Aus der Klinik für Kardiologie, Pneumologie und Angiologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. Malte Kelm

# Acetylsalicylsäure: Thrombozytenfunktionshemmung und antiinflammatorische Wirkung in Prävention und Therapie des akuten Myokardinfarktes

Dissertation

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

vorgelegt von

Kajetan Trojovsky

2023

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

gez.:

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

Erstgutachter: PD Dr. med. Amin Polzin

Zweitgutachter: PD Dr. med. Christian Buchbender

**Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:**

Dannenberg, L., D. Metzen, S. Zako, M. Pöhl, P. Mourikis, C. Helten, **K. Trojovsky**, *et al.* "Enhanced Platelet Reactivity under Aspirin Medication and Major Adverse Cardiac and Cerebrovascular Events in Patients with Coronary Artery Disease." *Pharmacology* 105, no. 1-2 (October 23 2020)

**Zusammenfassung:**

Acetylsalicylsäure (ASS) ist eines der ältesten und weitest verbreiteten Medikamente der Welt. Es wirkt sowohl antiinflammatorisch als auch thrombozytenfunktionshemmend. Vor allem die thrombozytenfunktionshemmende Wirkung wird in der Prävention kardiovaskulärer Ereignisse gerne eingesetzt. Nichtsdestotrotz wird es zunehmend ersetzt durch andere Thrombozytenfunktionshemmer. Kürzlich konnte Naguib eine Verkleinerung der Infarktgröße von Herzen im akuten Myokardinfarkt durch ASS zeigen. Ziel dieser Arbeit ist es, den Mechanismus dieser bisher nicht beschriebenen ASS Wirkung zu eruieren.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden 72 Patienten und Patientinnen unter ASS Therapie prospektiv auf kardiovaskuläre Ereignisse untersucht. Die Patienten und Patientinnen mit kardiovaskulären Ereignissen wurden mit Patienten und Patientinnen ohne kardiovaskulärer Ereignisse hinsichtlich der Thrombozytenfunktion, gemessen mittels Lichttransmissionsaggregometrie, verglichen. Hier zeigte sich eine signifikant höhere Thrombozytenfunktion bei den Patienten und Patientinnen, welche ein kardiovaskuläres Ereignis erlitten. An 649 Patienten und Patientinnen wurde daraufhin retrospektiv untersucht, ob eine verminderte Wirkung von ASS auf die Thrombozytenfunktion zu einem geringeren Senken von C-reaktivem Protein (CRP) als unabhängigen, kardiovaskulären Risikoindikator führt. Hier zeigte sich, dass Patienten und Patientinnen, welche eine höhere Thrombozytenfunktion unter ASS haben, auch erhöhte Spiegel von CRP im Blut aufweisen.

In einem weiteren Schritt wurde im Maus-Tiermodell untersucht, ob ASS im akuten Myokardinfarkt (AMI) rein thrombozytenabhängig protektiv wirkt oder ob die antiinflammatorischen Eigenschaften von ASS überwiegen. Zunächst wurde Natriumsalicylat (NaSS) als nicht Thrombozyten inhibitorisches Salicylat von ASS im AMI untersucht. Es zeigte sich kein Benefit auf die Infarktgröße von Mäusen. Im nächsten Schritt wurden Mäuse mittels anti-thrombozytärer-Antikörper depletiert, sodass quasi keine Thrombozyten mehr vorlagen. Depletierte Mäuse wiesen signifikant kleinere Infarktareale auf als Mäuse, welche nicht depletiert wurden. Dies legt eine schädliche Wirkung von Thrombozyten im AMI nahe. Im letzten Schritt wurde zusätzlich zur Depletion ASS im Myokardinfarkt beigesetzt. Hier zeigte sich kein zusätzlicher Benefit von ASS, wenn es zusätzlich zur Depletion verabreicht wurde. Insgesamt zeigen die Daten dieser Arbeit, dass sowohl die Verminderung von kardiovaskulären Ereignissen als auch die kardioprotektive Wirkung im AMI durch ASS thrombozytenabhängig sind und nicht primär über die antiinflammatorische Wirkung erklärt werden können.

**Abstract (English):**

Acetylsalicylic acid (ASS) is one of the oldest and most widely used drugs in the world. It has both anti-inflammatory and platelet function inhibitory effects. The platelet function inhibitory effect in particular is important in the prevention of cardiovascular events. Nevertheless, it is increasingly being replaced by other platelet function inhibitors. Recently, Naguib demonstrated a reduction in infarct size of mouse hearts after acute myocardial infarction by ASS. The aim of this work is to elicit the pathomechanism of this previously undescribed ASS effect.

In the first part of this work, 72 patients under ASS therapy were prospectively studied for cardiovascular events. Patients with cardiovascular events were compared with patients without cardiovascular events regarding platelet function measured by light transmission aggregometry. Significantly higher platelet function was found in patients who had a cardiovascular event. A retrospective study was then performed on 649 patients to determine whether a reduced effect of ASS on platelet function leads to a lower reduction in C-reactive protein (CRP) as an independent cardiovascular risk indicator. It was shown that patients who had a higher platelet function under ASS therapy also had higher levels of CRP in their blood.

In a further step, the mouse animal model was used to investigate whether ASS has a purely platelet-dependent protective effect in acute myocardial infarction (AMI) or whether the anti-inflammatory properties of ASS predominate. First, sodium salicylate was investigated as a nonplatelet inhibitory salicylate of ASS in AMI. No benefit on infarct size of mice was shown. In the next step, mice were depleted using anti-platelet antibodies so that virtually no platelets were present anymore. It was found that depleted mice had significantly smaller infarct areas than mice that were not depleted. This suggests a deleterious effect of platelets in AMI. In the final step, in addition to depletion, ASS was added to the myocardial infarction. Here, there was no additional benefit of ASS when it was administered in addition to depletion. Overall, the data of this work show, that both the reduction of cardiovascular events and the cardioprotective effect in AMI by ASS are platelet-dependent and cannot be explained primarily by the anti-inflammatory effect.

# Inhalt


1 Einleitung ..... 10
1.1 Herzinfarkt nach Definition der *World Health Organization* (WHO) ..... 10
1.2 Pathophysiologie des akuten Myokardinfarktes ..... 10
1.3 Therapie des AMI ..... 11
1.3.1 Akuttherapie ..... 11
1.3.2 Medikamentöse Therapie ..... 13
1.3.3 Revaskularisierungstherapie ..... 14
1.4 Herzinsuffizienz nach AMI ..... 15
1.5 Thrombozyten als *target* ..... 15
1.6 Inflammation als *target* ..... 16
1.7 Acetylsalicylsäure ..... 17
1.7.1 Geschichte und Wirkung von Acetylsalicylsäure ..... 17
1.7.1 ASS im AMI ..... 18
1.7.2 ASS bei KHK ..... 19
1.7.3 *High on treatment platelet reactivity* als Problem ..... 20
1.7.4 Natrium-Salizylat ..... 20
1.8 P2Y12-Rezeptor Inhibitoren ..... 21
1.9 Infarktmodell ..... 21
1.10 Ziele der Arbeit ..... 22
2 Methoden ..... 23
2.1 Klinischer Teil 1: Kardiale Ereignisse unter ASS Therapie ..... 23
2.1.1 Versuchsaufbau ..... 23
2.1.2 Blutentnahme ..... 23
2.1.3 Lichttransmissionsaggregometrie ..... 24
2.1.4 Datenerfassung ..... 25
2.2 Klinischer Teil 2: Inflammation unter ASS Therapie ..... 26
2.3 Tierexperimenteller Teil: Thrombozyten im AMI ..... 26
2.3.1 Tierhaltung ..... 26
2.3.2 Ischämie Reperfusion ..... 27
2.3.3 Elektrokardiographie ..... 28
2.3.4 Applikation von Medikamenten ..... 29
2.3.5 Transthorakale Echokardiographie ..... 30
2.3.6 Probenentnahme ..... 31
2.3.7 Histologische Untersuchungen ..... 31
3 Material ..... 34

3.1 Klinischer Teil ..... 34
3.2 Tierexperimenteller Teil ..... 34
3.2.1 Tiere: ..... 34
3.2.2 Materialien ..... 34
3.2.3 Geräte ..... 34
3.2.4 Software ..... 35
3.2.5 Medikamente ..... 35
3.2.6 Färbungen ..... 35
4 Ergebnisse ..... 36
4.1 Klinischer Teil 1: Kardiale Ereignisse unter ASS Therapie ..... 36
4.2 Klinischer Teil 2: Inflammation unter ASS Therapie ..... 38
4.3 Muriner Teil Natriumsalicylat im AMI ..... 40
4.3.1 Infarktgröße ..... 40
4.3.2 Echokardiografie ..... 41
4.4 Muriner Teil Depletion im AMI ..... 44
4.4.1 Infarktgröße ..... 44
..... 44
4.4.2 Echokardiografie ..... 45
4.4.3 Blutbilder ..... 47
4.5 Muriner Teil Depletion und ASS im AMI ..... 49
4.5.1 Infarktgröße ..... 49
4.5.2 Echokardiografie ..... 50
4.5.3 Blutbilder ..... 51
4.5.4 Histologie ..... 53
5 Diskussion ..... 57
5.1 Muriner Teil: Thrombozyten im AMI ..... 60
5.1.1 Natrium-Salizylat Infarktgröße ..... 60
5.1.2 Depletion bei AMI ..... 62
5.1.3 Depletion + Acetylsalicylsäure bei AMI ..... 64
5.2 Resümee ..... 65
6 Quellenverzeichnis: ..... 67

**Abkürzungsverzeichnis:**

µl- Mikroliter

µm- Mikrometer

AAR- *Area at risk*

Abb.- Abbildung

ADP- Adenosindiphosphat

AMI- Akuter Myokardinfarkt

ARA- Arachidonsäure

ASS- Acetylsalicylsäure

BMS - *bare metal stents*

Con- Kontrolle/ Kontrollgruppe

COX 1/2- Cyclooxygenase 1/2

CRP- C-reaktives Protein

DAPT- Duale Antiplättchen-Therapie

DES- *Drug eluting* Stent

EF- Ejektionsfraktion

EKG- Elektrokardiographie/-gramm

FS- *fractional shortening*

Hb- Hämoglobin

HI- Herzinsuffizienz

HTPR- *High on treatment platelet reactivity*

IL-1- Interleukin 1

I/R- Ischämie-Reperfusion

IgG- Immunglobulin-G

IS- Infarktgröße

kg- Kilogramm

KG- Körpergewicht

KHK- Koronare Herzerkrankung

LANUV- NRW- Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen

LAD- *left anterior descending artery*

LV- Linker Ventrikel

LVEDD- Linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser

LVEF- Linksventrikuläre Ejektionsfraktion

LVESD- Linksventrikulärer endsystolischer Durchmesser

MACCE- *Major adverse cardiac and cerebrovascular events*

MoA- *Maximum of aggregation*

min- Minute

NaCl- Natriumchlorid

NaSS- Natrium-Salizylat

NF-κB- *Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*

NSTEMI- Nicht-ST-Hebungs-Myokardinfarkt

PAR- Protease-aktivierter Rezeptor

PBS- Dulbecco's Phosphate buffered saline

PPP- Plättchenarmes Plasma

PRP- Plättchenreiches Plasma

rcf- Relative Zentrifugalbeschleunigung

s.c.- subkutan

SV- Schlagvolumen

SVI- Schlagvolumenindex

STEMI- ST-Hebungs-Myokardinfarkt

TM- Thrombozytenmedium

TNF-α- Tumornekrosefaktor-α

TTC- 2,3,5-Triphenyltetrazolinumchlorid

UKD- Universitätsklinikum Düsseldorf

ZETT- Zentrale Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben

# 1 Einleitung

## 1.1 Herzinfarkt nach Definition der *World Health Organization* (WHO)

Herz-Kreislauferkrankungen stellen die häufigste Todesursache deutschlandweit und auch weltweit dar [10]. Innerhalb dieser Gruppe sind ischämische Herzerkrankungen mit dem akuten Myokardinfarkt (AMI) die häufigste Todesursache, gefolgt von anderen Herzerkrankungen und Schlaganfällen [11]. Mit wenigen Ausnahmen [12, 13] sind ischämische Herzerkrankungen und somit auch der AMI auf arteriosklerotische Prozesse der Koronararterien zurückzuführen [14, 15]. Diese Verdickung und Entzündung der Koronararterien führt zu koronarer Herzerkrankung (KHK), welche zu einer Plaqueruptur führen kann. Bei einer Plaqueruptur kommt es aufgrund massiver Ausschüttung thrombogener und inflammatorischer Substanzen zur Bildung eines Thrombus und somit zu einem Verschluss des Gefäßes, wodurch kein Blut und damit auch kein Sauerstoff mehr im versorgten Gewebe ankommen kann [16, 17]. Dies führt zum Absterben des Gewebes, wenn es nicht schnell genug reperfundiert wird [17]. Die effektivste Therapie im akuten Geschehen ist demnach eine Reperfusionstherapie, das bedeutet ein Beseitigen des Thrombus in den Herzkranzgefäßen. Dies kann entweder über eine systemische Lyse des Thrombus erfolgen oder über eine Perkutane koronare Intervention (PCI), bei welcher der Thrombus mechanisch entfernt wird [18]. Im direkten Vergleich ist hier die PCI klar überlegen, da das Nebenwirkungsprofil der systemischen Lyse, insbesondere das Auftreten von schweren Blutungen, ungünstig ist [19].

Der AMI lässt sich zwar zunehmend besser behandeln, jedoch hat er immer noch eine hohe Letalität von circa 3-5% [18, 20, 21]. Daher liegt der Fokus darauf das Entstehen einer KHK und damit AMI präventiv zu verhindern und Risikofaktoren zu vermindern [22]. Zu den nicht beeinflussbaren Risikofaktoren zählen insbesondere Alter, Geschlecht und genetische Prädispositionen [14, 23]. Klassische beeinflussbare Risikofaktoren sind unter anderem Blutdruck, Lipidstatus, Diabetes mellitus und Nikotinabusus [23]. Neben nicht-medikamentösen Interventionen kommen in der Prävention einer KHK dabei zunehmend Thrombozytenfunktionshemmer und antiinflammatorische Medikamente zum Einsatz [22, 24], bislang vor allem in der Sekundär- und Tertiärprävention [25].

## 1.2 Pathophysiologie des akuten Myokardinfarktes

Bei einem AMI kommt es durch Ischämie zu einer Hypoxie und folglich zu einem Untergang der Kardiomyozyten. Der häufigste Grund für die Ischämie ist eine bestehende koronare Arteriosklerose mit plötzlicher Plaqueruptur und konsekutivem Verschluss der Koronararterie. Seltenere Ursachen des Verschlusses stellen beispielsweise Embolien oder Dissektionen der Koronarien dar [9].

Durch Minderperfusion der Kardiomyozyten kommt es rasch zu einer Kontraktilitätsverminderung. Diese ist einerseits durch eine gesteigerte Bildung von anorganischem Phosphat, andererseits durch

eine rasch einsetzende intrazelluläre Azidose bedingt, wodurch es zu einer verminderten Sensibilität der kardiomyozytären Proteine auf Kalzium kommt [26, 27]. Die Kontraktilitätsverminderung führt zu einem verminderten Energiebedarf. Dies soll zunächst einem verlängerten Überleben der Kardiomyozyten dienen. Jedoch wird dieser verminderte Energiebedarf kurzzeitig weitgehend über hoch energetische Phosphate anstatt über Sauerstoff aufrechterhalten. Danach kommt es zur anaeroben Glykolyse aus intrazellulären Glykogenspeichern. Diese insuffiziente Energiegewinnung führt letztlich zu einem massivem Laktatanstieg und verstärkt die intrazelluläre Azidose [9].

Kommt es zu einer raschen Revaskularisierung innerhalb von ca. 20 Minuten, ist der bis dahin bereits entstandene Schaden reversibel. Trotzdem dauert es mehrere Tage bis zur Normalisierung der Kontraktilität des Myokardes. Dieses sogenannte *myocardial stunning* beruht einerseits auf einer Bildung freier Sauerstoffradikale, welche vermutlich eine verminderte Sensibilität der kardiomyozytären Proteine für Kalzium bedingen und andererseits auf einer Störung der intrazellulären Kalziumhämostase selbst [28, 29]. Durch massive Elektrolytentgleisungen, insbesondere von Kalium, Natrium, Kalzium und Magnesium, steigt das arrhythmogene Potential stark an [9].

Kommt es nicht zu einer Revaskularisierung innerhalb dieser 20 Minuten, können irreversible Schäden auftreten, welche zu einer zunehmenden Nekrose innerhalb der *area at risk* (AAR) führt, beginnend von subendokardial ausbreitend nach subepikardial (Abb. 1). Der genaue Pathomechanismus dahinter ist nicht geklärt, höhere Strömungswiderstände in den subendokardialen Gefäßen und ein *backwash* des Blutes während der Systole von subendokardial nach subepikardial bieten jedoch bereits lange beschriebene Erklärungsmöglichkeiten [30, 31].

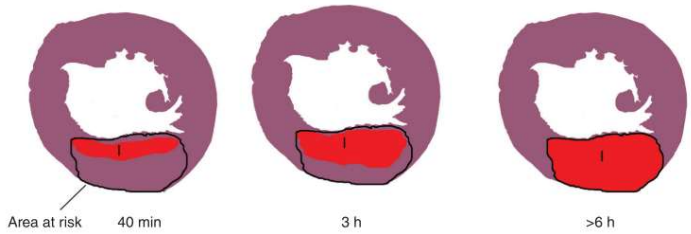

*Abbildung 1: Ausbreitung eines Infarktareal über die Zeit bei Ischämie [9]*

Das Abheilen der nekrotischen Areale erfolgt in drei, sich überlappenden, Phasen: inflammatorische Phase, Reparaturphase und Proliferationsphase. Auf diese wird unter Punkt 1.6 näher eingegangen.

## 1.3 Therapie des AMI

### 1.3.1 Akuttherapie

Patienten und Patientinnen mit AMI stellen sich häufig mit Angina pectoris Beschwerden in der Notaufnahme vor. Dieses, als Brustenge beschriebene Syndrom, besteht typischerweise aus Druckgefühl im Thorax oder retrosternalen Schmerzen, welche in den linken Arm, Unterkiefer oder

Hals ausstrahlen können [32]. Manche Personen, vorwiegend Frauen, Diabetiker und Diabetikerinnen und ältere Patienten und Patientinnen zeigen gehäuft auch andere, atypische, Symptome. Diese können sich in Erbrechen, Übelkeit, Dyspnoe, Müdigkeit oder Palpitationen äußern. Insbesondere Patienten und Patientinnen mit diesen atypischen Symptomen werden häufig spät erkannt, sodass dies bis zu einer doppelt erhöhten Letalität dieser Subgruppen führen kann [33].

Der AMI ist gekennzeichnet durch Gewebeuntergang des Herzmuskels. Er wird unterteilt in den ST-Hebungs-Myokardinfarkt (STEMI) und den Nicht-ST-Hebungs-Myokardinfarkt (NSTEMI). Der STEMI ist charakterisiert durch typische elektrokardiographische (EKG) Veränderungen (ST-Hebungen oder maskierender neu aufgetretener Links- oder Rechtsschenkelblock) und eine Troponindynamik. Der NSTEMI hingegen weist keine charakteristischen EKG-Veränderungen auf, wird jedoch ebenfalls über infarkttypische Symptomatik und eine Troponindynamik diagnostiziert [1, 34]. Therapeutisch ist beim STEMI eine Revaskularisierung des verschlossenen Koronargefäßes innerhalb von maximal 120 Minuten anzustreben, da es sonst vermehrt zu irreversiblen Schäden des Myokardes kommt. In einem PCI-Zentrum gilt das Ziel von unter 60 Minuten ab Betreten des Krankenhauses durch die Patienten und Patientinnen bis zur Revaskularisierung im Herzkatheterlabor (Abb. 2) [1]. Die Therapie des NSTEMI hängt von den Beschwerden des Patienten ab, ist allerdings im Vergleich weniger zeitkritisch [34].

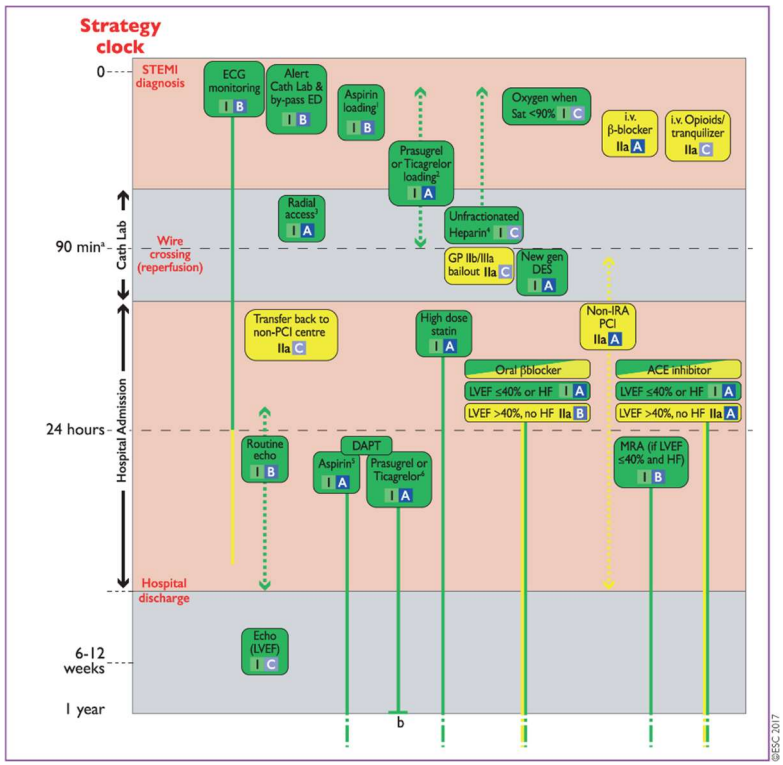


*Abbildung 2: Übersicht der Diagnostik und Therapie des STEMI [1]*

Die Akuttherapie des AMI besteht einerseits aus einer medikamentösen Komponente, welche bereits prähospital eingesetzt wird und der Revaskularisierung, welche im Herzkatheterlabor erfolgt [1].

### 1.3.2 Medikamentöse Therapie

Die medikamentöse Therapie sollte im besten Fall bereits präklinisch bei der Diagnose AMI begonnen werden. Diese stützt sich auf mehrere Säulen und muss im Einzelfall je nach Patient oder Patientin und Symptomatik gegebenenfalls angepasst werden [1].

Die wesentlichsten Ansatzpunkte sind:

Sauerstoff: Bei einer arteriellen Sauerstoffsättigung von unter 90% ist Sauerstoffgabe indiziert mit einem Zielwert einer Sauerstoffsättigung von >95% [1].

Duale Antiplättchen-Therapie (DAPT): Die DAPT sollte bei jeder PCI erfolgen und setzt sich zusammen aus Acetylsalicylsäure (ASS) und einem P2Y12-Inhibitor. ASS sollte so schnell wie möglich nach der Diagnose eines AMI gegeben werden, sogar noch vor der PCI, beispielweise im Rettungswagen. Die Applikation kann hierbei oral mit 150-300 mg erfolgen oder intravenös mit 75-100 mg. Diskutiert wird auch eine höhere Dosis, um eine noch effizientere Thrombozytenfunktionshemmung zu erreichen. Zum idealen Zeitpunkt der P2Y12-Inhibitoren-Gabe gibt es aktuell noch keine klaren Daten. Spätestens erfolgt diese jedoch in der Regel im Herzkatheterlabor periprozedural bei PCI. Bevorzugt eingesetzt werden dabei je nach Risiko-Nutzen-Konstellation Prasugrel oder Ticagrelor [1].

Antikoagulation: Eine Antikoagulation mit Heparin bei PCI ist empfohlen. Da bei unfraktioniertem Heparin (UFH) die größten Erfahrungswerte vorliegen, ist dieses primär indiziert, kann allerdings durch Enoxaparin oder Bivalirudin ersetzt werden [1]. UFH bindet an verschiedene Antithrombinmoleküle, insbesondere Antithrombin III. Dieser Komplex ist in der Lage die Gerinnungsfaktoren IIa, Xa, IXa, XIa, XIIa zu inhibieren und dadurch die Gerinnung zu hemmen [35]. Da Faktor Xa ein potenter Thrombozytenaktivator über den Protease-aktivierten Rezeptor (PAR)-1 ist, erfolgt über dessen Hemmung außerdem eine Thrombozytenfunktionshemmung. Dies konnten Petzold et al. mit dem Faktor-Xa-Hemmer Rivaroxaban zeigen [36].

Morphin: Morphin dient der Anxiolyse und Analgesie der Patienten und Patientinnen, was sich wiederum hemmend auf die gesteigerte Sympathikusaktivität auswirkt [1]. Parodi et al. konnten jedoch zeigen, dass eine Morphingabe die thrombozytenfunktionshemmende Wirkung von Prasugrel bzw. Ticagrelor vermindert [37]. Dennoch wird es in der klinischen Praxis routinemäßig eingesetzt.

Beta-Blocker: Durch die Hemmung der Beta-Rezeptoren kommt es zu einer Verminderung von malignen Herzrhythmusstörungen im akuten Geschehen. Daher ist eine frühzeitige i.v. Gabe von z.B. Metoprolol zu erwägen, auch wenn es aktuell keine Daten gibt, welche einen Langzeitüberlebensvorteil bei akuter Beta-Blocker-Gabe zeigen [1]. Eine langfristige Therapie von Beta-Blockern bei KHK oder nach AMI führt hingegen, laut aktueller Studienlage, zu einer Risikoreduktion für den Endpunkt Tod um 10% [38].

Nitrate: Nitrate führen über eine Vasodilatation zu einer Verminderung des Sauerstoffbedarfs des Herzens im AMI. Allerdings konnte in großen Studien kein Benefit der Therapie zeigen, sodass diese in aktuellen Guidelines des STEMI keinen Stellenwert besitzen [1, 39]. Bei pectanginösen Beschwerden ist eine Beschwerdeminderung allerdings möglich.

### 1.3.3 Revaskularisierungstherapie

Um die Blutversorgung des Herzes nach einem AMI wieder herzustellen, ist die einzige Lösung eine Revaskularisierung der verschlossenen Koronararterie. Dies kann entweder über eine Lyse des Thrombus erfolgen oder über eine PCI [1].

1929 erfolgte durch Werner Forssmann im Selbstversuch die erste erfolgreiche Katheterisierung des Herzens. Über eine Armvene schob er einen 65 cm langen Katheter vor, bis dieser im rechten Ventrikel landete. Dokumentiert wurde dies mittels einer Röntgenaufnahme (Abb. 3) [4].

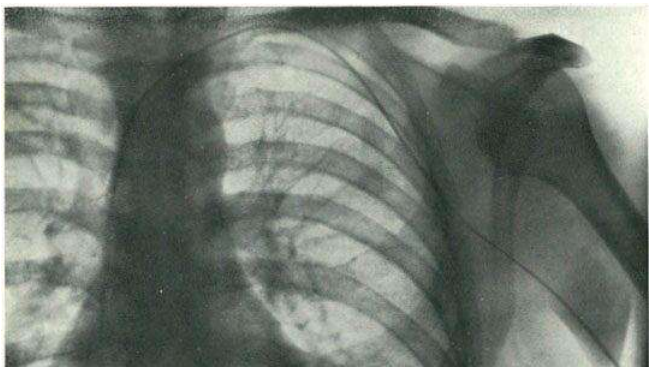

*Abbildung 3: Röntgenaufnahme der ersten Herzkatheterisierung durch Werner Forssmann [4]*

1978 erfolgte dann die erste kathetergestützte Revaskularisierung der Koronararterien durch Gruentzig. Anfangs erfolgte dies über das reine Aufpumpen eines Ballons innerhalb des Gefäßes, welcher den Thrombus an die Wand der Koronarie drückt. Hierbei kam es jedoch zu sehr hohen Raten von Re-Stenosierungen bei bis zu 50% der Patienten und Patientinnen. Um dies zu unterbinden, wurden „Stents“ entwickelt, kleine Metallgitter, welche in die Koronararterie eingesetzt wurden und so die Offenheitsraten wesentlich verbesserten. Zunächst wurden Stents aus Edelstahl ohne Beschichtung eingesetzt (BMS - *bare metal stents*) [40].

Bei der PCI wird heutzutage in der Regel ein *Drug eluting* Stent (DES) eingesetzt, um das Gefäß auch nach der Applikation offen zu halten. Diese sind mit wachstumshemmenden Substanzen wie Sirolimus beschichtet, um eine Überwucherung des Stents mit glatter Muskulatur und damit Restenosen zu verhindern [41]. Nach der Prozedur ist eine DAPT je nach Risikokonstellation (Ischämie- versus Blutungsrisiko) für bis zu 12 Monate indiziert [1, 34].

Die früher standardmäßig durchgeführte Lysetherapie mit der i.v. Applikation von Thrombolytika wird wegen des ungünstigen Nutzen/Risikoprofils im Vergleich zur PCI nur mehr in Ausnahmefällen, etwa wenn keine PCI-Möglichkeit in kurzer Zeit erreichbar ist, durchgeführt.

## 1.4 Herzinsuffizienz nach AMI

Herzinsuffizienz (HI) beschreibt eine eingeschränkte Pumpfunktion des Herzens, welche nicht mehr die vom Körper benötigte Auswurfleistung erbringen kann. Dies kann sich primär in Dyspnoe und Ödemen, aber auch in anderen Beschwerden zeigen [42, 43]. Es gibt diverse Klassifikationen, um HI zu beschreiben. Klinisch sehr gängig und einfach zu bestimmen ist die New York Heart Association (NYHA) Klassifikation, welche die HI in Stadien von I-IV unterteilt [43]. Ebenfalls gängig ist die Klassifikation über die Ejektionsfraktion des linken Ventrikels (LVEF) in der Echokardiographie. Hier wird die HI in der Regel unterteilt in ≥50%, 40-50% und <40% LVEF. Diese Klassifikation muss nicht zwingend mit der Klinik der Patienten und Patientinnen korrelieren, hat aber dennoch einen starken prognostischen Wert. Daher ist eine Abklärung, auch wenig symptomatischer Patienten und Patientinnen, relevant. Insbesondere die Gruppe von Menschen mit einer LVEF <40% profitiert von einer daraus resultierenden Therapie der HI [44].

Das Auftreten von HI nach einem erstmaligem AMI liegt je nach Studie bei 20%- 40% [45]. Das Feststellen der HI ist einer der wichtigsten prognostischen Marker für das Überleben nach AMI. Segev et al. konnten zeigen, dass AMI Patienten und Patientinnen, bei denen zusätzlich sich eine HI besteht, ein stark erhöhtes Risiko haben, innerhalb eines Jahres nach einem AMI zu versterben (14,6% vs. 4,4%, $p < 0,0001$). Dieses Kollektiv stellt sich allerdings auch als signifikant älter und insgesamt multimorbider dar [46].

Patienten und Patientinnen mit eingeschränkter LVEF profitieren stark von Betablockern, ACE-Hemmern und Aldosteron Antagonisten. Auch das Applizieren eines implantierbaren Schrittmachers muss evaluiert werden. Das Sterben durch plötzliche Herzrhythmusstörungen kann dadurch signifikant vermindert werden [44].

## 1.5 Thrombozyten als *target*

Thrombozyten spielen eine entscheidende Rolle in der Blutgerinnung. Sie entstehen aus Megakaryozyten und besitzen selbst keinen Zellkern mehr [47]. Daten legen jedoch nahe, dass Thrombozyten aus Überbleibsel der *messenger* Ribonukleinsäure der Megakaryozyten Proteine synthetisieren können [48].

Bei Kontakt mit extravasalem Gewebe kommt es zur Aktivierung der Thrombozyten, woraufhin sie aggregieren und einen Thrombus bilden, um das Gefäß wieder zu verschließen [47]. Genau wie bei einer Verletzung, bei der die blutungsstillende Wirkung der Thrombozyten erwünscht ist, kommt es auch bei arteriosklerotischen Rupturen zur massiven Aktivierung von Thrombozyten, welche, in diesem Fall unerwünscht, zum Verschluss eines Gefäßes führen kann [49]. Die Aktivierung der Thrombozyten erfolgt über verschiedene auslösende Substanzen wie Adenosindiphosphat, van-

Willebrand-Faktor, Thrombin, Thromboxan $A_2$ Kollagen oder Arachidonsäure (ARA) [50, 51]. Diese Substanzen finden sich physiologisch in der extrazellulären Matrix, im Plasma oder in den alpha- und *dense*- Granula der Thrombozyten [50]. Eine Aktivierung, über einen dieser *pathways,* führt zu einer Ausschüttung der Granula aus den Thrombozyten, welche wiederum eine Kettenreaktion auslöst und so den Thrombus bildet [50].

Viele dieser *pathways* können gehemmt werden und Thrombozytenfunktionshemmer haben Einzug in den klinischen Alltag erhalten. Beispielsweise verhindern P2Y12-Rezeptor Inhibitoren, wie Prasugrel, ein Andocken von Adenosindiphosphat an den P2Y12 Rezeptor. Dadurch kommt es zu einer verminderten Aktivierung und Thrombusbildung der Thrombozyten [52].

Thrombozytenfunktionshemmer werden sowohl im akuten Geschehen als auch in der sekundären oder tertiären Prävention eingesetzt [32].

## 1.6 Inflammation als *target*

Die Inflammation bei AMI ist ein hochkomplexes Zusammenspiel diverser Zellen und Mediatoren. Sie gliedert sich in drei überlappende Phasen: die Inflammationsphase, die Reparaturphase und die Proliferationsphase [53].

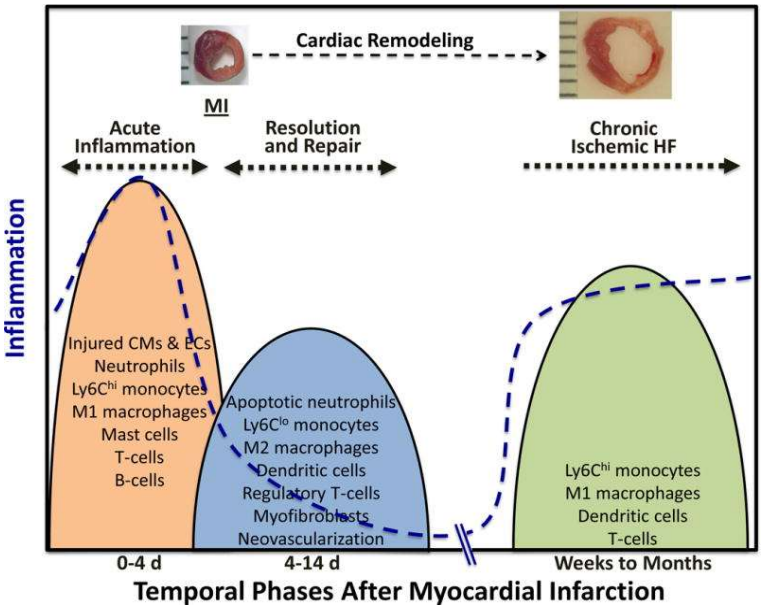


*Abbildung 4: Übersicht über inflammatorische Phasen nach AMI [2]*

Beim AMI ist die Inflammationsphase gekennzeichnet durch den Zelluntergang von Myokardiozyten mit starker Aktivierung diverser Entzündungs-*pathways*. Die nekrotisierenden Zellen aktivieren insbesondere das angeborene Immunsystem. So kommt es kurz nach einem AMI zu einer Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen wie Interleukin 1 (IL-1), Interleukin 6, Tumornekrosefaktor Alpha (TNF-α) aber auch des Komplementsystems, welche zu einer Infiltration von Leukozyten führen [9, 53]. Die Leukozyteninfiltration geschieht primär über eine vermehrte Expression von Adhäsionsmolekülen wie P- und E-Selektin an den Endothelien, wodurch es zum *rolling* und zur Einwanderung von Leukozyten kommt. In der Frühphase des AMI sind primär neutrophile Granulozyten und Ly6C$^{hi}$ Monozyten an der Hochregulation der Inflammation beteiligt. Diese Phase dauert bei Mäusen etwa vier Tage ab dem AMI [53].

In der Reparaturphase kommt es zu einer Hemmung der überschießenden Inflammation durch antiinflammatorische Zellen. Ly6C$^{lo}$ Monozyten und M2-*like* Makrophagen exprimieren antiinflammatorische, profibrotische und angiogene Substanzen. Dies führt zur Proliferationsphase, in welcher es zu einem fibrotischen Umbau durch Fibroblasten und Angioneogenese im Herzen kommt (Abb. 4) [2]. Nekrotische Areale werden durch nicht-kontraktile Kollagennarben ersetzt [9].

Der gesamte Prozess wird unter dem Begriff *cardiac remodeling* zusammengefasst. Insgesamt zeigt sich, dass eine hohe initiale Inflammation zu einem stärkeren fibrotischen Umbau des Herzes führt, was wiederum die Wahrscheinlichkeit erhöht, in einer Herzinsuffizienz zu münden [2].

In großen Studien konnte bis vor kurzem kein Einfluss von antiinflammatorischer Therapie auf kardiovaskuläre Ereignisse gezeigt werden. Dies änderte sich mit dem CANTHOS Trial, bei welchem gezeigt werden konnte, dass eine Hemmung von Interleukin-1β mit dem Antikörper Canakinumab zu einer signifikanten Reduktion von AMI, Schlaganfällen und kardiovaskulärem Tod führt. Je nach Dosis von Canakinumab ergab sich eine Risikoreduktion um bis zu 15% für den primären Endpunkt [54].

C-reaktives Protein (CRP) gilt als wichtiger Inflammationsmarker und konnte bereits mehrfach als unabhängiger Risikofaktor für kardiovaskuläre Ereignisse bestätigt werden [5, 55].

## 1.7 Acetylsalicylsäure

### 1.7.1 Geschichte und Wirkung von Acetylsalicylsäure

Salizylate gehören zu den ältesten, bekannten Medikamente der Menschheitsgeschichte. Erste Berichte gehen über 3500 Jahre zurück, als salizylathaltige Weidenrinde zur Schmerzstillung und zur Fiebersenkung eingesetzt wurde [56]. Das bekannteste Salizylat, Acetylsalicylsäure (ASS), konnte erstmals 1897 von Felix Hoffmann synthetisiert werden. In den 1970er Jahren wurde die Wirkung von ASS als Inhibitor der Prostaglandinsynthese durch John Vane beschrieben. 1982 erhielt Vane dafür den Nobelpreis für Medizin [56, 57]

Die Hauptwirkung von *low-dose* ASS beruht auf einer irreversiblen Acetylierung der Cyclooxygenase 1 (COX-1) am Serin 529. Dies verhindert die Umwandlung von ARA zu Thromboxan-A2 in Thrombozyten. Thromboxan-A2 ist ein potenter Thrombozyten Aktivator und Vasokonstriktor [58]. Dies führt einerseits zur gewünschten Wirkung der Thrombozytenaggregationshemmung, andererseits auch zu erhöhter Blutungsneigung, eine der häufigsten Nebenwirkung von ASS [59]. Die thrombozytenaggregationshemmende Wirkung von ASS hält 8-10 Tage, dem Lebenszyklus der Thrombozyten entsprechend [60].

Zusätzlich bewirkt ASS eine schwache Hemmung der COX-2, die Affinität ist deutlich geringer im Vergleich zur COX-1 [60, 61]. Dies tritt vor allem bei hohen ASS Dosen auf, wohingegen die

Thrombozytenaggregationshemmung bereits bei niedrigen Dosen auftritt [62]. Bei gewünschter Thrombozytenaggregationshemmung reichen orale Dosen von 75-300mg (*low-dose*), wohingegen bei gewünschter Analgesie und Antipyrese in der Regel orale Dosen über 1000mg/Tag benötigt werden [62].

Über die Wirkung auf die COX-1 und COX-2 hinaus sind weitere antiinflammatorische Wirkungen von ASS beschrieben. So konnten Weber et al. zeigen, dass ASS dosisabhängig die Aktivierung von *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells* (NF-κB) inhibiert und TNF als Mediator beschrieben werden kann [63].

### 1.7.1 ASS im AMI

Sowohl in der Akuttherapie als auch in der Prävention des AMI ist ASS ein unumgängliches Medikament.

In der Akuttherapie des AMI wird ASS oral in Dosen zwischen 150mg und 300mg empfohlen. Das Ziel ist es, schnell und effektiv die Thrombozytenfunktion zu hemmen und so ein Fortschreiten der Thrombusbildung zu unterbinden [1, 34]. So hat sich eine *loading dose* von ASS etabliert. Große Studien über die optimale Dosierung dieser *loading dose* sind noch ausständig. Santos et al. konnten jedoch zeigen, dass auch Patienten und Patientinnen welche bereits eine *low-dose* ASS Medikation vor AMI bekommen von einer zusätzlichen *loading dose* profitieren. Die zusätzliche ASS Dosis von 200-500mg konnte die Thromboxansynthese, Thrombozytenaktivität und *Pro brain natriuretic peptide*, als Marker einer Herzinsuffizienz, signifikant senken [64]. Studien welche an großen Kollektiven einen Benefit auf harte Endpunkte durch ASS-loading zeigen, stehen allerdings aus.

Zeymer et al. konnten 2017 zeigen, dass höhere ASS Dosen i.v. (250mg oder 500mg) die ARA-bedingte Thromboxansynthese potenter hemmen als ASS oral in ähnlicher Dosis (300mg). Die Blutungskomplikationen in beiden Gruppen waren ähnlich. Im akuten Geschehen sehen die Autoren daher einen Vorteil der i.v. Gabe von ASS im Vergleich zur oralen Einnahme [65].

Lange Zeit war unklar, wie und ob ASS sich auf die Infarktgröße auswirkt. Diverse Arbeiten zeigten keine Verbesserung durch ASS auf die Infarktgröße [66-68]. Hierbei wurden jedoch entweder keine Reperfusionsmodelle gewählt, sondern reine Okklusionen, eine sehr lange Ischämiezeit von 90 Minuten, oder ASS wurde erst während der Okklusion appliziert [66-68].

In seiner Dissertation konnte Naguib im murinen Modell jedoch zeigen, dass ASS einen positiven Effekt auf die Infarktgröße hat, wenn es 30 Minuten vor Ischämie in einem I/R Modell für 30 Minuten appliziert wird. Hingegen hatte ASS keinen Effekt auf die Infarktgröße, wenn es erst nach einer Ischämie appliziert wurde (Abb. 5) [7].

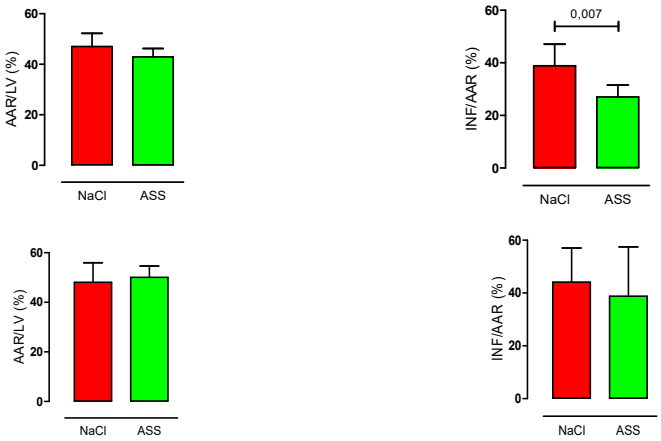


*Abbildung 5: oben: Infarktgrößenreduktion bei Mäusen nach ASS Gabe vor AMI, unten: keine Infarktgrößenreduktion bei Mäusen nach ASS Gabe während AMI [7]*

### 1.7.2 ASS bei KHK

In der Primärprävention spielt ASS bis heute klinisch keine Rolle. Baigent et al. konnten 2009 in einer Metaanalyse mit 660 000 Personenjahren zeigen, dass in der Primärprävention keine Reduktion von kardiovaskulärem Tod zu sehen ist. Nichtsdestotrotz konnte eine Reduktion von nicht tödlichem AMI um 22% gezeigt werden. Das Blutungsrisiko steigt demgegenüber signifikant an [69].

Kürzlich wurden mit ARRIVE, ASCEND und ASPREE drei große, placebokontrollierte Studien mit ASS als Primärprävention in vulnerablen Gruppen publiziert. Keine der Studien konnte eine signifikante Reduktion des Gesamtversterbens zeigen [70-72]. Es ist allerdings nicht ausgeschlossen, dass besonders vulnerable Gruppen von einer Primärprävention profitieren [69].

In der Sekundärprävention des AMI spielt ASS seit langem eine entscheidende Rolle. In der Ära, bevor Revaskularisierung bei AMI eine Rolle spielte, konnte bei Patienten und Patientinnen mit instabiler Angina Pectoris eine Reduktion von Endpunkt Tod gezeigt werden. So konnte bereits in den 80er Jahren bei einer Kohorte von 1266 Patienten und Patientinnen eine Reduktion von Tod oder AMI um 51% gezeigt werden. Das Risiko für nicht tödlichen AMI war ebenfalls um 51 % verringert [73].

*Low-Dose* ASS (75-100mg/Tag) reduziert das Risiko für AMI, Schlaganfall und Tod aller Ursachen, wenn bereits ein kardiovaskuläres Ereignis in der Vergangenheit stattfand [69]. Bei stabiler KHK ergab eine Metanalyse von Berger et al. eine Risikoreduktion von 21% für kardiovaskuläre Ereignisse und 26% für nicht tödlichen AMI. Das Gesamtsterben in der ASS Gruppe war ebenfalls um 13% reduziert [74]. Nach PCI oder akutem Koronarsyndrom ist eine duale Thrombozytenfunktionshemmung mit ASS und einem P2Y12 Inhibitor indiziert [75].

### 1.7.3 *High on treatment platelet reactivity* als Problem

Es gibt verschiedene Wege, um die Wirksamkeit von ASS zu bestimmen. Als Goldstandard gilt die Lichttransmissionsaggregometrie (LTA). Hier wird plättchenreiches Plasma (PRP) mit unterschiedlichen Stimulantien stimuliert. Für die Feststellung der ASS-Wirkung ist vor allem ARA als Stimulus relevant. Die Aggregation der Thrombozyten wird über eine fallende Lichtresorption des Plasmas gemessen und im Bereich zwischen 0 und 100% angegeben [58]. Die *high on treatment platelet reactivity* (HTPR) ist definiert über unzureichendes Ansprechen der Thrombozytenfunktion auf ASS Therapie und stellt ein häufiges Problem bei dieser dar. Bis zu 40% der Patienten und Patientinnen sprechen nicht adäquat auf eine ASS Therapie an [76]. Diese haben ein bis zu vierfach erhöhtes Risiko eines kardiovaskulären Ereignisses und ein bis zu sechsfach erhöhtes Risiko zu sterben [58]. Die Gründe dafür sind heterogen. Reduzierte Compliance der Patienten und Patientinnen, genetische Polymorphismen, Diabetes Mellitus, Übergewicht oder Inflammation sind einige der bekannten Risikofaktoren [58, 77]. Insbesondere die genetischen Polymorphismen könnten bei bis zu 19% der Bevölkerung eine verminderte Wirkung von ASS auf die COX-1 bedingen [78-80]. Auch Arzneimittelinteraktionen spielen eine wichtige Rolle. So konnten Polzin et al. bereits zeigen, dass ASS mit Metamizol um die COX konkurriert und dessen Wirkung dadurch weitgehend aufgehoben wird [81]. Ein Cut-Off für HTPR ist nicht klar definiert und hängt von den jeweiligen Laborbegebenheiten und Untersuchungsmethoden ab [82].

### 1.7.4 Natrium-Salizylat

Neben ASS ist auch das Salz der Salicylsäure Natrium-Salizylat (NaSS) ein lange bekannter COX-Inhibitor. Anders als ASS wirkt NaSS nicht irreversibel, sondern reversibel inhibitorisch auf die COX. Die COX-1 Hemmung von NaSS im Vergleich zu ASS ist wesentlich schwächer ausgeprägt bei vergleichbarerer COX-2 Hemmung [83]. So kommt es zwar zu einem ähnlichen Ausmaß von Prostaglandin Inhibition, allerdings zu einem deutlich geringeren bis fehlenden Ausmaß von Thromboxan-Inhibition (Abb. 6). Dies äußert sich in einer deutlich

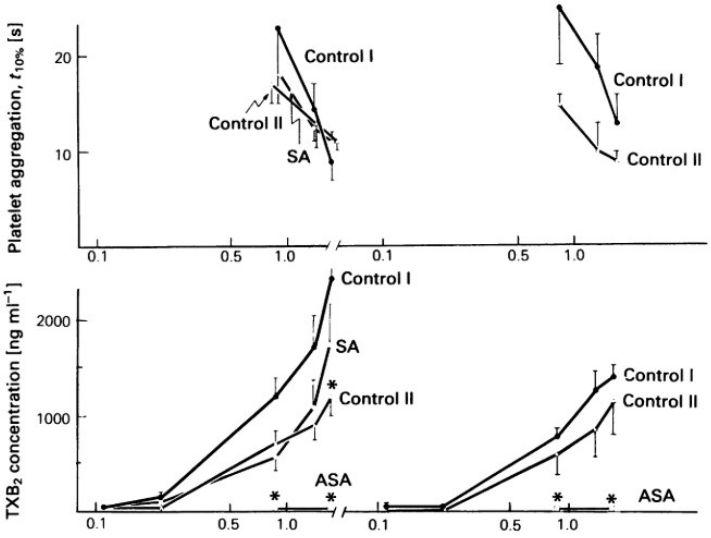


*Abbildung 6: Fehlende Hemmung der Thrombozytenaktivität und der Thromboxansynthese von NaSS verglichen mit ASS[6]*

verringerten, bis gar nicht vorhandenen, thrombozytenfunktionshemmenden Wirkung von NaSS bei vergleichbarer antiinflammatorischer Wirkung im Vergleich zu ASS [6, 84].

## 1.8 P2Y12-Rezeptor Inhibitoren

P2Y12-Rezeptor Inhibitoren finden zunehmend Einzug in die Akut- und Langzeit-Behandlung von Patienten und Patientinnen mit AMI [85].

Humane Thrombozyten exprimieren G-Protein gekoppelte Adenosindiphosphat (ADP) Rezeptoren P2Y1 und P2Y12 [86]. ADP führt über die Aktivierung dieser Rezeptoren zum intrazellulären Calcium Anstieg, zum *shape change* und zur Aggregation der Thrombozyten. Durch die Aktivierung der Thrombozyten kommt es in weiterer Folge zu einem Ausschütten der *dense granula*, was ADP in hoher Konzentration freisetzt und so zu einem positiven Feedback führt [87]. Dieses positive Feedback spielt dementsprechend auch bei der Aktivierung mit anderen Aktivatoren eine Rolle. So kommt es bei P2Y1 *knock-out* Mäusen nicht nur zum Verlust der Aggregation unter ADP, sondern auch zur verminderten Aggregation von Kollagen und von niedrig dosiertem Thrombin [88]. Weitere Funktionen der P2Y-Rezeptoren werden derzeit noch untersucht. Es konnten unter anderem Effekte auf Inflammation und auf Tumorwachstum mit Metastasierung gezeigt werden [89].

P2Y12-Rezeptor Inhibitoren blockieren die oben beschriebenen pro-aggregatorischen Effekte des P2Y12 Rezeptors. Es lassen sich zwei Gruppen differenzieren, Thienopyridine (Clopidogrel, Prasgurel) und Nicht-Thienopyridine (Ticagrelor, Cangrelor). Thienopyridine sind *pro drugs* und müssen erst zu ihrem aktiven Metaboliten umgewandelt werden [90]. Clopidogrel ist nach wie vor am weitesten verbreitet im klinischen Alltag, obwohl die neueren P2Y12 Inhibitoren Ticagrelor bzw. Prasugrel stärker thrombozytenfunktionshemmend wirken. Diese sind allerdings mit einem erhöhten Blutungsrisiko versehen [90-92]. P2Y12-Inhibitoren werden sowohl im akuten AMI als auch in der Sekundärprophylaxe von kardiovaskulären Geschehen eingesetzt [90].

## 1.9 Infarktmodell

Zur Erforschung des AMI ist nach wie vor das Tiermodell ein unverzichtbarer Bestandteil zur pathophysiologischen Simulation. Es gibt verschiedene Infarktmodelle in Versuchstieren, etabliert hat sich vor allem der operative Verschluss eines Hauptastes der *left anterior descending artery (LAD).* Dabei unterscheiden sich grundsätzlich zwei Methoden: Permanente Infarkte und I/R. Bei den permanenten Infarkten wird die LAD verschlossen und nicht wieder eröffnet, bei I/R Modellen erfolgt nach einer standardisierten Zeit eine Wiedereröffnung des zuvor verschlossenen Gefäßes. Beide Modelle haben unterschiedliche Stärken und Schwächen. Bei permanenten Infarkten zeigt sich eine größere Infarktnarbe und praktisch die gesamte *area at risk* (AAR) entspricht der Infarktgröße. Bei I/R Modellen ergibt sich eine kleinere Infarktnarbe, welche innerhalb der AAR liegt, der technische und

zeitliche Aufwand ist höher. Ein sekundärer Schaden, der Reperfusionsschaden kommt durch ein Wiedereröffnen des Gefäßes und sekundäres Ödem zustande. Er sollte klinisch nicht unterschätzt werden und existiert nur bei I/R [93].

## 1.10 Ziele der Arbeit

In der vorliegenden Dissertation werden folgende Fragestellungen behandelt

- Besteht bei HTPR unter ASS ein vermindertes kardiovaskuläres Outcome?
- Zeigt sich bei HTPR unter ASS ein Einfluss auf CRP?
- Verbessert NaSS das Outcome nach AMI in Mäusen?
- Verbessert Thrombozytendepletion das Outcome nach AMI in Mäusen?
- Verbessert die zusätzliche Gabe von ASS zu Thrombozytendepletion das Outcome nach AMI in Mäusen?

# 2 Methoden

## 2.1 Klinischer Teil 1: Kardiale Ereignisse unter ASS Therapie

### 2.1.1 Versuchsaufbau

Für den klinischen Teil dieser Arbeit wurden 72 Patienten und Patientinnen während ihres Aufenthaltes in der Klinik für Kardiologie, Pneumologie und Angiologie des Universitätsklinikums Düsseldorf (UKD) eingeschlossen. Alle Teilnehmenden hatten eine angiographisch gesicherte KHK und gaben eine schriftliche Einwilligung zur Partizipation ab. Die Aufklärung der Patienten und Patientinnen erfolgte in schriftlicher und mündlicher Form durch ärztliches Personal der kardiologischen Abteilung des Uniklinikums Düsseldorf.

Die Untersuchungen wurden vom Ethikkomitee des UKD genehmigt mit der Studiennummer: 4658.

**Einschlusskriterien** waren:

- Alter >18 Jahre
- Angiographisch gesicherte stabile oder instabile KHK
- 100 mg ASS Einnahme täglich

**Ausschlusskriterien** waren:

- Patienten und Patientinnen unter 18 Jahre
- Bekannte Blutungsneigung der Patienten und Patientinnen
- Nicht einwilligungsfähige Patienten und Patientinnen

### 2.1.2 Blutentnahme

Für die Messung der Thrombozytenfunktion der Teilnehmenden erfolgte eine Blutentnahme über eine periphere Venenpunktion. Diese wurde im Zuge der regulären Blutentnahmen der jeweiligen Stationen oder Ambulanz der Kardiologie des UKD durchgeführt. Nach erfolgter Hautdesinfektion mit Octeniderm® wurde eine periphere Armvene mittels 21G Butterfly Kanüle punktiert und drei Natrium-Citrat-Vacutainer (BD Vacutainer, Natrium-Citrat 3,8 %) abgenommen. Natrium-Citrat fungiert hier als Antikoagulans, indem es für eine Bindung von Calcium im Blut sorgt, welches für die primäre Hämostase eine entscheidende Rolle innehat [94]. Jeder Vacutainer enthält 2,7ml Vollblut. Insgesamt wurde so von jedem der Teilnehmenden 8,1ml Vollblut abgenommen. Innerhalb von 30 Minuten nach Abnahme erfolgte der Transport in das Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie der Heinrich-Heine-Universität. Dort fand die Thrombozytenfunktionsmessung mittels LTA statt.

### 2.1.3 Lichttransmissionsaggregometrie

Die LTA stellt den Goldstandard in der Thrombozytenfunktionsmessung dar. Die Messung kann mit PRP, gewaschenen Thrombozyten oder in gefilterten Thrombozyten erfolgen. Die Messung ist nicht international standardisiert, unsere Versuche erfolgten nach den internationalen Empfehlungen von Cattaneo et al. [95]. In der LTA können verschiedenste Stimulantien von Thrombozyten getestet werden. Etabliert sind beispielsweise ARA, Kollagen oder ADP [95].

Für die Versuche dieser Arbeit wurde PRP verwendet. Als Stimulus wurde 0,5mM ARA verwendet.

#### *2.1.3.1 Plättchenreiches Plasma und Plättchenarmes Plasma*

Zur Herstellung von PRP erfolgte eine 10- minütige Zentrifugation des Vollblutes der Probanden und Probandinnen bei 270 relativer Zentrifugalbeschleunigung (rcf). Dadurch separiert sich PRP von den restlichen Bestandteilen des Vollblutes, vorwiegend Erythrozyten und Thrombozyten. Der Überstand wird daraufhin abgenommen und ein Teil dessen weiter bei 13.000 rcf für 5 Minuten bei Raumluft zentrifugiert. Durch diesen Schritt separieren sich die Thrombozyten vom Überstand. Dieser kann erneut abgenommen werden und stellt plättchenarmes Plasma (PPP) dar. Vor Beginn der LTA muss das PRP für 15 Minuten bei Raumtemperatur stehen.

#### *2.1.3.2 Durchführung der LTA*

Die LTA ist eine in den 1960er Jahren entwickelte Methode zur Messung der Thrombozytenfunktion. Das Grundprinzip beruht auf der Änderung der Lichtdurchlässigkeit von PRP bzw. anderen thrombozytenhaltigen Medien bei einer Aktivierung der Thrombozyten. Diese wurde mittels einer konstanten Lichtquelle, welche durch das zu untersuchende Medium leuchtet, gemessen [96]. Die genauen Protokolle unterscheiden sich je nach Messgerät. Für diese Versuche wurde das APACT-4004 (Labitec, Ahrensburg, Deutschland) verwendet. Hierfür wurden jeweils 200µl der zu untersuchenden Substanz, in diesem Fall PRP, mit 50µl Thrombozytenmedium (TM) vermischt. Zunächst erfolgte eine Eichung des Gerätes mittels PRP und TM. Dies stellt im System den Zustand von 100% dar, da nahezu keine Thrombozyten in der Lösung sind.

Nach der Eichung wird PRP mit TM in die Teströhrchen gefüllt. Dieser Zustand stellt 0% dar, da noch alle Thrombozyten im System in Lösung vorliegen. Anschließend kommt es zum Umrühren mittels Rührknochen der Proben und zur Inkubation bei 37°C für 4 Minuten. Nach 4 Minuten erfolgt ein dauerhaftes Rühren der Proben mit einem automatisierten Rührmechanismus. Nach weiteren zwei Minuten kommt es zur Stimulation der Proben durch Zugabe von 5µl 25mM ARA als Thrombozytenaktivator, sodass die Endkonzentration der Probe 0,5mM ARA beträgt. Nach Zugabe von ARA erfolgt die Messung über 4 Minuten bis zum Ende des Versuches.

### 2.1.3.3 *Interpretation der Kurve*

Unstimuliert zeigen sich auf der Kurve Werte um 0%. Sobald der Stimulus hinzugegeben wird, kommt es zum sogenannten *shape change* der Thrombozyten. Dadurch kommt es bei einer intrazellulären Umverteilung von Aktin zur Formveränderung der Thrombozyten, zu einer Vergrößerung des Volumens und damit zu einer verminderten Lichtdurchlässigkeit des PRP [97]. Dies resultiert bei Aktivierung der Thrombozyten in einer Thrombusbildung und zum „Verbrauch" der Thrombozyten im PRP. So kommt es zu gesteigerter Lichtdurchlässigkeit. Die Werte nähern sich nun den vorher bestimmten 100% durch die PPP Eichung an. Als wichtigster Parameter für die Thrombozytenfunktion gilt das *maximum of Aggregation (MoA) [96]*. Dieser Wert beschreibt den höchsten Ausschlag der Kurve in Richtung 100% und ergibt einen Wert zwischen 0% und 100%. Eine Aggregation von 100% bedeutet demnach, dass die kompletten Thrombozyten der Probe als Thrombus vorliegen und nicht im Lichtkanal der Messung vorliegen (Abb. 7).

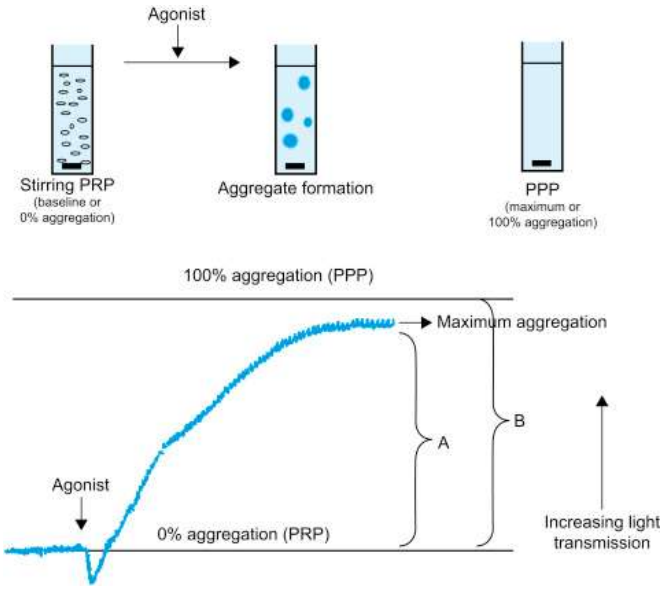


*Abbildung 7: Prinzip der LTA mit typischer Kurve nach Stimulation [8]*

### 2.1.3.4 *Definition von HTPR*

In dieser Arbeit wurde das Auftreten einer HTPR bei >20% MoA definiert, was der etabliertesten Definition entspricht [98, 99].

## 2.1.4 Datenerfassung

Bei Einschluss in die Studie wurden im Rahmen von Routinediagnostik Basischarakteristika, Ko-Medikation, Ko- Erkrankungen und Laborparameter der Patienten und Patientinnen bestimmt und dokumentiert. Die Laborparameter wurden im Zentrallabor des Uniklinikums Düsseldorf bestimmt. Die Daten wurden anonymisiert erhoben und gespeichert.

Nach Entlassung wurden die Patienten und Patientinnen im Schnitt 3,2 Jahre weiter beobachtet. Dies geschah im Rahmen von Routinekontrollen in der Ambulanz der kardiologischen Abteilung des Uniklinikums Düsseldorf. Dabei wurden Daten zu *major adverse cardiac and cerebrovascular events* (MACCE) innerhalb des Beobachtungszeitraumes erhoben. MACCE ist nicht klar einheitlich definiert. In unserer Studie haben wir die Parameter Tod, AMI, Schlaganfall, Revaskularisation eines Gefäßes und Blutungen evaluiert, was als gängigste Definition von MACCE gilt.

## 2.2 Klinischer Teil 2: Inflammation unter ASS Therapie

In diesem Abschnitt wurde untersucht, ob eine ASS HTPR Auswirkungen auf die parallel dazu bestimmten CRP Level bei kardiologischen Patienten und Patientinnen hat. CRP gilt als eines der wichtigsten Akut-Phase-Proteine und gibt daher Aufschluss über eine antiinflammatorische Wirkung von ASS.

Die Daten wurden aus einem gemischten Kollektiv verschiedener anderer Untersuchungen zusammengezogen. Die Blutentnahmen erfolgten jeweils im Zuge routinemäßiger Blutentnahmen während eines Aufenthalts in der kardiologischen Klinik, unabhängig davon ob ambulant oder stationär. Die Patienten wurden jeweils vor der Blutentnahme mündlich und schriftlich über das Procedere aufgeklärt. Die Laboranalyse erfolgte im Zentrallabor der Uniklinik Düsseldorf. Insgesamt befinden sich in dem Datensatz 913 Patientendaten. Davon wurde bei 890 Teilnehmenden eine ASS Medikation evaluiert. 649 davon nahmen 100mg ASS pro Tag ein. Die Daten wurden daraufhin bezüglich HTPR in der LTA untersucht. Als Grenzwert wurde 20% definiert. Daraufhin wurden die Teilnehmenden in die Gruppen HTPR und keine HTPR unter ASS, aufgeteilt und verglichen bezüglich ihres CRP Levels. 568 Patienten und Patientinnen fielen in die Kategorie ohne HTPR, 81 wiesen eine HTPR unter ASS auf.

Patientencharakteristika, welche standardmäßig erhoben wurden, werden ebenfalls gezeigt. Die Daten wurden anonymisiert bearbeitet. Die Messung durch LTA erfolgte analog zum oben beschriebenen~~,~~ klinischen Teil 1.

Die Versuche wurden vom Ethikkomitee der Uni Düsseldorf genehmigt mit der Studiennummer: 4658.

## 2.3 Tierexperimenteller Teil: Thrombozyten im AMI

Für den zweiten Teil der Dissertation wurden Mäuse auf die Wirkung von ASS und insbesondere die Thrombozytenfunktion im Myokardinfarkt untersucht. Die Tierversuche (Operationen, Echokardiographie, Blutentnahme, Organentnahme) wurden von Dr. Aysel Ayhan durchgeführt.

Die Experimente wurden vom Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen (LANUV NRW, Recklinghausen) genehmigt. Tierversuchsanträge: 84-02.04.2017.A154, 84-02.04.2017.A440

### 2.3.1 Tierhaltung

Bei den Mäusen, welche in den Tierversuchen verwendet wurden, handelt es sich um C57BL/6 Wildtyp Mäuse der Firma Jackson. Es wurden ausschließlich männliche Tiere im Alter von 10-15 Wochen mit einem Gewicht zwischen 22 und 30g verwendet. Diese wurden über die Zentrale Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben (ZETT) der Universität Düsseldorf bestellt und

gehalten. Die Pflege dort erfolgte durch das Fachpersonal der ZETT. Die Mäuse hatten innerhalb der ZETT einen 12h Tag-Nacht-Rhythmus mit halbstündiger Dämmerungsphase in vorgeschriebener Käfiggröße (mindestens 3-4cm² pro Gramm Körpergewicht). Die Luftfeuchte innerhalb der Haltungsräume beträgt 55% ±10%, die Temperatur zwischen 20 und 24°C, ein mindestens 15-facher Luftwechsel pro Stunde erfolgt. Eine regelmäßige Reinigung und Desinfektion der Käfige wurde durch Fachpersonal vorgenommen. Für die eigentlichen Versuche wurden die Tiere in das kardiologische Labor des UKD transportiert, wo sich die Operationsplätze für die Tiere befinden. Alle Arbeiten an den Tieren wurden durch erfahrene Tierexperimentatorinnen (Dr. Aysel Ayhan, Frau Stefanie Becher) durchgeführt.

### 2.3.2 Ischämie Reperfusion

Für die Versuche mit NaSS wurde das *open chest* Modell verwendet, für die Versuche mit depletierten Mäusen das *closed chest* Modell aufgrund eines deutlich erhöhten Blutungsrisikos.

Im Folgenden wird zunächst das *open chest* Modell erläutert: 30 Minuten vor Induktion der I/R erhielten die Mäuse eine subkutane Applikation mit dem Analgetikum Temgesic (0,1mg/kg KG).
Anschließend wurden die Tiere mittels 3% Isofluran in einer Narkosekammer narkotisiert und mittels einer Venenverweilkanüle (Vasofix® Safety 20G, B.Braun) intubiert. Nach erfolgter Intubation wurden die Tiere auf einem Wärmetisch (38°C) fixiert und mittels präoxygenierter Luft mit 3% Isofluran beatmet (140/min, Atemzugvolumen 200µl). Bei erreichter Areflexie der Tiere wurde die Isoflurankonzentration auf die Erhaltungsdosis von 2% reduziert. Während der gesamten Operation erfolgte ein Monitoring der Tiere mittels rektaler Temperatursonde und EKG. Vor Hautschnitt erfolgte eine Enthaarung des OP-Gebietes mittels Haarentfernungs-Creme (Veet®) und Desinfektion mittels Octenisept Spray. Die laterale Sternotomie erfolgte mittels Querinzision vom Sternum in Richtung des linken Vorderbeins. Nach Präparation durch die Brustmuskulatur erfolgte das Eröffnen des Brustkorbes durch einen Schnitt zwischen 3. und 4. Rippe. Durch Einsetzen von OP-Haken wurden die Rippen gespreizt und die Entfernung des Herzbeutels konnte erfolgen. Dadurch ergab sich eine Übersicht über das Herz und die LAD. Diese wurde lokalisiert und mittels eines 7-0 Prolenefadens unterstochen. Die Nadel wurde vom Faden abgetrennt und beide Fadenenden durch einen Polyethylenschlauch gezogen (Abb. 8). Durch Zug auf beide Fadenenden konnte so der Blutfluss in der LAD gestoppt werden. Zur

Erfolgskontrolle diente das EKG auf welchem durch den gestoppten Blutfluss typische Ischämiezeichen (ST-Hebungen) zu sehen waren. Durch Fixieren beider Fadenenden wurde diese Blockade für 30 Minuten aufrechterhalten. Nach Ablauf der Zeit wurden die Fadenenden gelöst und der Polyethylenschlauch entfernt. Dadurch kam es wieder zum Bluteinstrom, was zur Reperfusion führte. Der Faden wurde locker fixiert, um eine spätere Lokalisierung der Ischämiezone zu vereinfachen. Der Rippenbogen wurde mittels eines 5-0 Seidenfadens verschlossen, Muskulatur und Haut mittels eines 5-0 Prolenefadens. Die gesamte Operation erfolgte unter mikroskopischer Vergrößerung.

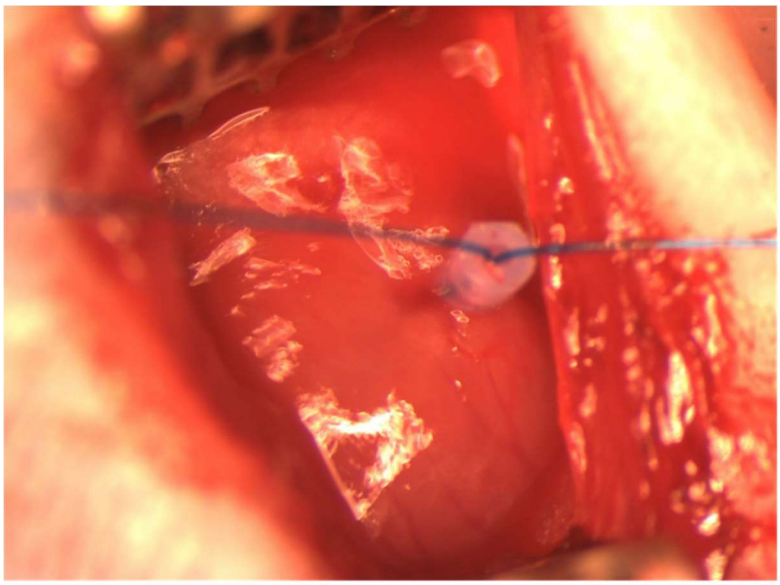

*Abbildung 8: Beispielfoto von LAD Ligatur einer Maus mit Fixierung durch Polyethylenschlauch*

Nach OP-Ende wurde das Isofluran ausgeschlichen und auf ein Einsetzen der Spontanatmung gewartet. Um ein Auskühlen zu verhindern, wurden die Tiere unter einer Wärmelampe gehalten. Postoperativ wurde eine Analgesie mittels Temgesic für drei Tage fortgesetzt.

Im Gegensatz zum hier beschriebenen *open chest* Modell, erfolgte beim *closed chest* Modell ein zweizeitiges Vorgehen. Es diente einer Minimierung der Blutungskomplikationen bei Depletion der Mäuse. Durch eine Vor-OP 4-7 Tage vor I/R wurde analog zum *open chest* Modell die LAD unterstochen und ein Polyethylenschlauch eingesetzt, allerdings ohne eine Ischämie auszulösen. Anschließend erfolgte der Verschluss des Brustkorbes, die Fadenenden wurden oberflächlich unter die Haut platziert. Am Tag der I/R wurden durch kleine Hautschnitte die Fadenenden aufgesucht und die LAD durch Zug an den Fadenenden verschlossen, ohne den Brustkorb erneut zu eröffnen. Es erfolgte analog zum *open chest* Modell eine Erfolgskontrolle der I/R mittels EKG.

### 2.3.3 Elektrokardiographie

Das EKG diente der nichtinvasiven Messung der elektrischen Aktivität des Herzens. Hierüber ließ sich der Erfolg der LAD-Ligatur kontrollieren. Als Erfolg wurde eine Steigung der ST-Strecke gewertet.

Die Ableitung erfolgte über drei Elektroden. Diese wurden an den beiden Vorderpfoten sowie an der rechten Hinterpfote angebracht. Die Aufzeichnung der Messung erfolgte mittels der Programme Iox.2 bzw. LabChart Pro 7.

### 2.3.4 Applikation von Medikamenten

Im tierexperimentellen Teil wurden im Wesentlichen drei Substanzen eingesetzt, um deren Wirkung und deren Zusammenspiel im akuten Myokardinfarkt zu untersuchen.

#### 2.3.4.1 Acetylsalicylsäure

Das ASS wurde in isotonischem Natriumchlorid (NaCl)-Lösung gelöst. Die Lösung enthielt 170mg ASS in 50ml NaCl. Die ASS Applikation erfolgte 30 Minuten vor I/R. 50µl der Lösung wurden in die Schwanzvene der Mäuse appliziert. Die Dosis entspricht ca. 7mg/kg KG ASS. Als Kontrolle dienten reine NaCl Applikationen.

#### 2.3.4.2 Natrium-Salizylat

Die Applikation von NaSS erfolgte 30 Minuten vor I/R über die Schwanzvene. NaSS wurde in isotonischem NaCl gelöst und 0,15mg wurden in 50µl appliziert. Zusätzlich wurden 38,1µg/Tag bis zur Euthanasie über das Trinkwasser der Mäuse verabreicht, um stabile Plasmaspiegel zu erhalten. Dabei wurde von einer Trinkmenge von 4ml pro Maus pro Tag ausgegangen.

#### *2.3.4.3 Depletion*

Um herauszufinden, ob die ASS Wirkung im AMI thrombozytenabhängig ist oder ob es auch thrombozytenunabhängige protektive Effekte im AMI gibt, wurden die Mäuse zusätzlich depletiert. Dies erfolgte durch Applikation des Antikörpers GpIbα (CD42b). Dieser in Ratten hergestellte Immunglobulin-G(IgG)-Antikörper bindet an den von-Willebrand Faktor Rezeptor der Mäusethrombozyten. Durch diese Bindung der Antikörper kommt es zur Immunantwort des Körpers und zum Abbau der Thrombozyten [100].

Die Applikation des Antikörpers erfolgte 1h vor Durchführung der I/R. Der Antikörper wurde mit 2µg/g KG dosiert und die benötigte Menge Antikörper eins zu eins mit *Dulbecco's Phosphate buffered saline* (PBS) verdünnt. Die Lösung wurde in die Schwanzvenen der Mäuse appliziert. Insgesamt wurden 100µl pro Maus appliziert. Der Erfolg der Depletion wurde mittels Blutbildkontrollen einen Tag nach der letzten Depletionsbehandlung kontrolliert. Hierzu wurden die Mäuse mittels 3% Isofluran betäubt bis zur Areflexie. Anschließend erfolgte die Blutentnahme mittels Glaskapillare aus dem retrobulbären Venenplexus. Maximal wurden ca. 60µl Blut entnommen.

### 2.3.5 Transthorakale Echokardiographie

Die Transthorakale Echokardiographie (TTE) dient der nicht-invasiven Darstellung der Herzfunktion.

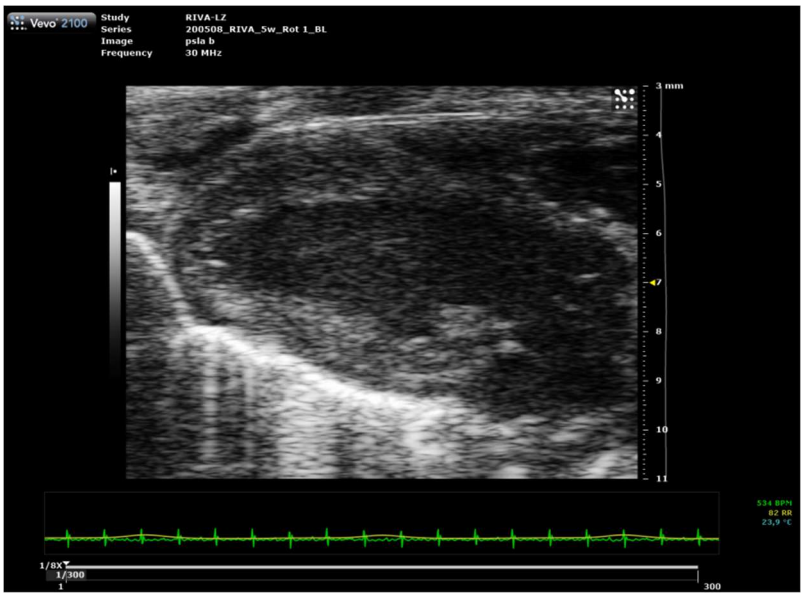

*Abbildung 9: Beispielbild transthorakale Echokardiographie bei einer Maus*

In den Versuchen wurde 24h vor I/R sowie 24h post I/R eine TTE durchgeführt. Dazu wurde das Ultraschallgerät Vevo 2100 und der 18-38 MHz Schallkopf MS400 (VisualSonics, Fujifilm) verwendet. Zunächst wurden die Tiere in eine Narkosekammer mit 3% Isofluran und 40% Sauerstoff gesetzt. Bei eingesetzter Narkose wurden sie auf dem Heiztisch gelagert und die Schnauze in der Narkosemaske gelagert. Zusätzlich wurden die Tiere in Rückenlage mit Fixation der Extremitäten gelagert. Eine Temperatursonde wurde rektal eingeführt und eine permanente Überwachung der Herz- und Atem-Frequenz mittels Kontakt-Pads gewährleistet. Die Isoflurankonzentration wurde auf 1,5% Erhaltungsdosis reduziert. Wie bei der oben beschriebenen I/R wurde anschließend der Thoraxbereich mittels Veet Haarentfernungs-Creme enthaart und vorgewärmtes Ultraschallgel aufgetragen.

Der Schallkopf wurde mittels Halterung positioniert, um die standardisierten Aufnahmen durchzuführen. Hierzu zählen: parasternale Längsachse des linken Ventrikels in B-Bild und M-Mode (Ableitung über Zeitachse), parasternale kurze Achse beider Ventrikel in B-Bild und M-Mode sowie eine Flussgeschwindigkeitsmessung der Flüsse in den Ventrikel mittels Dopplersonographie. Nach Beendigung der Aufnahme wurden die Isofluranzufuhr abgedreht und die Fixierung gelöst. Nach dem Wiedererlangen des Bewusstseins wurden die Mäuse in die jeweiligen Käfige zurücktransferiert.

Die Auswertung der Aufnahmen erfolgte mittels VevoLab 2.2.0. Diese wurden standardisiert manuell durchgeführt. Über eine Ermittlung der enddiastolischen und endsystolischen Volumina im linken Ventrikel ließen sich Schlagvolumen (SV) (Differenz enddiastolisches Volumen und endsystolisches Volumen), Schlagvolumenindex (SVI) (SV pro Körperoberfläche) und Ejektionsfraktion (EF) (Schlagvolumen/ enddiastolisches Volumen x 100%) berechnen. Über Aufnahmen im M-Mode ließen sich Wanddicke und linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser (LVEDD) sowie linksventrikulärer endsystolischer Durchmesser (LVESD) bestimmen. Über diese beiden Werte konnte man wiederum das *fractional shortening* (FS) ((LVEDD - LVESD / LVEDD) x 100) bestimmen. Zusätzlich ließen sich über

die obengenannten Dopplermessungen direkt die Flussgeschwindigkeiten über Mitralklappe sowie Aortenklappe bestimmen.

All diese Messungen dienen der Bestimmung der Herzfunktion bei den Tieren. So kann beispielsweise eine Herzinsuffizienz oder ein Klappenvitium diagnostiziert werden.

### 2.3.6 Probenentnahme

#### *2.3.6.1 Organentnahme& finale Blutentnahme*

Die Tötung der Tiere erfolgte mittels intraperitonealer finaler Narkose. Diese setzte sich aus 100mg/kg Körpergewicht Ketamin und 10mg/kg Körpergewicht Xylazin zusammen. 1000 I.E Heparin wurde appliziert, um ein Gerinnen des Blutes zu verhindern. Nach Überprüfen von vorhandener Areflexie wurden die Mäuse durch Verbluten euthanasiert. Dies erfolgte über eine Punktion des retrobulbären Venenplexus mittels einer Glaskapillare. Nach dem Tod erfolgte die Entnahme des Herzens der jeweiligen Maus. Sofort wurden die Herzen entweder in 4 % Paraformaldehyd gelegt, um in weiterer Folge eine histologische Untersuchung durchzuführen, oder für die 2,3,5-Triphenyltetrazolinumchlorid (TTC)-Färbung vorübergehend in einer Kaltschale gelagert.

### 2.3.7 Histologische Untersuchungen

#### *2.3.7.1 2,3,5-Triphenyltetrazolinumchlorid Färbung*

Diese Färbung diente der Bestimmung der Infarktgröße der Mäuseherzen.

Wie oben beschrieben wurden die Herzen direkt nach der Entnahme zunächst in einer Kaltschale gelagert. Anschließend wurden die Herzen von umliegenden Geweberesten befreit und mit NaCl-Lösung gespült, um Blutreste zu entfernen. Infolge wurden die Herzen mit Evans-Blue Lösung retrograd über die Aorta durchspült. Dies ermöglicht ein Aufdecken der Areale, welche von dem Gefäß perfundiert waren, welches bei I/R ligiert wurde, die sogenannte „area at risk“ (AAR). Im nächsten Schritt wurden die Herzen für mindestens eine Stunde bei -20°C eingefroren. Nach Ablauf der Zeit wurden die Herzen zunächst gewogen und anschließend händisch in ca. 1mm dicke Scheiben geschnitten, wobei die Schnittrichtung im rechten Winkel zur Längsachse erfolgte. Die Schnitte wurden in die TTC Lösung überführt und für 5 Minuten in Dunkelheit bei 37°C inkubiert. Die gefärbten Schnitte wurden auf einen Objektträger nebeneinandergelegt und mit einer 1,25-fachen Vergrößerung abfotografiert (Leica Fluoreszenzmikroskop DM4000 M).

Die Fotos wurden mit der Software DiskusView ausgewertet. Unterscheiden lässt sich einerseits das gesamte betroffene Areal der I/R, die AAR, welches sich nicht mit Evans Blue verfärbt darstellt. Andererseits ließ sich die Infarktgröße (IS) durch die TTC-Färbung ermitteln. Die IS ergab sich aus der Unterscheidung von vitalem Gewebe (rot) und totem Gewebe (weiß). Aus AAR und IS ließ sich der

wichtige Parameter IS/AAR bestimmen. IS/AAR gibt an, wieviel des potenziell betroffenen Gewebes des I/R, avitales Gewebe ist.

#### *2.3.7.2 Immunhistochemische Färbungen*

Diese Färbungen dienten weiteren Immunologischen Analysen der Mäuseherzen.

Die Mäuseherzen wurden in 4 % Paraformaldehyd für 24h eingelegt. Anschließend wurden sie im Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie der Heinrich-Heine-Universität mit dem Tissue Tek VIP E150/E30 entwässert. Nach dem Entwässerungsschritt erfolgte die Einbettung in Paraffin mit der Paraffinausgießstation EG1150H. Hierbei wurden die Herzen in aufrechter Position in den jeweiligen Containern fixiert, mit Paraffin aufgefüllt und anschließend auf der integrierten Kühlplatte aushärten gelassen. Die Schnitte der Herzen erfolgte von apikal nach basal. Mithilfe des Mikrotoms (Jung Biocut 2035, Leica) wurden 5µm dicke Schnitte hergestellt. Es wurden pro Ebene 10 Schnitte angefertigt, beginnend mit den apikalen Anteilen der Herzen. Zwischen den Ebenen erfolgte ein Verschnitt von 250µm. Pro Herz wurden 10 Ebenen mit jeweils 10 Schnitten angefertigt. Die Schnitte wurden in ein 37°C warmes Wasserbad überführt und von dort aus auf die Objektträger aufgebracht. Bis zur weiteren Bearbeitung wurden die Schnitte mindestens 24h komplett durchtrocknen gelassen.

Zum Färben der Schnitte wurden diese zunächst mittels einer Alkoholreihe entparaffiniert. Hierzu wurden die Schnitte 2x 10 Minuten in Roticlear getaucht. Anschließend 2x1 Minuten in Roticlear, dann jeweils eine Minute in einer absteigenden Ethanol-Reihe. Beginnend mit 2x100% Ethanol, dann 2x 96% Ethanol, dann 2x70% Ethanol, danach noch eine Minute in destilliertem Wasser. Anschließend erfolgte die jeweilige Färbung der Schnitte.

##### 2.3.7.2.1 MAC-2

Die MAC-2 Färbung diente der Darstellung von Makrophagen in Geweben [101, 102].

Nach erfolgter Entparaffinierung der Schnitte erfolgte ein Block der Peroxidase mit 3% $H_2O_2$ gelöst in Methanol für 10 Minuten. Dieser Schritt diente der Blockierung unspezifischer Peroxidasen im Gewebe, welche in späteren Schritten zu unspezifischen Signalen im Gewebe führen könnten. Anschließend erfolgten drei Waschschritte mit PBS für jeweils eine Minute. Die Applikation von monoklonalem Rat Anti Mouse Mac-2 bzw. der Negativkontrolle Rat Gamma Globulin erfolgte verdünnt in 3% Ziegenserum mit einer Endkonzentration von 0,25µg/ml. Pro Schnitt wurden 50µl Antikörperlösung appliziert, sodass dieser komplett von der jeweiligen Lösung bedeckt war. Die Antikörper wurden für eine Stunde bei Raumtemperatur auf den jeweiligen Schnitten belassen. Danach erfolgten drei Waschschritte mit jeweils einer Minute in PBS. Der sekundäre Goat Anti Rat IgG Antikörper wurde in 3% Ziegenserum gelöst mit 5µg/ml als Endkonzentration auf die Schnitte aufgebracht. Es wurden 50µl pro Schnitt appliziert und diese für 30 Minuten bei Raumtemperatur

belassen. Anschließend wurden drei Waschschritte mit PBS durchgeführt. Als nächsten Schritt wurde Streptavidin POX in PBS verdünnt und mit 4µg/ml Endkonzentration auf die Schnitte aufgebracht. Pro Schnitt wurden 50µl für 45 Minuten bei Raumtemperatur belassen. Anschließend erfolgten drei Waschschritte mit PBS. Die Farbentwicklung erfolgte mit dem DAB-Substrate Kit. Pro Schnitt wurden zwei Tropfen der fertigen Lösung appliziert und für 4 Minuten inkubiert. Anschließend erfolgte ein Waschschritt mit destilliertem Wasser. Um eine Kernfärbung der Schnitte zu erreichen, wurden die Schnitte für 20 Sekunden in Hämalaun GILL II getaucht. Das Bläuen der Schnitte erfolgte dann unter fließendem Leitungswasser für 5 Minuten. Anschließend erfolgte die Fixierung der Schnitte. Hierzu wurde eine aufsteigende Alkoholreihe in umgekehrter Reihenfolge, wie im letzten Absatz von 2.3.7.2.1 beschrieben, durchgeführt. Das Eindecken der Schnitte erfolgte mittels EUKITT *mounting medium* und eines Deckglases. Die Färbung zeigte nun braune MAC-2 positive Zellen und blaue Zellkerne. Vor dem Mikroskopieren wurden die Schnitte mindestens 24h in einer Objektträgermappe gelagert, um ein komplettes Durchtrocknen zu gewährleisten. Sämtliche Inkubationsschritte erfolgten ohne Einfluss von Licht.

#### 2.3.7.2.2 Ly6G$^+$

Die LY6G$^+$ Färbung dient der Darstellung von neutrophilen Granulozyten im Gewebe [103].

Die Färbung erfolgte methodisch analog zur oben genannten MAC-2 Färbung. Nach erfolgter Entparaffinierung wurde hier ebenfalls mit 3% $H_2O_2$ unspezifischer Peroxidase Aktivität inhibiert. Der Ly6G-Antikörper wurde mit 3% Ziegenserum verdünnt und in einer Verdünnung von 0,25 µg/ml mit einem Volumen von 50µl auf die Schnitte aufgebracht. Als Negativkontrolle wurden Negativ-Kontrollantikörper in der gleichen Konzentration, Verdünnung und Menge auf die Schnitte aufgetragen. Die Antikörper wurden für 60 Minuten bei Raumtemperatur und Dunkelheit inkubiert. Anschließend erfolgten drei Waschschritte von jeweils eine Minute in PBS. Ab diesem Schritt erfolgte die Färbung ident zur MAC-2 Färbung.

Als Resultat dieser Färbung waren die Zellkerne blau gefärbt und LY6G$^+$ gefärbte Zellen braun.

#### 2.3.7.2.3 Auswertung Immunhistochemie

Die Auswertung der Schnitte erfolgte frühestens 24h nach der Färbung, um ein komplettes Trocknen zu garantieren. Es wurden Fotos der Schnitte mit dem Leica Fluoreszenzmikroskop DM4000 M in 2,5-Facher Vergrößerung gemacht. Die Auswertung erfolgte anschließend mittels der Bildbearbeitungssoftware ImageJ. Hier erfolgte eine quantitative Analyse der braun gefärbten Areale im Vergleich zur gesamten Schnittfläche bzw. im Verhältnis zu rechtem und linkem Ventrikel.

# 3 Material

## 3.1 Klinischer Teil

Blutentnahme:

- Butterfly: BD Safety-Lok™ Blutentnahmeset
- BD Vacutainer, Röhrchen mit Na-Citrat gepuffert 3,8 %

LTA/Puffer

- Thrombozytenmedium-Puffer (pH=7,4):
  134,00 mM NaCl, 12,00 mM NaHCO3, 2,90 mM KCl, 0,36 mM NaH2PO4 x 2H2O, 1,00 mM MgCl2 x 6H2O, 5,00 mM HEPES
- ARA, Oxford Biomedical Research, Oxford/Michigan, USA
- Apact, Labitec, Ahrensburg, Deutschland

## 3.2 Tierexperimenteller Teil

### 3.2.1 Tiere:

- C57BL/6 Wildtyp Mäuse- Männliche Tiere von Janvier bzw. Jackson Laboratory

### 3.2.2 Materialien

- Temgesic: Indivior, PZN:345928
- Venenverweilkanüle (Vasofix® Safety 20G, B.Braun) (Intubation)
- Veet Haarentfernungs-Creme: Reckitt Benckiser, Artikelnummer: 7768307
- Octenisept®: Schülke & Mayr, Artikelnummer: 03853401
- Seraflex® 5/0: Serag Wiessner, Artikelnummer: IC108000
- Prolene™ 7-0 (0,5 Ph.Eur.): Ethicon®, Artikelnummer: EH7405
- Prolene™ 5-0 (1 Ph.Eur.9): Ethicon®, Artikelnummer: EH7231
- PBS: SIGMA, D8537-500ml, Lot. No.: RNBG5988

### 3.2.3 Geräte

- Vevo 2100 (Ultraschallgerät)
- 18-38 MHz Schallkopf MS400 (VisualSonics, Fujifilm)
- Leica Fluoreszenzmikroskop DM4000 M
- Tissue Tek VIP E150/E300: Sakura Finetek
- Paraffinausgießstation EG1150H: Leica Biosystems
- Mikrotom (Jung Biocut 2035, Leica)

### 3.2.4 Software

- VevoLab 2.2.0 VisualSonics Fujifilm
- Iox.2 EMKA
- LabChart Pro 7 ADInstruments
- DiskusView
- ImageJ, Freeware

### 3.2.5 Medikamente

- Ketaset® S Ketamin: Zoetis, Artikelnummer: 12467832
- Rompun® Xylazin: Bayer, Artikelnummer: 1320422
- GPIbα(CD42b): Emfret, Artikelnummer: R300
- NaSS Sigma, CAS-Nummer: 54-21-7
- Heparin-Natrium (25.000 I.E./5 ml, B.Braun, PZN:9929393)

### 3.2.6 Färbungen

- 2,3,5-Triphenyltetrazolinumchlorid: Sigma, CAS-Nummer: 298-96-4
- Paraformaldehyd ROTI®Histofix 4 %, 500 ml: Roth
- Evans Blau: Fluka, Artikelnummer: 46160
- Roticlear®: CarlRoth, Artikelnummer: 1529
- Monoclonal Rat Anti Mouse Mac-2: Cedarline, Artikelnummer #CL8942AP
- Rat Gamma Globulin: Jackson Immuno, Artikelnummer: #012-000-002
- Goat Anti Rat IgG Biotin: Sigma, Artikelnummer: #B7139
- Streptavidin POX: Dianova (Jackson Immuno), Artikelnummer: #016-030-034
- DAB-Substrate Kit: ZYTOMED Systems, Artikelnummer: DAB057
- EUKITT mounting medium, Merck, Artikelnummer: 03989-100ML
- Anti-Ly6g antibody: Abcam, Artikelnummer: ab25377

# 4 Ergebnisse

## 4.1 Klinischer Teil 1: Kardiale Ereignisse unter ASS Therapie

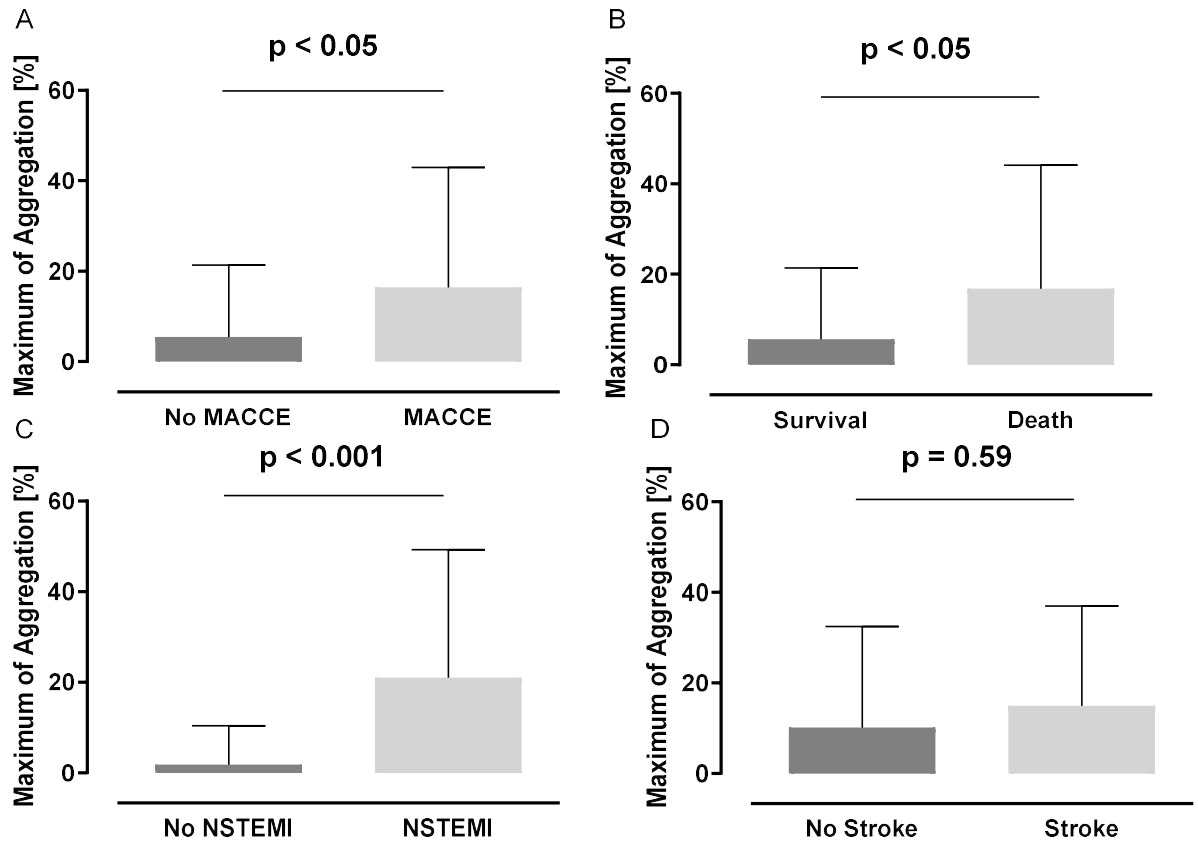


**Abbildung 10: Vergleich des Outcomes von Patienten und Patientinnen mit KHK und ASS Therapie bezüglich MoA**

A: MoA: Patienten und Patientinnen ohne MACCE[38]: 5,40% ± 15,98% vs. Patienten und Patientinnen mit MACCE[34]: 16,41% ± 26,59%, p=0,0347, B: MoA: Patienten und Patientinnen ohne tödliches Ereignis[40]: 5,61% ± 15,74% vs. Patienten und Patientinnen mit tödlichem Ereignis [32]: 16,83% ± 27,26%, p=0,6061, C: MoA: Patienten und Patientinnen ohne NSTEMI [39]: 1,77% ± 8,61% vs. Patienten und Patientinnen mit NSTEMI [33]: 21,04% ± 28,22%, p=0,0005, D: MoA: Patienten und Patientinnen ohne Schlaganfall [65]: 10,13% ± 22,32% vs. Patienten und Patientinnen mit Schlaganfall [7], p=14,93% ± 22,02%, p=0,5904, alle Abbildungen: ungepaarte T-Tests [104]

Um eine präventive ASS-Wirkung bezüglich kardiovaskulärer Ereignisse zu untersuchen, wurden Patienten und Patientinnen unter ASS Therapie bezüglich LTA untersucht und anschließend auf kardiovaskuläre Ereignisse gescreent. Es zeigte sich, dass in der Kohorte, welche während des Beobachtungszeitraumes verstarben, MACCE oder NSTEMI erlitten, signifikant höhere MoA gemessen wurden im Vergleich zu jenen Patienten und Patientinnen, bei welchen diese Ereignisse nicht auftraten. Für Schlaganfälle galt dieser Zusammenhang nicht, allerdings wurden auch nur 7 Schlaganfälle, und damit deutlich weniger als in den anderen Kohorten, dokumentiert. Insgesamt zeigt

sich so ein Zusammenhang aus vermindertem Ansprechen auf ASS Therapie und danach auftretenden kardiovaskuläre Ereignissen.

| Characteristic | Study group ($n = 72$) |
|---|---|
| Age, years, mean ± SD | 77±12 |
| Gender, male, *n* (%) | 40 (56) |
| Body mass index, mean ± SD | 26±4.2 |
| Cardiovascular risk factor, *n* (%) | |
| Hypertension | 72 (100) |
| Hypercholesterolemia | 50 (69) |
| Diabetes mellitus | 33 (46) |
| Obesity[a] | 13 (18) |
| Other medical history, *n* (%) | |
| Previous myocardial infarction | 38 (53) |
| Previous bypass surgery | 19 (26) |
| Previous stroke | 8 (11) |
| Reduced systolic LV-function[b] | 38 (53) |
| Impaired renal function[c] | 46 (64) |
| Atrial fibrillation | 20 (28) |
| Number of diseased vessels, *n* (%) | |
| 3 Vessel disease | 47 (65) |
| 2 Vessel disease | 8 (11) |
| 1 Vessel disease | 6 (8) |
| Microangiopathy | 11 (15) |
| Clinical presentation, *n* (%) | |
| STEMI | 3 (4) |
| NSTEMI | 16 (22) |
| Unstable angina pectoris | 11 (15) |
| Chronic coronary syndrome | 42 (58) |
| Medication, *n* (%) | |
| Aspirin | 72 (100) |
| P2Y12 inhibitors | 54 (75) |
| ACE-/AT-II-receptor-inhibitors | 56 (77) |
| Beta-blockers | 60 (83) |
| Calcium-channel inhibitors | 31 (43) |
| Aldosterone antagonists | 13 (18) |
| Cardiac glycosides | 2 (3) |
| Proton-pump inhibitors | 47 (65) |
| Statins | 50 (69) |
| Oral antidiabetics | 8 (11) |
| Insulin | 14 (19) |
| Uricosurics | 14 (19) |

**Tabelle 1: Patientencharakteristika der Studienpopulation aus Abbildung 10**

Angegeben in Mittelwert ± Standardabweichung bzw. betroffene Prozent der Studienpopulation [104].

Die Patientencharakteristika zeigen ein typisches, kardiologisch-vorerkranktes Patientenkollektiv. Alle Untersuchten wiesen eine arterielle Hypertonie auf. Darüber hinaus bestand bei 69% Hypercholesterinämie, bei 46% Diabetes mellitus. Dementsprechend wurden auch andere Medikamente eingenommen.

## 4.2 Klinischer Teil 2: Inflammation unter ASS Therapie

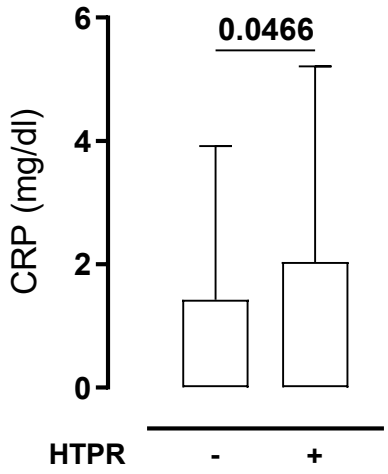


**Abbildung 11: CRP in ASS Patienten und Patientinnen ± HTPR**

CRP: keine HTPR [568]: 1,42 mg/dl ± 2,49 mg/dl vs. HTPR [81]: 2,04 mg/dl ± 3,17 mg/dl, p= 0,0466, Mann-Whitney Test

CRP ist einer der entscheidenden Inflammationsparameter und gilt als unabhängiger Risikofaktor von kardiovaskulären Ereignissen [5, 55]. An 649 kardiologischen Patienten und Patientinnen wurde untersucht, ob eine verminderte thrombozytenfunktionshemmende Wirkung durch ASS, definiert als HTPR in der LTA mit Werten >20% MoA, zu veränderten CRP Spiegeln führt. Es zeigte sich, dass Patienten, welche eine HTPR unter ASS Therapie aufwiesen, signifikant höhere CRP Level im Blut haben.

| Charakteristika | |
|---|---|
| Alter (Jahre) ± SD | 72,90 ± 13,75 |
| Geschlecht männlich % | 61,01 % |
| BMI ± SD | 27,01 ± 5,187 |
| **CV- Risikofaktoren % vorhanden** | |
| Nikotinabusus | 28,08 % |
| Hypertonie | 78,86 % |
| CKD | 55,86 % |
| Hypercholesterinämie | 26,36 % |
| **CV- Ereignisse in der Vergangenheit %** | |
| AMI | 33,84 % |
| Schlaganfall | 12,61 % |
| Bypass OP | 17,6 % |
| **Co-Medikation % Einnahme** | |
| P2Y12-Inhibitoren | 65,46 % |
| ACE-Hemmer | 52,03 % |
| Beta-Blocker | 68,12 % |
| Kalziumkanal Blocker | 30,32 % |
| Diuretika | 53,48 % |
| NSAIDs | 1,14 % |
| Opioide | 10,95 % |

**Tabelle 2: Patientencharakteristika der Patienten und Patientinnen aus Abbildung 11**

Angaben in % der betroffenen Patienten und Patientinnen

Die Patienten und Patientinnen aus Abbildung 11 stellen ein typisches, kardiologisch vorerkranktes Patientenkollektiv dar. So weisen beinahe 80% der Patienten und Patientinnen eine Hypertonie auf, über 50% leiden unter einer Niereninsuffizienz, viele haben eine Begleitmedikation mit häufig eingesetzten Medikamenten wie P2Y12 Inhibitoren, ACE Hemmern, Betablockern oder Diuretika.

## 4.3 Muriner Teil Natriumsalicylat im AMI

### 4.3.1 Infarktgröße

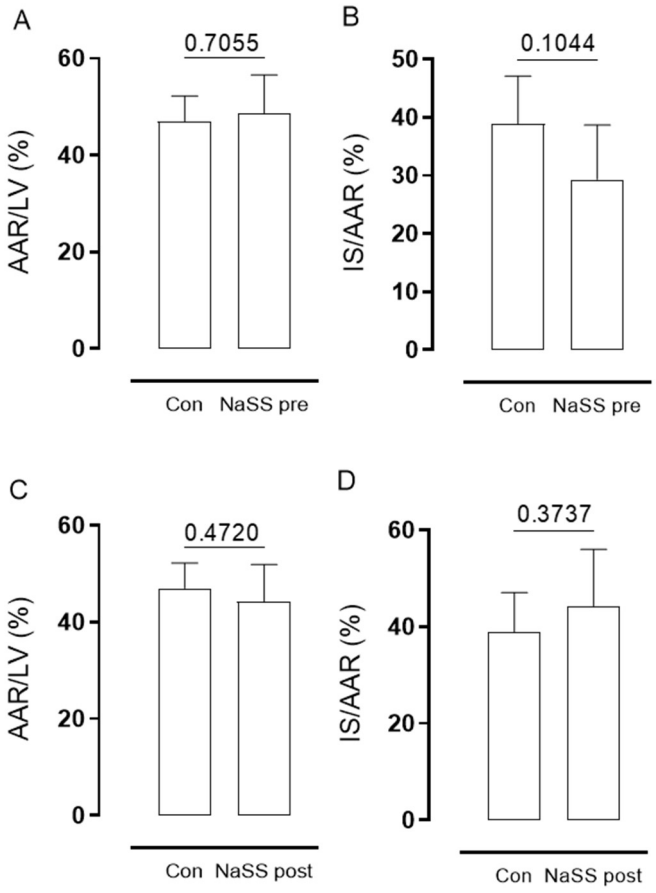


**Abbildung 12: Vergleich der AAR/LV und IS/AAR post I/R für Con und NaSS 30 Minuten vor I/R und NaSS 15 Minuten post I/R**

A: AAR/LV: Con [6]: 47,04 % ± 5,21 % vs. NaSS pre [5]: 48,6 % ± 8,01 %, p= 0,7055, B: IS/AAR: Con [6]: 38,89% ± 8,22% vs. NaSS pre [5]: 29,34% ± 9,33%, p=0,1044, C: AAR/LV: Con [6]: 47,04 % ± 5,21 % vs. NaSS post [7]: 44,28 % ± 7,66 %, p= 0,4720, D: Con [6]: 38,89% ± 8,22% vs. NaSS post [7]: 44,22 % ± 11,81 %, p= 0,3737, Alle Abbildungen: ungepaarte T-Tests

NaSS ist ein Salizylat mit kaum vorhandener Thromboxansynthesehemmung [6, 84]. Um seine Wirkung im AMI zu untersuchen, wurde es Mäusen in einer Gruppe (Abb. 12, A/B) 30 Minuten vor I/R Induktion injiziert, in einer zweiten Gruppe (Abb. 12 C/D) 15 Minuten post I/R Induktion.

Es zeigen sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich der AAR/LV sowie der IS/AAR in beiden Gruppen (Abb. 12). Es zeigt sich ein Trend zu kleinerer IS/AAR in der NaSS pre Gruppe, welche NaSS 30 Minuten vor I/R bekam. Dieser Trend ist nicht signifikant (P=0,1044, Abb. 12. B). Insgesamt ergibt sich so ein Bild, welches keinen Benefit von NaSS im AMI bei Mäusen zeigt. Dies ist ein Hinweis, dass die fehlende Thrombozytenfunktionshemmung zu einer fehlenden Wirkung im AMI führt.

### 4.3.2 Echokardiografie

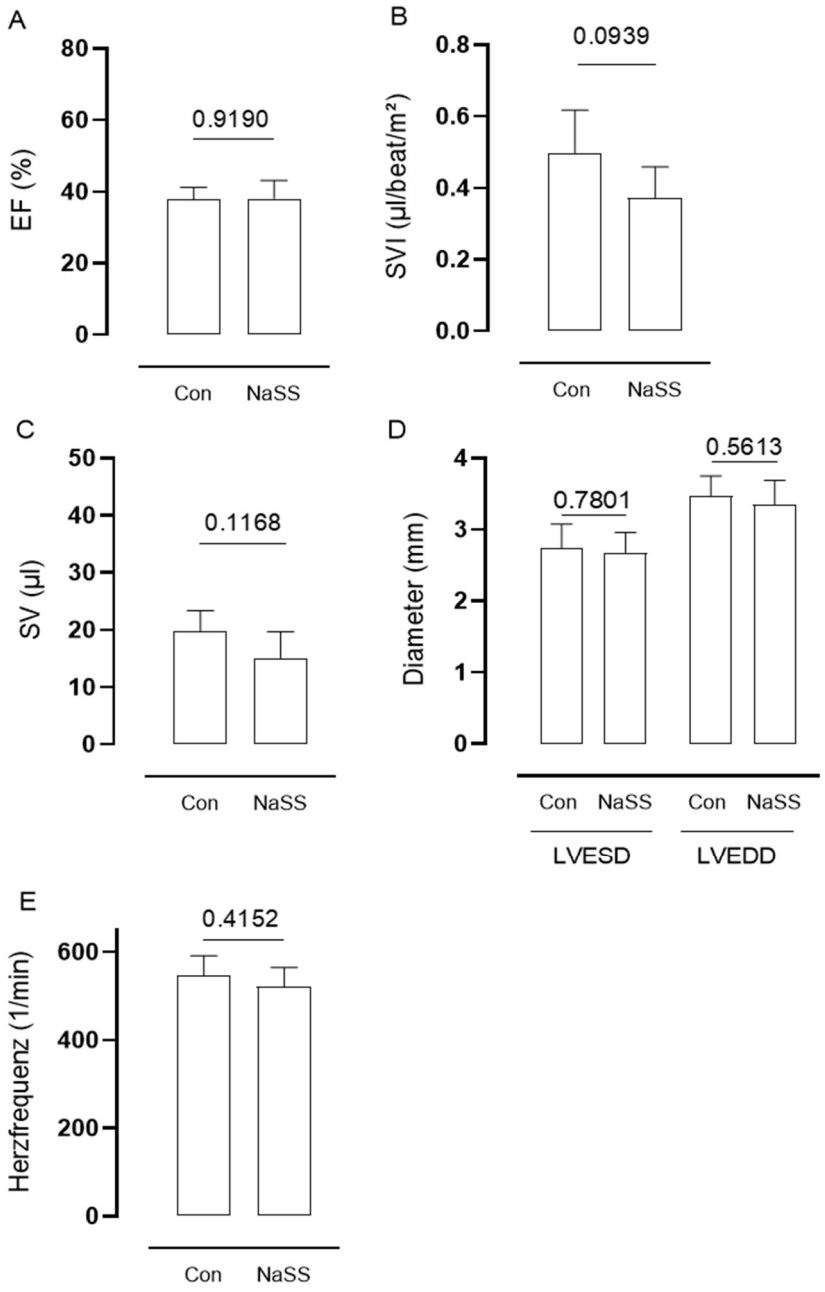


**Abbildung 13: Echokardiographie 24h post I/R und nach Gabe von NaSS pre bzw. Con (NaCl)**

A: EF: Con [5]: 37,84 % ± 3,39 % vs. NaSS [5]: 38,12 % ± 5,06 %, p=0,919, B: SVI: Con [5]: 0,50 µl/beat/m2 ± 0,12 µl/beat/m2 vs. NaSS [5]:0,37 µl/beat/m2 ± 0,09 µl/beat/m2, p=0,0939, C: SV: Con [5]: 19,73 µl ± 3,69µl vs. NaSS [5]: 15,10 µl ± 4,58 µl, p=0,1168, D: LVESD: Con [5]: 2,74 mm ± 0,34 mm vs. NaSS [5]: 2,68 mm ± 0,28 mm, p= 0,7801, LVEDD: Con [5]: 3,47 mm ± 0,28 mm vs. NaSS [5]: 3,35 mm ± 0,34 mm, p= 0,5613, E: Herzfrequenz: Con [5]: 545,7/min ± 45,86/min vs. NaSS [5]: 521,3/min ± 43,76/min, p= 0,4152, (Alle Abbildungen: ungepaarte T-Tests)

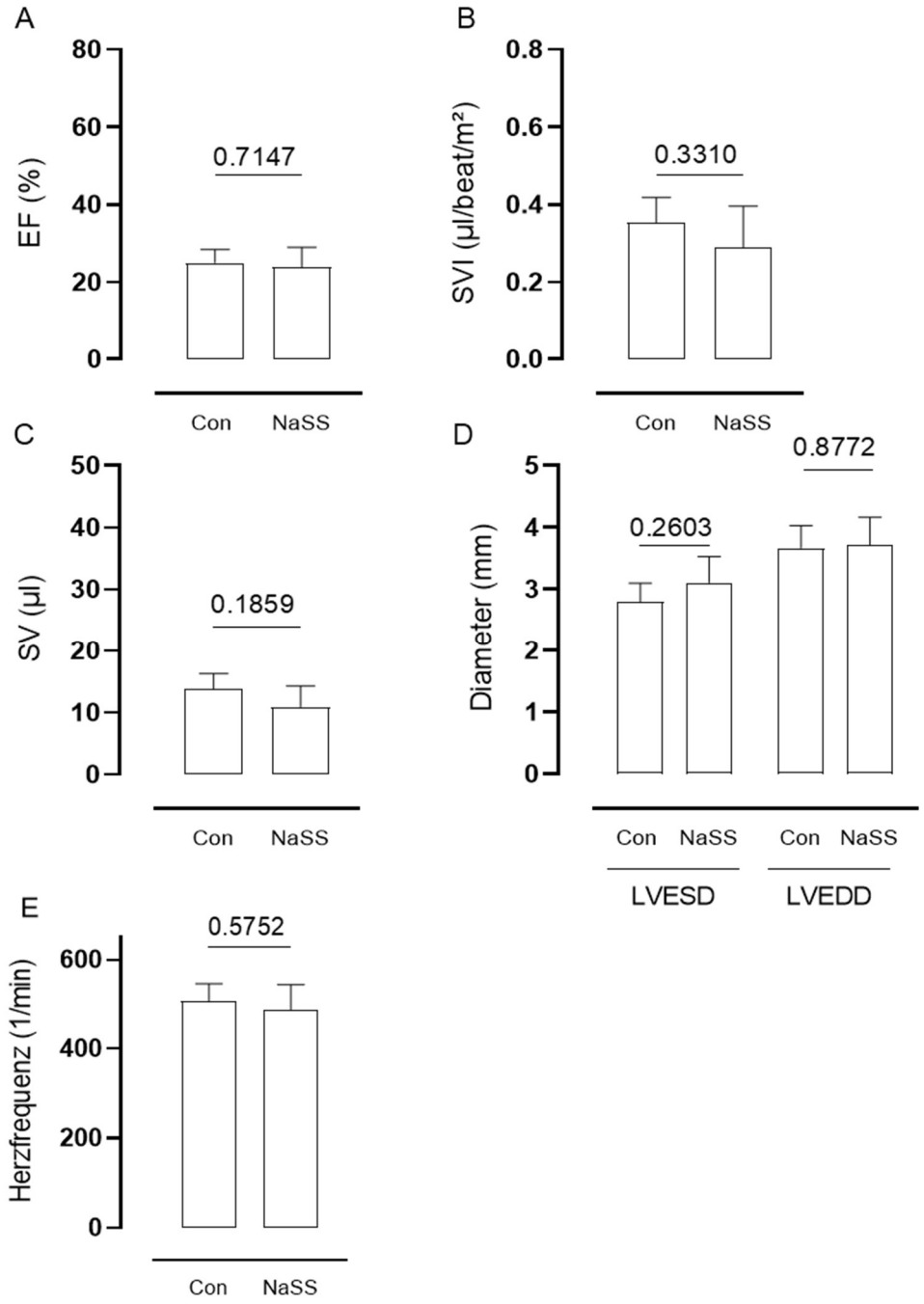


**Abbildung 14: Echokardiographie 21 Tage post I/R und nach Gabe von NaSS pre bzw. Con (NaCl)**

A: EF: Con [4]: 25,05% ± 3,41% vs. NaSS [5]: 23,90% ± 5,19%, p=0,7147, B: SVI: Con [4]: 0,35µl/beat/m2 ± 0,06µl/beat/m2 vs. NaSS [5]: 0,29µl/beat/m2 ± 0,11µl/beat/m2, p=0,3310, C: SV: Con [4]: 13,86µl ± 2,41µl vs. NaSS [5]: 10,90µl ± 3,39µl, p=0,1859, D: LVESD: Con [4]: 2,80mm ± 0,30mm vs. NaSS [5]: 3,11mm ± 0,42mm, p=0,2603, LVEDD: Con [4]: 3,67 mm ± 0,36 mm vs. NaSS [5]: 3,71mm ± 0,45 mm, P=0,8772, E: Herzfrequenz: Con [4]: 505,7/min ± 38,75/min vs. NaSS [5]: 486,2/min ± 56,18/min, p= 0,5752, (Alle Abbildungen: ungepaarte T-Tests)

Die echokardiografische Untersuchung (Abb. 13&14) gibt entscheidende Hinweise auf das funktionelle Outcome nach AMI. NaSS wurde in Analogie zu den Tieren aus Abb. 12 bei denen ein Trend zu kleinerer IS/AAR zu erkennbar war, 30 Minuten vor I/R appliziert. Als Messzeitpunkte wurde sowohl 24h post

I/R als auch 21 Tage post I/R gewählt, um einerseits frühe Veränderungen, als auch Mittel bis Langzeitfolgen zu detektieren. Es wurden jeweils Con und NaSS verglichen. In den Echokardiografien welche 24h post I/R angefertigt wurden, zeigten sich keine signifikanten Veränderungen (Abb. 13). Interessanterweise zeigte sich sogar ein Abfall des SVI um 26%, allerdings nicht signifikant (Abb. 13, p=0,0939). Der SVI ist im Vergleich zum normalen SV bezogen auf die Körperoberfläche. So gibt er Aufschluss über die Pumpleistung des Herzens unabhängig von der Körpergröße.

Bezüglich der echokardiografischen Langzeitdaten von NaSS zeigte sich ein ähnliches Bild. So ergaben sich 21 Tage post I/R ebenfalls keine signifikanten Veränderungen (Abb. 14) zwischen Con und NaSS. Dies zeigt, dass es neben der fehlenden Verminderung der IS/AAR auch keine Verbesserung des funktionellen Outcomes durch NaSS gab.

## 4.4 Muriner Teil Depletion im AMI

### 4.4.1 Infarktgröße

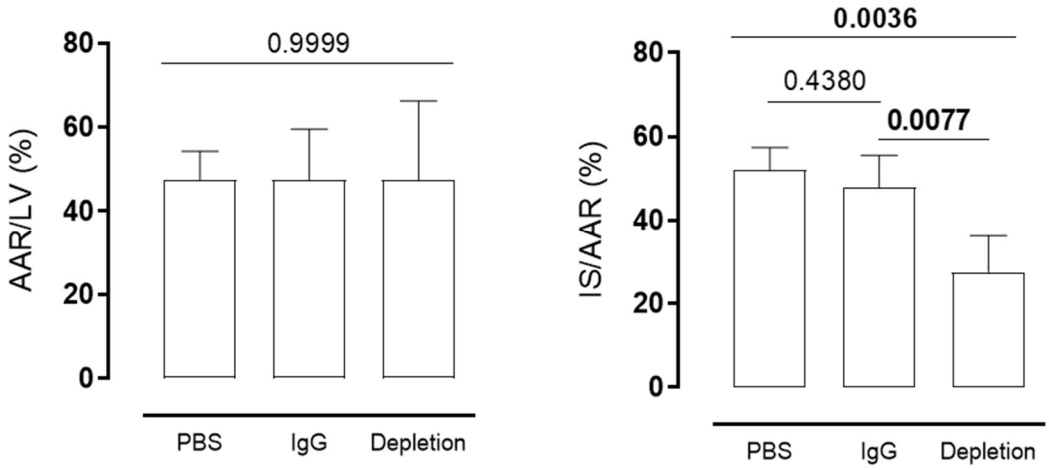


**Abbildung 15: Infarktgröße von Mäusen post I/R und Depletion bzw. post I/R und Kontrolle mit PBS und IgG**

A: AAR/LV post I/R PBS [n=3]: 47,46% ± 6,89% vs. IgG [n=5] : 47,49% ± 12,07% vs. Depletion [n=4]: 47,34% ± 18,88%, p=0,999, B: I/S/AAR post I/R PBS [n=3]: 58,07% ± 5,41% vs. IgG [n=5] 53,41% ± 7,77% vs. Depletion [n=4]: 37,63 % ± 8,70%, p=0,0036, post I/R PBS [n=3]: 58,07% ± 5,41% vs. IgG [n=5] 53,41% ± 7,77%, p= 0,4380, IgG [n=5] 53,41% ± 7,77% vs. Depletion [n=4]: 37,63 % ± 8,70%, p= 0,0077, A/B: one-way Anova

Um weiter zu untersuchen, welche Rolle Thrombozyten im AMI innehaben, und in weiterer Folge auch die ASS Wirkung im AMI tiefer zu verstehen, wurden Mäuse mittels Antikörpern depletiert, sodass nahezu keine Thrombozyten mehr vorlagen (Abb. 17, A). Um Effekte auszuschließen, welche durch Antikörpergabe per se ausgelöst wurden, erhielt eine weitere Gruppe IgG ohne spezifisches *target*. Bezüglich der AAR/LV zeigten sich keine Unterschiede zwischen den Con, IgG und NaSS Gruppen. Bezüglich der IS/AAR als entscheidender, struktureller Parameter zeigt sich eine starke Abnahme bei den depletierten Mäusen. Dies ergibt einen protektiven Effekt bei AMI durch Depletion.

### 4.4.2 Echokardiografie

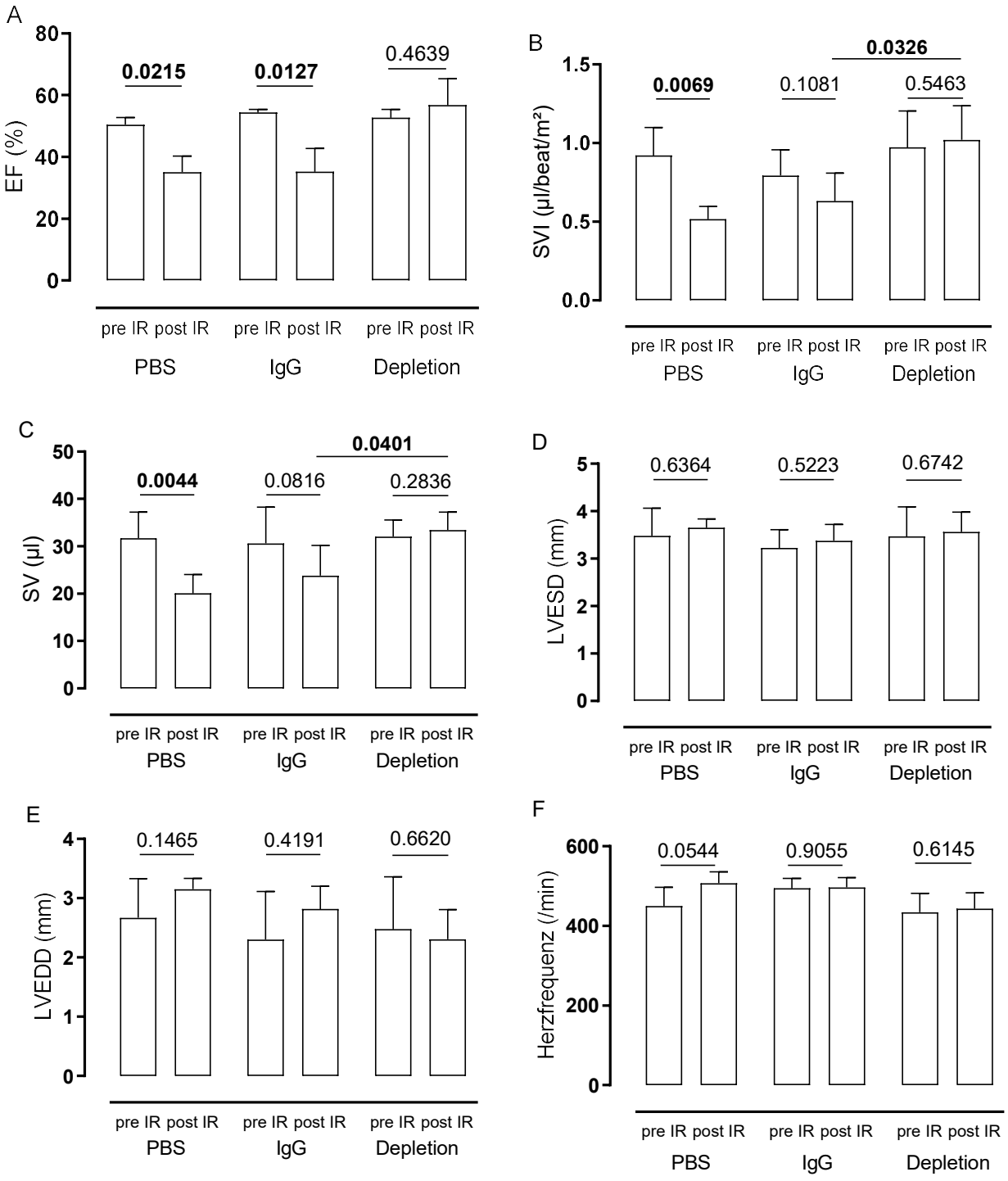


**Abbildung 16: Echokardiographie von Mäusen post I/R und Depletion bzw. post I/R und Kontrolle**

A: EF: PBS *baseline* [4]: 50,45% ± 2,34% vs. PBS post I/R [4] 35,06% ± 5,19%, p=0,0215, IgG *baseline* [4]: 54,40% ± 1,05% vs. IgG post I/R [4]: 35,21% ± 7,55%, p=0,0127, Depletion *baseline* [4]: 52,73% ± 2,64% vs. Depletion post I/R [4]: 56,79% ± 8,54%, p=0,4639, B: SVI: PBS *baseline* [4]: 0,92µl/beat/m2 ± 0,18µl/beat/m2 vs. PBS post I/R [4]: 0,52µl/beat/m2 ± 0,08µl/beat/m2, p=0,0069, IgG *baseline* [4]: 0,79µl/beat/m2 ± 0,16µl/beat/m2 vs. IgG post I/R [4]: 0,63µl/beat/m2 ± 0,18µl/beat/m2, p=0,1081, Depletion *baseline* [4]: 0,97µl/beat/m2 ± 0,23µl/beat/m2 vs. Depletion post I/R [4]: 1,02µl/beat/m2 ± 0,22µl/beat/m2, p=0,5463, IgG post I/R [4]: 0,63µl/beat/m2 ± 0,18µl/beat/m2 vs. Depletion post I/R [4]: 1,02µl/beat/m2 ± 0,22µl/beat/m2, p=0,0326, C: SV: PBS *baseline* [4]: 31,75µl ± 5,50µl vs. PBS post I/R [4]: 20,06µl ± 4,01µl, p=0,0044, IgG

*baseline* [4]: 30,64µl ± 7,65µl vs. IgG post I/R [4]: 23,82µl ± 6,37µl, p=0,0816, Depletion *baseline* [4]: 32,06µl ± 3,51µl vs. Depletion post I/R [4]: 33,45µl ± 3,73µl, p=0,2836, IgG post I/R [4]: 23,82µl ± 6,37µl vs. Depletion post I/R [4]: 33,45µl ± 3,73µl, p= 0,0401, D: LVESD: PBS *baseline* [4]: 3,48mm ± 0,59mm vs. PBS post I/R [4]: 3,65mm ± 0,19mm, p=0,6364, IgG *baseline* [4]: 3,22mm ± 0,38mm vs. IgG post I/R [4]: 3,38mm ± 0,34mm, p= 0,5223, Depletion baseline [4]: 3,47mm ± 0,62mm vs. Depletion post I/R [4]: 3,56mm ± 0,42mm, p=0,6742, E: LVEDD: PBS *baseline* [4]: 2,67mm ± 0,66mm vs. PBS post I/R [4]: 3,15mm ± 0,18mm, p=0,1465, IgG *baseline* [4]: 2,30mm ± 0,81mm vs. IgG post I/R [4]: 2,82mm ± 0,38mm, p=0,4191, Depletion *baseline* [4]: 2,47mm ± 0,88mm vs. Depletion post I/R [4]: 2,31mm ± 0,50mm, p=0,6620, F: Herzfrequenz: PBS *baseline* [4]: 449,9/min ± 47,19/min vs. PBS post I/R [4]: 507,5/min ± 28,17/min, p=0,0544, IgG *baseline* [4]: 494,6/min ± 25,06/min vs. IgG post I/R [4]: 496,9/min ± 24,58/min, p=0,9055, Depletion *baseline* [4]: 434,2/min ± 47,46/min vs. Depletion post I/R [4]: 442,9/min ± 39,91/min, p=0,6145, A-F: gepaarte T-Tests, Außer in B/C, IgG post I/R vs. Depletion post I/R: ungepaarter T-Test

Um funktionelle Daten bezüglich des Outcomes nach AMI mit Depletion zu untersuchen, wurde vor und 24 Stunden post I/R eine echokardiografische Untersuchung durchgeführt. Bezüglich der EF zeigt sich ein Abfall post I/R in der PBS und in der IgG Gruppe, im Gegensatz zu jener Gruppe welche depletiert wurde (Abb. 16 A). Dies zeigt eine protektive Wirkung durch Depletion im AMI. Ähnlich verhält sich da SV und SVI. Hier zeigt sich im Gegensatz dazu allerdings nur ein signifikanter Abfall in der PBS Gruppe, allerdings nicht in der IgG Gruppe. Es ist zwar ein Trend erkennbar, dieser ist allerdings nicht signifikant. Daher wurde IgG gegen Depletion in der post IR Gruppe verglichen. Hier zeigt sich in beiden Fällen ein signifikant stärkerer Abfall post I/R in der IgG Gruppe im Vergleich zur Depletion (Abb. 16., B/C) Daher kann auch hier von einem protektiven Effekt gesprochen werden. LVESD, LVEDD und Herzfrequenz zeigen keine signifikanten Unterschiede.

Insgesamt ergibt sich ein eindeutig protektiver Effekt durch Depletion im AMI. Sowohl bezüglich der strukturellen Daten (Abb. 15) als auch bezüglich der funktionellen Daten (Abb. 16).

### 4.4.3 Blutbilder

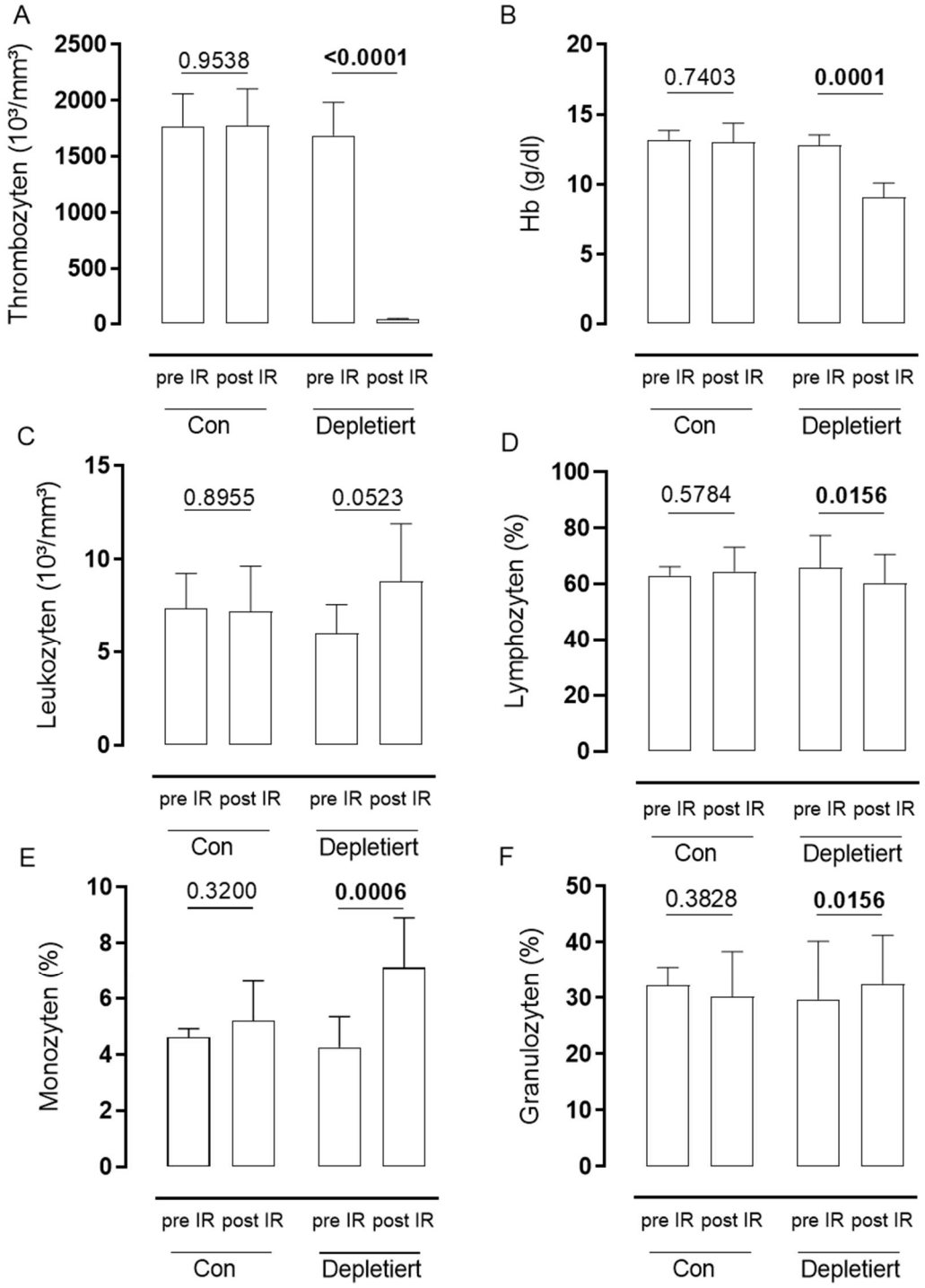


**Abbildung 17: Blutbilder 24h vor I/R und 24h post I/R ± Depletion**

A: Thrombozyten: Con pre I/R [7]: 1772 $10^3$/µl ± 287,5 $10^3$/µl vs. Con post I/R [6]: 1778 $10^3$/µl ± 325,9 $10^3$/µl, p= 0,9538, Thrombozyten Depletion pre I/R [8]: 1689 $10^3$/µl ± 37,43 $10^3$/µl vs. Depletion post I/R [7]: 294,1 $10^3$/µl ± 8,94 $10^3$/µl, p= <0,0001, B: Hb: Con pre I/R [8]: 13,19g/dl ± 0,67g/dl vs. Con post I/R [8]: 13,00g/dl ± 1,38g/dl, p= 0,7403, Hb Depletion pre I/R [9]: 12,82g/dl ± 0,73g/dl vs. Depletion post I/R [7]: 9,09g/dl ± 1,01g/dl, p= 0,0001, C: Leukozyten: Con pre I/R [8]: 7,35 $10^3$/µl ± 1,9 $10^3$/µl vs. Con post I/R [8]: 7,2 $10^3$/µl ± 2,44 $10^3$/µl, p= 0,8955, Leukozyten Depletion pre I/R [9]: 6,03 $10^3$/µl ± 1,53 $10^3$/µl vs. Depletion post I/R [7]: 8,81 $10^3$/µl ± 3,08 $10^3$/µl, p=0,0523, D: Lymphozyten: Con pre I/R [8]: 63,08% ± 3,17% vs. Con post I/R [8]: 64,59% ± 8,65%, p=0,5784, Lymphozyten Depletion pre I/R [7]: 67,70% ± 11,27% vs. Depletion post I/R

[7]: 60,37% ± 10,22%, p= 0,0156, E: Monozyten: Con pre I/R [8]: 4,61% ± 0,3% vs. Con post I/R [8]: 5,21% ± 1,42%, p= 0,3200, Monozyten Depletion pre I/R [9]: 4,26% ± 1,1% vs. Depletion post I/R [7]: 7,13% ± 1,79%, p= 0,0006, F: Granulozyten: Con pre I/R [8]: 32,31% ± 3,22% vs. Con post I/R [8]: 30,2% ± 8,16%, p= 0,3828, Granulozyten Depletion pre I/R [9]: 29,74% ± 10,47% vs. Depletion post I/R [7]: 32,5% ± 8,76%,p= 0,0156, A-F: ungepaarte T-Tests

Von 9 depletierten Mäusen sind zwei innerhalb von 24h post I/R verstorben.

Blutbilder von depletierten Mäusen wurden mit nicht depletierten Con vor und post I/R verglichen. Zunächst zeigt sich bezüglich der Thrombozyten ein erwartbarer Abfall in der Depletionsgruppe auf nahezu null (Abb. 17, A). Dies kann auch als Kontrolle der Depletionsmethode angesehen werden. Auch im erwartbaren Rahmen, zeigt sich ein signifikanter Abfall des Hb in der Depletionsgruppe welcher sich in der Con nicht zeigt (Abb. 17, B). Durch die fehlenden Thrombozyten kommt es zu vermehrter Blutungsneigung, dadurch zu einem höheren Blutverlust während des Eingriffs. Bezüglich der Leukozyten zeigt sich ein heterogeneres Bild. Die Gesamtleukozyten steigen in der Depletionsgruppe post I/R an, allerdings nicht signifikant (Abb. 17, C). Signifikant ist hingegen, ebenfalls nur in der Depletionsgruppe, ein Abfall der Leukozyten bei gleichzeitigem Anstieg von Monozyten und Granulozyten (Abb. 17, D-F). Dies deutet stark auf eine immunologische Wirkung der Thrombozyten im AMI hin. Zusätzlich sind 2 Mäuse in der Depletionsgruppe innerhalb von 24 nach AMI verstorben. Dies könnte durch erhöhte Blutungskomplikationen bedingt sein, eher nicht durch den AMI selbst, da sich hier bezüglich der IS/AAR und der Echokardiographie eine protektive Wirkung durch Depletion zeigt.

## 4.5 Muriner Teil Depletion und ASS im AMI

### 4.5.1 Infarktgröße

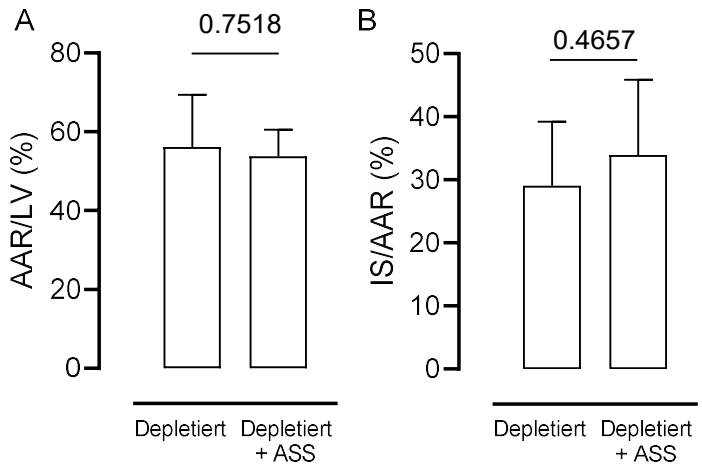


**Abbildung 18: Infarktgröße von Mäusen post I/R und Depletion bzw. post I/R Deletion+ ASS**

A: AAR/LV: Depletiert [9]: 56,10% ± 13,28% vs. Depletiert + ASS [4]: 53,79% ± 6,786%, p=0,7518, B: IS/AAR: Depletiert [9]: 29,05% ± 10,18% vs. Depletiert + ASS [4]: 33,91% ± 33,91%, p= 0,4657, A-B ungepaarte T-Tests

Vergleicht man die IS von Mäusen welche depletiert wurden, mit Mäusen welche zusätzlich ASS erhielten, zeigt sich kein zusätzlicher Benefit durch die Gabe von ASS. Sowohl die AAR/LV als auch die IS/AAR zeigen keine signifikanten Unterschiede innerhalb der zwei Gruppen. Vergleichbare Daten konnten bereits durch Ayhan gezeigt werden [105].

### 4.5.2 Echokardiografie

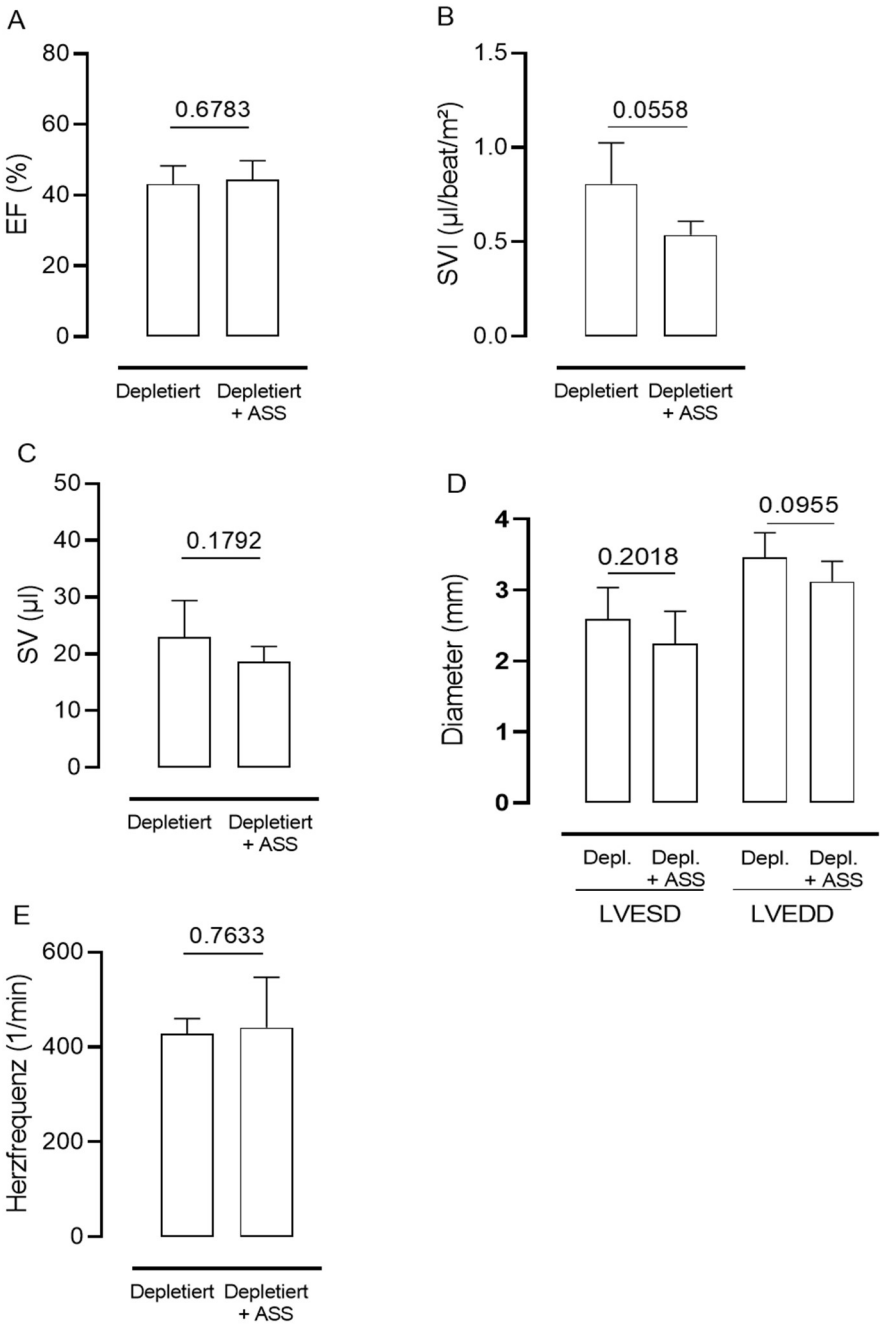


**Abbildung 19: Echokardiographie von Mäusen post I/R und Depletion bzw. post I/R Deletion+ ASS**

A: EF: Depletiert [8]: 43,12 % ± 5,22% vs. Depletiert + ASS [5]: 44,40% ± 5,31%, p=0,6783, B: SVI: Depletiert [4]: 0,81 µl/beat/m² ± 0,22 µl/beat/m² vs. Depletiert + ASS [4]: 0,54 µl/beat/m² ± 0,07 µl/beat/m², p= 0,0558, C: SV: Depletiert [8]: 23,01 mm ± 18,64 mm vs. Depletiert + ASS [5]: 6,39 mm ± 2,67mm, p=0,1792, D: LVESD: Depletiert [8]: 2,59 mm ± 0,44 mm vs. Depletiert + ASS [5]: 2,24 mm ± 0,46 mm, p=0,2018, LVEDD: Depletiert [8]: 3,46 mm ± 0,35 mm vs. Depletiert + ASS [5]: 3,12 mm ± 0,29 mm, p=0,0955, E: Herzfrequenz: Depletiert[8]: 428,5/min ± 31,17/min vs. Depletiert + ASS [5]: 440,6/min ± 106,3/min, p= 0,7633, A-E: ungepaarte T-Tests

Als funktionellen Parameter wurde eine echokardiografische Untersuchung an Mäusen 24 Stunden nach AMI durchgeführt. Diese wurden entweder nur depletiert oder depletiert und erhielten zusätzlich

ASS. Es zeigen sich keine Unterschiede bezüglich EF, LVESD, LVEDD, SV und Herzfrequenz (Abb. 19). Bezüglich des SVI zeigt sich überraschenderweise ein Absinken der Mäuse welche zusätzlich ASS zu Depletion bekamen auf 66,5% jener Mäuse, welche nur depletiert wurden. Dieser Unterschied ist allerdings ebenfalls nicht signifikant (Abb. 19, B, p=0,0558). Insgesamt lässt sich sagen, dass kein zusätzlicher Benefit durch ASS Gabe bei bereits erfolgter Depletion erkennbar ist. Dies deutet auf eine rein thrombozytenabhängige Wirkung von ASS im AMI hin.

### 4.5.3 Blutbilder

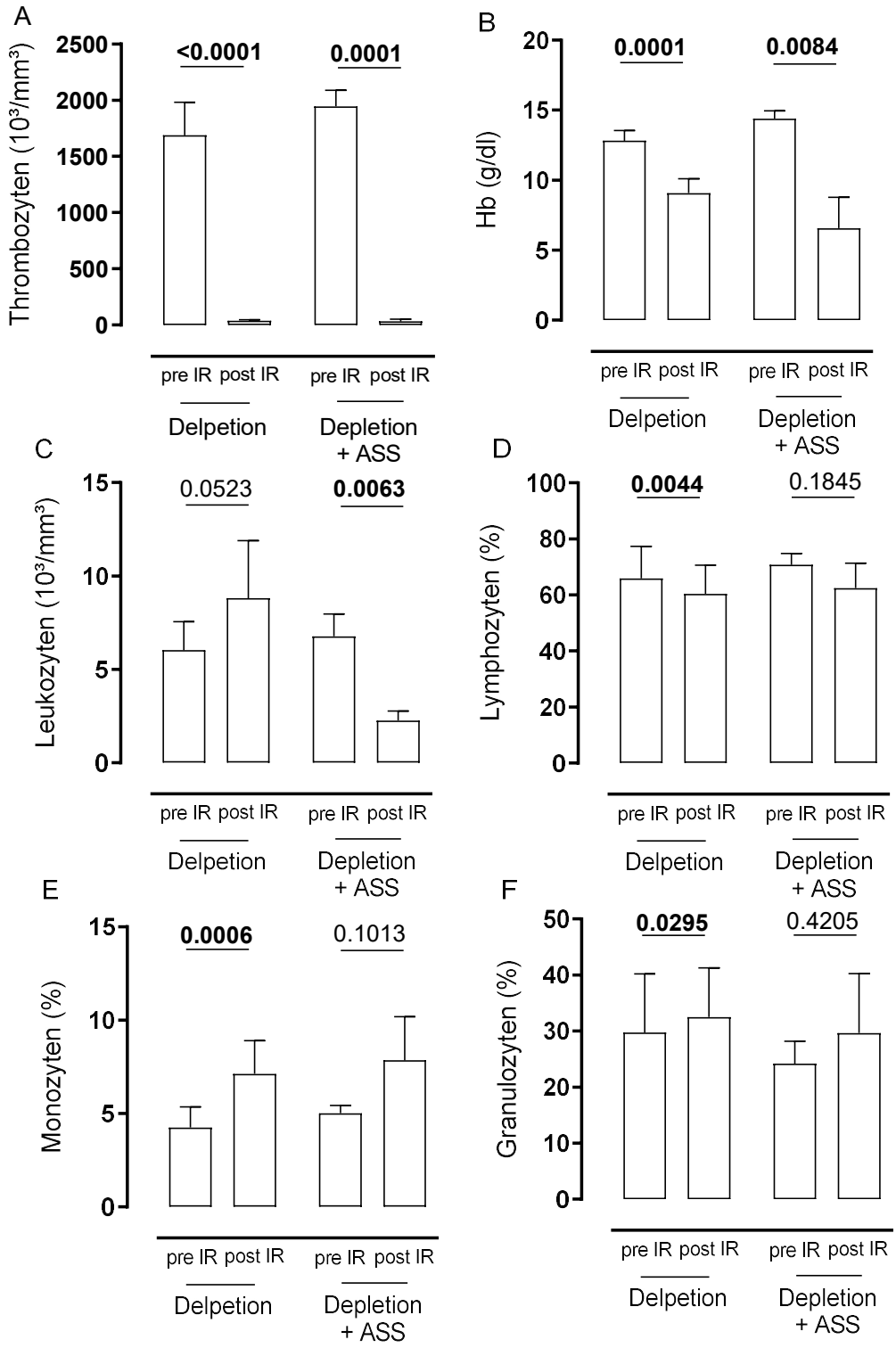

**Abbildung 20: Blutbilder 24h vor I/R und 24h post I/R ± ASS ± Depletion und ASS**

A: Thrombozyten: Depletion pre I/R [8]: 1689 $10^3$/µl ± 37,43 $10^3$/µl vs. Depletion post I/R [7]: 294,1 $10^3$/µl ± 8,94 $10^3$/µl, p= <0,0001, Depletion und ASS pre I/R [4]: 1947 $10^3$/µl ± 141,5 $10^3$/µl vs. Depletion und ASS post I/R [4]: 32,75 $10^3$/µl ± 19,05 $10^3$/µl, p= 0,0001, B: Hb: Depletion pre I/R [9]: 12,82g/dl ± 0,73g/dl vs. Depletion post I/R [7]: 9,09g/dl ± 1,01g/dl, p= 0,0001, Depletion und ASS pre I/R [4]: 14,4 mg/dl ± 0,55 mg/dl vs. Depletion und ASS post I/R [4]: 6,57 mg/dl ± 2,21 mg/dl, p= 0,0084, C: Leukozyten: Depletion pre I/R [9]: 6,03 $10^3$/µl ± 1,53 $10^3$/µl vs. Depletion post I/R [7]: 8,81 $10^3$/µl ± 3,08 $10^3$/µl, p=0,0523, Depletion und ASS pre I/R [4]: 6,77 $10^3$/µl ± 1,19 $10^3$/µl vs. . Depletion und ASS post I/R [4]: 2,27 $10^3$/µl ± 0,49 $10^3$/µl, p= 0,0063, D: Lymphozyten: Depletion pre I/R [7]: 67,70% ± 11,27% vs. Depletion post I/R [7]: 60,37% ± 10,22%, p= 0,0156, Depletion und ASS pre I/R [4]: 70,8 % ± 4,09 % vs. Depletion und ASS post I/R [4]: 62,48 % ± 8,87 %, p= 0,1845, E: Monozyten: Depletion pre I/R [9]: 4,26% ± 1,1% vs. Depletion post I/R [7]: 7,13% ± 1,79%, p= 0,0006, Depletion und ASS pre I/R [4]: 5,02 % ± 0,42 % vs. Depletion und ASS post I/R [4]: 7,85 % ± 2,34 %, p= 0,1013, F: Granulozyten: Depletion pre I/R [9]: 29,74% ± 10,47% vs. Depletion post I/R [7]: 32,5% ± 8,76%,p= 0,0156, Depletion und ASS pre I/R [4]: 24,18 % ± 4,04 % vs. Depletion und ASS post I/R [4]: 29,68 % ± 10,59 %, p= 0,4205, A-F: gepaarte T-Tests

Zur weiteren Untersuchung, inwieweit ASS im AMI über Thrombozyten wirkt, wurde in Analogie zu Abbildung 17, Mäusen 24h nach I/R Blut abgenommen. Die Mäuse wurden vor I/R mit Depletion und ASS behandelt. Als Vergleichsgröße wurde hier reine Depletion gewählt, um einen additiven Effekt von ASS zu untersuchen. Bezüglich der Thrombozyten zeigt sich wieder ein erwartbares Bild mit Abfall auf nahezu null (Abb. 20, A). Auch der Hb fällt wie in der Depletionsgruppe nach I/R signifikant ab, wohl auch hier aufgrund von Blutungskomplikationen (Abb. 20, B). Die Leukozyten zeigen ein uneinheitlicheres Bild. So ist die Gesamtleukozytenzahl in der Depletion + ASS Gruppe signifikant nach I/R gesunken, wohingegen in der reinen Depletionsgruppe ein Trend Richtung Anstieg zu erkennen ist (Abb. 20, C). Bezüglich der einzelnen Leukozytenfraktionen zeigen sich keine großen Unterschiede zwischen Depletion und Depletion + ASS, auch wenn in der Depletion + ASS Gruppe keine signifikanten Unterschiede gibt, im Gegensatz zu Depletion allein. Dies ist wohl auf die geringere N-Zahl in der Depletion + ASS Gruppe zurückzuführen. Diese Gruppe bestand nur aus n=4, im Vergleich zu n=7 in der Depletionsgruppe.

### 4.5.4 Histologie

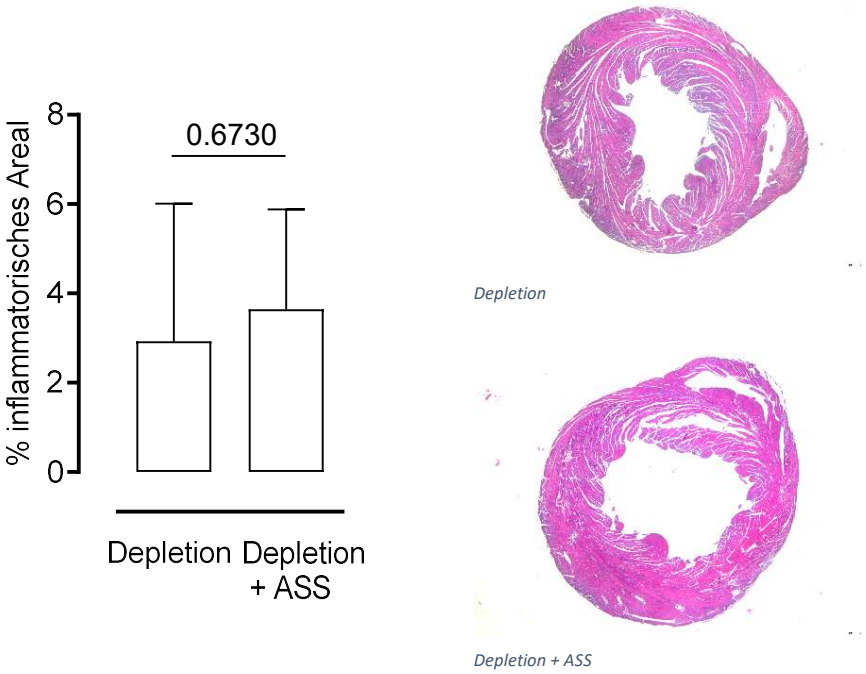


**Abbildung 21: Inflammatorisches Areal von Mäuseherzen post I/R in HE-Färbung nach Behandlung von Depletion oder ASS+ Depletion, Angegeben in betroffenen Prozent des gesamten Myokardes und jeweilige Beispielbilder**

Inflammatorisches Areal: Depletion [6]: 2,93% ± 3,08% vs. ASS und Depletion [5] 3,65% ± 2,23%, p= 0,6730, ungepaarter T-Test

Um eine allgemeine Leukozyteninfiltration und inflammatorischen Umbau zu untersuchen, wurde eine HE-Färbung 5 Tage nach AMI angefertigt. In dieser Färbung zeigen sich bezüglich der entzündlich veränderten Areale keine signifikanten Unterschiede zwischen Mäusen welche depletiert wurde und welche zusätzlich zur Depletion ASS erhielten.

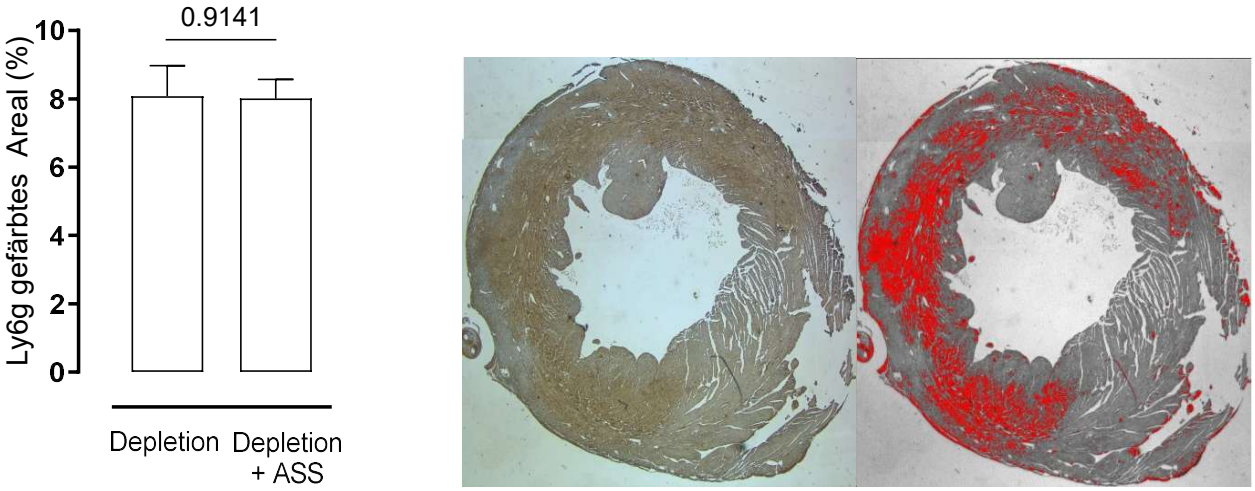


**Abbildung 22: Ly6G positiv gefärbtes Areal von Mäuseherzen post I/R nach Behandlung mit Depletion oder Depletion + ASS, Angegeben in betroffenen Prozent des gesamten Myokardes und Beispielbild mit Beispielauswertung**

Ly6G: Depletion [7]: 8,07 % ± 0,90 % vs. Depletion und ASS [3]: 8,01 % ± 0,56 %, p= 0,9141, ungepaarter T-Test

Die Infiltration von Neutrophilen in Mäuseherzen 5 Tage nach AMI wurde über eine Ly6G Färbung sichtbar gemacht und gibt Aufschluss über Inflammations- und Umbauprozesse. Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied bezüglich der Neutrophileneinwanderung zwischen thrombozytendepletierten Mäusen und Mäusen welche zusätzlich zur Thrombozytendepletion noch ASS erhielten. Dies legt nahe, dass es keinen zusätzlichen Benefit von ASS im AMI gibt, welcher die Neutrophileneinwanderung hemmt und nicht über Thrombozyten vermittelt wird.

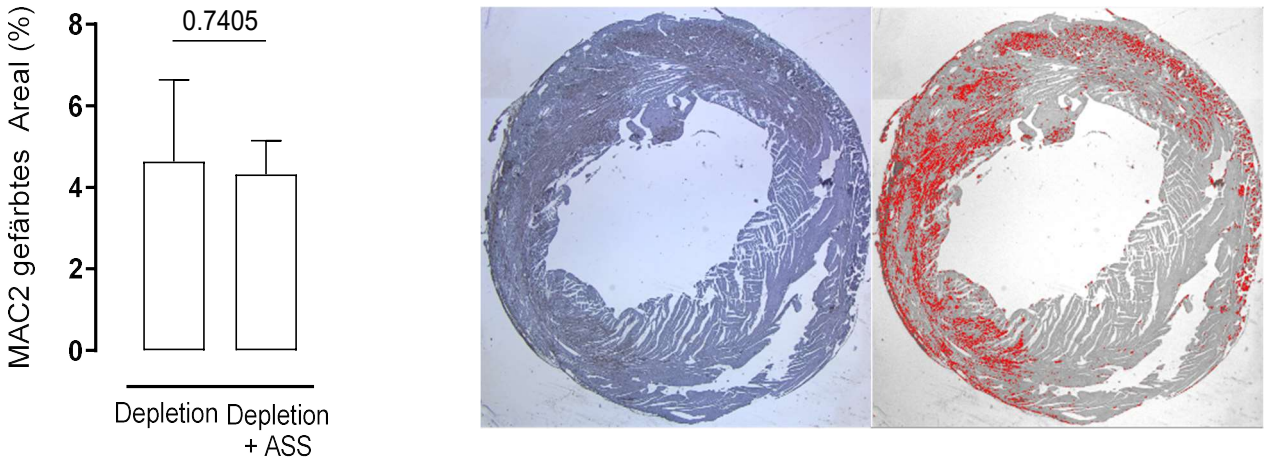


**Abbildung 23: MAC2 positiv gefärbtes Areal von Mäuseherzen post I/R nach Behandlung mit Depletion oder Depletion + ASS, Angegeben in betroffenen Prozent des gesamten Myokardes und Beispielbild mit Beispielauswertung**

MAC2: Depletion [9]: 4,64 % ± 1,99 % vs. Depletion und ASS [5]: 4,32 % ± 0,83 %, p= 0,7405, ungepaarter T-Test

Neben der Neutrophileneinwanderung spielen auch die Makrophagen eine wichtige Rolle in Inflammations- und Umbauprozesse nach AMI. Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied bezüglich der Makrophageneinwanderung zwischen thrombozytendepletierten Mäusen und Mäusen welche zusätzlich zur Thrombozytendepletion noch ASS erhielten. Dies legt nahe, dass es keinen zusätzlichen Benefit von ASS im AMI gibt, welcher die Makrophageneinwanderung hemmt und nicht über Thrombozyten vermittelt wird.

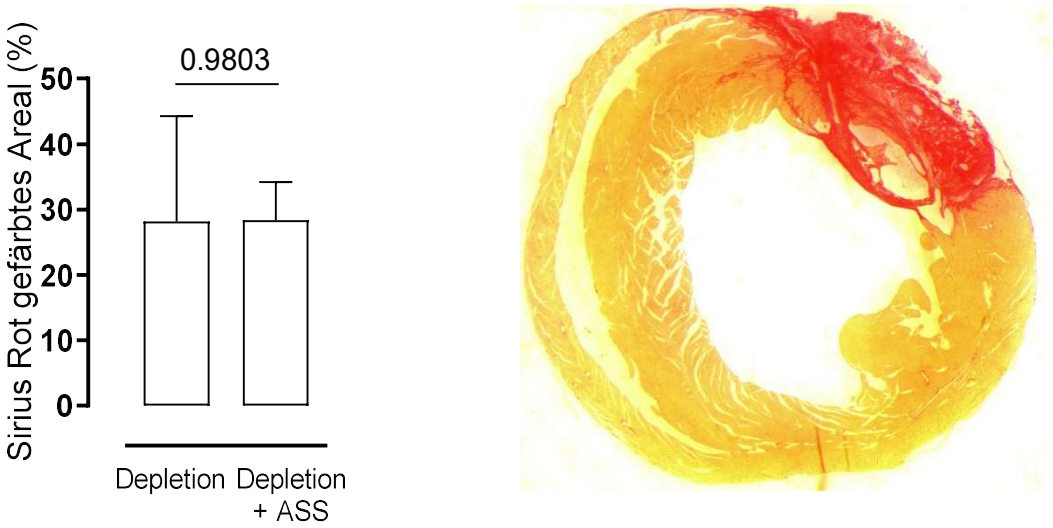


**Abbildung 24: Sirius Rot gefärbtes Areal 21 Tage post I/R nach Behandlung von Depletion und Depletion + ASS. Angegeben in betroffenen Prozent des linken Ventrikels und Beispielbild**

Sirius Rot gefärbtes Areal: Depletion [10]: 28,14 % ± 16,13 % vs. Depletion und ASS [4]: 28,36 % ± 5,79 %, p=0,9803, ungepaarter T-Test

Kollagen in Mäusehetzen wurde 21 Tage nach AMI mittels Sirius Rot gefärbt. Kollagen gibt Aufschluss über Narbengröße des AMI und damit indirekt über die Schwere. Es zeigen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Mäusen, welche nur depletiert wurden und jenen welche zusätzlich ASS erhielten. Es zeigt sich also kein zusätzlicher Benefit einer ASS Behandlung, wenn keine Thrombozyten vorliegen.

# 5 Diskussion

ASS stellt einen der wichtigsten Eckpfeiler der Akuttherapie und der Prävention des AMI und anderer kardiovaskulärer Erkrankungen dar. Eine relevante Prognoseverbesserung konnte insbesondere in der Sekundärprävention belegt werden [1, 5, 59, 106]. Die Hauptwirkung von ASS besteht unbestritten in der Hemmung der Thrombozytenfunktion über eine irreversible Hemmung der COX-1 und so in einer Verminderung der Thromboxan-Synthese. Nichtsdestotrotz ist unklar, ob es Effekte im AMI oder in der Prävention ebendessen gibt, die über diesep Thrombozytenfunktionshemmung hinausgehen. Ziel dieser Arbeit ist es zu ergründen, ob die ASS Wirkung im AMI rein auf Thrombozytenfunktionshemmung beruht oder ob es einen zusätzlichen Effektgibt welcher darüber hinaus geht.

## 4.1 Klinischer Teil 1: Kardiale Ereignisse unter ASS Therapie

Bisher gilt die Datenlage bezüglich HTPR unter ASS und Ereignissen wie MACCE oder AMI als unzureichend. So konnte erst 2018 in einem großen Register retrospektiv keine Zunahme von kardiovaskulären Ereignissen bei HTPR unter ASS gefunden werden [107]. Bei diesen Ergebnissen müssen allerdings mehrere Faktoren bedacht werden. Zum einen erfolgte die Bestimmung von HTPR nicht mit dem Goldstandard LTA, sondern mittels VerifyNow ARU. Bereits 2008 konnte an einer kleinen Kohorte gezeigt werden, dass bei einem Cut-off von 550 ARU keine ausreichend hohe Sensitivität bezüglich HTPR durch VerifyNow ARU erreicht wird [108]. Darüber hinaus zeigten sich zwischen den Kohorten HTPR und keine HTPR signifikante Unterschied, beispielsweise was das Alter angeht (HTPR: 67 ± 11 Jahre vs. keine HTPR: 63 ± 11 Jahre) [107]. Eine weitere Studie von Yeo et al. konnte 2018 auch keinen Zusammenhang zwischen ASS HTPR und erhöhten kardiovaskulären Ereignissen feststellen. Das Patientenkollektiv war allerdings beschränkt auf periphere arterielle Verschlusskrankheiten und Karotisstenosen als Einschlusskriterien [109].

Andere Studien wie Mayer et al. sahen signifikant höhere Mortalität unter ASS HTPR innerhalb eines Jahres [110]. Auch bei dieser Studie wurde jedoch nicht der Goldstandard LTA, sondern eine Multiplate Analyse zur Bestimmung der HTPR verwendet. Eine Metaanalyse von Krasopoulos et al. zeigte 2008 an 810 Patienten und Patientinnen mit ASS HTPR signifikant schlechteres Überleben, erhöhte Inzidenz von MACCE und akutem Koronarsyndrom gegenüber Patienten und Patientinnen mit ASS aber ohne HTPR [111]. Es bestand große Heterogenität bezüglich der unterschiedlichen HTPR Testverfahren. Darüber hinaus konnten die Autoren eine höhere Heterogenität innerhalb jener Studien ermitteln, welche Vollblutproben zur HTPR Testung verwendeten, im Vergleich zu jenen welche PRP verwendeten. 33% wiesen in Vollblutverfahren eine HTPR auf, im Gegensatz dazu 16% in Verfahren

mit PRP [111]. Dies bestätigte die Position der LTA als Goldstandard, auch wenn beide Testverfahren zuverlässig eine ASS HTPR bestätigten.

In unserer Untersuchung wurde an 72 Patienten und Patientinnen mit gesicherter KHK prospektiv untersucht, ob jene Patienten und Patientinnen welche unter ASS MACCE, Tod, NSTEMI und Schlaganfälle entwickeln eine veränderte initiale Thrombozytenfunktion aufwiesen. Das Patientenkollektiv wurde in der Uniklinik Düsseldorf zunächst auf Thrombozytenfunktion unter ASS untersucht. Die Patientencharakteristika beschreiben ein typisch, kardiovaskulär vorerkranktes Kollektiv (Tabelle 1). Anschließend erfolgten, bei jährlichen Routinekontrollen, Evaluation von MACCE, Tod, NSTEMI und Schlaganfall. Hierbei zeigte sich eine signifikant höhere Thrombozytenfunktion gemessen in LTA, wenn die Ereignisse MACCE, Tod und NSTEMI innerhalb des Beobachtungszeitraum auftraten (Abb. 10). Für Schlaganfälle zeigte sich kein signifikanter Zusammenhang (Abb. 10 D). Ein nicht signifikanter Trend zu höherer Thrombozytenfunktion, wenn ein Schlaganfall auftrat, war auch hier erkennbar. Hierbei ist zu beachten, dass lediglich 7 Schlaganfälle im Beobachtungszeitraum auftraten, was erklären könnte, warum hier keine signifikanten Unterschiede auftraten.

Unsere Ergebnisse gehen weitestgehend mit der oben beschrieben Metaanalyse von Krasopoulos et al. einher [111]. An Schwächen in unserer Untersuchung muss zunächst die geringe Patientenzahl berücksichtigt werden. Trotzdem konnten aufgrund des langen Beobachtungszeitraumes und der relativ hohen Inzidenzen für MACCE, Tod und NSTEMI signifikante Ergebnisse erzielt werden. Darüber hinaus muss als Limitation, wie bei nahezu allen anderen dazu publizierten Studien, auf eine häufige Co-Medikation mit anderen Thrombozytenfunktionshemmern hingewiesen werden. Außerdem bestand unsere Thrombozytenfunktionsmessung in einer einmaligen Messung und nicht in wiederholten Messungen über einen längeren Zeitraum.

## Klinischer Teil 2: Inflammation unter ASS Therapie

In diesem Teil der Arbeit wurde in einem großen, kardiologisch erkranktem Patientenkollektiv unter ASS-Therapie der Entzündungsmediator CRP unter HTPR und nicht-HTPR verglichen. CRP gilt als wichtiger, unabhängiger Risikoindikator für kardiovaskuläre Ereignisse. Dies konnte bereits mehrfach belegt werden [5, 55].

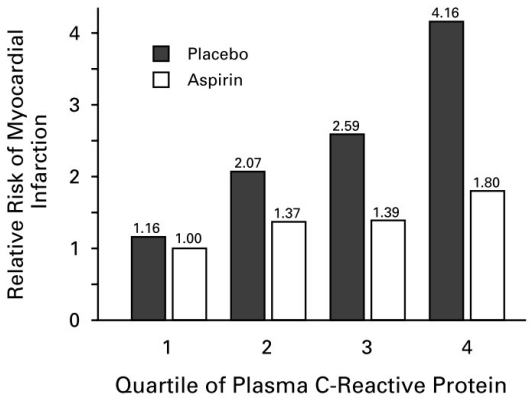


*Abbildung 25: bei steigenden CRP Leveln, steigt der relative, kardiovaskuläre, protektive Effekt von ASS [5]*

Es gibt dementsprechend einige Vorarbeiten auf diesem Gebiet. Ridker et al. konnte bereits 1997 die stärkste ASS Wirkung bezüglich der Verhinderung von

AMI in jenem Patientenkollektiv mit den höchsten CRP Level zeigen. Im Quartil der Patienten und Patientinnen mit dem niedrigsten CRP Level konnte keine signifikante Risikoreduktion durch ASS nachgewiesen werden, wohingegen im Quartil mit den höchsten CRP Level eine Risikoreduktion durch ASS für AMI von 55. 7 %, p=0,02 gezeigt werden konnte (Abb. 25) [5].

Die Daten, ob ASS CRP-Level verringert, sind widersprüchlich. Kim et al. konnten keine signifikante Verminderung von CRP durch ASS in einem Patientenkollektiv mit milder Hypertonie zeigen [112]. Hierbei muss allerdings auf das kleine Patientenkollektiv und auf die relativ geringe Krankheitslast (Kontrollierte Hypertonie) hingewiesen werden. Auch andere Studien zeigte ein fehlendes Absinken des CRP durch niedrig dosierte ASS-Einnahme. Feldman et al. untersuchten gesunde Probandinnen und Probanden hinsichtlich einer CRP Minderung durch niedrig dosiertes ASS. Es konnte keine Reduktion gezeigt werden, startend bei bereits niedrigen Level, mit Durchschnittswerten um 0,15 mg/dl [113]. Im Gegensatz dazu gibt es auch Arbeiten welche eine positive Wirkung von ASS auf CRP nachweisen konnten. So konnten Kronish et al. einen Zusammenhang zwischen steigenden CRP-Level und mangelnder Einnahmeadhärenz von ASS zeigen. Darüber hinaus zeigt sich in ihrer Arbeit sinkende CRP Level drei Monate nach ASS Einnahme, wenn auch signifikant stärker bei höheren ASS-Dosen [114]. Der Einschluss der Patienten und Patientinnen erfolgte rasch nach akutem Koronarsyndrom, daher kann von einem kränkeren Kollektiv als bei den oben angeführten Studien ausgegangen werden [114].

Im Vergleich zu den Vorarbeiten wurde bei dieser Auswertung der Daten auf Unterschiede im ASS Kollektiv, nicht in ASS oder kein ASS untersucht. Unsere Daten zeigen signifikant niedrigere CRP Level, wenn Patienten und Patientinnen unter ASS- Therapie keine HTPR aufwiesen, verglichen mit Patienten und Patientinnen, welche unter ASS- Therapie eine HTPR aufwiesen (Abb. 11). Das Patientenkollektiv zeigt, wie in den Charakteristika (Tabelle 2) beschrieben, ein gemischtes, typisch kardiologisch vorerkranktes Kollektiv bei welchem ASS insbesondere zur Sekundärprophylaxe angewandt wurde. Das Kollektiv weist auch insgesamt hohe CRP Level auf (1,42 mg/dl in -HTPR Gruppe, 2,04mg/dl in +HTPR Gruppe) verglichen mit anderen Studien [112]. Dies könnte für eine grundsätzlich erhöhte Inflammationslast bzw. Krankheitslast in unserem Kollektiv sprechen.

Mehrere Gründe für die fehlende ASS Wirkung auf CRP unter HTPR kommen in Frage. Ein Grund könnte mangelnde Compliance in der Einnahme von ASS sein. Dies ist ein möglicher Confounder welcher sich sowohl auf die Thrombozytenfunktion als auch auf die CRP Level auswirken könnte und welcher nicht klar identifizierbar wäre. Weitere häufige Gründe für HTPR bestehen jedoch in genetischen Polymorphismen der COX-1, insbesondere C50T Polymorphismen. Dadurch ergibt sich bei 12-19% der kaukasischen Bevölkerung vermindertes Ansprechen der COX-1 auf ASS [78-80]. In unserer

Untersuchung wiesen 12,4 % der untersuchten Patienten und Patientinnen eine HTPR auf, was sich in etwa mit den erwartbaren Zahlen decken würde.

Die Ergebnisse aus der klinischen Untersuchung legen daher nahe, dass die antiinflammatorische Wirkung von ASS auf CRP als kardiovaskulären Risikoindikator auf einer suffizienten Thrombozytenfunktionshemmung beruht und somit Thrombozytenabhängig ist.

## 5.1 Muriner Teil: Thrombozyten im AMI

### 5.1.1 Natrium-Salizylat Infarktgröße

Seit langer Zeit wird die akute Wirkung von ASS im AMI diskutiert. Ob eine Reduktion der Infarktgröße stattfindet, war lange Zeit unklar [66-68]. Kürzlich konnte Naguib zeigen, dass ASS, wenn es vor I/R appliziert wurde, eine signifikante Reduktion der Infarktgröße bewirkt [7]. Aufgrund der klinischen Ergebnisse der in 5.2. beschriebenen Patientengruppe drängt sich die Frage auf, ob der Effekt auf einer alleinigen Thrombozytenfunktionshemmung beruht oder ob es darüberhinausgehende Effekte, insbesondere was die antiinflammatorische Wirkung von ASS angeht gibt [63, 115]. Um dies zu untersuchen haben wir uns zunächst die Wirkung von NaSS im murinen AMI angesehen. NaSS ist eine aktive Vorstufe von ASS, wird aber auch als eigenständiges Medikament eingesetzt.

NaSS findet vor allem Bedeutung als antiinflammatorisches und analgetisches Medikament, insbesondere in der Tiermedizin. NaSS hat praktisch keine inhibitorische Wirkung auf die Thromboxansynthese [6] und damit auf die Thrombozytenfunktion, bei gleichzeitig suffizienter Hemmung der Prostaglandinsynthese *in-vivo* [84]. Der genaue Wirkmechanismus von NaSS gilt nach wie vor als ungeklärt. Eine Wirkung beruht auf der Hemmung der COX-2 wie Mitchel at al. 1997 zeigen konnten. Die COX-2 Aktivität wurde über die Prostaglandin E2 Syntheseleistung bestimmt. Jedoch konnten sie auch zeigen, dass die COX-2 Hemmung durch höhere ARA-Spiegel wieder aufgehoben werden konnte [83]. Die Wirkung von NaSS auf die COX-1 ist deutlich weniger ausgeprägt als auf die COX-2, insbesondere verglichen mit jener Wirkung von ASS [116].

Die Hemmung der Prostaglandinsynthese über die COX-2 durch NaSS wurde bisher in Zellkulturen *in-vitro* untersucht [117]. Zusätzlich zur Synthesehemmung der COX-2 scheint NaSS unter gewissen Umständen die Expression der COX-2 zu fördern. Zwar konnte Amann et al. ebenfalls eine Hemmung der Prostaglandinsynthese in peripheren, mononukleären Blutzellen durch NaSS zeigen, allerdings wurde die Expression von COX-2 gleichzeitig verstärkt durch NaSS-Zugabe [117]. Im Gegensatz dazu, konnten Hinz et al. nur eine schwache Hemmung der Prostaglandinsynthese durch NaSS finden, allerdings keine vermehrte Expression der COX-2. Eine stärkere Hemmung der Prostaglandinsynthese konnte durch Metabolite von NaSS gezeigt werden, welche *in-vivo* eine relevantere Rolle innehaben könnten [118].

Es gibt bisher eine Arbeit welche sich NaSS bereits 1981 als mögliches Target im AMI angesehen hat. Leprán et al. konnten keine Verbesserung der Infarktgröße bei Ratten durch NaSS sehen, allerdings ein vermindertes Auftreten von Arrhythmien [119]. Es wurde jedoch kein I/R Modell gewählt, sondern eine dauerhafte Ligatur der LAD durchgeführt.

Wie bei den Vorarbeiten dieser Arbeit mit ASS durch Naguib, wurde in den hier erhobenen Daten ebenfalls in einer Gruppe 30 Minuten vor Ischämie, in einer zweiten Gruppe 15 Minuten ab Ischämie NaSS appliziert [7]. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich der AAR/LV und der IS/AAR in beiden Gruppen (Abb. 12).

Die Mäuse wurden echokardiografiert, um neben den strukturellen Daten auch funktionelle Daten zu erheben. Dies wurde vor Beginn der Untersuchungen, 24h post I/R sowie 21 Tage post I/R durchgeführt. Die gewählten Zeitpunkte können Aufschluss über einen zeitlichen Verlauf eines möglichen Effektes durch NaSS geben. Die Daten vor Beginn der Untersuchung werden nicht abgebildet, unterscheiden sich nicht von der Kontrollgruppe. Die Echokardiographie gilt als einer der zuverlässigsten diagnostischen Werkzeuge zur Einschätzung von Schäden durch AMI und kardialen Funktion [120, 121]. Als repräsentative Parameter werden in dieser Arbeit EF, SVI, SV, LVESD, LVEDD sowie die Herzfrequenz gezeigt (Abb. 13). Alle gewählten Parameter können Aufschluss über eine mögliche Entwicklung einer akuten Herzinsuffizienz geben, welche als eine der häufigsten und prognoserelevantesten Komplikation nach I/R auftreten kann [45]. Die Mäuse in dieser Untersuchung erhielten 30 Minuten vor I/R NaSS, analog zu den Untersuchungen von Naguib, bei welchen ASS die Infarktgröße signifikant vermindert hat [7]. In unseren Ergebnissen der Echokardiographie zeigen sich keine signifikante Veränderung der untersuchten Parameter durch NaSS 5 und 21 Tage nach I/R gegenüber Con (Abb. 13/14).

Mehrere Gründe könnten für die fehlende Wirkung von NaSS im AMI verantwortlich sein. NaSS ist ein potenter Inhibitor der COX-2, welche insbesondere in inflammatorischem Gewebe hochreguliert wird [83, 122-124]. Die Wirkung bezüglich COX-2 Inhibitoren im AMI ist bisher nicht eindeutig geklärt. 2003 konnten Saito et al. eine Prognoseverbesserung im AMI durch spezifische COX-2 Hemmung mittels 5,5-dimethyl-3-(3-fluorophenyl) -4-(4-methylsulphonyl)phenyl-2(5H)-fluranone zeigen. Darüber hinaus konnte in der Studie eine Zunahme von COX-2 haltigen Makrophagen am Übergang zischen nekrotischen und nicht-nekrotischen Arealen im AMI gesehen werden [124]. Im Gegensatz dazu wurde 2007 ein schlechteres Überleben und schlechtere echokardiografische Parameter wie SV nach AMI durch COX-2 Inhibition mittels Celecoxib in Schweinen gezeigt. Die Infarktgröße war jedoch unverändert [125]. In unserer Untersuchung überlebten alle 5 Mäuse der jeweiligen Gruppen und es zeigten sich keine veränderten echokardiografischen Parameter nach NaSS Gabe.

Die oben beschriebene Hemmung der NaSS Wirkung auf die COX-2 bei erhöhten ARA-Spiegeln könnte eine weitere Erklärung für die mangelnde Wirkung im AMI sein, bei möglicherweise hohen ARA Spiegeln im AMI [83].

Eine weitere potenzielle Ursache für die fehlende Wirkung durch NaSS liegt in der Natur der Sache, und ist über eine verminderte Thrombozytenfunktionshemmung bzw. verminderte Thromboxansynthesehemmung durch NaSS vermittelt. Thromboxansynthese wird vor allem über die COX-1 und insbesondere in Thrombozyten vermittelt [126]. Es kann also die Hypothese angenommen werden, dass die ASS Wirkung im AMI, welche über jene von NaSS hinausgeht, nur oder überwiegend über die COX-1 bzw. über Thrombozyten vermittelt wird. Diese Hypothese wird in Teil 5.3.4. dieser Arbeit weiter diskutiert. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass NaSS, welches zwar antiinflammatorisch aber nicht Thrombozytenfunktionshemmend wirkt, im AMI keinen Benefit bringt.

### 5.1.2 Depletion bei AMI

Zur weiteren Untersuchung einer thrombozytenabhängigen ASS Wirkung im AMI wurde die reine Wirkung von Thrombozyten im AMI evaluiert. Dazu wurde den Mäusen 1h vor I/R ein thrombozytenspezifischer GpIbα Antikörper appliziert, welcher zu einer kompletten Depletion der Mäuse führte. Der Erfolg wurde mittels Blutbilduntersuchungen kontrolliert. Hier zeigt sich eine signifikante Abnahme der Thrombozyten auf nahezu null nach Applikation des Antikörpers (Abb. 17).

Thrombozyten spielen im AMI eine entscheidende Rolle, die Wirkung wird allerdings nach wie vor kontrovers diskutiert. Einerseits konnten Liu et al. einen schädlichen Einfluss von Thrombozyten im AMI bei Mäusen zeigen, da es nach Depletion (begonnen 2h nach AMI), zu einer verminderten Inzidenz von Myokardrupturen kommt. Als Modell wurde ein reines Okklusionsmodell gewählt. Die Infarktgröße war im selben Versuch nicht vermindert [127]. Andererseits gibt es Arbeiten wie jene von Cheng et al., welche protektive Effekte von Thrombozyten nachweisen konnten. Sie konnten eine durch Thrombozytengel-vermittelte verbesserte Pumpfunktion, Infarktdurchmesser und besseres Outcome post I/R zeigen [128]. Es muss jedoch bedacht werden, dass das Thrombozytengel aus PRP hergestellt wurde und daher durchaus noch andere Mediatoren wie Sphingosin-1-Phosphat zur Prognoseverbesserung in Frage kommen könnten.

Die Daten in dieser Arbeit verglichen nicht nur Con und Depletion, darüber hinaus gab es noch eine Gruppe welche IgG appliziert bekam, um unspezifische, antikörpervermittelte Effekte auszuschließen. Es zeigt sich ein klar verbessertes Outcome durch Depletion bei den Mäusen. Die Infarktgröße ist signifikant vermindert bei vergleichbarem AAR/LV (Abb. 15). Weiters zeigt sich in der Echokardiographie keine Abnahme der EF unter Depletion im Gegensatz zu IgG und Con (Abb. 16 A). Bezüglich SVI und SV zeigt sich eine signifikante Verminderung post I/R bei Con, allerdings nicht bei IgG

(Abb. 16 B/C). Es zeigen sich allerdings auch hier umgekehrte Trends zwischen IgG und Depletion, wobei Depletion auf ein besseres Outcome hindeutet. Vergleicht man die Werte post I/R von IgG und Depletion mittels ungepaartem T-Test, zeigen sich hier bei SV und SVI auch signifikante Unterschiede. Bei LVEDD, LVESD und der Herzfrequenz zeigen sich keine Unterschiede zwischen den Gruppen (Abb. 16 D-F)

Unsere strukturellen und funktionellen Daten zeigen insgesamt eine klare Verbesserung des Outcomes nach Depletion (Abb. 15/16). Bezüglich der Blutbild-Daten ergibt sich ein interessantes Bild. Erwartbar ist einerseits eine Verminderung der Thrombozyten unter Depletion auf nahezu null (Abb. 17 A). Auch ein verminderter Hb durch erhöhte Blutungskomplikationen der I/R Operation war zu erwarten (Abb. 17 B). Interessanterweise gibt es jedoch auch signifikante Unterschiede bezüglich der Leukozytenfraktionen. So zeigt sich unter Depletion ein signifikanter Abfall der Lymphozyten, bei gleichzeitig signifikantem Anstieg von Monozyten und Granulozyten. Alle diese Veränderungen liegen in der Kontrollgruppe nicht vor (Abb. 17).

Diese Veränderungen deuten auf ein Zusammenspiel zwischen Thrombozyten und inflammatorischer Antwort bzw. direkt zwischen Thrombozyten und Leukozyten im AMI hin. Dass Thrombozyten mehr als eine reine hämostaseologische Wirkung besitzen rückt zunehmend in den Fokus der Wissenschaft. Zwar können Thrombozyten aufgrund mangelnden Zellkerns keine nennenswerten Mengen von Proteinen neu synthetisieren, allerdings verfügen sie über Speicher (insbesondere α-Granula) welche bei Aktivierung der Thrombozyten ausgeschüttet werden und neben hämostaseologischen Stoffen

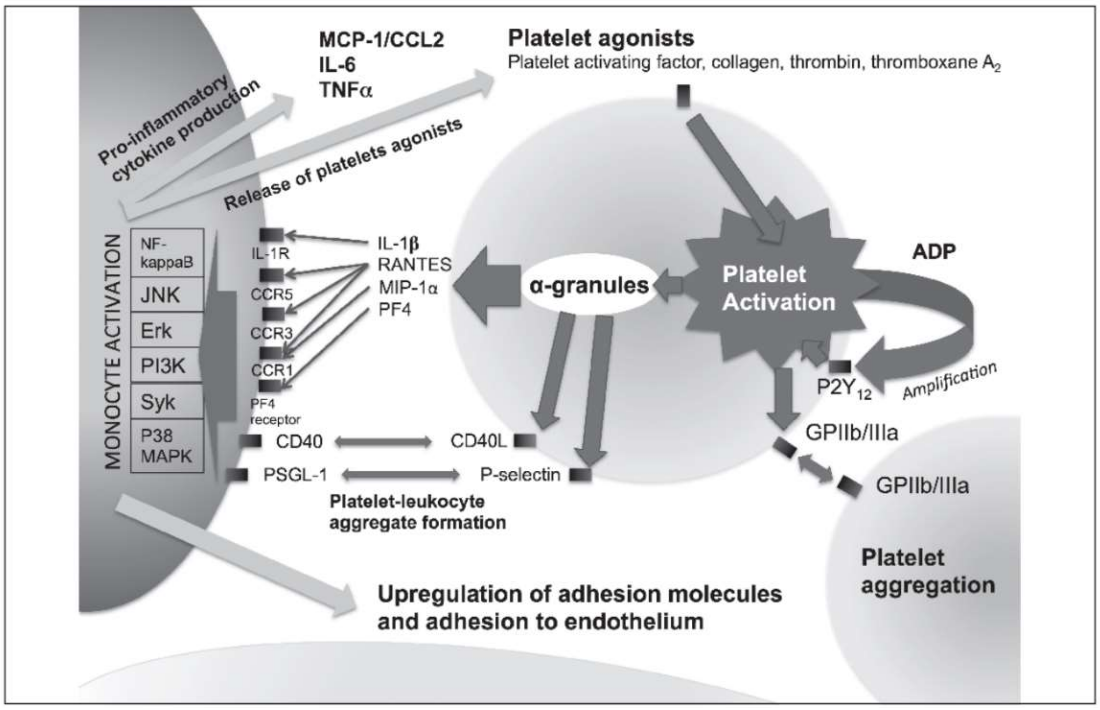


*Abbildung 26: Übersicht Zusammenspiel von Thrombozyten und Inflammation [3]*

auch diverse Chemokine innehaben [3, 129]. Im AMI kommt es durch massive Thrombozytenaktivierung daher auch zum Ausschütten von Chemokinen welche zur Rekrutierung von Immunzellen wie Monozyten oder Granulozyten in betroffene Areale führen [3]. Darüber hinaus kommt es über positive Feedbackmechanismen zur Autoaktivierung von Thrombozyten, z.B. über die Ausschüttung von ADP (Abb. 26) [3].

### 5.1.3 Depletion + Acetylsalicylsäure bei AMI

Um das Zusammenspiel aus Thrombozyten und ASS zu untersuchen, wurde Mäusen ASS und Depletion zusammen vor AMI appliziert. Aus den oben beschrieben Daten (Abb. 15-17) der depletierten Mäuse konnte bereits ein Wirken der Thrombozyten auf die inflammatorische Antwort nach AMI gesehen werden. Fraglich war nun, ob der Effekt der Depletion durch ASS weiter verändert werden würde. Sollte es eine weitere Verbesserung des Outcomes nach AMI durch ASS, trotz bereits erfolgter Depletion geben, würde dies für einen ASS-Effekt sprechen, welcher über die Wirkung der Thrombozytenfunktionshemmung hinaus geht.

Die Daten bezüglich der AAR/LV zeigen keine signifikanten Unterschiede zwischen der Gruppe Mäuse welche depletiert wurde und jener Gruppe die zusätzlich ASS erhielt (Abb. 18 A). Dies spiegelt sich auch in der IS/AAR dieser Gruppen wider (Abb. 18 B). Vergleichbare Daten konnten auch durch Ayhan 2020 gezeigt werden [105].

In dieser Arbeit wird nun weiter auf die funktionellen Parameter und histologische Aufarbeitung der Herzen eingegangen. Bei den funktionellen Parametern 24h nach I/R zeigte sich kein Unterschied einer zusätzlichen ASS Gabe im Vergleich zu reiner Depletion. EF, SVI, SV, LVEDD, LVESD und Herzfrequenz ergaben keine signifikanten Unterschiede (Abb. 19). Interessanterweise zeigt der SVI von ASS + Depletion im Median sogar eine Verminderung auf 66,5% der reinen Depletion, allerdings sind diese Daten nicht signifikant (p=0,0558, Abb.18 B). Aus diesen Daten ergibt sich ein weiterer Hinweis, dass ASS im AMI nicht über Thrombozytenfunktionshemmung hinaus protektiv wirkt.

Bezüglich der Blutbild-Daten zeigt sich ein heterogeneres Bild. Als Kontrolle des Erfolges der Depletion ergibt sich wieder eine erwartbare Abnahme der Thrombozyten in der Gruppe ASS + Depletion auf nahezu null (Abb. 20 A). Auch bezüglich des Hb Wertes zeigt sich eine, vermutlich durch vermehrte Blutungen durch den Eingriff entstandene, auch in der Depletionsgruppe auftretenden, signifikanten Abnahme nach OP in der Gruppe ASS + Depletion (Abb. 20 B). Diese Effekte sind so weit plausibel erklärbar. Die Gesamtleukozyten nahmen allerdings unter ASS + Depletion signifikant ab, was sich unter reiner Depletion nicht zeigt (Abb. 20 C). Dies könnte einerseits für ein vermindertes, inflammatorisches Geschehen sprechen, andererseits für eine vermehrte Einwanderung der Leukozyten in das infarzierte Areal. Es zeigten sich also unspezifische Veränderungen des Blutbildes

durch ASS, auch wenn es zusätzlich zu Depletion verabreicht wurde, ohne jedoch zu einer Verbesserung des Outcomes zu führen.

Die Immunantwort im Myokard nach AMI kann maßgeblich zum Outcome und zum *cardiac remodeling* beitragen [130]. Insbesondere Neutrophile, Makrophagen und Monozyten werden rasch nach AMI über Zytokine rekrutiert. Der Peak der Initialen Immunantwort findet ca. drei bis fünf Tage nach AMI statt, diese geht dann weiter über in eine ca. 10-tägige proliferative Phase [131]. Die Ly-6C$^{high}$ proinflammatorischen Makrophagen kennzeichnen dabei die Frühphase, Ly-6C$^{low}$ Makrophagen erreichen ihren Peak im infarzierten Gewebe später und initiieren Reparatur und Narbenbildung [131].

Die gesamte Infiltration von Immunzellen wurde zunächst mittels HE-Färbung lichtmikroskopisch ermittelt. Anschließend erfolgten Makrophagen und Neutrophilen-Färbungen der Mäuseherzen 5 Tage nach AMI. Die 5 Tage wurden gewählt um einen repräsentativen Zeitpunkt des *cardiac remodeling* zu beobachten [132]. Es zeigen sich keine signifikanten Unterschiede in der Gruppe ASS + Depletion verglichen mit der Gruppe Depletion hinsichtlich Gesamt-Inflammation, Makrophagen und Neutrophileneinwanderung in das Myokard post I/R (Abb. 21-23) im Myokard.

Zusätzlich wurde zur Begutachtung des Langzeitergebnisses die Kollagenfärbung Sirius Rot 21 Tage nach I/R durchgeführt. Hieraus lassen sich Rückschlüsse auf die Infarktnarbe und damit Heilungsprozesse im längeren Zeitintervall ziehen. Auch hier zeigt sich keine Verbesserung der Infarktnarbe durch eine zusätzliche Gabe von ASS zu Depletion verglichen mit reiner Depletion (Abb. 24). Es zeigt sich insgesamt keine Verbesserung des Outcomes nach I/R durch Gabe von ASS, wenn bereits eine Thrombozytendepletion durchgeführt wurde. Ein signifikanter Unterschied konnte in der Leukozyten Verteilung im Blut gesehen werden (Abb. 20 C-F), was sich allerdings nicht in der Infiltration des Myokardes widerspiegelte (Abb. 21-23).

## 5.2 Resümee

ASS in der Prävention von kardiovaskulären Ereignissen ist ein häufig eingesetztes und gut untersuchtes Medikament, welches jedoch zunehmend kritisch betrachtet wird und bei vielen neuen Untersuchungen ersetzt wird, beispielsweise durch P2Y12 Inhibitoren. Dass ASS zu einer Verkleinerung des Infarktareals im AMI hat, konnte erst kürzlich durch Naguib gezeigt werden. Die Hintergründe dieser bislang nicht beschriebenen Wirkung von ASS waren unklar. Ob unter den vielfältigen Wirkungen von ASS die antiinflammatorischen oder thrombozytenfunktionshemmende Eigenschafen für diesen neuartigen Mechanismus verantwortlich sind, wurde in dieser Arbeit untersucht.

Es zeigte sich, dass Mäuse, welche anstelle von ASS das Natriumsalz der Salicylsäure NaSS bekamen, kein besseres Outcome nach AMI hatten im Vergleich zu unbehandelten Mäusen. NaSS hat vergleichbare antiinflammatorische Eigenschaften wie ASS, bei nicht vorhandener

Thrombozytenfunktionshemmung. Mäuse welche Thrombozyten-depletiert wurden, hatten im Gegensatz dazu einen deutlich geringeren Myokardschaden nach AMI als Mäuse, welche nicht depletiert wurden. Die Mäuse hatten allerdings kein zusätzlicher Vorteil, wenn zur Depletion zusätzlich ASS verabreicht wurde. Insgesamt zeigt sich daher, dass die kardioprotektive Wirkung im AMI bei Mäusen durch ASS, rein thrombozytenabhängig ist und nicht direkt durch antiinflammatorische Eigenschaften von ASS zu erklären ist. Im translationalen Teil der Arbeit konnte gezeigt werden, dass Patienten, welche trotz bereits bestehender Therapie mit ASS ein kardiovaskuläres Ereignis erlitten, eine signifikant höhere Thrombozytenfunktion aufwiesen als Patienten ohne kardiovaskuläres Ereignis. An einer weiteren Kohorte konnte gezeigt werden, dass CRP als unabhängiger kardiovaskulärer Risikoindikator, bei Patienten unter ASS Therapie signifikant höher war, wenn die Patienten eine verminderte Thrombozytenfunktionshemmung aufwiesen. Die Ergebnisse zeigen insgesamt, dass sowohl die neu beschriebene Verkleinerung der Infarktgröße im AMI durch ASS als auch die kardiovaskuläre Risikoreduktion von ASS, Thrombozytenabhängig ist.

Klinisch könnte dies bedeuten, dass Thrombozytenfunktionstests, geeignet zum Monitoring der ASS Wirkung sind und daher vermehrte Anwendung finden sollten. Zusätzlich sollte bei klinischen Studien vermehrt auf die Infarktgröße und das daraus entstehende klinische Outcome geachtet werden als auf die reine Inzidenz von kardiovaskulären Ereignissen. Dies könnte erneut einen höheren Stellenwert von ASS in der klinischen Anwendung bedeuten.

# 6 Quellenverzeichnis:


1. 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).* Eur Heart J, 2018. **39**(2): p. 119-177.
2. Prabhu, S.D. and N.G. Frangogiannis, *The Biological Basis for Cardiac Repair After Myocardial Infarction: From Inflammation to Fibrosis.* Circ Res, 2016. **119**(1): p. 91-112.
3. Thomas, M.R. and R.F. Storey, *The role of platelets in inflammation.* Thromb Haemost, 2015. **114**(3): p. 449-58.
4. Nicholls, M., *Werner Forssmann Nobel Prize for physiology or medicine 1956.* Eur Heart J, 2020. **41**(9): p. 980-982.
5. Ridker, P.M., et al., *Inflammation, aspirin, and the risk of cardiovascular disease in apparently healthy men.* N Engl J Med, 1997. **336**(14): p. 973-9.
6. Rosenkranz, B., et al., *Effects of salicylic and acetylsalicylic acid alone and in combination on platelet aggregation and prostanoid synthesis in man.* Br J Clin Pharmacol, 1986. **21**(3): p. 309-17.
7. Naguib, D., *Inzidenz einer High on-treatment platelet reactivity bei elektiver Korona-rintervention und Acetylsalicylsäure im murinen Myokardinfarkt.* Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, 2018.
8. Miller, C.H., *Platelet Aggregation Studies*, in *Transfusion Medicine and Hemostasis*, B.H. Shaz, C.D. Hillyer, and M. Reyes Gil, Editors. 2019, Elsevier. p. 827-831.
9. Frangogiannis, N.G., *Pathophysiology of Myocardial Infarction.* Compr Physiol, 2015. **5**(4): p. 1841-75.
10. WHO. *Cardiovascular diseases (CVDs)*. 2021; Available from: https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds).
11. Wilkins, E., et al. *European cardiovascular disease statistics 2017.* 2017; Available from: https://ehnheart.org/cvd-statistics/cvd-statistics-2017.html.
12. Joseph, L. and E.S.H. Kim, *Non-Atherosclerotic Vascular Disease in Women.* Curr Treat Options Cardiovasc Med, 2017. **19**(10): p. 78.
13. van der Schoot, G.G.F., R.L. Anthonio, and G.A.J. Jessurun, *Acute myocardial infarction in adolescents: reappraisal of underlying mechanisms.* Neth Heart J, 2020. **28**(6): p. 301-308.
14. Barth, A.S. and G.F. Tomaselli, *Gene scanning and heart attack risk.* Trends Cardiovasc Med, 2016. **26**(3): p. 260-5.
15. Malakar, A.K., et al., *A review on coronary artery disease, its risk factors, and therapeutics.* J Cell Physiol, 2019. **234**(10): p. 16812-16823.
16. Hu, S., et al., *Management and Outcome of Patients With Acute Coronary Syndrome Caused by Plaque Rupture Versus Plaque Erosion: An Intravascular Optical Coherence Tomography Study.* J Am Heart Assoc, 2017. **6**(3).
17. Toldo, S. and A. Abbate, *The NLRP3 inflammasome in acute myocardial infarction.* Nat Rev Cardiol, 2018. **15**(4): p. 203-214.
18. Heusch, G. and B.J. Gersh, *The pathophysiology of acute myocardial infarction and strategies of protection beyond reperfusion: a continual challenge.* Eur Heart J, 2017. **38**(11): p. 774-784.
19. Boersma, E., *Does time matter? A pooled analysis of randomized clinical trials comparing primary percutaneous coronary intervention and in-hospital fibrinolysis in acute myocardial infarction patients.* Eur Heart J, 2006. **27**(7): p. 779-88.
20. Puymirat, E., et al., *Association of changes in clinical characteristics and management with improvement in survival among patients with ST-elevation myocardial infarction.* Jama, 2012. **308**(10): p. 998-1006.
21. DGK, *<PA-Herzinfarkt-17012018.pdf> Deutscher Herzbericht 2017: Immer weniger Herzinfarkt-Tote dankFortschritten der modernen Herz-Medizin Pressetext DGK 01/2018.*

22. Mehta, A., et al., *Cardiovascular Disease Prevention in Focus: Highlights from the 2019 American Heart Association Scientific Sessions.* Curr Atheroscler Rep, 2020. **22**(1): p. 3.
23. Pencina, M.J., et al., *Quantifying Importance of Major Risk Factors for Coronary Heart Disease.* Circulation, 2019. **139**(13): p. 1603-1611.
24. Lou, G., J. Chen, and Y. Xia, *Effects of low-dose aspirin in subjects with dyslipidemia.* Lipids Health Dis, 2016. **15**: p. 106.
25. Meade, T., *Primary prevention of ischaemic cardiovascular disorders with antiplatelet agents.* Handb Exp Pharmacol, 2012(210): p. 565-605.
26. Elliott, A.C., et al., *Metabolic changes during ischaemia and their role in contractile failure in isolated ferret hearts.* J Physiol, 1992. **454**: p. 467-90.
27. Solaro, R.J., et al., *Effects of acidosis on ventricular muscle from adult and neonatal rats.* Circ Res, 1988. **63**(4): p. 779-87.
28. Sekili, S., et al., *Direct evidence that the hydroxyl radical plays a pathogenetic role in myocardial "stunning" in the conscious dog and demonstration that stunning can be markedly attenuated without subsequent adverse effects.* Circ Res, 1993. **73**(4): p. 705-23.
29. Corretti, M.C., et al., *Glycolytic inhibition and calcium overload as consequences of exogenously generated free radicals in rabbit hearts.* J Clin Invest, 1991. **88**(3): p. 1014-25.
30. Buckberg, G.D., et al., *Experimental subendocardial ischemia in dogs with normal coronary arteries.* Circ Res, 1972. **30**(1): p. 67-81.
31. Spaan, J.A., N.P. Breuls, and J.D. Laird, *Diastolic-systolic coronary flow differences are caused by intramyocardial pump action in the anesthetized dog.* Circ Res, 1981. **49**(3): p. 584-93.
32. Task Force on the management of, S.T.s.e.a.m.i.o.t.E.S.o.C., et al., *ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation.* Eur Heart J, 2012. **33**(20): p. 2569-619.
33. Brieger, D., et al., *Acute coronary syndromes without chest pain, an underdiagnosed and undertreated high-risk group: insights from the Global Registry of Acute Coronary Events.* Chest, 2004. **126**(2): p. 461-9.
34. Collet, J.P., et al., *2020 ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation.* Rev Esp Cardiol (Engl Ed), 2021. **74**(6): p. 544.
35. Derbalah, A., et al., *Revisiting the Pharmacology of Unfractionated Heparin.* Clin Pharmacokinet, 2019. **58**(8): p. 1015-1028.
36. Petzold, T., et al., *Rivaroxaban Reduces Arterial Thrombosis by Inhibition of FXa-Driven Platelet Activation via Protease Activated Receptor-1.* Circ Res, 2020. **126**(4): p. 486-500.
37. Parodi, G., et al., *Morphine is associated with a delayed activity of oral antiplatelet agents in patients with ST-elevation acute myocardial infarction undergoing primary percutaneous coronary intervention.* Circ Cardiovasc Interv, 2015. **8**(1).
38. Andersson, C., et al., *β-blocker therapy and cardiac events among patients with newly diagnosed coronary heart disease.* J Am Coll Cardiol, 2014. **64**(3): p. 247-52.
39. *ISIS-4: a randomised factorial trial assessing early oral captopril, oral mononitrate, and intravenous magnesium sulphate in 58,050 patients with suspected acute myocardial infarction. ISIS-4 (Fourth International Study of Infarct Survival) Collaborative Group.* Lancet, 1995. **345**(8951): p. 669-85.
40. Schmidt, T. and J.D. Abbott, *Coronary Stents: History, Design, and Construction.* J Clin Med, 2018. **7**(6).
41. Fattori, R. and T. Piva, *Drug-eluting stents in vascular intervention.* Lancet, 2003. **361**(9353): p. 247-9.
42. Crespo-Leiro, M.G., et al., *Advanced heart failure: a position statement of the Heart Failure Association of the European Society of Cardiology.* Eur J Heart Fail, 2018. **20**(11): p. 1505-1535.
43. Snipelisky, D., S.P. Chaudhry, and G.C. Stewart, *The Many Faces of Heart Failure.* Card Electrophysiol Clin, 2019. **11**(1): p. 11-20.

44. Ponikowski, P., et al., *2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: The 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.* Eur Heart J, 2016. **37**(27): p. 2129-2200.
45. Bahit, M.C., A. Kochar, and C.B. Granger, *Post-Myocardial Infarction Heart Failure.* JACC Heart Fail, 2018. **6**(3): p. 179-186.
46. Segev, A., et al., *Prognostic significance of admission heart failure in patients with non-ST-elevation acute coronary syndromes (from the Canadian Acute Coronary Syndrome Registries).* Am J Cardiol, 2006. **98**(4): p. 470-3.
47. Holinstat, M., *Normal platelet function.* Cancer Metastasis Rev, 2017. **36**(2): p. 195-198.
48. Weyrich, A.S., et al., *Protein synthesis by platelets: historical and new perspectives.* J Thromb Haemost, 2009. **7**(2): p. 241-6.
49. Hess, K., *The vulnerable blood.* Hamostaseologie, 2015. **35**(1): p. 25-33.
50. Gremmel, T., A.L. Frelinger, 3rd, and A.D. Michelson, *Platelet Physiology.* Semin Thromb Hemost, 2016. **42**(3): p. 191-204.
51. Temperilli, F., et al., *Arachidonic acid-stimulated platelet tests: Identification of patients less sensitive to aspirin treatment.* Platelets, 2015. **26**(8): p. 783-7.
52. Scharf, R.E., *Drugs that affect platelet function.* Semin Thromb Hemost, 2012. **38**(8): p. 865-83.
53. Nahrendorf, M., M.J. Pittet, and F.K. Swirski, *Monocytes: protagonists of infarct inflammation and repair after myocardial infarction.* Circulation, 2010. **121**(22): p. 2437-45.
54. Ridker, P.M., et al., *Antiinflammatory Therapy with Canakinumab for Atherosclerotic Disease.* N Engl J Med, 2017. **377**(12): p. 1119-1131.
55. Ridker, P.M., et al., *C-reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women.* N Engl J Med, 2000. **342**(12): p. 836-43.
56. Montinari, M.R., S. Minelli, and R. De Caterina, *The first 3500 years of aspirin history from its roots - A concise summary.* Vascul Pharmacol, 2019. **113**: p. 1-8.
57. Botting, R.M., *Vane's discovery of the mechanism of action of aspirin changed our understanding of its clinical pharmacology.* Pharmacol Rep, 2010. **62**(3): p. 518-25.
58. Fitzgerald, R. and M. Pirmohamed, *Aspirin resistance: effect of clinical, biochemical and genetic factors.* Pharmacol Ther, 2011. **130**(2): p. 213-25.
59. 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.
60. Vane, J.R., Y.S. Bakhle, and R.M. Botting, *Cyclooxygenases 1 and 2.* Annu Rev Pharmacol Toxicol, 1998. **38**: p. 97-120.
61. Blanco, F.J., et al., *Effect of antiinflammatory drugs on COX-1 and COX-2 activity in human articular chondrocytes.* J Rheumatol, 1999. **26**(6): p. 1366-73.
62. Ornelas, A., et al., *Beyond COX-1: the effects of aspirin on platelet biology and potential mechanisms of chemoprevention.* Cancer Metastasis Rev, 2017. **36**(2): p. 289-303.
63. Weber, C., et al., *Aspirin inhibits nuclear factor-kappa B mobilization and monocyte adhesion in stimulated human endothelial cells.* Circulation, 1995. **91**(7): p. 1914-7.
64. Santos, M.T., et al., *The administration of a loading dose of aspirin to patients presenting with acute myocardial infarction while receiving chronic aspirin treatment reduces thromboxane A2-dependent platelet reactivity.* Platelets, 2014. **25**(4): p. 268-73.
65. Zeymer, U., et al., *Prospective, randomised trial of the time dependent antiplatelet effects of 500 mg and 250 mg acetylsalicylic acid i. v. and 300 mg p. o. in ACS (ACUTE).* Thromb Haemost, 2017. **117**(3): p. 625-635.
66. Bonow, R.O., et al., *Lack of effect of aspirin on myocardial infarct size in the dog.* Am J Cardiol, 1981. **47**(2): p. 258-64.
67. Libersan, D., et al., *Intravenous aspirin at reperfusion does not reduce infarct size in the dog with a residual critical stenosis.* J Cardiovasc Pharmacol, 1999. **34**(4): p. 575-83.

68. Birnbaum, Y., R. Ye, and Y. Ye, *Aspirin Blocks the Infarct-Size Limiting Effect of Ischemic Postconditioning in the Rat.* Cardiovasc Drugs Ther, 2021.
69. Baigent, C., et al., *Aspirin in the primary and secondary prevention of vascular disease: collaborative meta-analysis of individual participant data from randomised trials.* Lancet, 2009. **373**(9678): p. 1849-60.
70. Bowman, L., et al., *ASCEND: A Study of Cardiovascular Events iN Diabetes: Characteristics of a randomized trial of aspirin and of omega-3 fatty acid supplementation in 15,480 people with diabetes.* Am Heart J, 2018. **198**: p. 135-144.
71. 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.
72. McNeil, J.J., et al., *Effect of Aspirin on All-Cause Mortality in the Healthy Elderly.* New England Journal of Medicine, 2018. **379**(16): p. 1519-1528.
73. Lewis, H.D., Jr., et al., *Protective effects of aspirin against acute myocardial infarction and death in men with unstable angina. Results of a Veterans Administration Cooperative Study.* N Engl J Med, 1983. **309**(7): p. 396-403.
74. Berger, J.S., D.L. Brown, and R.C. Becker, *Low-dose aspirin in patients with stable cardiovascular disease: a meta-analysis.* Am J Med, 2008. **121**(1): p. 43-9.
75. Degrauwe, S., et al., *Dual antiplatelet therapy for secondary prevention of coronary artery disease.* Open Heart, 2017. **4**(2): p. e000651.
76. Hankey, G.J. and J.W. Eikelboom, *Aspirin resistance.* Lancet, 2006. **367**(9510): p. 606-17.
77. Rothwell, P.M., et al., *Effects of aspirin on risks of vascular events and cancer according to bodyweight and dose: analysis of individual patient data from randomised trials.* Lancet, 2018. **392**(10145): p. 387-399.
78. Maree, A.O., et al., *Cyclooxygenase-1 haplotype modulates platelet response to aspirin.* J Thromb Haemost, 2005. **3**(10): p. 2340-5.
79. Lepäntalo, A., et al., *Polymorphisms of COX-1 and GPVI associate with the antiplatelet effect of aspirin in coronary artery disease patients.* Thromb Haemost, 2006. **95**(2): p. 253-9.
80. Clappers, N., et al., *The C50T polymorphism of the cyclooxygenase-1 gene and the risk of thrombotic events during low-dose therapy with acetyl salicylic acid.* Thromb Haemost, 2008. **100**(1): p. 70-5.
81. Polzin, A., et al., *Prevention of dipyrone (metamizole) induced inhibition of aspirin antiplatelet effects.* Thromb Haemost, 2015. **114**(1): p. 87-95.
82. Cattaneo, M., *High on-treatment platelet reactivity--definition and measurement.* Thromb Haemost, 2013. **109**(5): p. 792-8.
83. Mitchell, J.A., et al., *Sodium salicylate inhibits cyclo-oxygenase-2 activity independently of transcription factor (nuclear factor kappaB) activation: role of arachidonic acid.* Mol Pharmacol, 1997. **51**(6): p. 907-12.
84. Higgs, G.A., et al., *Pharmacokinetics of aspirin and salicylate in relation to inhibition of arachidonate cyclooxygenase and antiinflammatory activity.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(5): p. 1417-20.
85. Angiolillo, D.J., *The evolution of antiplatelet therapy in the treatment of acute coronary syndromes: from aspirin to the present day.* Drugs, 2012. **72**(16): p. 2087-116.
86. Gąsecka, A., et al., *Role of P2Y Receptors in Platelet Extracellular Vesicle Release.* Int J Mol Sci, 2020. **21**(17).
87. Offermanns, S., *Activation of platelet function through G protein-coupled receptors.* Circ Res, 2006. **99**(12): p. 1293-304.
88. Léon, C., et al., *Defective platelet aggregation and increased resistance to thrombosis in purinergic P2Y(1) receptor-null mice.* J Clin Invest, 1999. **104**(12): p. 1731-7.
89. Cattaneo, M., *P2Y12 receptors: structure and function.* J Thromb Haemost, 2015. **13 Suppl 1**: p. S10-6.

90. Schilling, U., J. Dingemanse, and M. Ufer, *Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Approved and Investigational P2Y12 Receptor Antagonists.* Clin Pharmacokinet, 2020. **59**(5): p. 545-566.
91. Wallentin, L., et al., *Ticagrelor versus clopidogrel in patients with acute coronary syndromes.* N Engl J Med, 2009. **361**(11): p. 1045-57.
92. Zhang, L., et al., *Meta-analysis of Comparison of the Newer P2Y12 Inhibitors (Oral Preparation or Intravenous) to Clopidogrel in Patients With Acute Coronary Syndrome.* J Cardiovasc Pharmacol, 2017. **69**(3): p. 147-155.
93. De Villiers, C. and P.R. Riley, *Mouse models of myocardial infarction: comparing permanent ligation and ischaemia-reperfusion.* Dis Model Mech, 2020. **13**(11).
94. Monchi, M., *Citrate pathophysiology and metabolism.* Transfus Apher Sci, 2017. **56**(1): p. 28-30.
95. Cattaneo, M., et al., *Recommendations for the Standardization of Light Transmission Aggregometry: A Consensus of the Working Party from the Platelet Physiology Subcommittee of SSC/ISTH.* J Thromb Haemost, 2013.
96. Hvas, A.M. and E.J. Favaloro, *Platelet Function Analyzed by Light Transmission Aggregometry.* Methods Mol Biol, 2017. **1646**: p. 321-331.
97. Aslan, J.E., et al., *Platelet shape change and spreading.* Methods Mol Biol, 2012. **788**: p. 91-100.
98. Busch, L., et al., *Impact of high on-treatment platelet reactivity after angioplasty in patients with peripheral arterial disease.* Platelets, 2021. **32**(3): p. 391-397.
99. Polzin, A., et al., *Platelet reactivity in MitraClip patients.* Vascul Pharmacol, 2016. **77**: p. 54-9.
100. Bergmeier, W., et al., *Structural and functional characterization of the mouse von Willebrand factor receptor GPIb-IX with novel monoclonal antibodies.* Blood, 2000. **95**(3): p. 886-93.
101. Liu, L.T., et al., *Composition and characteristics of distinct macrophage subpopulations in the mouse thymus.* Mol Med Rep, 2013. **7**(6): p. 1850-4.
102. Walker, E.B., et al., *Characterization of subsets of bone marrow-derived macrophages by flow cytometry analysis.* J Leukoc Biol, 1985. **37**(2): p. 121-36.
103. Vafadarnejad, E., et al., *Dynamics of Cardiac Neutrophil Diversity in Murine Myocardial Infarction.* Circ Res, 2020. **127**(9): p. e232-e249.
104. Dannenberg, L., et al., *Enhanced Platelet Reactivity under Aspirin Medication and Major Adverse Cardiac and Cerebrovascular Events in Patients with Coronary Artery Disease.* Pharmacology, 2020. **105**(1-2): p. 118-122.
105. Ayhan, A., *Optimierung der antithrombotischen Therapie von Patienten mit einer koronaren Herzkrankheit und Vorhofflimmern.* Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, 2020.
106. Ittaman, S.V., J.J. VanWormer, and S.H. Rezkalla, *The role of aspirin in the prevention of cardiovascular disease.* Clin Med Res, 2014. **12**(3-4): p. 147-54.
107. Chung, C.J., et al., *Impact of high on-aspirin platelet reactivity on outcomes following successful percutaneous coronary intervention with drug-eluting stents.* Am Heart J, 2018. **205**: p. 77-86.
108. Nielsen, H.L., et al., *Aspirin response evaluated by the VerifyNow Aspirin System and light transmission aggregometry.* Thromb Res, 2008. **123**(2): p. 267-73.
109. Yeo, K.K., et al., *Aspirin and clopidogrel high on-treatment platelet reactivity and genetic predictors in peripheral arterial disease.* Catheter Cardiovasc Interv, 2018. **91**(7): p. 1308-1317.
110. 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.
111. Krasopoulos, G., et al., *Aspirin "resistance" and risk of cardiovascular morbidity: systematic review and meta-analysis.* Bmj, 2008. **336**(7637): p. 195-8.

112. Kim, M.A., et al., *The effect of aspirin on C-reactive protein in hypertensive patients.* Clin Exp Hypertens, 2011. **33**(1): p. 47-52.
113. Feldman, M., et al., *Effects of low-dose aspirin on serum C-reactive protein and thromboxane B2 concentrations: a placebo-controlled study using a highly sensitive C-reactive protein assay.* J Am Coll Cardiol, 2001. **37**(8): p. 2036-41.
114. Kronish, I.M., et al., *Aspirin adherence, aspirin dosage, and C-reactive protein in the first 3 months after acute coronary syndrome.* Am J Cardiol, 2010. **106**(8): p. 1090-4.
115. Pello Lázaro, A.M., et al., *Anti-Inflammatory Drugs in Patients with Ischemic Heart Disease.* J Clin Med, 2021. **10**(13).
116. Mitchell, J.A., et al., *Selectivity of nonsteroidal antiinflammatory drugs as inhibitors of constitutive and inducible cyclooxygenase.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(24): p. 11693-7.
117. Amann, R., et al., *Sodium salicylate enhances the expression of cyclooxygenase-2 in endotoxin-stimulated human mononuclear cells.* Eur J Pharmacol, 2001. **433**(1): p. 129-34.
118. Hinz, B., et al., *Salicylate metabolites inhibit cyclooxygenase-2-dependent prostaglandin E(2) synthesis in murine macrophages.* Biochem Biophys Res Commun, 2000. **274**(1): p. 197-202.
119. Leprán, I., M. Koltai, and L. Szekeres, *Effect of non-steroid anti-inflammatory drugs in experimental myocardial infarction in rats.* Eur J Pharmacol, 1981. **69**(2): p. 235-8.
120. Gao, X.M., et al., *Serial echocardiographic assessment of left ventricular dimensions and function after myocardial infarction in mice.* Cardiovasc Res, 2000. **45**(2): p. 330-8.
121. Moran, C.M., et al., *High-resolution echocardiography in the assessment of cardiac physiology and disease in preclinical models.* Exp Physiol, 2013. **98**(3): p. 629-44.
122. Vane, J.R., et al., *Inducible isoforms of cyclooxygenase and nitric-oxide synthase in inflammation.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(6): p. 2046-50.
123. Xu, X.M., et al., *Suppression of inducible cyclooxygenase 2 gene transcription by aspirin and sodium salicylate.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1999. **96**(9): p. 5292-5297.
124. Saito, T., et al., *Cyclooxygenase-2 (COX-2) in acute myocardial infarction: cellular expression and use of selective COX-2 inhibitor.* Can J Physiol Pharmacol, 2003. **81**(2): p. 114-9.
125. Timmers, L., et al., *Cyclooxygenase-2 inhibition increases mortality, enhances left ventricular remodeling, and impairs systolic function after myocardial infarction in the pig.* Circulation, 2007. **115**(3): p. 326-32.
126. Riondino, S., et al., *Lack of biological relevance of platelet cyclooxygenase-2 dependent thromboxane A2 production.* Thromb Res, 2008. **122**(3): p. 359-65.
127. Liu, Y., et al., *Novel role of platelets in mediating inflammatory responses and ventricular rupture or remodeling following myocardial infarction.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2011. **31**(4): p. 834-41.
128. Cheng, K., et al., *Intramyocardial injection of platelet gel promotes endogenous repair and augments cardiac function in rats with myocardial infarction.* J Am Coll Cardiol, 2012. **59**(3): p. 256-64.
129. Blair, P. and R. Flaumenhaft, *Platelet alpha-granules: basic biology and clinical correlates.* Blood Rev, 2009. **23**(4): p. 177-89.
130. Frangogiannis, N.G., *The immune system and the remodeling infarcted heart: cell biological insights and therapeutic opportunities.* J Cardiovasc Pharmacol, 2014. **63**(3): p. 185-95.
131. Peet, C., et al., *Cardiac monocytes and macrophages after myocardial infarction.* Cardiovasc Res, 2020. **116**(6): p. 1101-1112.

**Danksagung:**

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Malte Kelm bedanken, der mir die Möglichkeit gegeben hat, in seiner Klinik Forschung zu betreiben. Ganz besonderer Dank gilt natürlich auch PD. Dr. Polzin, welcher mir als Betreuer stets zur Seite stand. Ich konnte über die Jahre wirklich viel von Ihnen lernen! Über das Führen einer riesengroßen Arbeitsgruppe, über wissenschaftliches Arbeiten, über Ehrgeiz zum Erreichen seiner Ziele. Nichtsdestotrotz stand bei Ihnen auch immer Humor im Mittelpunkt, was uns als Arbeitsgruppe stark zusammengeschweißt hat und einen auch schwierige Momente zusammen durchstehen lies. Bei meiner Arbeitsgruppe möchte ich mich auch von Herzen bedanken! Aysel, René, Betül, Philipp, Alina, David, Kirsten, Steffi, Lisa, Saif, Martin ohne euch wäre die Arbeit im Labor nicht möglich gewesen! Mit euch, hat es dafür (meistens) richtig viel Spaß gemacht. Aber auch alle die nach mir dazu kamen, um die Arbeitsgruppe noch größer und noch stärker zu machen, auch ohne euch hätte ich diese Arbeit nicht beenden können! Daher auch ein riesiges Danke an Marcel, Maike, Daniel, Doro, Sam, Laura, Sophie! Ich denke außerdem sehr gerne an die diversen Festivitäten zurück, die wir zusammen erleben durften und möchte nichts davon missen!

Und Danke dir Flo, mit dir auf der Uni-Bibliothek waren es definitiv die produktivsten Stunden des Schreibens.

Der allergrößte Dank gilt aber natürlich meiner Familie! Ohne euch wäre das alles sowieso nie etwas geworden. Danke Anna, Danke Alex, Danke Helga! In jeder Phase dieser Arbeit konnte ich immer auf euch zählen! Außerdem wart ihr beim Korrekturlesen so wertvoll, und jedem von euch sind andere Dinge aufgefallen, sodass am Ende ein ganzes Bild steht. Danke, Danke, Danke!