

**Aus der medizinischen Klinik und Poliklinik
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie
Direktor/Leiter: Herr Prof. Dr. Jens W. Fischer**

**Optischer Malondialdehyd-Assay zur Evaluation der
Aspirin- induzierten Hemmung der Thrombozytenfunktion
in Blutproben von Patienten mit koronarer Herzkrankheit**

Dissertation

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

vorgelegt von
Theresa Schneider

2022

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Thomas Hohlfeld

Zweitgutachter: PD Dr. med. Amin Polzin

Für meine Eltern

Publikationen

1.

Pharmacology. 2017;100(3-4):127-130. doi: 10.1159/000477303

Thromboxane Formation Assay to Identify High On-Treatment Platelet Reactivity to Aspirin.

Mohring A, Piayda K, Dannenberg L, Zako S, Schneider T, Bartkowski K, Levkau B, Zeus T, Kelm M, Hohlfeld T, Polzin A.

2.

Pharmacology. 2018 Oct 24;103(1-2):23-29. doi: 10.1159/000493754

Malondialdehyde Assay in the Evaluation of Aspirin Antiplatelet Effects.

Polzin A, Dannenberg L, Schneider T, Knoop B, Naguib D, Helten C, Pöhl M, Kelm M, Zeus T, Hohlfeld T.

Zusammenfassung

Kardiovaskuläre Krankheiten zählen zu den häufigsten in westlichen Ländern. In deren Sekundärprävention spielt die Hemmung der Thrombozytenfunktion eine große Rolle. Eines der am häufigsten hierfür eingesetzten Medikamente ist Acetylsalicylsäure (ASS). Es hemmt die Cyclooxygenase (COX)-1, ein Enzym des thrombozytären Thromboxansyntheseweges. Ein Nebenprodukt der Synthese von Thromboxan A₂ (TXA₂) ist Malondialdehyd (MDA).

Es gibt jedoch Patienten, bei denen die erwartete Hemmung der Thromboxansynthese durch ASS nicht erreicht wird („ASS-Nonresponder“). In der vorliegenden Arbeit wurde unter den eingeschlossenen kardiologischen Patienten eine Prävalenz von 33% ermittelt. Die möglichen Ursachen sind zahlreich. Auf Medikamenteninteraktionen, insbesondere mit Metamizol, wird in dieser Arbeit besonders eingegangen. Diese Interaktion könnte bei vielen Patienten der nachgewiesenen ASS-Nonresponse zugrunde liegen. Zwar sind die klinischen Auswirkungen von ASS-Nonresponse noch nicht endgültig gesichert, doch haben mehrere Studien eine Assoziation von „ASS-Nonresponse“ mit verschlechtertem Outcome gezeigt.

Zur Überprüfung der Wirkung von Plättchenhemmern wurden zahlreiche Methoden entwickelt. Diese haben Schwachstellen und kommen zum Teil zu widersprüchlichen Ergebnissen. Der in dieser Arbeit untersuchte MDA-Assay ist eine in der hiesigen Arbeitsgruppe etablierte fluorometrische Methode, welche ähnlich dem TXB₂-Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) die thrombozytäre Thromboxansynthese (indirekt) bestimmt.

In dieser Arbeit wurde plättchenreiches Plasma (PRP) von 22 Probanden- sowie 63 Patienten mit koronarer Herzkrankheit mittels Immuno-Assay und MDA-Assay sowie der Licht-Transmissions-Aggregometrie (LTA) auf die Thrombozytenhemmung durch ASS hin untersucht und diese Verfahren miteinander verglichen. Es zeigte sich eine hohe Testgüte des MDA-Assays sowie eine gute Übereinstimmung der Methoden untereinander. Der MDA-Assay bietet eine Reihe von Vorteilen gegenüber anderen Methoden wie Zeitersparnis, Bedside-Potential sowie kostengünstige Durchführung.

Aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit scheint der MDA-Assay eine vielversprechende Methode zur Überprüfung der ASS-Wirkung im klinischen Alltag zu sein. Nachfolgeuntersuchungen müssen prüfen, ob eine Adjustierung der antithrombozytären Therapie auf der Grundlage von Testergebnissen zu Verbesserung des klinischen Outcomes führen kann.

Summary

Cardiovascular disease is common in western countries. Antiplatelet drugs are firmly established, especially for secondary cardiovascular prevention. The most frequently used antiplatelet drug is acetyl salicylic acid (ASS). It inhibits platelet cyclooxygenase (COX-1), the rate-limiting step of platelet thromboxane (TXA₂) synthesis. A side-product of TXA₂ synthesis is malondialdehyde (MDA).

There is a proportion of patients where ASS does not act as expected ("ASS nonresponders"). In this study, the proportion was determined to be 33,3%. Among numerous causes, ASS nonresponse may result from drug interaction, such as by co-therapy with the analgesic metamizole (dipyrone). Metamizole turned out in the present study to have caused ASS-nonresponse in the majority of patients identified as ASS nonresponders. While several investigations demonstrated an association between ASS-nonresponse and worsened clinical outcome, the clinical implications of ASS-nonresponse are presently still uncertain.

Many methods have been developed to examine platelet function in general, as well as to monitor antiplatelet therapy. These assays have their strengths and weaknesses and their results have been controversial. Thus, there is uncertainty which assay may be appropriate for detection of ASS nonresponse. A new attractive method may be the fluorometric detection of MDA, which has been established in our laboratory. Similar to the *TXB₂-enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA), it (indirectly) detects platelet TXA₂ synthesis.

In this study, platelet rich plasma (PRP) of 22 probands and 63 patients was examined by the mentioned assays of platelet TXA₂ formation. The results were compared with light-transmittance aggregometry (LTA), the historic gold standard for analysis of platelet function. A good test quality of the MDA assay and agreement within the methods was shown. In addition, the MDA assay offers advantages towards other methods like time saving, bedside potential and cost-effective implementation.

Taken together, the MDA assay appears to be a promising method in the clinical routine for the examination of the antiplatelet action of ASS. Clearly, the potential benefit by identification of ASS nonresponders and individualized pharmacological antiplatelet strategies requires future clinical studies.

Abkürzungen

Abb. = Abbildung

Abs. = Abschnitt

ARA = Arachidonsäure

AAA = 4-Acetylaminoantipyrin

AA = Aminoantipyrin

ACE-Hemmer = *Angiotensin-Converting-Enzyme*-Hemmer

ACS = Akutes Koronarsyndrom

ADP/ ATP = Adenosindiphosphat/-triphosphat

ADAPT-DES = *Assessment of Dual Antiplatelet Therapy with Drug-Eluting Stents*

AHA = *American Heart Association*

ARU = *Aspirin-Reaction Units*

ASS = Acetylsalicylsäure

asympt. = Asymptotisch

AT1-Antagonist = Angiotensin-1-Antagonist

AUC = *Area Under the Curve*

BMI = *Body Mass Index*

bzw. = Beziehungsweise

ca. = Circa

CCS = *Canadian Cardiovascular Society*

C₂H₃N = Acetonitril

C₂H₃NaO₂ = Natriumacetat

cm = Zentimeter

CrP = C-reaktives Protein

COX = Cyclooxygenase

CT = *in vitro Closure Time*

DALY = *Disability Adjusted Life Years*

DDD = *Defined Daily Doses*

df = *Degrees of Freedom*

dl = Deziliter

DM = Diabetes mellitus

DMSO = Dimethylsulfoxid

EDTA = Ethyldiamintetraessigsäure

EK = Endkonzentration

EIA = *Enzyme Immunosorbent Assay*

ELISA = *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

engl. = Englisch

et al. = *Et alia*

etc. = *Et cetera*

EtOH = Ethanol

GP = Glykoprotein

HDL = *High-density* Lipoprotein

HEPES = 2-(4-(2-Hydroxyethyl) -1-piperazinyl) -ethansulfonsäure

HHT = Hydroxyheptadecatriensäure

HPLC = Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

HKU = Herzkatheteruntersuchung

j = Jahre

m = Meter

mg = Miligramm

(A)MI = (akuter) Myokardinfarkt

min = Minute

mRNA = *Messenger RNA*

NaH₂PO₄ = Natriumdihydrogenphosphat

NaOH = Natriumhydroxid

NaN₃ = Natriumazid

ng = Nanogramm

nl = Nanoliter

NFKB = *Nuclear Factor „kappa-light-chain-enhancer“ of activated B-cells*

nM = Nanomolar

NSAID = *Non-steroidal Antiinflammatory Drug*

NYHA = *New York Heart Association*

PAP = Plättchenarmes Plasma

PA-200 = *Platelet Agitator 200*

pAVK = periphere arterielle

Verschlusskrankheit

PFA-100[®] = *Platelet function analyzer 100*

PG = Prostaglandin
PGD₂ = Prostaglandin D₂
PGE₂ = Prostaglandin E₂
PGF_{2alpha} = Prostaglandin F_{2alpha}
PGG₂ = Prostaglandin G₂
PGH₂ = Prostaglandin H₂
PGI₂ = Prostaglandin I₂/Prostacyclin
PGJ₂ = Prostaglandin J₂
PML = Polymorphonukleäre Leukozyten
PPAR = Peroxisomen-Proliferator-
aktivierte Rezeptoren
PPI = Protonenpumpeninhibitor
PRP = Plättchenreiches Plasma
PTCA = Perkutane transluminale
Angioplastie
RNA = Ribonukleinsäure
ROC = *Receiver Operator Characteristics*
ROS = *Reactive oxygen species*
RPFA = *Ultra Rapid Platelet Function*
Analyzer 200
rpm = *Rounds per minute*
s. = Siehe

S. = Seite
SD = Standardabweichung
SIRS = *Systemic Immune Response*
Syndrome
Sig. = Signifikanz
SNP = *Single Nucleotid* Polymorphismen
sog. = Sogenannte
Tab. = Tabelle
TBA = Thiobarbitursäure
TCA = Trichloressigsäure
TEP = 1,1,3,3- Tetraethoxypropan
TEG = Thromboelastografie
TM = Thrombozytenmedium
TRAP6 = *Thrombin Receptor Activator*
Peptide 6
TX/TXA₂ = Thromboxan/Thromboxan A₂
vs. = *Versus*
vWF = von Willebrand Faktor
μM = Mikromolar
z.B. = Zum Beispiel
Z.n. = Zustand nach
[%] = Prozent

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung

- 1.1 Thrombozyten (Seite (S.) 1)
- 1.2 Prostaglandine (S. 1)
- 1.3 MDA (S. 3)
- 1.4 ASS (S. 4)
- 1.5 Arteriosklerose und KHK (S. 5)
- 1.6 „ASS-Nonresponse“ (S. 7)
- 1.7 Medikamenteninteraktionen mit ASS (S. 9)
- 1.8 Klinische Auswirkungen der *Nonresponse* gegenüber ASS (S. 9)
- 1.9 Thrombozytenfunktions-Assays (S. 10)
- 1.10 Ziele der Arbeit (S. 14)

2. Material und Methoden

- 2.1 Ethikvotum (S. 15)
- 2.2 Erhebung klinischer Daten (S. 15)
- 2.3 Materialien (S. 15)
 - 2.3.1 Substanzen (S. 15)
 - 2.3.2 Geräte (S. 17)
 - 2.3.3 Puffer und Lösungen (S. 18)
- 2.4 Blutentnahme (S. 19)
- 2.5 Präparation des plättchenreichen und plättchenarmen Plasmas (S. 19)
- 2.6 LTA (S. 19)
- 2.7 Fluorometrischer MDA-Assay (S. 22)
- 2.8 TXB₂- *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) (S. 24)
- 2.9 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) (S. 26)
- 2.10 Statistische Auswertung (S. 27)
- 2.11 Ein- und Ausschlusskriterien (S. 29)
- 2.12 Probandenkollektiv (S. 29)
 - 2.12.1 Patientengruppe (S. 29)
 - 2.12.2 Kontrollgruppe (S. 34)

3. Ergebnisse

- 3.1 Deskriptive Statistik der Ergebnisse aus Aggregation, MDA- und TXB₂-Assay (S. 35)
 - 3.1.1 Ergebnisse mit ARA aus Aggregation, MDA- und TXB₂-Assay (S. 35)
 - 3.1.1.1 Aggregation mit ARA (S. 35)
 - 3.1.1.2 Thrombozytäre Freisetzung von MDA nach ARA-induzierter Aggregation (S. 38)
 - 3.1.1.3 Thrombozytäre Freisetzung von TXB₂ nach ARA-induzierter Aggregation (S. 40)

- 3.1.2 Ergebnisse mit TRAP6 aus Aggregation, MDA- und TXB₂-Assay (S. 42)
 - 3.1.2.1 Aggregation mit TRAP6 (S. 42)
 - 3.1.2.2 Thrombozytäre Freisetzung von MDA sowie TXB₂ nach TRAP6-induzierter Aggregation (S. 45)
- 3.2 Vergleich von MDA-Assay mit LTA und TXB₂-ELISA (S. 49)
 - 3.2.1 Vergleich der Ergebnisse von Aggregation, MDA- und Thromboxan-Assay nach Stimulation mit ARA mittels Korrelationsanalyse (S. 49)
 - 3.2.1.1 Korrelation zwischen der thrombozytären Freisetzung von MDA nach ARA-induzierter Aggregation und der Aggregation mit ARA (S. 49)
 - 3.2.1.2 Korrelation zwischen der thrombozytären Freisetzung von MDA und TXB₂ nach Aggregation mit ARA (S. 51)
 - 3.2.1.3 Korrelation zwischen der thrombozytären Freisetzung von TXB₂ nach ARA-induzierter Aggregation und der Aggregation mit ARA (S. 52)
 - 3.2.2 Vergleich der Ergebnisse von Aggregation, MDA- und Thromboxan-Assay nach Stimulation mit TRAP6 mittels Korrelationsanalyse (S. 54)
- 3.3 Prüfung des Einflusses von Alter und Geschlecht als mögliche Störfaktoren (*Confounder*) der Korrelationsanalyse (Partielle Rangkorrelation nach Spearman) (S. 56)
 - 3.3.1. Alter (S. 56)
 - 3.3.2 Geschlecht (S. 56)
- 3.4 Darstellung der Aspirin-*Nonresponse* durch den MDA-Assay (S. 57)
 - 3.4.1 Unterscheidung *Responder* vs. *Nonresponder* (S. 57)
 - 3.4.1.1 Unterscheidung der Werte von *Respondern* und *Nonrespondern* in den Ergebnissen des MDA- sowie TXB₂-Assays aus der Aggregation mit ARA (S. 57)
 - 3.4.1.2 Unterscheidung der Werte von *Respondern* und *Nonrespondern* in den Ergebnissen des MDA- sowie TXB₂-Assays aus der Aggregation mit TRAP6 (S. 58)
 - 3.4.2 Plasmakonzentrationen von Metamizol und dessen Metaboliten (S. 59)
 - 3.4.3 *Receiver-Operator-Characteristics* („ROC“)-Analyse MDA-Assay (S. 60)
 - 3.4.3.1 ROC-Analyse für den MDA-Assay aus der Aggregation mit ARA (S. 60)
 - 3.4.3.1.1 a) und b) *Cut-off*-Bestimmung MDA-Assay mit ARA (S. 61)
 - 3.4.3.2 ROC-Analyse für den MDA-Assay aus der Aggregation mit TRAP6 (S. 63)
 - 3.4.4 ROC-Analyse TXB₂-Assay (S. 63)
 - 3.4.4.1 ROC-Analyse für den TXB₂-Assay aus der Aggregation mit ARA (S. 63)
 - 3.4.4.1.1 a) und b) *Cut-off*-Bestimmung TXB₂-Assay mit ARA (S. 65)
 - 3.4.4.2 ROC-Analyse für den TXB₂-Assay aus der Aggregation mit TRAP6 (S. 66)

4. Diskussion

- 4.1 Kritische Betrachtung des Studiendesigns (S. 67)
- 4.2 ASS-*Nonresponse* im MDA-Assay- eine Frage der Definition (S. 68)
- 4.3 Probleme der individualisierten Thrombozytenfunktionstestung (S. 70)
- 4.4 Der fluorometrische MDA-Assay (S. 71)
- 4.5 Kritische Beurteilung der Darstellung verschiedener Aspekte in den Assays (S. 75)
 - 4.5.1. *Response* vs. *Nonresponse* (S. 75)

- 4.5.2 Thromboxan und MDA als Biomarker für die Thrombozytenaktivierung (S. 77)
- 4.5.3 Hemmung durch Terbogrel (S. 78)
- 4.5.4 Aggregationsstimulus TRAP6 (S. 79)
- 4.6 Mögliche Ursachen der ASS-Nonresponse in dem untersuchten Patientenkollektiv (S. 79)
 - 4.6.1 *Noncompliance* (S. 79)
 - 4.6.2 Pharmakokinetik (S. 80)
 - 4.6.3 Interagierende Arzneimittel: Beispiel Metamizol (S. 80)
 - 4.6.4 Interagierende Arzneimittel: Beispiel andere *Non-steroidal Antiinflammatory Drugs* (NSAID) (S. 83)
 - 4.6.5 Interagierende Arzneimittel: Beispiel Protonenpumpeninhibitoren (S. 84)
 - 4.6.6 Inflammation (S. 85)
 - 4.6.7 Alter und Geschlecht (S. 86)
 - 4.6.8 Rauchen (S. 86)
 - 4.6.9 Komorbiditäten (S. 87)
- 4.7 Klinische Relevanz der ASS-Nonresponse (S. 87)
- 4.8 Schlussfolgerungen (S. 92)

5. Literatur- und Quellenverzeichnis

6. Anhang

- 6.1 ROC-Analyse MDA-Assay
 - 6.1.1 Koordinaten der ROC-Kurve
 - 6.1.2 Berechnung der Testgütemaße für ausgewählte *Cut-Offs* der ROC-Analyse für den MDA-Assay aus der Aggregation mit ARA
- 6.2 ROC-Analyse TXB₂-Assay
 - 6.2.1 Koordinaten der ROC-Kurve
 - 6.2.2 Berechnung der Testgütemaße für ausgewählte *Cut-Offs* der ROC-Analyse für den TXB₂-Assay aus der Aggregation mit ARA

7. Danksagung

1. Einleitung

1.1 Thrombozyten

Die wohl größte Rolle der zellkernlosen Thrombozyten (Blutplättchen) ist die Blutstillung und Aufrechterhaltung des Gefäßsystems durch Thrombenbildung, die sogenannte (sog.) Aggregation [1]. Wird die Gefäßwand verletzt, führt die freigelegte subendotheliale Matrix zur schnellen Thrombozytenrekrutierung, -aktivierung und -adhäsion [1]. Auf die Bildung dieses „weißen“ Thrombozytenthrombus, welcher die Gefäßläsion abdeckt, folgt die Aktivierung der Gerinnungskaskade. An deren Ende steht die Aktivierung von Thrombin und die Bildung eines stabilen Fibrinthrombus [2].

Thrombozyten interagieren über zahlreiche Membranrezeptoren [3, 4] mit Adhäsionsproteinen der extrazellulären Matrix, welche sie aktivieren. Zu diesen zählen als stärkste Aktivatoren Kollagen [5], da es gleichzeitig Adhäsion als auch Aktivierung fördert [6] und der von Willebrand Faktor [4, 7, 8]. In aktivierten Thrombozyten laufen zahlreiche Signalwege ab, wodurch Produkte entstehen, die wiederum die Aggregation verstärken. Eine Schlüsselrolle spielt dabei Thromboxan (TX) A_2 , welches über mehrere Schritte aus Arachidonsäure entsteht und zur Exozytose proaggregatorischer Granula führt [9]. Es wirkt außerdem chemotaktisch und aktivierend auf Thrombozyten. Wirkungen von TXA_2 werden über einen G-Proteingekoppelten Rezeptor (siehe (s). Abschnitt (Abs.) 1.2) mit nachgeschalteten Signalkaskaden vermittelt. Positive Feedback-Mechanismen verstärken die biologischen Wirkungen von TXA_2 [10]. Über die Freisetzung prokoagulatorischer Granula-Inhaltsstoffe und Veränderung der Thrombozytenoberfläche wird auch die Gerinnungskaskade aktiviert [2, 11].

1.2 Prostaglandine

Thromboxan zählt zu den Prostaglandinen, eine Untergruppe der Eikosanoide von der Arachidonsäure (AA) abstammend. Sie sind ungesättigte Fettsäuren deren Grundgerüst aus 20 Kohlenstoffatomen und mit Ausnahme von Thromboxan einem Zylopentanring besteht [12]. Prostaglandine entfalten ihre Wirkung vor allem lokal autokrin und parakrin. Sie werden nicht gespeichert, sondern erst durch aktivierende Signale produziert [13, 14]. Sie wirken nur kurz (Minuten), weshalb sie analytisch über ihre Abbauprodukte gemessen werden [12].

Zu Beginn der Prostaglandin-Biosynthese wird die C_{20} -Fettsäure Arachidonsäure (AA) durch die Phospholipasen A_2 oder C freigesetzt [12, 13]. Die Prostaglandin- H_2 -Synthase 1 oder 2 (PGH₂-Synthase 1/2) beziehungsweise (bzw.) Cyclooxygenase 1 oder 2 (COX-1/-2) setzen sie weiter um zu Prostaglandin H_2 (PGH₂) [15, 16]. Die Cyclooxygenaseaktivität katalysiert dabei die Umwandlung von AA zu Prostaglandin G_2 (PGG₂) und die Peroxidaseaktivität weiter zu PGH₂ [17] (s. Abbildung (Abb.) 1). Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Cyclooxygenasereaktion ist die Umwandlung von Tyrosin an Position 385 der Cyclooxygenase zu einem Tyrosilradikal [18-20]. Serin 530 wiederum ist der Angriffspunkt von Aspirin. Diese

Aminosäure ist für die Bildung der korrekten stereochemischen Struktur von PGG₂ bedeutsam [21]. PGH₂ wird von gewebespezifischen Synthasen weiter zu den biologisch aktiven Prostaglandinen Thromboxan A₂ (TXA₂) (s. Abb. 1), Prostaglandin I₂ (PGI₂), Prostaglandin E₂ (PGE₂), Prostaglandin F_{2α} (PGF_{2α}) und Prostaglandin D₂ (PGD₂) umgesetzt [13, 22]. TXA₂ und PGI₂ (Prostacyclin) werden dabei auch spezialisierte Prostaglandine genannt, da sie nur an bestimmten Orten produziert werden [12].

Neben den Prostaglandinen werden aus der Arachidonsäure über die Lipoxygenasen die Leukotriene hergestellt, die vor allem im Rahmen von Entzündungsreaktionen eine Rolle spielen [13, 23].

Obwohl die COX-1 und -2 –Isoenzyme in ihrer Struktur zu 60% identisch sind, unterscheiden sie sich erheblich in ihren Funktionsbereichen. Die COX-2 wird vor allem „akut“ während Krankheitsprozessen durch Reize wie Endotoxine, Wachstumsfaktoren oder Zytokine gebildet [15], während die COX-1 eher dauerhaft im Körper ablaufende physiologische Prozesse wie die Magenprotektion und die Blutstillung abdeckt [17]. Warum unterschiedliche Cyclooxygenase-Isoformen existieren, ist unbekannt [20]. Eine 2002 entdeckte weitere Isoform; die COX-3; ist Gegenstand der Forschung [24].

Die proaggregatorische Wirkung von TXA₂ auf Blutplättchen wurde 1975 von Hamberg *et alia* (*et al.*) entdeckt [25]. TXA₂ und dessen physiologischer Gegenspieler PGI₂ sind eingebunden in die Regulation des Gefäßsystems sowie der Hämostase [26]. Sie stellen daher einen Angriffspunkt für die Therapie kardiovaskulärer Krankheiten dar [27]. Das antiaggregatorische und vasodilatatorische PGI₂ wird dabei vor allem durch Endothelzellen über die COX-2 gebildet [28], während Thrombozyten mit ihrer COX-1 den proaggregatorischen und vasokonstriktiven Gegenspieler TXA₂ freisetzen [12, 29]. Doch auch andere Zellen wie Neutrophile Granulozyten oder Makrophagen sind in der Lage TXA₂ zu bilden [30], während glatte Muskelzellen neben Endothelzellen eine weitere Quelle von Prostacyclin sind [31]. TXA₂ wirkt über einen Gq- [10, 32] und G12/13-gekoppelten [33] Rezeptor, welcher auch andere Prostaglandine wie PGH₂ bindet [10]. Während der Thromboxansynthese entsteht auch MDA (s. Abb. 1 bzw. Abs. 1.3.) Einfluss auf das kardiovaskuläre System haben auch die Prostaglandine E₂ [34], PGD₂ und PGF_{2α} [12, 35]. Da Prostaglandine daneben involviert sind in den Stoffwechsel der Niere, Knochen, Nerven und Ovarien kann medikamentöse COX-Hemmung zahlreiche andere, vom kardiovaskulären System unabhängige Wirkungen hervorrufen [14, 34]

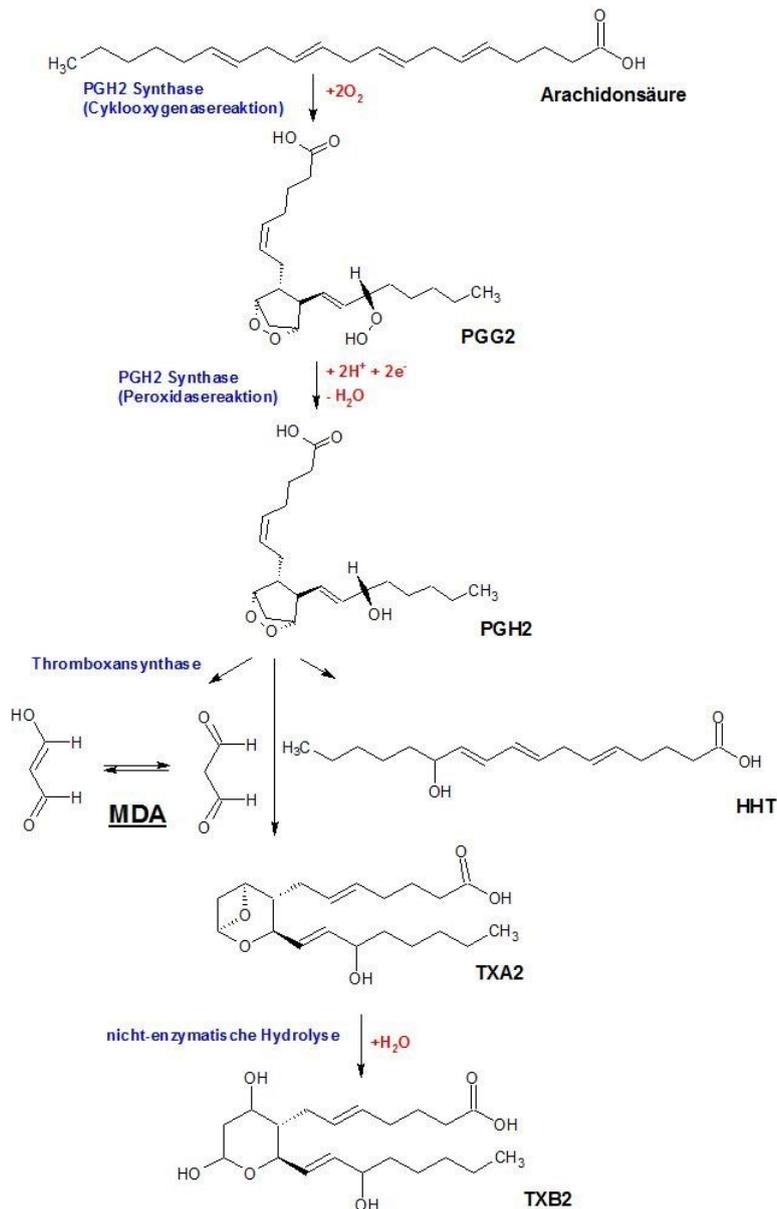


Abb. 1: Biosynthese der Prostaglandine: Darstellung der chemischen Struktur der Prostaglandine. Aus der Arachidonsäure bildet die PGH₂-Synthase über PGG₂ das Produkt PGH₂. Dieses wird durch die Thromboxansynthase umgesetzt zu TXA₂, wobei als Nebenprodukte 12-Heptadecatriensäure (HHT) und Malondialdehyd (MDA) entstehen. TXA₂ wird schnell nicht-enzymatisch zu TXB₂ hydrolysiert.

1.3 MDA

MDA entsteht während der Prostaglandinbiosynthese neben TXA₂ und HHT bei der Umwandlung von PGH₂ durch das Cytochrom P450-Enzym Thromboxansynthase [36] (s. Abb. 1). Hecker *et al.* postulierten 1986, dass man daher spektroskopisch HHT oder MDA als indirekte Biomarker für die Synthese von TXA₂ verwenden kann [37], da diese Stoffwechselprodukte im selben Verhältnis zueinander gebildet werden [36, 38]. Die Plasma-MDA-Konzentration könnte daher auch ein Biomarker der Cyclooxygenaseaktivität sein [39]. MDA ist eine kurzkettige schwache Säure (pKa: 4,46), welche in Lösung zwischen zwei isomeren Formen wechselt [40] (s. Abb. 1). Sie entsteht auch bei der Autooxidation von Lipiden [41], welche unter anderem für Alterung und Arterioskleroseentstehung verantwortlich ist

[39, 42] (s. Abs. 4.5.2). Der Prozess der Lipidperoxidation kann daher mithilfe der Bestimmung von MDA quantifiziert werden [40]. MDA zeigt starke chemische Reaktivität und kann sowohl als Nucleophil als auch Elektrophil Addukte mit anderen Molekülen bilden [40]; unter anderem auch mit Zellproteinen der Thrombozyten [38].

Hinsichtlich der spektroskopischen Messung von MDA ist besonders ein Addukt interessant, welches MDA mit der nucleophilen Thiobarbitursäure (TBA) im Verhältnis 1:2 eingeht. Da dieses Addukt UV-Licht stärker absorbiert als MDA selbst, kann durch die spektroskopische Messung dieses rötlich gefärbten Adduktes auf die MDA-Konzentration zurückgeschlossen werden (s. Abs. 2.7) [40]. Die Reaktion von TBA und MDA wurde erstmals 1951 von Patton *et al.* im Detail identifiziert [42], während zuvor das mit TBA reagierende Molekül Kohn *et al.* noch unbekannt war [43].

Durch die Bestimmung von MDA könnte es möglich sein, die hemmende Wirkung von Hemmstoffen der Cyclooxygenase wie ASS oder NSAID-Analgetika zu quantifizieren [44]. In Abhängigkeit von der ASS-Dosierung lässt sich bereits innerhalb von 24 Stunden die MDA Produktion in den Thrombozyten fast vollständig unterdrücken sowie das Plasma-MDA-Level um 23% reduzieren. Anschließend dauert es in etwa eine Woche, infolge des circa (ca.) zehntägigen Lebenszyklus der Thrombozyten, bis sich die Spiegel wieder erholen [39]. Spektrofluorometrische Studien wie die von Dannhardt *et al.* konnten eine typische Kinetik der MDA-Bildung herausarbeiten, bei der nach etwa zwei Minuten die Kurve der MDA-Neubildung abflacht und nicht weiter zunimmt. Dies liegt unter anderem daran, dass die Cyclooxygenase und Thromboxansynthase einem negativen Rückkopplungsmechanismus unterliegen [45]. Da die Messung von Thromboxan als Biomarker für die individuelle Thrombozytenfunktionshemmung durch ASS angesehen werden kann, soll in dieser Arbeit evaluiert werden, ob die Messung der thrombozytären MDA-Synthese ebenfalls Aussagen über die Hemmung der Thrombozyten durch ASS zulässt [46-48] .

1.4 ASS

Die kardioprotektive Wirkung der ASS (Aspirin®) wurde Mitte des 20. Jahrhunderts entdeckt [49]. Die Erforschung ihrer Wirkung auf die Prostaglandinsynthese wurde im Jahr 1982 mit dem Nobelpreis gewürdigt. Präventiv scheint sie über die analgetische und antithrombotische Wirkungen hinaus auch auf die Entstehung bestimmter Tumore (zum Beispiel (z.B.) kolorektaler Karzinome) zu wirken [49, 50].

ASS hemmt durch die Acetylierung von Serin 530 des COX-Enzyms das *Docking* des Substrats Arachidonsäure am aktiven Zentrum [19, 51]. Da diese Hemmung irreversibel ist und Thrombozyten kernlos sind, hält die Wirkung über die Lebensdauer der Thrombozyten von 7-10 Tagen an [29]. Schon niedrige Tagesdosen von 75-150 mg (*“low-dose ASS“*) hemmen Thrombozyten suffizient durch Hemmung der Thromboxansynthese [51]. Erst in höheren Dosen bzw. hoch frequentierter Gabe tritt die schmerzmildernde und

entzündungshemmende Wirkung ein, zu der auch eine COX-2-Hemmung beiträgt [49, 51]. Möglicherweise beeinflusst ASS auch die Genexpression der COX-2 [49]. Während ASS bevorzugt die COX-1 hemmt, gibt es andere NSAID-Analgetika („Coxibe“), die vor allem die COX-2 Isoform hemmen, basierend auf dem Angriff an deren strukturelle Besonderheiten [52].

1.5 Arteriosklerose und KHK

Die Arteriosklerose ist ein chronischer Entzündungsprozess der Intima der Blutgefäße, der zu endothelialen Ablagerungen von Bindegewebsbestandteilen wie Kollagen und Lipiden führt [53]. Pathogenetisch beschreiben einige Autoren die Entstehung aus sog. „*fatty streaks*“ an der Gefäßwand, die sich zu Plaques mit fibröser Kappe weiterentwickeln [53]. Diese können verkalken [54] und zu rupturieren drohen, dann als sog. „vulnerable“ Plaques [55]. Plaqueerosionen oder –rupturen können zu akut lebensbedrohlichen thrombotischen Gefäßverschlüssen führen [56]. Thrombozyten sind hierbei pathogenetisch bedeutsam [57], da sie durch den stark Arteriosklerose-induzierenden Inhalt rupturierter Plaques aktiviert werden [58]. Viele Autoren gehen daneben von einer globalen Entzündungsreaktion in den Koronargefäßen aus [59, 60].

Aus der Arteriosklerose der Koronargefäße kann sich die KHK entwickeln. Die Einengung des Gefäßdurchmessers durch Plaques führt hierbei zur insuffizienten Blutversorgung und relativem Sauerstoffmangel des Myokards [61]. Bei Beginn der Beschwerden, meist als *Angina pectoris*, liegt oft schon eine siebzigprozentige (70%) Lumeneinengung sowie ein verdoppeltes Komplikationsrisiko vor [62, 63]. Die pectanginösen Beschwerden lassen sich nach der *Canadian Cardiovascular Society (CCS)*-Skala in vier Klassen einteilen. Mit steigender CCS-Klasse nimmt die Mortalität, das Reinfarktrisiko, sowie der Einsatz von Revaskularisationsmaßnahmen zu [64]. Darüber hinaus kann sich die KHK als Akutes Koronarsyndrom, Herzinsuffizienz und Störung des Herzrhythmus bis hin zum (plötzlichen) Herztod äußern [65]. Die Schwere der Herzinsuffizienz kann in einem Symptomscore der *New York Heart Association (NYHA)* erfasst werden. Auch hier zeigt sich ein stark positiver Zusammenhang zwischen Symptomschwere und *Outcome* [66, 67].

Aktuell sind in den Industrienationen kardiovaskuläre Krankheiten und deren akute Auswirkungen wie der ischämische Myokardinfarkt (MI) und der *Apoplex* Todesursache Nummer eins [57, 68]. In den USA starben 2013 über 2200 Menschen täglich an kardiovaskulären Ereignissen, davon ein Drittel jünger als 75 Jahre [69], was nach Prognosen von Murray *et al.* auch in Zukunft so bleiben wird [70]. Die *Disability-adjusted life years (DALY)*, die ein Bewohner einer europäischen Industrienation durchschnittlich an einer kardiovaskulären Krankheit leidet, betragen 22 Jahre [70]. In der *Global burden of disease study* von 2010 zeigte sich, dass durch die koronare bzw. ischämische Herzkrankheit neben Rückenschmerzen für Patienten in Deutschland die meiste Lebensqualität verloren geht [71].

Nach dem Gesundheitsbericht des Robert-Koch-Institutes nimmt die Lebenszeitprävalenz der KHK mit dem Alter zu von 0,7% bzw. 0,9% bei den unter 30-jährigen Frauen bzw. Männern bis hin zu 35,1 % bzw. 40,0 % ab einem Alter von 75 Jahren [72]. Wirtschaftlich belastet die KHK das Gesundheitssystem stark und nahm z.B. in Deutschland 2015 mit 46,4 Milliarden Euro 13,7% der gesamten Krankheitskosten von 338 Milliarden Euro ein [73].

Zu den Hauptrisikofaktoren für KHK zählen *Low-density* Lipoprotein (LDL)-Cholesterin-Erhöhung bzw. *High-density* Lipoprotein (HDL)-Cholesterin-Erniedrigung, arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus (DM), Nikotinabusus, KHK bzw. Herzinfarkt bei Verwandten 1. Grades vor dem 55./56. (m/w) Lebensjahr und ein Lebensalter über 45 bzw. 55 Jahren (m/w) [74]. Die Kombination der Risikofaktoren Adipositas, Dyslipoproteinämie (Triglyzeriderhöhung und HDL-Erniedrigung), Hypertonie und Glukosetoleranzstörung bzw. *Diabetes mellitus* Typ 2 bezeichnet man als „metabolisches Syndrom“ [75].

Die Therapie der KHK gliedert sich in kausale sowie symptomatische Therapie. Lebensstiländerung, Risikofaktorelimination, Medikamente wie die drei letalitätssenkenden Gruppen ASS/Clopidogrel, Betablocker und Statin, Antiangiensa, als auch Revaskularisationsmaßnahmen sind Teile davon [76, 77].

Die Thrombozytenfunktionshemmung ist durch die zentrale Rolle der Zellen bei der Thrombogenese ein wichtiger Therapiebaustein [58, 78]. ASS ist dabei an erster Stelle zu nennen. Es ist das bisher am meisten erforschte plättchenhemmende Medikament. Schwerpunkte des Einsatzes der *low-dose*-Therapie sind die Sekundärprophylaxe bei manifester KHK, nach perkutaner transluminaler Koronarangioplastie (PTCA) mit *Stent*-Einsatz, nach herzchirurgischen Interventionen sowie bei stabiler und instabiler Angina pectoris [79]. Bei ASS-Dosierungen von 75-100mg ist das Gleichgewicht zwischen effizienter Prävention und Beschränkung der Nebenwirkungen (vor allem Blutungen) optimal [79, 80].

In der Primärprophylaxe ist das Blutungsrisiko unter ASS laut einer Metaanalyse der *Antithrombotic Trialists Collaboration* um den Faktor 1,54 und unter Sekundärprophylaxe um 2,69 erhöht [81].

In Metaanalysen sowie in Einzelstudien lassen sich unter Sekundärprophylaxe mit Plättchenhemmern etwa 25% weniger lebensgefährliche kardiovaskuläre Krankheitsereignisse (nichttödlicher MI und Schlaganfall sowie Tod durch kardiovaskuläres Ereignis) verzeichnen [82-84]. Zusammengenommen wird die kardiovaskuläre Mortalität durch ASS um 15% gesenkt, die Gesamtmortalität um ein Sechstel [85] und die kardiovaskuläre Morbidität um 30% [86]. Die Risikoreduktion für den MI einzeln betrachtet beziffert sich auf ca. 34%; für den Schlaganfall auf 25% [85]. In einer Metaanalyse mit 40.000 Patienten zu dem frühen Einsatz von ASS bei akuter zerebraler Ischämie zeigte sich eine Reduktion der Mortalität sowie des Auftretens weiterer Schlaganfälle von 9,1% auf 8,2% [87].

Der Einsatz von ASS in der Primärprävention ist stark umstritten. 2018 konnten die ASPREE- [88] sowie die ARRIVE-Studie [89] keinen Vorteil durch primärpräventive ASS-Einnahme

feststellen, während die ASCEND-Studie, die an Diabetes vorerkrankte Patienten untersuchte, diesen nachweisen konnte [90]. In diesen Studien zeigte sich jedoch ein vermehrtes Blutungsrisiko. Ältere Patienten scheinen von dem präventiven Effekt mehr zu profitieren als jüngere, während die Einflüsse von Diabetes und Geschlecht nicht eindeutig sind [91]. ASS ist aktuell in den ESC-*Guidelines* zur Primärprävention nicht empfohlen [92], während das *American College of Cardiology (ACC)/ die American Heart Association (AHA)* ASS für Hochrisikopatienten zwischen 40 und 70 Jahren, die nicht blutungsgefährdet sind, empfiehlt. Eine andere weitflächig eingesetzte Gruppe von Plättchenhemmern sind die Antagonisten des Adenosindiphosphat (ADP)-Rezeptors P2Y₁₂, bestehend aus den Thienopyridinen Ticlopidin [93], Clopidogrel und Prasugrel [94, 95], sowie dem chemisch anders strukturierten, reversiblen P2Y₁₂-Antagonist Ticagrelor [96-98].

Aufgrund stärkerer Wirksamkeit wird eine „duale“ Plättchenhemmung von ASS in Kombination mit einem P2Y₁₂-Antagonist empfohlen [83, 99]. Neben Clopidogrel [100-104] kommen die stärker und schneller wirksamen Substanzen Prasugrel oder Ticagrelor zum Einsatz [94, 96, 99, 105, 106]. Für die Akutbehandlung steht seit kurzem Cangrelor zur Verfügung [107]. Im Falle einer Indikation für orale Antikoagulation kann eine antithrombotische Dreifachkombination sinnvoll sein [99]. Unter dem relativ neuen Medikament Vorapaxar, ein Hemmer des thrombozytären Protease-aktivierten Rezeptors 1 zeigte sich in einer Studie von Theroux *et al.* eine signifikante Reduktion der Mortalität und Morbidität gegenüber Placebo, jedoch unter vermehrten Blutungskomplikationen [108].

Seltener werden die GP IIb/IIIa-Hemmer Abciximab, Tirofiban und Eptifibatid bei Hochrisikopatienten eingesetzt [109]. Die duale Plättchenhemmung mit ASS als festem Bestandteil ist jedoch Therapie der Wahl [110].

1.6 „ASS-Nonresponse“

Auch unter Antiplättchentherapie mit ASS allein oder in Kombination mit P2Y₁₂-Hemmern kommt es bei einem Anteil kardiologischer Patienten zu arteriothrombotischen Ereignissen [111]. Innerhalb von zwei Jahren betrifft dies bis zu 18% [112]. Dies wird als „ASS-Nonresponse“ bzw. „ASS-Resistenz“ bezeichnet. Die Definitionen und Angaben zur Häufigkeit variieren in der Literatur erheblich (s. Tabelle (Tab.) 1).

Häufigkeit bei KHK	<p>ASS-Nonresponse</p> <ul style="list-style-type: none"> - Prävalenz 5-45%; erneute arteriothrombotische Ereignisse in 2 Jahren 8-18% [112] - Prävalenz 12.7-15,3% [113] - Protektivitätsrate ASS 25% [114] <p>ASS-Clopidogrel-Nonresponse</p> <ul style="list-style-type: none"> - Prävalenz 1-45% [111] - Prävalenz 50% von 12.7-15,3% [113] - Inzidenz 6% [115]
Weiteres Vorkommen von ASS-Nonresponse	<p>Periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK) [112, 116, 117]</p> <p>zerebrovaskuläre Verschlusskrankheit (cAVK) [112, 117-122] 3-62%</p> <p>Gesunde [112, 117]</p> <p>pAVK / zerebrovaskuläre Verschlusskrankheit/ Gesunde [112] 60%/ 25-36%/ 8,6%</p>

Tab. 1: Häufigkeit von ASS-Resistenz: Übersicht über die Häufigkeit von ASS-Resistenz bzw. -*Nonresponse* in Prozent [%] in verschiedenen Publikationen bei Patienten mit kardiovaskulären Krankheiten.

Wodurch *ASS-Nonresponse* entsteht ist nicht abschließend geklärt. Erklärungsansätze beziehen sich auf *Noncompliance*, was bis zu 10% der Patienten betrifft [123], Komorbiditäten, Interaktionen mit Arzneimitteln, patientenbezogene Faktoren wie Absorption und Metabolisierung, genetische Polymorphismen der Cyclooxygenasen und Mechanismen auf zellulärer Ebene (s. Tab. 2).

Allgemeine Faktoren	<ul style="list-style-type: none"> - <i>Noncompliance</i> [123] - Weibliches Geschlecht [124] - Alter >65 [125] (KHK), Alter [126] (<i>Apoplex</i>) - Rauchen (Plättchen aggregieren verstärkt) [127] - Inflammation [128]
Klinische Parameter	<ul style="list-style-type: none"> - BMI > 25 kg/m² [129] - Hyperlipidämie [130]
Begleiterkrankungen	<ul style="list-style-type: none"> - <i>Diabetes mellitus</i> [131] - Niereninsuffizienz [132-134] - Reduzierte LV-Funktion [125] - Akutes Koronarsyndrom [135]
Genetik	<ul style="list-style-type: none"> - 1622A/G Mutation des P2Y₁-Rezeptors und weitere, Genpolymorphismen [136] - Veränderungen an <i>Single Nucleotid</i> Polymorphismen [137]
Komedikation	<ul style="list-style-type: none"> - Insulin bei <i>DM II</i> [138] - NSAID [139]

	<ul style="list-style-type: none"> - Metamizol [140] - Pantoprazol [141]
Zelluläre Mechanismen	<ul style="list-style-type: none"> - Hoher Anteil zur COX-Synthese fähigen, <i>messenger</i> RNA (mRNA)-enthaltenden Thrombozytenvorläuferzellen bei erhöhtem Thrombozytenumsatz [142, 143]

Tab. 2: Nonresponse-Ursachen: In der Literatur diskutierte Ursachen für ASS-Nonresponse.

Thrombozytenvorläuferzellen, die im Gegensatz zu den reifen Thrombozyten einen Zellkern besitzen, wie auch andere Zellen, sind in der Lage ASS-unabhängig Thromboxan zu synthetisieren bzw. dessen Wirkung zu unterstützen (s. Tab. 3).

ASS-unabhängige proaggregatorische Mechanismen	<ul style="list-style-type: none"> - Hoher Anteil zur COX-Synthese fähigen, mRNA-enthaltenden Thrombozytenvorläuferzellen [142, 144] - COX-2 in Makrophagen (durch ASS nicht inhibierbar) [145] - COX-2 Induktion in Endothelzellen durch polymorphe Leukozyten (PML), Monozyten und Interleukine [146, 147] - Proaggregatorische Wirkung von Erythrozyten [114] - Steuerung von Thrombin über Phosphorylierung von Proteinen [148]
---	--

Tab. 3: ASS-unabhängige proaggregatorische Mechanismen: Übersicht über diskutierte Mechanismen, die unabhängig von ASS zu ASS-Nonresponse führen können.

Daneben ist nicht zu vergessen, dass Thrombozyten über zahlreiche thromboxanunabhängige Mechanismen in die Thrombenbildung eingebunden sind, welche nicht durch ASS hemmbar sind und daher nicht in den Definitionsbereich der ASS-Nonresponse fallen (s. Abs. 1.1) [1-11].

1.7 Medikamenteninteraktionen mit ASS

Einige Medikamente sind in der Lage die ASS-Wirkung abzuschwächen. Dazu zählen einige NSAIDs wie Ibuprofen, welches die COX-1 nur reversibel hemmt und mit ASS um die Bindung im Bereich des aktiven Zentrums der COX-1 konkurriert (s. Abs. 4.6.4) [139]. Auch haben zahlreiche Voruntersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe gezeigt, dass Methylaminoantipyrin (MAA), der aktive Metabolit von Metamizol (z.B. Novalgin®), sowohl *in vitro* als auch *in vivo* spezifisch die Plättchenhemmung durch ASS herabsetzen kann (s. Abs. 4.6.3) [140, 149].

1.8 Klinische Auswirkungen der Nonresponse gegenüber ASS

Ein unabhängiger Zusammenhang zwischen verminderter Thrombozytenhemmung durch ASS und schwerwiegenden kardiovaskulären Ereignissen wurde erstmals 2002 von Eikelboom *et al.* gezeigt [150]. Die Studienlage ist aktuell nicht eindeutig (s. Abs. 4.7).

1.9 Thrombozytenfunktions- Assays

Die Methoden für die Bestimmung der Plättchenfunktion im Labor setzen an verschiedenen thrombozytären Aktivierungsmechanismen an [151]. Der Einsatzbereich reicht von der klinischen Diagnostik bis zum Medikamenten-Monitoring [152] (s. Tab. 4).

Die ersten Richtlinien zu Thrombozytenfunktionstests wurden bereits 1988 veröffentlicht und beinhalten die Blutungszeit, Plättchenadhäsionstests, turbodimetrische Aggregometrie sowie Tests zur Freisetzung von ADP, Adenosintriphosphat (ATP) und Serotonin aus den Thrombozyten [153]. Es kamen viele weitere *in vitro* Testmethoden hinzu wie beispielsweise die Durchflusszytometrie, Vollblutmethoden wie der Platelet Function Analyzer 100 (PFA-100®) oder die Bestimmung der thrombozytären Freisetzung von Thromboxan A₂ [151, 152].

Test	Vorteil	Nachteil	Sonstiges
Bleeding Time	- Einfach	- Niedrige Sensitivität - Störfaktoren	
Aggregation			
1. LTA	- Langzeiterfahrung - Viele Daten	- Kein Vollblut - Viel Material erforderlich - PRP-Präparation - Lange Dauer - Initialphase nicht abgebildet	Seit Jahrzehnten bewährter „Goldstandard“
2. Impedanz-aggregometrie	- Vollblut	- Viel Material erforderlich - Lange Dauer - Standardisierung schwierig - Initialphase nicht abgebildet	
3. PA-200	- Initialphase abgebildet - Weitere Messparameter - Physiologische Agonist-Konzentrationen	- Viel Material erforderlich	
4. VerifyNow® (RPFA)	- Vollblut - Wenig Material erforderlich - <i>Bedside</i> verfügbar - Vollautomatisch	- Mechanismen der Thrombozytenaktivierung unklar	
5. Multiplate®	- Vollblut - <i>Bedside</i> verfügbar - Verschieden definierte Agonisten	- Vergleichsweise teuer	
6. Plateletworks®	- Vollblut	- Wenig untersucht	
Durchflusszytometrie	- Vollblut - Wenig Material erforderlich	- Teuer - Lange Dauer - Kompliziert	Eher für Forschungszwecke

	- Auch bei niedrigen Thrombozytenzahlen möglich		
Thromboelastografie (TEG)	- Vollblut - Sekundäre Hämostase	- Komplexe thrombozytäre Aktivierungsmechanismen - Testergebnis überlagert sich mit Koagulation	
Impact®	- Vollblut - Wenig Material erforderlich - Einfach - Schnell - Schubspannung berücksichtigt	- Wenig untersucht	
PFA-100®	- Vollblut - <i>Bedside</i> verfügbar - Wenig Material erforderlich - Einfach - Schnell	- Komplexe thrombozytäre Aktivierungsmechanismen - Wenig Daten zum <i>Monitoring</i> von Thrombozytenfunktionshemmern	
TXB₂-ELISA	- Sehr spezifisch hinsichtlich der Hemmung durch ASS	- Teuer - Lange Dauer - Erfordert spezialisiertes Labor	

Tab. 4: Thrombozytenfunktionstests: Übersicht über eine Auswahl von Thrombozytenfunktionstests [25, 47, 48, 51, 111, 150-152, 154-200]. LTA = Lichttransmissionsaggregometrie, ELISA= *Enzyme-linked Immunosorbent Assay*, PA = *Platelet Agitator*, PFA = *Platelet Function Anlayzer*, RPFA = *Rapid Platelet Function Anlayzer*, TEG = Thromboelastografie

Die Blutungszeit nach einer kleinen Hautinzision wurde bereits anfangs des 19. Jahrhunderts entwickelt [158]. Trotz mangelnder Sensitivität, uneinheitlichem und umstrittenem Einsatz, Abhängigkeit von vielen Störfaktoren, geringer Aussagekraft, Invasivität und schlechter Standardisierung, wurde sie lange in einigen Kliniken nicht ersetzt [159, 161].

Aggregation

Die turbidimetrische LTA, welche von Born [162] und O'Brien [163] in den frühen 60er Jahren als Test auf Plättchenfunktionsstörungen entwickelt wurde, hat sich als historischer Goldstandard etabliert, der noch heute gilt [111, 151, 199]. Bei dieser Methode wird das Blut zunächst mit Citrat antikoaguliert. Anschließend werden dem durch Zentrifugation gewonnenen Plättchen-reichen Plasma (PRP) Agonisten zugesetzt und die Plättchen zur Aggregation angeregt. Oft wird hierfür Kollagen oder ADP gewählt [161]. Durch die zunehmende Plättchenaggregation nimmt die Lichtdurchlässigkeit der Probe zu, was durch ein Photometer erfasst und als Kurve registriert wird (s. Abs. 2.6) [152].

Neben der LTA gibt es die Impedanzaggregometrie, welche mit Vollblut durchgeführt wird. Sie greift Aspekte auf, die bei der LTA oft in der Kritik stehen: Die Aufwendigkeit der PRP-

Präparation sowie die eventuell verloren gehenden Einflussfaktoren durch die Separation des Plasmas von den anderen Blutbestandteilen [164]. Hierbei erfolgt die Messung der Plättchenaggregation durch Erfassung der elektrischen Impedanz durch zwei Elektroden, an denen die Plättchen bei der Aggregation haften [152]. Gleichzeitig lässt sich mit der Methode über Lumineszenz aus aktivierten Plättchen freigesetztes ADP messen. Die Ergebnisse korrelieren zum Teil mit denen der LTA [201], jedoch haben beide ihre Schwächen. So lässt sich die Impedanzaggregometrie nur schwer standardisieren und zeigt auf einige bewährte Agonisten nicht den erwartbaren Effekt [165]. Ein Problem beider Methoden ist, dass sich die sehr frühe Initialphase der Aggregation eventuell noch nicht zeigt [166, 167]. Ein Aggregometer welches dieses Problem aufgreift ist der Platelet Agitator 200 (PA-200) von Kowa aus Japan, welches mit dynamischer Lichtstreuung eines Lasers arbeitet und so sensitiver kleinere Aggregate detektieren kann [168]. Es arbeitet mit geringeren Konzentrationen der Agonisten, die denen im Körper ähnlicher sind [169] und kann weitere Parameter, wie den prozentualen Anteil der aggregierten Plättchen, erfassen [168]. Neben der langen Dauer der Impedanz- und Lichttransmissionsaggregometrie ist ein weiterer Nachteil, dass man viel Blutmaterial benötigt [151]. Im Kontrast dazu steht der sogenannte VerifyNow®-Test, auch Ultegra® *Rapid Platelet Function Analyzer* (RPFA) genannt (Accumetrics Inc. San Diego, USA), der kürzer, materialsparender und semiautomatisiert ist, wie die Impedanzaggregometrie in Vollblut durchgeführt wird und sich zur Überprüfung der Wirkung von Aspirin, P2Y₁₂-Hemmern und GP IIb-IIIa-Antikörpern eignet [170].

Andere Plättchenfunktionstests

Eine weitere Vollblut-Methode, die ein schnelles Ergebnis liefert, ist Plateletworks® (Helena Laboratories, Beaumont, USA) [171]. Dieser setzt die Thrombozytenzahl vor und nach der Aggregation ins Verhältnis und gilt ebenfalls als einsetzbar im *ASS-Monitoring*, ist allerdings noch nicht umfassend untersucht [151, 171, 172].

Die Durchflusszytometrie, ebenfalls eine Vollblutmethode, die eher aufwändig und teuer ist [173], wird in speziellen Einrichtungen ebenfalls angewandt [175]. Hierbei werden Oberflächenantigene der Plättchen, wie zum Beispiel Glykoprotein Ib oder Integrin β_3 , während des Durchflusses durch eine Kapillare mittels Fluoreszenzfarbstoff-markierter Antikörper über Laserlicht quantitativ erfasst [173]. Dadurch, dass nur wenig Testvolumen benötigt wird [174], ist das Einsatzfeld groß und schließt auch kritisch kranke Patienten mit niedrigen Thrombozytenzahlen [173] oder die Neonatalogie mit ein [176]. Allerdings erfordert die Vorbereitung ein spezialisiertes Labor und nimmt Zeit in Anspruch, weshalb der Einsatzschwerpunkt überwiegend in der Forschung liegt [151, 173, 174].

Eine weitere Vollblutmethode, die Thrombozytenfunktion und plasmatische Gerinnung einbezieht [177], ist die Thromboelastografie. Sie misst den Anteil der Thrombozyten an der Gesamtheit der Gerinnelbildung und betrachtet den Zusammenhang zur Fibrinbildung [178].

Weiterentwickelt, wie zum Beispiel von Craft et al., gibt es Varianten, mit denen die Überwachung der Therapie mit Plättchenhemmern möglich sein soll [183].

Der Impact® Cone and Platelet Analyzer (DiaMed, Cressier, Schweiz) ist ein Test, welcher an die Physiologie angenähert ist, da er die Schubspannung simuliert, die auf die Plättchen wirkt, während sie im Blutkreislauf zirkulieren [182]. Sie hat entscheidenden Einfluss auf die Plättchenaggregation und wird durch einen rotierenden Kegel erzeugt, was den Effekt der erhöhten Schubspannung in Arterien darstellen soll, die durch arteriosklerotische Plaques im Durchmesser verkleinert sind [8]. Diese Methode hat den Vorteil, eine Vollblutmethode zu sein, ist einfach durchführbar, zeitsparend und benötigt weniger als 1 ml Blutvolumen [181].

Die Schubspannung wird ebenfalls in dem Test PFA-100® (Siemens Healthcare Diagnostics Inc., Deerfield, USA) aufgegriffen, welcher die sog. „*in vitro closure time*“ (CT) bestimmt [184]. Hier wird die Verschlusszeit einer Kapillare durch die Scherkraft-aktivierte Bildung eines Thrombozytenaggregates bestimmt. Weitere Parallelen sind Vollblutmethode, einfache Durchführung wie Zeit- und Materialersparnis [152]. Der Test kann eine Reihe von Thrombozytendefekten aufdecken [152]. Er wird zum *ASS-Monitoring* eingesetzt, was umstritten ist, da die Studienergebnisse nicht eindeutig sind [184, 186]. Zum Clopidogrel-*Monitoring* eignet er sich nicht, eventuell jedoch für GPIIb-IIIa-Antagonisten [187]. CT-Verkürzung ist eventuell prognostisch bedeutsam für die Risikoabschätzung des Wiederauftretens eines Akuten Koronarsyndroms (ACS) [188] und könnte hilfreich sein zur Wahl der Aggregationshemmung vor PTCA [187].

Zuletzt ist die Messung von Thromboxan B₂ über den *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) oder der Thromboxanmetabolite aus dem Urin zu nennen [25, 189]. Serum-Thromboxan B₂ entsteht aus der aktiven, proaggregatorischen Form Thromboxan A₂, welche durch die COX-1 entsteht (s. Abs. 1.2) [25]. Anhand der quantitativen Bestimmung von Thromboxan kann somit speziell die pharmakologische Wirksamkeit von ASS überwacht werden, da ASS direkt an der COX-1 angreift. Dieser Test erreicht eine hohe Sensitivität [51, 151, 152] und Spezifität [154, 191, 192]. Er gilt als die spezifischste Methode um die Aspirin-induzierte Hemmung der Thrombozyten zu ermitteln [154].

Das biologisch aktive Thromboxan A₂ (TXA₂) kann nur schwer gemessen werden, da es kein zirkulierendes Hormon ist, sondern seine Effekte lokal ausübt und binnen Sekunden zu TXB₂ hydrolysiert wird. Daher wird TXB₂ gemessen. Auch dieses Molekül wird *in vivo* schnell renal eliminiert (HWZ 1-2 Minuten), weswegen die direkte Messung im Plasma schwierig ist [202]. TXB₂ entsteht durch Cyclooxygenasen an verschiedenen Stellen im Körper. TXB₂ -Werte in Patientenserum setzen sich vor allem aus dem durch *in vitro* Plättchenstimulation und zu geringem Anteil aus renal produziertem TXB₂ zusammen [203, 204]. Die in dieser Dissertation verwendete Methodik (s. Abs. 2.8); die Bestimmung der Serumthromboxanwerte nach vorheriger Stimulation mit Arachidonsäure; ist noch genauer, da so der plättchenexterne Ursprung des Thromboxans unwahrscheinlicher wird [194] und die plättchenspezifische

Thromboxanproduktion gemessen werden kann [193]. Einen standardisierten Grenzwert für Serum-TxB₂ in der Messung mittels ELISA gibt es bisher noch nicht (s. Abs. 4.3).

Im Gegensatz dazu ist die Bestimmung von Thromboxanmetaboliten im Urin weniger spezifisch für Thrombozyten, da Thromboxan hier zu einem größeren Anteil aus anderen Thromboxanquellen (z.B. Immunzellen) stammt [190]. Bei Bestimmung von Thromboxan im Urin ist ein Bezug auf die Kreatininkonzentration erforderlich [150].

Insgesamt bieten sich für das pharmakologische Monitoring der Wirkung von ASS am ehesten Methoden an, die auf einer thromboxanabhängigen Plättchenaktivierung beruhen. Dies sind zum Beispiel die Licht-Transmissions-Aggregation mit dem COX-1 spezifischen Agonist ARA als noch herrschender Goldstandard, sowie der für das *ASS-Monitoring* sehr spezifische Immuno-Assay für Thromboxan B₂ [111, 199].

1.10 Ziele der Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit soll als neue *Monitoring*-Methode der *low-dose-ASS*-Therapie der MDA-Assay evaluiert und eingeordnet werden.

Hierfür soll die ARA-induzierte MDA-Synthese sowie die Hemmung dieser durch Zusatz von *low-dose-ASS in vitro* dargestellt, analysiert (s. Abs. 3.2, 4.5) und mittels Korrelation verglichen werden mit dem TXB₂-ELISA-Assay, sowie der Arachidonsäure-induzierten LTA (s. Abs. 3.3). Mittels Partialkorrelation soll *Confounding* durch die Einflussgrößen Alter und Geschlecht (s. Abs. 3.4) ausgeschlossen werden.

Dass der MDA-Assay fähig ist, *Responder* gut von *Nonrespondern* zu unterscheiden soll anhand des nonparametrischen Mann-Whitney-U-Tests geprüft werden (s. Abs. 3.5.1). Mittels *Receiver Operator Characteristics*-Analysen soll darüber hinaus die Testgüte des MDA-Assays im Vergleich zum TXB₂-Assay überprüft werden (s. Abs. 3.5.3, 3.5.4.), sowie *Cut-off*-Werte für den MDA- sowie TXB₂-Assay ermittelt werden (s. Abs. 3.5.3.1.1, 3.5.4.1.1).

Darüber hinaus sollen die Fragen geklärt werden, welche Vor- und Nachteile der MDA-Assay im Vergleich zu anderen Plättchenfunktionstests hat und ob der MDA-Assay als zukünftige *Bedside*-Methode geeignet ist (s. Abs. 4.3, 4.4).

Weitergehend sollen mögliche *Nonresponse*-Ursachen im Patientenkollektiv diskutiert werden, vor allem im Hinblick auf die in früheren Untersuchungen der Arbeitsgruppe identifizierte pharmakologische Interaktion mit dem häufig verordneten Analgetikum Metamizol (s. Abs. 4.6). Dies soll anhand der Auswertung zahlreicher anamnestischer Daten sowie Begleiterkrankungen und verordneten Arzneimitteln (s. Abs. 3.1), einschließlich der Messung der Metamizolspiegel im Plasma mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC), erfolgen (s. Abs. 3.5.2).

Zuletzt soll die Arbeit mit der Diskussion der klinischen Bedeutsamkeit der individuellen Thrombozytentestung einen aktuellen Bezug nehmen (s. Abs. 4.7) und sich dabei auch mit der Frage der einheitlichen Definition der *ASS-Nonresponse* befassen (s. Abs. 1.6, 4.2).

2. Material und Methoden

2.1 Ethikvotum:

Im Rahmen dieser Dissertation wurden Blutentnahmen bei gesunden Probanden und Patienten der Klinik für Kardiologie, Pneumologie und Angiologie der HHU Düsseldorf durchgeführt, sowie Gesundheitsdaten von Patienten in pseudonymisierter Form gesammelt und verarbeitet. Alle Untersuchungen erfolgten strikt getrennt von der medizinischen Betreuung der Patienten und hatten auf diese keinen Einfluss. Vor Beginn der Untersuchung wurde ein positives Ethikvotum der Ethikkommission bei der Medizinischen Fakultät der HHU Düsseldorf eingeholt (Studennummer 4504, Tittel „Optischer Thromboxan-Assay zur Evaluation der Aspirin induzierten Hemmung der Thrombozytenfunktion“, interne Registrierungs-ID: 2014022184).

2.2 Erhebung klinischer Daten

Um mögliche Störgrößen zu erfassen und ihren möglichen Einfluss auf die MDA-Synthese zu evaluieren wurden verschiedene patientenspezifische Daten erhoben. Dazu zählen die oben genannten Risikofaktoren für KHK, klinische Risikoscores (CCS, NYHA), Medikation mit Thrombozytenfunktionshemmern, Antikoagulantien, Antidiabetika, Blutdrucksenkern, Lipidsenkern und Schmerzmedikation sowie Laborwerte. Die Daten wurden in pseudonymisierter Form gespeichert und ausgewertet.

2.3 Materialien

2.3.1 Substanzen

Aggregation und MDA Assay

Acetylsalicylsäure; D,L-Lysinacetylsalicylat (ASS), Aspirin® i.v.,	Bayer, Leverkusen, Deutschland
Arachidonsäure, ASPItest Multiplate®analysis (ARA), Artikelnummer: 06675816190	Roche, Rotkreuz, Schweiz
Arachidonsäure (ARA) Artikelnummer: #10AA	NatuTec, Oxford Biochemical Research, Michigan, USA,
Dimethylsulfoxid (DMSO) Artikelnummer: 27,04-1	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) Titriplex III Artikelnummer: 8418.0250	Merck, Darmstadt, Deutschland
Salzsäure (HCl) Artikelnummer: 6331	Roth, Karlsruhe, Deutschland
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES) Artikelnummer: H-3376	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Indometazin Artikelnummer: I7378-5G	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Kaliumchlorid (KCl)	Roth, Karlsruhe, Deutschland

Artikelnummer: p017.1	
Kaliumhydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄) Artikelnummer: 4873	Merck, Darmstadt, Deutschland
Magnesiumchlorid Hexahydrat (MgCl ₂ x 6H ₂ O) Artikelnummer: 1.05833.0250	Merck, Darmstadt, Deutschland
MilliQ Reinstwasser	Milli-Q-Brocel, Millipore, Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃) Artikelnummer: 1.06329.1000	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl) Artikelnummer: 1.06404.1000	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O), Artikelnummer: 6345	Merck, Darmstadt, Deutschland
1,1,3,3- Tetraethoxypropane (TEP) Artikelnummer: 1.800.854.0530, von ICN (ATNO: 156783)	MP Biomedicals, Santa Ana, California, USA
Terbogrel Artikelnummer: 121946	Boehringer Ingelheim, Ingelheim am Rhein, Deutschland
2- Thiobarbitursäure (TBA) Artikelnummer: T5500-25-6	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Thrombin-Receptor Activator Peptide 6 (TRAP6) Artikelnummer: T1573-5MG	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Trichloressigsäure (TCA) Artikelnummer: T6399-100G	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland

Tab. 5: Substanzen für Aggregation und MDA-Assay

TXB₂-ELISA

EIA Puffer	Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA. Item No. 400060
Waschpuffer	Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA, Item No .400062
TXB ₂ Standard	Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA, Item No. 419034
TXB ₂ AChE <i>Tracer</i>	Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA, Item No. 419030
TXB ₂ EIA Antiserum	Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA, Item No. 419032
Ellman's Reagent	Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA, Item No. 400050

Tab. 6: Substanzen für TXB₂-ELISA

HPLC

Natriumacetat (C ₂ H ₃ NaO ₂), Artikelnummer: 6268	Merck, Darmstadt, Deutschland
Acetonitril (C ₂ H ₃ N) Artikelnummer: 1.06688	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumazid (NaN ₃) Artikelnummer: 1.06688.0100	Merck, Darmstadt, Deutschland
Helium (Hausapotheke)	Linde-Gas, Pullach, Deutschland

Tab. 7: Substanzen für HPLC

2.3.2 Geräte

Blutentnahme

Butterflies BD <i>Vacutainer Safety-Lok, Blood Collection Set</i> , REF 367286,	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, New Jersey, USA
BD Citrat- <i>Vacutainer</i> REF 364305,	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, New Jersey, USA

Tab. 8: Geräte für Blutentnahme

Vorbereitung

Zentrifuge Minifuge RF	Heraeus Sepatech, Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Waage Model XS204 <i>DeltaRange</i>	Mettler Toledo, Columbus, Ohio, USA
Ph-Meter pH211 (für TM)	Hanna instruments, Woonsocket, Rhode Island, USA
Rührer magnetisch (für TM)	IKA Combimag RCT, Janke und Kunkel, Staufen im Breisgau, Deutschland

Tab. 9: Geräte zur Vorbereitung der Versuche

Aggregation und MDA-Assay

Tischzentrifuge 5415 R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Aggregometer APACKT	LABOR BioMedical Technologies, Ahrensburg, Deutschland
Schreiber Modell 621	Packard, Palo Alto, CA, USA
Pipetten pipetman 1000µl, 200µl, 20 µl	Gilson, Middleton, USA
Pipettenspitzen TipOneR, 200, 1000 µl	Starlabgroup
Mikroküvetten mit Rührstäbchen	DiaSys Greiner
Vortexmischer REAX 2000	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Fluoroscans Ascent	Labsystems, Vantaa, Finland
Mikroplatten 96 <i>Well</i>	ThermaLab Systems

Tab. 10: Geräte für Aggregation und MDA-Assay

TXB₂-ELISA

ACE™ Competitive EIA, Thromboxane B2 EIA <i>Kit</i>	Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA, Item No.: 519031
---	---

Tab. 11: Geräte für TXB₂-ELISA

HPLC

Trennsäule EC 125/4 Nucleodur C18 Pyramid, 3 µM Artikelnummer: REF 760260.40	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
Nanosep 3K Filter Omega	VWR-Merck (Pall)
LaChrom UV-VIS Detektor L7420	Merck Hitachi
LaChrom Pumpe L6200	Merck Hitachi

Tab. 12: Geräte für HPLC

Sonstiges

Eppendorfcups <i>Safe-Lock Tubes</i> , 2,0, 1,5, 0,5 ml, Eppendorf	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
--	---------------------------------

Falcon-Röhrchen CELLSTARR 15ml	Greiner bio-one, Kremsmünster, Oberösterreich
Statistiksoftware	<ul style="list-style-type: none"> - IBM® SPSS® Statistics, Version 20, Armonk, New York, USA - Microsoft® Excel®TM, Microsoft GmbH, Frankfurt, Deutschland
Literaturverwaltungsprogramm	Endnote 9.0, Clarivate Analytics, Philadelphia, Pennsylvania, USA

Tab. 13: Sonstige Geräte

2.3.3 Puffer und Lösungen

Thrombozytenmedium (TM):

134mM NaCl, 12mM NaHCO₃, 2,95mM KCl, 0,36mM NaH₂PO₄ x H₂O, 1mM MgCl₂ x 6H₂O, 5mM HEPES

pH 7,4

Phosphatpuffer:

0,01 mM KH₂PO₄, 0,05 mM NaH₂PO₄ x H₂O

pH 7,4

0,53% Thiobarbitursäure: in Phosphatpuffer gelöst

TCA:

20% in 0,6M HCl

EDTA:

77mM Titriplex III in MilliQ-Wasser

Indometazin:

50mM in Ethanol

ARA:

NatuTec Arachidonsäure: 1g gelöst in Ethanol absolut zu 100mM und unter Stickstoff gelagert. Nach versalzen mit Natriumhydroxid (NaOH)/ Ethanol (EtOH) unter Stickstoff und arbeitstäglich mit 50mM Tris-Puffer pH 7,4 zu einer 50mM Gebrauchslösung gelöst.

ASPItest von Roche: Lyophilisat in 300µl MilliQ-Wasser zu einer 50mM Gebrauchslösung gelöst.

Thrombin-Receptor-Activator Peptide 6 (TRAP6):

5mg mit MilliQ-Wasser zu einer Gebrauchslösung von 1,5 mM gelöst, aliquotiert und bei -20°C gelagert. Arbeitstäglich wurden frische *Aliquots* verwendet.

Terbogrel:

10mM Stammlösung in DMSO. Weiterverdünnung für die Aggregation mit DMSO zu 300µM Ausgangslösung.

Isokratischer Eluent für die Bestimmung von Metamizol mittels HPLC:

30mM Natriumacetat pH 5,6 / Acetonitril (v/v; 87:13%) / 0,02% NaN₃, heliumtast

ELISA Puffer:

Alle Lösungen für die Thromboxan B₂-Bestimmung wurden nach Herstellerangaben hergestellt [205].

2.4 Blutentnahme

Bei den Patienten erfolgte die Blutentnahme nach Aufklärung und Einwilligung durch einen Arzt im Rahmen der Routineblutentnahmen zur klinischen Diagnostik in der Klinik für Kardiologie, Angiologie und Pneumologie. Verwendet wurde ein Vakuumsystem mit *Butterfly* und Citrat-Entnahmeröhrchen. Den Probanden wurde, ebenfalls nach informierter Einwilligung, das Blut im Institut für Pharmakologie und klinische Pharmakologie durch einen Arzt abgenommen. Es wurden je ca. 20 ml venöses Vollblut mit Röhrchen abgenommen, in welchem Citrat (ACD) im Verhältnis 1:10 vorgelegt wurde.

2.5 Präparation des plättchenreichen und plättchenarmen Plasmas

Zunächst wurde durch zehnteilige Zentrifugation der Proben bei Raumtemperatur mit 270xg PRP als Überstand gewonnen und in ein Falcon Röhrchen überführt. Durch erneutes Zentrifugieren des verbliebenen Blutes um weitere zehn Minuten mit 1700xg wurde plättchenarmes Plasma (PAP) gewonnen.

2.6 LTA

Das Aggregometer bedient sich dem Prinzip der Photometrie (s. Abs. 1.9). Von einer Lichtquelle aus wird sichtbares Licht durch die in einem Ständer befindlichen Küvetten geschickt, welche die Proben mit PRP enthalten (s. Abb. 2). Die während der Aggregation zunehmende Lichtdurchlässigkeit der Proben wird von Photozellen auf der gegenüberliegenden Seite der Lichtquelle ermittelt und von einem Schreiber registriert, welcher die sich verändernde Lichtdurchlässigkeit als Aggregationskurve aufzeichnet. Moderne Aggregometer registrieren die Daten elektronisch, in unserem Fall haben wir einen Schreiber mit Papierausgabe verwendet. Das Aggregometer ist mit einem Heizelement ausgestattet, um die Temperatur der PRP-Proben auf 37°C zu halten, sowie mit einem magnetischen Rührer, der die Reagenzien vermischt und die für die Thrombozytenaggregation

nötige Scherkraft ausübt [206]

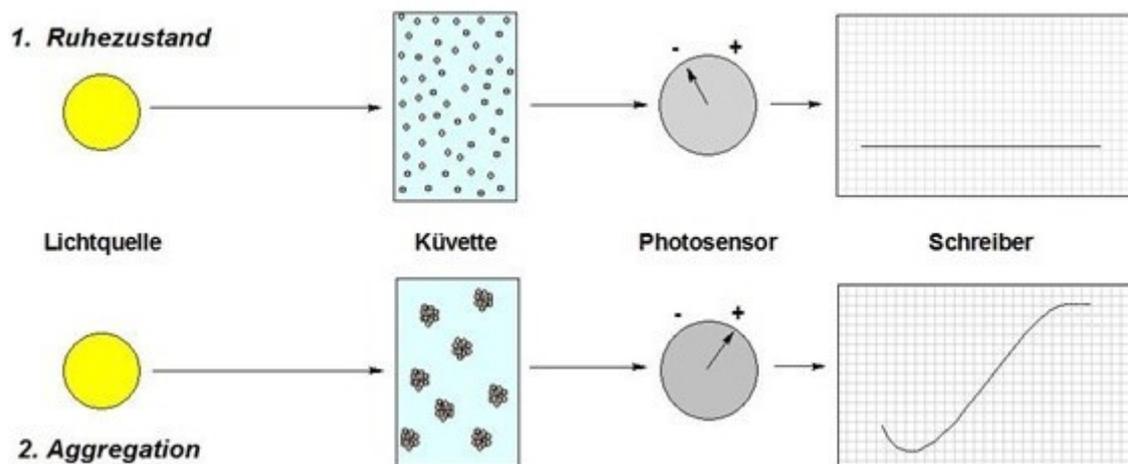


Abb. 2: Schematischer Aufbau der Lichttransmissionsaggregometrie: Die Lichtquelle (gelber Kreis links) schickt Licht durch die Messküvette (hellblauer Kasten mit Patientenprobe mittig links), in der sich die Proben befinden. Im Ruhezustand (s. 1. Ruhezustand) detektiert der Photosensor (grauer Kreis mittig rechts) kein durchlässiges Licht und der Schreiber (Kasten rechts) zeichnet keine Aggregationskurve auf. Während der Aggregation (s. 2. Aggregation) bilden die Thrombozyten Aggregate, wodurch die Messküvette im Verlauf lichtdurchlässiger wird, was vom Photosensor detektiert wird und vom Schreiber als Aggregationskurve aufgezeichnet.

Die vom Schreiber aufgezeichnete Aggregationskurve (s. Abb. 2) folgt dabei einem typischen Verlauf. Während die Thrombozyten im Aggregationsansatz einzeln vorliegen, ist die Lichtdurchlässigkeit am niedrigsten. Kurz nach Zugabe des Agonisten kommt es im Zuge der Thrombozytenaktivierung zu einem sogenannten *Shape Change* der Thrombozyten, einer Formveränderung, bei der sich aus den anfangs diskoiden Thrombozyten eine rundere Form mit Pseudopodien entwickelt, welche die Thrombusbildung unterstützen [207]. Dadurch fällt die Lichtdurchlässigkeit kurzzeitig unter das Ausgangsniveau. Anschließend nimmt die GP IIb/IIIa-Rezeptor (Fibrinogen/ vWF-Rezeptor) vermittelte Thrombozytenaggregation zu, bis sie ein Plateau erreicht [208]. Das aufgezeichnete Plateau der Aggregationskurve (s. Abb. 2) ist dabei ein Zeichen der Irreversibilität des Prozesses [209, 210]. In manchen Fällen, wie zum Beispiel bei schwachen Agonisten, kann die Aggregation jedoch auch reversibel sein, was sich in einer erneuten Abnahme der Lichtdurchlässigkeit zeigt.

Des Weiteren ist die Form der Aggregationskurve abhängig vom Thrombozytenstimulus. Die am meisten verwendeten Stimuli sind ADP, Kollagen, ARA, Epinephrin und TXA₂-Analoga wie der Thrombinrezeptoragonist TRAP6 und der Thromboxanrezeptoragonist U46619 [207]. Bei ADP kann niedrig konzentriert der Aggregationskurvenverlauf biphasisch oder nach der Primärphase ruckläufig sein, hochkonzentriert dagegen ist er in der Regel monophasisch [156]. Reversibilität kann auch dysfunktionale Ausschüttung der Thrombozytengranula anzeigen [165, 211]. Bei Epinephrin ist auch unter hohen Konzentrationen die Aggregationskurve biphasisch [209]. Mithilfe des Einsatzes verschiedener Stimuli können

unter anderem auch Hinweise auf das Vorliegen eines von-Willebrand-Jürgens Syndroms oder eines Glanzman-Syndroms geliefert werden [165]. Die in diesem Fall verwendeten Stimulantien ARA und TRAP6, sowie Indometazin und Terbogrel zum Stoppen der Aggregation wurden wie oben beschrieben vorbereitet. TRAP ist ein synthetischer Thrombin-Rezeptor-Aktivator und wird nur wenig von der Hemmung der Thromboxansynthese beeinflusst [207]. Terbogrel hemmt dabei die Thrombozyten sowohl direkt über Antagonisierung am Thromboxanrezeptor als auch einen Schritt zuvor durch eine Hemmung der Thromboxansynthese [212]. Indometazin hemmt die Thromboxansynthese durch Hemmung der Cyclooxygenase [213, 214].

Nachdem das Aggregometer auf 37°C vorgewärmt wurde, wurden die zwei Kanäle des Aggregometers und der Zweikanal-Schreiber geeicht. Dazu wurden je 100µl TM zu 400µl PAP bzw. PRP gegeben, was als Maximal (0%)- bzw. Minimalwert (100%) für die vom Schreiber aufgezeichnete Lichttransmission als Resultat der Aggregation fungierte.

Der jeweilige Aggregationsansatz durchlief dabei den folgenden Zyklus: Zunächst wurde vier Minuten bei 37°C inkubiert, gefolgt von einer zweiminütigen Rührphase. Mit Beginn der zweiminütigen Rührphase wurde der Schreiber gestartet, um vorzeitige Aggregation durch mechanische Irritation aufzeichnen zu können.

Anschließend wurde der Aggregationsstimulus zugesetzt; entweder 1mM ARA (Endkonzentration (EK)) oder 30µM TRAP6 (EK). Danach wurde vier Minuten die Aggregation aufgezeichnet, bis die Reaktion mit 100µM Indometazin (EK) und 4,5 mM EDTA (EK) gestoppt wurde.

Die Aggregationsansätze waren bei allen Proben von Patienten und Probanden gleich. Es erfolgte jeweils zunächst ein Ansatz allein mit PRP und TM. Danach wurde *in vitro* Acetylsalicylsäure (ASS) hinzugegeben in den Konzentration 30µM und 100µM, um die Hemmbarkeit der Plättchen zu testen. Zuletzt erfolgte ein Ansatz ohne ASS, dafür mit 5µl Terbogrel (3µM EK), um die thromboxanabhängige Plättchenaktivierung (auch COX-unabhängig) vollständig auszuschalten und sicherzustellen, dass eine thromboxanabhängige Thrombozytenaktivierung vorlag. Pro Stimulus wurden alle vier Ansätze durchlaufen, das heißt acht Aggregationen pro Patient bzw. Proband.

Anhand der aufgezeichneten Aggregationskurve wurden drei Werte erfasst: Die Steigung in cm/min, der absolute Wert der Aggregation in cm sowie das Maximum der Aggregation in Prozent des Maximalwertes aus der Eichung.

Nach der Aggregation wurden alle Proben in Eppendorfcups pipetiert und fünf Minuten bei Maximalem *Speed* der Zentrifuge (15700xg bzw. 13200rpm) zentrifugiert, um einen plättchenfreien Überstand für die MDA-Messung sowie für die TXB₂-Bestimmung zu gewinnen. Das PAP für den MDA-Assay wurde bis zur Messung auf Eis gelagert und das PAP für die TXB₂-Bestimmung bei -20°C eingefroren.

2.7 Fluorometrischer MDA-Assay

Die Messung von MDA als Indikator der Prostaglandinsynthese der Thrombozyten wurde von Smith *et al.* 1976 entwickelt [215]. Die zunächst kolorimetrische Methode, die die Konzentration des Addukts von MDA und TBA) ermittelte, wurde weiterentwickelt zu einer sensitiveren und weniger störanfälligen Methode, basierend auf der Emission einer charakteristischen Wellenlänge des TBA-MDA-Adduktes (s. Abb. 3), messbar durch Fluorometrie [216].

Vor Beginn der Versuche wurden Messungen der Fluoreszenz von MDA bei aufsteigenden Konzentrationen von 10nM bis 10µM 1,1,3,3-Tetraethoxypropan (TEP) durchgeführt. Da MDA leicht flüchtig ist, wurde für die Standardmessung der Fluoreszenz TEP verwendet, welches im sauren Milieu schnell zu MDA hydrolysiert. Es ergab sich ein linearer Zusammenhang der beiden Parameter mit einem Korrelationskoeffizienten nach Pearson von 0,999 (s. Tab. 14), aus dem mittels linearer Regression eine Eichgerade erstellt wurde mit einem r^2 von 0,998 (s. Abb. 3).

		TEP [nM]	MDA-Messwerte
TEP [nM]	Pearson Korrelation	1,00	0,99**
	Signifikanz (Sig.) (2-seitig)		0,00
	N	11	11
MDA-Messwerte	Pearson Korrelation	0,99**	1,00
	Sig. (2-seitig)	0,00	
	N	11	11

Tab. 14: Korrelation MDA und TEP: Lineare Korrelation von MDA und TEP zur Erstellung einer Eichgerade für die spätere Umrechnung der Fluoreszenz von MDA in die Stoffkonzentration in µM.

** Die Korrelation ist signifikant zum Signifikanzniveau $p=0.01$ (2-seitig getestet).

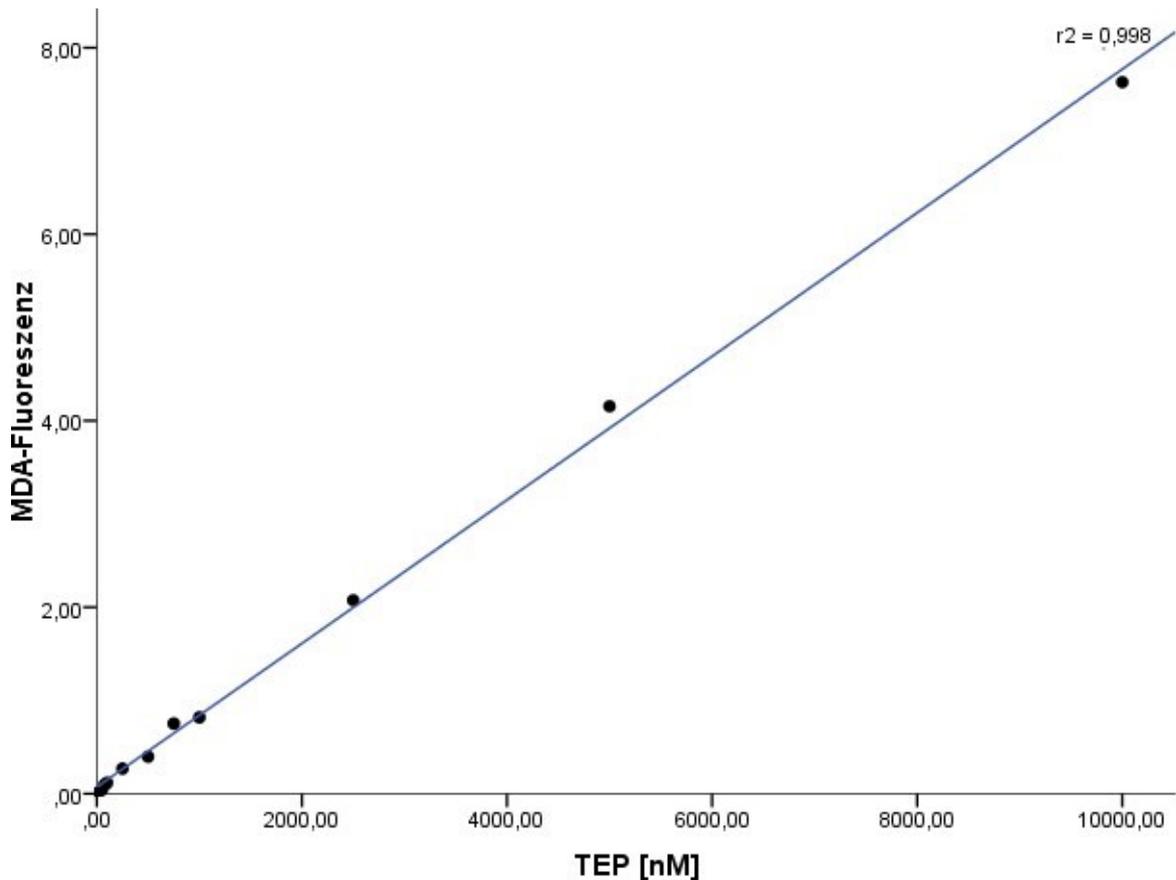


Abb. 3: Eichgerade MDA: Korrelation der MDA-Fluoreszenz aus den Messungen mit aufsteigenden Konzentrationen von TEP (10 nM - 10µM). nM = Nanomolar. µM = Mikromolar.

Diese wurde bei den späteren Messungen benutzt zur Umrechnung der Fluoreszenz von MDA in die Stoffkonzentration in µM.

Für die Messung von MDA wurden je 200µl PAP aus den Aggregationsansätzen benötigt. Zusätzlich wurden 400µl PAP für die Herstellung eines Leerwertes („Blank“) für die fluorometrische Messung benötigt, welcher je einmal pro Konzentrations-Wirkungs-Kurve (0/30/100µM ASS/0µMASS, 3µM Terbogrel) hergestellt wurde.

Dem Leerwert wurden dabei die gleichen Substanzen in identischen Konzentrationen wie jedem Aggregationsansatz zugefügt. Dazu wurden den 400µl PAP 100µl TM, 5µl Indometazinverdünnung (EK 100µM), 5µl Terbogrel (EK 3µM) und 10µl Arachidonsäure (EK 1mM) bzw. TRAP6 (EK 30µM) hinzugefügt. Der Leerwert wurde anschließend zehn Minuten bei 37°C inkubiert.

Zur Präzipitation der Proteine wurden den 200µl Aggregationsüberstand bzw. dem Leerwert je 120µl Trichlorsessigsäure (TCA) zugesetzt. Nach gründlichem Vermischen mit dem Vortexmischer wurden die Proben dann fünf Minuten bei 15000rpm mit der Tischzentrifuge zentrifugiert.

Anschließend wurden 200µl des daraus gewonnen proteinfreien Überstandes 200µl des Farbstoffes TBA zugegeben. Dies wurde mit dem Vortexmischer gut vermischt und 30 Minuten

bei 70°C inkubiert. Das gelöste TBA ist ca. 3 Wochen gekühlt und lichtgeschützt haltbar. MDA und TBA bildeten dabei ein pink (-rot) gefärbtes Addukt (s. Abb. 4). Zum Abkühlen wurden die Proben danach fünf Minuten auf Eis gelegt. Nach Zentrifugieren mit der Tischzentrifuge (5 min, 15700xg) und erneutem Mischen mit dem Vortexmischer wurden sie weitere 15 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen.

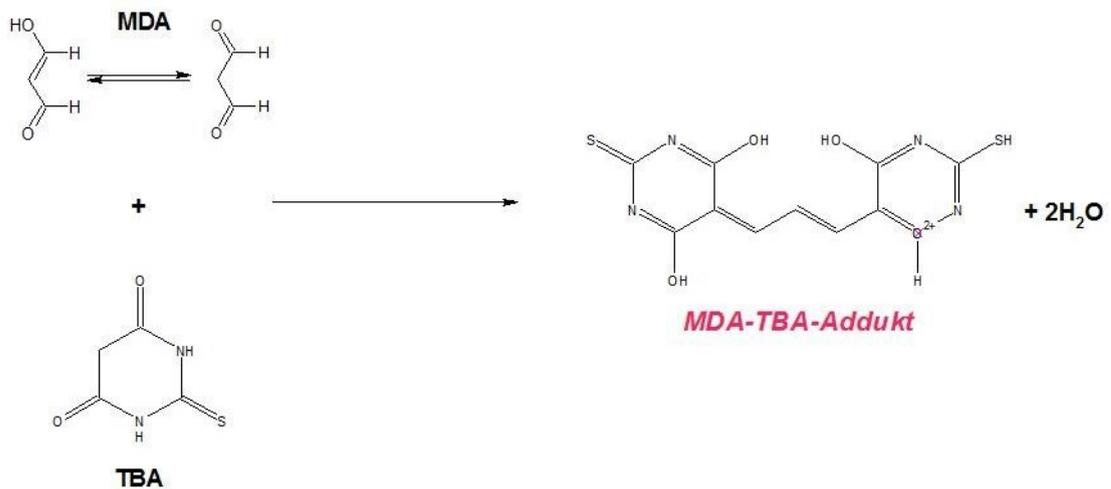


Abb. 4: Bildung des MDA-TBA-Adduktes: MDA, welches zwischen zwei isomeren Formen wechselt (links in der Abb.) verbindet sich mit TBA (links in der Abb.) zu einem MDA-TBA-Addukt (rechts in der Abb.), welches pink (-rot) gefärbt ist. Zwei Wassermoleküle (H_2O) werden frei (rechts in der Abb.).

Für die Messung an dem Fluoreszenzphotometer wurden dann je drei Proben eines Aggregationsansatzes à 100µl pro *Well* in eine 96 *Well* Mikrotiterplatte pipettiert.

Abschließend wurden die Proben im Fluoreszenzphotometer bei einer Anregung von $\lambda=520\text{nm}$ und einer Emission von $\lambda=555\text{nm}$ gemessen und Mittelwerte aus den Messungen berechnet. Dabei wurden in den Berechnungen die Leerwertspiegel als *Baseline* von den Messwerten abgezogen, um eine eventuelle Verfälschung durch aus anderen Quellen entstandenes MDA zu vermeiden (s. Abs. 4.5.2).

Kalibriert wurden die MDA Messungen am Fluoreszenzphotometer mit einer 1,1,3,3,-Tetraethoxypropan (TEP) – Eichreihe, welche eine gute Linearität zeigte (s. Abb. 3).

2.8 TXB₂ - ELISA

Der sogenannte „ELISA“ stammt von dem Radioimmuno-Assay ab und wurde 1956 zunächst zur Messung der Plasmainsulinspiegel von Berson *et al.* entwickelt [217]. 1977 gewann er für die Entwicklung dieses Assays zur Messung von Peptidhormonen den Nobelpreis [218]. Aus dem Radioimmuno-Assay entwickelten sich zwei Verfahren weiter; der Enzym Immuno-Assay (EIA) und der *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA). Daran beteiligt waren zwei unabhängige Forschergruppen aus Schweden und den Niederlanden [219, 220]. Der nach Stimulation mit ARA durchgeführte ELISA auf Thromboxan B₂ misst die Plättchenfunktion

indirekt, in dem er die aktivierungsabhängige thrombozytäre Thromboxansynthese in Form des Hydrolyseprodukts TXB₂ misst (s. Abs. 1.9) [151].

Wir verwendeten ein kompetitives ELISA *Kit* von Cayman [205]. Dabei konkurrierte das TXB₂ im Plasma des Probanden bzw. Patienten mit einem an Acetylcholinesterase (AChE) gebundenen TXB₂ Indikator um eine begrenzte Anzahl von Bindestellen des TXB₂-spezifischen Kaninchen-Antiserums (s. Abb. 5). Während der Messung wurde dabei die Konzentration des an das Kaninchen-Antiserum bindenden TXB₂ Indikators auf konstantem *Level* gehalten. Die Konzentration des im Serum des Probanden/Patienten vorhandenen TXB₂ war somit umgekehrt proportional zu der des TXB₂ -Indikators [205].

Zur Vorbereitung wurde die Messplatte vorinkubiert mit blockierenden Proteinen und mit dem TXB₂ spezifischen Kaninchen Antiserum der Maus (s. Abb. 5). Danach wurde mit Probanden/Patienten-Serum sowie mit TXB₂-AChE Indikator inkubiert. Darauf folgte die Gabe von TXB₂ EIA Antiserum [205]. Die Platte wurde dann mit einem Plastikfilm abgedeckt und 18 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. So wurde das Kaninchen-IgG in inverser Konzentration zu dem vorhandenen TXB₂ im Serum mit TXB₂ Indikator besetzt.

Nun wurde 200µl Ellman's Reagenz hinzugefügt und die Mikrotiterplatte im Dunkeln 20 – 60min unter leichtem Schütteln inkubiert. Das Produkt der enzymatischen Reaktion wurde als Farbumschlag zu gelb bei einer Wellenlänge von 405nm im UV-Photometer gemessen. Die inverse Beziehung der TXB₂- Konzentration zum TXB₂ Indikator lässt sich darstellen als [205]:

$$\begin{aligned} \text{Absorption im Photometer} &= \text{Konzentration des TXB}_2 \text{ Indikators} \\ &= \frac{1}{\text{Konzentration TXB}_2 \text{ im Serum}} \end{aligned}$$

Die AChE aus dem *Kit* von Cayman stammte aus dem Zitteraal (*Electrophorus electricus*) [205]. In dem Ellman's Reagenz, welches durch die AChE umgesetzt wurde, war Acetylthiocholin sowie 5,5' –dithio-bis-2-Nitrobenzoesäure enthalten. Durch die Hydrolyse von Acetylthiocholin entstand Thiocholin, welches dann mit 5,5'-dithio-bis-1-Nitrobenzoesäure zu 5-thio-2-Nitrobenzoesäure reagierte, mit einer starken Absorption bei 412nm ($\epsilon = 13.600$) [205].

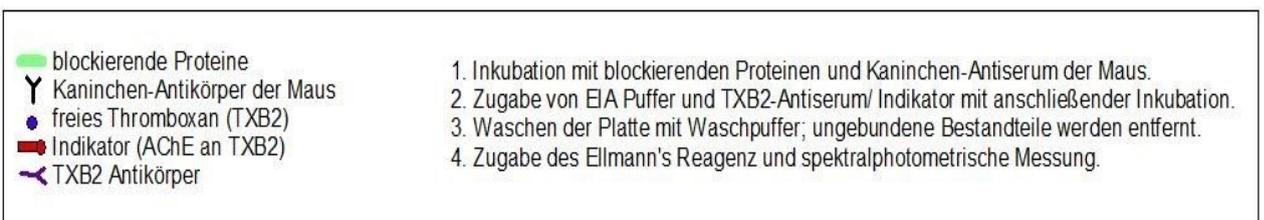
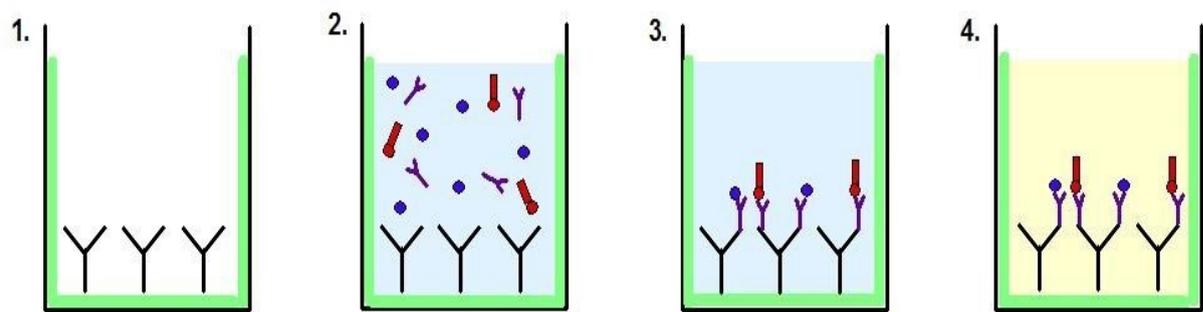


Abb. 5: Schematischer Aufbau des TXB₂-ELISA: Dargestellt sind die vier Hauptschritte des TXB₂-ELISA (s. 1.-4.). AChE = Acetylcholinesterase, EIA = *Enzyme Immunosorbent Assay*

In der Vorbereitung für den Assay wurde aus dem EIA-Pufferkonzentrat mit MilliQ-Wasser ein Puffer zur Verdünnung der Aggregationsüberstände hergestellt. Das PAP aus den Aggregationsansätzen wurde darin gelöst. Nach Herstelleranleitung wurde außerdem ein Waschpuffer, eine TXB₂-Standard-Eichreihe, der Thromboxan B₂-AChE Indikator und das Thromboxan B₂ EIA Antiserum hergestellt [205].

2.9 HPLC

Die Grundsteine der HPLC wurden bereits 1941 von Martin und Syngge *et al.* gelegt [221]. Sie ist eine Trenntechnik bei der der Trennvorgang auf der Verteilung eines Stoffes zwischen einer mobilen und einer stationären Phase beruht [222].

Die Messung der Metamizol-Plasmaspiegel der Patienten, die nach Angaben der Klinik Novalgin (fest oder bei Bedarf) erhielten, wurde durchgeführt mit der Umkehrphase (*Reversed Phase*) HPLC. Umkehrphase HPLC bedeutet, dass die stationäre Phase unpolar und die mobile Phase, welche das zu trennende Gemisch enthält und transportiert, polar ist. Da Metamizol schnell hydrolysiert wird, misst man dessen Metabolite (s. Abs. 3.5.2, 4.6.3) [223]. Metamizol selbst ist nur bei intravenöser Gabe kurzzeitig im Blut nachweisbar [224]. Unter den Metaboliten Aminoantipyrin (AA), 4-Acetylaminoantipyrin (AAA) und MAA, sind AA und MAA die pharmakologisch aktiven.

Für die HPLC wurde PAP genutzt, welches vor der Aggregation wie oben beschrieben durch Zentrifugation gewonnen wurde. Dieses wurde zur Vorbereitung gefiltert.

Als Eluent wurde eine wässrige Mischung aus Natriumacetat- Acetonitril 87%:13%, (v/v) sowie

zur Stabilität NaN_3^- (Natriumazid, 0.02%) hergestellt und auf einen pH von 5,6 eingestellt. Diese wurde über einen $0,2\mu\text{M}$ Filter mittels Vakuumpumpe gefiltert und anschließend zehn Minuten mit Helium entgast.

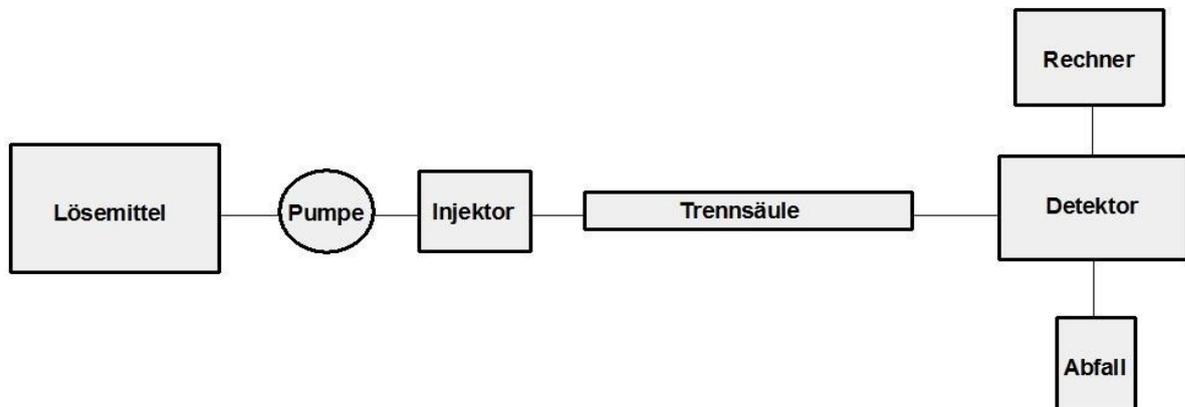


Abb. 6: Schematischer Aufbau HPLC: Das Lösemittel mit der Probe gelangt über die Pumpe in den Injektor sowie anschließend in die Trennsäule. Der UV-Detektor misst die Proben, woraufhin die Daten in einem speziellen Computerprogramm weiterverarbeitet werden.

Als mobile Phase bezeichnet man das oben beschriebene Lösemittel (s. Abb. 6). Über den Injektor wurde mittels geeigneter Hamiltonspritze ($100\mu\text{l}$) mit dem fünffachen Schleifenvolumen ($20\mu\text{l}$, Schleife = Kapillare zwischen Lösemittel und Säule) die zu messende Probe injiziert. Die Flussrate betrug $0,5\text{ml}/\text{min}$ und der Druck $80\text{-}120\text{bar}$. Die Metamizolmetabolite wurden über der Trennsäule bei einer Wellenlänge von 257nm mit dem UV-VIS-Detektor detektiert. Um die Messgenauigkeit zu verifizieren wurde jeder zu messenden Plasmaprobe ein interner Standard von $100\mu\text{M}$ Antipyrin zugesetzt.

Die Plasmakonzentration der Metamizolmetabolite wurde mit der Software Chromulan auf einem IBM-PC als *Area under the Curve* (AUC) detektiert und mittels einer Eichgerade kalibriert. Die Ergebnisse wurden in μM angegeben.

2.10 Statistische Auswertung

Die Datenerfassung erfolgte mit Microsoft Excel™, die statistische Auswertung mit IBM® SPSS [225]. Für die Berechnungen wurde für die Daten zu Alter, Größe, Gewicht und Geschlecht (s. Tab. 15) eine Normalverteilung angenommen. Dies konnte unter anderem dadurch untermauert werden, dass ein Levenes Test Varianzhomogenität zwischen den Gruppen zeigte (s. Tab. 16; Nullhypothese (Gleichheit der Varianzen) nicht verworfen, da $p > 0,05$) [226, 227]. Zur Auswertung von Alter, Größe, Gewicht und Geschlecht wurde außerdem *Bootstrapping* angewandt. Dies ist ein vorwiegend nonparametrisches robustes *Resampling*-Verfahren mit hoher Teststärke, bei dem aus einer Grundstichprobe neue Stichproben (sog. *Resamples*; mit Zurücklegen gewählte zufällige Stichproben) gezogen werden und daraufhin

die Teststatistik für jedes *Resample* berechnet wird, um so die Verteilung der Werte der Stichprobe zu ermitteln (s. Tab. 15) [228]. Der statistische Begriff „robust“ beschreibt, dass die Fehlerrate für Fehler erster und zweiter Art gering ist [229]. „Verzerrung“ ist die Differenz zwischen der Statistik unter Annahme der Normalverteilung sowie der Statistik, welche mittels *Bootstrapping* ermittelt wurde [228].

Für die übrigen anamnestischen Daten wurde ebenfalls mit relativ robusten Verfahren gerechnet und eine nonparametrische Verteilung angenommen. Somit wurde statt des Mittelwerts jeweils der Median berechnet. Das Signifikanzniveau (Sig.) p für α wurde mit 0,05 festgelegt. Die Auswertung erfolgte mit einer nonparametrischen Varianzanalyse für unabhängige Stichproben; der Wilcoxon-Mann-Whitney U-Analyse (bzw. „Wilcoxon Rangsummen-Test“); die bei kleinen Stichproben möglich ist und wenig durch Ausreißer beeinflusst wird (s. Tab. 17). Die zentrale Tendenz der Daten wird mit „Rängen“ berechnet, die den jeweiligen Messwerten zugeordnet werden, anstatt mit den genauen Messwerten. Es ergibt sich die Teststatistik U , welche auf Signifikanz getestet wird, indem sie mit den z -Werten einer Standardnormalverteilung (sog. z -Verteilung), verglichen wird, die man Tabellen entnimmt. Ist die Teststatistik U höher als der „kritische“ Wert aus der z -Verteilung, gilt der Unterschied als signifikant [230].

Da die Stichprobengröße der meisten anamnestischen Daten ausreichend groß war (Anzahl n für Variable >30) wurde die asymptotische Signifikanz p berechnet. Lediglich für Cholesterol, LDL und Fibrinogen wurde aufgrund der kleinen Datenmenge die exakte Signifikanz angegeben. Asymptotisch bedeutet, dass die Berechnung anhand näherungsweise Tabellen erfolgt. Dies ist umso präziser, je größer der Stichprobenumfang ist [231]. Der Wilcoxon Rangsummentest mit der Teststatistik W wurde bei der Durchführung des Mann-Whitney-U-Tests mitberechnet. Er basiert auf gleichartigen Prinzipien wie der Mann-Whitney-U-Test und die Ergebnisse werden mit der gleichen z -Standardverteilung verglichen, daher bleibt das Ergebnis das Gleiche [230]. Der Vergleich der Werte von *Nonrespondern* und *Respondern* im MDA und TXB₂-Assay (s. 3.4.1) sowie der Plasmakonzentration von Metamizol (3.4.2) erfolgte ebenfalls mittels des Mann-Whitney-U- sowie Wilcoxon Rangsummentests.

Für die Korrelationsanalysen zwischen den Ergebnissen der Aggregation, des MDA- und TXB₂-Assays wurde die nonparametrische Rangkorrelation nach Spearman durchgeführt, da bei dieser keine Normalverteilung vorliegen muss und sie sich nicht auf rein lineare Zusammenhänge beschränkt (s. Abs. 3.2). Hierbei erfolgt ebenfalls eine Ordnung der Daten in Ränge. Es ergibt sich der Korrelationskoeffizient ρ nach Spearman. Ein positiver Wert bedeutet, dass hohe Werte einer der verglichenen Variablen mit hohen Werten der zweiten Variablen einhergehen und umgekehrt. Der p -Wert kann minimal -1 und maximal +1 betragen [230, 232]. Die Korrelationsanalysen wurden um die Partialkorrelationen nach Spearman erweitert, um die Ergebnisse auf Verfälschung durch die Störfaktoren Alter und Geschlecht (sog. *Confounding*) zu untersuchen (s. Abs. 3.3) [233].

Ein bedeutsamer Teil der statistischen Analysen beschäftigt sich in dieser Arbeit außerdem mit den sog. *Receiver-Operator-Characteristics (ROC)*-Analysen (s. Abs. 3.4.3). Diese wurden verwendet, um die Testgüte bzw. die Genauigkeit des MDA-Assays, auch im Vergleich zum TXB₂-Assay zu eruieren. Dabei wurden die Messwerte des MDA-Assays als „Schwellenwerte“ betrachtet, anhand derer die Einteilung in *Responder* bzw. *Nonresponder* erfolgte und für jeden Schwellenwert Sensitivität sowie Spezifität bestimmt. Die Sensitivität wurde dann in einer Kurve, der *ROC*-Kurve gegen 1-Spezifität aufgezeichnet. Die Fläche unter der Kurve, die sog. *Area Under The Curve (AUC)* ist dabei ein Maß für die Wahrscheinlichkeit, dass der MDA-Assay einen Wert „richtig“ misst [234]. Ihr Wert ist maximal 1,0. Als „richtiges Ergebnis“ wurden dabei die Ergebnisse der Aggregation mit ARA als Stimulus zugrunde gelegt, anhand der die Patienten initial als *Responder* bzw. *Nonresponder* klassifiziert wurden (*Nonresponse* = relative Aggregationsamplitude > 20% unter Stimulation mit ARA).

2.11 Ein- und Ausschlusskriterien

Zu den Einschlusskriterien für sowohl Patienten- als auch Probandengruppe zählten die Volljährigkeit sowie die schriftliche Einwilligung bei vollständiger Einwilligungsfähigkeit. Für die Patienten kam außerdem die stationäre Aufnahme aufgrund einer kardiologischen Indikation hinzu sowie die Dauertherapie mit ASS 100mg. Ebenfalls wurden Patienten unter Dauertherapie mit ASS 100mg sowie Einnahme von 500mg ASS nach HKU mit eingeschlossen.

Zu den Ausschlusskriterien zählten die fehlende schriftliche Einwilligung bzw. Einwilligungsfähigkeit. Für die Probanden als Kontrollgruppe galt außerdem der Ausschluss der Einnahme von NSAID bis zu 14 Tage vor der Blutentnahme.

2.12 Probandenkollektiv

2.12.1 Patienten

Im Mittel waren die Patienten 72,19 Jahre alt und zu 56% männlich (s. Tab. 15). Hinsichtlich der Komorbiditäten (s. Tab. 17) waren zum Zeitpunkt der Blutentnahme 92% an KHK, 79% an Herzinsuffizienz sowie 30% an Vorhofflimmern erkrankt. Ein Anteil von 57% hatte bereits einen MI erlitten. Chirurgisch wurden 29% bereits mittels Arterio-Coronarer-Venen-Bypass-OP (ACVB), interventionell 87% mit perkutaner Coronar-Angioplastie (PTCA) behandelt. Zweiundzwanzig Prozent der Patienten erhielten im Rahmen der PTCA 500mg ASS. Siebenundzwanzig Prozent litten außerdem an COPD. Hinsichtlich kardiovaskulärer Risikofaktoren waren die Patienten zum Abnahmezeitpunkt mit einem durchschnittlichen *BMI* von 27,62 übergewichtig und zu 32% adipös. Der Anteil an Rauchern oder Ex-Rauchern lag bei 17%, 83% hatten Hyperlipidämie/ Hypercholesterolämie/ Hypertriglyceridämie/ Dyslipidämie, 81% arterielle Hypertonie und 43% Diabetes mellitus. Bei 94% war die linksventrikuläre Ejektionsfraktion vermindert mit einem Anteil von 68% mit milder, 14% mit

moderater und 11% mit hochgradiger Einschränkung. Die mittlere NYHA-Klasse lag zwischen II und III und die mittlere CCS Klasse zwischen I und II.

Neben ASS, was nur ein Patient zum Zeitpunkt der Blutentnahme nicht einnahm, erhielten 68% einen P2Y₁₂ Antagonisten und 24% orale Antikoagulantien. Eine antihypertensive Medikation mit Angiotensin-Converting-Enzyme (ACE)-Inhibitoren erhielten 67%, 21% AT1-Antagonisten, 79% Betablocker, 40% Calciumantagonisten, 76% Diuretika und 8% Aldosteronantagonisten. Außerdem wurden 6% mit Herzglykosiden behandelt, 68% mit Protonenpumpeninhibitoren und 76% mit Statinen. Als antidiabetische Medikation nahmen 17% Insulin und 14% orale Antidiabetika ein. Schmerzmedikation nahm ein Großteil der Patienten ebenfalls ein; 67% erhielten Metamizol, 3% Ibuprofen, 8% Paracetamol und 19% Opiate.

Zum Zeitpunkt der Blutabnahme waren die Kreatinin-Plasmaspiegel mit einem Median von 1,2mg/dl im altersentsprechenden Normbereich. Die Lipidwerte lagen durchschnittlich für Gesamtcholesterin bei einem Median von 160,5mg/dl, für HDL bei 10,0mg/dl, für LDL bei 119,0mg/dl und für Triglyceride (TG) bei 143,0mg/dl. Das C-reaktive Protein als Inflammationsmarker war leicht erhöht mit 1,9mg/dl, Fibrinogen lag mit 402,0mg/dl im oberen Normbereich. Die Leukozytenzahlen lagen mit einem Median von 8,2 x 1000/µl ebenfalls im Referenzrahmen.

In einem durchgeführten t-Test für unverbundene Stichproben zeigte sich kein Unterschied für die normalverteilten Parameter Alter, BMI, Größe und Gewicht zwischen *Respondern* und *Nonrespondern* ($p > 0,05$) (s. Tab. 16).

Für die nicht-normalverteilten Parameter (s. Tab. 17) zeigte sich in einem Wilcoxon-Mann-Whitney-U-Test, dass es für die meisten Parameter ebenfalls in beiden Gruppen keinen Unterschied gab ($p > 0,05$). Ein signifikanter Unterschied ergab sich für den klinischen Parameter NYHA II ($p=0,01$), welcher seltener bei *Nonrespondern* vorkam. Die höheren NYHA- und CCS-Klassen (III, IV) kamen bei *Nonrespondern* häufiger vor, jedoch war dieser Unterschied nicht signifikant. Ebenfalls signifikant unterschiedlich war die Einnahme von Protonenpumpeninhibitoren ($p = 0,04$), Novalgin ($p = 0,01$) und Morphin ($p=0,02$), sowie die Laborparameter C-reaktives Protein (CrP) ($p=0,02$) und Leukozytenzahl ($P= 0,03$), welche bei *Nonrespondern* häufiger vorkam bzw. bei *Nonrespondern* höher waren.

Gruppe		Statistik	Bootstrap ^a				
			Verzerrung	Standardfehler	95% Konfidenzintervall		
		Unteres			Oberes		
Alter [j]	Responder	N	42				
		Mittelwert	72,10	-0,01	2,08	68,11	76,27
		SD	13,20	-0,30	1,40	10,19	15,67

	<i>Nonresponder</i>	SEM	2,04				
		N	21				
		Mittelwert	72,29	-0,04	2,74	66,60	77,79
		SD	12,84	-0,39	1,68	8,88	15,62
		SEM	2,80				
Body Mass Index	<i>Responder</i>	N	42				
		Mittelwert	27,01	0,00	0,74	25,62	28,56
		SD	4,94	-0,11	0,66	3,56	6,03
		SEM	0,76				
	<i>Nonresponder</i>	N	21				
		Mittelwert	28,83	0,03	1,38	26,36	31,77
		SD	6,29	-0,28	1,51	2,89	8,77
		SEM	1,37				
Gewicht [kg]	<i>Responder</i>	N	42				
		Mittelwert	79,62	0,03	2,68	74,60	85,29
		SD	17,56	-0,43	2,69	12,06	22,74
		SEM	2,71				
	<i>Nonresponder</i>	N	21				
		Mittelwert	82,95	0,08	5,40	73,91	96,02
		SD	24,34	-1,70	7,83	10,64	37,30
		SEM	5,31				
Größe [m]	<i>Responder</i>	N	42				
		Mittelwert	1,71	0,00	0,02	1,68	1,75
		SD	0,11	-0,00	0,01	0,08	0,12
		SEM	0,02				
	<i>Nonresponder</i>	N	21				
		Mittelwert	1,69	0,00	0,02	1,64	1,74
		SD	0,11	0,00	0,02	0,07	0,13
		SEM	0,02				
Männl. Geschl.	<i>Responder</i>	N	42				
		Mittelwert	0,60	0,00	0,07	0,45	0,74
		SD	0,50	0,01	0,02	0,45	0,51
		SEM	0,08				
	<i>Nonresponder</i>	N	21				
		Mittelwert	0,52	0,00	0,11	0,31	0,74
		SD	0,51	0,01	0,02	0,43	0,52
		SEM	0,11				

Tab. 15: Normalverteilte Patientencharakteristika. N = Anzahl der Patienten, SD = Standard Deviation, SEM = Standard Error of the Mean.

[j]= Jahre, [kg] = Kilogramm, [m] = Meter.

a. *Bootstrap* basierend auf 1000 *Bootstrap* Proben

		Levene's Test für die Gleichheit der Varianzen		t	df	Sig. (2-seitig)	Mittlere Differenz	Standard Fehler Differenz	95% Konfidenzintervall	
		F	Sig.						Unteres	Oberes
Alter [j]	*	0,04	0,84	-0,05	61,00	0,96	-0,19	3,50	-7,18	6,80
	**			-0,06	41,13	0,96	-0,19	3,46	-7,19	6,80
BMI	*	0,28	0,60	-1,26	61,00	0,21	-1,82	1,45	-4,72	1,08
	**			-1,16	32,75	0,26	-1,82	1,57	-5,01	1,37
Gewicht [kg]	*	0,33	0,57	-0,62	61,00	0,54	-3,33	5,35	-14,04	7,37
	**			-0,56	30,75	0,58	-3,33	5,96	-15,50	8,83
Größe [m]	*	0,00	1,00	0,87	61,00	0,39	0,02	0,03	-0,03	0,08
	**			0,86	39,98	0,39	0,02	0,03	-0,03	0,08
Männl. Geschl.	*	0,65	0,42	0,53	61,00	0,60	0,07	0,13	-0,20	0,34
	**			0,53	39,06	0,60	0,07	0,14	-0,20	0,35

Tab. 16: Normalverteilte Patientencharakteristika. BMI = *Body Mass Index*, männl. Geschlecht = männliches Geschlecht, Sig. = Signifikanz.

[j] = Jahre, [kg] = Kilogramm, [m] = Meter.

* Gleiche Varianzen angenommen ** Gleiche Varianzen nicht angenommen

Für alle Parameter ergab der Levene's Test Varianzhomogenität der Gruppen (Nullhypothese (Varianzhomogenität gegeben) mit $p > 0,05$ erfüllt) (s. Tab. 16).

	N	Min.	Max.	Median	Mann-Whitney U	Wilcoxon W	Z	Asymp. Sig. (2-seitig)	=/ N/ R
Männliches Geschlecht	63	0,00	1,00	0,57	409,50	640,50	0,54	0,59	=
Nikotinabusus	63	0,00	1,00	0,00	430,50	1333,50	-0,23	0,84	=
Herzinsuffizienz	63	0,00	1,00	1,00	388,50	1291,50	-1,06	0,29	=
Vorhofflimmern	63	0,00	1,00	0,00	346,50	1249,50	-1,76	0,08	=
Koronare Herzkrankheit	63	0,00	1,00	1,00	409,50	1312,50	-0,90	0,37	=
Z.n. MI	63	0,00	1,00	1,00	399,00	1302,00	-0,71	0,48	=
Z.n. ACB/ACVB	63	0,00	1,00	0,00	378,00	609,00	-1,17	0,24	=
Z.n. HKU/PTCA	63	0,00	1,00	1,00	409,50	640,50	-0,76	0,45	=
Z.n. Gabe von 500mg ASS bei HKU/PTCA	63	0,00	1,00	0,00	378,00	609,00	-1,81	0,07	=
Hypercholesterinämie, Hypertriglyceridämie, Dyslipidämie	63	0,00	1,00	1,00	388,50	619,50	-1,02	0,31	=
Hypertonus	63	0,00	1,00	1,00	409,50	1312,50	-0,68	0,50	=
Diabetes mellitus	63	0,00	1,00	0,00	378,00	1281,00	-1,07	0,28	=
COPD	63	0,00	1,00	0,00	399,00	1302,00	-0,80	0,43	=

Adipositas	63	0,00	1,00	0,00	367,50	1270,50	-1,33	0,18	=
Leichtgr. reduz. LVF	63	0,00	1,00	1,00	430,50	661,50	-0,19	0,85	=
Mittelgr. reduz. LVF	63	0,00	1,00	0,00	409,50	640,50	-0,76	0,45	=
Hochgradig reduz. LVF	63	0,00	1,00	0,00	378,00	1281,00	-1,81	0,07	=
NYHA I	63	0,00	1,00	0,00	399,00	1302,00	-0,93	0,35	=
NYHA II	63	0,00	1,00	0,00	294,00	525,00	-2,66	0,01	R
NYHA III	63	0,00	1,00	0,00	399,00	1302,00	-0,85	0,40	=
NYHA IV	63	0,00	1,00	0,00	346,50	1249,50	-1,87	0,06	=
CCS 0	63	0,00	1,00	1,00	388,50	619,50	-0,90	0,37	=
CCS 1	63	0,00	1,00	0,00	441,00	672,00	0,00	1,00	=
CCS 2	63	0,00	1,00	0,00	430,50	661,50	-0,36	0,71	=
CCS 3	63	0,00	1,00	0,00	409,50	1312,50	-0,90	0,37	=
CCS 4	63	0,00	1,00	0,00	388,50	1291,50	-1,21	0,23	=
ASS 100mg	63	0,00	1,00	1,00	430,50	1333,50	-0,71	0,48	=
P2Y₁₂ Hemmer	63	0,00	1,00	1,00	399,00	630,00	-0,76	0,45	=
Orale Antikoagulantien	63	0,00	1,00	0,00	409,50	640,50	-0,62	0,53	=
ACE-Hemmer	63	0,00	1,00	1,00	441,00	672,00	0,00	1,00	=
AT-1-Antagonist	63	0,00	1,00	0,00	430,50	661,50	-0,22	0,83	=
Betablocker	63	0,00	1,00	1,00	430,50	1333,50	-0,22	0,83	=
Calciumkanalhemmer	63	0,00	1,00	0,00	388,50	1291,50	-0,90	0,37	=
Diuretika	63	0,00	1,00	1,00	378,00	1281,00	-1,25	0,21	=
Aldosteronantagonist	63	0,00	1,00	0,00	430,50	1333,50	-0,31	0,74	=
Herzglykoside	63	0,00	1,00	0,00	420,00	1323,00	-0,73	0,47	=
Protonenpumpenhemmer	63	0,00	1,00	1,00	325,50	1228,50	-2,09	0,04	N
Statine	63	0,00	1,00	1,00	409,50	640,50	-0,62	0,53	=
Orale Antidiabetika	63	0,00	1,00	0,00	409,50	1312,50	-0,76	0,45	=
Insulin	63	0,00	1,00	0,00	399,00	1302,00	-0,93	0,35	=
Metamizol	63	0,00	1,00	1,00	283,50	1186,50	-2,81	0,01	N
Ibuprofen	63	0,00	1,00	0,00	430,50	1333,50	-0,50	0,61	=
Diclofenac	63	0,00	0,00	0,00	441,00	672,00	0,00	1,00	=
Paracetamol	63	0,00	1,00	0,00	399,00	1302,00	-1,31	0,19	=
Morphinderivate	63	0,00	1,00	0,00	336,00	1239,00	-2,33	0,02	N
Kreatinin [mg/dl]	61	0,60	4,60	1,20	403,00	1223,00	-0,26	0,80	=
Cholesterol [mg/dl]	30	80,00	262,00	160,50	69,00	135,00	-1,53	0,13 *0,13	=
HDL [mg/dl]	15	22,00	120,00	40,00	13,50	23,50	-1,11	0,27 *0,28	=
LDL [mg/dl]	15	61,00	200,00	119,00	20,00	30,00	-0,26	0,79 *0,85	=

TG [mg/dl]	29	58,00	357,00	143,00	96,50	162,50	-0,11	0,91 = *0,91
CrP [mg/dl]	58	0,09	28,10	1,90	248,50	951,50	-2,27	0,02 N
Leukozyten [/nl]	61	3,60	16,80	8,20	278,00	1098,00	-2,16	0,03 N
Fibrinogen [mg/dl]	28	178,00	816,00	402,00	74,50	165,50	-1,06	0,29 = *0,29

Tab. 17: weitere Patientencharakteristika. ACB = Arterio-Coronarer Bypass, ACE = *Angiotensin Converting Enzyme*, AT = Antithrombin, ACVB = Arterio-Coronarer-Venen-Bypass, CCS = *Canadian Cardiovascular Society*, COPD = *Chronic obstructive pulmonary disease* = Chronisch obstruktive Lungenkrankheit, CrP = C-reaktives Protein, HDL = *high density lipoprotein*, HKU = Herzkatheteruntersuchung, LDL = *low density lipoprotein*, LVF = linksventrikuläre Funktion, MI = Myokardinfarkt, Min./Max. = minimal/maximal gemessener Wert, NYHA = *New York Heart Association*, PTCA = perkutane transluminale Coronar Angioplastie, TG = Triglyceride, Z = Vergleich Teststatistik U mit z-Verteilung, Z.n. = Zustand nach.

[mg/dl] = Miligramm/Deziliter, [nl] = Nanoliter.

=: in beiden Gruppen gleich häufig/ N: bei *Nonrespondern* häufiger/ R: bei *Respondern* häufiger

Exakte Sig. [2(1-seitige Sig.)]

2.12.2 Kontrollgruppe

Die gesunden Probanden waren im Mittel 27,82 Jahre alt, zu 41% männlich und hatten einen durchschnittlichen BMI von 21,95. Es gaben 13,63% an, Raucher zu sein (s. Tab. 18).

	Statistik	Bootstrap ^a				
		Verzerrung	Standard- fehler	95% Konfidenz Intervall		
				Unteres	Oberes	
Alter	N	22	0	0	22	22
	Minimum	18,00				
	Maximum	56,00				
	Summe	612,00				
	Mittelwert	27,82	-0,06	1,99	24,36	31,95
	SD	9,45	-0,75	2,75	3,13	13,32
Männliches Geschlecht	N	22	0	0	22	22
	Median	0,00	0,20	0,36	0,00	1,00
	Minimum	0,00				
	Maximum	1,00				
	Summe	9,00				
	Mittelwert	0,41	0,00	0,10	0,23	0,64
	SD	0,50	-0,01	0,03	0,43	0,513
Body Mass Index	N	22	0	0	22	22
	Minimum	18,37				
	Maximum	26,42				
	Summe	482,84				
	Mittelwert	21,95	0,01	0,53	20,94	23,12
	SD	2,60	-0,07	0,25	1,98	2,99

Nikotin	N	22	0	0	22	22
	Median	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Minimum	0,00				
	Maximum	1,00				
	Summe	3,00				
	Mittelwert	0,14	0,00	0,07	0,00	0,27
	SD	0,35	-0,02	0,10	0,00	0,46

Tab. 18: Charakteristika der Kontrollgruppe.

SD = Standard Deviation.

a. *Bootstrap* Basierend auf 1000 *Bootstrap* Proben

3. Ergebnisse

3.1 Deskriptive Statistik der Ergebnisse aus Aggregation, MDA- und TXB₂-Assay

3.1.1 Ergebnisse mit ARA aus Aggregation, MDA- und TXB₂-Assay

Anhand der Ergebnisse der Aggregation mit ARA ohne Zusatz von ASS wurden die Patienten nach einem vorab definierten *Cut-off* (Aggregation \geq 20%) eingeteilt in *Nonresponder* (n = 21) und *Responder* (n = 42). Diese Einteilung wurde auch für den MDA- und TXB₂-Assay verwendet.

3.1.1.1 Aggregation mit ARA

In den Aggregationsansätzen mit ARA ohne *in vitro* Zusatz von ASS zeigte die gesunde Kontrollgruppe die stärkste Aggregation mit einer Steigung von 19,08cm/min (= Median; Min = 10,41; Max = 33,33) (s. Tab. 19, Abb. 7) und relativen Amplitude von 79,06% (= Median; Min = 22,58; Max = 99,80) (s. Tab. 20, Abb. 8). Wurden die Messungen in Gegenwart von ASS *in vitro* durchgeführt, war die Aggregation vollständig gehemmt (s. Werte der Steigung bzw. Amplitude bei Zusatz von 30/100 μ M ASS in Tab. 19, 20 und Abb. 7, 8).

Nonresponder zeigten ebenfalls hohe Plättchenaktivität in der ASS-spezifischen Aggregation mit ARA ohne *in vitro* Zusatz von ASS mit einer durchschnittlichen Aggregationsamplitude von 70,34% (= Median; Min = 3,96; Max = 24,03) (s. Tab. 20, Abb. 8) und Steigung von 10,05cm/min (= Median; Min = 52,33; Max = 90,55) (s. Tab. 19, Abb. 7). In Gegenwart von *in vitro* ASS war die Hemmung hingegen weniger stark als bei den Kontrollen (s. Werte der Steigung bzw. Amplitude bei Zusatz von 30/100 μ M ASS in Tab. 19 und 20 und Abb. 7 und 8). Bei Zugabe von 100 μ M ASS lag die Steigung noch bei 5,16 cm/min (= Median; Min = 0; Max = 13,02) (s. Tab. 19, Abb. 7) und die relative Amplitude bei 56,10% (= Median; Min = 0; Max = 84,62) (s. Tab. 20, Abb. 8). Wurde Terbogrel dem Aggregationsansatz zugesetzt, war die Aggregation vollständig gehemmt (s. Werte der Steigung bzw. Amplitude bei Zusatz von 3 μ M Terbogrel in Tab. 19 und 20 und Abb. 7 und 8).

In der *Responder*-Gruppe hingegen zeigten sich die Plättchen bereits ohne *in vitro* Zusatz von

ASS vollständig durch ASS gehemmt (Amplitude [%]/ Steigung [cm/min]: Median = 0,00, Min = 0,00, Max = 12,50/ bzw. Median = 0,00; Min = 0,00, Max = 5,88) (s. Werte der Steigung bzw. Amplitude ohne Zusatz von 30/100µM ASS in Tab. 19 und 20 und Abb. 7 und 8).

Stimulus: ARA					
	Steigung [cm/min]	0µM ASS	30µM ASS	100µM ASS	3µM Terbogrel
Gruppe					
K	Median	19,08	0,00	0,00	0,00
	Varianz	36,66	12,50	0,00	0,00
	Standardabweichung	6,05	3,54	0,00	0,00
	Minimum	10,41	0,00	0,00	0,00
	Maximum	33,33	13,74	0,00	0,00
	Wertemenge	22,92	13,74	0,00	0,00
	Interquartilsabstand	10,06	0,00	0,00	0,00
R	Median	0,00	0,00	0,00	0,00
	Varianz	1,22	0,12	0,18	0,00
	Standardabweichung	1,11	0,35	0,42	0,00
	Minimum	0,00	0,00	0,00	0,00
	Maximum	5,88	1,95	2,61	0,00
	Wertemenge	5,88	1,95	2,61	0,00
	Interquartilsabstand	0,00	0,00	0,00	0,00
NR	Median	10,05	6,18	5,16	0,00
	Varianz	35,12	28,36	17,16	1,34
	Standardabweichung	5,93	5,33	4,14	1,16
	Minimum	3,96	0,00	0,00	0,00
	Maximum	24,03	17,91	13,02	5,16
	Wertemenge	20,07	17,91	13,02	5,16
	Interquartilsabstand	9,57	7,80	6,98	0,00

Tab. 19: Steigung [cm/min] aus der Aggregation mit ARA. 0/30/100µM ASS/3µM Terbogrel = Versuchsansätze mit 0/30/100µM ASS/ 3µM Terbogrel. K = Kontrolle, R = *Responder*, NR = *Nonresponder*. [µM] = Mikromolar, [cm/min] = Zentimeter pro Minute.

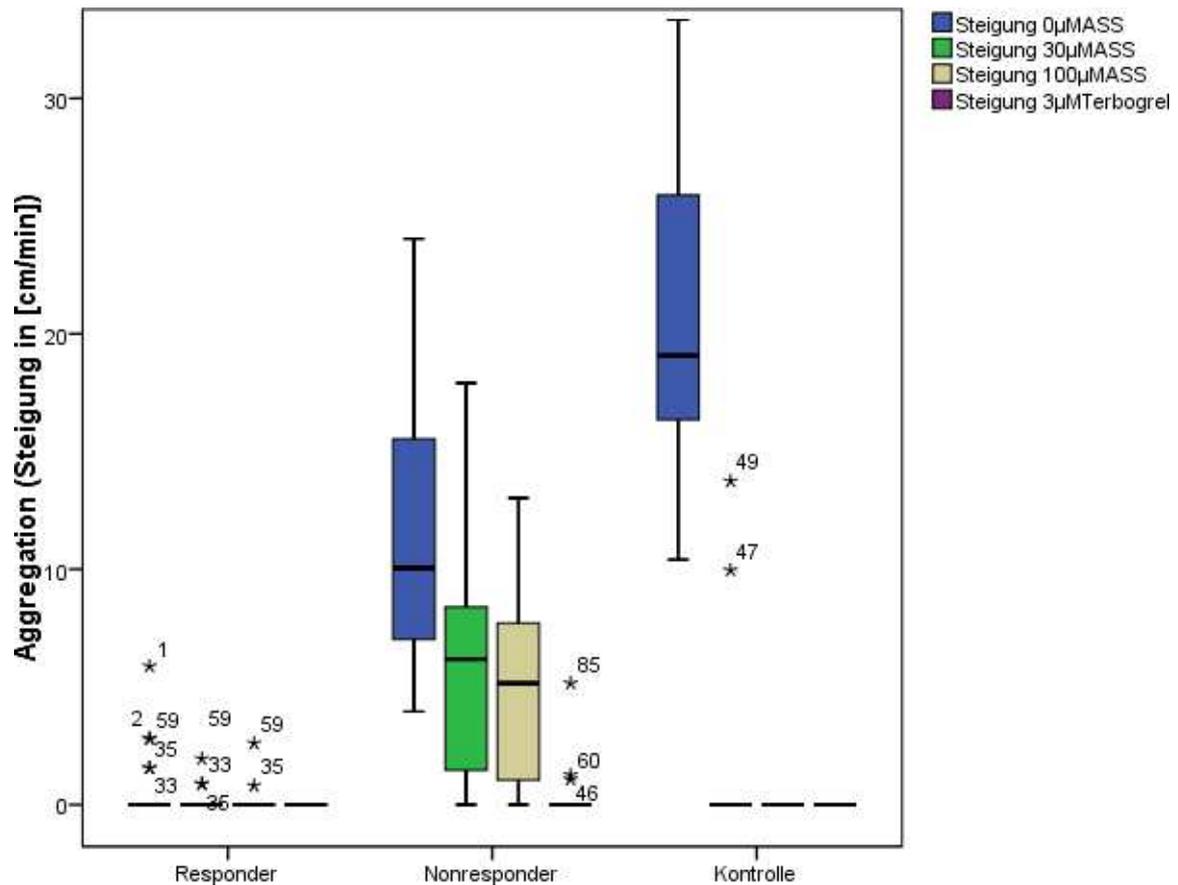


Abb. 7: Steigung [cm/min] aus Aggregation mit ARA. 0/ 30/ 100µM ASS/3µM Terbogrel = Versuchsansätze mit 0/ 30/ 100µM ASS/ 3µM Terbogrel. [cm/min] = Zentimeter pro Minute, [µM] = Mikromolar. Mit Sternchen (*) gekennzeichnete Werte = extreme Werte, Zahlen = Nr. des Versuchsansatzes bzw. Patientennummer.

Stimulus: ARA					
	Amplitude [%]	0µM ASS	30µM ASS	100µM ASS	3µM Terbogrel
K	Median	79,06	0,00	0,00	0,00
	Varianz	424,99	500,24	0,00	0,00
	Standardabweichung	20,62	22,37	0,00	0,00
	Minimum	22,58	0,00	0,00	0,00
	Maximum	99,80	77,26	0,00	0,00
	Wertemenge	77,22	77,26	0,00	0,00
	Interquartilsabstand	27,68	0,00	0,00	0,00
R	Median	0,00	0,00	0,00	0,00
	Varianz	6,90	2,78	3,57	0,00
	Standardabweichung	2,63	1,67	1,89	0,00
	Minimum	0,00	0,00	0,00	0,00
	Maximum	12,50	8,82	10,22	0,00
	Wertemenge	12,50	8,82	10,22	0,00

	Interquartilsabstand	0,00	0,00	0,00	0,00
NR	Median	70,34	60,13	56,10	0,00
	Varianz	126,11	1071,36	1051,14	16,41
	Standardabweichung	11,23	32,73	32,42	4,05
	Minimum	52,33	0,00	0,00	0,00
	Maximum	90,55	86,51	84,62	13,95
	Wertemenge	38,22	86,51	84,62	13,95
	Interquartilsabstand	18,27	66,60	65,45	0,00

Tab. 20: Amplitude [%] aus der Aggregation mit ARA. 0/30/100 μ MASS/3 μ M Terbogrel = Versuchsansätze mit 0/30/100 μ M ASS/ 3 μ M Terbogrel. [%] = Prozent, [μ M] = Mikromolar. K = Kontrolle, R = Responder, NR = Nonresponder.

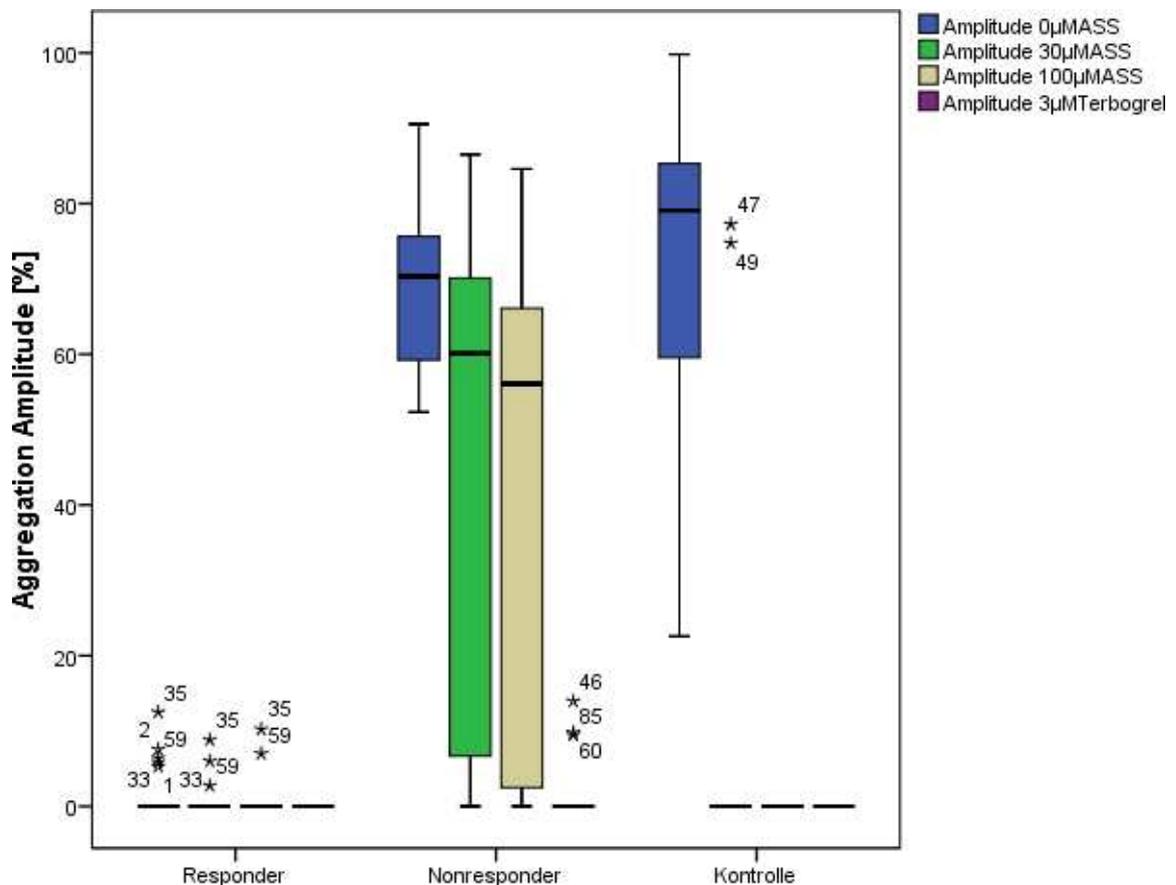


Abb. 8: Amplitude [%] aus der Aggregation mit ARA 0/ 30/ 100 μ MASS/ 3 μ M Terbogrel = Versuchsansätze mit 0/ 30/ 100 μ M ASS/ 3 μ M Terbogrel. [%] = Prozent, [μ M] = Mikromolar. Mit Sternchen (*) gekennzeichnete Werte = extreme Werte, Zahlen = Nr. des Versuchsansatzes bzw. Patientennummer.

3.1.1.2 Thrombozytäre Freisetzung von MDA nach ARA-induzierter Aggregation

Im MDA-Assay stellten sich die Verhältnisse ähnlich wie in der Aggregation dar. Die gesunde Kontrollgruppe zeigte sehr hohe MDA-Werte von 2309,4nM (= Median; Min = 1732,07; Max = 5317,17) (s. Tab. 21, Abb. 9). Schon bei Zugabe von 30 μ M ASS ließen sich die Konzentrationen um 95,52% auf 103,49nM im Vergleich zur Kontrolle (= Median; Min = 2,19;

Max = 969,86) reduzieren.

Nonresponder hatten wiederum mit 697,39nM MDA (= Median, Min = 131,20, Max = 1903,70) ca. 15-mal höhere Werte als *Responder* mit 45,44nM (= Median, Min = 20,17, Max = 155,47) ohne *in vitro* Zusatz von ASS (s. Tab. 21, Abb. 9). Die geringere Hemmbarkeit der Thrombozyten von *Nonrespondern* zeigte sich auch hier mit selbst unter 100µM ASS erhaltenen MDA-Konzentrationen von 39,26% (= Median; Min = 26,97; Max = 1001,73). Erst durch Terbogrel wurde eine nahezu vollständige Hemmung erreicht auf 15,48nM (= Median; Min = 5,2; Max = 26,62).

In der *Responder*-Gruppe ließ sich die Hemmung durch ASS mittels des MDA-Assays im Gegensatz zur Aggregation dezidiert darstellen. Hier zeigte sich eine leichte zusätzliche Hemmung durch *in vitro* Zusatz von 100µM ASS sowie durch Terbogrel (s. Tab. 21, Abb. 9).

Stimulus: ARA					
	MDA [nM]	0µM ASS	30µM ASS	100µM ASS	3µM Terbogrel
Gruppe					
K	Median	2309,40	103,49	22,33	29,71
	Varianz	990382,85	66100,10	2790,43	3931,68
	Standardabweichung	995,18	257,10	52,82	62,70
	Minimum	1732,07	2,19	3,91	7,46
	Maximum	5317,17	969,86	193,70	241,54
	Wertemenge	3585,10	967,67	189,79	234,08
	Interquartilsabstand	1065,00	124,42	36,97	71,60
R	Median	45,44	10,48	17,56	10,13
	Varianz	2553,39	4298,37	4731,49	1192,24
	Standardabweichung	50,53	65,56	68,79	34,53
	Minimum	20,17	2,61	7,28	3,01
	Maximum	155,47	171,41	179,69	93,01
	Wertemenge	135,30	168,80	172,41	90,00
	Interquartilsabstand	67,25	70,51	99,81	40,55
NR	Median	697,39	331,89	273,80	15,48
	Varianz	286318,74	245144,62	139757,86	63,65
	Standardabweichung	535,09	495,12	373,84	7,98
	Minimum	131,20	23,19	26,97	5,20
	Maximum	1903,70	1477,74	1001,73	26,62
	Wertemenge	1772,50	1454,55	974,76	21,42
	Interquartilsabstand	693,66	691,29	697,79	15,33

Tab. 21: Thrombozytäre MDA-Freisetzung [nM] aus der Aggregation mit ARA. 0/ 30/ 100µM ASS/ 3µM Terbogrel = Versuchsansätze mit 0/ 30/ 100µM ASS/ 3µM Terbogrel. [nM] = Nanomolar, [µM] = Mikromolar. K = Kontrolle, R = *Responder*, NR = *Nonresponder*

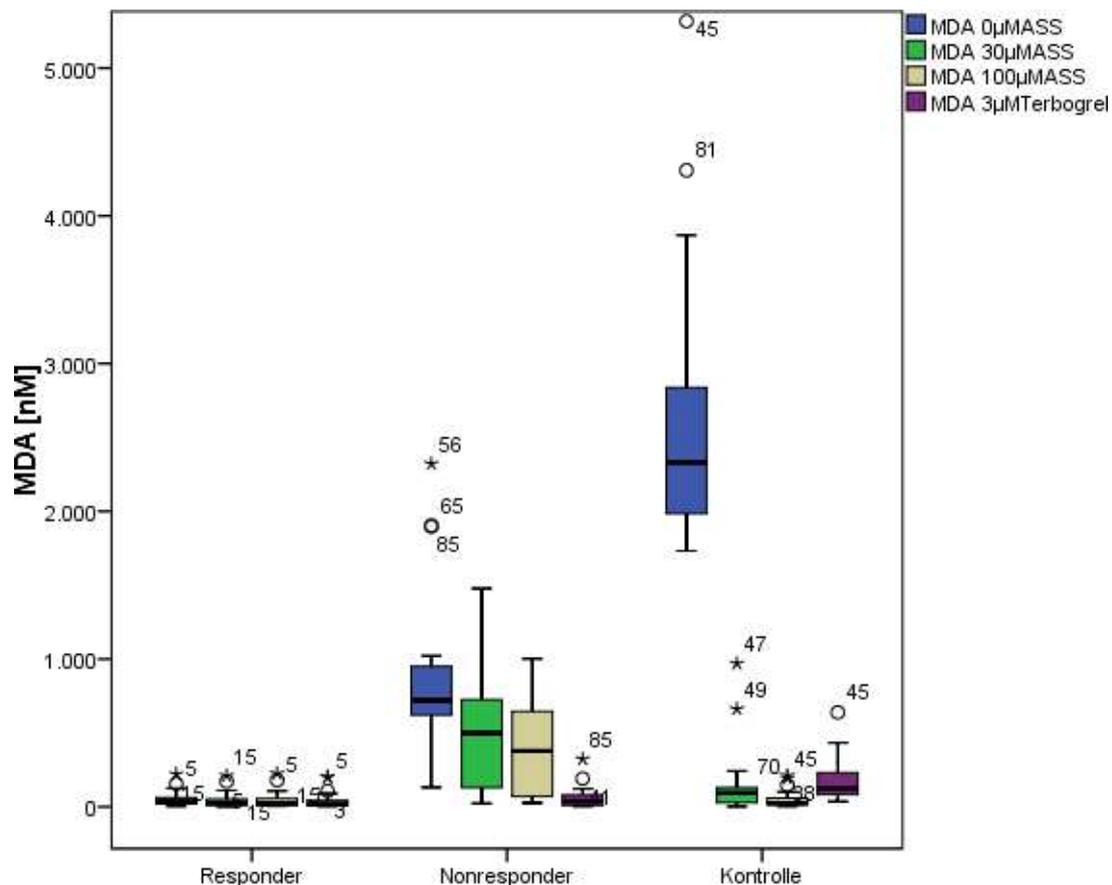


Abb. 9: Thrombozytäre MDA-Freisetzung [nM] aus der Aggregation mit ARA. 0/ 30/ 100µM ASS/ 3µM Terbogrel = Versuchsansätze mit 0/ 30/ 100µM ASS/ 3µM Terbogrel. [nM] = Nanomolar, [µM] = Mikromolar. Mit Sternchen (*) gekennzeichnete Werte = extreme Werte. Mit Kreis (o) gekennzeichnete Werte = Ausreißerwerte, Zahlen = Nr. des Versuchsansatzes bzw. Patientennummer.

3.1.1.3 Thrombozytäre Freisetzung von TXB₂ nach ARA-induzierter Aggregation

Die Ergebnisse im TXB₂-Assay entsprachen weitgehend den Ergebnissen des MDA-Assays. Die Kontrollgruppe setzte sich wieder deutlich ab mit Werten von 759,28ng/ml (= Median; Min = 181,73; Max = 1873,01) (s. Tab. 22, Abb. 10). *Nonresponder* zeigten mit 258,61ng/ml TXB₂ (= Median, Min = 8,16, Max = 560,09) ca. 96-mal höhere Werte als *Responder* mit 2,71ng/ml (= Median, Min = 0,81, Max = 19,66) ohne *in vitro* Zugabe von ASS und unterschieden sich damit noch stärker als im MDA Assay (s. Tab. 22, Abb. 10). Im Gegensatz zum MDA-Assay ließ sich im TXB₂-Assay eine Hemmung der *Nonresponder* auf 10,74% (27,78 (= Median; Min = 0,54; Max = 233,90)) durch 100µM ASS darstellen.

Nach Hinzugabe von ASS *in vitro* ließen sich die *Responder* noch minimal weiter hemmen. Bei den *Nonrespondern* war der Abfall der TXB₂-Werte unter 30µM ASS größer als im MDA-Assay darstellbar mit einer Hemmung auf 18,74% (= 48,46 ng/ml (= Median; Min = 0,44; Max = 402,85) (s. Tab. 22, Abb. 10).

Stimulus: ARA					
	TXB ₂ [ng/ml]	0µM ASS	30µM ASS	100µM ASS	3µM Terbogrel
Gruppe					
K	Median	759,28	9,34	1,10	3,26
	Varianz	160123,87	840699,48	2,00	382,66
	Standardabweichung	400,15	916,90	1,42	19,56
	Minimum	181,73	0,54	0,32	0,11
	Maximum	1873,01	3803,29	4,52	55,14
	Wertemenge	1691,28	3802,75	4,20	55,03
	Interquartilsabstand	441,69	54,49	1,81	3,26
R	Median	2,71	1,15	1,51	0,44
	Varianz	51,96	0,58	3,91	51,93
	Standardabweichung	7,21	0,76	1,98	7,21
	Minimum	0,81	0,45	0,21	0,08
	Maximum	19,66	2,21	5,19	17,83
	Wertemenge	18,85	1,76	4,98	17,75
	Interquartilsabstand	7,57	1,33	3,27	10,16
NR	Median	258,61	48,46	27,78	3,86
	Varianz	46604,04	25577,89	12095,61	266,55
	Standardabweichung	215,88	159,93	109,98	16,33
	Minimum	8,16	0,44	0,54	0,44
	Maximum	560,09	402,85	233,90	46,26
	Wertemenge	551,93	402,41	233,36	45,82
	Interquartilsabstand	448,18	267,53	223,46	19,78

Tab. 22: Thrombozytäre TXB₂-Freisetzung [ng/ml] aus der Aggregation mit ARA. 0/ 30/ 100µM ASS/ 3µM Terbogrel = Versuchsansätze mit 0/ 30/ 100µM ASS/ 3µM Terbogrel. [ng/ml] = Nanogramm pro Mililiter, [µM] = Mikromolar. K = Kontrolle, R = *Responder*, NR = *Nonresponder*.

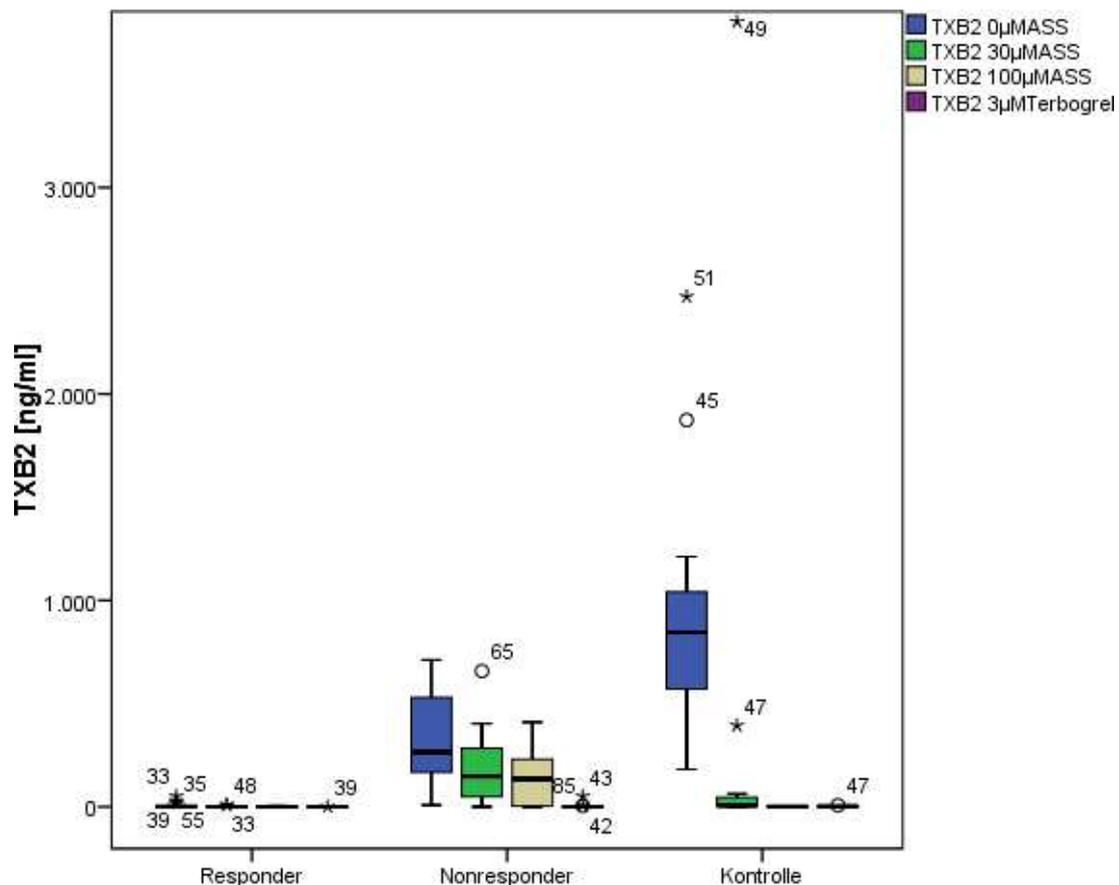


Abb. 10: TXB₂ [ng/ml] aus Aggregation mit ARA. 0/ 30/ 100µM ASS/ 3µM Terbogrel = Versuchsansätze mit 0/ 30/ 100µM ASS/ 3µM Terbogrel. [ng/ml] = Nanogramm pro Milliliter, [µM] = Mikromolar. Mit Sternchen (*) gekennzeichnete Werte = extreme Werte. Mit Kreis (o) gekennzeichnete Werte = Ausreißerwerte, Zahlen = Nr. des Versuchsansatzes bzw. Patientennummer.

3.1.2 Ergebnisse mit TRAP6 aus Aggregation, MDA- und TXB₂-Assay

3.1.2.1 Aggregation mit TRAP6

In der Aggregation mit TRAP6 waren die Unterschiede zwischen den Gruppen im Gegensatz zu der Aggregation mit ARA nur gering. Die Kontrollgruppe hatte nur minimal höhere Werte mit einer Steigung von 25,68cm/min (= Median; Min = 17,85; Max = 32,34) (s. Tab. 23, Abb. 11) sowie Amplitude von 86,33% (= Median; Min = 65,18; Max = 99,79) (s. Tab. 24, Abb. 12) gegenüber den *Respondern* mit einer Steigung bzw. Amplitude von 19,17cm/min (= Median; Min = 17,10; Max = 26,01) bzw. 81,00% (= Median; Min = 70,87; Max = 107,40) sowie der *Nonresponder* mit einer Steigung bzw. Amplitude von 19,35cm/min (= Median; Min = 12,63; Max = 36,06) bzw. 80,45% (= Median; Min = 71,33; Max = 86,93) (s. Tab. 23, 24 und Abb. 11, 12). Auch war der Abfall der Werte unter Zugabe von *in vitro* ASS und Terbogrel minimal.

Stimulus: TRAP6					
	Steigung [cm/min]	0µM ASS	30µM ASS	100µM ASS	3µM Terbogrel
Gruppe					
K	Median	25,68	19,41	19,86	17,49
	Varianz	13,17	17,61	13,97	10,12
	Standardabweichung	3,63	4,20	3,74	3,18
	Minimum	17,85	11,64	13,17	10,53
	Maximum	32,34	28,38	27,63	22,50
	Wertemenge	14,49	16,74	14,46	11,97
	Interquartilsabstand	4,47	3,77	4,65	4,08
R	Median	19,17	16,46	16,29	13,07
	Varianz	11,24	31,29	5,08	2,94
	Standardabweichung	3,35	5,59	2,25	1,72
	Minimum	17,10	0,00	13,05	11,16
	Maximum	26,01	25,65	18,87	15,60
	Wertemenge	8,91	25,65	5,82	4,44
	Interquartilsabstand	5,58	7,57	4,43	3,43
NR	Median	19,35	15,48	15,72	13,23
	Varianz	48,23	31,53	16,30	12,20
	Standardabweichung	6,94	5,62	4,04	3,49
	Minimum	12,63	5,82	11,25	9,99
	Maximum	36,06	30,12	24,00	20,25
	Wertemenge	23,43	24,30	12,75	10,26
	Interquartilsabstand	7,26	7,58	5,79	5,77

Tab. 23: Steigung [cm/min] aus der Aggregation mit TRAP6. 0/ 30/ 100µM ASS/3µM Terbogrel = Versuchsansätze mit 0/ 30/ 100µM ASS/ 3µM Terbogrel. K = Kontrolle, R = *Responder*, NR = *Nonresponder*.

[cm/min] = Zentimeter pro Minute, [µM] = Mikromolar.

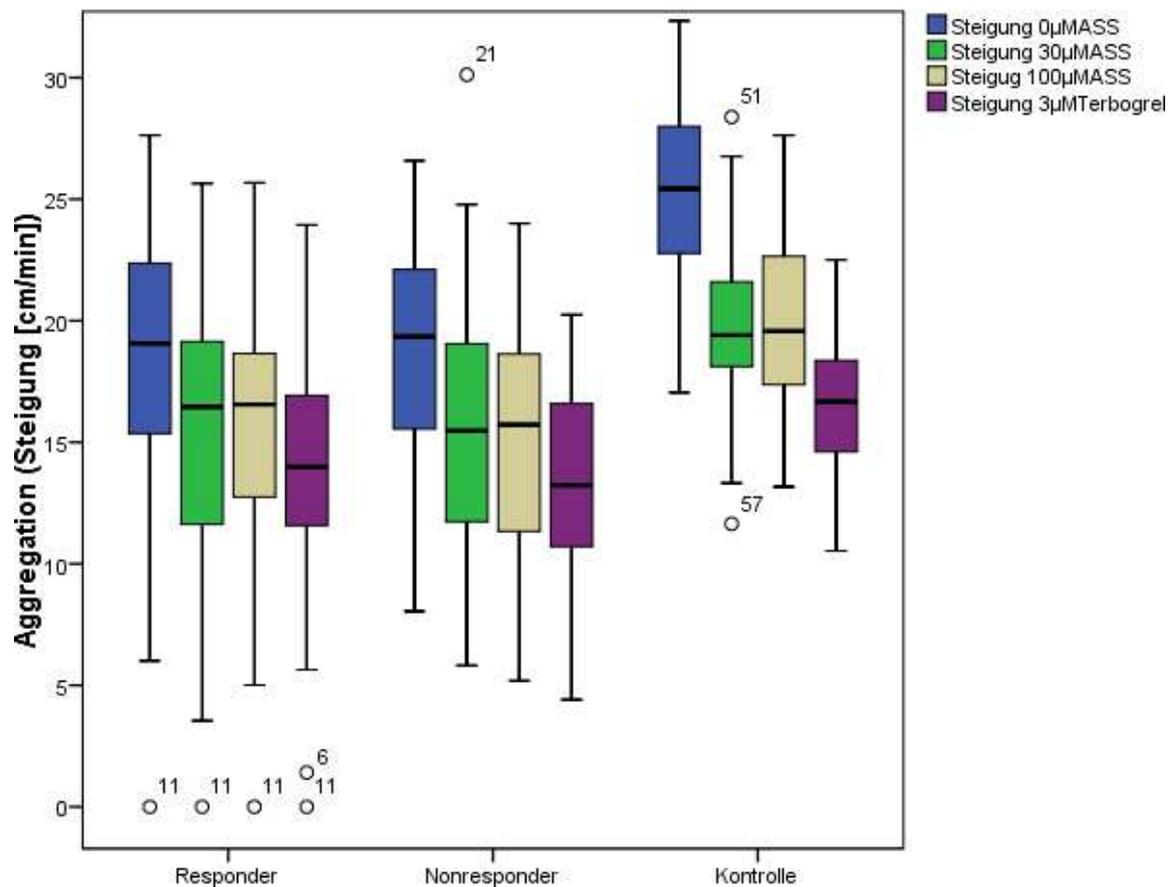


Abb. 11: Steigung [cm/min] aus der Aggregation mit TRAP6. 0/ 30/ 100µM ASS/ 3µM Terbogrel = Versuchsansätze mit 0/ 30/ 100µM ASS/ 3µM Terbogrel. [cm/min] = Zentimeter pro Minute, [µM] = Mikromolar. Mit Sternchen (*) gekennzeichnete Werte = extreme Werte. Mit Kreis (o) gekennzeichnete Werte = Ausreißerwerte, Zahlen = Nr. des Versuchsansatzes bzw. Patientennummer.

Stimulus: TRAP6					
	Amplitude [%]	0µM ASS	30µM ASS	100µM ASS	3µM Terbogrel
K	Median	86,33	81,83	83,00	77,15
	Varianz	64,47	20,03	27,45	67,19
	Standardabweichung	8,03	4,48	5,24	8,20
	Minimum	65,18	70,58	75,47	65,20
	Maximum	99,79	94,46	92,42	95,11
	Wertemenge	34,61	23,88	16,95	29,91
	Interquartilsabstand	9,75	4,68	9,83	12,78
R	Median	81,00	77,23	82,89	76,23
	Varianz	183,41	175,59	172,83	195,57
	Standardabweichung	13,54	13,25	13,15	13,98
	Minimum	70,87	35,23	68,37	60,20
	Maximum	107,40	95,11	105,62	97,72
	Wertemenge	36,53	59,88	37,25	37,52
	Interquartilsabstand	20,37	14,99	19,79	25,59

NR	Median	80,45	75,22	77,16	70,92
	Varianz	31,94	112,01	34,59	51,90
	Standardabweichung	5,65	10,58	5,88	7,20
	Minimum	71,33	45,87	69,02	66,10
	Maximum	86,93	92,28	87,59	88,62
	Wertemenge	15,60	46,41	18,57	22,52
	Interquartilsabstand	10,74	14,85	8,61	10,16

Tab. 24: Amplitude [%] aus der Aggregation mit TRAP6. 0/ 30/ 100µM ASS/ 3µM Terbogrel = Versuchsansätze mit 0/ 30/ 100µM ASS/ 3µM Terbogrel. K = Kontrolle, R = Responder, NR = Nonresponder. [%] = Prozent, [µM] = Mikromolar.

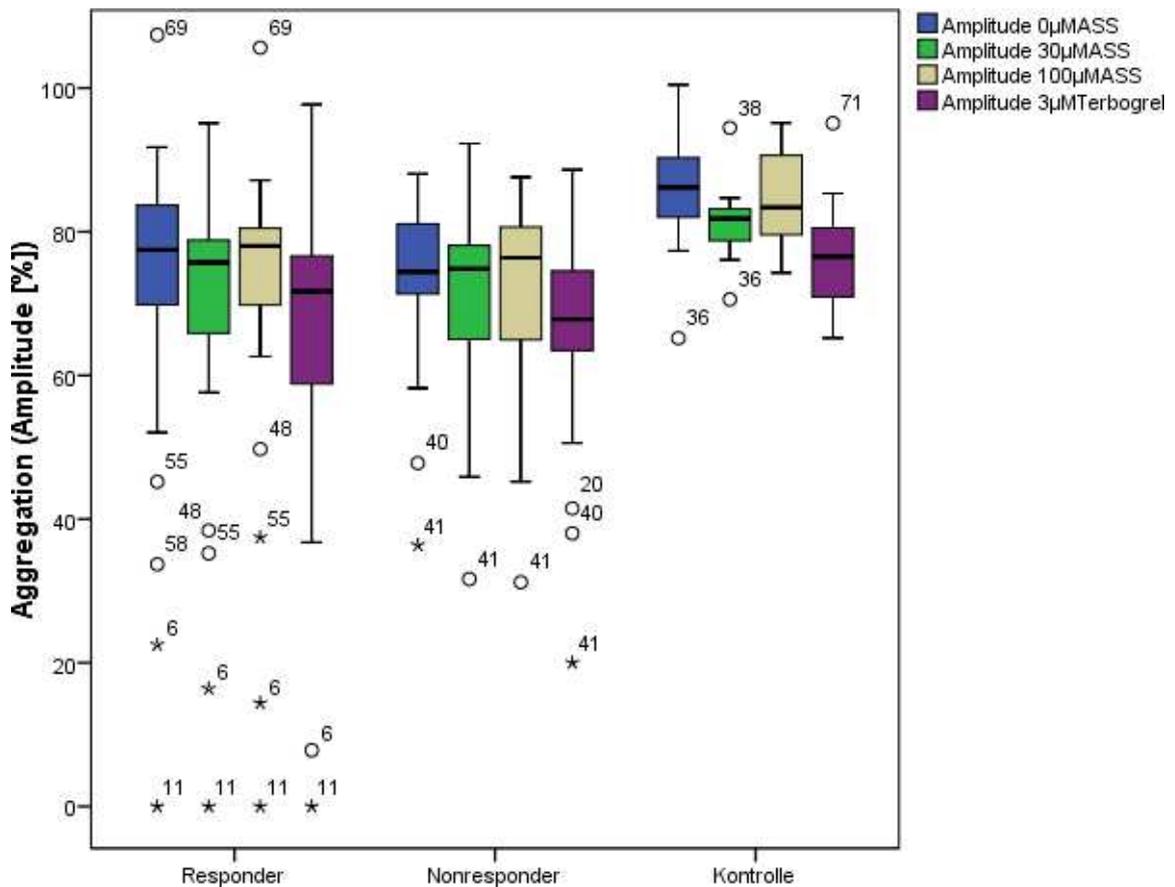


Abb. 12: Amplitude [%] aus der Aggregation mit TRAP6. 0/ 30/ 100µM ASS/ 3µM Terbogrel = Versuchsansätze mit 0/ 30/ 100µM ASS/ 3µM Terbogrel. [%] = Prozent, [µM] = Mikromolar. Mit Sternchen (*) gekennzeichnete Werte = extreme Werte. Mit Kreis (o) gekennzeichnete Werte = Ausreißerwerte, Zahlen = Nr. des Versuchsansatzes bzw. Patientenummer.

3.1.2.2 Thrombozytäre Freisetzung von MDA sowie TXB₂ nach TRAP6-induzierter Aggregation

Im MDA-Assay sowie im TXB₂-Assay ohne *in vitro* Zusatz von ASS unterschied sich die Kontrollgruppe mit deutlich höheren Werten von den Patienten mit durchschnittlich 286,72nM MDA (= Median; Min = 23,54; Max = 883,48) bzw. 143,2ng/ml TXB₂ (= Median; Min = 0,19; Max= 777,95) (s. Werte mit 0µM ASS in Tab. 25, 26 und Abb. 13,14). Ebenfalls ließ sich in der

Kontrollgruppe eine Hemmung durch ASS und Terbogrel darstellen; unter 30µM ASS bereits auf 29,71nM MDA (= Median; Min = 7,46; Max = 241,54) bzw. 5,03ng/ml TXB₂ (= Median; Min = 0,11; Max = 55,14) (vgl. Werte mit 30/100µM ASS bzw. 3µM Terbogrel in Tabellen 25, 26 und Abbildungen 13, 14). *Responder* sowie *Nonresponder* unterschieden sich jedoch in allen Ansätzen für MDA und TXB₂ mit Stimulation durch TRAP6 kaum (s. Tab. 25, 26 und Abb. 13, 14).

Stimulus: TRAP6					
	MDA [nM]	0µM ASS	30µM ASS	100µM ASS	3µM Terbogrel
Gruppe					
K	Median	286,72	29,71	7,57	15,37
	Varianz	47594,29	3918,47	3284,70	2859,87
	Standardabweichung	218,16	62,60	57,31	53,48
	Minimum	23,54	7,46	2,27	2,45
	Maximum	883,48	241,54	243,84	209,04
	Wertemenge	859,94	234,08	241,57	206,59
	Interquartilsabstand	246,92	71,60	11,74	22,16
R	Median	15,87	7,51	6,99	3,08
	Varianz	1194,18	464,02	1244,60	1352,01
	Standardabweichung	34,56	21,54	35,28	36,77
	Minimum	3,01	3,01	3,16	2,06
	Maximum	94,09	93,01	93,37	94,05
	Wertemenge	91,08	90,00	90,21	91,99
	Interquartilsabstand	49,91	14,13	39,46	29,63
NR	Median	20,40	12,38	11,28	5,60
	Varianz	436,20	103,65	73,70	26,30
	Standardabweichung	20,89	10,18	8,58	5,13
	Minimum	2,25	2,05	2,44	1,63
	Maximum	68,83	39,92	28,84	18,04
	Wertemenge	66,58	37,87	26,40	16,41
	Interquartilsabstand	28,59	17,92	12,74	5,91

Tab. 25: MDA [nM] aus der Aggregation mit TRAP6. 0/ 30/ 100µM ASS/ 3µM Terbogrel = Versuchsansätze mit 0/ 30/ 100µM ASS/ 3µM Terbogrel. K = Kontrolle, R = *Responder*, NR = *Nonresponder*. [nM] = Nanomolar, [µM] = Mikromolar.

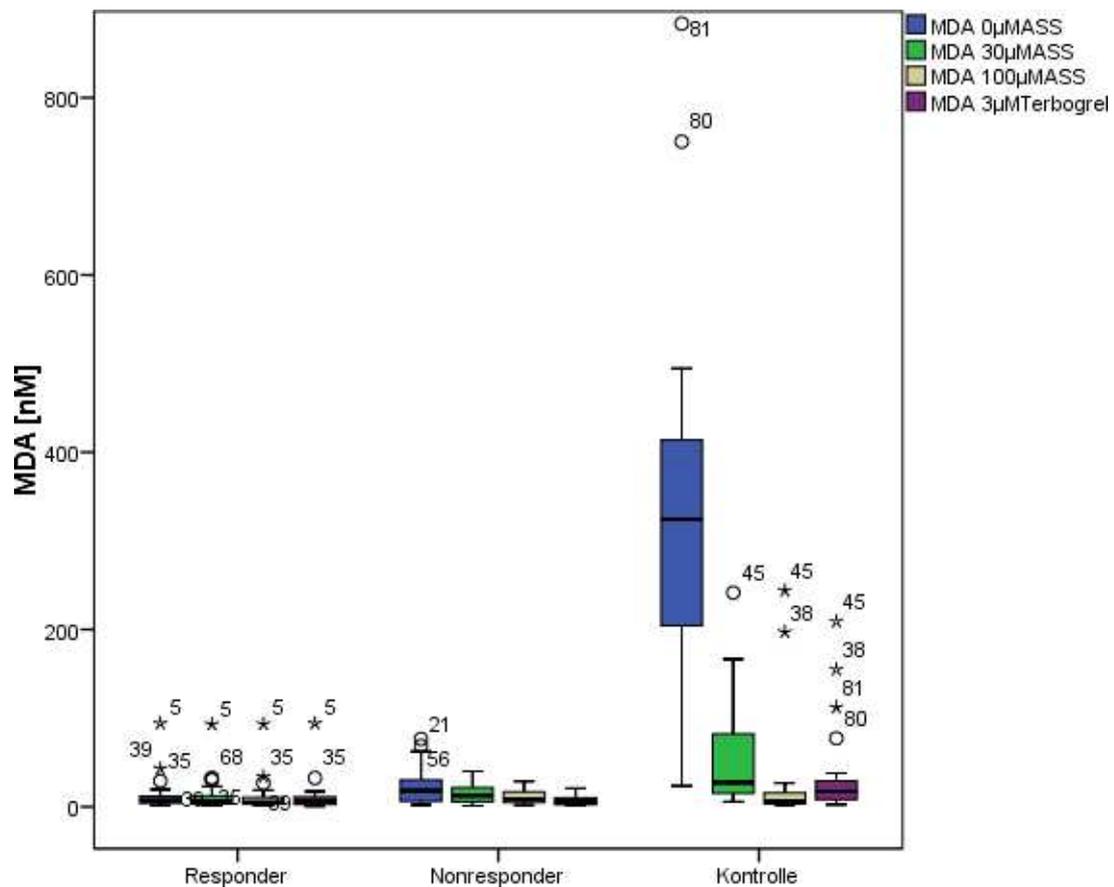


Abb. 13: MDA [nM] aus der Aggregation mit TRAP6. 0/ 30/ 100µM ASS/ 3µM Terbogrel = Versuchsansätze mit 0/ 30/ 100µM ASS/ 3µM Terbogrel. [nM] = Nanomolar, [µM] = Mikromolar. Mit Sternchen (*) gekennzeichnete Werte = extreme Werte. Mit Kreis (o) gekennzeichnete Werte = Ausreißerwerte, Zahlen = Nr. des Versuchsansatzes bzw. Patientennummer.

Stimulus: TRAP6					
	TXB ₂ [ng/ml]	0µM ASS	30µM ASS	100µM ASS	3µM Terbogrel
K	Median	143,22	5,03	0,29	0,55
	Varianz	41101,92	319,88	3,97	85,28
	Standardabweichung	202,74	17,89	1,99	9,23
	Minimum	0,19	0,11	0,10	0,21
	Maximum	777,95	55,14	8,37	33,71
	Wertemenge	777,76	55,03	8,27	33,50
	Interquartilsabstand	292,41	23,44	0,13	0,91
R	Median	3,29	0,33	0,22	0,17
	Varianz	48,72	19,29	2,73	0,03
	Standardabweichung	6,98	4,39	1,65	0,18
	Minimum	0,09	0,08	0,09	0,11
	Maximum	17,18	17,83	4,24	0,60
	Wertemenge	17,09	17,75	4,15	0,49
	Interquartilsabstand	12,00	1,03	1,23	0,24

NR	Median	2,42	1,45	0,77	0,23
	Varianz	214,12	146,43	42,72	0,00
	Standardabweichung	14,63	12,10	6,54	0,06
	Minimum	0,80	0,12	0,19	0,11
	Maximum	44,93	46,26	19,50	0,28
	Wertemenge	44,13	46,14	19,31	0,17
	Interquartilsabstand	16,63	5,47	5,11	0,12

Tab. 26: TXB₂ [ng/ml] aus der Aggregation mit TRAP6. 0/ 30/ 100µM ASS/ 3µM Terbogrel = Versuchsansätze mit 0/ 30/ 100µM ASS/ 3µM Terbogrel. K = Kontrolle, R = *Responder*, NR = *Nonresponder*. [ng/ml] = Nanogramm pro Mililiter, [µM] = Mikromolar.

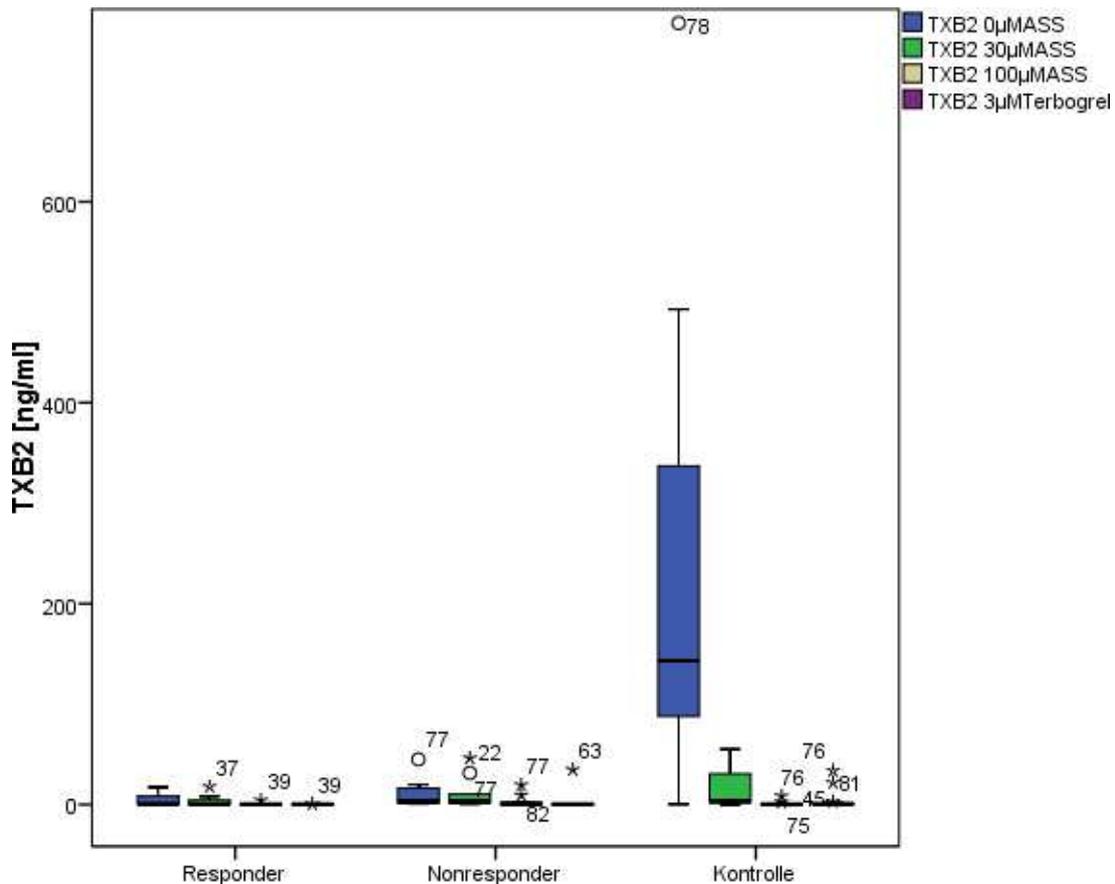


Abb. 14: TXB₂ [ng/ml] aus der Aggregation mit TRAP6. 0/ 30/ 100µM ASS/ 3µM Terbogrel = Versuchsansätze mit 0/ 30/ 100µM ASS/ 3µM Terbogrel. [ng/ml] = Nanogramm pro Mililiter, [µM] = Mikromolar. Mit Sternchen (*) gekennzeichnete Werte = extreme Werte. Mit Kreis (o) gekennzeichnete Werte = Ausreißerwerte, Zahlen = Nr. des Versuchsansatzes bzw. Patientennummer.

Zusammenfassend zeigt sich in der deskriptiven Statistik, dass die *Nonresponder*, welche deutlich stärker auf Stimuli reagieren durch verstärkte Aggregation, vermehrt das proaggregatorische TXB₂ sowie MDA bilden.

3.2 Vergleich von MDA-Assay mit LTA und TXB₂-ELISA

3.2.1 Vergleich der Ergebnisse von Aggregation, MDA- und Thromboxan-Assay nach Stimulation mit ARA mittels Korrelationsanalyse

Für den Vergleich des MDA-Assays mit der LTA und dem TXB₂-ELISA wurden Korrelationen durchgeführt.

3.2.1.1 Korrelation zwischen der thrombozytären Freisetzung von MDA nach ARA-induzierter Aggregation und der Aggregation mit ARA

In den Ergebnissen der Aggregation mit ARA korrelierte der MDA-Assay positiv mit den Werten der Aggregation; dabei war die Korrelation mit der Steigung der Aggregationskurve minimal stärker als die Korrelation mit der Amplitude. Aufgrund ähnlicher Ergebnisse wurde sich jedoch auf die Darstellung der Korrelation mit der relativen Aggregationsamplitude beschränkt (s. Tab. 27, Abb. 15). Die Korrelation war in dem Ansatz ohne Zusatz von ASS mit Spearmans's rho von 0,91 für die Korrelation zwischen MDA und relativer Aggregationsamplitude am stärksten (s. Werte für 0µM ASS in Tab. 27, Abb. 15). Diese Ergebnisse waren statistisch signifikant ($p < 0,001$). Die Korrelation nahm ab mit steigenden Konzentrationen von ASS und war am niedrigsten in dem Ansatz mit Terbogrel (s. Tab. 27, Abb. 15).

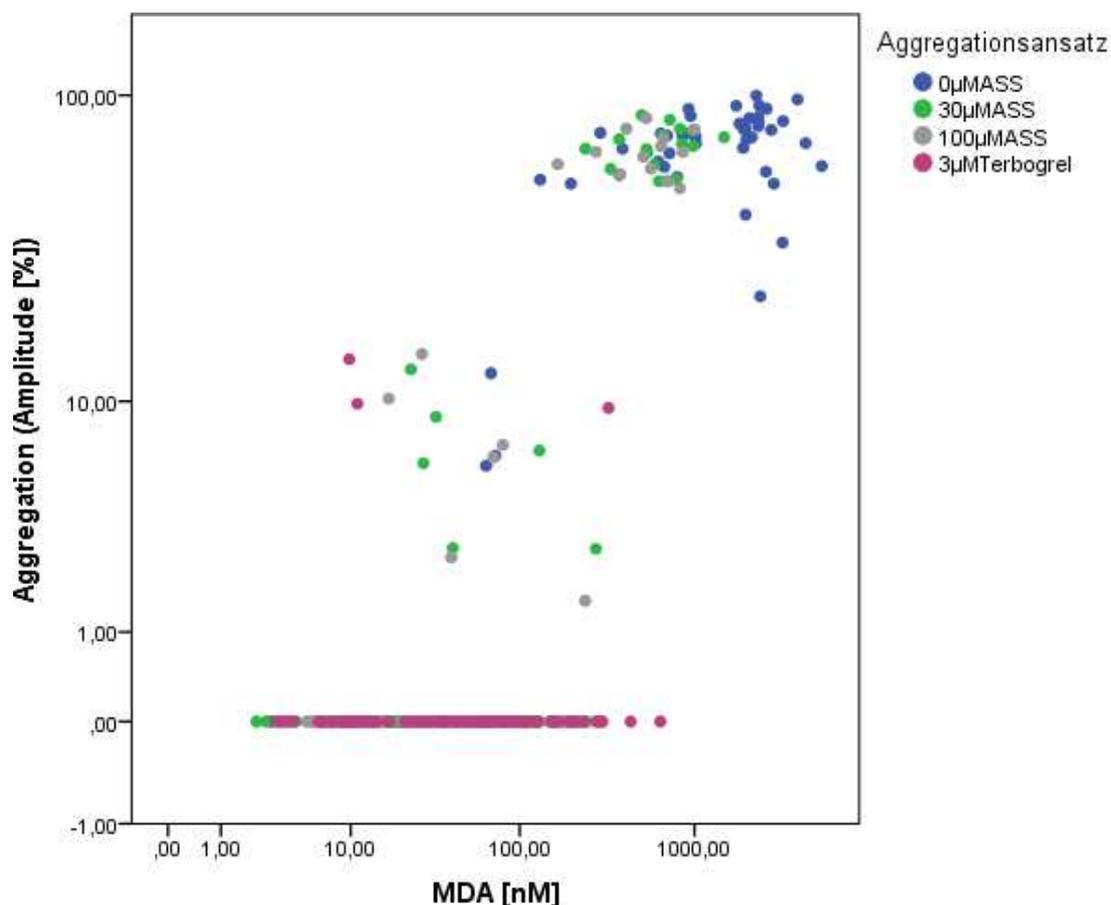


Abb. 15: Korrelation MDA [nM] und Aggregationsamplitude [%] aus der Aggregation mit ARA. 0/ 30/ 100µM ASS/ 3µM Terbogrel = Versuchsansätze mit 0/ 30/ 100µM ASS/ 3µM Terbogrel. [nM] = Nanomolar, [%] = Prozent, [µM] = Mikromolar.

			MDA [nM]
0µM ASS	Amplitude [%]	Korrelationskoeffizient	0,84**
		Sig. (2-seitig)	0,00
		N	83
30µM ASS	Amplitude [%]	Korrelationskoeffizient	0,65**
		Sig. (2-seitig)	0,00
		N	83
100µM ASS	Amplitude [%]	Korrelationskoeffizient	0,60**
		Sig. (2-seitig)	0,00
		N	83
3µM Terbogrel	Amplitude [%]	Korrelationskoeffizient	-0,03
		Sig. (2-seitig)	0,80
		N	83

Tab. 27: Korrelation MDA [nM] und Aggregationsamplitude [%] aus der Aggregation mit ARA (Korrelation nach Spearman). 0/ 30/ 100µM ASS/ 3µM Terbogrel = Versuchsansätze mit 0/ 30/ 100µM ASS/ 3µM Terbogrel. [nM] = Nanomolar, Sig. = Signifikanz [µM] = Mikromolar, [%] = Prozent.

**Die Korrelation ist signifikant zum Signifikanzniveau $p = 0,01$ (2-seitig)

3.2.1.2 Korrelation zwischen der thrombozytären Freisetzung von MDA und TXB₂ nach Aggregation mit ARA

Ebenfalls korrelierten in den Ergebnissen mit ARA die MDA-Werte positiv mit den Ergebnissen des TXB₂-Assays (s. Tab. 28, Abb. 16). Auch hier war mit einem Spearman's rho von 0,891 die Korrelation in dem Ansatz ohne Zusatz von ASS am stärksten (s. Werte für 0µM ASS in Tab. 28, Abb. 16). Die Ergebnisse waren signifikant ($p < 0,001$). Die Korrelation nahm ab mit steigenden Konzentrationen von ASS und war am niedrigsten in dem Ansatz mit Terbogrel (s. Werte für 30/ 100µM ASS/ 3µM Terbogrel in Tab. 28, Abb. 16). Auch hier waren die Ergebnisse statistisch signifikant ($p < 0,001$).

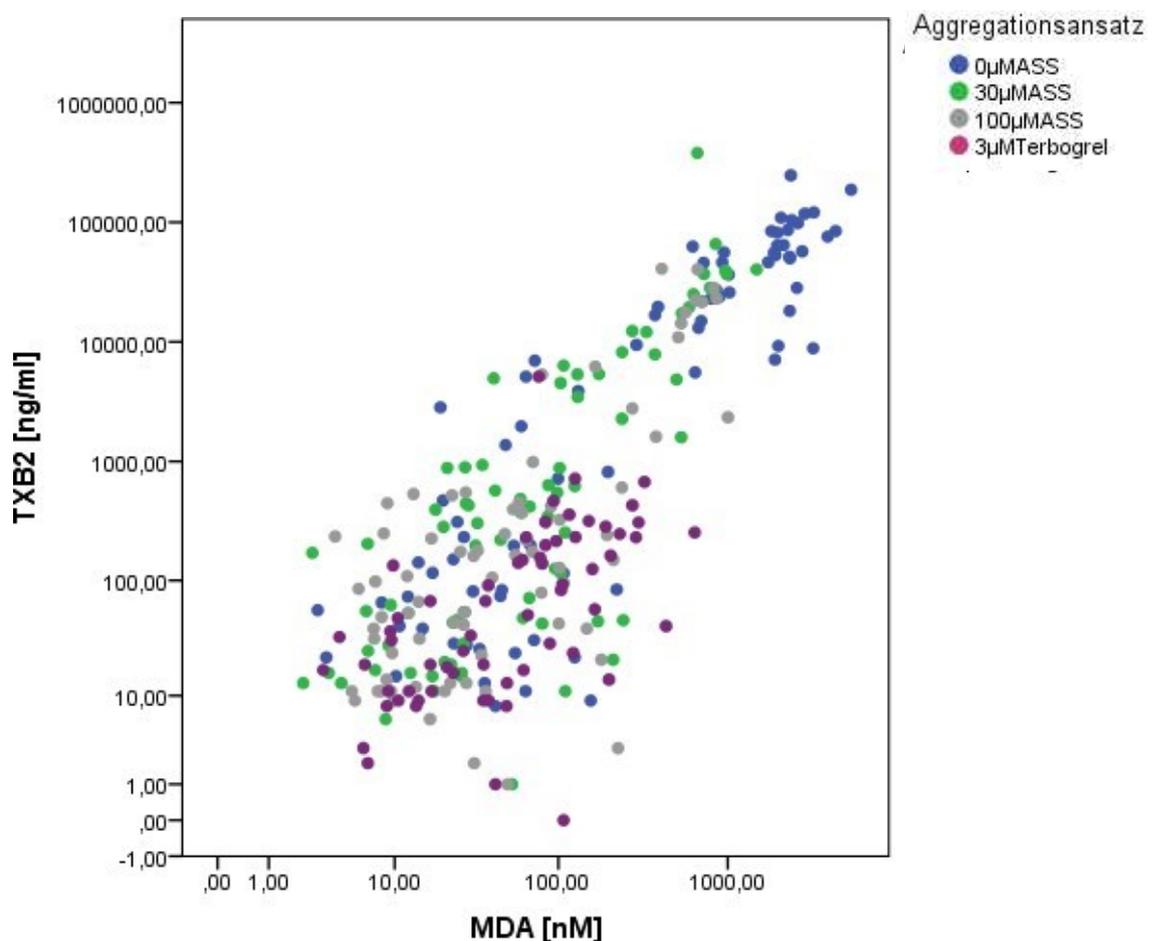


Abb. 16: Korrelation MDA [nM] und TXB₂ [ng/ml] aus der Aggregation mit ARA. 0/ 30/ 100µM ASS/ 3µM Terbogrel = Versuchsansätze mit 0/ 30/ 100µM ASS/ 3µM Terbogrel. [nM] = Nanomolar, [µM] = Mikromolar, [ng/ml] = Nanogramm/Milliliter

			MDA
0µM ASS	TXB ₂ [ng/ml]	Korrelationskoeffizient	0,89**
		Sig. (2-seitig)	0,00
		N	80
30µM ASS	TXB ₂ [ng/ml]	Korrelationskoeffizient	0,79**
		Sig. (2-seitig)	0,00
		N	77
100µM ASS	TXB ₂ [ng/ml]	Korrelationskoeffizient	0,68**
		Sig. (2-seitig)	0,00
		N	76
3µM Terbogrel	TXB ₂ [ng/ml]	Korrelationskoeffizient	0,67**
		Sig. (2-seitig)	0,00
		N	62

Tab. 28: Korrelation MDA [nM] und TXB₂ [ng/ml] aus der Aggregation mit ARA (Korrelation nach Spearman). 0/ 30/ 100µM ASS/ 3µM Terbogrel = Versuchsansätze mit 0/ 30/ 100µM ASS/ 3µM Terbogrel. [nM] = Nanomolar, [ng/ml] = Nanogramm/Mililiter, Sig. = Signifikanz, [µM] = Mikromolar.
**Die Korrelation ist signifikant zum Signifikanzniveau $p = 0,01$ (2-seitig)

3.2.1.3 Korrelation zwischen der thrombozytären Freisetzung von TXB₂ nach ARA-induzierter Aggregation und der Aggregation mit ARA

In der Korrelation von TXB₂ [ng/ml] und Aggregation war der positive Zusammenhang ähnlich stark und jeweils signifikant ($p < 0,01$) wie zwischen MDA und Aggregation (s. Abb. 17, Tab. 29). Am stärksten war auch hier die Korrelation der Werte aus der Aggregation ohne Zusatz von ASS mit einem Korrelationskoeffizienten für die Korrelation von TXB₂ [ng/ml] und Steigung von 0,90 sowie für die Korrelation von TXB₂ [ng/ml] und relativer Aggregationsamplitude von 0,84 (s. Werte für 0µM ASS Tab. 29).

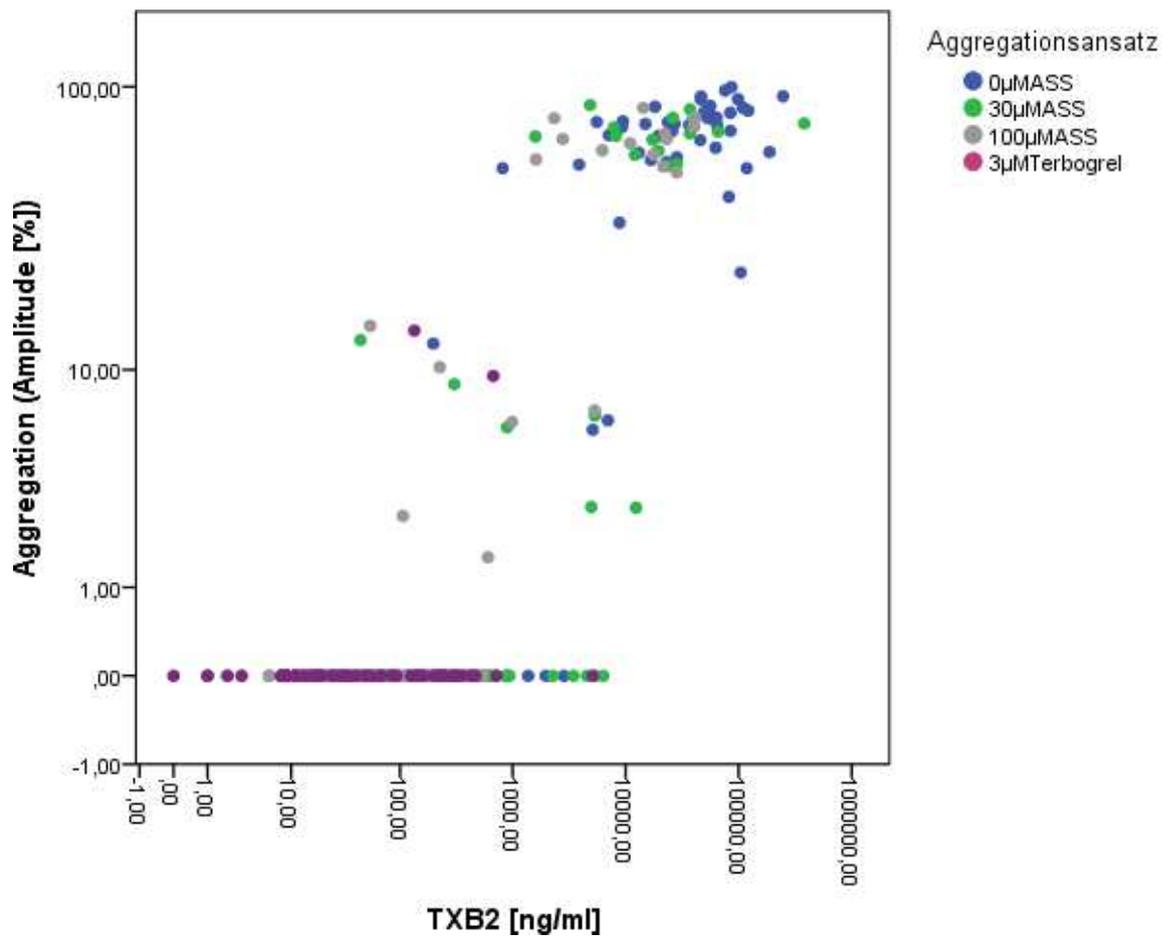


Abb. 17: Korrelation TXB₂ [ng/ml] und Amplitude [%] aus der Aggregation mit ARA. 0/ 30/ 100µM ASS/ 3µM Terbogrel = Versuchsansätze mit 0/ 30/ 100µM ASS/ 3µM Terbogrel. [ng/ml] = Nanogramm/Mililiter, [µM] = Mikromolar, [%] = Prozent.

		TXB ₂ [ng/ml]	
0µM ASS	Amplitude [%]	Korrelationskoeffizient	0,84**
		Sig. (2-seitig)	0,00
		N	80
30µM ASS	Amplitude [%]	Korrelationskoeffizient	0,70**
		Sig. (2-seitig)	0,00
		N	77
100µM ASS	Amplitude [%]	Korrelationskoeffizient	0,66**
		Sig. (2-seitig)	0,00
		N	76
3µM Terbogrel	Amplitude [%]	Korrelationskoeffizient	0,18
		Sig. (2-seitig)	0,17
		N	62

Tab. 29: Korrelation TXB₂ [ng/ml] und Amplitude [%] aus der Aggregation mit ARA (Korrelation nach Spearman). 0/ 30/ 100µM ASS/ 3µM Terbogrel = Versuchsansätze mit 0/ 30/ 100µM ASS/ 3µM Terbogrel. [ng/ml] = Nanogramm/Mililiter, Sig. = Signifikanz, [µM] = Mikromolar, [%] = Prozent.

**Die Korrelation ist signifikant zum Signifikanzniveau $p = 0,01$ (2-seitig).

3.2.2 Vergleich der Ergebnisse von Aggregation, MDA- und Thromboxan-Assay nach Stimulation mit TRAP6 mittels Korrelationanalyse

In den Ergebnissen mit TRAP6 als Agonist für die Stimulation der Thrombozyten wurde aufgrund der schwachen Korrelation zwischen MDA/TXB₂ und der Aggregation auf eine Darstellung der Ergebnisse verzichtet und im Folgenden nur die Korrelation der thrombozytären Freisetzung von MDA und TXB₂ nach TRAP6-induzierter Aggregation dargestellt.

In den Ergebnissen mit TRAP6 korrelierten die MDA-Werte positiv mit den Ergebnissen des TXB₂-Assays (s. Tab. 30, Abb. 18). Auch hier war mit einem Spearmans's rho von 0,83 die Korrelation mit den Ergebnissen ohne Zusatz von ASS am stärksten (s. Werte für 0µM ASS in Tab. 30, Abb. 18). Die Ergebnisse waren signifikant ($p < 0,001$). Die Korrelation nahm ab mit steigenden Konzentrationen von ASS und war am niedrigsten in dem Ansatz mit Terbogrel (s. Werte für 3µM Terbogrel in Tab. 30, Abb. 18). Auch hier waren die Ergebnisse signifikant ($p < 0,001$).

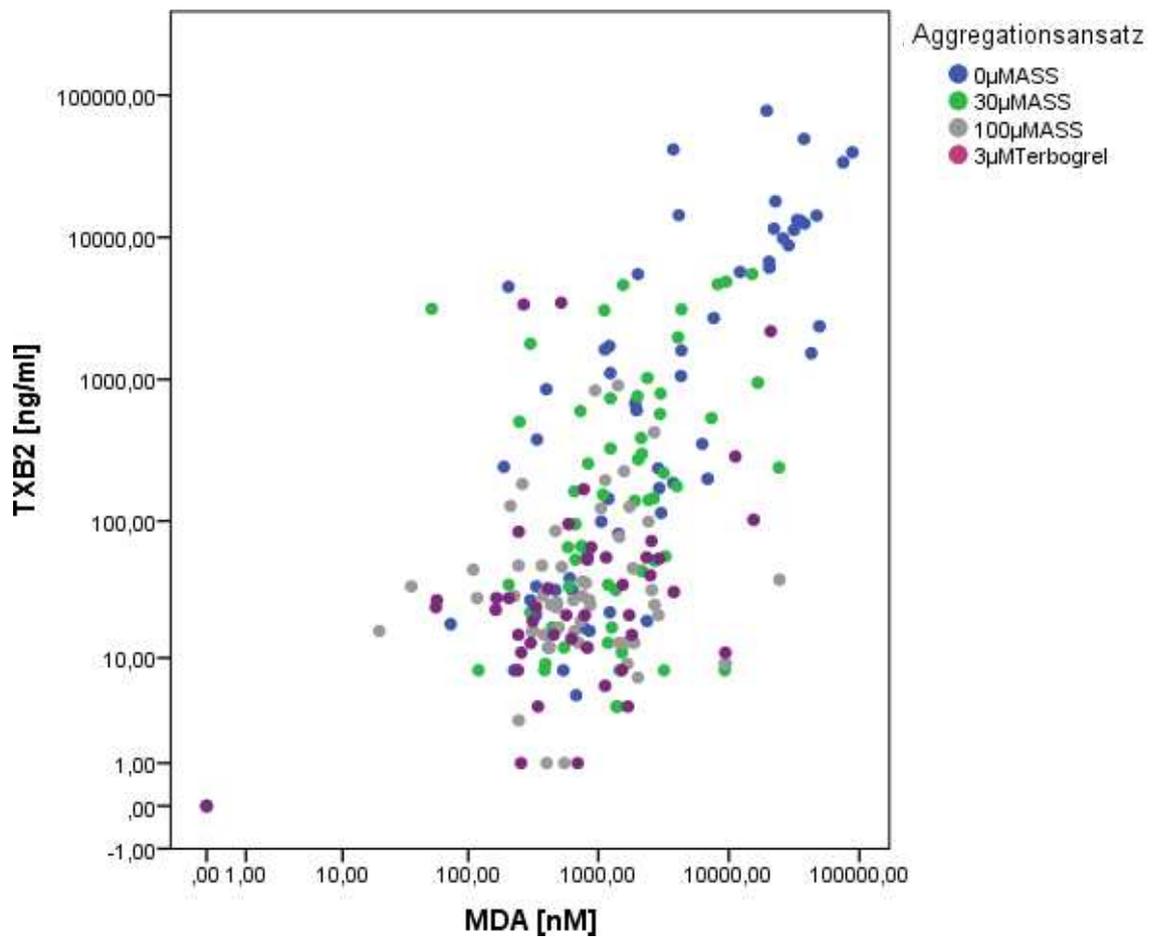


Abb. 18: MDA [nM] und TXB₂ [ng/ml] aus der Aggregation mit TRAP6. 0/ 30/ 100µM ASS/ 3µM Terbogrel = Versuchsansätze mit 0/ 30/ 100µM ASS/ 3µM Terbogrel. [ng/ml] = Nanogramm/Mililiter, [nM] = Nanomolar, [µM] = Mikromolar.

		MDA [nM]	
0µM ASS	TXB₂ [ng/ml]	Korrelationskoeffizient	0,83**
		Sig. (2-seitig)	0,00
		N	59
30µM ASS	TXB₂ [ng/ml]	Korrelationskoeffizient	0,43**
		Sig. (2-seitig)	0,00
		N	58
100µM ASS	TXB₂ [ng/ml]	Korrelationskoeffizient	0,09
		Sig. (2-seitig)	0,52
		N	54
3µM Terbogrel	TXB₂ [ng/ml]	Korrelationskoeffizient	0,44**
		Sig. (2-seitig)	0,00
		N	43

Tab. 30: Korrelation MDA [nM] und TXB₂ [ng/ml]. 0/ 30/ 100µM ASS/ 3µM Terbogrel = Versuchsansätze mit 0/ 30/ 100µM ASS/ 3µM Terbogrel. [ng/ml] = Nanogramm/Mililiter, [nM] = Nanomolar, Sig. = Signifikanz, [µM] = Mikromolar.

**Die Korrelation ist signifikant zum Signifikanzniveau $p = 0,01$ (2-seitig).

3.3 Prüfung des Einflusses von Alter und Geschlecht als mögliche Störfaktoren (*Confounder*) der Korrelationsanalyse (Partielle Rangkorrelation nach Spearman)

Es wurde eine partielle Rangkorrelation nach Spearman durchgeführt, um die Ergebnisse auf Verfälschung durch Störfaktoren (*Confounder*) zu untersuchen. Dabei wurde die Auswahl auf Alter und Geschlecht beschränkt. Dargestellt sind jeweils die Partialkorrelationen für die Gesamtheit der Aggregationsansätze (0/ 30/ 100µM ASS/ 3µM Terbogrel). Die alleinige Korrelation der Ergebnisse aus dem Ansatz mit 0µM ASS zeigte eine ähnliche Tendenz.

3.3.1. Alter

In der partiellen Rangkorrelation nach Spearman für den *Confounder* Alter zeigte sich anhand der sehr ähnlichen Korrelationskoeffizienten im Vergleich zur „normalen“ Rangkorrelation nach Spearman, dass die positiven Zusammenhänge zwischen Aggregation, MDA und TXB₂ auch unter „Herausrechnen“ des Alters bestehen blieben. So betrug beispielsweise die partielle Rangkorrelation aus der Aggregation mit ARA zwischen MDA und Aggregation für alle Aggregationsergebnisse in der Aggregation mit ARA (N=332) für die Steigung 0,70 ($p < 0,001$) statt 0,68 (s. Tab. 31).

Kontrollvariablen		MDA [nM]	
Alter	Steigung [cm/min]	Korrelationskoeffizient	0,70
		Sig. (2-seitig)	0,00
		df	329

Tab. 31: Partialkorrelation MDA [nM] und Steigung [cm/min] aus der Aggregation mit ARA mit Kontrollvariable Alter. [cm/min]= Zentimeter pro Minute, df = degrees of freedom, [nM] = Nanomolar, Sig. = Signifikanz.

3.3.2 Geschlecht

In der partiellen Rangkorrelation nach Spearman für den *Confounder* Geschlecht zeigten sich sehr ähnliche Korrelationskoeffizienten wie in der „normalen“ Rangkorrelation nach Spearman. Auch hier blieben die positiven Zusammenhänge zwischen Aggregation, MDA und TXB₂ unter „Herausrechnen“ des Geschlechts bestehen. Beispielsweise betrug die partielle Rangkorrelation aus der Aggregation mit ARA zwischen MDA und TXB₂ für alle Aggregationsansätze (N=332) 0,72 ($p < 0,001$) im Vergleich zur Rangkorrelation nach Spearman mit $r = 0,73$ (s. Tab. 32). Exemplarisch ist hier nur dies als Tabelle dargestellt, weitere Ergebnisse befinden sich im Anhang.

Kontrollvariablen		MDA [nM]	
Geschlecht	TXB ₂ [ng/ml]	Korrelationskoeffizient	0,72
		Sig. (2-seitig)	0,00
		df	329

Tab. 32: Partialkorrelation MDA [nM] und TXB₂ [ng/ml] aus der Aggregation mit ARA mit Kontrollvariable Geschlecht. df = degrees of freedom, [ng/ml] = Nanogramm/Mililiter, [nM] = Nanomolar, Sig. = Signifikanz.

Die weiteren Partialkorrelationen zu Alter und Geschlecht kamen ebenfalls zu ähnlichen Ergebnissen wie die ursprünglichen Korrelationsanalysen.

Insgesamt zeigte sich, dass unter Berücksichtigung der Variablen Alter und Geschlecht die positiven Zusammenhänge zwischen Aggregation, MDA und TXB₂ bestehen blieben.

3.4 Darstellung der Aspirin-Nonresponse durch den MDA-Assay

3.4.1 Unterscheidung Responder versus (vs.) Nonresponder

Der Vergleich der Ergebnisse der *Responder* und *Nonresponder* (anhand der Aggregation eingeteilt) aus dem MDA-Assay und ELISA wurde mittels des nonparametrischen Mann-Whitney-U-Tests durchgeführt.

Die Ergebnisse spiegeln die in der deskriptiven Statistik beschriebenen Verhältnisse der Werte der Gruppen untereinander wider. In den Ansätzen mit ARA unterschieden sich *Responder* und *Nonresponder* sowohl im MDA-Assay sowie dem TXB₂-Assay signifikant voneinander mit $p < 0,01$, in dem Ansatz mit Terbogrel zum Signifikanzniveau $p = 0,05$ (s. Tab. 33, 34).

In den Ergebnissen mit TRAP6 unterschieden sich im MDA-Assay sowie TXB₂-Assay *Responder* und *Nonresponder* in den Ansätzen mit 0 μ M bzw. 30 μ M ASS zum Signifikanzniveau $p = 0,05$ bzw. in dem 0 μ M ASS-Ansatz im TXB₂-Assay zum Signifikanzniveau $p = 0,01$ (s. Tab. 35, 36).

3.4.1.1 Unterscheidung der Werte von Respondern und Nonrespondern in den Ergebnissen des MDA- sowie TXB₂-Assays aus der Aggregation mit ARA

Sowohl der MDA-Assay als auch der TXB₂-ELISA ergaben einen hoch signifikanten Unterschied zwischen den auf Grundlage der Aggregation mit ARA definierten ASS-*Respondern* und -*Nonrespondern*. Auch nach Zusatz von ASS (30 bzw. 100 μ M) oder Terbogrel (3 μ M) zum Assay differenzierten beide Nachweismethoden der thrombozytären Thromboxansynthese annähernd gleich gut (s. Tab. 33, 34).

MDA

MDA [nM]	0 μ M ASS	30 μ M ASS	100 μ M ASS	3 μ M Terbogrel
Mann-Whitney U	3,00	45,00	81,00	277,00
Wilcoxon W	823,00	865,00	901,00	1097,00
Z	-6,33	-5,69	-5,15	-2,17
Asymptotische Sig. (2-seitig)	0,00	0,00	0,00	0,03

Tab. 33: Mann-Whitney U Test zwischen *Respondern* und *Nonrespondern* für MDA [nM] aus der Aggregation mit ARA. [nM] = Nanomolar, Sig. = Signifikanz, [μ M] = Mikromolar, Z = Vergleich mit z-Wert einer Standardnormalverteilung (sog. z-Verteilung). 0/ 30/ 100 μ M ASS/ 3 μ M Terbogrel = Aggregationsansätze mit 0/ 30/ 100 μ M ASS/ 3 μ M Terbogrel.

TXB₂-ELISA

TXB ₂ [ng/ml]	0µM ASS	30µM ASS	100µM ASS	3µM Terbogrel
Mann-Whitney U	9,00	44,00	67,00	88,00
Wilcoxon W	712,00	674,00	662,00	259,00
Z	-6,14	-5,48	-5,03	-2,52
Asymptotische Sig. (2-seitig)	0,00	0,00	0,00	0,01
Exakte Sig. [2*(1-seitige Sig.)]				0,01

Tab. 34: Mann-Whitney U Test zwischen *Respondern* und *Nonrespondern* für TXB₂ [ng/ml] aus der Aggregation mit TRAP6. [ng/ml] = Nanogramm/Mililiter, Sig. = Signifikanz, [µM] = Mikromolar, Z = Vergleich mit z-Wert einer Standardnormalverteilung (sog. z-Verteilung). 0/ 30/ 100µM ASS/ 3µM Terbogrel = Aggregationsansätze mit 0/ 30/ 100µM ASS/ 3µM Terbogrel.

3.4.1.2 Unterscheidung der Werte von *Respondern* und *Nonrespondern* in den Ergebnissen des MDA- sowie TXB₂-Assays aus der Aggregation mit TRAP6

Auch in den Ergebnissen des MDA- sowie TXB₂-Assays aus der Aggregation mit TRAP6 zeigte sich, dass die bereits in der deskriptiven Statistik angedeuteten Unterschiede zwischen *Respondern* und *Nonrespondern* statistisch signifikant sind (Tab. 35, 36).

MDA

MDA [nM]	0µM ASS	30µM ASS	100µM ASS	3µM Terbogrel
Mann-Whitney U	261,00	277,00	313,00	407,00
Wilcoxon W	1081,00	1097,00	1133,00	638,00
Z	-2,41	-2,17	-1,62	-0,20
Asymptotische Sig. (2-seitig)	0,02	0,03	0,10	0,84

Tab. 35: Mann-Whitney U Test zwischen *Respondern* und *Nonrespondern* für MDA [nM] aus der Aggregation mit TRAP6. [nM] = Nanomolar, Sig. = Signifikanz, [µM] = Mikromolar, Z = Vergleich mit z-Wert einer Standardnormalverteilung (sog. z-Verteilung). 0/ 30/ 100µM ASS/3µM Terbogrel = Aggregationsansätze mit 0/ 30/ 100µM ASS/ 3µM Terbogrel.

TXB₂-ELISA

TXB ₂ [ng/ml]	0µM ASS	30µM ASS	100µM ASS	3µM Terbogrel
Mann-Whitney U	80,50	88,00	101,00	33,50
Wilcoxon W	251,50	259,00	237,00	124,50
Z	-2,75	-2,52	-1,88	-1,96
Asymptotische Sig. (2-seitig)	0,01	0,01	0,06	0,05
Exakte Sig. [2*(1-seitige Sig.)]	0,01	0,01	0,06	0,05

Tab. 36: Mann-Whitney U Test zwischen *Respondern* und *Nonrespondern* für TXB₂ [ng/ml] aus der Aggregation mit TRAP6. [ng/ml] = Nanogramm/Mililiter, Sig. = Signifikanz, [µM] = Mikromolar, Z = Vergleich mit z-Wert einer Standardnormalverteilung (sog. z-Verteilung). 0/ 30/ 100µM ASS/ 3 µM Terbogrel = Aggregationsansätze mit 0/ 30/ 100µM ASS/ 3 µM Terbogrel

3.4.2 Plasmakonzentrationen von Metamizol und dessen Metaboliten

Von den Patienten, welche Metamizol einnahmen, wurden die Plasmakonzentrationen der Metamizolmetabolite mittels HPLC gemessen, um mögliche Unterschiede zwischen *Respondern* und *Nonrespondern* aufzudecken.

Für die Metamizolmetabolite AA, AAA, MAA sowie die Summe aus AA und MAA zeigte sich zum Zeitpunkt der Blutentnahme kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen (s. Tab. 37).

	N	Minimum	Maximum	Perzentilen			MWU	Wilcoxon W	Z	Sig.*
				25.	50. (Median)	75.				
AA [µM]	38	0,00	58,89	2,85	11,54	20,95	168,00	358,00	-0,37	0,72 (0,72 ^b)
AAA [µM]	38	3,70	1038,97	58,77	99,77	157,51	178,00	368,00	-0,07	0,94 (0,95 ^b)
MAA [µM]	38	0,00	172,15	14,65	39,10	76,44	161,50	351,50	-0,56	0,58 (0,58 ^b)
AA+ MAA [µM]	38	0,00	188,27	21,42	51,32	94,57	158,50	348,50	-0,64	0,52 (0,53 ^b)

Tab. 37: Metamizol-Plasmakonzentrationen der Patienten [µM], welche Metamizol einnahmen.

AA = Aminoantipyrin, AAA = Acetylaminoantipyrin, MAA = 4-Methylaminoantipyrin, Sig. = Signifikanz, [µM] = Mikromolar.

*Asymptotische Sig. (2-seitig)
(Exakte Sig. [2*(1-seitig Sig.)])

Mittels einer Rangkorrelation nach Spearman wurde ferner der Zusammenhang zwischen den Metamizolmetaboliten, hier beispielhaft die Summe aus AA und MAA und MDA bzw. TXB₂-Werten untersucht (s. Tab. 38, 39). Die Rangkorrelationen bestätigten den schwachen statistischen Zusammenhang zwischen den Metamizolmetaboliten und TXB₂ bzw. MDA. Spearman's rho betrug für die Korrelation mit TXB₂ -0,16 (p = 0,35) bzw. mit MDA -0,05 (p = 0,75).

		AA + MAA [µM]	
TXB ₂ [ng/ml]	Korrelationskoeffizient (Spearman's rho)	-0,16	
	Sig. (2-seitig)	0,35	
	N	38	
	Bootstrap ^c	Bias	0,00
		Standardfehler	0,18
		95% Konfidenz- Intervall	Unteres
Oberes			0,19

Tab. 38: Exemplarische Korrelation von AA + MAA und TXB₂ aus der Aggregation mit ARA.

Ansatz mit 0µM ASS. AA = Aminoantipyrin, AAA = Acetylaminoantipyrin, MAA = 4-Methylaminoantipyrin. [ng/ml] = Nanogramm/Mililiter, Sig. = Signifikanz, [µM] = Mikromolar.

C = Bootstrap basierend auf 1000 Bootstrap Proben

MDA [nM]		AA + MAA [μ M]	
Korrelationskoeffizient (Spearman's rho)		-0,05	
Sig. (2-tailed)		0,75	
N		38	
Bootstrap ^c	Bias	0,00	
	Standardfehler	0,00	
	95% Konfidenz-intervall	Unteres	-0,50
		Oberes	0,19

Tab. 39: Exemplarische Korrelation von AA + MAA und MDA aus der Aggregation mit ARA. Ansatz mit 0 μ M ASS. AA = Aminoantipyrin, AAA = Acetylaminoantipyrin, MAA = 4- Methylaminoantipyrin. [nM] = Nanomolar, Sig. = Signifikanz, [μ M] = Mikromolar. c = Bootstrap basierend auf 1000 Bootstrap Proben.

3.4.3 Receiver-Operator-Characteristics („ROC“)-Analyse MDA-Assay

Um die Testgüte des MDA-Assays hinsichtlich der Erkennung von ASS-Nonresponse zu überprüfen, wurden ROC-Analysen durchgeführt. Die Aggregation mit ARA $\geq 20\%$ wurde hier als Status der „realen“ Nonresponse festgesetzt. Es sollte der Messwert des MDA-Assays ermittelt werden, welcher am besten als Schwellenwert eingesetzt werden kann für das Vorliegen von ASS-Nonresponse. Dann wurden Sensitivität (Y-Achse) und Spezifität (X-Achse) der Messwerte des MDA-Assays in einem Diagramm gegeneinander aufgetragen und zu einer Kurve verbunden. So konnte der Schwellenwert ermittelt werden, mit welchem man Nonresponder und Responder am besten unterscheiden kann. Je weiter links oben im Diagramm die Kurve verläuft bzw. je größer die sog. AUC (Area Under the Curve) ist (maximal 1,00), umso besser die Diskriminierungsfähigkeit des Tests.

3.4.3.1 ROC-Analyse für den MDA-Assay aus der Aggregation mit ARA

Die ROC-Analyse für den MDA-Assay aus der Aggregation mit ARA zeigte, dass der MDA-Assay eine gute Trennschärfe besitzt. Mit einer Fläche unter der Kurve (AUC) von 0,996 war die Trennschärfe des Ansatzes ohne ASS am größten und nahm mit zunehmender ASS-Konzentration ab (s. Abb. 19, Tab. 40). Der Ansatz mit Terbogrel zeigte mit einer AUC von 0,618 eine nur geringe Trennschärfe.

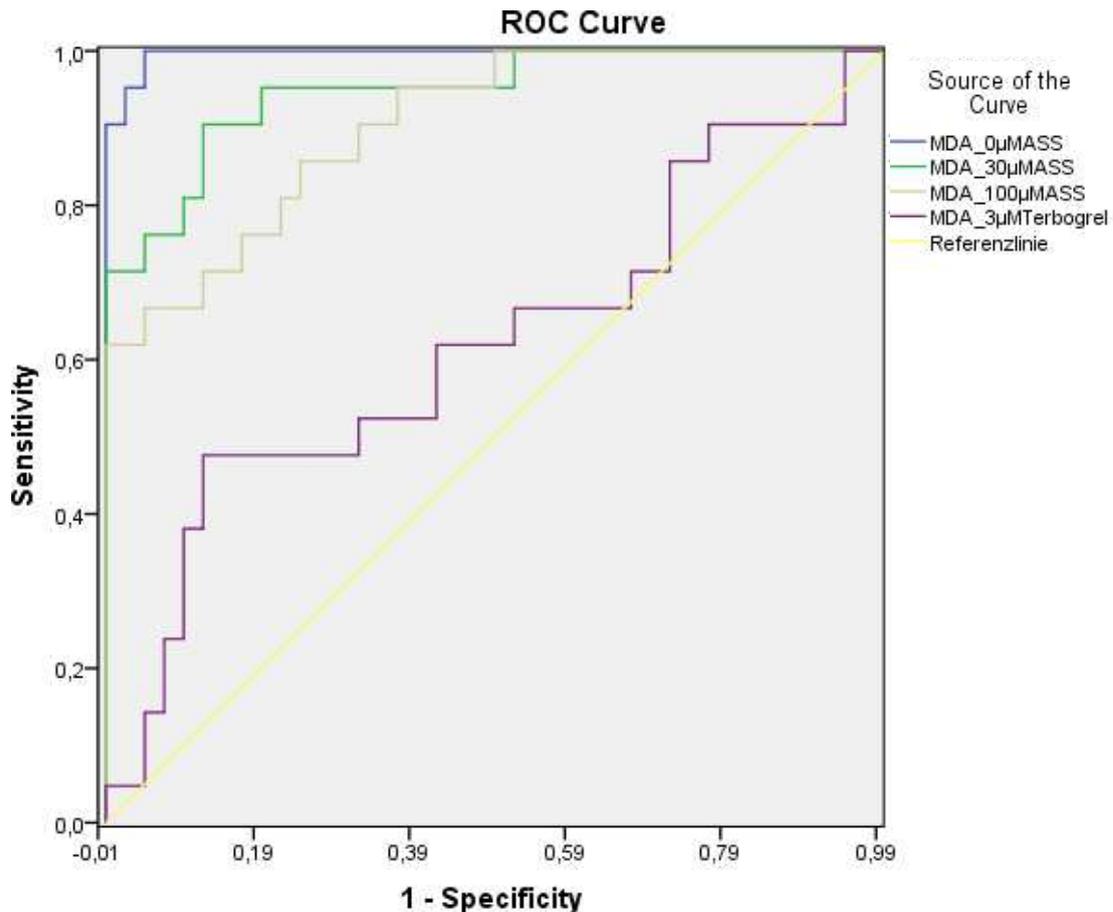


Abb. 19: ROC-Kurve für den MDA-Assay aus der Aggregation mit ARA. MDA_0µM ASS/ 30µM ASS/ 100µM ASS/ 3µM Terbogrel = Aggregationsansatz mit 0/ 30/ 100µM ASS und 3µM Terbogrel. *Sensitivity* = Sensitivität, *Source of the curve* = Quelle der Kurve = entsprechender Aggregationsansatz. *Specificity* = Spezifität, [µM] = Mikromolar.

MDA [nM] aus der Aggregation mit ARA	AUC	Standardfehler	Asymptotische Sig. ^b	Asymptotisches 95% Konfidenzintervall	
				Untere Grenze	Obere Grenze
0µM ASS	0,996	0,004	0,000	0,988	1,000
30µM ASS	0,946	0,030	0,000	0,889	1,000
100µM ASS	0,904	0,039	0,000	0,827	0,980
3µM Terbogrel	0,618	0,081	0,133	0,460	0,776

Tab. 40: AUC der ROC-Kurve für den MDA-Assay aus der Aggregation mit ARA. *AUC* = Area under the curve, [nM] = Nanomolar, Sig = Signifikanz, [µM] = Mikromolar.

0µM ASS/ 30µM ASS/ 100µM ASS/ 3µM Terbogrel = Aggregation mit 0/ 30/ 100µM ASS und 3µM Terbogrel.

a. Unter Annahme nonparametrischer Verteilung

b. Nullhypothese: wahre Fläche = 0.5

3.4.3.1.1 Schwellenwert (*Cut-off*)-Bestimmung MDA-Assay mit ARA

(aus den MDA-Werten nach der Aggregation mit 0µM ASS)

Da die *ROC*-Kurve aus dem Aggregationsansatz ohne ASS die größte Trennschärfe zeigte, wurde diese zur *Cut-off*-Bestimmung genutzt (*Cut-off* = MDA-Wert, ab dem ASS-Nonresponse

angenommen werden kann bzw. ab dem eine Aggregation mit ARA von mindestens 20% zugrunde liegt). Die Koordinaten dieser befinden sich im Anhang (Tab. 56,57).

3.4.3.1.1 a) *Cut-off* bei $\geq 128,07\text{nM}$ MDA

Der *Cut-off* 128,07nM MDA (aus den MDA-Werten nach Aggregation mit 0 μM ASS) wurde ausgewählt, da er eine maximale Sensitivität von 100,00% hat. Aus den *Cut-off* Werten mit 100,00% Sensitivität hat er außerdem die höchste Spezifität von 95,00% (s. Tab. 56 im Anhang). Dieser Wert könnte beispielsweise eingesetzt werden, wenn es darum geht, möglichst alle Kranken zu erkennen; das heißt bei denen ASS nicht die beabsichtigte Hemmung der Thrombozyten bewirkt. Dann würden zwei Patienten von 61 irrtümlich als „falsch positiv“ zugeordnet werden (s. Tab. 41).

Realität (Aggregation \geq 20%)	Vorhersage durch den MDA-Assay bei <i>Cut-off</i> $\geq 128,07$ nM MDA			
		Nonresponder	Responder	Summe
	Nonresponder	21 = RP	0 = FN	21
	Responder	2 = FP	38 = RN	40
Summe	23	38	61	

Tab. 41: Vierfeldertafel für den *Cut-off* $\geq 128,07$ nM MDA aus der Aggregation mit ARA.

FN = falsch negativ, FP = falsch positiv, RN = richtig negativ, RP = richtig positiv.
[nM] = Nanomolar, [%] = Prozent.

Die „*Accuracy*“, der Anteil der korrekt Klassifizierten an allen Klassifizierten; liegt für diesen *Cut-off* bei 0,967 bzw. 96,7% (s. Tab. 42). Der *F1-Score*, der die ungleichmäßige Verteilung der Daten berücksichtigt und eine Balance zwischen *Precision* und *Recall* (Richtig-Positiv-Rate) schafft liegt hier bei 0,955 bzw. 95,50%. Eine Erläuterung der Berechnung der hier aufgeführten Testgütemaße befindet sich im Anhang (s. Tab. 58 im Anhang).

<i>Cut-off</i> : $\geq 128,07\text{nM}$ MDA	
Sensitivität	1,000 (100,00%)
Spezifität	0,950 (95,00%)
Richtig-Positiv-Rate = <i>Recall</i>	1,000 (100,00%)
Richtig-Negativ-Rate	0,950 (95,00%)
Falsch-Positiv-Rate	0,050 (5,00%)
Falsch-Negativ-Rate	0,000 (0,00%)
<i>Accuracy</i>	0,967 (96,70%)
<i>Precision</i>	0,913 (91,30%)
<i>F1-Score</i>	0,955 (95,45%)

Tab. 42: Testgütemaße für *Cut-off* $\geq 128,07\text{nM}$ MDA aus der Aggregation mit ARA. [nM] = Nanomolar, [%] = Prozent.

3.4.3.1.1 b) *Cut-off* bei 0 μM ASS: $\geq 255,66\text{nM}$ MDA

Der *Cut-off* von 255,66nM MDA (aus den MDA-Werten nach Aggregation mit 0 μM ASS) wurde ausgewählt, der er maximale Spezifität von 100,00% hat. Aus den *Cut-off* Werten mit 100,00% Spezifität hat er außerdem die höchste Sensitivität, mit 90,50% (s. Tab. 56 im Anhang). Dieser

Wert könnte beispielsweise eingesetzt werden, wenn es darum geht, möglichst alle „Gesunden“ zu erkennen, bei denen ASS hinsichtlich der Thrombozytenhemmung effektiv ist. Dann würden zwei Patienten von 61 irrtümlich als „falsch negativ“ zugeordnet werden (s. Tab. 43).

Realität (Aggregation ≥ 20%)	Vorhersage durch den MDA-Assay bei ≥ 255,66 nM MDA			Summe
		Nonresponder	Responder	
	Nonresponder	19 = RP	2 = FN	21
	Responder	0 = FP	40 = RN	40
Summe	19	42	61	

Tab. 43: Vierfeldertafel für *Cut-off* ≥ 255,66nM MDA aus der Aggregation mit ARA.

FN = falsch negativ, FP = falsch positiv, RN = richtig negativ, RP = richtig positiv.
[nM] = Nanomolar, [%] = Prozent.

Die *Accuracy*; der Anteil der korrekt Klassifizierten an allen Klassifizierten; liegt für diesen *Cut-off* bei 0,967 bzw. 96,70% (s. Tab. 44). Der *F1-Score* liegt hier bei 0,950 bzw. 95,00%. Eine Erläuterung der Berechnung der hier aufgeführten Testgütemaße befindet sich im Anhang (s. Tab. 59 im Anhang).

<i>Cut-off</i> : ≥ 255,66nM MDA	
Sensitivität	0,905 (90,50%)
Spezifität	1,000 (100,00%)
Richtig-Positiv-Rate = Recall	0,905 (90,50%)
Richtig-Negativ-Rate	1,000 (100,00%)
Falsch-Positiv-Rate	0,000 (0,00%)
Falsch-Negativ-Rate	0,095 (9,50%)
<i>Accuracy</i>	0,967 (96,70%)
<i>Precision</i>	1,000 (100,00%)
<i>F1-Score</i>	0,950 (95,00%)

Tab. 44: Testgütemaße für *Cut-off* ≥ 255,66nM MDA aus der Aggregation mit ARA. [nM] = Nanomolar, [%] = Prozent.

3.4.3.2 ROC-Analyse für den MDA-Assay aus der Aggregation mit TRAP6

Aus den Ergebnissen mit TRAP6 konnte kein *Cut-off* ermittelt werden aufgrund schlechter Ergebnisse für Sensitivität und Spezifität.

3.4.4 ROC-Analyse TXB₂-Assay

3.4.4.1 ROC-Analyse für den TXB₂-Assay aus der Aggregation mit ARA

Die ROC-Analyse für den TXB₂-Assay aus der Aggregation mit ARA zeigte, dass der TXB₂-Assay ebenfalls eine gute Trennschärfe besitzt. Auch hier war mit einer *AUC* von 0,989 die Trennschärfe des Ansatzes ohne ASS am größten und nahm mit zunehmender ASS-Konzentration ab (s. Abb. 20, Tab. 45). Der Ansatz mit Terbogrel zeigte mit einer *AUC* von

0,868 eine höhere Trennschärfe als der Ansatz mit Terbogrel im MDA-Assay (s. Kurve/ Werte für Terbogrel in Abb. 19, 20 sowie Tab. 40, 45).

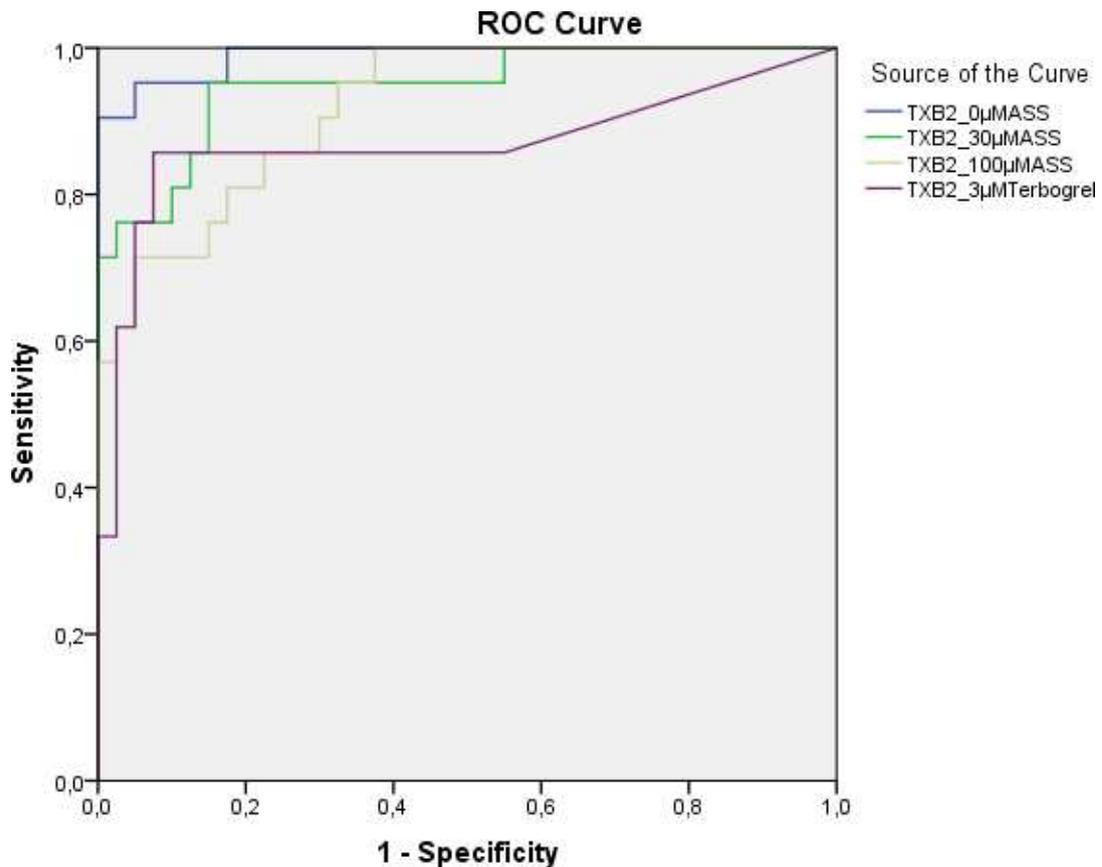


Abb. 20: ROC-Kurve für den TXB₂-Assay aus der Aggregation mit ARA. TXB₂₀µM ASS/ 30µM ASS/ 100µM ASS/ 3µM Terbogrel = Aggregationsansatz mit 0/ 30/ 100µM ASS und 3µM Terbogrel. Sensitivity = Sensitivität, Source of the curve = Quelle der Kurve = entsprechender Aggregationsansatz. Specificity = Spezifität, [µM] = Mikromolar.

TXB ₂ [ng/ml]	AUC	Standardfehler	Asymptotische Sig. b	Asymptotisches 95% Konfidenzintervall	
				Untere Grenze	Obere Grenze
0µM ASS	0,989	0,010	0,000	0,970	1,000
30µM ASS	0,948	0,030	0,000	0,889	1,000
100µM ASS	0,920	0,034	0,000	0,854	0,986
3µM Terbogrel	0,868	0,061	0,000	0,748	0,988

Tab. 45: AUC der ROC-Kurve für den TXB₂-Assay aus der Aggregation mit ARA. [ng/ml] = Nanogramm/Mililiter, Sig = Signifikanz, [µM] = Mikromolar. 0µM ASS/ 30µM ASS/ 100µM ASS/ 3µM Terbogrel = Aggregation mit 0/ 30/ 100µM ASS und 3µM Terbogrel.

a. Unter Annahme nonparametrischer Verteilung

b. Nullhypothese: wahre Fläche = 0.5

3.4.4.1.1 Cut-off-Bestimmung TXB₂-Assay mit ARA

(aus den TXB₂-Werten nach der Aggregation mit 0µM ASS)

Analog zum MDA-Assay wurde auch für den TXB₂-Assay die ROC-Kurve aus dem Aggregationsansatz ohne ASS mit der größten Trennschärfe genutzt zur Cut-off-Bestimmung. Die Koordinaten dieser befinden sich im Anhang (s. Tab. 60 und 61 im Anhang).

3.4.4.1.1 a) Cut-off bei 0µM ASS: ≥ 7,67ng/ml TXB₂

Der Cut-off 7,67ng/ml TXB₂ (aus den MDA-Werten nach Aggregation mit 0µM ASS) wurde ausgewählt, da er maximale Sensitivität von 100,00% hat. Aus den Cut-off Werten mit 100,00% Sensitivität hat er außerdem die höchste Spezifität von 82,50% (s. Tab. 60 im Anhang). Dieser Wert könnte beispielsweise eingesetzt werden, wenn es darum geht, möglichst alle Personen zu erkennen, bei denen die ASS-Wirkung herabgesetzt ist. Dann würden sieben Patienten von 61 irrtümlich als „falsch positiv“ zugeordnet werden (s. Tab. 46).

Realität (Aggregation ≥ 20%)	Vorhersage durch den TXB ₂ -Assay bei Cut-off ≥ 7,67ng/ml TXB ₂			
		Nonresponder	Responder	Summe
	Nonresponder	21 = RP	0 = FN	21
	Responder	7 = FP	33 = RN	40
Summe	28	33	61	

Tab. 46: Vierfeldertafel für Cut-off ≥ 7,67ng/ml TXB₂ aus der Aggregation mit ARA.

FN = falsch negativ, FP = falsch positiv, RN = richtig negativ, RP = richtig positiv.
[ng/ml] = Nanogramm/Mililiter, [%] = Prozent.

Cut-off: ≥ 7,67ng/ml TXB ₂	
Sensitivität	1,000 (100,00%)
Spezifität	0,825 (82,50%)
Richtig-Positiv-Rate = Recall	1,000 (100,00%)
Richtig-Negativ-Rate	0,825 (82,50%)
Falsch-Positiv-Rate	0,175 (17,50%)
Falsch-Negativ-Rate	0,000 (0,00%)
Accuracy	0,883 (88,25%)
Precision	0,750 (75,00%)
F1-Score	0,857 (85,70%)

Tab. 47: Testgütemaße für Cut-off ≥ 7,67ng/ml TXB₂ aus der Aggregation mit ARA. [ng/ml] = Nanogramm/Mililiter, [%] = Prozent.

Die Accuracy; der Anteil der korrekt Klassifizierten an allen Klassifizierten; liegt für diesen Cut-off bei 0,883 bzw. 88,30% (s. Tab. 47).

Der F1-Score, liegt hier bei 0,857 bzw. 85,70% (s. Tab. 47). Eine Erläuterung der Berechnung der hier aufgeführten Testgütemaße befindet sich im Anhang (s. Tab. 62 im Anhang).

3.4.4.1.1 b) Cut-off bei 0µM ASS: ≥ 82,04ng/ml TXB₂

Der *Cut-off* ≥ 82,04ng/ml TXB₂ (aus den MDA-Werten nach Aggregation mit 0µM ASS) wurde ausgewählt, da er maximale Spezifität von 100,00% hat. Aus den *Cut-off* Werten mit 100,00% Spezifität hat er außerdem die höchste Sensitivität von 90,50% (s. Tab. 60 im Anhang). Dieser Wert könnte beispielsweise eingesetzt werden, wenn es darum geht, möglichst alle „Gesunden“ zu erkennen, bei denen ASS hinsichtlich der Thrombozytenhemmung effektiv ist. Dann würden zwei Patienten von 61 irrtümlich als „falsch negativ“ zugeordnet werden (s. Tab. 48).

Realität (Aggregation ≥ 20%)	Vorhersage durch TXB ₂ -Assay bei <i>Cut-off</i> ≥ 82,04ng/ml TXB ₂			
		Nonresponder	Responder	Summe
	Nonresponder	19 = RP	2 = FN	21
	Responder	0 = FP	40 = RN	40
Summe	19	42	61	

Tab. 48: Vierfeldertafel für *Cut-off* ≥ 82,04ng/ml TXB₂ aus der Aggregation mit ARA. FN = falsch negativ, FP = falsch positiv, RN = richtig negativ, RP = richtig positiv. [ng/ml] = Nanogramm/Mililiter, [%] = Prozent.

<i>Cut-off</i> : ≥ 82,04ng/ml TXB ₂	
Sensitivität	0,905 (90,50%)
Spezifität	1,000 (100,00%)
Richtig-Positiv-Rate = <i>Recall</i>	0,905 (90,50%)
Richtig-Negativ-Rate	1,000 (100,00%)
Falsch-Positiv-Rate	0,000 (0,00%)
Falsch-Negativ-Rate	0,095 (9,50%)
<i>Accuracy</i>	0,967 (96,70%)
<i>Precision</i>	1,000 (100,00%)
<i>F1-Score</i>	0,950 (95,00%)

Tab. 49: Testgütemaße für *Cut-off* ≥ 82,04ng/ml TXB₂ aus der Aggregation mit ARA. [ng/ml] = Nanogramm/Mililiter, [%] = Prozent.

Die „*Accuracy*“; der Anteil der korrekt Klassifizierten an allen Klassifizierten; liegt für diesen *Cut-off* bei 0,967 bzw. 96,70% (s. Tab. 49).

Der *F1-Score* liegt hier bei 0,95 bzw. 95,00% (s. Tab. 49). Eine Erläuterung der Berechnung der hier aufgeführten Testgütemaße befindet sich im Anhang (s. Tab. 63 im Anhang).

3.4.4.2 ROC-Analyse für den TXB₂-Assay aus der Aggregation mit TRAP6

Aus den Ergebnissen mit TRAP6 wurde kein *Cut-off* ermittelt aufgrund der schwachen Ergebnisse für Sensitivität und Spezifität.

Abschließend zeigten die ROC-Analysen, dass sowohl der MDA-Assay als auch der TXB₂-Assay eine hohe Trennschärfe aufweisen. Als optimaler „*Screening*“-*Cut-off* (100% Sensitivität bei maximaler Spezifität) hat sich ein MDA-Wert von ≥ 128,07nM erwiesen.

4. Diskussion

Ziel der vorliegenden Dissertation war es, den MDA-Assay zur Bestimmung der thrombozytären Thromboxansynthese und deren Hemmung durch ASS an Patienten mit kardiovaskulären Erkrankungen zu charakterisieren. Im Vordergrund stand dabei das Interesse, mit dem Test solche Patienten zu identifizieren, bei denen ASS nicht die zu erwartende Hemmung der Thrombozytenfunktion und Thromboxansynthese bewirkt. Der MDA-Assay sollte verglichen werden mit anderen Methoden des Thrombozytenfunktions-Monitorings.

Hier zeigte sich, dass der MDA-Assay dazu in der Lage ist, als *Screening*-Test mit hoher Sensitivität ASS-*Nonresponder* zu erkennen (s. Abs. 3.4.3); ähnlich gut wie die bisher wahrscheinlich spezifischste Methode, der TXB₂-Immuno-Assay (s. Abs. 3.4.4). Vorteilhaft sind für die Einsetzbarkeit als *Screening*-Methode einige Eigenschaften des MDA-Assays; unter anderem die einfache Durchführbarkeit (s. Abs. 4.4).

Es gibt in der Literatur sehr unterschiedliche Angaben, wie häufig ASS-*Nonresponse* auftritt (s. Abs. 1.6). In der vorliegenden Arbeit zeigte sich ein *Nonresponder*-Anteil von 33% (21 von 63 Patienten), wobei als Definition das Erreichen eines Aggregationsmaximums von 20% oder mehr in der Aggregation mit ARA ohne Zusatz von ASS zugrunde lag (s. Abs. 3.1.1). Wenn man die Patienten ausnimmt, die im Zeitraum von 14 Tagen vor der Messung einen 500mg Bolus ASS im Rahmen einer HKU erhielten (elf *Responder* und ein *Nonresponder*), war der Anteil der *Nonresponder* sogar 39% (20 von 51 Patienten).

Darüber hinaus konnten im Rahmen dieser Dissertation ursächliche Faktoren identifiziert werden, die zur Entstehung der *Nonresponse* beigetragen haben könnten (s. Abs. 4.6). Am deutlichsten zeigte sich der Einfluss der Begleitmedikation mit dem Analgetikum Metamizol (s. Abs. 4.6.3).

4.1 Kritische Betrachtung des Studiendesigns

Das monozentrische Design mit der relativ geringen Anzahl eingeschlossener Patienten schränkt die Aussagekraft der Arbeit möglicherweise ein, wenngleich der Umfang der erhobenen Daten ausreichte, um die Ziele dieser Untersuchung zu erreichen. Die Zahl eingeschlossener Patienten erlaubte keine Stratifizierung nach Subgruppen hinsichtlich Schweregrad oder Begleiterkrankungen.

Ein mögliches *Bias* könnte daraus resultieren, dass die gesunde Kontrollgruppe jünger war als die Patientengruppe; daher hätte das Alter als *Confounder* zur *Nonresponse* beitragen können (s. Abs. 1.6, 4.6.7). Dies lag darin begründet, dass sich für die Untersuchungen vornehmlich jüngere Mitarbeiter der Klinik und des Institutes als Thrombozytenspender zur Verfügung stellten. *Confounding* durch Alter und Geschlecht wurde jedoch mittels Partialkorrelation ausgeschlossen (s. Abs. 3.3).

4.2 ASS-Nonresponse im MDA-Assay - eine Frage der Definition

Für die zukünftige Einsatzfähigkeit des MDA-Assays stellt sich die grundlegende Frage, wie ASS-Nonresponse bei Einsatz dessen definiert werden soll.

ASS-Nonresponse im engeren Sinne bezeichnet die pharmakologische Unwirksamkeit von ASS [235]. Wir verwendeten für die Definition von Nonresponse den gängigen Schwellenwert einer mindestens 20% betragenden relativen Aggregationsamplitude nach ARA-induzierter Aggregation der Thrombozyten. Die Wahl des Agonisten hat bei der Bewertung von ASS-Nonresponse große Bedeutung. In einem systematischen Review von Hovens *et al.* zeigte sich, dass in Abhängigkeit vom Agonisten der Anteil der als Nonresponder klassifizierten Personen stark variiert [236]. Mit ADP beispielsweise lässt sich in niedrigen Konzentrationen Nonresponse zwar ebenfalls oft beobachten, jedoch aktiviert dieses die Thromboxansynthese insgesamt nur wenig. In hohen Dosen hingegen aktiviert es die Thrombozyten Thromboxan-unabhängig [237]. Die Stimulation erfolgte in der vorliegenden Arbeit mit ARA, da man so am spezifischsten den Thromboxansyntheseweg und folglich den pharmakologischen Mechanismus der Hemmung durch ASS untersuchen kann [48, 199].

Die fehlerhafte Einschätzung von Patienten als Nonresponder ist dennoch auch mit dem Stimulus ARA theoretisch möglich. Ursachen dafür könnte die Vernachlässigung von weiteren COX-unabhängigen proaggregatorischen Faktoren wie Hydroperoxide oder Isoprostane sein, die als Verunreinigung in der Arachidonsäure vorhanden sein können, sowie die individuelle Variabilität des Plättchenstoffwechsels [237, 238]. Mit den in dieser Arbeit verwendeten ARA-Chargen zeigte sich unter den gesunden Probanden nahezu keine Nonresponse, sodass Artefakte durch Verunreinigungen eher ausgeschlossen werden können.

Wichtig ist auch, unter welcher Zielsetzung der Cut-off für Nonresponse gewählt wird; Nonresponse sicher zu erkennen oder sicher auszuschließen. In der hier vorgelegten Arbeit wurden beispielhaft verschiedene Cut-off-Werte für MDA für bestimmte Zielsetzungen bestimmt (s. Abs. 3.4.3.1.1). Bei maximaler Sensitivität von 100% ergab sich ein Grenzwert von $\geq 128,07\text{nM}$ MDA bzw. bei maximaler Spezifität von 100% von $\geq 255,66\text{nM}$ MDA.

Es existieren eine Menge weiterer Nonresponse-Definitionen auf der Grundlage von Thrombozytenfunktionsparametern [239], deren Cut-off-Werte in der Literatur variieren (s. Abs. 4.5.2) [195, 240]. Es wurden nur für wenige Methoden, wie den VerifyNow[®]-Assay [241] oder den Multiplate[®]-Assay [242] Cut-off Werte durch die Hersteller definiert (s. Tab. 50).

Definition	<p><i>Nonresponse</i> in Plättchentests:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Residuelle Plättchenaggregation [112, 243] <ul style="list-style-type: none"> - Lichttransmissionsaggregometrie <ul style="list-style-type: none"> • z.B. mit ARA: 20% Aggregation [111, 244] - Impedanzaggregometrie (Multiplate®-Assay) <ul style="list-style-type: none"> • z.B. mit ARA: 20% Aggregation [242] - Plateletworks®: Plättchenzahl bzw. % Aggregation/ Inhibition [245] - Serum -Thromboxanwerte <ul style="list-style-type: none"> - > 25ng/ml [240] - > 209,8ng/ml [195] - <i>Rapid Platelet Function Assay</i>-Aspirin (RPFA-ASS bzw. VerifyNow®) ARU ≥ 550 [113] - PFA-100®: <i>Closure-Time (CT)</i>: ≤ 193 Sekunden [244] - TEG: ARA-induzierte Stärke des Fibrin-Plättchen-Thrombus (MA_{ARA}) [246] <p>Pharmakologische <i>Nonresponse</i>: Pharmakokinetik/-dynamik <i>et cetera (etc.)</i></p> <p>Typen von <i>Nonresponse</i>:</p> <ul style="list-style-type: none"> - volle/ partielle Resistenz [117] - 3 Typen der ASS-<i>Nonresponse</i> je nach Ergebnissen aus: <ol style="list-style-type: none"> 1. Thromboxan-abhängige Aggregation 2. Thromboxanmessung [247] - verschiedene Typen je nach Ergebnissen aus Aggregation mit ARA und ADP sowie VerifyNow® [113]
Problematik des Begriffs ASS-Nonresponse	<p>Starke Unterschiede der:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Durchführung der Testmethoden [112, 243] - Zusammensetzung der Studienpopulationen [243] - Definitionen [248]

Tab. 50: Auswahl verschiedener Ansätze zur Definition von ASS-Nonresponse. ADP = Adenosindiphosphat, ARA = Arachidonsäure, ARU = Aspirin-*Reaction Units*, CT = *Closure Time*, (MA_{ARA}) = Maximale Amplitude unter Stimulation mit ARA, PFA = *Platelet Functon Analyzer*, RPFA = *Rapid Platelet Function Assay*-Aspirin, TEG = Thromboelastografie. [ng/ml] = Nanogramm/Mililiter, [%] = Prozent.

Um der Komplexität der *Nonresponse* Rechnung zu tragen, kombinierten beispielsweise Gum *et al.* Aggregationsergebnisse zweier verschiedener Stimuli miteinander [117]. Weber *et al.* unterschieden drei Typen der ASS-*Nonresponse* je nach „makroskopischer“ Aggregation sowie den COX-1-spezifischen Ergebnissen des Thromboxan-Assays (s. Tab. 51). Jeweils ordneten sie mögliche Ursachen zu [235]:

	<i>Responder</i>	Typ 1 <i>Nonresponse</i>	Typ 2 <i>Nonresponse</i>	Typ 3 <i>Nonresponse</i>	
Thromboxan	Supprimiert (> 95%)	Nicht supprimiert	Nicht supprimiert	Supprimiert (>95%)	100mg ASS p.o.
Aggregation mit Kollagen	Keine	Positiv	Positiv	Positiv	
Thromboxan	Supprimiert (> 95%)	Supprimiert (> 95%)	Nicht supprimiert	Supprimiert (> 95%)	100mg ASS p.o. + 100µM ASS in vitro

Aggregation mit Kollagen	Keine	Keine	Positiv	Positiv	
Mögliche Ursachen		„Pharmakokinetisch“; <i>Noncompliance</i> Kompetition um COX-1 (NSAID etc.)	„Pharmakodynamisch“; inkomplette Hemmung der thrombozytären Thromboxan-synthese am COX-Enzym	Plättchenstimulation durch „ASS-unabhängige Faktoren“ (Thromboxan-unabhängige Signalwege, z.B. P2Y ₁₂ - oder PAR-1-Rezeptoren)	

Tab. 51: Einteilung ASS-Nonresponse in 3 Typen nach Weber et. al. [235, 247]. ASS = Acetylsalicylsäure, COX = Cyclooxygenase, NSAID = *Non-steroidal Antiinflammatory Drug*, P2Y₁₂ = ein ADP-Rezeptor, PAR-1 = Protease-aktivierter Rezeptor 1, p.o. = per os. [mg] = Milligramm, [µM] = Mikromolar.

Die Ergebnisse der vorliegenden Dissertation ließen eine Zuordnung der Patienten zu „Typ 1“ und „Typ 2“ *Nonresponse* nach Weber *et al.* zu (Typ1 : Typ2: ca. 4-5 : 16-17). Unter „Typ 1“ nahmen drei Patienten Metamizol sowie ein Patient Ibuprofen ein; wie auch durch Weber *et al.* als mögliche Ursachen beschrieben. COX-Interaktion steht hier wahrscheinlich im Mittelpunkt (s. Abs. 4.6.3 und 4.6.4). *Noncompliance* als „Typ 1“ *Nonresponse* -Ursache scheint hingegen in unserem Patientenkollektiv weniger bedeutsam gewesen zu sein (s. Abs. 4.6.1). Eine Assoziation von ACVB-Operationen mit „Typ 2“ *Nonresponse*, wie in einer weiteren Publikation berichtet [249], zeigte sich bei unseren Patienten nicht. Eine Einteilung in verschiedene Typen wäre auch in einer Kombination aus Aggregation und MDA-Assay anstelle des Thromboxan-Assays denkbar.

4.3 Probleme der individualisierten Thrombozytenfunktionstestung

Das komplexe Wesen der Plättchenaggregation macht deren korrekte Messung zu einer besonderen Herausforderung [250]. Welcher Test der beste zur Evaluation der Plättchenfunktion sowie der ASS-Wirkung ist, bleibt bisher unklar. Viele Methoden verlangen ein spezielles Labor, sind nicht standardisiert, basieren auf unterschiedlichen thrombozytären Aktivierungsmechanismen oder sind zur Evaluation der pharmakologischen Plättchenhemmung schlecht untersucht (s. Abs. 1.9). Sie erfassen jeweils nur einen „Teil der Wahrheit“ [237]. So haben auch die LTA mit ARA; oft die Standard-Vergleichsmethode [185]; sowie der TXB₂-ELISA einige „Schwachstellen“. Der MDA-Assay könnte hingegen in vielen Punkten Verbesserung bringen.

Die Licht-Transmissionsaggregometrie ist methodisch eingeschränkt durch einige der in Abschnitt 1.9 angesprochenen Faktoren (lange Dauer, relativ große Blutmenge erforderlich, keine Vollblutmethode, keine Erfassung der Initialphase der Plättchenaggregation) [151, 164, 166, 167]. Hinzu kommen die notwendige spezielle Expertise bei der Durchführung und fehlende Standards [157].

Die Nachteile des Thromboxan-Assays (ELISA) sind ebenfalls die Methodik (lange Dauer), die

notwendige spezielle Expertise, der relativ schmale Messbereich, welcher häufig Wiederholungsmessungen mit Probenverdünnung erfordert, sowie die hohen Kosten der Reagenzien (Antikörper, Enzyme zur Immunodetektion) [200]. Zudem gibt es unterschiedliche TXB₂-*Cut-offs* für *Nonresponse*. Maree *et al.* fanden einen *Cut-off* von 2,2ng/ml Serum-TXB₂ (nach Stimulation mit ARA), bei dem 50% der Thromboxanproduktion der Plättchen nicht mehr gehemmt ist [193]. Temperelli *et al.* legten als *Cut-off* für erhöhte Werte 3,1ng/ml Serum-TXB₂ ohne vorherige Stimulation fest. Sie zeigten auch, dass die Serum-TXB₂-Werte mit denen nach ARA-Stimulation signifikant positiv korrelierten [194].

In einer Studie unserer Arbeitsgruppe ergab sich 209,8ng/ml Serum-TXB₂ nach Stimulation mit ARA als optimaler *Cut-off* [195]. Die Diskrepanz der *Cut-off*-Werte zu den zuvor genannten könnte am ehesten darauf zurückführbar sein, dass bei den Messungen im Serum weitere aktivierende Faktoren der Gerinnungssystems wie z.B. Thrombin auf die Thrombozyten eingewirkt haben könnten, die zu einer Sensibilisierung dieser und Herabsetzen des Thromboxan-Schwellenwertes geführt haben könnten [1]. Bei der Messung nach Aggregation mit ARA wurde hingegen Plasma untersucht; das Serum wurde hier nach der Aggregation abzentrifugiert (s. Abs. 2.6).

Auch für den Thromboxan-Assay wurden beispielhaft verschiedene *Cut-off*-Werte für bestimmte Zielsetzungen bestimmt (s. Abs. 3.4.4.1.1). Bei maximaler Sensitivität von 100% ergab sich ein Grenzwert von $\geq 7,67$ ng/ml TXB₂ bzw. bei maximaler Spezifität von 100% von $\geq 82,04$ ng/ml TXB₂.

Wie die LTA und der TXB₂-Assay sind auch viele andere der aktuell verfügbaren Methoden (s. Abs. 1.9) zeitintensiv, wenig standardisiert und setzen ein spezialisiertes Labor voraus [196, 197, 251]. Die physiologischen Verhältnisse und die Einbindung der Thrombozyten in pathophysiologische Vorgänge (Scherkräfte an der Gefäßwand, plasmatische Gerinnung, Inflammation *etc.* werden oft nicht ausreichend abgebildet [198]. In der jüngeren Vergangenheit entwickelte *Point-of-care*-Methoden sind der VerifyNow[®]-Assay, PFA-100[®] sowie der Multiplate[®]-Assay [170, 252, 253]. Die Frage, ob sie sich zur Therapieüberwachung von ASS gut eignen, ist noch nicht endgültig geklärt. Weitere Daten zur Übereinstimmung mit Aggregation und Thromboxan-Assay müssen erst noch erhoben werden [157].

4.4 Der fluorometrische MDA-Assay

Aus der vorangehenden Diskussion der Schwachpunkte bisheriger Testmethoden ergeben sich eine Reihe von Kriterien, die ein zukünftig einsetzbarer MDA-Assay zum *ASS-Monitoring* erfüllen müsste. Ergänzt mit Aspekten von Hayward *et al.* ergeben sich folgende Anforderungen an einen solchen Assay [185]:

1. Gute Vergleichbarkeit des MDA-Assays mit anderen Tests [185, 254]
2. Patientennahe Einsatzmöglichkeit bzw. *Bedside-Assay*/ *Point-of-Care-Assay* [200]

3. Möglichkeit der individualisierten Entscheidungsfindung sowie hohe Testgüte [200]
4. Möglichkeit der Ableitung von Therapiekonsequenzen [185]
5. Nähe zum pharmakologischen Wirkmechanismus von ASS [238]
6. Nähe zur Pathophysiologie kardiovaskulärer Krankheiten [152]
7. Einfache und schnelle Durchführung [200]
8. Gute Standardisierung und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse [200]
9. Gutes Kosten-Nutzen-Verhältnis [172]
10. Übertragbarkeit, Anwendbarkeit [255]
11. Verbesserung des *Outcomes* durch Anwendung des Verfahrens [185] (s. Abs. 4.7)

Der in dieser Dissertation untersuchte MDA-Assay erfüllt bereits eine Reihe dieser Kriterien, andere wiederum noch nicht.

4.4.1 Gute Vergleichbarkeit des MDA-Assays mit anderen Tests

Bisher haben Vergleichsuntersuchungen verschiedener Thrombozyten-Assays insgesamt keine guten Korrelationen untereinander gezeigt [172, 196, 254, 256, 257].

In dieser Arbeit zeigte sich in einer Korrelationsanalyse zwischen dem MDA-Assay und dem Goldstandard LTA sowie dem TXB₂-ELISA ein stark positiver Zusammenhang (s. Abs. 3.2.1).

4.4.2 Patientennahe Einsatzmöglichkeit bzw. *Bedside-Assay/ Point-of-Care-Assay*

Bedside-Methoden wie die ubiquitär etablierte Blutgasanalyse, welche ebenfalls zum Teil mit fluoreszenzphotometrischen Methoden arbeitet, sind mittlerweile für den klinischen Alltag unverzichtbar und ermöglichen unmittelbare, für den Patienten relevante therapeutische Konsequenzen [258, 259]. Die Messung der Fluoreszenz von MDA nach Derivatisierung wurde in dieser Dissertation mit einem universell einsetzbaren Fluoreszenzphotometer durchgeführt. Ein solches Gerät ist aktuell zwar nur in wenigen Laboren vorhanden, wird jedoch bereits für andere hämostaseologische Untersuchungsmethoden eingesetzt (z.B. Thrombinpotential nach Hemker) [260]. Die Wellenlängen von Exzitation ($\lambda = 520\text{nm}$) und Emission ($\lambda = 555\text{nm}$) (s. Abs. 2.7) für die Detektion des Adduktes von MDA und Thiobarbiturat liegen im Bereich des sichtbaren Lichtes. Lichtquellen für die Erzeugung (LED, Laser) und Detektion (Photodiode, Photomultiplier) sowie optische Filter sind für diese Wellenlängen handelsüblich. In Zusammenarbeit mit dem Institut für Physik der Mathematisch- Naturwissenschaftlichen Fakultät der HHU Düsseldorf wurde ein Fluoreszenzmessgerät entwickelt, das mit einem relativ einfachen und kostengünstigen Aufbau die MDA-Detektion ermöglicht und sich als *Bedside*-Methode eignen könnte. MDA kann dann ohne vorherige Aggregation gemessen werden. In Vorversuchen zeigte sich, dass MDA auch ohne LTA nach Inkubation von PRP mit ARA für wenige Minuten bei 37°C messbar ist. Diese Temperatur ist

nötig, da bei Raumtemperatur Thrombozyten nur wenig MDA produzieren [261-263]. Neben der Festlegung dieser Temperatur ist die zügige Verarbeitung der Proben sowie eine festgelegte Inkubationszeit notwendig [261-263]. In einer weiteren Doktorarbeit mit gesunden Probanden im Institut für Pharmakologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf wurde die MDA-Messung mit niedrigeren, als der hier in der Aggregation angewendeten (1mM EK) ARA-Konzentrationen ausgetestet. Dabei zeigte sich, dass mindestens ein ARA-Zusatz (bei Anwendung der Arachidonsäure von Roche s. Abs. 2.3.1) von ca. 200µM EK notwendig ist, um MDA zuverlässig messen zu können, da erst damit eine ausreichende Thrombozytenaktivierung erfolgt [264]. Ursächlich ist die ausgeprägte Plasmaeiweißbindung von ARA im Blut [265]. Demnach würde die Messung in einem *Bedside*-Fluoreszenzspektrometer mit PRP und mindestens 200µM ARA erfolgen.

4.4.3 Möglichkeit der individualisierten Entscheidungsfindung sowie hohe Testgüte

Mit dem MDA-Assay sollte es möglich sein, zuverlässig die Entscheidung zwischen *Responder* und *Nonresponder* zu treffen.

Die Messwerte von *Respondern* und *Nonrespondern* unterschieden sich in allen drei in dieser Dissertation verglichenen *Assays* signifikant voneinander ($p > 0,01$). Die ROC-Analysen zeigten, dass der MDA-Assay nach ARA-Stimulation eine hohe Test-/Trenngüte aufweist, die der des TXB₂-Assays entspricht (s. Abs. 3.4.3). In Abhängigkeit von der Fragestellung könnte mit entsprechenden *Cut-off*-Werten gearbeitet werden. Der F1-Score ist dabei für die exemplarisch ausgewählten *Cut-off*-Werte mit 0,955 bzw. 0,950 sehr hoch (s. Abs. 3.4.3.1.1.), ebenso wie die jeweilige Sensitivität und Spezifität von $\geq 90\%$. Im Vergleich zu anderen Plättchentests ist die Testgüte des MDA-Assays im Hinblick auf die Detektion von ASS-Resistenz im Sinne von erhaltener Plättchenaggregation damit sehr hoch. In einer Studie von Breet *et al.* mit HKU-Patienten lagen beispielsweise Sensitivität und Spezifität von LTA, VerifyNow[®], PFA-100[®], Innovance[®] PFA P2Y, IMPACT[®]-R und Plateletworks[®] für ausgewählte *Cut-off*-Werte nur bei 44-63% bzw. 29-63,9% im Hinblick auf die Vorhersage des Eintretens ischämischer Ereignisse nach einem Jahr [266]. Die in dieser Arbeit gewählten *Cut-off*-Werte sollten jedoch in weiteren Studien prospektiv validiert und mit dem *Outcome* der Patienten verglichen werden

4.4.4 Möglichkeit der Ableitung von Therapiekonsequenzen

Einige Ursachen von ASS-*Nonresponse* sind unter bestimmten Umständen vermeidbar oder reversibel (s. Abs. 1.7, 4.6). So könnte beispielsweise bei Medikamenteninteraktionen von ASS mit Metamizol oder anderen NSAID eine feste Einnahmehinfolge mit festgelegtem zeitlichem Abstand oder Dosiserhöhung helfen (s. Abs. 4.6.3, 4.6.4) [149, 267-269]. Alternativ käme ein Wechsel des Plättchenhemmers in Frage [270]. Die Frage, ob diese Veränderungen

das *Outcome* verbessern können, wird in Abschnitt 4.7 diskutiert.

4.4.5 Nähe zum pharmakologischen Wirkmechanismus von ASS

ASS hemmt, wie bereits in Abschnitt 1.4 beschrieben, die COX durch Acetylierung [19]. Somit wird auch die im nächsten Schritt ablaufende Thromboxansynthese aus PGH₂ gehemmt, bei der MDA im Verhältnis eins zu eins entsteht [36] (s. Abs. 1.3). Statt der Messung von Thromboxan [51] ist es daher möglich, mittels MDA die pharmakologische Wirkung von ASS zu erfassen [37, 44] (s. Abs. 1.3).

4.4.6 Nähe zur Pathophysiologie kardiovaskulärer Krankheiten

Thromboxan spielt als proaggregatorischer und vasokonstriktiver Faktor eine zentrale Rolle im Prozess der Thrombozytenaggregation [9, 12, 29] sowie der Arterioskleroseentstehung [26] (s. Abs. 1.1). Es verstärkt den Gesamtprozess der Thrombozytenaggregation sowie die Thrombozyten untereinander und wirkt dabei kurz und lokal [271]. MDA als natürliches, direktes Nebenprodukt der Synthese von Thromboxan [36] bildet damit ebenso zentrale Vorgänge der Aggregation ab [38, 272].

Dennoch wird mit der Messung von Thromboxan bzw. MDA nur ein kleiner Teil des komplexen Prostaglandinsyntheseweges- und -systems beleuchtet (s. Abs. 1.2) [13], denn neben Thromboxan spielen weitere Prostaglandine; wie PGI₂ und PGE₂; eine Rolle im kardiovaskulären System [12]. Dadurch, dass ASS als Inhibitor an der COX eingreift, wird zwar auch die Synthese anderer Prostaglandine gehemmt [19], jedoch werden diese durch *low dose* ASS weit weniger inhibiert als die thrombozytäre Thromboxansynthese [273, 274]. Dazu kommt der Einfluss einer Vielzahl pro- und antiaggregatorischer Faktoren, welche nicht unter dem Einfluss von ASS stehen [250].

4.4.7 Einfache und schnelle Durchführbarkeit

Der MDA-Assay bietet eine deutliche Zeitersparnis gegenüber dem spezifischen *ELISA*. Zur Vorbereitung des Assays gehören die Zentrifugation des Vollblutes sowie die Vorinkubation des PRP von ca. zehn Minuten mit ARA bei 37°C zur Stimulation der MDA-Produktion. Danach beträgt der zeitliche Aufwand ca. 85 Minuten. Dies ist ein Bruchteil (5,74%) der für den TXB₂-*ELISA* benötigten Zeit, welcher ca. zweieinhalb Arbeitstage (29 Stunden) beansprucht (MDA-Assay: ca. 100 Minuten vs. TXB₂-Assay ca. 1740 Minuten) [264]. Mit einer 96-*Well*-Mikrotiterplatte würden sich, bei dreifacher Messung der Proben und Herstellung je eines *Blanks*, 24 Proben gleichzeitig untersuchen lassen. Außerdem ist der Versuchsablauf relativ einfach im Vergleich mit ca. sieben (MDA-Assay) gegenüber elf Arbeitsschritten (TXB₂-Assay). Eine hohe fachliche Expertise ist nicht nötig [264, 275, 276]. In der Weiterentwicklung des MDA-Assays wäre außerdem zusätzliche Zeitersparnis durch Anwendung in Vollblut denkbar. Dazu sind jedoch weitere Untersuchungen notwendig.

4.4.8 Gutes Kosten-Nutzen-Verhältnis

Ein weiterer eindeutiger Vorteil ist die enorme Kostenersparnis, sowohl personell (Zeitersparnis gegenüber TXB₂-Assay von über 94% s. Abs. 4.4.6) als auch materiell. Die für den MDA-Assay eingesetzten Substanzen TCA und TBA sind kostengünstig [275]. Demgegenüber kostet ein einzelnes ELISA-KIT, wie z.B. von Cayman mit 96 *Well* ca. 350 Euro (Stand 11.05.2020). Es kann bei Dreifachbestimmung jeder Probe für 24 Proben verwendet werden [205].

4.4.9 Übertragbarkeit und Anwendbarkeit

Die Ergebnisse dieser Arbeit müssen in weiteren klinischen Studien verifiziert werden. Interessant wäre die Langzeitverfolgung der Patienten mit wiederholten Messungen sowie die Erfassung von *Outcome*-Daten.

Daneben wurde in dieser Arbeit der MDA-Assay nur mit der LTA und dem TXB₂-Assay verglichen. Für die bessere Einordnung wäre der Vergleich mit weiteren Testmethoden wünschenswert. Trotz ihrer Stellung als Goldstandard, ist nicht außer Acht zu lassen, dass die LTA eine bereits über 50 Jahre alte Methode und zudem keine *Bedside*-Methode ist [162, 163]. Der Vergleich mit neuen Methoden, die den Status *Bedside*-Assay eher beanspruchen können, wie der VerifyNow[®]-Assay, der PFA-100[®] sowie der Multiplate[®]-Assay (s. Abs. 1.9, 4.2) [170, 252, 253] wäre sinnvoll.

Was das Patientenspektrum für einen zukünftigen Einsatz betrifft, so ist vielversprechend, dass im Rahmen dieser Dissertation eine breite Spanne von Patienten und gesunden Personen eingeschlossen wurde (s. Abs. 2.12, 4.1) und sich die Resultate trotzdem zu einem kohärenten Bild zusammenfassen ließen. Bisher beschränken sich die Empfehlungen für Plättchenfunktionstests auf Hochrisikopatienten [157].

4.5 Kritische Beurteilung der Darstellung verschiedener Aspekte in den Assays

Nachdem die für die Praxis vorteilhaften Eigenschaften des MDA-Assays dargestellt wurden, sollen im Folgenden verschiedene Aspekte der Ergebnisse des Assays, der Versuchsaufbau sowie Fehlerquellen analysiert werden.

4.5.1. Response vs. Nonresponse

Ergebnisse ohne *in vitro* Zusatz von ASS

Bei den *Respondern* zeigte sich eine maximale Hemmung der Aggregation, der Thromboxan- und somit auch der MDA-Produktion (s. Abs. 3.1). Um dies zu erreichen, ist die Hemmung der nahezu gesamten Thromboxanproduktion notwendig [46]. Die Wirkung von ASS kann mit dem „Alles-oder-nichts“-Prinzip beschrieben werden [277]. Mit der *low-dose*-ASS-Therapie von 100mg oral ist eine maximale Plasmakonzentration von ca. 5-6µM zu erwarten [278]. Darunter lässt sich bereits eine maximale Suppression erreichen [51]. Das Ausmaß der Suppression

der Serum-TXB₂-Werte der *Responder* lag bei 99,64% nach der Aggregation mit ARA sowie 97,70% nach der Aggregation mit TRAP6 (im Vergleich zur Kontrollgruppe (s. Tab. 22 Abs. 3.1.1.3, Tab. 26 Abs. 3.1.2.2)). Dies stimmt überein mit den Angaben von 94 bis > 99% in der Literatur [192, 279]. Die Suppression der MDA-Produktion der *Responder* war ähnlich stark, mit einer Reduktion auf 1,97% nach der Aggregation mit ARA sowie auf 5,34% nach der Aggregation mit TRAP6 (im Vergleich zur Kontrollgruppe (s. Tab. 21 Abs. 3.1.1.2, Tab. 25 Abs. 3.1.2.2)). Die nahezu vollständige Suppression der Aggregation, MDA- und Thromboxanproduktion lässt vermuten, dass die Therapietreue dieser Patienten sehr gut war. Die hier verabreichten ASS-Dosierungen entsprechen denen der aktuell gültigen Leitlinien zur Dauer- und Akuttherapie von stabiler und instabiler KHK [280-285].

Oral verabreichtes ASS entfaltet seine volle Wirkung je nach Darreichungsform erst nach mehreren Stunden bis Tagen [51]. Bei Dauereinnahme wird unter anderem in Abhängigkeit von der Halbwertszeit (ca. 15-20 Min.) und Dosis nach einer gewissen Zeit ein *steady state* erreicht [51, 286]. Erst darunter entfaltet sich die volle Wirkung [287, 288]. In einer Studie von Nagelschmitz *et al.* beispielsweise, bei der nur eine einmalige ASS-Dosis verabreicht und nach 20 Minuten gemessen wurde, wurde eine Reduktion der Aggregation auf nur 31,6% gezeigt (Mittelwert +/- 46% = SD) [278].

Nonresponder (relatives Aggregationsmaximum mit ARA \geq 20%) zeigten signifikant ($p < 0,01$) höhere „funktionelle“ Plättchenaktivität als *Responder* in der ASS-spezifischen Aggregation mit ARA ohne *in vitro* Zusatz von ASS. Im MDA-Assay und TXB₂-ELISA ließ sich dies reproduzieren.

Ergebnisse mit *in vitro* Zusatz von ASS

In weiteren Versuchsansätzen wurde mit *in vitro* ASS-Zusatz von 30 μ M bzw. 100 μ M gearbeitet (s. Abs. 2.6, 3.1), um die weitere Hemmbarkeit insbesondere der *Nonresponder* zu prüfen. Diese Konzentrationen liegen deutlich über den mit *low dose* ASS erreichbaren maximalen Plasmaspiegeln und wurden in dieser Arbeit verwendet, um die ASS-Sensitivität unter den aktuellen Assay-Bedingungen zu prüfen. Solch hohe ASS-Plasmaspiegel können in der Therapie andere Krankheiten vorkommen, wie z.B. zur Therapie des Kawasaki-Syndroms [289].

Die Kontrollgruppe war bereits unter 30 μ M stark gehemmt in MDA-Assay, LTA und TXB₂-ELISA. Die schon ohne Zusatz von ASS gehemmten *Responder* reagierten ähnlich (s. Abs. 3.1). *Nonresponder* wurden zwar auch gehemmt, jedoch in deutlich geringerem Maße und erst in höheren Dosen. Die *in vitro* Hemmbarkeit der Thrombozyten von *Nonrespondern* durch Erhöhung der *in vitro* zugesetzten Konzentration von ASS zeigt möglicherweise einen Aspekt der *Nonresponse*, welcher vorbeschrieben ist: Die dadurch mögliche Überwindung der *Nonresponse* [236, 270].

4.5.2 Thromboxan und MDA als Biomarker für die Thrombozytenaktivierung

Vergleich der Konzentrationen von MDA und TXB₂

Der schnell abnehmenden antithrombotischen Wirkung bei ASS-*Nonresponse* liegt eine nicht-lineare Beziehung der Produktion von Thromboxan und Plättchenaktivierung durch dieses zugrunde [46]. Dies zeigte sich auch in unserer Arbeit in der Korrelation der Aggregationsergebnisse mit MDA bzw. TXB₂ aus der Aggregation mit ARA (s. Abs. 3.2.1.1, 3.2.1.3). Die Korrelationspunkte konzentrieren sich auf der einen Seite in einem Bereich mit inaktiven Plättchen, auf der andere Seite in dem Bereich mit aktivierten; einem „Alles-oder-Nichts-Prinzip“ entsprechend [51, 189].

MDA- und TXB₂-Assay: mögliche Messungenaugigkeiten

Beim Vergleich des Verhältnisses der TXB₂- und MDA-Werte fällt auf, dass dieses variiert (s. Abs. 3.2.1.2, 3.2.2). Dies scheint der Annahme zu widersprechen, dass beide Stoffe eins zu eins gebildet werden [36, 38]. Beides sind jedoch Methoden, die laborchemischen Variationen unterliegen.

MDA entsteht auch bei der durch ROS (*Reactive oxygen species*) verursachten Lipidperoxidation [40]. Dabei bricht das Gleichgewicht oxidativer sowie antioxidativer Faktoren zusammen und oxidativer Stress entsteht [290]. Für dessen Quantifizierung wird MDA als Biomarker eingesetzt, ist allerdings aufgrund stark variierender Plasmaspiegel umstritten [291]. Auch steht es im Zusammenhang mit den inflammatorischen Prozessen im Rahmen der Arterioskleroseentstehung [292]. Es zeigt das KHK-Ausmaß an [293], lässt auf Reperfusionvorgänge zurückschließen [294] und könnte als MDA-LDL-Produkt auch prognostische Bedeutung für das kardiovaskuläre *Outcome* haben [295]. Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurde MDA jedoch in PAP bestimmt (s. Abs. 2.7). Bei dessen Herstellung wurden zelluläre Bestandteile, aus deren Metabolismus die ROS entstehen [290], durch Zentrifugation weitestgehend entfernt. Außerdem wurde bei den MDA-Messungen im Plasma der Patienten jeweils der *Blank* und damit aus anderen Quellen entstandenes MDA, vom arachidonsäurestimulierten Wert abgezogen (s. Abs. 2.7).

MDA kann neben dem „direkten“ Weg über die PGH₂ auch nichtenzymatisch durch Umwandlung von PGH₂ entstehen [36, 296]. Es ist sehr reaktiv und instabil [276]. Folglich ist dessen Konzentration stark von Umgebungsfaktoren wie der Temperatur, dem pH-Wert sowie von der Zeit abhängig [297-300]. In den Bestimmungen zu dieser Dissertation wurde jedoch nicht oberhalb von Temperaturen von 70°C gearbeitet sowie bei einem pH-Wert des Thrombozytenmediums der bei ca. 7,4 lag wie im menschlichen Körper (s. Abs. 2.3.3, 2.7). MDA wurde sofort nach der Aggregation gemessen ohne die Proben zu lagern. Die Gesamtdauer der Messungen betrug ca. 100 Minuten.

Im Rahmen unserer Versuche zeigte sich die scheinbar fehlende Bedeutung anderer biologischer MDA-Quellen neben dem thrombozytären Ursprung daran, dass die MDA- wie

die Thromboxansynthese durch Zusatz von ASS im PRP gesunder Probanden fast vollständig gehemmt werden konnte. Eine geringe Restproduktion von MDA und TXB₂ ließ sich dabei noch darstellen im Gegensatz zur vollständig gehemmten Aggregation (s. 3.1.1.1, 3.1.1.2, 3.1.1.3). Dies könnte möglicherweise ein Hinweis darauf sein, dass durch den MDA-Assay bereits präaggregatorische Vorgänge im Sinne einer einsetzenden Thromboxan- bzw. MDA-Produktion, die noch nicht zur Aggregation führen, gemessen werden können.

Den TXB₂-ELISA betreffend, können laut Herstellerangabe ebenfalls Fehlmessungen, z.B. durch Kreuzreaktivitäten, auftreten. Hierbei reagieren die TXB₂-detektierenden Antikörper mit verschiedenen anderen Prostaglandinen und Leukotrienen [205]. Außerdem variiert die Testgenauigkeit mit der TXB₂-Konzentration. Sie zeigt abnehmende Tendenz, je niedriger die Thromboxankonzentration ist, mit einer Varianz von 25,8% bei Werten von 0,41ng/ml [205]. Dies könnte in der *Responder*-Gruppe mit sehr niedrigen TXB₂-Werten zum Tragen gekommen sein, was sich darin widerspiegelt, dass hier das Verhältnis von TXB₂ und MDA-Messwerten am meisten variiert (s. geringe Korrelation von MDA- und Thromboxanwerten in Ansätzen mit niedrigen TXB₂-/ MDA-Messwerten (100µM ASS/ 3µM Terbogrel) Abs. 3.2.1.2, 3.2.2). Ebenso wie beim MDA-Assay in Betracht zu ziehen sind außerdem Schwankungen der TXB₂-Werte, die hervorgerufen sein könnten durch Abweichungen der Temperatur oder der Dauer bis zur Messung [261-263].

4.5.3 Hemmung durch Terbogrel

Mit Terbogrel wurde ein Wirkstoff eingesetzt, welcher neben der Thromboxansynthese auch den Thromboxanrezeptor hemmt [212, 301, 302]. So zeigten sich die Plättchen aller drei Gruppen, auch die der *Nonresponder*, in der Aggregation mit ARA durch Terbogrel stark gehemmt (s. Abs. 3.1.1.). Da Terbogrel an dem der COX-nachgeschalteten Enzym ansetzt (Thromboxansynthese), bleibt die COX aktiv und kann andere Prostaglandine produzieren. Jene, wie beispielsweise PGH₂, können wiederum auch an Thromboxanrezeptoren binden und so potentiell proaggregatorisch wirken [10], allerdings greift dann der Antagonismus von Terbogrel am Thromboxanrezeptor. Außerdem werden über die COX auch antiaggregatorische Prostaglandine produziert (s. Abs. 1.2) [212, 302].

Die Wirkung von Terbogrel auf Thrombozyten von *Nonrespondern* war nicht gemindert. Diese Beobachtung stimmt überein mit Ergebnissen von Zimmermann *et al.*, die zeigen konnten, dass Terbogrel auch in Situationen in denen *Nonresponse* auftrat, wie z.B. nach PTCA, nicht wirkungsgemindert war [249]. Bei *Nonresponse* können Plättchen in arteriosklerotisch-inflammatorische Prozesse eingebunden sein und folglich veränderte Verhältnisse der Prostaglandinproduktion mit erhöhten Thromboxan- und Prostacyclinwerten vorliegen. Thromboxan scheint auch bei *Nonresponse* weiterhin ein zentraler Aggregationsverstärker zu sein [27, 212, 303].

In der Kontrollgruppe zeigten sich unter 3µM Terbogrel höhere Werte als unter 100µM ASS

für Thromboxan und MDA, jedoch war dies statistisch nicht signifikant (s. Abs. 3.1.1.2, 3.1.1.3).

4.5.4 Aggregationsstimulus TRAP6

Die Aggregation mit TRAP6 als Agonist wurde eingesetzt, um zu prüfen, ob die Plättchen funktionstüchtig und variabel stimulierbar sind (s. Abs. 3.1.2.1). Zudem ließ sich im Vergleich mit ARA als Stimulus unterstreichen, dass MDA in der Aggregation mit ARA spezifisch während der Thromboxansynthese entsteht. Da in der Aggregation mit TRAP6 ARA als Substrat der COX nicht direkt zugegeben wurde, lagen die Werte für TXB₂- und MDA deutlich unter denen nach Stimulation mit ARA (s. Abs. 3.1.2.2).

Responder und *Nonresponder* zeigten ähnlich hohe Werte in der Aggregation mit TRAP6 (s. Abs. 3.1.2.1). Die Plättchenaggregation ließ sich außerdem unter TRAP6 durch ASS nicht hemmen (< 50% Hemmung). Dies ist dadurch zu erklären, dass TRAP6 weitgehend COX-unabhängig die Plättchen direkt über den Thrombinrezeptor stimuliert. So hat ASS kaum Einfluss auf die Thrombin-induzierte Aggregation [304]. Thromboxan spielt hier nur als Selbstverstärkungsmechanismus der Plättchen eine Rolle [305, 306]. Die inhibierende Wirkung von *in vitro* ASS auf diese Selbstverstärkung war deutlich besser darstellbar in der Messung von MDA und TXB₂ (s. Abs. 3.1.2.2). Analog zu den Messungen mit ARA zeigte sich die Reduktion der MDA und TXB₂-Werte am stärksten in der Kontroll-, schwächer in der *Responder*- und am wenigsten in der *Nonresponder*-Gruppe. In den Ansätzen mit 0 und 30µM ASS waren die Unterschiede zwischen *Respondern* und *Nonrespondern* signifikant (s. Abs. 3.4.1.2).

4.6 Mögliche Ursachen der ASS-Nonresponse in dem untersuchten Patientenkollektiv

Im Folgenden soll dargestellt werden, welche Faktoren in dem in dieser Arbeit untersuchten kardiologischen Patientenkollektiv zu *Nonresponse* geführt haben könnten und welche Mechanismen zugrunde gelegen haben könnten. Mithilfe des MDA-Assays könnte man testen, ob bei den einzelnen Patienten der jeweilige Faktor zu *Nonresponse* führt und gegebenenfalls die ASS-Wirkung unter Ausschaltung dessen bzw. Umstellung der Therapie *monitoren*.

4.6.1 Noncompliance

ASS-*Noncompliance* kann sowohl eine Ursache von *Nonresponse* sein (s. Abs. 1.6, 4.2), als auch ein *Confounder*, durch den die *Nonresponder*-Rate überschätzt werden kann [123]. Sie kann mit verschlechtertem *Outcome* assoziiert sein [307]. Der Anteil der Patienten mit *Noncompliance* ist in der vorliegenden Untersuchung jedoch eher als gering einzuschätzen, da die Medikamentengabe in der Klinik kontrollierter erfolgte als unter ambulanten Bedingungen. Des Weiteren spricht die geringe Hemmbarkeit der *Nonresponder*-Thrombozyten *in vitro* gegen das Vorliegen von *Noncompliance* als Ursache für die

Nonresponse (s. Abs. 3.1, 4.2, 4.5.1).

4.6.2 Pharmakokinetik

Veränderungen in der Pharmakokinetik von ASS können als individuelle Faktoren eine große Rolle im Hinblick auf *ASS-Nonresponse* spielen [277, 308]. Die Wirkung von ASS auf Thrombozyten entfaltet sich bereits im Blut der Pfortader [309]. Die nach der Absorption resultierende systemische Wirkung ist abhängig von vielen Faktoren. Dazu zählen unter anderem die Darreichungsform, die Verstoffwechslung über Esterasen, Transportproteine wie das *Multidrug resistance protein 4* sowie genetische Einflüsse [308]. Der Einfluss dieser Faktoren ist im Patientenkollektiv dieser Untersuchung nicht auszuschließen. Allerdings wäre bei *Nonresponse* durch veränderte Pharmakokinetik eine normale *in vitro* Sensitivität der Thrombozyten zu erwarten („Typ 1“ *Nonresponse* nach Weber), was in der vorliegenden Untersuchung nicht der Fall war (s. Abs. 3.1, 4.2, 4.5.1) [247].

4.6.3 Interagierende Arzneimittel: Beispiel Metamizol

ASS-Metamizol-Interaktion

MAA, der aktive Metabolit von Metamizol, kann unter bestimmten Bedingungen mit ASS interferieren [310]. Die Herabsetzung der ASS-Wirkung durch Metamizol, die bereits bei einer Plasmakonzentration von 10µM MAA auftritt, wurde erstmals 2008 von Hohlfeld *et al.* an Patienten nach koronarer *Bypass*-Operation beobachtet und durch *in vitro* Experimente an humanen Thrombozyten bestätigt [267]. Auf der Ebene der Aggregation mit den Stimuli Kollagen und ARA, der Thromboxanbildung, subzellulär anhand mikrosomaler COX-Aktivität und anhand der thrombozytären P-Selektin-Expression ließ sich die verminderte ASS-Wirkung in Gegenwart von Metamizol darstellen [267]. Untersuchungen an anderen Patientenkollektiven haben ebenfalls gezeigt, dass MAA sowohl *in vitro* als auch *in vivo* spezifisch die Plättchenhemmung durch ASS herabsetzen kann [140, 149, 311]. Weitere Indizien aus *in vitro* Studien bei Gesunden für die durch die Interaktion verursachte *Nonresponse* sind: Die direkt durch Metamizol verursachte *Nonresponse* an Thrombozyten gesunder Personen [149, 267], sowie indirekt die Übertragbarkeit von *ASS-Nonresponse* mittels Blutplasma von Metamizol-behandelten Patienten auf Thrombozyten von Gesunden [312]. Auch in einer Fall-Kontroll-Studie mit Schmerzpatienten unter analgetischer Therapie mit ASS und Metamizol und arteriosklerotisch bedingten Grundkrankheiten zeigte sich das Ausbleiben eines zeitabhängigen TXB₂-Abfalls nach ASS-Gabe sowie ein Anteil von nur 22% der Patienten, bei denen eine reguläre Hemmung der Plättchenaggregation vorhanden war [313]. Bei Apoplex-Patienten belief sich in einer Studie von Dannenberg *et al.* die *Nonresponse*-Rate bei gleichzeitiger Einnahme von ASS und Metamizol auf 33% (OR 21,95%, Konfidenzintervall 1,2 - 401) gemessen durch LTA mit ARA [314].

Ähnlich zu der Interaktionen von ASS mit NSAID (s. Abs. 4.6.4) scheint zwischen ASS und

Metamizol eine kompetitive Interaktion über die COX-1 [315] sowie andere COX-Isoenzyme zu bestehen [316]. Daher lässt sich diese durch höhere ASS-Dosen durchbrechen [267]. MAA bindet vermutlich reversibel, mit höherer Affinität als ASS an die COX-1, und könnte so den Substratkanal für ASS an Serin 530 blockieren. Dies geschieht wahrscheinlich noch während der initialen reversiblen Bindung von ASS im Bereich des Substratkanals der COX-1 [140, 267]. Da Metamizol mit zwei bis drei Stunden außerdem eine höhere Plasmahalbwertszeit als ASS hat [317], welches nach oraler Gabe eine Halbwertszeit von ca. 20 Minuten aufweist [278], kann bei gleichzeitiger oder vorheriger Einnahme von Metamizol die Plättchenhemmung durch ASS vermindert werden [149, 267].

Bemerkenswert ist, dass Metamizol ähnlich wie Ibuprofen und andere Nichtopioid-Analgetika kein potenter COX-1-Inhibitor ist [318]. Dem könnte zugrunde liegen, dass erst in hohen Dosen die Konkurrenz mit der mit sehr hoher Affinität bindenden ARA als Substrat der COX-1, überwunden wird [319]. Eine dosisabhängige Hemmwirkung von MAA auf die COX1- und 2 wurde bei Dosierungen von 500-1000mg [320] jedoch beschrieben und Metamizol sogar als alternativer Plättchenhemmer bei intravenöser Gabe vorgeschlagen [268].

ASS-Nonresponse durch Metamizol in dieser Arbeit

In dieser Arbeit konnten bei 38 Patienten Metamizolmetabolite im Blut bestimmt werden; bei 36 die pharmakologisch aktiven AA und MAA (s. Abs. 3.4.2). Davon waren 19 *Nonresponder* ($19/38 = 50\%$ bzw. $19/36 = 52,78\%$). Dies entspricht einer Häufigkeit von ASS-Nonresponse im kardiologischen Krankengut, die auch in früheren Untersuchungen unseres Labors berichtet wurde [311]. Zusätzlich könnte bei den zwölf Patienten, welche im Rahmen einer HKU einen Hochdosis-ASS-Bolus erhielten, ASS-Nonresponse durch den ASS-Bolus verschleiert bzw. „durchbrochen“ worden sein (s. Abs. 2.12). Dies gilt insbesondere für die sieben der zwölf HKU-Patienten (ein *Nonresponder*, sechs *Responder*), bei denen eine gleichzeitige Medikation mit Metamizol bestand.

Metamizol-Plasmakonzentrationen

Die Metamizolspiegel von *Nonrespondern* sowie *Respondern* variierten stark und unterschieden sich nicht signifikant voneinander (s. Abs. 3.4.2). Ein signifikanter Unterschied hatte sich jedoch in vorherigen Arbeiten der Arbeitsgruppe gezeigt [149]. Die Metabolisierung von Metamizol bzw. seines aktiven Metaboliten MAA erfolgt nicht-linear und ist von vielen Faktoren abhängig. Dazu zählen Einnahmemodus, Häufigkeit und Zeitpunkt der Einnahme (z.B. vor/ bei/ nach dem Essen), Dosis, Acetyliererstatus, Alter sowie Nieren- und Leberfunktion [310, 321-323]. Folglich lässt sich schwer beurteilen, wie hoch die Metamizol-Plasmaspiegel zum Zeitpunkt des Anflutens von ASS nach ASS-Einnahme waren und ob dabei ein signifikanter Unterschied zwischen *Nonrespondern* und *Respondern* darstellbar gewesen wäre. In unseren Untersuchungen ließ sich die ASS-Metamizol-Interaktion ebenfalls

nicht auf eine bestimmte Darreichungsform reduzieren. Sie kam sowohl bei oraler Gabe als Tablette oder Tropfen als auch bei intravenöser Gabe vor. Polzin *et al.* kamen in einer vorausgehenden Untersuchung zu einem ähnlichen Ergebnis [149].

Klinische Bedeutung der Interaktion zwischen ASS und Metamizol

Bedeutung erlangt die Interaktion durch die sehr hohe „Beliebtheit“ von Metamizol in Deutschland und anderen Ländern, in denen Metamizol zugelassen ist. Sie beruht auf dessen suffizienten schmerzhemmenden, antipyretischen und spasmolytischen Effekten [324] bei insgesamt guter Verträglichkeit [321] mit geringer gastrointestinaler Blutungswahrscheinlichkeit [325]. Hinzu kommt die schwache Plättchenhemmung im Gegensatz zu anderen peripheren Analgetika (NSAIDs), welche in Kombination mit ASS laut aktueller Leitlinie nicht zum Einsatz kommen sollen bei kardiologischen Patienten [280, 326, 327].

Potenziell lebensbedrohliche Blutbildveränderungen führten dazu, dass Metamizol in vielen Ländern nicht mehr im Handel ist [328]. In Deutschland wird Metamizol hingegen seit vielen Jahren zunehmend häufiger verschrieben. Die Anzahl der *Defined Daily Doses (DDD)* erreichte 2009 allein in der Bundesrepublik Deutschland über 140 Millionen [329]. In den Jahren danach nahm die Verschreibungshäufigkeit weiter zu - 2019 landete Metamizol sogar auf Platz eins der verordneten Schmerzmittel mit 243,5 Millionen DDD [330]. In Ländern wie den USA, in denen es zurückgezogen wurde, wird Metamizol zum Teil illegal eingeführt und verwendet [331].

Das klinische Risikoprofil von Metamizol ist besonders durch die für diese Substanz sehr bekannte, jedoch seltene Agranulozytose charakterisiert [328]. Dahingegen gibt es nur wenige Daten zum kardiovaskulären Risiko der ASS-Metamizol-Interaktion.

In einer Beobachtungsstudie zeigten Achilles *et al.* bei Patienten mit ASS-Metamizol-Komedikation über bis zu 4 Jahre eine erhöhte Rate an schwerwiegenden kardialen und zerebrovaskulären Komplikationen. Jedoch war die Patientenzahl relativ klein und die Metamizolbehandlung nicht über den gesamten Zeitraum des *Follow-Up* durchgehend dokumentiert [332]. Bei Patienten nach Apoplex, welche mit *low-dose* ASS behandelt wurden, ergab ein *Follow-up* nach einem Vierteljahr ein schlechteres neurologisches *Outcome* (gemessen anhand der modifizierten Rankin Skala), wenn diese eine Begleitmedikation mit Metamizol erhielten [314]. Eine Fall-Kontroll-Studie mit 3.833 40 bis 90-jährigen Patienten mit Zustand nach (Z.n.) akutem MI und 20.000 Kontrollprobanden ergab hingegen weder Hinweise auf Metamizol-ASS-Interaktion noch erhöhte kardiovaskuläre Mortalität durch die Langzeit-Metamizoleinnahme selbst [333]. Eine Metaanalyse von 79 Studien mit 3716 Metamizol-einnehmenden, deutlich jüngeren (22-64 Jahre) Patienten ohne Eingrenzung des Patientenspektrums, die die kurzzeitige Metamizoleinnahme (<2 Wochen) beleuchtete, verneinte ebenfalls das erhöhte Auftreten von „unerwünschten“ sowie „schwerwiegend

unerwünschten“ Ereignissen unter Metamizoleinnahme verglichen mit den Gruppen Placebo, andere NSAID und Opioide. Die stark uneinheitlichen Endpunktdefinitionen, eine Vielzahl an *Confoundern*, die fehlende Untersuchung von mittel- bis langfristiger Metamizoleinnahme sowie von Komedikation mit ASS oder anderen NSAID mindern jedoch die Aussagekraft der Metaanalyse [334].

Klinische Folgen der Interaktion in der vorliegenden Arbeit

Im Patientenkollektiv in unserer Arbeit zeigte sich in der retrospektiven Datenanalyse zu Komorbiditäten und kardiovaskulären Ereignissen weder ein Unterschied zwischen *Respondern* und *Nonrespondern* (s. Abs. 2.12) noch zwischen Patienten mit oder ohne Metamizol in der Medikation. Es zeigte sich jedoch eine Erhöhung der Inflammationsparameter CrP sowie Leukozytenzahl bei *Nonrespondern*, was mit Verschlechterung des kardiovaskulären *Outcomes* assoziiert sein kann (s. Abs. 4.6.6). CrP war auch bei Patienten mit Metamizol gegenüber denen ohne Metamizol erhöht (Sig. 0,13). Es fehlen in unserer Arbeit prospektive Daten. Insgesamt lässt sich mit dieser Arbeit keine endgültige Aussage treffen zur Morbidität und Mortalität bei ASS-*Nonresponse*.

Umgehung der Interaktion

Die ASS-Metamizol-Interaktion ist wahrscheinlich beeinflussbar [267]. Falls kein anderes Analgetikum verwendet werden kann, kann die ASS-Dosis erhöht und somit Metamizol kompetitiv verdrängt werden. Alternativ kann zeitlich die ASS-Einnahme fest vor die Metamizolgabe gestellt werden [268, 269]. Unter Berücksichtigung der Latenz bis zum Erreichen effektiver Plasmakonzentrationen und der kurzen Plasmahalbwertszeit von ASS [149], könnte für die Metamizolgabe nach der ASS-Einnahme ein zeitlicher Abstand von zwei Stunden oder mehr ausreichend sein. Studiendaten hierzu sowie zu der Frage, ob dies Auswirkungen auf das klinische *Outcome* hat, sind noch zu erheben.

4.6.4 Interagierende Arzneimittel: Beispiel andere NSAID

Die Medikation mit NSAID *per se* kann das kardiovaskuläre Risiko erhöhen. In einer Metaanalyse von Trelle *et al.* wurde eine Erhöhung der Inzidenz kardiovaskulärer Ereignisse um das 1,3-fache ermittelt [333, 335]. Ferner scheint auch die Kombination mit ASS, dauerhaft wie kurzzeitig, zu einem Zuwachs der kardiovaskulären Morbidität und Mortalität zu führen [336, 337]. Für Ibuprofen wurde beschrieben, dass dieses möglicherweise mit dem *Docking* von ASS an der COX-1 konkurriert [338-340]. Zum Teil wurde dies auch bei vorheriger ASS-Einnahme festgestellt [337]. Wegen der kurzen Plasmahalbwertszeit von ASS [341], ist nach der Elimination von Ibuprofen nach etwa einem Tag keine Plättchenhemmung durch ASS mehr zu erwarten [338]. Ohne die irreversible COX-1-Hemmung ist auch hier, ähnlich wie bei Metamizoleinnahme, zu vermuten, dass der kardiovaskulär protektive Effekt von ASS

vermindert ist [139]. Neben Ibuprofen interagieren auch weitere NSAID wie Indometazin und Naproxen mit ASS [44, 342], Diclofenac hingegen weniger [139, 343, 344]. Die Daten zu Coxiben sind uneinheitlich [342, 345, 346].

In der vorliegenden Arbeit fand sich unter der *Nonresponder*-Gruppe ein Patient, der neben ASS dauerhaft Ibuprofen einnahm (s. Abs. 2.12). Bei diesem erfolgte die Einnahme von ASS und Ibuprofen morgens, wobei die Einnahmereihenfolge in den Krankenunterlagen nicht dokumentiert war. Möglicherweise war auch hier eine Interaktion mit dem COX-Inhibitor Ibuprofen die Ursache der ASS-*Nonresponse*.

4.6.5 Interagierende Arzneimittel: Beispiel Protonenpumpeninhibitoren (PPI)

Indikation und Wirkweise

Eine Gefahr der Anwendung von ASS und prinzipiell aller NSAID ist deren Schleimhauttoxizität. Sie manifestiert sich zum einen direkt über die chemischen Eigenschaften wie Azidität und pH-abhängige Löslichkeit [347]. Indirekt ist unter anderem die Hemmung der Produktion mukosaprotektiver Prostaglandine wie PGI₂ und PGE₂ relevant [348]. Diese und andere Mechanismen können zu gastrointestinalen Blutungen durch Mukosaschädigung führen mit einer Inzidenz bis über 60% [349].

In der Folge werden bei Patienten mit ASS-Dauermedikation oft Protonenpumpeninhibitoren (PPI) eingesetzt. Diese inhibieren an den Belegzellen des Magens die H⁺-K⁺-ATPase irreversibel und mindern somit die Säureproduktion [350]. Der negative Effekt der sauren NSAID sowie das Blutungsrisiko soll so gemindert werden [347]. Für die duale Plättchenhemmung wird der Einsatz von PPI nach aktuellen Leitlinien ausdrücklich empfohlen [282]. Es zeigte sich dadurch *Outcome*-Verbesserung sowohl im Vergleich zu Placebo [351-353], als auch gegenüber alternativer Therapieoptionen wie *Helicobacter pylori*-Eradikation allein [354] oder in Kombination mit PPI [355].

PPI und *Nonresponse*

In unserer Arbeit wurden in der *Nonresponder*-Gruppe signifikant (p= 0,037) mehr PPI eingenommen (s. Abs. 2.12). Von 43 Patienten, welche PPI einnahmen waren 17 *Nonresponder* (39,53%). Damit war der Effekt etwas schwächer als bei Metamizol-Komedikation. PPI alkalisieren den Magen-pH [356], was die Resorption von ASS beeinträchtigen kann [141]. Darüber hinaus ist auch die Stabilität von ASS pH-abhängig und bei erhöhtem pH geringer [357]. Wütz *et al.* zeigten bei über 400 Patienten einen negativen Einfluss der Einnahme von PPI auf die Aspirinwirkung (unzureichende Hemmung von Plättchenstimulation und -aggregation) bei KHK [358].

Klinische Bedeutung ASS-PPI-Komedikation

Die klinische Bedeutung der Interaktion für kardiologische Patienten ist umstritten. Lázaro *et al.* brachten sie in einer prospektiven Studie mit über 700 Patienten mit erhöhter kardiovaskulärer Mortalität sowie Verschlechterung der Herzfunktion in Zusammenhang [359]. Auch in einer landesweiten Studie aus Dänemark mit MI-Patienten ergab sich übereinstimmend eine mit ASS-PPI-Komedikation assoziierte erhöhte Morbidität und Mortalität [360].

Auf der anderen Seite gibt es Metaanalysen wie die von Dahal *et al.* oder Fortuna *et al.*, die diesen negativen Zusammenhang nicht feststellen konnten [361, 362]. Ebenso wenig zeigte ihn eine Metaanalyse für die duale Therapie mit ASS und Clopidogrel neben PPI mit 33.492 Patienten aus zwölf retro- und prospektiv angelegten Studien [363].

In unserer Arbeit zeigte sich keine erhöhte Prävalenz von Komorbiditäten oder Inzidenz von kardiovaskulären Ereignissen bei Patienten, die PPI einnahmen. Eine Ausnahme war hier das Vorhofflimmern, welches bei *Respondern* häufiger vorkam. Grundsätzlich sind Vorhofflimmern und PPI-Einnahme bzw. Refluxkrankheit oft miteinander vergesellschaftet [364]. Die Assoziation mit ASS-Response ist in der Literatur nicht eindeutig zu finden.

4.6.6 Inflammation

Inflammation und kardiovaskuläre Krankheiten

Kardiovaskuläre Krankheiten gehen mit inflammatorischen Vorgängen einher [365, 366]. Unklar war lange, ob ein paralleler oder sequenzieller Zusammenhang besteht [367]. In der CANTOS-Studie führte die Drosselung von Inflammationsprozessen mittels eines monoklonalen Antikörpers zu signifikanter Verbesserung des kardiovaskulären *Outcomes* [368]. Viele mit kardiovaskulären Krankheiten assoziierte Verhaltensweisen wie z.B. Nikotinabusus (s. Abs. 4.6.8) und Komorbiditäten tragen zu Inflammation und oxidativem Stress bei [369].

Inflamationsmarker bei kardiovaskulären Krankheiten

Zu den im Rahmen des Inflammationsprozesses freigesetzten endogenen Stoffen zählen die in der Leber produzierten sog. Akute-Phase-Proteine, wie auch das CrP [370]. CrP ist schon seit den Dreißigerjahren als Serummarker bei Infektionserkrankungen geläufig [371, 372] und wird in der klinischen Diagnostik breit eingesetzt [373]. Bei kardiovaskulären Krankheiten hat CrP nicht nur prognostisch Gewicht, sondern ist möglicherweise auch ursächlich beteiligt [367, 374, 375]. Griselli *et al.* stellten 1999 bei Ratten eine Zunahme des Infarktareals um 40% dar, wenn CrP intravenös verabreicht wurde [376]. Zudem sind Leukozyten als Abwehrzellen zentral im Wechselspiel mit CrP am Inflammationsgeschehen beteiligt [377]. Auch Leukozyten haben *Monitoring*- sowie prognostischen Charakter bei kardiovaskulären Krankheiten [378].

Inflammation und ASS-Nonresponse

Innerhalb des Patientengutes dieser Arbeit war auffällig, dass CrP und Leukozytenzahl bei *ASS-Nonrespondern* signifikant höher waren als bei *Respondern* ($p = 0,023$ bzw. $= 0,031$). Die Assoziation von *ASS-Nonresponse* mit inflammatorischen Vorgängen im Gefäßsystem ist bereits bekannt [379]. Sie resultiert unter anderem aus der Thrombozytenaktivierung und -nachbildung während Inflammationsprozessen [128, 380]. Thrombozyten interagieren in diesem Zusammenhang auch mit Monozyten [381]. Vermehrte Nachbildung sowie Aktivierung von Thrombozyten sind bekannte Risikofaktoren für *ASS-Nonresponse* [111, 144, 369]. Hinzu kommen die während Inflammationsvorgängen stark aktiven alternativen Thromboxan-synthesewege. Diese sind vor allem COX-2-vermittelt [146, 147, 382] (s. Abs. 1.6) und laufen meist plättchenextern ab [383]. So wird unter anderem dem unter oxidativem Stress entstehenden Prostaglandin 8-iso-prostaglandin F_{2a} die Desensibilisierung der Hemmung der Thromboxanproduktion durch ASS zugesprochen [384].

4.6.7 Alter und Geschlecht

Auch für die Faktoren weibliches Geschlecht und höheres Lebensalter wurde eine erhöhte Wahrscheinlichkeit von *ASS-Nonresponse* beschrieben [124-126] (s. Abs. 1.6). Dies konnte in dieser Dissertation nicht repliziert werden (s. Abs. 2.12). Insgesamt wurde zwar eine große Altersspanne erfasst (18 - 94 Jahre), jedoch lag der Altersschwerpunkt der erfassten Patienten deutlich über 50 Jahren. Alter und Geschlecht konnten dennoch als *Confounder* für die Korrelation zwischen Aggregation, TXB₂ und MDA-Assay mittels Partialkorrelation ausgeschlossen werden (s. Abs. 3.3). Insgesamt waren Altersverteilung und Anzahl analysierter Patienten allerdings nicht ausreichend, um einen negativen Einfluss des Alters auf *ASS-Nonresponse* sicher zu belegen oder zu verneinen.

4.6.8 Rauchen

Über direkte Endothelschädigung, Aktivierung von Inflammationsvorgängen und Thrombozytenaggregation sowie weitere Faktoren führt Rauchen zu erhöhtem kardiovaskulären Risiko [385, 386]. Schwerwiegende kardiovaskuläre Ereignisse erleiden Raucher etwa doppelt so oft wie Nichtraucher [284]. Je höher der Zigarettenkonsum, umso stärker die negativen Auswirkungen auf das kardiovaskuläre System [387, 388]. Die Aktivitätssteigerung der Thrombozyten kann sowohl zur Resistenz gegenüber natürlich im Körper vorkommenden antiaggregatorischen Mediatoren wie Prostacyclin [389], als auch gegenüber ASS führen [127]. Es resultiert *ASS-Nonresponse*. Li *et al.* zeigten, dass diese jedoch nicht unbedingt allein durch Rauchen, sondern vor allem im Zusammenhang mit KHK auftritt. Auch zeigten sie, dass durch Steigerung der ASS-Dosis die *Nonresponse* überwindbar war [390].

In dem Patientenkollektiv in unserer Arbeit lag der Anteil der Raucher unter den

Nonrespondern nicht höher, sodass sich kein Anhalt für einen Einfluss des Rauchens ergab (s. Abs. 2.12). Dieser Faktor wurde allerdings nur anamnestisch erfragt; ob eine „Dunkelziffer“ bestand, bleibt unklar.

4.6.9 Komorbiditäten

Die mit *Nonresponse* assoziierten Faktoren Diabetes mellitus [131], Niereninsuffizienz [132-134] sowie Aspekte des metabolischen Syndroms wie Hyperlipidämie [130], Adipositas [129], LV-Funktionseinschränkung [125] und Z.n. ACS sind zum Teil auch mit KHK assoziiert (s. Abs. 1.5, 1.6). Kardiovaskuläre Ereignisse können wiederum Folge von *ASS-Nonresponse* sein (s. Abs. 4.7). Die genannten Faktoren lagen in unserer Arbeit nicht häufiger bei *Nonresponse* vor. Die Aussagekraft ist jedoch auch hier durch die geringe Fallzahl eingeschränkt.

4.7 Klinische Relevanz der ASS-Nonresponse

Bisher wurde dargestellt, dass der MDA-Assay viele positive Faktoren für den Einsatz als Thrombozytenfunktionstest hat und sich durch die Vielzahl der mit *Nonresponse* assoziierten Risikofaktoren viele Anlässe zum Testen ergeben würden.

Nun soll, nachdem in Abschnitt 1.8 bereits die klinische Bedeutung der *ASS-Nonresponse* kurz angedeutet wurde, die Studienlage genauer betrachtet werden.

Zunächst bleibt zu ergründen, ob die *in vitro* beobachtete „potentielle“ klinische *Nonresponse* sich auch als „manifeste“ klinische *Nonresponse* mit *Outcome*-Verschlechterung zeigt. Ferner bleibt die Frage offen, ob das *Outcome* sich durch Veränderung der Therapie auf der Grundlage von Thrombozytentestung verbessern lässt.

Klinische Auswirkungen von ASS-Nonresponse

Zu den klinischen Auswirkungen von *ASS-Nonresponse* wurde eine Vielzahl retro- als auch prospektiv *designter* Studien durchgeführt, welche zu sehr unterschiedlichen Ergebnissen gekommen sind. Die Mehrzahl der Studien wurde an Patienten mit perkutaner koronarer Intervention (*percutaneous coronary intervention; PCI*) durchgeführt.

Krasopoulos *et al.*, Sofi *et al.* sowie Snoep *et al.* konnten in drei großen Metaanalysen mit insgesamt mehreren tausend Patienten aus 31 Studien ein insgesamt verschlechtertes *Outcome* von Patienten mit anhand von Thrombozytenfunktionstests nachgewiesener *ASS-Nonresponse* darstellen [391-393]. Darunter waren sowohl kardiologische Patienten mit stabiler KHK oder Akutereignissen wie ACS, als auch kardiochirurgische sowie neurologische Patienten mit zerebrovaskulärer Verschlusskrankheit. Insgesamt ließ sich hier rund ein Viertel der Patienten als *Nonresponder* definieren. Als Laborverfahren kam häufig die LTA sowie der PFA-100® zum Einsatz (s. Tab. 52) [391-393].

	Krasopoulos et al. 2007 [391]	Sofi et al. 2008 [392]	Snoep et al. 2007 [393]
Studien/Autoren (et al.)	Andersen [394] Berrouschot [395] Borna [196] Buchanan [396] Chen [101] Chen [397] Cotter [399] Faraday [401] Grundmann [402] Grottemeyer [403] Gum [175] Gurbel [404] Hobikoglu [406] McCabe [407] Mueller [116] Pamukcu [410] Poston [413] Stejksal [414] Yilmaz [415] Zhang [416]	Andersen [394] Cuisset [400] Fuchs [188] Gum [175] Gianetti [405] Malek [408] Marcucci [409] Pamukcu [410] Pamukcu [411] Poulsen [412] Stejksal [414]	Andersen [394] Buchanan [396] Chen [397] Cheng [398] Cotter [399] Eikelboom [150] Grundmann [402] Grottemeyer [403] Gum [175] Lev [113] Mueller [116] Pamukcu [411] Poston [413] Stejksal [414] Yilmaz [415] Ziegler [417]
Summe Patienten	ca. 2960	ca. 4178	ca. 4072
Patientengut	Z.n. ACS, CABG, CVE, PCI, stabile KHK, pAVK	Z.n. ACS, stabile KHK	Z.n. CABG, CVE, PCI, Stroke, stabile KHK
ASS-Dosis	13 x 75 - 325mg, 1 x 500mg, 6 x + weitere Plättchenhemmer	75 - 325mg	80 - 1500mg (v.a. 80 - 325mg)
Thrombozyten- Test	PFA-100®, LTA, VerifyNow® (RPFA), Bleeding Time, Thromboxan B ₂ im Serum, WBA, TEG, Platelet adhesion	PFA-100®, LTA	PFA-100®, LTA, Thromboxan B ₂ im Serum, VeriFyNow® (RPFA), weitere
Prävalenz ASS- Nonresponse	28%	25%	5-65% (gepooled 27%)

Outcome: erhöhte Inzidenz von:	ACS, CVE, GT, periphere Gefäßokklusion	CVE	ACS, CVE, GT, Restenose/ Reokklusion, Myonekrose, Apoplex/ TIA, Tod
---------------------------------------	--	-----	---

Tab. 52: Metaanalysen mit heterogenen Patientenkollektiven von Krasopoulos *et al.*, Sofi *et al.* und Snoep *et al.* [235, 247].

ACS = Akutes Koronarsyndrom, CABG = Coronary artery bypass graft, CVE = Cardiovascular event, GT = Graft thrombosis, HKU = Herzkatheteruntersuchung, KHK = Koronare Herzkrankheit, MI = Myokardinfarkt, PCI = Percutaneous coronary intervention, pAVK = Periphere arterielle Verschlusskrankheit, TEG = Thromboelastografie, TIA = transitorisch ischämische Attacke, WBA = Whole blood aggregometry, Z.n. = Zustand nach. [mg] = Miligramm, [%] = Prozent.

Daneben gab es in den Jahren bis 2011 die Studien von Frelinger *et al.* [418], Wenaweser *et al.* [419] sowie Rajendran *et al.* [420], die einen tendenziell negativen Einfluss von *Nonresponse* zeigen konnten auf das *Outcome* von Patienten, die eine PCI durchliefen (s. Tab. 53) [419]. Dies beschränkte sich bei Wenaweser *et al.* jedoch auf die Messung von TXB₂ im Serum sowie die PFA-100® Kollagen - ADP CT.

	Wenaweser <i>et al.</i> 2005 [419]	Rajendran <i>et al.</i> 2009 [420]	Frelinger <i>et al.</i> 2002 - 2004 [421]
Summe Patienten	23 (+ 50 Kontrollen)	16 (+ 40 Kontrollen)	682
Jahre	1995 - 2003	2005 - 2009	2002 - 2004
Dauer Nachverfolgung	31 +/- 4 t	2 w	24.8 +/- 0.3 m
Patientengut	Z.n. PCI + Stent	Z.n. PCI + Stent	vor PCI
ASS-Dosis	100mg	100 - 150mg	81 - 325mg
Test	LTA (APACT) mit ADP + ARA	VerifyNow® (RPFA)	TXB ₂ im Serum, ARA-induzierte P-Selectin-Expression, Glycoprotein IIb/IIIa und Leukozyten-Plättchenaggregate; Kollagen-Epinephrin und Kollagen-ADP-induzierte CT im PFA-100®
Prävalenz ASS-Nonresponse	Stentthrombose: 48%, Kontrollen: 32%	Alle: 75%	TXB ₂ : 8% PFA-100® (ADP): 2.8% PFA-100® (Epinephrin): 21,7%
Outcome: erhöhte Inzidenz von:	ST	ST	MACE

Tab. 53: Metaanalysen mit Patienten vor/ nach PCI von Wenaweser *et al.*, Rajendran *et al.*, Frelinger *et al.*

CT = Closure time, m = Monate, MACE = Major adverse cardiovascular events, ST = Stentthrombose, PCI = Percutaneous coronary intervention, t = Tage, w = Wochen, Z.n. = Zustand nach. [mg] = Miligramm, [%] = Prozent.

In einer Studie von Geisler *et al.* mit 1019 symptomatischen KHK-Patienten vor PCI waren die Ergebnisse heterogen; das *Outcome* variierte zeitabhängig und gleichte sich drei Monate nach PCI dem von *Respondern* an [135]. Breet *et al.* zeigten mit 2103 Patienten nach einem Jahr eine erhöhte Mortalität und Morbidität bei *Nonrespondern* nur, wenn die LTA, der VerifyNow®-Assay oder der Plateletworks®-Assay eingesetzt wurden [266]. Park *et al.* konnten bei 2849 Patienten keinen Unterschied im *Outcome* zweieinhalb Jahre nach PCI feststellen [422].

Dagegen kamen in einer Studie mit ähnlich langem *Follow up* und 1789 Patienten die primären Endpunkte bei *Nonresponse* häufiger vor (s. Tab. 54) [423].

	Geisler et al. 2009 [424] (nur Clopidogrel)	Breet et al. 2010 [266]	Park et al. 2011 [422]	Parodi et al. 2011 [423]
Summe Patienten	1019	1069	2849	1789
Jahre	2005 - 2007	2005 - 2007	2006 - 2009	2005 - 2009
Dauer Nachverfolgung	3 m	1 j	2,2 j (Median)	2 j
Patientengut	symptomatische KHK, vor <i>PCI</i>	Vor <i>PCI</i> + Stent	<i>PCI</i>	ACS mit <i>PCI</i>
ASS-Dosis	90% 100mg/d vor <i>PCI</i> , alle 500mg vor <i>PCI</i> , danach alle 100mg/d	80 - 100mg ≥ 10 Tage	<i>Loading</i> 200mg, dann 100-200mg/d mindestens 2 Monate	325mg <i>Loading</i> , dann 325mg/d
Test	LTA	LTA, VerifyNow® (RPFA), Plateletworks®, IMPACT-R®, PFA® COL/ADP, Innovance® PFA P2Y	VerifyNow®	LTA
Prävalenz ASS- Nonresponse	Clopidogrel- <i>Nonresponse</i> : 40-60%	37-43%	58%	14%
Outcome	Erhöhte Inzidenz von früher ST, keine erhöhte Inzidenz von später ST	zum Teil erhöhte Inzidenz von Tod, MI, ST, ischämischer Apoplex. Keine erhöhte Inzidenz von Blutungen	keine erhöhte Inzidenz von ST, MI, Tod	Erhöhte Inzidenz von Tod, MI, AKR, Apoplex, sekundär auch ST

Tab. 54: Studien von Geisler et al., Breet et al., Park et al., und Parodi et al.

ACS = Akutes Koronarsyndrom, AKR = Akute koronare Revaskularisation, j = Jahr, m = Monat, MI = Myokardinfarkt, *PCI* = *Percutaneous coronary intervention*, ST = Stentthrombose.

[mg] = Milligramm, [%] = Prozent.

Später durchgeführte Studien berichten ebenfalls heterogene Ergebnisse. Während bei Mayer et al. bei *Nonresponse*-Patienten nach HKU vermehrt Stentthrombosen auftraten [243], konnten Rangé et al. [425], Legrand et al. [426] und Stone et al. 2013 [427] das vermehrte Auftreten dieser sowie der weiteren Endpunkte nicht beobachten (s. Tab. 55). Ebenso wenig traten die kardiovaskulären Endpunkte häufiger in einer 2012 veröffentlichten Studie von Pettersen et al. bei Patienten mit stabiler KHK, die ASS als Monotherapie einnahmen, auf [428].

	Mayer et al. ISAR-ASPI 2014 [243]	Stone et al. ADAPT-DES 2013 [427]	Legrand et al. (STIB) 2014 [426]	Rangé et al. VERI- FRENCHY 2014 [425]
Summe Patienten	7090	8582	891	1001
Jahre	2007 - 2013	2008 - 2010	2008 - 2010	2008 - 2009
Dauer Nachverfolgung	1 j	1 j	30 t	1 j
Patientengut	Z.n. <i>PCI</i>	KHK, Z.n. <i>PCI</i> + Stent	Stabile KHK, vor <i>PCI</i>	Stabile KHK und NSTEMI
Aspirindosis	1x 500mg, dann 2x 100mg	Mindestens 300mg <i>Loading</i> vor <i>PCI</i> , dann Dauermedikation	300mg <i>Loading</i> vor <i>PCI</i> , danach 80-100mg/d	ASS <i>Loading</i> , dann 75- 160mg/d
Test	Impedanz- Aggregometrie	VerifyNow® (RPFA)	VerifyNow® (RPFA)	VerifyNow® (RPFA)
Prävalenz ASS- Nonresponse	19,9%	5,6% - 7,2%	6,7%	8,6% (Aspirin) - 36% (Clopidogrel)
Outcome	Erhöhte Inzidenz von ST	Keine erhöhte Inzidenz von ST, MI, Tod. Erhöhte Inzidenz von Blutungen	Keine erhöhte Inzidenz von Myonekrose, ST, MI, CVE, Tod	Keine erhöhte Inzidenz von ST, MI, Tod

Tab. 55: Studien von Mayer et al., Stone et al., Legrand et al. und Rangé et al.

CVE = Cardiovascular event, j = Jahre, KHK = Koronare Herzkrankheit, MI = Myokardinfarkt, *NSTEMI* = Nicht-ST-Hebungsinfarkt, *PCI* = Percutaneous coronary intervention, ST = Stentthrombose, t = Tage, Z.n. = Zustand nach.

[mg] = Milligramm, [%] = Prozent.

Die Heterogenität der Studienlage scheint zunächst überraschend. Die uneinheitliche Definition von *Nonresponse*, der Einsatz von unspezifischen Testmethoden, starke Variation von Patientengut, Studiengröße und erfassten *Outcome*-Parametern sowie ungenügende Kontrolle von Störfaktoren könnten Ursachen für die unterschiedlichen Ergebnisse sein [51]. Schlussendlich bleibt damit die Frage offen, ob *ASS-Nonresponse* kurz- und langfristig das *Outcome* von KHK-Patienten beeinflusst. Größere Patientenkollektive sowie die Vereinheitlichung laboranalytischer Parameter und klinischer Endpunkte sind nötig, um die Frage der klinischen Relevanz von *ASS-Nonresponse* zuverlässig zu beantworten und damit den routinemäßigen Einsatz von Thrombozytenfunktionstests zu begründen.

Verbesserung des *Outcomes* durch Therapieumstellung auf der Grundlage von Plättchentestung

Auch wenn die Studienlage zu der klinischen Bedeutung von *Nonresponse* in sich konsistent wäre, so müsste man in einem nächsten Schritt eruieren, ob eine nach Plättchentestung erfolgte Umstellung der Therapie das klinische *Outcome* verbessern könnte [185]. Collet et al. setzten in einer randomisierten Studie mit 2440 Patienten, die sich einer Stentimplantation unterzogen, bei 1213 den VerifyNow®-Assay zur Evaluation der antithrombotischen Therapie

von ASS und Clopidogrel ein. Bei *Nonresponse* wurde diese intensiviert, was jedoch für *Nonresponder* keinen Vorteil brachte in Bezug auf die kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität nach einem Jahr [429]. Eine weitere Studie von Price *et al.* mit 2214 Clopidogrel-*Nonrespondern* nach *Stenting*, bei der ein halbes Jahr nachbeobachtet wurde, lieferte ähnliche Ergebnisse [430]. In der oben genannten Studie von Peterssen *et al.* erwies sich der Wechsel von ASS auf Clopidogrel bei *Nonresponse*-Status ebenfalls als nicht protektiv [428]. Zwei weitere große Studien, die ANTARCTIC und Trigger-PCI Studie, die P2Y₁₂-Hemmer untersuchten und dazu den VerifyNow®-Assay einsetzten, konnten ebenso wenig einen signifikant positiven Effekt der Umstellung der Therapie auf der Grundlage von Plättchentestung darlegen [431, 432]. Sibbing *et al.* evaluierten mit der Multicenter-Studie TROPICAL-ACS unter Anwendung des Multiplate®-Analyzers die mögliche Reduzierung der antithrombotischen Therapie nach HKU. Es wurde eine zwölfmonatige Therapie mit Prasugrel verglichen mit einer je einwöchigen Therapie mit Prasugrel gefolgt von Clopidogrel und einer anschließenden Erhaltungstherapie. Deren Dauer wurde auf der Grundlage von Plättchentestung gesteuert und so gegebenenfalls früher beendet. Es zeigte sich keine Verschlechterung des *Outcomes* in der nach Plättchentestung gesteuerten Gruppe [433]. Insgesamt ist die grundlegende Rationale für den Einsatz von Plättchentestung wie den MDA-Assay; die *Outcome*-Verbesserung der Patienten; derzeit leider noch nicht eindeutig gegeben.

Leitlinien zur Indikationsstellung einer Plättchentestung auf ASS-Nonresponse

Die uneinheitliche Studienlage spiegelt sich auch in den Leitlinien wider. Es finden sich vor allem Angaben zum Umgang mit der antithrombozytären Therapie bei Patienten, die eine *PCI* durchlaufen. Eine routinemäßige Testung wird in den Leitlinien durchweg nicht befürwortet [280, 281]. In Hochrisikosituationen kann jedoch, vor allem was Clopidogrel bzw. die Gruppe der P2Y₁₂-Inhibitoren betrifft, laut einer Metaanalyse von Aradi *et al.* von 2015 mit über 20.000 Patienten [434], eine Plättchentestung hinsichtlich der Verbesserung von Mortalität und Blutungsrisiko von Vorteil sein. Dies umfasst auch bestimmte Situationen in denen es darum geht, Daten zu *Compliance*, Prognose sowie der Möglichkeit einer Reduktion der Plättchenhemmung zu erhalten [281, 282, 435].

4.8 Schlussfolgerungen

Der in dieser Arbeit erstmals an Patienten eingesetzte MDA-Assay könnte ein weiterer Schritt sein, um mehr Klarheit in das intensiv diskutierte Thema *ASS-Nonresponse* zu bringen, welches von der Definition bis zur klinischen Bedeutung umstritten ist. Er könnte mehr Eindeutigkeit darüber schaffen, ob *ASS-Response* vorliegt oder nicht und hat eine Reihe von Eigenschaften, die für den klinischen Einsatz wünschenswert sind (s. Abs. 4.4).

Die gute Qualität des MDA-Assays als *Nonresponse-Assay* lässt sich zum einen durch die übereinstimmenden Ergebnisse mit bewährten Methoden sowie durch die hohe Testgüte (s.

Abs. 3.2, 3.4) belegen. Zudem entsteht MDA in Thrombozyten unmittelbar als Nebenprodukt der Thromboxansynthese und steht damit in sehr enger Beziehung zum pharmakologischen Wirkmechanismus von ASS (s. Abs. 1.3, 1.4). Dies unterscheidet ihn zu anderen weniger spezifischen Methoden wie beispielsweise der Aggregation, die ein eher integraler Parameter der Thrombozytenfunktion ist. Weiterhin steht der MDA-Assay auch in Bezug auf das *Bedside-Potential* aktuellen *Bedside*-Testmethoden wie dem VerifyNow®-Assay nicht nach (s. Abs. 4.4.2). Insbesondere sind hier Zeitersparnis, Kostenersparnis und einfache Durchführung vorteilhaft (s. Abs. 4.4). Auch der MDA-Assay kann *Nonresponse*-Ursachen nicht aufdecken, jedoch zusammen mit der Kenntnis über mit *Nonresponse* assoziierte Faktoren, vor allem *Noncompliance*, Komedikation sowie Komorbiditäten, richtungsweisend sein (s. Abs. 4.6). Ein Messgerät für die thrombozytäre MDA-Freisetzung wird am Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie in Kooperation mit dem Physikalischen Institut der HHU Düsseldorf entwickelt.

Die Frage, ob Thrombozytenfunktions-Assays für das *ASS-Monitoring* wirklich geeignet sind, ist allerdings nicht beantwortet [111, 199]. Außerdem ist die klinische Bedeutung von *ASS-Nonresponse* für das *Outcome* der Patienten unklar (s. Abs 4.7). Derzeit wird daher die individualisierte Überwachung der Plättchenhemmung mittels Plättchenfunktionstests in den Leitlinien nicht routinemäßig empfohlen [280, 281]. Zu uneinheitlich sind die Ergebnisse der Tests untereinander (s. Abs. 4.3) [117, 172, 196, 254, 256, 257]. Gründe dafür könnten sein, dass der *ASS-Nonresponse* sehr unterschiedliche Mechanismen zugrunde liegen und die Definition der *Nonresponse* stark variiert (s. Abs. 1.6, 4.2, 4.6) [200, 257].

Eidesstattliche Versicherung

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

Datum, Vor- und Nachname

Unterschrift

5. Literatur- und Quellenverzeichnis

1. Schnetzer, G.W., et al., Platelets and Thrombogenesis - Current Concepts. *American Heart Journal*, 1972. 83(4): p. 552-+.
2. Twarock, S., et al., Platelet–vessel wall interactions and drug effects. *Pharmacology & Therapeutics*, 2016. 167: p. 74-84.
3. Hynes, R.O., et al., Integrins: a family of cell surface receptors. *Cell*, 1987. 48(4): p. 549-54.
4. Smyth, S.S., et al., Regulation of vascular integrins. *Blood*, 1993. 81(11): p. 2827-43.
5. Farndale, R.W., et al., Collagen-induced platelet activation. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 2006. 36(2): p. 162-165.
6. Nieswandt, B., et al., Evidence for cross-talk between glycoprotein VI and Gi-coupled receptors during collagen-induced platelet aggregation. *Blood*, 2001. 97(12): p. 3829-35.
7. Broos, K., et al., Platelets at work in primary hemostasis. *Blood Rev*, 2011. 25(4): p. 155-67.
8. Ruggeri, Z.M., et al., Platelets in atherothrombosis. *Nat Med*, 2002. 8(11): p. 1227-34.
9. Wachowicz, B., et al., The physiology of blood platelets and changes of their biological activities in multiple sclerosis. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*, 2016. 76(4): p. 269-281.
10. Offermanns, S., et al., Activation of platelet function through G protein-coupled receptors. *Circ Res*, 2006. 99(12): p. 1293-304.
11. de Witt, S.M., et al., Insights into platelet-based control of coagulation. *Thrombosis Research*, 2014. 133: p. S139-S148.
12. Miller, S.B., et al., Prostaglandins in Health and Disease: An Overview. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, 2006. 36(1): p. 37-49.
13. Smith, W.L., et al., Prostaglandins and Leukotrienes A2 - Lennarz, William J, in *Encyclopedia of Biological Chemistry*, M.D. Lane, Editor. 2013, Academic Press: Waltham. p. 581-584.
14. Dubois, R.N., et al., Cyclooxygenase in biology and disease. *FASEB J*, 1998. 12(12): p. 1063-73.
15. Rocca, B., et al., Cyclooxygenases and prostaglandins: shaping up the immune response. *International Immunopharmacology*, 2002. 2(5): p. 603-630.
16. Smith, W.L., et al., Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annu Rev Biochem*, 2000. 69: p. 145-82.
17. Rouzer, C.A., et al., Cyclooxygenases: structural and functional insights. *Journal of Lipid Research*, 2009. 50(Suppl): p. S29-S34.
18. Rouzer, C.A., et al., Mechanism of free radical oxygenation of polyunsaturated fatty acids by cyclooxygenases. *Chem Rev*, 2003. 103(6): p. 2239-304.
19. Simmons, D.L., et al., Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. *Pharmacol Rev*, 2004. 56(3): p. 387-437.
20. Smith, W.L., et al., Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and -2. *J Biol Chem*, 1996. 271(52): p. 33157-60.
21. Schneider, C., et al., Control of prostaglandin stereochemistry at the 15-carbon by cyclooxygenases-1 and -2. A critical role for serine 530 and valine 349. *J Biol Chem*, 2002. 277(1): p. 478-85.
22. Hamberg, M., et al., On the mechanism of the biosynthesis of prostaglandins E-1 and F-1-alpha. *J Biol Chem*, 1967. 242(22): p. 5336-43.
23. Rinaldo-Matthis, A., et al., Structures and mechanisms of enzymes in the leukotriene cascade. *Biochimie*, 2010. 92(6): p. 676-681.
24. Chandrasekharan, N.V., et al., COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. 99(21): p. 13926-31.
25. Hamberg, M., et al., Thromboxanes: a new group of biologically active compounds derived from prostaglandin endoperoxides. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1975. 72(8): p. 2994-8.
26. Belton, O., et al., Cyclooxygenase-1 and -2-dependent prostacyclin formation in patients with atherosclerosis. *Circulation*, 2000. 102(8): p. 840-5.
27. Kobayashi, T., et al., Roles of thromboxane A(2) and prostacyclin in the development of atherosclerosis in apoE-deficient mice. *J Clin Invest*, 2004. 114(6): p. 784-94.
28. McAdam, B.F., et al., Systemic biosynthesis of prostacyclin by cyclooxygenase (COX)-2: the human pharmacology of a selective inhibitor of COX-2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. 96(1): p. 272-7.
29. Majerus, P.W., et al., Arachidonate metabolism in vascular disorders. *J Clin Invest*, 1983. 72(5): p. 1521-5.
30. Fu, J.Y., et al., The induction and suppression of prostaglandin H2 synthase (cyclooxygenase) in human monocytes. *J Biol Chem*, 1990. 265(28): p. 16737-40.
31. Smith, W.L., et al., Bimodal distribution of the prostaglandin I2 synthase antigen in smooth muscle cells. *J Biol Chem*, 1983. 258(9): p. 5922-6.

32. Djellas, Y., et al., Identification of Galpha13 as one of the G-proteins that couple to human platelet thromboxane A2 receptors. *J Biol Chem*, 1999. 274(20): p. 14325-30.
33. Offermanns, S., et al., G proteins of the G12 family are activated via thromboxane A2 and thrombin receptors in human platelets. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. 91(2): p. 504-8.
34. Bergstrom, S., et al., The prostaglandins: a family of biologically active lipids. *Pharmacol Rev*, 1968. 20(1): p. 1-48.
35. Ito, S., et al., Prostaglandin D2: a biochemical perspective. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 1989. 37(4): p. 219-34.
36. Hecker, M., et al., Products, kinetics, and substrate specificity of homogeneous thromboxane synthase from human platelets: development of a novel enzyme assay. *Arch Biochem Biophys*, 1987. 254(1): p. 124-35.
37. Hecker, M., et al., Spectral studies on structure-activity relationships of thromboxane synthesis inhibitors. *European Journal of Biochemistry*, 1986. 157(1): p. 217-223.
38. Zagol-Ikapite, I., et al., Modification of platelet proteins by malondialdehyde: prevention by dicarbonyl scavengers. *J Lipid Res*, 2015. 56(11): p. 2196-205.
39. Violi, F., et al., Relationship between platelet cyclooxygenase pathway and plasma malondialdehyde-like material. *Lipids*, 1985. 20(5): p. 322-324.
40. Janero, D.R., et al., Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radical Biology and Medicine*, 1990. 9(6): p. 515-540.
41. Dahle, L.K., et al., The thiobarbituric acid reaction and the autoxidations of polyunsaturated fatty acid methyl esters. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1962. 98(2): p. 253-261.
42. Ohkawa, H., et al., Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem*, 1979. 95(2): p. 351-8.
43. Bernheim, F., et al., The reaction between thiobarbituric acid and the oxidation products of certain lipides. *J Biol Chem*, 1948. 174(1): p. 257-64.
44. Livio, M., et al., Indomethacin prevents the long-lasting inhibitory effect of aspirin on human platelet cyclo-oxygenase activity. *Prostaglandins*, 1982. 23(6): p. 787-796.
45. Dannhardt, G., et al., Spectrofluorimetric quantification of malondialdehyde for evaluation of cyclooxygenase-1/thromboxane synthase inhibition. *Arch Pharm (Weinheim)*, 1998. 331(11): p. 359-64.
46. Reilly, I.A., et al., Inhibition of thromboxane formation in vivo and ex vivo: implications for therapy with platelet inhibitory drugs. *Blood*, 1987. 69(1): p. 180-6.
47. Frelinger, A.L., et al., Aspirin 'resistance': role of pre-existent platelet reactivity and correlation between tests. *J Thromb Haemost*, 2008. 6(12): p. 2035-44.
48. Cattaneo, M., et al., Aspirin and clopidogrel: efficacy, safety, and the issue of drug resistance. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004. 24(11): p. 1980-7.
49. Schrör, K., et al., [100 years of successful drug discovery. The history of aspirin]. *Pharm Unserer Zeit*, 2009. 38(4): p. 306-13.
50. Schrör, K., et al., Pharmacology and cellular/molecular mechanisms of action of aspirin and non-aspirin NSAIDs in colorectal cancer. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 2011. 25(4-5): p. 473-84.
51. Eikelboom, J.W., et al., Antiplatelet drugs: Antithrombotic Therapy and Prevention of Thrombosis, 9th ed: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines. *Chest*, 2012. 141(2 Suppl): p. e89S-e119S.
52. Fries, S., et al., The cardiovascular pharmacology of COX-2 inhibition. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2005: p. 445-51.
53. Ross, R., et al., 141. Atherosclerosis — an inflammatory disease. *Fibrinolysis*, 1996. 10: p. 44.
54. Sary, H.C., et al., A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1995. 15(9): p. 1512-31.
55. Ouweneel, A.B., et al., Lipoproteins as modulators of atherothrombosis: From endothelial function to primary and secondary coagulation. *Vascular Pharmacology*, 2016. 82: p. 1-10.
56. Falk, E., et al., Coronary plaque disruption. *Circulation*, 1995. 92(3): p. 657-71.
57. Meadows, T.A., et al., Clinical aspects of platelet inhibitors and thrombus formation. *Circ Res*, 2007. 100(9): p. 1261-75.
58. Bhatt, D.L., et al., Role of Antiplatelet Therapy Across the Spectrum of Patients with Coronary Artery Disease. *The American Journal of Cardiology*, 2009. 103(3, Supplement): p. 11A-19A.
59. Buffon, A., et al., Widespread coronary inflammation in unstable angina. *N Engl J Med*, 2002. 347(1): p. 5-12.

60. Mauriello, A., et al., Diffuse and active inflammation occurs in both vulnerable and stable plaques of the entire coronary tree: a histopathologic study of patients dying of acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*, 2005. 45(10): p. 1585-93.
61. Opie, L.H., et al., Angina pectoris: the evolution of concepts. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*, 2004. 9 Suppl 1: p. S3-9.
62. Jones, M., et al., Systematic review: prognosis of angina in primary care. *Fam Pract*, 2006. 23(5): p. 520-8.
63. Bhatt, D.L., et al., Comparative determinants of 4-year cardiovascular event rates in stable outpatients at risk of or with atherothrombosis. *Jama*, 2010. 304(12): p. 1350-7.
64. Hemingway, H., et al., Prospective validity of measuring angina severity with Canadian Cardiovascular Society class: The ACRE study. *Can J Cardiol*, 2004. 20(3): p. 305-9.
65. Bundesärztekammer, et al., Nationale Versorgungsleitlinie Chronische KHK - Langfassung, 3. Auflage. Version 1., 2014, Herbert-Lewin-Platz 1, 10623 Berlin, p.25.
66. Scrutinio, D., et al., Prediction of mortality in mild to moderately symptomatic patients with left ventricular dysfunction. The role of the New York Heart Association classification, cardiopulmonary exercise testing, two-dimensional echocardiography and Holter monitoring. *Eur Heart J*, 1994. 15(8): p. 1089-95.
67. Smith, R.F., et al., Functional capacity in heart failure. Comparison of methods for assessment and their relation to other indexes of heart failure. The V-HeFT VA Cooperative Studies Group. *Circulation*, 1993. 87(6 Suppl): p. Vi88-93.
68. Murray, C.J., et al., Global, regional, and national incidence and mortality for HIV, tuberculosis, and malaria during 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet*, 2014. 384(9947): p. 1005-70.
69. Mozaffarian, D., et al., Heart Disease and Stroke Statistics-2016 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation*, 2016. 133(4): p. e38-360.
70. Murray, C.J.L., et al., Alternative projections of mortality and disability by cause 1990–2020: Global Burden of Disease Study. *The Lancet*, 1997. 349(9064): p. 1498-1504.
71. Plass, D., et al., Trends in disease burden in Germany: results, implications and limitations of the Global Burden of Disease study. *Dtsch Arztebl Int*, 2014. 111(38): p. 629-38.
72. Robert-Koch-Institut, et al., Gesundheit in Deutschland, 2015, Nordufer 20, 13353 Berlin, p.37-49.
73. Statistisches Bundesamt, Krankheitskosten 2015, Gustav-Stresemann-Ring 11, 65189 Wiesbaden, <https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Krankheitskosten/inhalt.html>, acces date 11.06.2021.
74. Assmann, G., et al., Cardiovascular risk assessment in the metabolic syndrome: results from the Prospective Cardiovascular Munster (PROCAM) Study. *Int J Obes (Lond)*, 2008. 32 Suppl 2: p. S11-6.
75. Cornier, M.A., et al., The metabolic syndrome. *Endocr Rev*, 2008. 29(7): p. 777-822.
76. Fihn, S.D., et al., 2012 ACCF/AHA/ACP/AATS/PCNA/SCAI/STS Guideline for the diagnosis and management of patients with stable ischemic heart disease: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines, and the American College of Physicians, American Association for Thoracic Surgery, Preventive Cardiovascular Nurses Association, Society for Cardiovascular Angiography and Interventions, and Society of Thoracic Surgeons. *J Am Coll Cardiol*, 2012. 60(24): p. e44-e164.
77. Bittner, V., et al., Comprehensive Cardiovascular Risk Factor Control Improves Survival: The BARI 2D Trial. *J Am Coll Cardiol*, 2015. 66(7): p. 765-73.
78. International Stroke Trial Collaborative Group, The International Stroke Trial (IST): a randomised trial of aspirin, subcutaneous heparin, both, or neither among 19435 patients with acute ischaemic stroke. *Lancet*, 1997. 349(9065): p. 1569-81.
79. Valgimigli, M., et al., [2017 ESC focused update on dual antiplatelet therapy in coronary artery disease developed in collaboration with EACTS.]. *Kardiol Pol*, 2017. 75(12): p. 1217-1299.
80. Knuuti, J., et al., 2019 ESC Guidelines for the diagnosis and management of chronic coronary syndromes: The Task Force for the diagnosis and management of chronic coronary syndromes of the European Society of Cardiology (ESC). *European Heart Journal*, 2019: p. 436.
81. Collins, R., et al., Aspirin in the primary and secondary prevention of vascular disease: collaborative meta-analysis of individual participant data from randomised trials. *Lancet*, 2009. 373(9678): p. 1849-1860.
82. Antithrombotic Trialists Collaboration, Aspirin in the primary and secondary prevention of vascular disease: collaborative meta-analysis of individual participant data from randomised trials. *Lancet*, 2009. 373(9678): p. 1849-1860.

83. Vandvik, P.O., et al., 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(2 Suppl): p. e637S-e668S.
84. Patrono, C., et al., Low-dose aspirin for the prevention of atherothrombosis. *N Engl J Med*, 2005. 353(22): p. 2373-83.
85. Antithrombotic Trialists Collaboration, Collaborative meta-analysis of randomised trials of antiplatelet therapy for prevention of death, myocardial infarction, and stroke in high risk patients. *BMJ*, 2002. 324(7329): p. 71-86.
86. Patrono, C., et al., Platelet-active drugs : the relationships among dose, effectiveness, and side effects. *Chest*, 2001. 119(1 Suppl): p. 39s-63s.
87. Chen, Z.M., et al., Indications for early aspirin use in acute ischemic stroke : A combined analysis of 40 000 randomized patients from the chinese acute stroke trial and the international stroke trial. On behalf of the CAST and IST collaborative groups. *Stroke*, 2000. 31(6): p. 1240-9.
88. McNeil, J.J., et al., Effect of Aspirin on All-Cause Mortality in the Healthy Elderly. *N Engl J Med*, 2018. 379(16): p. 1519-1528.
89. Gaziano, J.M., et al., Use of aspirin to reduce risk of initial vascular events in patients at moderate risk of cardiovascular disease (ARRIVE): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet*, 2018. 392(10152): p. 1036-1046.
90. Bowman, L., et al., Effects of Aspirin for Primary Prevention in Persons with Diabetes Mellitus. *N Engl J Med*, 2018. 379(16): p. 1529-1539.
91. Guirguis-Blake, J.M., et al., Aspirin for the Primary Prevention of Cardiovascular Events: A Systematic Evidence Review for the U.S. Preventive Services Task Force. *Ann Intern Med*, 2016. 164(12): p. 804-13.
92. Piepoli, M.F., et al., 2016 European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice: The Sixth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice (constituted by representatives of 10 societies and by invited experts)Developed with the special contribution of the European Association for Cardiovascular Prevention & Rehabilitation (EACPR). *European Heart Journal*, 2016. 37(29): p. 2315-2381.
93. Savi, P., et al., Clopidogrel and ticlopidine: P2Y12 adenosine diphosphate-receptor antagonists for the prevention of atherothrombosis. *Semin Thromb Hemost*, 2005. 31(2): p. 174-83.
94. Wiviott, S.D., et al., Prasugrel versus clopidogrel in patients with acute coronary syndromes. *N Engl J Med*, 2007. 357(20): p. 2001-15.
95. CAPRIE Steering Committee, A randomised, blinded, trial of clopidogrel versus aspirin in patients at risk of ischaemic events (CAPRIE). *Lancet*, 1996. 348(9038): p. 1329-39.
96. Wallentin, L., et al., Ticagrelor versus clopidogrel in patients with acute coronary syndromes. *N Engl J Med*, 2009. 361(11): p. 1045-57.
97. Storey, R.F., et al., Inhibition of platelet aggregation by AZD6140, a reversible oral P2Y12 receptor antagonist, compared with clopidogrel in patients with acute coronary syndromes. *J Am Coll Cardiol*, 2007. 50(19): p. 1852-6.
98. Husted, S., et al., Pharmacodynamics, pharmacokinetics, and safety of the oral reversible P2Y12 antagonist AZD6140 with aspirin in patients with atherosclerosis: a double-blind comparison to clopidogrel with aspirin. *Eur Heart J*, 2006. 27(9): p. 1038-47.
99. Damman, P., et al., 2015 ESC guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation: comments from the Dutch ACS working group. *Neth Heart J*, 2017. 25(3): p. 181-185.
100. Yusuf, S., et al., Effects of clopidogrel in addition to aspirin in patients with acute coronary syndromes without ST-segment elevation. *N Engl J Med*, 2001. 345(7): p. 494-502.
101. Chen, Z.M., et al., Addition of clopidogrel to aspirin in 45,852 patients with acute myocardial infarction: randomised placebo-controlled trial. *Lancet*, 2005. 366(9497): p. 1607-21.
102. Sabatine, M.S., et al., Addition of clopidogrel to aspirin and fibrinolytic therapy for myocardial infarction with ST-segment elevation. *N Engl J Med*, 2005. 352(12): p. 1179-89.
103. Mehta, S.R., et al., Short- and long-term oral antiplatelet therapy in acute coronary syndromes and percutaneous coronary intervention. *Journal of the American College of Cardiology*, 2003. 41(4): p. 79s-88s.
104. Steinhubl, S.R., et al., Early and sustained dual oral antiplatelet therapy following percutaneous coronary intervention: a randomized controlled trial. *JAMA*, 2002. 288(19): p. 2411-20.
105. Franchi, F., et al., Antithrombotic therapy for patients with STEMI undergoing primary PCI. *Nat Rev Cardiol*, 2017: p. 361-379.

106. Jneid, H., et al., 2012 ACCF/AHA focused update of the guideline for the management of patients with unstable angina/non-ST-elevation myocardial infarction (updating the 2007 guideline and replacing the 2011 focused update): a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol*, 2012. 60(7): p. 645-81.
107. Qamar, A., et al., Current status of data on cangrelor. *Pharmacol Ther*, 2016. 159: p. 102-9.
108. Morrow, D.A., et al., Vorapaxar in the secondary prevention of atherothrombotic events. *N Engl J Med*, 2012. 366(15): p. 1404-13.
109. Armstrong, P.C., et al., GPIIb/IIIa inhibitors: from bench to bedside and back to bench again. *Thromb Haemost*, 2012. 107(5): p. 808-14.
110. Schäfer, A., et al., [Focused update on dual antiplatelet treatment : ESC guidelines 2017]. *Herz*, 2017. 42(8): p. 739-745.
111. Ben-Dor, I., et al., Assessment, mechanisms, and clinical implication of variability in platelet response to aspirin and clopidogrel therapy, *The American Journal of Cardiology*, 2009. 104(2): p. 227-233.
112. Mason, P.J., et al., Aspirin resistance and atherothrombotic disease. *J Am Coll Cardiol*, 2005. 46(6): p. 986-93.
113. Lev, E.I., et al., Aspirin and clopidogrel drug response in patients undergoing percutaneous coronary intervention: the role of dual drug resistance. *J Am Coll Cardiol*, 2006. 47(1): p. 27-33.
114. Valles, J., et al., Erythrocyte promotion of platelet reactivity decreases the effectiveness of aspirin as an antithrombotic therapeutic modality: the effect of low-dose aspirin is less than optimal in patients with vascular disease due to prothrombotic effects of erythrocytes on platelet reactivity. *Circulation*, 1998. 97(4): p. 350-5.
115. Gori, A.M., et al., Incidence and clinical impact of dual nonresponsiveness to aspirin and clopidogrel in patients with drug-eluting stents. *J Am Coll Cardiol*, 2008. 52(9): p. 734-9.
116. Mueller, M.R., et al., Variable platelet response to low-dose ASA and the risk of limb deterioration in patients submitted to peripheral arterial angioplasty. *Thromb Haemost*, 1997. 78(3): p. 1003-7.
117. Gum, P.A., et al., Profile and prevalence of aspirin resistance in patients with cardiovascular disease. *The American Journal of Cardiology*, 2001. 88(3): p. 230-235.
118. Helgason, C.M., et al., Development of aspirin resistance in persons with previous ischemic stroke. *Stroke*, 1994. 25(12): p. 2331-6.
119. Lim, S.T., et al., Platelet function testing in transient ischaemic attack and ischaemic stroke: A comprehensive systematic review of the literature. *Platelets*, 2015. 26(5): p. 402-12.
120. Wu, K.K., et al., Increased platelet aggregates in patients with transient ischemic attacks. *Stroke*, 1975. 6(5): p. 521-4.
121. Helgason, C.M., et al., Platelet aggregation in patients with atrial fibrillation taking aspirin or warfarin. *Stroke*, 1993. 24(10): p. 1458-61.
122. Helgason, C.M., et al., Aspirin response and failure in cerebral infarction. *Stroke*, 1993. 24(3): p. 345-50.
123. Cuisset, T., et al., Aspirin noncompliance is the major cause of "aspirin resistance" in patients undergoing coronary stenting. *Am Heart J*, 2009. 157(5): p. 889-93.
124. Becker, D.M., et al., Sex differences in platelet reactivity and response to low-dose aspirin therapy. *Jama*, 2006. 295(12): p. 1420-7.
125. Geisler, T., et al., The Residual Platelet Aggregation after Deployment of Intracoronary Stent (PREDICT) score. *J Thromb Haemost*, 2008. 6(1): p. 54-61.
126. Couch, J.R., et al., Platelet aggregation, stroke, and transient ischemic attack in middle-aged and elderly patients. *Neurology*, 1976. 26(9): p. 888-95.
127. Hung, J., et al., Cigarette smoking acutely increases platelet thrombus formation in patients with coronary artery disease taking aspirin. *Circulation*, 1995. 92(9): p. 2432-6.
128. Yalcinkaya, E., et al., Evaluation of inflammatory conditions associated with aspirin resistance. *Upsala Journal of Medical Sciences*, 2014. 119(3): p. 292-293.
129. Angiolillo, D.J., et al., Platelet aggregation according to body mass index in patients undergoing coronary stenting: should clopidogrel loading-dose be weight adjusted? *J Invasive Cardiol*, 2004. 16(4): p. 169-74.
130. Salama, M.M., et al., Resistance to low-dose aspirin therapy among patients with acute coronary syndrome in relation to associated risk factors. *J Clin Pharm Ther*, 2012. 37(6): p. 630-6.
131. Angiolillo, D.J., et al., Platelet function profiles in patients with type 2 diabetes and coronary artery disease on combined aspirin and clopidogrel treatment. *Diabetes*, 2005. 54(8): p. 2430-5.

132. Landray, M.J., et al., Inflammation, endothelial dysfunction, and platelet activation in patients with chronic kidney disease: the chronic renal impairment in Birmingham (CRIB) study. *American Journal of Kidney Diseases*, 2004. 43(2): p. 244-253.
133. Ballow, A., et al., Platelet surface receptor activation in patients with chronic renal failure on hemodialysis, peritoneal dialysis and those with successful kidney transplantation. *Platelets*, 2005. 16(1): p. 19-24.
134. Polzin, A., et al., Antiplatelet effects of aspirin in chronic kidney disease patients. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 2016. 14(2): p. 375-380.
135. Geisler, T., et al., Residual platelet activity is increased in clopidogrel- and ASA-treated patients with coronary stenting for acute coronary syndromes compared with stable coronary artery disease. *Heart*, 2008. 94(6): p. 743-7.
136. Lordkipanidze, M., et al., Genetic determinants of response to aspirin: appraisal of 4 candidate genes. *Thromb Res*, 2011. 128(1): p. 47-53.
137. Sachidanandam, R., et al., A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature*, 2001. 409(6822): p. 928-33.
138. Angiolillo, D.J., et al., Insulin therapy is associated with platelet dysfunction in patients with type 2 diabetes mellitus on dual oral antiplatelet treatment. *J Am Coll Cardiol*, 2006. 48(2): p. 298-304.
139. Catella-Lawson, F., et al., Cyclooxygenase inhibitors and the antiplatelet effects of aspirin. *N Engl J Med*, 2001. 345(25): p. 1809-17.
140. Hohlfeld, T., et al., High on treatment platelet reactivity against aspirin by non-steroidal anti-inflammatory drugs--pharmacological mechanisms and clinical relevance. *Thromb Haemost*, 2013. 109(5): p. 825-33.
141. Giraud, M.N., et al., Effect of omeprazole on the bioavailability of unmodified and phospholipid-complexed aspirin in rats. *Aliment Pharmacol Ther*, 1997. 11(5): p. 899-906.
142. Guthikonda, S., et al., Reticulated platelets and uninhibited COX-1 and COX-2 decrease the antiplatelet effects of aspirin. *J Thromb Haemost*, 2007. 5(3): p. 490-6.
143. Zimmermann, N., et al., Aspirin resistance after coronary artery bypass grafting. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2001. 121(5): p. 982-4.
144. Santilli, F., et al., Platelet activation in obesity and metabolic syndrome. *Obes Rev*, 2012. 13(1): p. 27-42.
145. Cipollone, F., et al., Differential suppression of thromboxane biosynthesis by indobufen and aspirin in patients with unstable angina. *Circulation*, 1997. 96(4): p. 1109-16.
146. Maclouf, J., et al., Eicosanoids and iso-eicosanoids: constitutive, inducible and transcellular biosynthesis in vascular disease. *Thromb Haemost*, 1998. 79(4): p. 691-705.
147. Karim, S., et al., Cyclooxygenase-1 and -2 of endothelial cells utilize exogenous or endogenous arachidonic acid for transcellular production of thromboxane. *J Biol Chem*, 1996. 271(20): p. 12042-8.
148. Santos, M.T., et al., Participation of tyrosine phosphorylation in cytoskeletal reorganization, alpha(IIb)beta(3) integrin receptor activation, and aspirin-insensitive mechanisms of thrombin-stimulated human platelets. *Circulation*, 2000. 102(16): p. 1924-30.
149. Polzin, A., et al., Prevention of dipyron (metamizole) induced inhibition of aspirin antiplatelet effects. *Thromb Haemost*, 2015. 114(1): p. 87-95.
150. Eikelboom, J.W., et al., Aspirin-resistant thromboxane biosynthesis and the risk of myocardial infarction, stroke, or cardiovascular death in patients at high risk for cardiovascular events. *Circulation*, 2002. 105(14): p. 1650-5.
151. Michelson, A.D., et al., Methods for the measurement of platelet function. *Am J Cardiol*, 2009. 103(3 Suppl): p. 20A-26A.
152. Harrison, P., Assessment of platelet function in the laboratory. *Hamostaseologie*, 2009. 29(1): p. 25-31.
153. The British Society for Haematology, Haemostasis and Thrombosis Task Force, Guidelines on platelet function testing. *J Clin Pathol*, 1988. 41(12): p. 1322-30.
154. Cattaneo, M., et al., Laboratory detection of 'aspirin resistance': what test should we use (if any)? *Eur Heart J*, 2007. 28(14): p. 1673-5.
155. Zeidan, A.M., et al., Platelet function testing: state of the art. *Expert Rev Cardiovasc Ther*, 2007. 5(5): p. 955-67.
156. Rodgers, G.M., Overview of platelet physiology and laboratory evaluation of platelet function. *Clin Obstet Gynecol*, 1999. 42(2): p. 349-59.
157. Harrison, P., et al., Comparison of nine platelet function tests used to determine responses to different aspirin dosages in people with type 2 diabetes. *Platelets*, 2018: p. 1-9.
158. Lind, S.E., et al., *The Bleeding Time in Platelets (Michelson, A. D.)*, 2nd edition, ISBN: 9780123693679, Chapter 25. 2007, Academic Press: Burlington. p. 485-493.

159. Rodgers, R.P., et al., A critical reappraisal of the bleeding time. *Semin Thromb Hemost*, 1990. 16(1): p. 1-20.
160. Jennings, L.K., et al., Interspecies comparison of platelet aggregation, LIBS expression and clot retraction: observed differences in GPIIb-IIIa functional activity. *Thromb Haemost*, 1995. 74(6): p. 1551-6.
161. Jennings, I., et al., Platelet function testing: practice among UK National External Quality Assessment Scheme for Blood Coagulation participants, 2006. *J Clin Pathol*, 2008. 61(8): p. 950-4.
162. Born, G.V., Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature*, 1962. 194: p. 927-9.
163. O'Brien J, R., et al., Platelet aggregation: Part I Some effects of the adenosine phosphates, thrombin, and cocaine upon platelet adhesiveness. *J Clin Pathol*, 1962. 15(5): p. 446-52.
164. Cardinal, D.C., et al., The electronic aggregometer: a novel device for assessing platelet behavior in blood. *J Pharmacol Methods*, 1980. 3(2): p. 135-58.
165. Kehrel B. E., et al., State of the art in platelet function testing. *Transfus Med Hemother*, 2013. 40(2): p. 73-86.
166. Milton, J.G., et al., Turbidometric evaluations of platelet activation: Relative contributions of measured shape change, volume, and early aggregation. *Journal of Pharmacological Methods*, 1983. 9(2): p. 101-115.
167. Thompson, N.T., et al., Particle volume changes associated with light transmittance changes in the platelet aggregometer: Dependence upon aggregating agent and effectiveness of stimulus. *Thrombosis Research*, 1986. 41(5): p. 615-626.
168. Ozaki, Y., et al., Detection of platelet aggregates with a particle counting method using light scattering. *Anal Biochem*, 1994. 218(2): p. 284-94.
169. Harrison, P., Progress in the assessment of platelet function. *Br J Haematol*, 2000. 111(3): p. 733-44.
170. Steinhubl, S.R., The VerifyNow System, in *Platelets* (Michelson, A. D.), 2nd edition, ISBN: 9780123693679, Chapter 27. 2007, Elsevier, Academic Press: Burlington. p. 509-518.
171. Lennon, M.J., et al., A comparison of Plateletworks and platelet aggregometry for the assessment of aspirin-related platelet dysfunction in cardiac surgical patients. *J Cardiothorac Vasc Anesth*, 2004. 18(2): p. 136-40.
172. Nicholson, N.S., et al., Assessment of platelet function assays. *Am Heart J*, 1998. 135(5 Pt 2 Su): p. S170-8.
173. Michelson, A.D., et al., Flow Cytometry, in *Platelets*, 2nd Edition, ISBN: 9780123693679, Chapter 30. 2007, Elsevier, Academic Press: Burlington. p. 545-563.
174. Shattil, S.J., et al., Detection of activated platelets in whole blood using activation-dependent monoclonal antibodies and flow cytometry. *Blood*, 1987. 70(1): p. 307-15.
175. Gum, P.A., et al., A prospective, blinded determination of the natural history of aspirin resistance among stable patients with cardiovascular disease. *J Am Coll Cardiol*, 2003. 41(6): p. 961-5.
176. Rajasekhar, D., et al., Platelet hyporeactivity in very low birth weight neonates. *Thromb Haemost*, 1997. 77(5): p. 1002-7.
177. Bouchard, B.A., et al., Interactions Between Platelets and the Coagulation System in *Platelets* (Michelson, A. D.), 2nd edition, ISBN: 9780123693679, Chapter 19. 2007, Elsevier, Academic Press: Burlington. p. 377-402.
178. Tantry, U.S., et al., Overestimation of platelet aspirin resistance detection by thrombelastograph platelet mapping and validation by conventional aggregometry using arachidonic acid stimulation. *J Am Coll Cardiol*, 2005. 46(9): p. 1705-9.
179. Tantry, U.S., et al., Consensus and update on the definition of on-treatment platelet reactivity to adenosine diphosphate associated with ischemia and bleeding. *J Am Coll Cardiol*, 2013. 62(24): p. 2261-73.
180. Tantry, U.S., et al., Antiplatelet drug resistance and variability in response: the role of antiplatelet therapy monitoring. *Curr Pharm Des*, 2013. 19(21): p. 3795-815.
181. Varon, D., et al., A new method for quantitative analysis of whole blood platelet interaction with extracellular matrix under flow conditions. *Thromb Res*, 1997. 85(4): p. 283-94.
182. Varon, D., et al., Impact Cone and Plate(let) Analyzer in *Platelets* (Michelson, A.D.), 2nd Edition, ISBN: 9780123693679, Chapter 29. 2007, Elsevier, Academic Press: Burlington. p. 535-544.
183. Craft, R.M., et al., A novel modification of the Thrombelastograph assay, isolating platelet function, correlates with optical platelet aggregation. *J Lab Clin Med*, 2004. 143(5): p. 301-9.
184. Chakroun, T., et al., In vitro aspirin resistance detected by PFA-100 closure time: pivotal role of plasma von Willebrand factor. *Br J Haematol*, 2004. 124(1): p. 80-5.

185. Hayward, C.P., et al., Platelet function testing: quality assurance. *Semin Thromb Hemost*, 2007. 33(3): p. 273-82.
186. Hayward, C.P., et al., Platelet function analyzer (PFA)-100 closure time in the evaluation of platelet disorders and platelet function. *J Thromb Haemost*, 2006. 4(2): p. 312-9.
187. Hezard, N., et al., Use of the PFA-100 apparatus to assess platelet function in patients undergoing PTCA during and after infusion of c7E3 Fab in the presence of other antiplatelet agents. *Thromb Haemost*, 2000. 83(4): p. 540-4.
188. Fuchs, I., et al., Platelet function in patients with acute coronary syndrome (ACS) predicts recurrent ACS. *J Thromb Haemost*, 2006. 4(12): p. 2547-52.
189. Grosser, T., et al., *Thromboxane Generation in Platelets (Michelson, A. D.)*, 2nd edition, ISBN: 9780123693679, Chapter 31. 2007, Elsevier, Academic Press: Burlington. p. 565-574.
190. Catella, F., et al., Paired analysis of urinary thromboxane B2 metabolites in humans. *Thromb Res*, 1987. 47(6): p. 647-56.
191. Grove, E.L., et al., A comparison of platelet function tests and thromboxane metabolites to evaluate aspirin response in healthy individuals and patients with coronary artery disease. *Thromb Haemost*, 2010. 103(6): p. 1245-53.
192. Hedegaard, S.S., et al., Optical platelet aggregation versus thromboxane metabolites in healthy individuals and patients with stable coronary artery disease after low-dose aspirin administration. *Thromb Res*, 2009. 124(1): p. 96-100.
193. Maree, A.O., et al., Platelet Response to Low-Dose Enteric-Coated Aspirin in Patients With Stable Cardiovascular Disease. *Journal of the American College of Cardiology*, 2005. 46(7): p. 1258-1263.
194. Temperilli, F., et al., Arachidonic acid-stimulated platelet tests: Identification of patients less sensitive to aspirin treatment. *Platelets*, 2015. 26(8): p. 783-7.
195. Mohring, A., et al., Thromboxane Formation Assay to Identify High On-Treatment Platelet Reactivity to Aspirin. *Pharmacology*, 2017. 100(3-4): p. 127-130.
196. Borna, C., et al., Resistance to aspirin is increased by ST-elevation myocardial infarction and correlates with adenosine diphosphate levels. *Thromb J*, 2005. 3: p. 10.
197. Moffat, K.A., et al., Variability in clinical laboratory practice in testing for disorders of platelet function: results of two surveys of the North American Specialized Coagulation Laboratory Association. *Thromb Haemost*, 2005. 93(3): p. 549-53.
198. Bhatt, D.L., et al., Scientific and therapeutic advances in antiplatelet therapy. *Nat Rev Drug Discov*, 2003. 2(1): p. 15-28.
199. Schrör, K., et al., Functional testing methods for the antiplatelet effects of aspirin. *Biomark Med*, 2011. 5(1): p. 31-42.
200. Michelson, A.D., et al., Aspirin resistance: position paper of the Working Group on Aspirin Resistance. *J Thromb Haemost*, 2005. 3(6): p. 1309-11.
201. Mascelli, M.A., et al., Rapid assessment of platelet inhibition using a modified whole blood aggregometer (aggrestat™) in PTCA patients receiving ReoPro™. *Journal of the American College of Cardiology*, 1996. 27(2): p. 361.
202. Patrono, C., et al., Estimated rate of thromboxane secretion into the circulation of normal humans. *J Clin Invest*, 1986. 77(2): p. 590-4.
203. Samuelsson, B., et al., Prostaglandins. *Annu Rev Biochem*, 1975. 44: p. 669-95.
204. Nasrallah, R., et al., Prostaglandins in the kidney: developments since Y2K. *Clin Sci (Lond)*, 2007. 113(7): p. 297-311.
205. Cayman Chemical Company, Thromboxane B2 EIA Kit, Item No. 519031, 2013, 1180 East Ellsworth Road, Ann Arbor, Michigan 48108, USA.
206. Ulehlova, J., et al., The assessment of aspirin resistance by using light transmission and multiple electrode aggregometry. *Int J Lab Hematol*, 2011. 33(3): p. 305-9.
207. Rand, M.L., et al., Platelet function assays. *Transfusion and Apheresis Science*, 2003. 28(3): p. 307-317.
208. Kottke-Marchant, K., et al., The laboratory diagnosis of platelet disorders. *Arch Pathol Lab Med*, 2002. 126(2): p. 133-46.
209. Cattaneo, M., et al., Light transmission aggregometry and ATP release for the diagnostic assessment of platelet function. *Semin Thromb Hemost*, 2009. 35(2): p. 158-67.
210. Ling, L.Q., et al., Evaluation of an automated light transmission aggregometry. *Platelets*, 2017: p. 1-8.
211. Lages, B., et al., Biphasic aggregation responses to ADP and epinephrine in some storage pool deficient platelets: relationship to the role of endogenous ADP in platelet aggregation and secretion. *Thromb Haemost*, 1980. 43(2): p. 147-53.
212. Muck, S., et al., Effects of terbogrel on platelet function and prostaglandin endoperoxide transfer. *European Journal of Pharmacology*, 1998. 344(1): p. 45-48.

213. Crook, D., et al., Comparison of effects of aspirin and indomethacin on human platelet prostaglandin synthetase. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 1977. 36(5): p. 459-463.
214. Lora, M., et al., Systematic pharmacological approach to the characterization of NSAIDs. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 1998. 59(1): p. 55-62.
215. Smith, J.B., et al., Malondialdehyde formation as an indicator of prostaglandin production by human platelets. *J Lab Clin Med*, 1976. 88(1): p. 167-72.
216. McMillan, R.M., et al., Simple, sensitive fluorimetric assay for malondialdehyde production by blood platelets. *Thrombosis Research*, 1977. 11(3): p. 425-428.
217. Berson, S.A., et al., Insulin-I131 metabolism in human subjects: demonstration of insulin binding globulin in the circulation of insulin treated subjects. *J Clin Invest*, 1956. 35(2): p. 170-90.
218. Lequin, R.M., et al., Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Clin Chem*, 2005. 51(12): p. 2415-8.
219. Engvall, E., et al., Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*, 1971. 8(9): p. 871-4.
220. Van Weemen, B.K., et al., Immunoassay using antigen-enzyme conjugates. *FEBS Lett*, 1971. 15(3): p. 232-236.
221. Martin, A.J., et al., A new form of chromatogram employing two liquid phases: A theory of chromatography. 2. Application to the micro-determination of the higher monoamino-acids in proteins. *Biochem J*, 1941. 35(12): p. 1358-68.
222. Meyer, V. R., *Praxis der Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie*, 9th edition, ISBN 978-3-527-30726-5, Wiley-VHC Verlag GmbH & Co KGaA, 2004, Weinheim, p. 15.
223. Zylber Katz, E., et al., Simultaneous determination of dipyrone metabolites in plasma by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 1984. 305: p. 477-484.
224. Jasiocka, A., et al., Pharmacological characteristics of metamizole. *Pol J Vet Sci*, 2014. 17(1): p. 207-14.
225. IBM SPSS Statistics, Support Knowledge Center, © Copyright IBM Corporation 1989, 2021, Armonk, New York, USA.
226. Cardinal, R.N., ANOVA in practice, and complex ANOVA designs. 2004; Available from: http://egret.psychol.cam.ac.uk/psychology/graduate/Guide_to_ANOVA.pdf, acces date 01.05.2021.
227. Levene, H., et al., Robust tests for the equality of variance. In *Contributions to probability and statistics* (Oklin, I., ed.). Stanford University Press, Palo Alto, California, 1960.
228. IBM SPSS Statistics, Bootstrapping 20, © Copyright IBM Corporation 1989, 2011, Armonk, New York, USA, ftp://public.dhe.ibm.com/software/analytics/spss/documentation/statistics/20.0/de/client/Manuals/IBM_SPSS_Bootstrapping.pdf, acces date 29.04.2021.
229. Lüpsen, H. *Varianzanalysen - Prüfen der Voraussetzungen und nichtparametrische Methoden sowie praktische Anwendungen mit R und SPSS*. Version 4.2 22.11.2020; Available from: <http://www.uni-koeln.de/~a0032/statistik/texte/nonpar-anova.pdf>, acces date 20.05.2021.
230. Planing, P., *Statistikgrundlagen*, Hochschule für Technik Stuttgart, Schellingstraße 24, 70174 Stuttgart, www.statistikgrundlagen.de, acces date 20.05.2021.
231. IBM SPSS Statistics, Exakte Tests, © Copyright IBM Corporation 1989, 2021, Armonk, New York, USA, <https://www.ibm.com/docs/de/spss-statistics/SaaS?topic=testing-exact-tests>, acces date 29.04.2021.
232. IBM SPSS Statistics, Bivariate Korrelationen, © Copyright IBM Corporation 1989, 2021, Armonk, New York, USA, <https://www.ibm.com/docs/de/spss-statistics/SaaS?topic=features-bivariate-correlations>, acces date 10.05.2021.
233. IBM SPSS Statistics, Partial rank correlations in SPSS, Document number: 155047, 16 April 2020, © Copyright IBM Corporation 1989, 2021, Armonk, New York, USA, <https://www.ibm.com/support/pages/node/155047>, acces date 10.05.2021.
234. IBM SPSS Statistics, ROC-Analyse, © Copyright IBM Corporation 1989, 2021, Armonk, New York, USA, <https://www.ibm.com/docs/de/spss-statistics/version-missing?topic=features-roc-analysis>, acces date 10.04.2021.
235. Schrör, K., et al., Aspirin "resistance". *Blood Cells Mol Dis*, 2006. 36(2): p. 171-6.
236. Hovens, M.M., et al., Prevalence of persistent platelet reactivity despite use of aspirin: a systematic review. *Am Heart J*, 2007. 153(2): p. 175-81.
237. Lordkipanidze, M., et al., A comparison of six major platelet function tests to determine the prevalence of aspirin resistance in patients with stable coronary artery disease. *Eur Heart J*, 2007. 28(14): p. 1702-8.
238. Cattaneo, M., et al., Resistance to antiplatelet drugs: molecular mechanisms and laboratory detection. *J Thromb Haemost*, 2007. 5 Suppl 1: p. 230-7.

239. Schrör, K., et al., Aspirin resistance - does it clinically matter? *Clin Res Cardiol*, 2006. 95(10): p. 505-10.
240. Mayeux, P.R., et al., The affinities of prostaglandin H2 and thromboxane A2 for their receptor are similar in washed human platelets. *Biochem Biophys Res Commun*, 1988. 157(2): p. 733-9.
241. Accumetrics Inc., *Ultegra® Rapid Platelet Function Assay-ASA (RPFA-ASA)*, 2002, San Diego, CA, https://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/pdf/K012701.pdf, acces date 01.06.2021.
242. Paniccia, R., et al., Assessment of Platelet Function on Whole Blood by Multiple Electrode Aggregometry in High-Risk Patients With Coronary Artery Disease Receiving Antiplatelet Therapy. *American Journal of Clinical Pathology*, 2009. 131(6): p. 834-842.
243. Mayer, K., et al., Aspirin treatment and outcomes after percutaneous coronary intervention: results of the ISAR-ASPI registry. *J Am Coll Cardiol*, 2014. 64(9): p. 863-71.
244. Gum, P.A., et al., Profile and prevalence of aspirin resistance in patients with cardiovascular disease. *Am J Cardiol*, 2001. 88(3): p. 230-5.
245. Helena Laboratories, *Plateletworks®*, Beaumont, Texas USA 77704, <https://www.helena.com/plateletworks.htm>, acces date 11.06.2021.
246. Wu, H.Y., et al., Residual platelet reactivity is preferred over platelet inhibition rate in monitoring antiplatelet efficacy: insights using thrombelastography. *Acta Pharmacol Sin*, 2019.
247. Weber, A.A., et al., Towards a definition of aspirin resistance: a typological approach. *Platelets*, 2002. 13(1): p. 37-40.
248. Lordkipanidzé, M., et al., Aspirin resistance: Truth or dare. *Pharmacology & Therapeutics*, 2006. 112(3): p. 733-743.
249. Zimmermann, N., et al., Functional and biochemical evaluation of platelet aspirin resistance after coronary artery bypass surgery. *Circulation*, 2003. 108(5): p. 542-7.
250. Jackson, S.P., et al., The growing complexity of platelet aggregation. *Blood*, 2007. 109(12): p. 5087-95.
251. Choi, J.-L., et al., Platelet function tests: a review of progresses in clinical application. *BioMed research international*, 2014. 2014: p. 456569-456569.
252. Jilma, B., Platelet function analyzer (PFA-100): a tool to quantify congenital or acquired platelet dysfunction. *J Lab Clin Med*, 2001. 138(3): p. 152-63.
253. Wurtz, M., et al., Rapid evaluation of platelet function using the Multiplate(R) Analyzer. *Platelets*, 2014. 25(8): p. 628-33.
254. Kasmeridis, C., et al., Aspirin and aspirin resistance in coronary artery disease. *Curr Opin Pharmacol*, 2013. 13(2): p. 242-50.
255. Maier, G., *Testgütekriterien*, Springer Gabler Wissenschaftslexikon, 2010, <http://wirtschaftslexikon.gabler.de/Archiv/57491/testquetekriterien-v8.html>, acces date 01.03.21.
256. Harrison, P., et al., Screening for aspirin responsiveness after transient ischemic attack and stroke: comparison of 2 point-of-care platelet function tests with optical aggregometry. *Stroke*, 2005. 36(5): p. 1001-5.
257. Faraday, N., et al., Relation between atherosclerosis risk factors and aspirin resistance in a primary prevention population. *Am J Cardiol*, 2006. 98(6): p. 774-9.
258. Benoit, M., et al., Evaluation and advantages of an automatic magnetic mixing of syringes integrated to a whole blood gas analyser. *Scand J Clin Lab Invest*, 2009. 69(5): p. 628-32.
259. Ganter, M., et al., Continuous intravascular blood gas monitoring: development, current techniques, and clinical use of a commercial device. *British Journal of Anaesthesia*, 2003. 91(3): p. 397-407.
260. Chantarangkul, V., et al., Thrombin generation assessed as endogenous thrombin potential in patients with hyper- or hypo-coagulability. *Haematologica*, 2003. 88(5): p. 547-554.
261. van Diemen, J.J.K., et al., Influence of pre-analytical time and temperature conditions on serum thromboxane B2 levels. *Thromb Res*, 2018. 163: p. 1-5.
262. Petrucci, G., et al., Patient-independent variables affecting the assessment of aspirin responsiveness by serum thromboxane measurement. *Thromb Haemost*, 2016. 116(5): p. 891-896.
263. Sadilkova, L., et al., The effect of selected pre-analytical phase variables on plasma thromboxane A(2) measurements in humans. *Int J Lab Hematol*, 2013. 35(1): p. 92-100.
264. Müller, C., et al., *Thrombozytäre Freisetzung von Malondialdehyd als Index für die Thromboxan-Synthese: Experimentelle Untersuchung an Thrombozytenreichem Plasma gesunder Spender*, in Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie 2018, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
265. Hanna, V.S., et al., Synopsis of arachidonic acid metabolism: A review. *Journal of Advanced Research*, 2018. 11: p. 23-32.

266. Breet, N.J., et al., Comparison of platelet function tests in predicting clinical outcome in patients undergoing coronary stent implantation. *Jama*, 2010. 303(8): p. 754-62.
267. Hohlfeld, T., et al., Pyrazolinone analgesics prevent the antiplatelet effect of aspirin and preserve human platelet thromboxane synthesis. *J Thromb Haemost*, 2008. 6(1): p. 166-73.
268. Papp, J., et al., Antiplatelet effect of acetylsalicylic acid, metamizole and their combination - in vitro and in vivo comparisons. *Clin Hemorheol Microcirc*, 2014. 56(1): p. 1-12.
269. Hohlfeld, T., et al., Inhibition of antiplatelet effects of aspirin by nonopioid analgesics. *Clin Pharmacol Ther*, 2015. 97(2): p. 131-4.
270. Zimmermann, N., et al., Clinical implications of aspirin resistance. *Thromb Haemost*, 2008. 100(3): p. 379-90.
271. Brass, L.F., et al., Chapter 19 - Signal Transduction During Platelet Plug Formation, in *Platelets (Third Edition)*, A.D. Michelson, Editor. 2013, Academic Press. p. 367-398.
272. Hecker, M., et al., Products, kinetics, and substrate specificity of homogeneous thromboxane synthase from human platelets: Development of a novel enzyme assay. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1987. 254(1): p. 124-135.
273. Bunting, S., et al., Arterial walls generate from prostaglandin endoperoxides a substance (prostaglandin X) which relaxes strips of mesenteric and coeliac arteries and inhibits platelet aggregation. *Prostaglandins*, 1976. 12(6): p. 897-913.
274. Marcus, A.J., et al., Synthesis of prostacyclin from platelet-derived endoperoxides by cultured human endothelial cells. *J Clin Invest*, 1980. 66(5): p. 979-86.
275. Grotto, D., et al., Importance of the lipid peroxidation biomarkers and methodological aspects FOR malondialdehyde quantification. *Química Nova*, 2009. 32: p. 169-174.
276. Richard, M.J., et al., Malondialdehyde kit evaluated for determining plasma and lipoprotein fractions that react with thiobarbituric acid. *Clinical Chemistry*, 1992. 38(5): p. 704-709.
277. Benedek, I.H., et al., Variability in the pharmacokinetics and pharmacodynamics of low dose aspirin in healthy male volunteers. *J Clin Pharmacol*, 1995. 35(12): p. 1181-6.
278. Nagelschmitz, J., et al., Pharmacokinetics and pharmacodynamics of acetylsalicylic acid after intravenous and oral administration to healthy volunteers. *Clin Pharmacol*, 2014. 6: p. 51-9.
279. Patrono, C., et al., Low dose aspirin and inhibition of thromboxane B2 production in healthy subjects. *Thromb Res*, 1980. 17(3-4): p. 317-27.
280. Montalescot, G., et al., 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(38): p. 2949-3003.
281. Neumann, F.-J., et al., 2018 ESC/EACTS Guidelines on myocardial revascularization. *European Heart Journal*, 2018: p. ehy394-ehy394.
282. Valgimigli, M., et al., 2017 ESC focused update on dual antiplatelet therapy in coronary artery disease developed in collaboration with EACTS The Task Force for dual antiplatelet therapy in coronary artery disease of the European Society of Cardiology (ESC) and of the European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS). *European Heart Journal*, 2018. 39(3): p. 213-260.
283. Ibanez, B., et al., 2017 ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation The Task Force for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation of the European Society of Cardiology (ESC). *European Heart Journal*, 2018. 39(2): p. 119-177.
284. Piepoli, M.F., et al., 2016 European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice: The Sixth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice (constituted by representatives of 10 societies and by invited experts) Developed with the special contribution of the European Association for Cardiovascular Prevention & Rehabilitation (EACPR). *Eur Heart J*, 2016. 37(29): p. 2315-2381.
285. Roffi, M., et al., 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). *European Heart Journal*, 2016. 37(3): p. 267-315.
286. Levy, G., et al., Clinical pharmacokinetics of aspirin. *Pediatrics*, 1978. 62(5 Pt 2 Suppl): p. 867-72.
287. Patrignani, P., et al., Selective Cumulative Inhibition of Platelet Thromboxane Production by Low-dose Aspirin in Healthy Subjects. *Journal of Clinical Investigation*, 1982. 69(6): p. 1366-1372.
288. Patrono, C., et al., Clinical pharmacology of platelet cyclooxygenase inhibition. *Circulation*, 1985. 72(6): p. 1177-84.

289. Dhanrajani, A., et al., Aspirin Dose in Kawasaki Disease: The Ongoing Battle. *Arthritis Care & Research*, 2018. 70(10): p. 1536-1540.
290. Urso, M.L., et al., Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. *Toxicology*, 2003. 189(1-2): p. 41-54.
291. Azizi, S., et al., A possible reason for the low reproducibility of malondialdehyde determinations in biological samples. *Bioanalysis*, 2016. 8(21): p. 2179-2181.
292. Li, H., et al., Vascular oxidative stress, nitric oxide and atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 2014. 237(1): p. 208-19.
293. Yaghoubi, A., et al., Correlation of Serum Levels of Vitronectin, Malondialdehyde and Hs-CRP With Disease Severity in Coronary Artery Disease. *J Cardiovasc Thorac Res*, 2015. 7(3): p. 113-7.
294. Pucheu, S., et al., Assessment of radical activity during the acute phase of myocardial infarction following fibrinolysis: utility of assaying plasma malondialdehyde. *Free Radic Biol Med*, 1995. 19(6): p. 873-81.
295. Takamura, T.-A., et al., Circulating malondialdehyde-modified low-density lipoprotein (MDA-LDL) as a novel predictor of clinical outcome after endovascular therapy in patients with peripheral artery disease (PAD). *Atherosclerosis*, 2017. 263: p. 192-197.
296. Boukhchache, D., et al., Interactions between prostaglandin precursors during their oxygenation by human platelets. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism*, 1982. 713(2): p. 386-392.
297. Schoenmakers, A.W., et al., Reliability of the Thiobarbituric Acid Test in the Presence of Inorganic Iron. *Nature*, 1966. 210: p. 1153.
298. Siu, G.M., et al., Metabolism of malonaldehyde in vivo and in vitro. *Lipids*, 1982. 17(5): p. 349-55.
299. Shin, B.C., et al., Effects of pH, concentration and aging on the malonaldehyde reaction with proteins. *Lipids*, 1972. 7(4): p. 229-33.
300. Khoubnasabjafari, M., et al., Reliability of malondialdehyde as a biomarker of oxidative stress in psychological disorders. *BiolImpacts : BI*, 2015. 5(3): p. 123-127.
301. Guth, B.D., et al., Pharmacokinetics and pharmacodynamics of terbogrel, a combined thromboxane A(2) receptor and synthase inhibitor, in healthy subjects. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 2004. 58(1): p. 40-51.
302. Gresele, P., et al., Role of proaggregatory and antiaggregatory prostaglandins in hemostasis. Studies with combined thromboxane synthase inhibition and thromboxane receptor antagonism. *J Clin Invest*, 1987. 80(5): p. 1435-45.
303. Gawaz, M., et al., Platelets in inflammation and atherogenesis. *J Clin Invest*, 2005. 115(12): p. 3378-84.
304. Yip, C., et al., Platelets from children are hyper-responsive to activation by thrombin receptor activator peptide and adenosine diphosphate compared to platelets from adults. *Br J Haematol*, 2015. 168(4): p. 526-32.
305. Packham, M.A., et al., Thromboxane A2 causes feedback amplification involving extensive thromboxane A2 formation on close contact of human platelets in media with a low concentration of ionized calcium. *Blood*, 1987. 70(3): p. 647-51.
306. Nakahata, N., et al., Thromboxane A2: Physiology/pathophysiology, cellular signal transduction and pharmacology. *Pharmacology & Therapeutics*, 2008. 118(1): p. 18-35.
307. Biondi-Zoccai, G., et al., Aspirin underuse, non-compliance or cessation: definition, extent, impact and potential solutions in the primary and secondary prevention of cardiovascular disease. *Int J Cardiol*, 2015. 182: p. 148-54.
308. Floyd, C.N., et al., Mechanisms of aspirin resistance. *Pharmacol Ther*, 2014. 141(1): p. 69-78.
309. Patrick, J., et al., A randomized trial to assess the pharmacodynamics and pharmacokinetics of a single dose of an extended-release aspirin formulation. *Postgrad Med*, 2015. 127(6): p. 573-80.
310. Vlahov, V., et al., Pharmacokinetics of metamizol metabolites in healthy subjects after a single oral dose of metamizol sodium. *Eur J Clin Pharmacol*, 1990. 38(1): p. 61-5.
311. Polzin, A., et al., Dipyron (metamizole) can nullify the antiplatelet effect of aspirin in patients with coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol*, 2013. 62(18): p. 1725-6.
312. Anger, K., et al., Platelet Hyporesponsiveness to Acetylsalicylic Acid Can Be Transferred by Plasma in Humans. *Pharmacology*, 2010. 85(4): p. 241-247.
313. Schmitz, A., et al., Dipyron (metamizole) markedly interferes with platelet inhibition by aspirin in patients with acute and chronic pain: A case-control study. *Eur J Anaesthesiol*, 2017. 34(5): p. 288-296.
314. Dannenberg, L., et al., Dipyron comedication in aspirin treated stroke patients impairs outcome. *Vascul Pharmacol*, 2016. 87: p. 66-69.

315. Pierre, S.C., et al., Inhibition of cyclooxygenases by dipyron. *Br J Pharmacol*, 2007. 151(4): p. 494-503.
316. Campos, C., et al., Regulation of cyclooxygenase activity by metamizol. *Eur J Pharmacol*, 1999. 378(3): p. 339-47.
317. Volz, M., et al., Kinetics and metabolism of pyrazolones (propyphenazone, aminopyrine and dipyron). *Br J Clin Pharmacol*, 1980. 10 Suppl 2: p. 299s-308s.
318. Geisslinger, G., et al., The effects on platelet aggregation and prostanoid biosynthesis of two parenteral analgesics: ketorolac tromethamine and dipyron. *Thromb Haemost*, 1996. 76(4): p. 592-7.
319. Ouellet, M., et al., A high level of cyclooxygenase-2 inhibitor selectivity is associated with a reduced interference of platelet cyclooxygenase-1 inactivation by aspirin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. 98(25): p. 14583-8.
320. Hinz, B., et al., Dipyron elicits substantial inhibition of peripheral cyclooxygenases in humans: new insights into the pharmacology of an old analgesic. *Faseb j*, 2007. 21(10): p. 2343-51.
321. Levy, M., et al., Clinical pharmacokinetics of dipyron and its metabolites. *Clin Pharmacokinet*, 1995. 28(3): p. 216-34.
322. Zylber-Katz, E., et al., Formation and excretion of dipyron metabolites in man. *Eur J Clin Pharmacol*, 1992. 42(2): p. 187-91.
323. Moore, R.A., et al., Effects of food on pharmacokinetics of immediate release oral formulations of aspirin, dipyron, paracetamol and NSAIDs - a systematic review. *Br J Clin Pharmacol*, 2015. 80(3): p. 381-8.
324. Wessel, J.C., et al., Characterization of oxalic acid derivatives as new metabolites of metamizol (dipyron) in incubated hen's egg and human. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2006. 28(1-2): p. 15-25.
325. Laporte, J.R., et al., Upper gastrointestinal bleeding in relation to previous use of analgesics and non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Catalan Countries Study on Upper Gastrointestinal Bleeding. Lancet*, 1991. 337(8733): p. 85-9.
326. Abbate, R., et al., Activity of dipyron on intraplatelet arachidonic acid metabolism: An in vitro study. *Pharmacological Research*, 1989. 21(1): p. 43-50.
327. Ponikowski, P., et al., 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failureThe Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC)Developed with the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. *European Heart Journal*, 2016. 37(27): p. 2129-2200.
328. Andrade, S., et al., Safety of metamizole: a systematic review of the literature. *J Clin Pharm Ther*, 2016. 41(5): p. 459-77.
329. Hoffmann, F., et al., Who gets dipyron (metamizole) in Germany? Prescribing by age, sex and region. *J Clin Pharm Ther*, 2015. 40(3): p. 285-8.
330. Berkemeier, F., et al., *Arzneimittel-Atlas 2017*, IGES Institut GmbH, 2017, Friedrichstraße 180, 10117 Berlin, <https://www.arzneimittel-atlas.de/arzneimittel/n02-analgetika/top-10/>, acces date 01.09.20.
331. Garcia, S., et al., Dipyron-induced granulocytopenia: a case for awareness. *Pharmacotherapy*, 2006. 26(3): p. 440-2.
332. Achilles, A., et al., Analgesic medication with dipyron in patients with coronary artery disease: Relation to MACCE. *Int J Cardiol*, 2017.
333. de Abajo, F.J., et al., Risk of nonfatal acute myocardial infarction associated with non-steroidal antiinflammatory drugs, non-narcotic analgesics and other drugs used in osteoarthritis: a nested case-control study. *Pharmacoepidemiol Drug Saf*, 2014. 23(11): p. 1128-38.
334. Kötter, T., et al., Metamizole-Associated Adverse Events: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS ONE*, 2015. 10(4): p. e0122918.
335. Trelle, S., et al., Cardiovascular safety of non-steroidal anti-inflammatory drugs: network meta-analysis. *Bmj*, 2011. 342: p. c7086.
336. Schjerning Olsen, A.M., et al., Duration of treatment with nonsteroidal anti-inflammatory drugs and impact on risk of death and recurrent myocardial infarction in patients with prior myocardial infarction: a nationwide cohort study. *Circulation*, 2011. 123(20): p. 2226-35.
337. Kurth, T., et al., Inhibition of clinical benefits of aspirin on first myocardial infarction by nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Circulation*, 2003. 108(10): p. 1191-5.
338. Rao, G.H., et al., Ibuprofen protects platelet cyclooxygenase from irreversible inhibition by aspirin. *Arteriosclerosis*, 1983. 3(4): p. 383-8.
339. Ikeda, Y., et al., The effect of ibuprofen on platelet function in vivo. *Keio J Med*, 1977. 26(4): p. 213-22.
340. Parks, W.M., et al., Comparative effect of ibuprofen on endothelial and platelet prostaglandin synthesis. *J Pharmacol Exp Ther*, 1981. 219(2): p. 415-9.

341. Patrono, C., Aspirin as an Antiplatelet Drug. *New England Journal of Medicine*, 1994. 330(18): p. 1287-1294.
342. Gladding, P.A., et al., The antiplatelet effect of six non-steroidal anti-inflammatory drugs and their pharmacodynamic interaction with aspirin in healthy volunteers. *Am J Cardiol*, 2008. 101(7): p. 1060-3.
343. Hersh, E.V., et al., Adverse drug interactions involving common prescription and over-the-counter analgesic agents. *Clinical Therapeutics*, 2007. 29(11): p. 2477-2497.
344. Schuijt, M.P., et al., The interaction of ibuprofen and diclofenac with aspirin in healthy volunteers. *Br J Pharmacol*, 2009. 157(6): p. 931-4.
345. Rimon, G., et al., Coxibs interfere with the action of aspirin by binding tightly to one monomer of cyclooxygenase-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. 107(1): p. 28-33.
346. Renda, G., et al., Celecoxib, ibuprofen, and the antiplatelet effect of aspirin in patients with osteoarthritis and ischemic heart disease. *Clin Pharmacol Ther*, 2006. 80(3): p. 264-74.
347. Bjorkman, D.J., Nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced gastrointestinal injury. *The American Journal of Medicine*, 1996. 101: p. S25-S32.
348. Wallace, J.L., Prostaglandins, NSAIDs, and gastric mucosal protection: why doesn't the stomach digest itself? *Physiol Rev*, 2008. 88(4): p. 1547-65.
349. Iwamoto, J., et al., Clinical features of gastroduodenal injury associated with long-term low-dose aspirin therapy. *World Journal of Gastroenterology : WJG*, 2013. 19(11): p. 1673-1682.
350. Shin, J.M., et al., Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the proton pump inhibitors. *J Neurogastroenterol Motil*, 2013. 19(1): p. 25-35.
351. Scheiman, J.M., et al., Prevention of peptic ulcers with esomeprazole in patients at risk of ulcer development treated with low-dose acetylsalicylic acid: a randomised, controlled trial (OBERON). *Heart*, 2011. 97(10): p. 797-802.
352. Sugano, K., et al., Lansoprazole for secondary prevention of gastric or duodenal ulcers associated with long-term low-dose aspirin therapy: results of a prospective, multicenter, double-blind, randomized, double-dummy, active-controlled trial. *J Gastroenterol*, 2011. 46(6): p. 724-35.
353. Yeomans, N., et al., Efficacy of esomeprazole (20 mg once daily) for reducing the risk of gastroduodenal ulcers associated with continuous use of low-dose aspirin. *Am J Gastroenterol*, 2008. 103(10): p. 2465-73.
354. Chan, F.K., et al., Preventing recurrent upper gastrointestinal bleeding in patients with *Helicobacter pylori* infection who are taking low-dose aspirin or naproxen. *N Engl J Med*, 2001. 344(13): p. 967-73.
355. Lai, K.C., et al., Lansoprazole for the prevention of recurrences of ulcer complications from long-term low-dose aspirin use. *N Engl J Med*, 2002. 346(26): p. 2033-8.
356. Schubert-Zsilavec, M., Magensäureblocker im breiten Einsatz, *Pharmazeutische-Zeitung*, Vol. 32, 2013, Avoxa – Mediengruppe Deutscher Apotheker GmbH, Apothekerhaus Eschborn, Carl-Mannich-Straße 26 | 65760 Eschborn, <https://www.pharmazeutische-zeitung.de/ausgabe-322013/protonenpumpenhemmer-magensaeureblocker-im-breiten-einsatz/>, acces date 05.04.21.
357. Dressman, J.B., et al., Biowaiver monograph for immediate-release solid oral dosage forms: acetylsalicylic acid. *J Pharm Sci*, 2012. 101(8): p. 2653-67.
358. Wurtz, M., et al., The antiplatelet effect of aspirin is reduced by proton pump inhibitors in patients with coronary artery disease. *Heart*, 2010. 96(5): p. 368-71.
359. Pello Lazaro, A.M., et al., Use of Proton-Pump Inhibitors Predicts Heart Failure and Death in Patients with Coronary Artery Disease. *PLoS One*, 2017. 12(1): p. e0169826.
360. Charlot, M., et al., Proton pump inhibitor use and risk of adverse cardiovascular events in aspirin treated patients with first time myocardial infarction: nationwide propensity score matched study. *The BMJ*, 2011. 342: p. d2690.
361. Dahal, K., et al., Efficacy and Safety of Proton Pump Inhibitors in the Long-Term Aspirin Users: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Am J Ther*, 2017. 24(5): p. e559-e569.
362. Fortuna, L.A., et al., Proton pump inhibitor use by aspirin-treated coronary artery disease patients is not associated with increased risk of cardiovascular events. *Eur Heart J Cardiovasc Pharmacother*, 2016. 2(1): p. 13-9.
363. Hu, W., et al., Influence of proton pump inhibitors on clinical outcomes in coronary heart disease patients receiving aspirin and clopidogrel: A meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*, 2018. 97(3): p. e9638.
364. Maruyama, T., et al., Association of atrial fibrillation and gastroesophageal reflux disease: Natural and therapeutic linkage of the two common diseases. *Journal of arrhythmia*, 2018. 35(1): p. 43-51.

365. Ross, R., et al., Atherosclerosis is an inflammatory disease. *Am Heart J*, 1999. 138(5 Pt 2): p. S419-20.
366. Ludewig, B., et al., Arterial Inflammation and Atherosclerosis. *Trends in Cardiovascular Medicine*, 2002. 12(4): p. 154-159.
367. Koenig, W., et al., High-sensitivity C-reactive protein and atherosclerotic disease: from improved risk prediction to risk-guided therapy. *Int J Cardiol*, 2013. 168(6): p. 5126-34.
368. Lorenzatti, A., et al., Role of Anti-inflammatory Interventions in Coronary Artery Disease: Understanding the Canakinumab Anti-inflammatory Thrombosis Outcomes Study (CANTOS). *Eur Cardiol*, 2018. 13(1): p. 38-41.
369. Davi, G., et al., Platelet activation in obese women: role of inflammation and oxidant stress. *Jama*, 2002. 288(16): p. 2008-14.
370. Gabay, C., et al., Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N Engl J Med*, 1999. 340(6): p. 448-54.
371. Abernethy, T.J., et al., The occurrence during acute infections of a protein not normally present in the blood : I. distribution of the reactive protein in patients' sera and the effect of calcium on the flocculation reaction with C-Polysaccharide of pneumococcus *J Exp Med*, 1941. 73(2): p. 173-82.
372. Tillett, W.S., et al., Serological reactions in pneumonia with a non-protein somatic fraction of pneumococcus. *The Journal of Experimental Medicine*, 1930. 52(4): p. 561-571.
373. Pepys, M.B., et al., C-reactive protein: a critical update. *J Clin Invest*, 2003. 111(12): p. 1805-12.
374. Casas, J.P., et al., C-reactive protein and coronary heart disease: a critical review. *J Intern Med*, 2008. 264(4): p. 295-314.
375. Tsimikas, S., et al., C-reactive protein and other emerging blood biomarkers to optimize risk stratification of vulnerable patients. *J Am Coll Cardiol*, 2006. 47(8 Suppl): p. C19-31.
376. Griselli, M., et al., C-reactive protein and complement are important mediators of tissue damage in acute myocardial infarction. *J Exp Med*, 1999. 190(12): p. 1733-40.
377. Sproston, N.R., et al., Role of C-Reactive Protein at Sites of Inflammation and Infection. *Frontiers in Immunology*, 2018. 9: p. 754.
378. Chmielewski, P.P., et al., Elevated leukocyte count as a harbinger of systemic inflammation, disease progression, and poor prognosis: a review. *Folia Morphol (Warsz)*, 2018. 77(2): p. 171-178.
379. Du, G., et al., A brief review on the mechanisms of aspirin resistance. *International Journal of Cardiology*, 2016. 220: p. 21-26.
380. Dovizio, M., et al., Role of platelets in inflammation and cancer: novel therapeutic strategies. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2014. 114(1): p. 118-27.
381. Freedman, J.E., et al., Platelet-monocyte aggregates: bridging thrombosis and inflammation. *Circulation*, 2002. 105(18): p. 2130-2.
382. Larsen, S.B., et al., Reduced antiplatelet effect of aspirin is associated with low-grade inflammation in patients with coronary artery disease. *Thromb Haemost*, 2013. 109(5): p. 920-9.
383. Yassine, H.N., et al., Clinical Determinants of Aspirin Resistance in Diabetes. *Diabetes research and clinical practice*, 2010. 90(1): p. e19-e21.
384. Cipollone, F., et al., Oxidant stress and aspirin-insensitive thromboxane biosynthesis in severe unstable angina. *Circulation*, 2000. 102(9): p. 1007-13.
385. Klein, L.W., et al., The Correlation Between Cigarette Smoking and Other Risk Factors With Coronary Stenosis Composition. *J Invasive Cardiol*, 2015. 27(8): p. 359-61.
386. Benowitz, N.L., Cigarette smoking and cardiovascular disease: pathophysiology and implications for treatment. *Prog Cardiovasc Dis*, 2003. 46(1): p. 91-111.
387. Jee, S.H., et al., Smoking and atherosclerotic cardiovascular disease in men with low levels of serum cholesterol: the Korea Medical Insurance Corporation Study. *Jama*, 1999. 282(22): p. 2149-55.
388. Qiao, Q., et al., Mortality from all causes and from coronary heart disease related to smoking and changes in smoking during a 35-year follow-up of middle-aged Finnish men. *Eur Heart J*, 2000. 21(19): p. 1621-6.
389. Burghuber, O.C., et al., Platelet sensitivity to prostacyclin in smokers and non-smokers. *Chest*, 1986. 90(1): p. 34-8.
390. Li, W.J., et al., Cigarette smoking inhibits the anti-platelet activity of aspirin in patients with coronary heart disease. *Chin Med J (Engl)*, 2011. 124(10): p. 1569-72.
391. Krasopoulos, G., et al., Aspirin "resistance" and risk of cardiovascular morbidity: systematic review and meta-analysis. *Bmj*, 2008. 336(7637): p. 195-8.
392. Sofi, F., et al., Residual platelet reactivity on aspirin therapy and recurrent cardiovascular events--a meta-analysis. *Int J Cardiol*, 2008. 128(2): p. 166-71.

393. Snoep, J.D., et al., Association of laboratory-defined aspirin resistance with a higher risk of recurrent cardiovascular events: a systematic review and meta-analysis. *Arch Intern Med*, 2007. 167(15): p. 1593-9.
394. Andersen, K., et al., Aspirin non-responsiveness as measured by PFA-100 in patients with coronary artery disease. *Thromb Res*, 2002. 108(1): p. 37-42.
395. Berrouschot, J., et al., Aspirin resistance in secondary stroke prevention. *Acta Neurol Scand*, 2006. 113(1): p. 31-5.
396. Buchanan, M.R., et al., Results of the BRAT study--a pilot study investigating the possible significance of ASA nonresponsiveness on the benefits and risks of ASA on thrombosis in patients undergoing coronary artery bypass surgery. *Can J Cardiol*, 2000. 16(11): p. 1385-90.
397. Chen, W.-H., et al., Aspirin resistance is associated with a high incidence of myonecrosis after non-urgent percutaneous coronary intervention despite clopidogrel pretreatment. *Journal of the American College of Cardiology*, 2004. 43(6): p. 1122-1126.
398. Cheng, X., et al., Prevalence, profile, predictors, and natural history of aspirin resistance measured by the ultegra rapid platelet function assay-asain patients with coronary artery disease, DOI 10.5353/th_b3370870, in HKU Theses Online (HKUTO). 2005, The University of Hong Kong (Pokfulam, Hong Kong).
399. Cotter, G., et al., Lack of aspirin effect: aspirin resistance or resistance to taking aspirin? *Am Heart J*, 2004. 147(2): p. 293-300.
400. Cuisset, T., et al., High post-treatment platelet reactivity identified low-responders to dual antiplatelet therapy at increased risk of recurrent cardiovascular events after stenting for acute coronary syndrome. *J Thromb Haemost*, 2006. 4(3): p. 542-9.
401. Faraday, N., et al., Prospective evaluation of the relationship between platelet-leukocyte conjugate formation and recurrent myocardial ischemia in patients with acute coronary syndromes. *Platelets*, 2004. 15(1): p. 9-14.
402. Grundmann, K., et al., Aspirin non-responder status in patients with recurrent cerebral ischemic attacks. *J Neurol*, 2003. 250(1): p. 63-6.
403. Grottemeyer, K.H., et al., Two-year follow-up of aspirin responder and aspirin non responder. A pilot-study including 180 post-stroke patients. *Thromb Res*, 1993. 71(5): p. 397-403.
404. Gurbel, P.A., et al., The stratification of platelet reactivity and activation in patients with stable coronary artery disease on aspirin therapy. *Thromb Res*, 2003. 112(1-2): p. 9-12.
405. Gianetti, J., et al., Platelet activation predicts recurrent ischemic events after percutaneous coronary angioplasty: a 6 months prospective study. *Thromb Res*, 2006. 118(4): p. 487-93.
406. Hobikoglu, G.F., et al., High frequency of aspirin resistance in patients with acute coronary syndrome. *Tohoku J Exp Med*, 2005. 207(1): p. 59-64.
407. McCabe, D.J., et al., Assessment of the antiplatelet effects of low to medium dose aspirin in the early and late phases after ischaemic stroke and TIA. *Platelets*, 2005. 16(5): p. 269-80.
408. Malek, L.A., et al., Persistent platelet activation is related to very early cardiovascular events in patients with acute coronary syndromes. *Kardiol Pol*, 2007. 65(1): p. 40-5; discussion 46.
409. Marcucci, R., et al., Usefulness of aspirin resistance after percutaneous coronary intervention for acute myocardial infarction in predicting one-year major adverse coronary events. *Am J Cardiol*, 2006. 98(9): p. 1156-9.
410. Pamukcu, B., et al., Aspirin-resistant platelet aggregation in a cohort of patients with coronary heart disease. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 2007. 18(5): p. 461-5.
411. Pamukcu, B., et al., The role of aspirin resistance on outcome in patients with acute coronary syndrome and the effect of clopidogrel therapy in the prevention of major cardiovascular events. *J Thromb Thrombolysis*, 2006. 22(2): p. 103-10.
412. Poulsen, T.S., et al., Prevalence of aspirin resistance in patients with an evolving acute myocardial infarction. *Thromb Res*, 2007. 119(5): p. 555-62.
413. Poston, R.S., et al., Endothelial injury and acquired aspirin resistance as promoters of regional thrombin formation and early vein graft failure after coronary artery bypass grafting. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2006. 131(1): p. 122-30.
414. Stejskal, D., et al., Aspirin resistance measured by cationic propyl gallate platelet aggregometry and recurrent cardiovascular events during 4 years of follow-up. *Eur J Intern Med*, 2006. 17(5): p. 349-54.
415. Yilmaz, M.B., et al., Late saphenous vein graft occlusion in patients with coronary bypass: possible role of aspirin resistance. *Thromb Res*, 2005. 115(1-2): p. 25-9.
416. Zhang, Y., et al., [Study on the relationship between aspirin resistance and incidence of myonecrosis after non-emergent percutaneous coronary intervention]. *Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi*, 2005. 33(8): p. 695-9.
417. Ziegler, S., et al., Monitoring of antiplatelet therapy with the PFA-100 in peripheral angioplasty patients. *Platelets*, 2002. 13(8): p. 493-7.

418. Frelinger, A.L., 3rd, et al., Residual arachidonic acid-induced platelet activation via an adenosine diphosphate-dependent but cyclooxygenase-1- and cyclooxygenase-2-independent pathway: a 700-patient study of aspirin resistance. *Circulation*, 2006. 113(25): p. 2888-96.
419. Wenaweser, P., et al., Stent Thrombosis Is Associated With an Impaired Response to Antiplatelet Therapy. *Journal of the American College of Cardiology*, 2005. 45(11): p. 1748-1752.
420. Rajendran, S., et al., High on treatment platelet reactivity and stent thrombosis. *Heart Lung Circ*, 2011. 20(8): p. 525-31.
421. Frelinger, A.L., 3rd, et al., Association of cyclooxygenase-1-dependent and -independent platelet function assays with adverse clinical outcomes in aspirin-treated patients presenting for cardiac catheterization. *Circulation*, 2009. 120(25): p. 2586-96.
422. Park, D.W., et al., A point-of-care platelet function assay and C-reactive protein for prediction of major cardiovascular events after drug-eluting stent implantation. *J Am Coll Cardiol*, 2011. 58(25): p. 2630-9.
423. Parodi, G., et al., High residual platelet reactivity after clopidogrel loading and long-term cardiovascular events among patients with acute coronary syndromes undergoing pci. *JAMA*, 2011. 306(11): p. 1215-1223.
424. Geisler, T., et al., Early but not late stent thrombosis is influenced by residual platelet aggregation in patients undergoing coronary interventions. *Eur Heart J*, 2010. 31(1): p. 59-66.
425. Rangé, G., et al., Thrombotic and bleeding events after coronary stenting according to clopidogrel and aspirin platelet reactivity: VerifyNow French Registry (VERIFRENCHY). *Archives of Cardiovascular Diseases*, 2014. 107(4): p. 225-235.
426. Legrand, V., et al., Platelet reactivity and cardiovascular events after percutaneous coronary intervention in patients with stable coronary artery disease: the Stent Thrombosis In Belgium (STIB) trial. *EuroIntervention*, 2014. 10(2): p. 204-11.
427. Stone, G.W., et al., Platelet reactivity and clinical outcomes after coronary artery implantation of drug-eluting stents (ADAPT-DES): a prospective multicentre registry study. *Lancet*, 2013. 382(9892): p. 614-23.
428. Pettersen, A.-Å.R., et al., High On-Aspirin Platelet Reactivity and Clinical Outcome in Patients With Stable Coronary Artery Disease: Results From ASCET (Aspirin Nonresponsiveness and Clopidogrel Endpoint Trial). *Journal of the American Heart Association: Cardiovascular and Cerebrovascular Disease*, 2012. 1(3): p. e000703.
429. Collet, J.P., et al., Bedside monitoring to adjust antiplatelet therapy for coronary stenting. *N Engl J Med*, 2012. 367(22): p. 2100-9.
430. Price, M.J., et al., Standard- vs high-dose clopidogrel based on platelet function testing after percutaneous coronary intervention: the GRAVITAS randomized trial. *Jama*, 2011. 305(11): p. 1097-105.
431. Cayla, G., et al., Platelet function monitoring to adjust antiplatelet therapy in elderly patients stented for an acute coronary syndrome (ANTARCTIC): an open-label, blinded-endpoint, randomised controlled superiority trial. *Lancet*, 2016. 388(10055): p. 2015-2022.
432. Trenk, D., et al., A randomized trial of prasugrel versus clopidogrel in patients with high platelet reactivity on clopidogrel after elective percutaneous coronary intervention with implantation of drug-eluting stents: results of the TRIGGER-PCI (Testing Platelet Reactivity In Patients Undergoing Elective Stent Placement on Clopidogrel to Guide Alternative Therapy With Prasugrel) study. *J Am Coll Cardiol*, 2012. 59(24): p. 2159-64.
433. Sibbing, D., et al., Guided de-escalation of antiplatelet treatment in patients with acute coronary syndrome undergoing percutaneous coronary intervention (TROPICAL-ACS): a randomised, open-label, multicentre trial. *Lancet*, 2017. 390(10104): p. 1747-1757.
434. Aradi, D., et al., Bleeding and stent thrombosis on P2Y12-inhibitors: collaborative analysis on the role of platelet reactivity for risk stratification after percutaneous coronary intervention. *Eur Heart J*, 2015. 36(27): p. 1762-71.
435. Sousa-Uva, M., et al., 2018 ESC/EACTS Guidelines on myocardial revascularization. *Eur J Cardiothorac Surg*, 2018: p. 407–477.

6. Anhang

6.1 ROC-Analyse MDA-Assay

6.1.1 Koordinaten der ROC-Kurve

ASS 0 μ M ARA			ASS 30 μ M ARA		
Positiv wenn größer oder gleich ^a	Sensitivität	1 - Spezifität	Positiv wenn größer oder gleich ^a	Sensitivität	1 - Spezifität
1,88	1,000	1,000	1,61	1,000	1,000
3,12	1,000	0,975	3,06	1,000	0,975
5,80	1,000	0,950	3,93	1,000	0,950
9,22	1,000	0,925	5,41	1,000	0,925
10,46	1,000	0,900	6,56	1,000	0,900
11,43	1,000	0,875	6,65	1,000	0,875
13,16	1,000	0,850	7,00	1,000	0,850
14,61	1,000	0,825	7,90	1,000	0,825
16,22	1,000	0,800	8,53	1,000	0,800
18,41	1,000	0,775	8,94	1,000	0,775
19,80	1,000	0,750	9,29	1,000	0,750
20,70	1,000	0,725	10,18	1,000	0,725
22,29	1,000	0,700	11,58	1,000	0,700
23,44	1,000	0,675	12,43	1,000	0,675
24,12	1,000	0,650	14,98	1,000	0,650
25,90	1,000	0,625	17,40	1,000	0,625
27,62	1,000	0,600	17,69	1,000	0,600
29,48	1,000	0,575	19,61	1,000	0,575
32,28	1,000	0,550	22,06	1,000	0,550
34,98	1,000	0,525	22,93	1,000	0,525
39,14	1,000	0,500	23,86	0,952	0,525
42,42	1,000	0,475	25,33	0,952	0,500
43,09	1,000	0,450	26,23	0,952	0,475
44,22	1,000	0,425	26,62	0,952	0,450
45,51	1,000	0,400	27,23	0,952	0,425
47,21	1,000	0,375	28,41	0,952	0,400
51,30	1,000	0,350	30,58	0,952	0,375
54,68	1,000	0,325	32,32	0,952	0,350
56,93	1,000	0,300	36,92	0,952	0,325
59,30	1,000	0,275	43,15	0,952	0,300
61,92	1,000	0,250	48,11	0,952	0,275
63,93	1,000	0,225	51,95	0,952	0,250
66,18	1,000	0,200	56,16	0,952	0,225
69,97	1,000	0,175	59,61	0,952	0,200

72,03	1,000	0,150	60,68	0,905	0,200
85,95	1,000	0,125	64,34	0,905	0,175
103,42	1,000	0,100	67,29	0,905	0,150
116,13	1,000	0,075	73,79	0,905	0,125
128,07	1,000	0,050	83,38	0,857	0,125
143,34	0,952	0,050	91,17	0,810	0,125
176,03	0,952	0,025	97,01	0,810	0,100
208,96	0,905	0,025	100,00	0,762	0,100
255,66	0,905	0,000	105,80	0,762	0,075
331,40	0,857	0,000	119,85	0,762	0,050
380,59	0,810	0,000	150,58	0,714	0,050
504,77	0,762	0,000	191,14	0,714	0,025
631,99	0,714	0,000	224,63	0,714	0,000
657,78	0,667	0,000	255,95	0,667	0,000
685,14	0,619	0,000	302,70	0,619	0,000
698,96	0,571	0,000	352,07	0,571	0,000
710,65	0,524	0,000	435,75	0,524	0,000
759,23	0,476	0,000	515,66	0,476	0,000
827,12	0,429	0,000	534,81	0,429	0,000
873,32	0,381	0,000	564,40	0,381	0,000
908,45	0,333	0,000	609,72	0,333	0,000
938,64	0,286	0,000	676,26	0,286	0,000
982,08	0,238	0,000	756,06	0,238	0,000
1017,68	0,190	0,000	807,43	0,190	0,000
1459,08	0,143	0,000	837,92	0,143	0,000
1900,10	0,095	0,000	916,78	0,095	0,000
2112,70	0,048	0,000	1231,34	0,048	0,000
2322,69	0,000	0,000	1478,74	0,000	0,000

Tab. 56: Koordinaten der ROC-Kurve für den MDA-Assay aus der Aggregation mit ARA. Fett markiert: *Cut-off* bei 0µM ASS: ≥ 128,07nM bzw. ≥ 255,66nM MDA.

ASS 100µM ARA			3µM Terbogrel ARA		
Positiv wenn größer oder gleich ^a	Sensitivität	1 - Spezifität	Positiv wenn größer oder gleich ^a	Sensitivität	1 - Spezifität
4,15	1,000	1,000	2,18	1,000	1,000
5,29	1,000	0,975	3,47	1,000	0,975
6,05	1,000	0,950	3,99	1,000	0,950
6,86	1,000	0,925	5,21	0,952	0,950
7,16	1,000	0,900	6,78	0,905	0,950
7,38	1,000	0,875	6,35	0,905	0,925
7,62	1,000	0,850	6,51	0,905	0,900
7,97	1,000	0,825	7,05	0,905	0,875
8,20	1,000	0,800	7,65	0,905	0,850

8,36	1,000	0,775	8,38	0,905	0,825
8,68	1,000	0,750	9,00	0,905	0,800
9,17	1,000	0,725	9,23	0,905	0,775
9,55	1,000	0,700	9,40	0,857	0,775
9,74	1,000	0,675	9,44	0,857	0,750
11,03	1,000	0,650	9,49	0,857	0,725
12,70	1,000	0,625	9,66	0,810	0,725
13,43	1,000	0,600	10,13	0,762	0,725
15,38	1,000	0,575	10,54	0,714	0,725
20,01	1,000	0,550	10,74	0,714	0,700
24,37	1,000	0,525	10,95	0,714	0,675
26,39	1,000	0,500	11,15	0,667	0,675
26,98	0,952	0,500	11,83	0,667	0,650
27,39	0,952	0,475	12,69	0,667	0,625
27,91	0,952	0,450	13,33	0,667	0,600
29,68	0,952	0,425	13,67	0,667	0,575
33,00	0,952	0,400	13,95	0,667	0,550
37,44	0,952	0,375	15,50	0,667	0,525
41,74	0,905	0,375	16,83	0,619	0,525
44,27	0,905	0,350	16,99	0,619	0,500
46,58	0,905	0,325	19,25	0,619	0,475
48,78	0,857	0,325	22,38	0,619	0,450
50,29	0,857	0,300	24,84	0,619	0,425
52,31	0,857	0,275	26,56	0,571	0,425
54,52	0,857	0,250	27,17	0,524	0,425
56,68	0,810	0,250	28,67	0,524	0,400
59,41	0,810	0,225	31,53	0,524	0,375
62,45	0,762	0,225	34,37	0,524	0,350
67,06	0,762	0,200	36,09	0,524	0,325
70,30	0,762	0,175	37,38	0,476	0,325
75,27	0,714	0,175	38,15	0,476	0,300
82,03	0,714	0,150	40,14	0,476	0,275
87,31	0,714	0,125	43,17	0,476	0,250
95,48	0,667	0,125	46,63	0,476	0,225
100,97	0,667	0,100	49,18	0,476	0,200
104,55	0,667	0,075	51,18	0,476	0,175
136,45	0,667	0,050	55,87	0,476	0,150
172,50	0,619	0,050	60,54	0,476	0,125
202,61	0,619	0,025	64,04	0,429	0,125
231,59	0,619	0,000	68,56	0,381	0,125
255,73	0,571	0,000	73,91	0,381	0,100
325,86	0,524	0,000	77,16	0,333	0,100
393,29	0,476	0,000	79,02	0,286	0,100
460,04	0,429	0,000	84,58	0,238	0,100

521,62	0,381	0,000	91,32	0,238	0,075
547,84	0,333	0,000	98,69	0,190	0,075
604,62	0,286	0,000	105,58	0,143	0,075
655,27	0,238	0,000	114,84	0,143	0,050
685,51	0,190	0,000	156,36	0,095	0,050
766,58	0,143	0,000	194,81	0,048	0,050
843,10	0,095	0,000	201,09	0,048	0,025
930,31	0,048	0,000	263,06	0,048	0,000
1002,73	0,000	0,000	324,11	0,000	0,000

Tab. 57: Weiterführung der Koordinaten der ROC-Kurve für den MDA-Assay aus der Aggregation mit ARA.

6.1.2 Berechnung der Testgütemaße für ausgewählte *Cut-offs* der ROC-Analyse für den MDA-Assay aus der Aggregation mit ARA

Cut-off: $\geq 128,07\text{nM}$ MDA

$Accuracy = (TP + TN) / (TP + TN + FP + FN) = (21 + 38) / (21 + 38 + 2 + 0) = 59 / 61 = 0,967$
$Precision = TP / (TP + FP) = 21 / (21 + 2) = 0,913$
Sensitivität = $TP / (TP + FN) = 21 / (21 + 0) = 1$
Spezifität = $TN / (TN + FP) = 38 / (38 + 2) = 0,950$
Richtig-Positiv-Rate = $Recall = TP / (TP + FN) = 21 / (21 + 0) = 1$
Falsch-Positiv-Rate = $FP / (FP + TN) = 2 / (2 + 38) = 0,050$
Richtig-Negativ-Rate = $TN / (TN + FP) = 38 / (38 + 2) = 0,950$
Falsch-Negativ-Rate = $FN / (FN + TP) = 0 / (0 + 21) = 0$
$F1\ Score = 2 * (Recall * Precision) / (Recall + Precision) = 2 (1 \times 0,913) / (1 + 0,913) = 0,955$

Tab. 58: Erläuterung zur Berechnung der Testgütemaße für den *Cut-off*: 128,07nM MDA

Cut-off: $\geq 255,66\text{nM}$ MDA

$Accuracy = (TP + TN) / (TP + TN + FP + FN) = (19 + 40) / (19 + 40 + 0 + 2) = 59 / 61 = 0,967$
$Precision = TP / (TP + FP) = 19 / (19 + 0) = 1$
Sensitivität = $TP / (TP + FN) = 19 / (19 + 2) = 19 / 21 = 0,905$
Spezifität = $TN / (TN + FP) = 40 / (40 + 0) = 1$
Richtig-Positiv-Rate = $Recall = TP / (TP + FN) = 19 / (19 + 2) = 19 / 21 = 0,905$
Falsch-Positiv-Rate = $FP / (FP + TN) = 0 / (0 + 40) = 0$
Richtig-Negativ-Rate = $TN / (TN + FP) = 40 / (40 + 0) = 1$
Falsch-Negativ-Rate = $FN / (FN + TP) = 2 / (2 + 19) = 0,095$
$F1\ Score = 2 * (Recall * Precision) / (Recall + Precision) = 2 (0,905 \times 1) / (0,905 + 1) = 0,950$

Tab. 59: Erläuterung zur Berechnung der Testgütemaße für den *Cut-off*: 255,66nM MDA

6.2 ROC-Analyse TXB₂-Assay

6.2.1 Koordinaten der ROC-Kurve

0μMASS ARA			30μMASS ARA		
Positiv wenn größer oder gleich ^a	Sensitivität	1 - Spezifität	Positiv wenn größer oder gleich ^a	Sensitivität	1 - Spezifität
-1,00	1,000	1,000	-1,00	1,000	1,000
0,06	1,000	0,925	0,05	1,000	0,875
0,12	1,000	0,900	0,11	1,000	0,850
0,14	1,000	0,875	0,12	1,000	0,825
0,17	1,000	0,850	0,14	1,000	0,800
0,21	1,000	0,825	0,16	1,000	0,750
0,23	1,000	0,775	0,18	1,000	0,675
0,25	1,000	0,750	0,20	1,000	0,650
0,27	1,000	0,725	0,23	1,000	0,625
0,29	1,000	0,700	0,27	1,000	0,600
0,34	1,000	0,675	0,29	1,000	0,575
0,40	1,000	0,650	0,37	1,000	0,550
0,49	1,000	0,625	0,45	0,952	0,550
0,61	1,000	0,600	0,46	0,952	0,525
0,69	1,000	0,575	0,47	0,952	0,500
0,74	1,000	0,550	0,51	0,952	0,475
0,77	1,000	0,525	0,54	0,952	0,450
0,81	1,000	0,500	0,58	0,952	0,425
0,82	1,000	0,475	0,61	0,952	0,400
0,84	1,000	0,450	0,67	0,952	0,375
0,87	1,000	0,425	0,91	0,952	0,350
1,03	1,000	0,400	1,18	0,952	0,325
1,29	1,000	0,375	1,48	0,952	0,300
1,47	1,000	0,350	1,71	0,952	0,275
1,74	1,000	0,325	1,84	0,952	0,250
2,14	1,000	0,300	2,01	0,952	0,225
2,71	1,000	0,275	2,13	0,952	0,200
3,11	1,000	0,250	2,63	0,952	0,175
3,91	1,000	0,225	3,26	0,952	0,150
5,94	1,000	0,200	3,61	0,905	0,150
7,67	1,000	0,175	3,96	0,857	0,150
9,83	0,952	0,175	4,24	0,857	0,125
12,61	0,952	0,150	4,57	0,810	0,125
16,69	0,952	0,125	5,17	0,810	0,100
19,73	0,952	0,100	7,15	0,762	0,100
24,09	0,952	0,075	8,82	0,762	0,075
33,58	0,952	0,050	8,88	0,762	0,050

44,96	0,905	0,050	28,70	0,762	0,025
60,40	0,905	0,025	48,99	0,714	0,025
82,04	0,905	0,000	51,52	0,714	0,000
112,74	0,857	0,000	66,14	0,667	0,000
140,19	0,810	0,000	80,42	0,619	0,000
158,29	0,762	0,000	101,45	0,571	0,000
181,51	0,714	0,000	122,12	0,524	0,000
207,36	0,667	0,000	141,26	0,476	0,000
224,56	0,619	0,000	165,92	0,429	0,000
233,53	0,571	0,000	183,73	0,381	0,000
247,75	0,524	0,000	222,54	0,333	0,000
265,00	0,476	0,000	256,10	0,286	0,000
318,05	0,429	0,000	272,67	0,238	0,000
411,36	0,381	0,000	326,85	0,190	0,000
460,16	0,333	0,000	370,27	0,143	0,000
480,69	0,286	0,000	386,60	0,095	0,000
514,41	0,238	0,000	530,11	0,048	0,000
542,23	0,190	0,000	658,37	0,000	0,000
557,40	0,143	0,000			
593,28	0,095	0,000			
668,83	0,048	0,000			
712,20	0,000	0,000			

Tab. 60: Koordinaten der ROC-Kurve für den TXB₂-Assay aus der Aggregation mit ARA. Fett markiert: Cut-off bei 0µM ASS: ≥ 7,67ng/ml TXB₂ bzw. ≥ 82,04ng/ml TXB₂

100µM ASS			3µM Terbogrel		
Positiv wenn größer oder gleich ^a	Sensitivität	1 - Spezifität	Positiv wenn größer oder gleich ^a	Sensitivität	1 - Spezifität
-1,00	1,000	1,000	-1,00	1,000	1,000
0,05	1,000	0,850	0,04	0,857	0,550
0,10	1,000	0,800	0,09	0,857	0,475
0,11	1,000	0,775	0,10	0,857	0,375
0,12	1,000	0,675	0,11	0,857	0,350
0,13	1,000	0,650	0,12	0,857	0,275
0,14	1,000	0,625	0,14	0,857	0,250
0,17	1,000	0,600	0,15	0,857	0,225
0,21	1,000	0,575	0,17	0,857	0,200
0,22	1,000	0,550	0,18	0,857	0,175
0,24	1,000	0,525	0,19	0,857	0,150
0,27	1,000	0,500	0,20	0,857	0,100
0,35	1,000	0,475	0,22	0,857	0,075
0,41	1,000	0,450	0,25	0,810	0,075
0,46	1,000	0,425	0,27	0,762	0,075
0,51	1,000	0,400	0,30	0,762	0,050

0,54	1,000	0,375	0,31	0,714	0,050
0,75	0,952	0,375	0,32	0,667	0,050
0,97	0,952	0,350	0,34	0,619	0,050
1,02	0,952	0,325	0,36	0,619	0,025
1,17	0,905	0,325	0,43	0,571	0,025
1,46	0,905	0,300	0,50	0,524	0,025
1,70	0,857	0,300	0,59	0,476	0,025
2,01	0,857	0,250	0,75	0,381	0,025
2,36	0,857	0,225	0,87	0,333	0,025
2,48	0,810	0,225	1,13	0,333	0,000
2,79	0,810	0,200	1,37	0,286	0,000
3,41	0,810	0,175	1,48	0,238	0,000
3,85	0,762	0,175	2,20	0,190	0,000
4,09	0,762	0,150	3,76	0,143	0,000
4,26	0,714	0,150	5,71	0,095	0,000
4,75	0,714	0,125	28,95	0,048	0,000
5,26	0,714	0,100	52,15	0,000	0,000
5,41	0,714	0,075			
5,77	0,714	0,050			
7,96	0,667	0,050			
15,94	0,619	0,050			
24,89	0,619	0,025			
40,52	0,571	0,025			
57,67	0,571	0,000			
85,71	0,524	0,000			
126,08	0,476	0,000			
151,96	0,429	0,000			
168,85	0,381	0,000			
195,91	0,333	0,000			
219,08	0,286	0,000			
226,55	0,238	0,000			
232,04	0,190	0,000			
258,71	0,143	0,000			
343,73	0,095	0,000			
406,63	0,048	0,000			
410,31	0,000	0,000			

Tab. 61: Weiterführung der Koordinaten der ROC-Kurve für den TXB₂-Assay aus der Aggregation mit ARA.

6.2.2 Berechnung der Testgütemaße für ausgewählte *Cut-offs* der ROC-Analyse für den TXB₂-Assay aus der Aggregation mit ARA

Cut-off: $\geq 7,67$ ng/ml TXB₂

$Acurracy = (TP + TN) / (TP + TN + FP + FN) = (21 + 33) / (21 + 33 + 7 + 0) = 0,885$
$Precision = TP / (TP + FP) = 21 / (21 + 7) = 0,75$
Sensitivität = $TP / (TP + FN) = 21 / (21 + 0) = 1$
Spezifität = $TN / (TN + FP) = 33 / (33 + 7) = 0,825$
Richtig-Positiv-Rate = $Recall = TP / (TP + FN) = 21 / (21 + 0) = 1$
Falsch-Positiv-Rate = $FP / (FP + TN) = 7 / (7 + 33) = 0,175$
Richtig-Negativ-Rate = $TN / (TN + FP) = 33 / (33 + 7) = 0,825$
Falsch-Negativ-Rate = $FN / (FN + TP) = 0 / (0 + 21) = 0$
$F1\ Score = 2 * (Recall * Precision) / (Recall + Precision) = 2 (1 \times 0,75) / (1 + 0,75) = 0,857$

Tab. 62: Erläuterung zur Berechnung der Testgütemaße für den *Cut-off: $\geq 7,67$ ng/ml TXB₂*

Cut-off: $\geq 82,04$ ng/ml TXB₂

$Acurracy = (TP + TN) / (TP + TN + FP + FN) = (19 + 40) / (19 + 40 + 0 + 2) = 0,967$
$Precision = TP / (TP + FP) = 19 / (19 + 0) = 1$
Sensitivität = $TP / (TP + FN) = 19 / (19 + 2) = 0,905$
Spezifität = $TN / (TN + FP) = 40 / (40 + 0) = 1$
Richtig-Positiv-Rate = $Recall = TP / (TP + FN) = 19 / (19 + 2) = 0,905$
Falsch-Positiv-Rate = $FP / (FP + TN) = 0 / (0 + 40) = 0$
Richtig-Negativ-Rate = $TN / (TN + FP) = 40 / (40 + 0) = 1$
Falsch-Negativ-Rate = $FN / (FN + TP) = 2 / (2 + 19) = 0,095$
$F1\ Score = 2 * (Recall * Precision) / (Recall + Precision) = 2 (0,9047 \times 1) / (0,9047 + 1) = 0,950$

Tab. 63: Erläuterung zur Berechnung der Testgütemaße für den *Cut-off: $\geq 82,04$ ng/ml TXB₂*

7. Danksagung

Ich bedanke mich für die Unterstützung durch meinen Doktorvater Prof. Dr. Thomas Hohlfeld, meinen Betreuer PD Dr. Amin Polzin, die Labormitarbeiter des Instituts für Pharmakologie und klinische Pharmakologie allen voran Frau Kirsten Bartkowski, die Mitarbeiter der Klinik für Kardiologie, Pneumologie und Angiologie der Uniklinik Düsseldorf sowie durch die Patienten und Probanden.