilson PW, American Heart Association Councils on Kidney in Cardiovascular Disease HBPRCC, Epidemiology and Prevention. Kidney disease as a risk factor for development of cardiovascular disease: a statement from the American Heart Association Councils on Kidney in Cardiovascular Disease, High Blood Pressure Research, Clinical Cardiology, and Epidemiology and Prevention. *Hypertension*. 2003;42:1050-65.
69. Vashistha V, Lee M, Wu YL, Kaur S and Ovbiagele B. Low glomerular filtration rate and risk of myocardial infarction: A systematic review and meta-analysis. *Int J Cardiol*. 2016;223:401-409.
70. Go AS, Chertow GM, Fan D, McCulloch CE and Hsu CY. Chronic kidney disease and the risks of death, cardiovascular events, and hospitalization. *N Engl J Med*. 2004;351:1296-305.
71. Trip MD, Cats VM, van Capelle FJ and Vreken J. Platelet hyperreactivity and prognosis in survivors of myocardial infarction. *N Engl J Med*. 1990;322:1549-54.
72. Elwood PC, Renaud S, Sharp DS, Beswick AD, O'Brien JR and Yarnell JW. Ischemic heart disease and platelet aggregation. The Caerphilly Collaborative Heart Disease Study. *Circulation*. 1991;83:38-44.
73. Huang MJ, Wei RB, Wang Y, Su TY, Di P, Li QP, Yang X, Li P and Chen XM. Blood coagulation system in patients with chronic kidney disease: a prospective observational study. *BMJ Open*. 2017;7:e014294.
74. Zeck J, Schallheim J, Lew SQ and DePalma L. Whole blood platelet aggregation and release reaction testing in uremic patients. *Biomed Res Int*. 2013;2013:486290.
75. Jain N, Li X, Adams-Huet B, Sarode R, Toto RD, Banerjee S and Hedayati SS. Differences in Whole Blood Platelet Aggregation at Baseline and in Response to Aspirin and Aspirin Plus Clopidogrel in Patients With Versus Without Chronic Kidney Disease. *Am J Cardiol*. 2016;117:656-663.

76. Yagmur E, Frank RD, Neulen J, Floege J and Muhlfeld AS. Platelet Hyperaggregability is Highly Prevalent in Patients With Chronic Kidney Disease: An Underestimated Risk Indicator of Thromboembolic Events. *Clin Appl Thromb Hemost.* 2015;21:132-8.
77. Fu DL, Zhao TT, Peng WH, Yang P, Liu XF, Zhang H, Li XL, Wang Y, Zheng JG, Gao YX, Lu HK and Wang Q. Effect of Dialysis on Antiplatelet Drug Efficacy in Uremic Patients with Coronary Heart Disease. *Chin Med J (Engl).* 2017;130:1914-1918.
78. Knehtl M, Ponikvar R and Buturovic-Ponikvar J. Platelet-related hemostasis before and after hemodialysis with five different anticoagulation methods. *Int J Artif Organs.* 2013;36:717-24.
79. Aggarwal A, Kabani SS, Rimmer JM, Gennari FJ, Taatjes DJ, Sobel BE and Schneider DJ. Biphasic effects of hemodialysis on platelet reactivity in patients with end-stage renal disease: a potential contributor to cardiovascular risk. *Am J Kidney Dis.* 2002;40:315-22.
80. Schooli M, Schooli M, Nube MJ and Bartels PC. Platelet depletion, platelet activation and coagulation during treatment with hemodialysis. *Scand J Clin Lab Invest.* 2011;71:240-7.
81. Polaschegg HD. Red blood cell damage from extracorporeal circulation in hemodialysis. *Semin Dial.* 2009;22:524-31.
82. Reilly JT and Toh CH. Shear stress and platelet function: a therapeutic challenge? *Lancet.* 1995;346:196-7.
83. Naudin C, Burillo E, Blankenberg S, Butler L and Renne T. Factor XII Contact Activation. *Semin Thromb Hemost.* 2017;43:814-826.
84. Verdoia M, Schaffer A, Pergolini P, Rolla R, Barbieri L, Bellomo G, Sinigaglia F, Marino P, Suryapranata H, De Luca G and Novara Atherosclerosis Study G. Homocysteine Levels Influence Platelet Reactivity in Coronary Artery Disease Patients Treated With Acetylsalicylic Acid. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2015;66:35-40.
85. Zhu W, Gregory JC, Org E, Buffa JA, Gupta N, Wang Z, Li L, Fu X, Wu Y, Mehrabian M, Sartor RB, McIntyre TM, Silverstein RL, Tang WHW, DiDonato JA, Brown JM, Luscis AJ and Hazen SL. Gut Microbial Metabolite TMAO Enhances Platelet Hyperreactivity and Thrombosis Risk. *Cell.* 2016;165:111-124.
86. Dessi M, Di Giovamberardino G, Pieri M, Noce A, Zenobi R, Di Daniele N and Pastore A. Influence of dialysis techniques and alternate vitamin supplementation on homocysteine levels in patients with known MTHFR genotypes. *Clin Exp Nephrol.* 2015;19:140-5.
87. Hai X, Landeras V, Dobre MA, DeOreo P, Meyer TW and Hostetter TH. Mechanism of Prominent Trimethylamine Oxide (TMAO) Accumulation in Hemodialysis Patients. *PLoS One.* 2015;10:e0143731.
88. Spencer CG, Martin SC, Felmeden DC, Blann AD, Beevers GD and Lip GY. Relationship of homocysteine to markers of platelet and endothelial activation in "high risk" hypertensives: a substudy of the Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial. *Int J Cardiol.* 2004;94:293-300.
89. Antithrombotic Trialists C. Collaborative meta-analysis of randomised trials of antiplatelet therapy for prevention of death, myocardial infarction, and stroke in high risk patients. *BMJ.* 2002;324:71-86.
90. Vandvik PO, Lincoff AM, Gore JM, Gutterman DD, Sonnenberg FA, Alonso-Coello P, Akl EA, Lansberg MG, Guyatt GH and Spencer FA. Primary and secondary prevention of cardiovascular disease: Antithrombotic Therapy and

- Prevention of Thrombosis, 9th ed: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines. *Chest*. 2012;141:e637S-e668S.
91. Fiolaki A, Katsanos AH, Kyritsis AP, Papadaki S, Kosmidou M, Moschonas IC, Tselepis AD and Giannopoulos S. High on treatment platelet reactivity to aspirin and clopidogrel in ischemic stroke: A systematic review and meta-analysis. *J Neurol Sci*. 2017;376:112-116.
 92. Rao GH, Johnson GG, Reddy KR and White JG. Ibuprofen protects platelet cyclooxygenase from irreversible inhibition by aspirin. *Arteriosclerosis*. 1983;3:383-8.
 93. Catella-Lawson F, Reilly MP, Kapoor SC, Cucchiara AJ, DeMarco S, Tournier B, Vyas SN and FitzGerald GA. Cyclooxygenase inhibitors and the antiplatelet effects of aspirin. *N Engl J Med*. 2001;345:1809-17.
 94. Zimmermann N, Kurt M, Wenk A, Winter J, Gams E and Hohlfeld T. Is cardiopulmonary bypass a reason for aspirin resistance after coronary artery bypass grafting? *Eur J Cardiothorac Surg*. 2005;27:606-10.
 95. Cesari F, Marcucci R, Gori AM, Caporale R, Fanelli A, Paniccia R, Zanazzi M, Bertoni E, Larti A, Salvadori M, Gensini GF and Abbate R. High platelet turnover and reactivity in renal transplant recipients patients. *Thromb Haemost*. 2010;104:804-10.
 96. Himmelfarb J, Holbrook D, McMonagle E and Ault K. Increased reticulated platelets in dialysis patients. *Kidney Int*. 1997;51:834-9.
 97. Neergaard-Petersen S, Hvas AM, Grove EL, Larsen SB, Gregersen S and Kristensen SD. The Influence of Haemoglobin A1c Levels on Platelet Aggregation and Platelet Turnover in Patients with Coronary Artery Disease Treated with Aspirin. *PLoS One*. 2015;10:e0132629.
 98. Armstrong PC, Hoefler T, Knowles RB, Tucker AT, Hayman MA, Ferreira PM, Chan MV and Warner TD. Newly Formed Reticulated Platelets Undermine Pharmacokinetically Short-Lived Antiplatelet Therapies. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2017;37:949-956.
 99. Rubak P, Kristensen SD and Hvas AM. Flow cytometric analysis of platelet cyclooxygenase-1 and -2 and surface glycoproteins in patients with immune thrombocytopenia and healthy individuals. *Platelets*. 2017;28:387-393.
 100. Cipollone F, Ciabattini G, Patrignani P, Pasquale M, Di Gregorio D, Bucciarelli T, Davi G, Cuccurullo F and Patrono C. Oxidant stress and aspirin-insensitive thromboxane biosynthesis in severe unstable angina. *Circulation*. 2000;102:1007-13.
 101. Davi G, Ciabattini G, Consoli A, Mezzetti A, Falco A, Santarone S, Pennese E, Vitacolonna E, Bucciarelli T, Costantini F, Capani F and Patrono C. In vivo formation of 8-iso-prostaglandin f2alpha and platelet activation in diabetes mellitus: effects of improved metabolic control and vitamin E supplementation. *Circulation*. 1999;99:224-9.
 102. Modaresi A, Nafar M and Sahraei Z. Oxidative stress in chronic kidney disease. *Iran J Kidney Dis*. 2015;9:165-79.
 103. Akchurin OM and Kaskel F. Update on inflammation in chronic kidney disease. *Blood Purif*. 2015;39:84-92.
 104. Aksu HU, Oner E, Celik O, Isiksacan N, Aksu H, Uzun S, Yavuz D, Ozturk S, Gul M and Uslu N. Aspirin resistance in patients undergoing hemodialysis and effect of hemodialysis on aspirin resistance. *Clin Appl Thromb Hemost*. 2015;21:82-6.
 105. Htun P, Kan T, Mueller E, Pohle C, Schindler R, Geisler T, Gawaz M, Bocksch W and Fateh-Moghadam S. Haemodialysis impairs clopidogrel but not

- aspirin responsiveness in patients with end-stage renal disease. Results of a pilot study. *Thromb Haemost.* 2014;111:662-9.
106. Tassies D, Reverter JC, Cases A, Escolar G, Villamor N, Lopez-Pedret J, Castillo R and Ordinas A. Reticulated platelets in uremic patients: effect of hemodialysis and continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Am J Hematol.* 1995;50:161-6.
107. Ito S, Ohno Y, Tanaka T, Kobuchi S, Ayajiki K, Manabe E, Masuyama T, Jun-Ichi S and Tsujino T. Neutrophil/lymphocyte ratio elevation in renal dysfunction is caused by distortion of leukocyte hematopoiesis in bone marrow. *Ren Fail.* 2019;41:284-293.
108. Kilickesmez KO, Kocas C, Abaci O, Okcun B, Gorcin B and Gurmen T. Follow-up of aspirin-resistant patients with end-stage kidney disease. *Int Urol Nephrol.* 2013;45:1097-102.
109. Bethel MA, Harrison P, Sourij H, Sun Y, Tucker L, Kennedy I, White S, Hill L, Oulhaj A, Coleman RL and Holman RR. Randomized controlled trial comparing impact on platelet reactivity of twice-daily with once-daily aspirin in people with Type 2 diabetes. *Diabet Med.* 2016;33:224-30.
110. Addad F, Chakroun T, Elalamy I, Abderazek F, Chouchene S, Dridi Z, Gerotziafas GT, Hatmi M, Hassine M and Gamra H. Antiplatelet effect of once- or twice-daily aspirin dosage in stable coronary artery disease patients with diabetes. *Int J Hematol.* 2010;92:296-301.
111. Dillinger JG, Drissa A, Sideris G, Bal dit Sollier C, Voicu S, Manzo Silberman S, Logeart D, Drouet L and Henry P. Biological efficacy of twice daily aspirin in type 2 diabetic patients with coronary artery disease. *Am Heart J.* 2012;164:600-606 e1.
112. McCullough PA, Chan CT, Weinhandl ED, Burkart JM and Bakris GL. Intensive Hemodialysis, Left Ventricular Hypertrophy, and Cardiovascular Disease. *Am J Kidney Dis.* 2016;68:S5-S14.
113. Georgianos PI and Sarafidis PA. Pro: Should we move to more frequent haemodialysis schedules? *Nephrol Dial Transplant.* 2015;30:18-22.
114. Banoglu E, Jha GG and King RS. Hepatic microsomal metabolism of indole to indoxyl, a precursor of indoxyl sulfate. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet.* 2001;26:235-40.
115. Deguchi T, Ohtsuki S, Otagiri M, Takanaga H, Asaba H, Mori S and Terasaki T. Major role of organic anion transporter 3 in the transport of indoxyl sulfate in the kidney. *Kidney Int.* 2002;61:1760-8.
116. Wikoff WR, Nagle MA, Kouznetsova VL, Tsigelny IF and Nigam SK. Untargeted metabolomics identifies enterobiome metabolites and putative uremic toxins as substrates of organic anion transporter 1 (Oat1). *J Proteome Res.* 2011;10:2842-51.
117. Sirich TL, Funk BA, Plummer NS, Hostetter TH and Meyer TW. Prominent accumulation in hemodialysis patients of solutes normally cleared by tubular secretion. *J Am Soc Nephrol.* 2014;25:615-22.
118. Niwa T. Removal of protein-bound uraemic toxins by haemodialysis. *Blood Purif.* 2013;35 Suppl 2:20-5.
119. Lin CJ, Liu HL, Pan CF, Chuang CK, Jayakumar T, Wang TJ, Chen HH and Wu CJ. Indoxyl sulfate predicts cardiovascular disease and renal function deterioration in advanced chronic kidney disease. *Arch Med Res.* 2012;43:451-6.
120. Tsai ML, Hsieh IC, Hung CC and Chen CC. Serum free indoxyl sulfate associated with in-stent restenosis after coronary artery stentings. *Cardiovasc Toxicol.* 2015;15:52-60.

121. Hsu CC, Lu YC, Chiu CA, Yu TH, Hung WC, Wang CP, Lu LF, Chung FM, Lee YJ and Tsai IT. Levels of indoxyl sulfate are associated with severity of coronary atherosclerosis. *Clin Invest Med*. 2013;36:E42-9.
122. Wang ZT, Wang Z and Hu YW. Possible roles of platelet-derived microparticles in atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2016;248:10-6.
123. Gerdes N, Seijkens T, Lievens D, Kuijpers MJ, Winkels H, Projahn D, Hartwig H, Beckers L, Megens RT, Boon L, Noelle RJ, Soehnlein O, Heemskerk JW, Weber C and Lutgens E. Platelet CD40 Exacerbates Atherosclerosis by Transcellular Activation of Endothelial Cells and Leukocytes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2016;36:482-90.
124. Yang K, Du C, Wang X, Li F, Xu Y, Wang S, Chen S, Chen F, Shen M, Chen M, Hu M, He T, Su Y, Wang J and Zhao J. Indoxyl sulfate induces platelet hyperactivity and contributes to chronic kidney disease-associated thrombosis in mice. *Blood*. 2017;129:2667-2679.
125. Karbowska M, Kaminski TW, Marcinczyk N, Misztal T, Rusak T, Smyk L and Pawlak D. The Uremic Toxin Indoxyl Sulfate Accelerates Thrombotic Response after Vascular Injury in Animal Models. *Toxins (Basel)*. 2017;9.
126. Brambilla M, Rossetti L, Zara C, Canzano P, Giesen PLA, Tremoli E and Camera M. Do methodological differences account for the current controversy on tissue factor expression in platelets? *Platelets*. 2018;29:406-414.
127. Schulman G, Vanholder R and Niwa T. AST-120 for the management of progression of chronic kidney disease. *Int J Nephrol Renovasc Dis*. 2014;7:49-56.
128. Ito S and Yoshida M. Protein-bound uremic toxins: new culprits of cardiovascular events in chronic kidney disease patients. *Toxins (Basel)*. 2014;6:665-78.
129. Asai M, Kumakura S and Kikuchi M. Review of the efficacy of AST-120 (KREMEZIN((R))) on renal function in chronic kidney disease patients. *Ren Fail*. 2019;41:47-56.
130. Mishima E, Fukuda S, Kanemitsu Y, Saigusa D, Mukawa C, Asaji K, Matsumoto Y, Tsukamoto H, Tachikawa T, Tsukimi T, Fukuda NN, Ho HJ, Kikuchi K, Suzuki C, Nanto F, Suzuki T, Ito S, Soga T, Tomioka Y and Abe T. Canagliflozin reduces plasma uremic toxins and alters the intestinal microbiota composition in a chronic kidney disease mouse model. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2018;315:F824-F833.
131. Neal B, Perkovic V, Mahaffey KW, de Zeeuw D, Fulcher G, Erondou N, Shaw W, Law G, Desai M, Matthews DR and Group CPC. Canagliflozin and Cardiovascular and Renal Events in Type 2 Diabetes. *N Engl J Med*. 2017;377:644-657.