

**Die Wirkung von Resveratrol  
auf menschliche Blutplättchen**

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor medicinae dentorum (Dr. med. dent.)

vorgelegt dem Rat der medizinischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

vorgelegt von Sarah Maria Forstner,  
geboren am 13. September 1984 in Krumbach a. d. Kammel

Ettenbeuren, 2014

**Gutachter:**

1. Univ.-Prof. Dr. med. Dagmar Barz, Jena
2. PD Dr. med. Annegret Balogh, Jena
3. Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Ekkehard Haen, Regensburg

**Tag der öffentlichen Verteidigung:** 03.03.2015

## Abkürzungsverzeichnis

<b>A</b>	AA	arachidonic acid, Arachidonsäure	
	ADP	Adenosindiphosphat	
	AI	Adhäsionsindex	
	Arg120	Arginin 120	
	ASA, ASS	Acetylsalicylsäure	
	AT-II	Angiotensin-II	
	ATL	aspirin-triggered lipoxins, ASS-induzierte Lipoxine	
	ATTC	Antiplatelet Trialist's Collaboration	
	AU*min, AUC	Aggregation Units mal Minuten, Area Under the Curve	
	<b>C</b>	Ca <sup>2+</sup>	Kalzium
CD41a		cluster of differentiation 41a, GP IIb/IIIa	
CD40L		cluster of differentiation 40 Ligand, CD154	
CD62p		cluster of differentiation 62p, P-Selektin	
C/EBPβ		CCAAT/enhancer binding protein β	
cGMP		cyclic guanosinmonophosphate, zyklisches Guanosinmonophosphat	
CO		Kohlenstoffmonoxid	
COX-1/-2		Cyclooxygenase-1/-2	
<b>E</b>		eNOS	Endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
		ET-1	Endothelin-1
<b>F</b>	FITC	Fluoreszenzeinisothiocyanat	
	Fc	fragment crystallizable	
	Fcγ <sub>II</sub> -R	Immunglobulin G-Rezeptor	
<b>G</b>	Glu524	Glutamat 524	
	GLUT-4	Typ 4-Glucosetransporter	
	GP IIb/IIIa	Glykoprotein IIb/IIIa	
	GPx-1	Glutathionperoxidase 1	
<b>H</b>	HbA1c	Glykohämoglobin, GHb	
	HDL	high-density lipoprotein	
	HETE,		
	12-, 15R-, 15S-	12-, 15R-, 15S-Hydroxy-Eicosatetraensäure	
	HGB	Hämoglobin	
	HIT-I/-II	Heparin induzierte Thrombozytopenie Typ I/II	
	HK	Hämatokrit	
	HMW-vWF	high molecular weight von-Willebrand factor	
	HO-1	Hämoxygenase-1	
	HPA-1	human platelet antigen 1	
<b>I</b>	IC <sub>50</sub>	Mittlere inhibitorische Konzentration	
	IgG	Immunglobulin G	
	iNOS	Induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase	
	ISIS-2	2nd International Study of Infarct Survival	
<b>K</b>	KG	Körpergewicht	
	<b>L</b>	LDL	low-density lipoproteins
LOX, 5-, 12-, 15-		5-, 12-, 15-Lipoxygenase	
LT, LTB4		Leukotrien, Leukotrien B4	
<b>M</b>	MAP-Kinase	mitogen activated protein kinase	
	Met522	Methionin 522	
<b>N</b>	n	Anzahl	
	NaCl 0,9%	isotone Kochsalzlösung	
	NADPH-Oxidase	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat-Oxidase	
	NFκB	nuclear factor κB, Nuklearer Faktor κB	
	NO	Stickstoffmonoxid	

	NSAID	non-steroidal anti-inflammatory drugs, Nichtsteroidale Antiphlogistika
<b>P</b>	PADA	platelet adhesion assay
	PADA-RASS	platelet adhesion assay - Resistenz auf ASS
	PAF	platelet activating factor, Plättchen aktivierender Faktor
	PE	Phycoerythrin
	PFA-100	platelet function analyzer
	PG	Prostaglandin
	PGG <sub>2</sub> /, PGH <sub>2</sub> -1/-2	Prostaglandin G <sub>2</sub> , Prostaglandin H <sub>2</sub> -1/-2
	PGHS-1/-2	Prostaglandin H <sub>2</sub> -Synthase-1/-2
	PGI <sub>2</sub>	Prostacyclin, Prostaglandin I <sub>2</sub>
	pH	potentia hydrogenii
	pK(A)	negativ dekadischer Logarithmus der Säurekonstante K(A)
	PLT	platelets, Blutplättchen
	PMNL	polymorphonuclear leukocyte, Polymorphkernige Leukozyten
	p. o.	per os, oral
	PPP	platelet-poor plasma, plättchenarmes Plasma
	PRASA	Paradoxe Reaktion auf ASS
	PRP	platelet-rich plasma, plättchenreiches Plasma
PSGL-1	P-selectin glycoprotein ligand 1	
<b>R</b>	rpm	rounds per minute, Umdrehungen pro Minute
	<b>S</b>	
	Ser350	Serin 350
	SOD-1	Superoxid-Dismutase 1
<b>T</b>	TF	tissue factor, Gewebsthromboplastin
	t-PA	tissue-type plasminogen activator, gewebespezifischer Plasminogenaktivator
	TRAP-6	thrombin activating peptide 6
	TX, TXA <sub>2</sub> /B <sub>2</sub>	Thromboxan, Thromboxan A <sub>2</sub> /B <sub>2</sub>
	Tyr385	Tyrosin 385
	T <sub>max</sub>	Zeit bis zum Erreichen maximaler Plasmaspiegel
	T <sub>1/2</sub>	Halbwertszeit
<b>U</b>	u-PA	urothelialer Plasminogenaktivator
	UV	Ultraviolett
<b>V</b>	vs.	versus, gegen
	vWF	von-Willebrand-Faktor
<b>W</b>	WBC	white blood cells, Leukozyten

## Einheiten

l, dl, ml, µl	Liter, Deziliter, Milliliter, Mikroliter
g, mg, µg, ng	Gramm, Milligramm, Mikrogramm, Nanogramm
mm, µm	Millimeter, Mikrometer
mol, µmol, nmol	Mol, Mikromol, Nanomol
sec, min, h, d	Sekunde, Minute, Stunde, Tag

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>I</b>
<b>Inhaltsverzeichnis.....</b>	<b>III</b>
<b>1. Einleitung.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Rolle der Thrombozyten bei Gerinnungskrankheiten.....</b>	<b>2</b>
<b>1.2. ASS als Hemmer der Thrombozytenaggregation</b>	
1.2.1. Indikationen .....	4
1.2.2. Pharmakokinetik .....	5
1.2.3. Unerwünschte Arzneimittelwirkungen und Interaktionen .....	5
1.2.4. Wirkungsmechanismus .....	6
1.2.5. Dosierung .....	11
1.2.6. „ASS-Resistenz“ .....	11
<b>1.3. Resveratrol und seine Wirkung auf die Blutplättchen.....</b>	<b>12</b>
1.3.1. Struktur und Biosynthese .....	13
1.3.2. Vorkommen.....	13
1.3.3. Pharmakokinetik .....	16
1.3.4. Toxizität .....	17
1.3.5. Wirkung auf das kardiovaskuläre System .....	17
1.3.6. Dosierung .....	21
<b>1.4. Verfahren zur Messung der Plättchenfunktion und ASS-Response .....</b>	<b>23</b>
1.4.1. Optische Aggregometrie.....	23
1.4.2. Impedanzaggregometrie (Multiplate).....	24
1.4.3. Durchflusszytometrie (P-Selektin-Expression).....	25
1.4.4. Platelet Adhesion Assay (PADA).....	27
1.4.5. Platelet Adhesion Assay – Reaktion auf ASS (PADA-RASS).....	28
1.4.6. Testauswahl.....	28
<b>2. Zielsetzung .....</b>	<b>32</b>
<b>3. Material und Methoden</b>	
<b>3.1. Studienkollektiv .....</b>	<b>33</b>
3.1.1. Probanden .....	33
3.1.2. Ein- und Ausschlusskriterien .....	33

<b>3.2. Studiendesign</b> .....	<b>33</b>
3.2.1. Studienablauf.....	33
3.2.2. Probandenbefragung .....	34
3.2.3. Allgemeine Blutwerte .....	34
3.2.4. Probengewinnung .....	34
<b>3.3. Materialien</b> .....	<b>35</b>
<b>3.4. Durchführung der Thrombozytenfunktionstests</b>	
3.4.1. Durchführung des PADA.....	36
3.4.2. Durchführung des PADA-RASS.....	37
3.4.3. Durchführung von Multiplate.....	38
3.4.4. Durchführung der Durchflusszytometrie.....	39
<b>3.5. Statistische Auswertung</b> .....	<b>39</b>
<b>4. Ergebnisse</b>	
<b>4.1. Allgemeine Blutparameter</b> .....	<b>40</b>
<b>4.2. Messung der Plättchenreaktivität</b>	
4.2.1. Messung der Plättchenreaktivität ohne Resveratrol mit dem PADA.....	40
4.2.2. Messung der Plättchenreaktivität vor und nach Resveratrol	
4.2.2.1. Messung der Plättchenreaktivität vor und nach Resveratrol mit dem PADA.. .....	42
4.2.2.2. Messung der Plättchenreaktivität vor und nach Resveratrol mit der Durchflusszytometrie.....	44
4.2.2.3. Messung der Plättchenreaktivität vor und nach Resveratrol mit dem Multiplate.....	45
<b>4.3. Messung der Plättchenaggregation unter ASS-Zusatz <i>in vitro</i></b>	
4.3.1. Messung der ASS-Response ohne Resveratrol mit dem PADA-RASS.....	48
4.3.2. Messung der ASS-Response vor und nach Resveratrol	
4.3.2.1. Messung der ASS-Response vor und nach Resveratrol mit dem PADA-RASS.....	51
4.3.2.2. Messung der ASS-Response vor und nach Resveratrol mit dem Multiplate.....	53
<b>4.4. Gegenüberstellung der drei Testmethoden</b>	
4.4.1. Vergleich der Testmethoden zur Messung der Plättchenaktivität.....	55
4.4.2. Vergleich der Testmethoden zur Messung der ASS-Response.....	57

## **5. Diskussion**

### **5.1. Diskussion der der Versuche ohne ASS-Zusatz**

5.1.1. Plättchenreaktivität mit dem PADA ohne Resveratrol.....	59
5.1.2. Einfluss von Resveratrol auf die im PADA gemessene Plättchenreaktivität .....	61
5.1.3. Einfluss von Resveratrol auf die P-Selektin-Expression der Plättchen.....	63
5.1.4. Einfluss von Resveratrol auf die mit dem Multiplate gemessene Plättchenreaktivität.....	64
5.1.5. Gegenüberstellung der Ergebnisse der drei Testmethoden.....	65

### **5.2. Diskussion der Versuche mit ASS-Zusatz *in vitro***

5.2.1. ASS-Response mit dem PADA-RASS ohne Resveratrol.....	67
5.2.1.1. Mögliche Ursachen für eine PRASA	
5.2.1.1.1. Antikoagulation mit Heparin.....	68
5.2.1.1.2. ASS als Plättchenaktivator.....	69
5.2.1.1.3. Beladung der Plättchen mit Antikörpern.....	72
5.2.2. Einfluss von Resveratrol auf die mit dem PADA-RASS gemessene ASS-Response.....	72
5.2.2.1. Mögliche Mechanismen wie Resveratrol die ASS-Wirkung im Plättchen beeinflusst	
5.2.2.1.1. Interaktion von Resveratrol mit COX-1.....	73
5.2.2.1.2. Interaktion von Resveratrol mit COX-2.....	75
5.2.2.1.3. Einfluss von Resveratrol auf oxidativen Stress .....	77
5.2.3. Einfluss von Resveratrol auf die mit Multiplate gemessene ASS-Response.....	77
5.2.4. Gegenüberstellung der Ergebnisse mit dem PADA-RASS und Multiplate.....	78

## **6. Zusammenfassung..... 79**

## **7. Literatur..... 82**

## **8. Anhang**

8.1. Diagramme und Tabellen.....	100
8.2. Probandenaufklärung.....	103
8.3. Fragebogen.....	104
8.4. Lebenslauf.....	105
8.5. Danksagung.....	106
8.6. Ehrenwörtliche Erklärung.....	107

## 1. Einleitung

Die Hämostase stellt im menschlichen Organismus ein essentielles System zur Sicherung der Überlebensfunktion dar, indem es bei Verletzungen im Gefäßbett für einen primären Wundverschluss sorgt. Dabei stehen Aktivierung und Hemmung der Blutgerinnung stets im Gleichgewicht miteinander. Wird dieses einseitig provoziert, z. B. durch entzündliche Veränderungen der Gefäßwand oder der Blutplättchen, kann das fälschlicherweise zum Einleiten der Hämostasereaktion bis hin zum kompletten Gefäßverschluss führen. Zum überwiegenden Teil entstehen solche arterielle Thromben auf dem Boden einer fortgeschrittenen Atherosklerose und führen zu Ereignissen wie Schlaganfall und Herzinfarkt. Fortgeleitete Blutgerinnsel, die aufgrund von Herzrhythmusstörungen oder Herzinsuffizienz, aber auch kardialen Aneurysmen entstehen, sind ebenso häufige Verursacher arterieller Embolien (Hach-Wunderle 2007).

Allein in Deutschland sterben als Folge einer Okklusion der Koronararterien jährlich 60.000-80.000 Menschen (Statistisches Bundesamt 2010). Die Dominanz von kardiovaskulären Erkrankungen als Haupttodesursache in der heutigen Wohlstandsgesellschaft intensiviert die Bemühungen um weitere Erkenntnisse über deren Pathogenese sowie über die uns zur Verfügung stehenden Therapie-Möglichkeiten. Sie wirft aber auch die Frage auf, inwieweit Ernährungsgewohnheiten hierbei eine Rolle spielen und ob sich bestimmte Lebensmittel günstig auf den Verlauf dieser Erkrankungen auswirken können. In Diskussion steht dabei der sekundäre Pflanzenstoff Resveratrol, ein insbesondere im Rotwein enthaltenes Polyphenol, dem eine Plättchen inhibierende Wirkung zugeschrieben wird. Da arterielle Thromben in erster Linie von Thrombozyten ausgelöst werden, könnte Resveratrol helfen das kardiovaskuläre Risiko zu reduzieren (Shen et al. 2007). Es wäre somit eine potentielle Erweiterung der Standard-Therapie mit Acetylsalicylsäure, welche aufgrund ihrer Nebenwirkungen oder einer ungenügenden Hemmung der Plättchenaggregation („Aspirin-Resistenz“) nicht immer erfolgreich angewendet werden kann.

In dieser Pilotstudie soll anhand 15 gesunder Probanden und verschiedener Testmethoden untersucht werden, ob sich nach Einnahme von Resveratrol die Plättchenaktivität verändert und ob die Substanz Einfluss auf die antiaggregatorische Wirkung von ASS besitzt.



## 1.1. Rolle der Thrombozyten bei Gerinnungskrankheiten

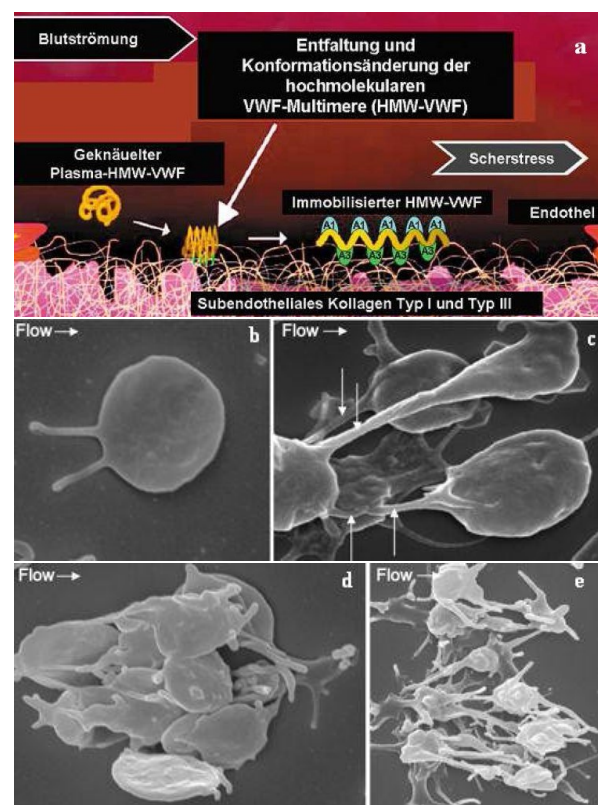
Thrombozyten sind ganz wesentlich für die Hämostase im arteriellen System verantwortlich (Kamath et al. 2001). Sie stehen in engem Kontakt mit dem Endothel, da sie beim schnellen Blutfluss von den wesentlich größeren Erythrozyten aufgrund des rheologischen Phänomens der Axialmigration nach außen zur Gefäßwand hin verdrängt werden („plasma skimming“). Dies erlaubt ihnen ein effektives Absuchen nach Endothelläsionen (Perkkiö et al. 1987, Reininger 2007). Bei Ruptur eines Blutgefäßes werden sie und die plasmatische Blutstillung parallel durch freigelegte subendotheliale Strukturen aktiviert und unterstützen sich gegenseitig bei der Bildung eines defektschließenden Blutkoagels (Madlener und Pötzsch 2010). Hierfür besitzen Plättchen verschiedene Rezeptoren, worüber sie mit hoher Affinität Liganden wie von-Willebrand-Faktor (vWF), Fibrinogen und Fibronektin binden, um trotz der teils hohen Scherraten im arteriellen Strombett am Ort der Verletzung zu adhären und miteinander aggregieren zu können (Jackson 2007) (**Abb. 1 a-e**).

### Abb. 1 a-d: Adhäsion und reversible Aggregation

Das frei zirkulierende Adhäsionsmolekül vWF bindet an subendotheliales Kollagen und wird durch Scherstress aus seiner globulären in eine langgestreckte Form „ausgerollt“, wobei Bindungsdomänen für thrombozytäre Rezeptoren frei werden (**Abb. 1 a**) (Reininger 2007). An diesen Kontaktpunkten wird die Plättchen-Membran im Blutstrom zu *tethers* (**Abb. 1 b**, Pfeile in **Abb. 1 c**) langgezogen, womit sich die Thrombozyten an der Gefäßwand festhalten und entlang „hangeln“ (*translocation*) (Dopheide et al. 2002). Adhärenz Plättchen sezernieren und binden weiteren vWF, über welchen sich immer mehr von ihnen zu einem reversiblen Aggregat vernetzen (**Abb. 1 c-d**) (Kulkarni et al. 2000).

### Abb. 1 e: Aktivierung und Stabilisierung

Das Abbremsen der Plättchen erlaubt nun ihre direkte Bindung an Kollagen und weitere Adhäsionsmoleküle, wodurch sie unter Ausbildung langer Filopodien (*shape change*, **Abb. 1 e**) und Freisetzung zahlreicher Mediatoren zunehmend aktiviert und letztendlich über Fibrinogen-Brücken irreversibel miteinander verstrickt werden (Savage et al. 1996, Offermanns 2006).



(Bilder: **a** Reininger 2007; **b-e** Maxwell et al. 2007)

Um einen stabilen Thrombus zu erreichen, bedarf es einer Aktivierung der Plättchen. Dies geschieht primär z.B. durch Kontakt zu extrazellulären subendothelialen Matrixbestandteilen

wie Kollagen und Fibronektin, wird jedoch im Wesentlichen fortgesetzt durch Mediatoren, die von den Plättchen selbst sezerniert (ADP, TXA<sub>2</sub>) bzw. im Rahmen der plasmatischen Gerinnung auf ihren Membranen oder denen anderer Zellen generiert werden (Thrombin). ADP, TXA<sub>2</sub> und Thrombin sind starke Agonisten, welche innerhalb des noch instabilen Plättchenaggregats (und damit weitgehend geschützt vor Abtransport in den systemischen Kreislauf) im Sinne eines positiven Feedbacks autokrin und parakrin die Plättchen zunehmend aktivieren. Dies wird noch potenziert durch weitere Mediatoren aus den thrombozytären Granula wie Serotonin, Prostaglandin E<sub>2</sub> oder Plättchenfaktor 4, deren Wirkungen einzeln betrachtet zwar nicht für eine vollständige Aktivierung ausreichen (Offermanns 2006), sich jedoch durchaus aufsummieren können (Kamath et al. 2001). Darüber hinaus reagieren Plättchen auf plötzliche Veränderungen in der Hämodynamik, wie sie physiologisch bei unterbrochener Gefäßintegrität bzw. von einem wachsenden Thrombus verursacht werden und den Gerinnungsprozess vor Ort zusätzlich unterstützen (Holme et al. 1997).

Diese vielfältigen Aktivierungswege führen zu einer enormen Signalverstärkung und Beschleunigung der Thrombusformation, bis ein Sistieren der Blutung erreicht ist (Kamath 2001). Wird dagegen intravasal eine Gerinnung induziert, kommt es dementsprechend zur Stenose oder gar Okklusion des Gefäßes (Reininger 2007). Normalerweise verhindert das Endothel durch Freisetzung vasoprotektiver Faktoren eine Plättchenaktivierung, wenn keine Gefäßverletzung vorliegt. Insbesondere das von der endothelialen NO-Synthase (eNOS) produzierte Stickstoffmonoxid (NO) verhindert die Adhäsion und Aggregation von Plättchen und wirkt an glatten Muskelzellen vasodilatatorisch. Chronifizierte pathologische Zustände wie Hypertonie und Hypercholesterinämie führen jedoch infolge entzündlicher Endothelschädigung und Atherosklerose zu einer reduzierten Antithrombogenität des vaskulären Systems und verschieben so die Balance zugunsten einer Aktivierung der Plättchen (Lüscher und Barton 1997). Beim kardiovaskulären Risikopatienten induziert oxidativer Stress die Bildung von Sauerstoffradikalen, welche mit NO reagieren und nicht nur dessen eigene Verfügbarkeit, sondern auch die des ebenfalls von Endothelzellen synthetisierten Prostacyclins reduzieren (Cai und Harrison 2000, Marnett et al. 1999). Prostacyclin (PGI<sub>2</sub>) stellt neben NO den wichtigsten natürlichen Plättchen-inhibitor dar (Moncada et al. 1977). Die Progression der Atherosklerose wird von den aktivierten Plättchen selbst zusätzlich vorangetrieben (Gawaz et al. 2005), indem sie z. B. über Adhäsionsmoleküle wie P-Selektin mit Leukozyten interagieren und ihr Einwandern in das Endothel fördern (van Gils et al. 2010). Die vorangetriebene Entzündung führt letztlich zur Entstehung von plaqueförmigen Läsionen mit unterschiedlicher Morphologie und Neigung zur Thrombosierung (Virmani et al. 2000).

Relevant ist hierbei wie schon erwähnt, dass Blutplättchen bei unphysiologischem Blutfluss auch durch Scherstress aktiviert werden können. Plötzlich wechselnde Strömungsverhältnisse, z. B. infolge von Rauigkeiten der Plaques, erweisen sich als besonders stimulierend im Vergleich zu einer reinen Zunahme der Wandscherrate aufgrund eines verringerten Gefäßdurchmessers (Holme et al. 1997). Es wurde sogar gezeigt, dass unter diesen Umständen selbst ohne primäre Plättchenaktivierung eine rasante Thrombusformation möglich ist (Ruggeri et al. 2006). Die bei kardialen Arrhythmien veränderte Hämodynamik geht deswegen ebenfalls mit einer vermehrten Plättchenaktivierung einher (Akar et al. 2008) und erhöht das Schlaganfallrisiko (Engström et al. 2000).

Unabhängig davon scheinen auch psychische Faktoren eine Plättchen stimulierende Wirkung zu besitzen. So verstärkt das Stresshormon Adrenalin die Plättchenaggregation (Lanza et al. 1988, Levine et al. 1985) und depressive Patienten zeigen reaktivere Plättchen als seelisch Gesunde (Musselmann et al. 2000).

Zuletzt gibt es auch Hinweise auf genetische Einflüsse wie z. B. hereditär bedingte Hyperreagibilitäten der Plättchen. Es konnte hierbei gezeigt werden, dass ein Polymorphismus des sich auf dem „Fibrinogen-Rezeptor“ GPIIb/IIIa befindlichen humanen Plättchenantigens-1 (HPA-1) mit einem um etwa fünf Jahre früher auftretenden Myokardinfarkt assoziiert ist (Zotz et al. 2005).

Eine übermäßige Aktivierung der Blutplättchen spielt also bei der Entstehung arterieller Thromben eine entscheidende Rolle. Es ist daher wichtig neben der Behandlung von allgemeinen Risikofaktoren der Atherosklerose wie Hypertonie, Hypercholesterinämie, Diabetes mellitus, Adipositas und Nikotinabusus (Bhatt et al. 2006) auch eine gezielte Hemmung der Thrombozytenfunktion in die Therapie zu integrieren. Üblicherweise geschieht das in Form einer prophylaktischen Einnahme von Acetylsalicylsäure (ASS) als Plättchen inhibierenden Wirkstoff.

## **1.2 ASS als Hemmer der Thrombozytenfunktion**

### **1.2.1. Indikationen**

Erste wissenschaftliche Empfehlungen für ASS als Antithrombotikum finden sich 1968 bei O'Brien und ebenfalls 1968 bei Weiss, nachdem Craven 1950 bereits auf einen potentiellen Schutz vor Herzinfarkt bei täglicher Einnahme von ASS hingewiesen hatte (O'Brien 1968, Weiss 1968, Craven 1950). Zahlreiche Studien folgten und ASS etablierte sich ab den 70iger Jahren des letzten Jahrhunderts als Mittel erster Wahl zur Sekundärprophylaxe nach Myokardinfarkt und Apoplex, sowie zur Vermeidung akuter atherothrombotischer Ereignisse

bei koronarer Herzkrankheit, peripherer arterieller Verschlusskrankheit (ATTC 2002) oder bei chirurgischen Interventionen wie Bypass-Operationen und Stent-Setzungen (Schrör 2010). Bei Fibrinolyse eines frisch okkludierten Koronargefäßes lässt sich durch additive Gabe von ASS die Letalität weiter deutlich senken (ISIS-2 1988). Beim akuten Koronarsyndrom ist die frühe antithrombozytäre Medikation mit ASS ein wesentlicher Bestandteil der Primärtherapie (May 2010 S. 488, Bassand et al. 2007). Auch beim ischämischen zerebralen Insult kann das Outcome durch ASS verbessert werden (Adams et al. 2008).

### 1.2.2. Pharmakokinetik

Acetylsalicylsäure wird in kleinen Mengen bereits im Magen resorbiert, was den schnellen Wirkungseintritt erklärt ( $T_{\max} = 25 \text{ min}$ ). ASS besitzt einen  $pK(A)$  von 3,5 und liegt daher zum Großteil in undissoziierter membrangängiger Form vor. Aufgrund des pH-Anstiegs im Intrazellularraum kommt es nach Diffusion in die oberen Mukosazellen zur Dissoziation und Ionisierung der Moleküle, die nunmehr über Kanäle die Zellmembran passieren und mangels Rückdiffusion in zytotoxisch relevanten Menge akkumulieren können.

Im alkalischen Milieu des oberen Dünndarms steigt die Löslichkeit von ASS rapide an und bedingt zusammen mit der beträchtlich vergrößerten Resorptionsoberfläche trotz zunehmender Dissoziation eine nahezu vollständige Aufnahme (Schrör 1992, Illes und Allgaier 2005). Unspezifische Esterasen in der Magen-Darm-Mukosa sowie in Blut und Leber deacetylieren etwa die Hälfte des ASS zum aktiven Metaboliten Salicylsäure, ehe es im systemischen Kreislauf mit einer Halbwertszeit von ca. 25 min einer weiteren Hydrolyse unterliegt (Plasmaproteinbindung: 60%) (Illes und Allgaier 2005).

Salicylsäure selbst wird bei einer Einmaldosis bis maximal 300 mg renal als überwiegend Glycin-konjugierte Salicylsäure eliminiert (Bedford et al. 1965). Die  $T_{1/2}$  von Salicylsäure beträgt 3-6 h, kann sich aber nach hohen Dosen wegen früher Sättigung der hepatischen Enzyme auf über 30 h verlängern. Bei Intoxikation mit Salicylaten lässt sich durch Alkalisierung des Harns die Ausscheidung der dissoziierten Säure-Metaboliten beschleunigen (Illes und Allgaier 2005 S. 237-239).

### 1.2.3. Unerwünschte Arzneimittelwirkungen und Interaktionen

Wesentliche Nebenwirkung von Plättchenaggregationshemmern ist die erhöhte Blutungsneigung. Vor elektiven Operationen ist daher gegebenenfalls eine Dosisanpassung nötig, was aber gegenüber dem Thromboserisiko sorgfältig abgewogen werden muss.

Die durch ASS ebenso reduzierte Prostaglandin-Synthese in anderen Geweben, aber auch ihre direkte Toxizität können bei Langzeitanwendung ernste Nebenwirkungen hervorrufen. Insbesondere die lokale Schädigung der Magenschleimhaut führt neben der ohnehin verlängerten Blutungszeit leicht zu okkulten Blutungen bis hin zu schwerwiegenden Ulzera. Die Produktion von Leukotrienen aus der nun vermehrt zur Verfügung stehenden Arachidonsäure kann bei überempfindlichen Patienten pseudoallergische Asthmaanfälle auslösen („Aspirin-Asthma“). Ebenso kontraindiziert ist die Gabe v. a. im letzten Trimenon einer Schwangerschaft, da der regelhafte Geburtsverlauf wesentlich von Prostaglandinen gesteuert wird. Hervorzuheben ist die kompetitive Hemmung von ASS durch andere NSAIDs wie Ibuprofen aber auch durch Pyrazolon-Derivate wie Metamizol und dessen Metabolite, da diese offensichtlich durch ihre reversible Bindung an COX-1 die irreversible Acetylierung durch ASS verhindern und daher bei kardiovaskulären Risikopatienten unter ASS-Therapie mit Vorsicht angewendet werden sollten (Hohlfeld et al. 2008).

#### **1.2.4. Wirkungsmechanismus**

ASS und ihr primärer Metabolit Salicylsäure greifen sowohl direkt in die Aktivität von Enzymen als auch indirekt über deren Transkription und Expression ein (Schrör 2008).

Noch am besten verstanden ist der inhibitorische Effekt von ASS auf die Prostaglandin- und Thromboxansynthese (Vane 1971, Schrör 1992). Prostaglandine (PG), Thromboxane (TX) und Leukotriene (LT) werden als Eicosanoide (griechisch „eikos“ = 20) zusammengefasst, da sie sich im Wesentlichen von der vierfach ungesättigten C20-Fettsäure Arachidonsäure (AA) ableiten. Daneben entstehen aus AA je nach Zellbesatz Lipoxine, Isoprostane und andere Abkömmlinge. Allesamt spielen sie als parakrine und autokrine Mediatoren im Organismus eine bedeutende Rolle.

Die halbessentielle AA ist ubiquitärer Bestandteil von Membran-Phospholipiden (Horn et al. 2002). Sie wird durch Phospholipase A2 freigesetzt und kann nun in dieser Form als Substrat für das Enzym Cyclooxygenase (COX) dienen (Kudo und Murakami 2002), bei der man insbesondere zwischen der in fast allen Zellen konstitutiv exprimierten COX-1 („housekeeping-enzyme“) und der v. a. in Immunzellen auf Reize wie Endotoxine und Zytokine hin induzierbare COX-2 differenziert. Eine strikte Trennung ihrer physiologischen Funktionsbereiche ist dennoch nach heutigem Wissensstand nicht möglich, da z. B. auch COX-1 in inflammatorische Prozesse involviert ist (Langenbach et al. 1995), während COX-2 u. a. für die Aufrechterhaltung verschiedener Organfunktionen (Brune und Hinz 1998, Williams und DuBois 1996) und für das Überleiten einer akuten Entzündung in die Heilungs-

phase verantwortlich ist (Rajakariar et al. 2006). In Endothelzellen wird COX-2 sogar für den Großteil der Prostacyclin-Synthese verantwortlich gemacht (McAdam et al. 1999).

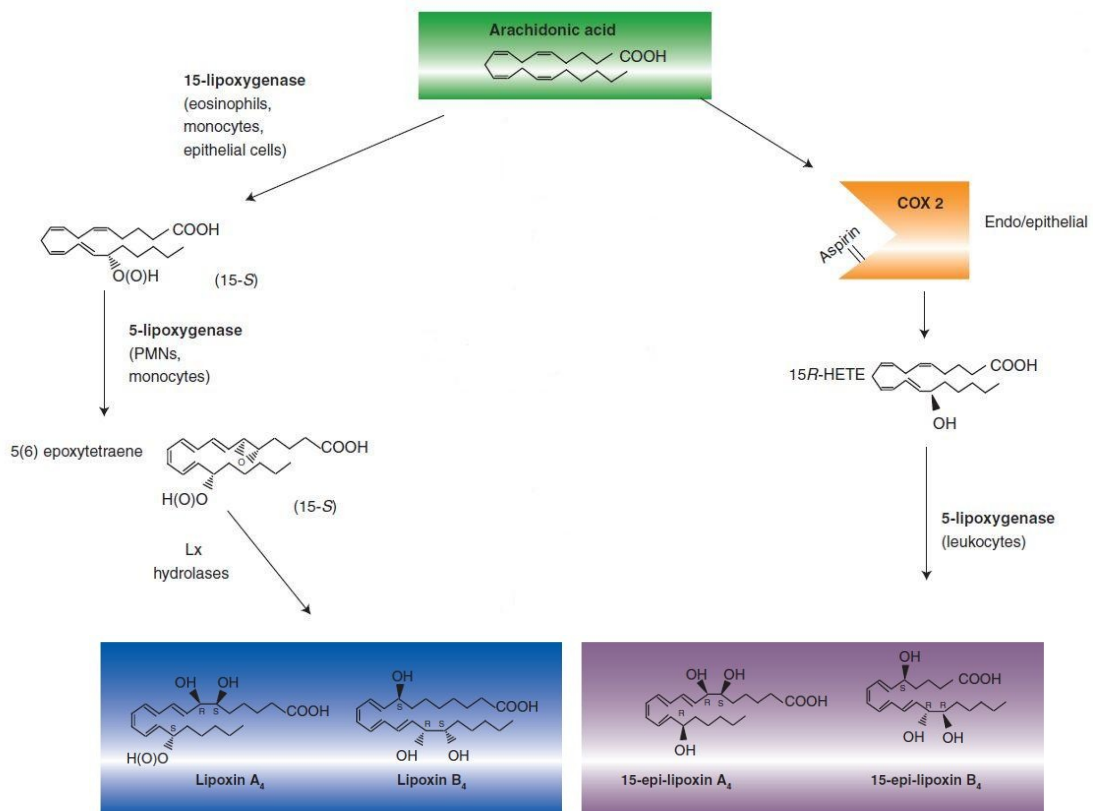
Die COX bildet den ersten enzymatischen Teilschritt der radikalisch ablaufenden Prostaglandin H<sub>2</sub>-Synthese (PGH<sub>2</sub>). Sie katalysiert die Addition von zwei Sauerstoffmolekülen an AA sowie eine intramolekulare Ringbildung, woraus das instabile Intermediat Prostaglandin G<sub>2</sub> (PGG<sub>2</sub>) entsteht, das anschließend in einem zweiten Schritt von der Peroxidase der COX zum beständigen Alkohol PGH<sub>2</sub> reduziert werden kann. PGH<sub>2</sub> ist nun Ausgangsmolekül für weitere PG (z. B. Prostacyclin) und den hochpotenten Plättchenaktivator TXA<sub>2</sub> (Marnett et al. 1999, Marnett 2000).

ASS acetyliert beide COX-Isoformen irreversibel an dem Ser350-Rest im katalytischen Zentrum, wodurch aufgrund sterischer Blockade keine Substratbindung mehr möglich ist (Roth et al. 1975, DeWitt et al. 1990). Irreversibel ist die Acetylierung deshalb, weil wegen des stark hydrophoben Milieus in unmittelbarer Umgebung keine Wassermoleküle für eine spontane Hydrolyse zur Verfügung stehen (Biele 2010). Die nachgeschaltete Peroxidase-Reaktion wird von ASS nicht beeinflusst.

COX-1 lässt sich fast 170-mal stärker durch ASS inhibieren als COX-2 (Vane et al. 1998, Maede et al. 1993). Dies ist grundlegend für die antithrombotische Wirkung von ASS, da man in den zur Protein-Neubildung unfähigen Plättchen vorrangig COX-1 vorfindet, woraus ein dauerhafter TXA<sub>2</sub>-Defekt resultiert (Awtry und Loscalzo 2000). TXA<sub>2</sub> wird von aktivierten Thrombozyten via TXA<sub>2</sub>-Isomerase aus PGH<sub>2</sub> gebildet (Hamberg und Samuelsson 1974), um über TXA<sub>2</sub>-Rezeptoren (etwa 1.000 davon auf einem Plättchen) weitere Aggregation und Freisetzung von Mediatoren zu erreichen (Hamberg et al. 1975, Offermanns 2010). Es wirkt zusätzlich vasokonstriktiv, wird aber - bei einer T<sub>1/2</sub> von etwa 30 sec – relativ rasch und ohne enzymatische Beteiligung in den beständigeren Metaboliten TXB<sub>2</sub> umgewandelt, was seine Wirksamkeit sinnvollerweise lokal begrenzt (Hamberg et al. 1975, Smith und Ingermann 1976, Offermanns 2010).

Parallel zur Thrombozytenhemmung wird im Endothel auch die Aktivität von COX-1 reduziert und folglich weniger Prostacyclin freigesetzt. Eine dadurch ausgelöste Steigerung der NO-Produktion (Bolz und Pohl 1997) und die Fähigkeit zur Neusynthese des Enzyms führen jedoch zur raschen Kompensation der Endothelfunktion (Vane 1998). Wie bereits erwähnt, beziehen Endothelzellen zudem einen Teil des Prostacyclins über ihre nur wenig ASS-sensitive COX-2. Diese behält selbst bei einer Acetylierung durch ASS mehr als 90% ihrer Aktivität bei, wobei aber statt Prostaglandinen jetzt andere Syntheseprodukte entstehen

(Maede et al. 1993): COX-2 ist vermutlich aufgrund günstigerer Platzverhältnisse im aktiven Zentrum trotz der gebundenen Acetyl-Gruppe imstande aus AA nun ein ganz anderes Produkt zu bilden: 15(R)-HETE (Rowlinson et al. 2000). 15(R)-HETE ist das R-Epimer zum natürlichen 15(S)-HETE, welches durch die 15-Lipoxygenase in Leukozyten aus AA entsteht (**Abb. 2**). Beide werden nun in ihrer jeweiligen Konfiguration weiter zu den anti-inflammatorischen Lipoxinen metabolisiert (Clària und Serhan 1995). Insbesondere in Anwesenheit von starken Entzündungsmediatoren wie Interleukin-1 $\beta$  (Lecomte et al. 1994) entstehen wegen Induktion von COX-2 vermehrt sogenannte „aspirin-triggered lipoxins“ (ATL), die im Gegensatz zu den physiologischen Lipoxinen in S-Konfiguration nicht innerhalb von wenigen Minuten abgebaut werden und daher länger am Ort des Geschehens wirksam bleiben (Sherhan et al. 1995). Neben AA fungiert auch Dokosahexaensäure als Substrat für eine R-Epimer-Bildung: aus ihr entstehen die sogenannten „aspirin-triggered resolvins“ (Serhan 2006). Als ein Produkt von PMNLs, Endothelzellen und Blutplättchen via zellüber-



**Abb. 2: Bildung von natürlichen Lipoxinen und aspirin-triggered lipoxins (15-epi-Lipoxine)**

Lipoxine sind wichtig für die Einleitung der Heilungsphase, indem sie u. a. die inflammatorische Aktivität von PMNLs hemmen und gleichzeitig die Einwanderung von phagozytierenden Monozyten stimulieren (Godson et al. 2000, Abb. modifiziert nach Rajakariar et al. 2006).

greifender Synthesewege limitieren Lipoxine (*lipoxigenase interaction products*) und Resolvine (*resolution phase interaction products*) ganz wesentlich das Ausmaß des entzündlich bedingten Gewebeschadens (Serhan et al. 1995, Serhan 2001 u. 2006) und könnten so einen Teil des positiven Einflusses von ASS auf die von chronisch-inflammatorischen Prozessen begleitete Atherosklerose erklären (Ridker et al. 1997). Zumindest konnte vor kurzem gezeigt werden, dass ATL in Endothelzellen bereits in geringsten Mengen die Hämoxygenase-1 (HO-1) im Abbau von Häm zu Kohlenstoffmonoxid (CO), Bilirubin und Eisen stimulieren (Nascimento-Silva et al. 2005, Grosser et al. 2003). CO und Bilirubin können als Radikalfänger den in inflammatorischen Phasen erhöhten oxidativen Stress abfangen (Ryter und Otterbein 2004). Die physiologische Relevanz von HO-1 für die Stabilisierung der Endothelfunktion in entzündlich veränderten Gefäßen zeigt sich im Tierversuch anhand schwerer arterieller Thrombenbildung bei HO-1-defekten Mäusen (True et al. 2007).

Einige Untersuchungen von COX-unabhängigen Effekten liefern ebenfalls interessante Ergebnisse hinsichtlich der vasoprotektiven Eigenschaften von ASS: bereits in therapierelevanten Konzentrationen steigert ASS, vermutlich direkt durch Acetylierung von eNOS, die kontinuierliche Freisetzung von kleinen Mengen des Radikalfängers NO und schützt so vor oxidativem Zellschaden des Endothels (Taubert et al. 2004). Inwieweit die tatsächliche NO-Bioverfügbarkeit von einer gleichzeitig auch vermehrten Sauerstoffradikal-Bildung nach ASS-Zugabe beeinträchtigt wird, ist allerdings noch offen (Madajka et al. 2003). Darüber hinaus interagiert ASS mit dem zunächst als Eisen-Reservoir bekannten Protein Ferritin, welches in seiner Synthese heraufreguliert wird und so freigewordenes zytosolisches Eisen an der Katalyse größerer Sauerstoffradikale hindern kann (Balla et al. 1992, Oberle et al. 1998).

Bemerkenswerterweise wirkt dagegen ASS, wenn auch erst in antiphlogistischer Dosierung, *hemmend* auf die durch Zytokine und bakterielle Lipopolysaccharide induzierbare Isoform der NOS, die im Gegensatz zur konstitutiven eNOS mittels massiver NO-Produktion aktiv in das Entzündungsgeschehen involviert ist (Katsuyama et al. 1999).

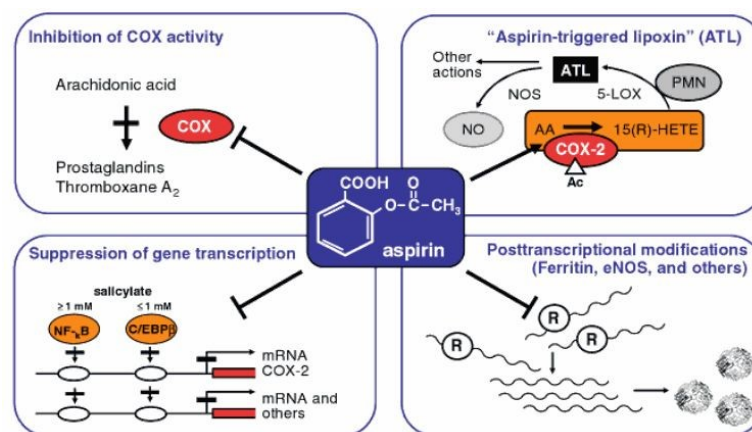
Die antithrombotische und gefäßschützende Wirkung von ASS beruht womöglich auch auf Wechselwirkungen mit Plasmabestandteilen wie z. B. Fibrinogen. Die Acetylierung von Lysin-Resten des Fibrinogens, welche für das Cross-linking während der Polymerisierung bedeutend sind, verlangsamt die Aggregat-Bildung und erleichtert die nachfolgende Fibrinolyse (Bjornsson et al. 1989). Gleichzeitig verhindert dies eine Oxidation der hierfür leicht anfälligen Lysin-Gruppen durch Sauerstoffradikale, was die Reaktivität des Fibrinogens steigern würde (Upchurch et al. 1998).



Auch die Oxidation von Low-density Lipoproteinen (LDL), welche vermehrt bei Hyperlipidämie im Blut zirkulieren, scheint bei Anwesenheit von ASS reduziert zu sein (Steer et al. 1997). Während Makrophagen oxidiertes LDL bevorzugt aufnehmen um bereits in frühen Stadien der Atherosklerose als lipidbeladene Schaumzellen zu imponieren, ist die Aufnahme von ASS-modifiziertem LDL in Makrophagen verringert (Mazière et al. 1987, Aviram und Maor 1993).

Auch kann ASS offenbar die plättchenhemmende Wirkung des monoklonalen Antikörpers Abciximab verstärken, indem es durch Acetylierung des Fibrinogenrezeptors GPIIb/IIIa seine Bindung an diesen erhöht (Schneider et al. 2001).

Im Gegensatz zu den (unvollständig) genannten *direkten* Interaktionen von ASS ist ihr Wirken auf *transkriptionaler* Ebene noch teilweise ungeklärt. Diskutiert wird u. a. die unterdrückte Induzierbarkeit von proinflammatorischen Transkriptionsfaktoren wie NFκB (Kopp 1994, Grilli et al. 1996) und C/EBPβ, die beispielsweise für die Induktion von COX-2 verantwortlich sind (Saunders et al. 2001). Vermutlich ebenfalls durch Hemmung der Transkription reduziert es die Expression von Tissue Factor (TF) auf Makrophagen (Oeth und Mackmann 1995). TF gilt als wesentlicher Initiator der plasmatischen Hämostase und wird in hohen Mengen auf der Membran von Makrophagen und anderen Zellen innerhalb von atherosklerotischen Läsionen exprimiert, was die Gefahr einer Thrombosierung stark erhöht (Steffel et al. 2006, Wilcox et al. 1989). Eine Übersicht über die wichtigsten Wirkungen von ASS gibt **Abb. 3**:



**Abb. 3: Wirkungen von ASS** (Schrör 2008)

### 1.2.5. Dosierung

Zur Sekundärprophylaxe vaskulärer Ereignisse zeigen sich geringe bis mäßig hohe Einmaldosen zwischen 75-325 mg /d als effektiv. Als Langzeittherapie werden 75-150 mg/d empfohlen, denn höhere Mengen zeigen keine signifikant besseren Ergebnisse, erhöhen jedoch die Häufigkeit unerwünschter Nebenwirkungen (APTC 1994, ATTC 2002) und können sogar das Thromboserisiko steigern (Taylor et al. 1999).

Die Gabe einmal pro Tag scheint ausreichend, um die TXA<sub>2</sub>-Synthese der täglich neu gebildeten Plättchen (ca. 10%) zu hemmen, während die COX-1 im Endothel sich wieder regenerieren (Patrono et al. 1998) und somit in ihrer Beeinträchtigung vernachlässigt werden kann (Jaffe und Weksler 1979).

Da beim Gesunden theoretisch bereits weniger als 0,1% Restaktivität der COX in den Plättchen für eine TXA<sub>2</sub>-vermittelte Aktivierung genügt, wird zumindest eine > 95%-ige Hemmung des Enzyms angestrebt, um die Thrombusbildung signifikant zu verlangsamen (Reilly und FitzGerald 1987, Weber et al. 2008).

### 1.2.6. „ASS-Resistenz“

Wie die Retrospektive zeigt, profitiert leider nur ein Teil der thrombosegefährdeten Risikopatienten von einer Therapie mit ASS (Grottemeyer et al. 1993, ATTC 2002, Eikelboom et al. 2002), so dass sich schon bald der Terminus „Aspirin-Resistenz“ etablierte. Im Allgemeinen wird hierunter verstanden, dass ASS nicht fähig ist den Patienten vor thrombotischen Ereignissen zu schützen bzw. dass bei Plättchenfunktionstests oder TXB<sub>2</sub>-Spiegelmessungen die erwartete Wirkung vermindert ist oder sogar ausbleibt (McKee et al. 2002). Unglücklich gewählt ist der Begriff „Resistenz“ allemal, insofern nicht auch tatsächlich der direkte pharmakologische Effekt von ASS auf das Zielenzym COX-1 betrachtet wird. Weil allerdings selbst die komplette Hemmung der TXA<sub>2</sub>-Synthese eine Thrombusbildung beim Vorhandensein anderer Stimuli nicht vermeiden kann (Weber et al. 2008), sollte bei thrombotischen Komplikationen unter ASS-Therapie nicht automatisch von einer „Resistenz“ gesprochen werden, da diese lediglich die Komplexität der Hämostase widerspiegeln - gerade bei kardiovaskulären Erkrankungen (Patrono 2003). Im Folgenden wird daher der Begriff „Resistenz“ durch „ASS-Nonresponse“ oder „ungenügende Sensitivität für ASS“ ersetzt.

Je nach Studienkollektiv und Testverfahren schwankt die angegebene Prävalenz einer ASS-Nonresponse zwischen 5-60%, was ungeachtet der bislang noch unausgereiften Nachweisverfahren von großer Bedeutung ist hinsichtlich der breiten Anwendung von ASS weltweit

(Nowak 2007, Lordkipanidzé et al. 2007). Problematisch wird die Festlegung einer ASS-Nonresponse, wenn sich Messwerte widersprechen, z. B. wenn sich die Plättchenaggregation selbst in Anwesenheit hoher Konzentrationen ASS nicht hemmen lässt, obwohl die TXA<sub>2</sub>-Synthese vielleicht vollständig unterdrückt ist bzw. umgekehrt. Weber und Mitarbeiter sind daher dazu übergegangen aus der Konstellation von Plättchenaggregation und simultaner TXB<sub>2</sub>-Messung verschiedene Typen einer ASS-Nonresponse zu definieren (Weber et al. 2002 b). Des Weiteren ließe sich auch zwischen einer ASS-Nonresponse *in vivo* (thrombotisches Ereignis trotz ASS) und *in vitro* (Labortest negativ) unterscheiden, wobei das Thromboserisiko zusammen mit der ASS-Nonresponse kontinuierlich steigt und deswegen die rein kategorische Einteilung in Responder/Nonresponder eigentlich wenig sinnvoll ist (Eikelboom et al. 2002, Hankey und Eikelboom 2004).

Als mögliche Ursachen wurden bereits pharmakodynamische (z. B. Interaktionen mit NSAIDs und Metamizol) bzw. –kinetische Gründe (mangelnde Resorption), aber auch einfach nur eine schlechte Compliance des Patienten identifiziert (Catella-Lawson et al. 2001, Capone et al. 2005, Hohlfeld et al. 2008, Gonzalez-Conejero et al. 2005, Cotter et al. 2004). Zudem kann sich die ASS-Response auch zeitlich ändern, z. B. nach einer Bypass-Operation, was u.a. mit einer gesteigerten Plättchen-Neusynthese in Verbindung gebracht wird (Zimmermann et al. 2003). Eine allgemein höhere Aktivität (Nowak 2007) oder Stimulierbarkeit (Guthikonda et al. 2007) der Plättchen spielt vermutlich ebenso eine Rolle und wird z. B. gefördert durch oxidativen Stress oder eine erhöhte COX-2-Expression in atherosklerotischen Plaques, die für die Plättchen als alternative Resource für TXA<sub>2</sub> dienen könnte (Cipollone et al. 1997).

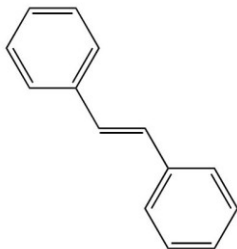
Desweiteren wird einer reduzierte ASS-Sensitivität assoziiert mit genetischen Polymorphismen der COX-1 (Nowak 2007, Maree et al. 2005), Veränderungen im Blutfluss z. B. aufgrund einer vermehrten Bildung von Erythrozytenaggregaten (Demiroglu 2003), steigendem Alter sowie einzelnen Blutparameter wie etwa dem Cholesterin-Spiegel (Akay et al. 2009, Friend et al. 2003).

### **1.3. Resveratrol und seine Wirkung auf die Blutplättchen**

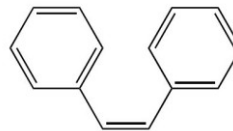
Da ASS offensichtlich nicht jeden Patienten vor einer Gerinnselbildung ausreichend schützen kann, ist man bestrebt nach Alternativen zu suchen. Das „mediterrane Paradoxon“, wonach Südeuropäer trotz hochkalorischer Kost weniger Herzinfarkte erleiden als andere Europäer, führte zu etlichen Studien über die mediterrane Lebensweise und entlarvte hierbei den Rotwein-Inhaltsstoff Resveratrol als Substanz mit besonderer vasoprotektiver Wirkung (Kopp 1998).

### 1.3.1. Struktur und Biosynthese

Resveratrol gehört zu den Stilbenen, einer Untergruppe der nicht-flavonoiden Phenole, welche wiederum der großen Klasse der Polyphenole angehört. Polyphenole sind sogenannte phytochemische Verbindungen (Synonym: Phytamine oder sekundäre Pflanzenstoffe, griechisch *phytos* = „Pflanze“). Diese werden für die organoleptischen Eigenschaften von Pflanzen verantwortlich gemacht, d. h. sie bestimmen wie eine Frucht oder ein Gemüse auf die menschlichen Sinnesorgane wirkt (Geschmack, Farbe etc.). Wissenschaftliche Untersuchungen unterstreichen immer mehr ihre Bedeutung für die menschliche Gesundheit (Béliveau und Gingras 2008).



*trans*-Stilben



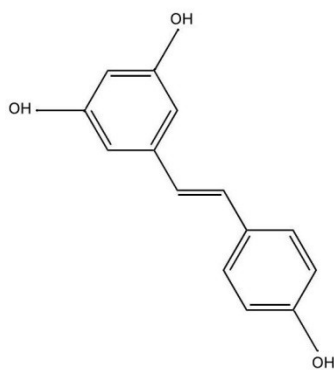
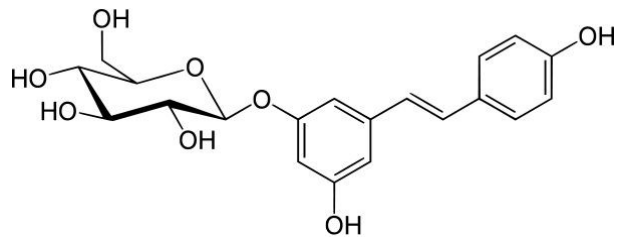
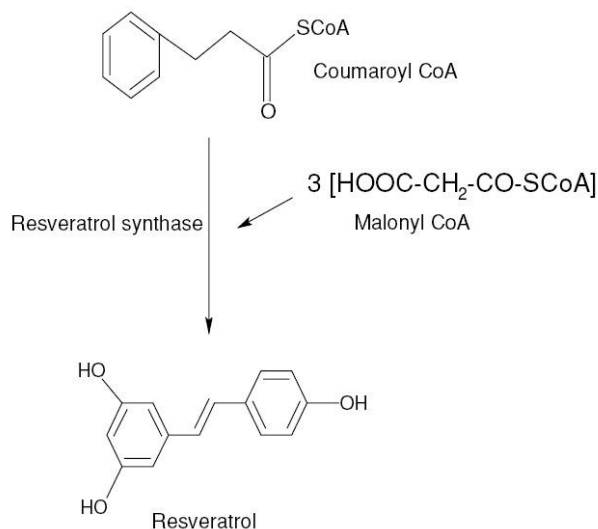
*cis*-Stilben

**Abb. 4:** Isomerie von Stilbenen

Bei Stilbenen sind zwei Isoformen möglich (**Abb. 4**), wobei die sterisch ungünstigere *cis*-Form weniger stabil ist als die *trans*-Form (Likhstenshtein 2010). Es handelt sich grundlegend um Ethen-Derivate mit zwei aromatischen Ringen, welche sich in Art und Anzahl ihrer noch zusätzlich gebundenen Moleküle (z.B. Hydroxyl- oder Zuckerreste) unterscheiden.

Resveratrol besitzt drei Hydroxylgruppen und wird daher auch als 3, 5, 4'-Trihydroxystilben bezeichnet. Üblicherweise ist damit das natürliche und biologisch aktivere *trans*-Isomer gemeint, während über *cis*-Resveratrol nur wenig in der Literatur bekannt ist (Soleas et al. 1995).

Die Pflanzen bilden *trans*-Resveratrol aus Coumarinsäure und Malonsäure durch das Enzym Stilbensynthase (Synonym: Resveratrolsynthase). Mittels Peroxidasen entstehen die größeren Polymere  $\alpha$ - und  $\epsilon$ -Viniferin (Daniel et al. 1999), durch Anlagerung von Zucker das Glukosid Piceid (**Abb. 5-6**).

*trans*-Resveratrol*trans*-Piceid**Abb. 5:** *Trans*-Resveratrol und sein Glukosid**Abb. 6:** Resveratrolsynthese (modifiziert nach Daniel et al. 1999)

### 1.3.2. Vorkommen

Resveratrol (lateinisch *res* = „Sache“, *veratrum* = „Nieswurz“) wurde Mitte der neunziger Jahre zum ersten mal aus *Veratrum grandiflorum* isoliert, später auch aus den Wurzeln von *Polygonum cuspidatum*. Es wird in höheren Mengen auch in Weintrauben, Erdnüssen und Maulbeeren gefunden und zählt zu den Phytoalexinen (griechisch *phytos* = „Pflanze“, *alekein* = „abwehren“). Diese werden von Pflanzen zum Schutz vor schädlichen Umwelteinflüssen synthetisiert, wie sie beispielsweise starke UV-Strahlung, mechanische Verletzungen und insbesondere Pilzinfektionen darstellen (Aggarwal et al. 2004). Besonders hoch ist

dementsprechend die Konzentration in ungespritzten Weintrauben aus Anbaugebieten mit feuchtem, kühlem Klima, aber auch der daraus produzierte Wein. Es befindet sich fast ausschließlich in der Schale und den Kernen, kaum im Fruchtfleisch (**Tab. 1**). Je länger also die zermahlene Traube bei der Weinherstellung vergoren werden, desto mehr Resveratrol kann sich aus Schale und Kern lösen, was den viel geringeren Gehalt des nur aus Traubenmark hergestellten Weißweins erklärt (Béliveau und Gingras 2008).

Nahrungsmittel	<i>trans</i> -	<i>cis</i> -Resveratrol	
	Resveratrol (µg/g)	(mg/l)	(µg/g) (mg/l)
Traubenschale	0,3 – 5,6		0,0
Erdnüsse <sup>1)</sup> frisch	0,07		
geröstet	0,02 -0,08		
Erdnussbutter <sup>1)</sup>	0,15 – 0,5		
Rosinen <sup>2)</sup>	0,0001		
Rotwein		0,03 – 4,6	0,03 – 4,6
Weißwein		0,01 – 0,2	0,01 – 0,6
Traubensaft		0,003 – 0,015	0,0

**Tab. 1: Resveratrolgehalt verschiedener Lebensmittel**

Der Gehalt im Wein variiert bedingt durch Rebsorte und Herstellungsverfahren (nach Soleas et al. 1995).

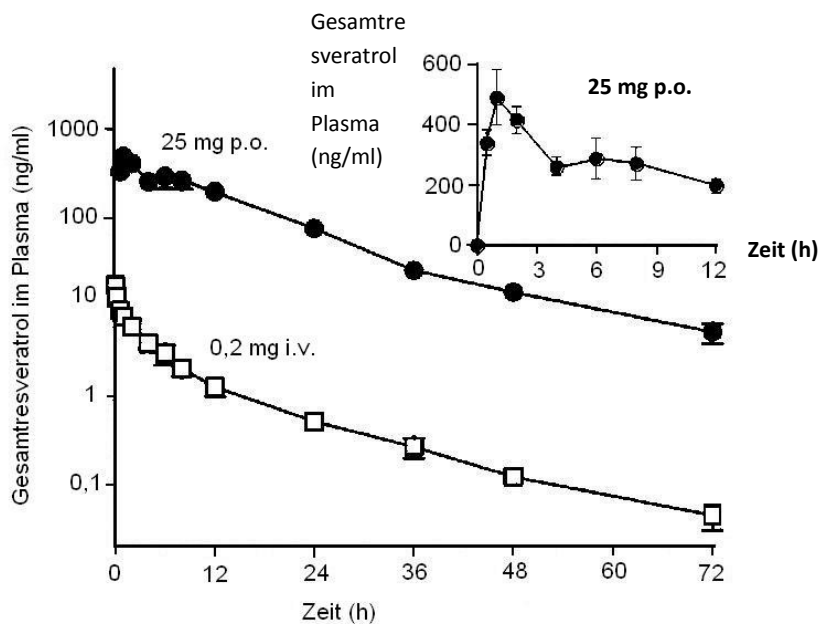
<sup>1)</sup> Sobolev und Cole 1999 <sup>2)</sup> Béliveau und Gingras 2008

Mit zunehmendem Reifegrad werden die Trauben widerstandsfähiger und ihr Bedarf an Phytoalexinen sinkt. Folglich enthält ein Saft immer weniger Resveratrol je reifer und süßer die Früchte waren (Jeandet et al. 1991). Da *cis*-Resveratrol zwar in Wein, jedoch weder in Traubenschalen noch in Traubensaft nachweisbar ist, entsteht es vermutlich erst während der Fermentation der Maische aufgrund einer Isomerisierung der *trans*-Form oder Abspaltung aus größeren Resveratrol-Polymeren (Viniferine) durch Hefe-Enzyme. Auch die nicht-enzymatische Umwandlung in *cis*-Resveratrol durch UV-Strahlung oder Oxidation ist möglich (Soleas et al. 1995). Der intensive Kontakt mit Sauerstoff wird daher auch als Grund für die nur noch minimalen Konzentrationen von *trans*-Resveratrol in getrockneten Rosinen genannt (Béliveau und Gingras 2008 S. 170).

### 1.3.3. Pharmakokinetik

Resveratrol wird im Menschen nach oraler Gabe rasch und zu > 70% resorbiert (Walle et al. 2004). Während der Passage durch die Dünndarmmukosa wird nahezu alles Resveratrol glukuronidiert und sulphatiert (Kuhnle et al. 2000, de Santi 2000 a und b). Beim Gesunden ergibt sich ca. 30-60 min nach Einnahme von 25 mg ein maximaler Plasmaspiegel von ca. 450 µg/l, welcher schnell wieder abfällt (**Abb. 7**). Nur ein Bruchteil davon (ca. 1,5%) sind dabei freies Resveratrol (Walle et al. 2004, Goldberg et al. 2003). Bei 0,2 mg i. v. war nach 30 min kein unverändertes Resveratrol im Blutkreislauf detektierbar (Walle et al. 2004). Auch bei täglich 1g oral über 8 Tage war Resveratrol in seiner freien Form gerade noch oder gar nicht mehr detektierbar (Patel et al. 2010). Boocock ermittelte an gesunden Probanden nach einmaliger Gabe von 0,5/1/2,5/5 g nach ca. 60 min eine maximale Konzentration freies Resveratrol von 72,6/117,0/268,0/538,8 µg/l (Boocock et al. 2007).

Die ermittelten Plasma-Halbwertszeiten beim Menschen variierten nach oraler Einnahme zwischen 1-10 h für freies Resveratrol sowie Metaboliten (Goldberg et al. 2003, Boocock et al. 2007 et al., Walle et al. 2004).



**Ab. 7: Plasmaspiegel insgesamt von Resveratrol und seinen Metaboliten (Gesamtresveratrol)**

(nach Walle et al. 2004)

Resveratrol wird zu einem geringen Maß im Stuhl ausgeschieden, Haupteliminationsweg stellt jedoch die Niere dar: bereits 4 h nach Einnahme ist der Großteil in Form von Resveratrol-Metaboliten im Urin wieder zu finden (Boocock et al. 2007).

Zusammenfassend lässt sich angesichts der raschen Ausscheidung eine nur geringe Bioverfügbarkeit von Resveratrol feststellen. Bei oraler Einnahme ist die präsystemische Metabolisierung in Darm und Leber von hoher Relevanz, aber auch nach i. v.-Injektion unterliegt die Substanz einer zügigen Umwandlung (Walle et al. 2004).

#### 1.3.4. Toxizität

In der Studie von Boocock et al. wurden bei gesunden Probanden selbst bei Tagesdosen bis 5 g keine schwerwiegenden Nebenwirkungen gefunden. Jedoch traten z. T. unspezifische Symptome auf wie Kopfschmerzen oder Verdauungsbeschwerden, aber auch erhöhte Leberwerte in Abhängigkeit von der Dosierung. Alle Nebenwirkungen waren zwar nur vorübergehend, Langzeiterfahrungen mit der Einnahme solch hoher Mengen existieren allerdings noch nicht (Boocock et al. 2007).

Anhand von Tierversuchen ließ sich bei 3 g/kg Körpergewicht (KG) am Tag eine eindeutige Nephrotoxizität erkennen. Eine zusätzliche Schädigung der Leber wurde aufgrund der Blutwerte zunächst vermutet, konnte histologisch jedoch nicht belegt werden. Dies macht die Niere zum Hauptschädigungsort, wobei die Einnahme von bis zu 300 mg/kg KG am Tag noch unterhalb ihrer toxischen Grenze liegt (Crowell et al. 2004). In Ratten kommt es dagegen schon ab 25 mg/kg Körpergewicht zu einer eindeutigen Umkehr der zuvor kardioprotektiven Effekte bis hin zum Tod (Dudley et al. 2008). Um diese Dosis zu erreichen, müsste eine 70 kg schwere Person hierfür jedoch rund 470 Flaschen Rotwein (5 mg Resveratrol/l) trinken.

#### 1.3.5. Wirkung auf das kardiovaskuläre System

Resveratrol wird ein vor Atherosklerose schützendes Potential zugeschrieben, was zunächst auf seine direkten antioxidativen Eigenschaften zurückgeführt wurde. So vermag es z. B. die Oxidation von LDL zu verhindern (Zou et al. 1999). Oxidiertes LDL ist stark atherogen, da es von Makrophagen leichter aufgenommen wird (Aviram und Maor 1993) und stimulierend auf glatte Muskelzellen (Delmas et al. 1995) aber auch auf die Thrombozyten wirkt (Zhao et al. 1995, Wang et al. 2002). Diese Fähigkeit ist jedoch im Vergleich zu anderen Radikalfängern *in vitro* relativ schwach im Gegensatz zu *in vivo*: Resveratrol kann offensichtlich die zelleigenen Schutzmechanismen im kardiovaskulären System hochregulieren („präkonditionieren“), indem es auf diverse Signalwege und Genexpressionen Einfluss nimmt (Delmas et al. 2005, Spanier et al. 2009):

Resveratrol verbessert die endogenen Kapazitäten zur Bewältigung von oxidativem Stress, z. B. durch Stimulation der antioxidativen Enzyme HO-1 (Hämoxxygenase-1), SOD-1



(Superoxid-Dismutase-1) und GPx-1 (Glutathionperoxidase-1), während die NADPH-Oxidase gehemmt wird (Huang et al. 2005, Zhuang et al. 2003, Spanier et al. 2009). NADPH-Oxidase bildet Sauerstoffradikale, welche zur Sekretion von Endothelin-1 (ET-1) führen, einem bei endothelialer Dysfunktion vermehrt gebildeten Vasokonstriktor. Resveratrol reduziert die Überexpression von ET-1 und unterstützt dadurch das Endothel in seinen regulatorischen Aufgaben (Liu et al. 2003, Lekli et al. 2008). Weil Sauerstoffradikale zudem das gefäßweitende NO leicht inaktivieren können, wird durch Resveratrol dessen Verfügbarkeit indirekt gesteigert. Es erhöht aber auch direkt die NO-Synthese via Expression und Aktivierung von eNOS (Li und Förstermann 2009). Allgemein wird der vermehrten Bereitstellung von NO durch Resveratrol eine wesentliche Bedeutung zugeschrieben (Csiszar et al. 2009, Li und Förstermann 2009, Das et al. 2005).

Derart „präkonditionierte“ Myokardzellen beispielsweise können den bei einem Infarkt entstehenden oxidativen Stress besser kompensieren, was den Zellschaden letztlich verringert. Verantwortlich hierfür scheint auch eine frühe Aktivierung von iNOS zu sein. iNOS ist die induzierbare NO-Synthase, welche normalerweise erst zu einem viel späteren Zeitpunkt angeschaltet wird (Hattori et al. 2002). Der Ischämie-Reiz einer progressiven Gefäßsklerose führt nach Behandlung mit Resveratrol auch zur stärkeren Synthese von VEGF (vascular endothelial growth factor) und anderen proangiogenetischen Faktoren, was mit einer vermehrten Bildung von Kollateralgefäßen einhergeht (Fukuda et al. 2006, Das et al. 2005). Ebenso bringt eine durch Resveratrol wieder zunehmende Neusynthese von GLUT-4 und Mitochondrien bei erworbener Insulinresistenz den kardialen Stoffwechsel in eine gegenüber Ischämie widerstandsfähigere Ausgangslage (Lekli et al. 2008, Csiszar et al. 2009).

Resveratrol optimiert aber nicht nur die endogenen Schutzmechanismen im vaskulären System gegenüber Atherosklerose, sondern kann vermutlich auch helfen diese zu verhindern bzw. hinauszuzögern. Bei Hypertonie, einem Haupt-Risikofaktor für Gefäß-erkrankungen, ist das Hormon Angiotensin-II (AT-II) erhöht, was proliferierend auf Myofibroblasten sowie glatte Muskelzellen wirkt und bis hin zur Gefäßhypertrophie und kardialen Fibrose führen kann. Diese von AT-II vermittelten Signalwege werden durch Resveratrol unterbrochen (Olson et al. 2005, Haider et al. 2002). Weiterhin ist es anti-inflammatorisch wirksam, indem es z. B. über die Hemmung von NFκB eine Induktion von COX-2 in stimulierten Makrophagen verhindert (Yi et al. 2011): es schwächt auch die Adhäsion von Leukozyten sowie deren Interaktion mit oxidiertem LDL und damit die erste inflammatorische Antwort mit Bildung der charakteristischen Schaumzellen (Shigematsu et al. 2003, Delmas et al. 1995). Ein Synergismus mit ähnlich anti-atherogenen Substanzen wie Tocopherol oder Omega-3-Fettsäuren wird vermutet, da sie - als Cocktail verabreicht - in der

Lage sind, gerade die entzündlichen Erstläsionen der Atherosklerose eindeutig hinauszuzögern (Verschuren et al. 2011). Dadurch behält das Blutgefäß seine antithrombogene Oberfläche bei, was durch eine gedrosselte Synthese von TF in Endothelzellen noch unterstützt wird (Pendurthi et al. 1999).

Resveratrol hemmt die Aktivität der inflammatorisch wirksamen Lipoxygenase 5-LOX, deren hauptsächliches Substrat die Arachidonsäure darstellt (Kimura et al. 1985). Durch sie entsteht in PMNLs und Makrophagen u. a. LTB<sub>4</sub>, einer der wichtigsten Mediatoren zur Verstärkung von entzündlichen Prozessen. Etwa zehnmal schwächer dagegen ist die hemmende Wirkung von Resveratrol auf die 15-LOX, deren Syntheseprodukte wie schon erwähnt die antiinflammatorischen Lipoxine sind (Maccarrone et al. 1999, Egger 2005).

Resveratrol inhibiert auch die in verschiedenen Zelltypen vorkommende 12-LOX. Diese bildet aus AA zum einen Hepoxiline, welche äquipotent zu LTB<sub>4</sub> chemotaktisch wirken und an zellulärer Ca<sup>2+</sup>-Mobilisation, Vasokonstriktion sowie Steigerung der Gefäßpermeabilität beteiligt sind (Pace-Asciak 2009).

Dahingegen steigert Resveratrol die fibrinolytische Aktivität auf der Endothel-Membran unter vermehrter Freisetzung von den Plasminogenaktivatoren t-PA und u-PA (Abou-Aqaq et al. 2001). Auch konnte gezeigt werden, dass es die Polymerisation von Fibrinogen durch das als kardiovaskulären Risikofaktor diskutierte Homocystein verhindert, was die nachfolgende Lyse des Fibringeflechts wiederum erleichtert (Malinowska und Olas 2010).

Resveratrol übt auch direkte Effekte auf die Plättchen aus. Es schützt sie zum einen ähnlich wie die Blutgefäße vor oxidativem Schaden (Olas et al. 2006), zum anderen hemmt es sie in ihrer Kollagen-, AA-, ADP-, Thrombin-, Adrenalin- oder PAF-induzierten Aggregation (Zbikowska et al. 2000, Wang et al. 2002, Fragopoulou et al. 2000, Stef et al. 2006). Hierbei wird mitunter eine ähnlich starke Wirkung erzielt wie mit ASS (Wang et al. 2002). In Anwesenheit von Resveratrol ist die Adhäsion der Plättchen an Kollagen oder Fibrinogen nach Stimulus mittels ADP, Endotoxinen oder Thrombin abgeschwächt (Olas et al. 2002, Zbikowska und Olas 2000) ebenso wie die Freisetzung ihrer gespeicherten Granula (Kaneider et al. 2004, Olas et al. 2001). Resveratrol greift offensichtlich in Thrombin-vermittelte Signalwege ein, indem es die Umwandlung von Phospholipiden aus der Membran und die dadurch ausgelöste Enzym-Phosphorylierungen, Granulafreisetzung und Mikro-partikel-Bildung blockiert (Olas et al. 2005). Es verhindert die Aktivierung von MAP-Kinasen, welche normalerweise die Bindung eines Agonisten an einem Rezeptor als Signal ins Innere des Plättchens weiterleiten (Kirk et al. 2000, Shen et al. 2007). Eine vermutlich unterge-

ordnete Rolle spielt das auf der thrombozytären Membran exprimierte PECAM-1 (platelet endothelial cell adhesion molecule-1), das als insgesamt eher Plättchen hemmendes Protein durch Resveratrol aktiviert werden kann (de Lange et al. 2007, Dhanjal et al. 2007).

Der intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegel wird im ruhenden Thrombozyten vermutlich nicht beeinflusst, jedoch verhindert Resveratrol dessen Anstieg nach Thrombin-Aktivierung. Hierfür reicht eine Kontaktzeit von nur wenigen Sekunden aus. Je höher die extrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration und demnach auch der  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in das aktivierte Plättchen, desto stärker ist dessen Hemmung durch Resveratrol. Ab einem bestimmten Level bleibt Letzteres allerdings gleich, woraus sich schließen lässt, dass Resveratrol nicht mit den  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen konkurriert, sondern es vermutlich zu einer direkten Bindung an deren Kanäle kommt. Dahingegen wird die  $\text{Ca}^{2+}$ -Mobilisation aus intrazellulären Speichern von Resveratrol vermutlich nicht tangiert (Dobrydneva 1999, Wu et al. 2007). Keinerlei Interaktionen scheint es auch mit dem Plättchenrezeptor GPIIb/IIIa zu geben (Shen et al. 2007).

Wesentlich für die supprimierte Plättchenaggregation durch Resveratrol ist wohl seine hemmende Wirkung auf die COX. Via LOX und COX drosselt Resveratrol insgesamt den AA-Metabolismus, ohne aber dabei die Freisetzung bzw. Inkorporation von AA in der Membran zu beeinflussen. Im Unterschied zu ASS und anderen NSAIDs wirkt es womöglich nicht nur auf die Cyclooxygenase sondern auch - bzw. ausschließlich - auf die Peroxidase der COX (Maccarrone et al. 1999, Johnson und Maddipati 1998, Szewczuk et al. 2004, Kümmerle et al. 2005). Neuere Studien deuten zudem darauf hin, dass sowohl die COX-1 als auch die COX-2 durch Resveratrol gehemmt werden (Calamini et al. 2010, Kang et al. 2009, Cao et al. 2011, Kümmerle et al. 2005, Handler et al. 2007, Larrosa et al. 2009). Dies erfolgt je nach Autor nicht-kompetitiv (Johnson und Maddipati 1998, Szewczuk et al. 2004) oder kompetitiv (Maccarrone et al. 1999), vermutlich aber irreversibel sowie zeit- und konzentrationsabhängig. Resveratrol führt nach den Erkenntnissen von Szewczuk et al. über einen „hit and run“-Mechanismus zur Inaktivierung der Peroxidase: aus Resveratrol entsteht dabei ein Radikal, welches in der COX-1 ein weiteres Radikal bildet („hit“), was das Enzym schließlich inaktiviert, während das Resveratrol-Radikal den Komplex wieder verlässt („run“). In COX-2 ist das Resveratrol nicht in der Lage solch ein Inhibitor-Radikal zu bilden und hat daher keine Wirkung auf COX-2 (Szewczuk et al. 2004).

Neuere Studien sehen das allerdings anders: Simulations-Modelle von Crescente et al. verleiten zu der Hypothese, dass Resveratrol direkt an die Cyclooxygenase der thrombozytären COX-1 andockt: möglicherweise kommt es zunächst zur Wechselwirkung zwischen Resveratrol und Met522 oder Glu524 des aktiven Zentrums, bis das Molekül weiter in den Kanal diffundiert, um mit Ser350 und Tyr385 eine feste kovalente Bindung

einzugehen. Der zweite Phenol-Ring von Resveratrol könnte hierbei für AA - ähnlich wie bei der Acetylierung durch ASS - den Zugang zum aktiven Zentrum verlegen. Da ASS nicht um ihre initiale Bindungsstelle Arg120 mit Resveratrol konkurrieren muss, können sich beide Substanzen in ihrer Inhibitor-Wirkung ergänzen statt gegenseitig behindern (Crescente et al. 2009). Weitere Autoren stützen die Behauptung, dass Resveratrol im aktiven Zentrum der Cyclooxygenase bindet und damit ein ähnliches Bindungsverhalten zeigt wie ASS und andere NSAIDs. Ihrer Meinung nach reagiert Resveratrol auf gleiche Weise auch mit COX-2 (Calamini et al. 2010, Zykova et al. 2008).

Der genaue Mechanismus der antithrombotischen Wirkung von Resveratrol bzw. seiner Metabolite ist noch nicht vollständig gelöst, ebenso wenig wie seine möglichen Interaktionen mit anderen gerinnungsaktiven Polyphenolen oder Pharmaka. Vermutlich ist nicht nur von einem singulären Effekt auszugehen, denn die bisherigen Studien offenbaren verschiedenste potentielle Angriffspunkte von Resveratrol wie z. B. die Akkumulation und Oxidation von LDL, Proliferation und Migration von glatten Muskelzellen, Leukozyteninfiltration und schließlich auch die Aggregation von Thrombozyten (Delmas et al. 2005).

Vergleicht man dies alles mit dem Wirkungsspektrum von ASS, finden sich viele Parallelen, v.a. was den AA-Metabolismus betrifft. Möglicherweise besitzen sie sogar dieselben Effekte auf nuklearer Ebene (Sridhar et al. 2012, Yi et al. 2011).

### 1.3.6. Dosierung

Eine allgemeine Dosisempfehlung für die klinische Anwendung von Resveratrol gibt es bislang noch nicht. Hauptproblem ist nach wie vor die ungeklärte Pharmakokinetik. So ist unsicher, inwieweit auch bzw. gerade die Metabolite zur eigentlichen Wirkung beitragen: die erforderlichen Konzentrationen bei *in vitro*-Versuchen sind meist höher als wie sie von *in vivo* gegebenen Dosen überhaupt erreicht werden dürften. Auch lassen sich am Tier ermittelte Werte nicht unbedingt auf den Menschen übertragen (Goldberg et al. 2003, Gescher und Steward 2003).

Resveratrol kann eine Zelle sowohl in ihrer Überlebensfähigkeit optimieren als auch ihre Apoptose auslösen. Es ist anzunehmen, dass aufgrund dieser biphasischen Wirkung nach Indikation differenziert werden muss: zur Tumor- und Entzündungssuppression werden z. B. meist höhere Konzentrationen benötigt (mmol-Bereich) als zur Thromboseprophylaxe (Mukherjee et al. 2010). So kommt es bei niedrigen Dosen von 4 mg/kg KG bereits zur

Normalisierung einer durch Hypercholesterinämie ausgelösten Plättchen-Hyperreaktivität (Wang et al. 2002). Bis zu 5 mg/kg erweisen sich kardioprotektiv, während es ab 25 mg/kg KG dagegen zu ersten proapoptischen und leistungsmindernden Effekten am Herzen kommt (Dudley et al. 2008, Lekli et al. 2008).

Um eine massive Entzündung effektiv reduzieren zu können, sind offenbar Gaben von 20-100 mg/kg KG nötig (Bereswill et al. 2010, Singh et al. 2010). Eine mit 400 mg/kg KG durchgeführte Studie hatte eine eindeutig senkende Wirkung auf den TXB<sub>2</sub>-Spiegel (Crescente et al. 2009). Sehr hohe Dosen (1g/kg KG) reduzieren dagegen die Lebenserwartung drastisch (Pearson et al. 2008). All diese Angaben basieren allerdings auf Tierversuchen und sind daher nur vage Anhaltspunkte zur Dosis-Kalkulation. Bei den meisten der hier zitierten *in vitro*-Studien waren Resveratrol-Konzentrationen zwischen 0,2-50 µmol/l günstig für das kardiovaskuläre System. Als IC<sub>50</sub>-Wert der Plättchenaggregations-Hemmung wurden beim gesunden Probanden 0,2-5 µmol/l (Shen et al. 2007) ermittelt und ca. 0,5 µmol/l für die COX-1 bzw. TXB<sub>2</sub>-Synthese (Handler et al. 2007, Kimura et al. 1985). Nimmt man an, dass eine Einmaldosis von 5 g (≈70 mg/kg bei 70 kg KG) zu maximalen Plasmaspiegeln von gerade einmal 2,4 µmol/l führt (Boocock et al. 2007), wäre das bereits weit über den *in vivo* ermittelten Dosisempfehlungen (Dudley et al. 2008, Lekli et al. 2008) und mit dem Konsum von Rotwein allein niemals erreichbar. Ob und wie supplementäre Resveratrol-Präparate hierbei von Vorteil sein könnten, ist dagegen noch wenig erforscht. Eine Überwachung der Thrombozyten wäre zumindest notwendig, da es schon ab 5 µmol/l zur Verringerung ihrer Lebensdauer aufgrund Resveratrol-induzierter Apoptose kommt (Lin et al. 2009). Es gibt jedoch noch Hinweise auf synergistische Wechselwirkungen von Resveratrol mit anderen Rotwein-Polyphenolen, aber auch ASS. Diese Zusammenhänge lassen spekulieren, warum geringste Mengen zu dennoch insgesamt positiven Effekten führen können, was die Frage nach der optimalen Dosis nicht gerade vereinfacht (Crescente et al. 2009).

## 1.4. Verfahren zur Messung der Plättchenfunktion und ASS-Response

Aufgrund der tragenden Rolle der Plättchen bei kardiovaskulären Erkrankungen wurden verschiedene Testmethoden entwickelt, anhand derer man versucht die Plättchenfunktion und damit das Risiko für thrombotische Ereignisse einzuschätzen bzw. den Erfolg einer Therapie mit gerinnungshemmenden Medikamenten zu kontrollieren.

Prinzipiell wird bei einem Plättchenfunktionstest eine (meist citrat-antikoagulierte) Blutprobe mit einem plättchenaktivierenden Agens versetzt, um die daraufhin einsetzende Aggregation mit Referenzwerten zu vergleichen. Dieser Prozess kann anhand der sich ändernden Lichtdurchlässigkeit (optische Aggregometrie) bzw. elektrischen Leitfähigkeit (Impedanz-aggregometrie) visualisiert werden. Auch ist es möglich die Zeit bis zum Verschluss eines mit Agonisten beschichteten Röhrchens - stellvertretend für das Blutgefäß - zu messen (PFA-100) oder mittels fluoreszenzmarkierter Antikörper typische, im Rahmen einer Plättchenaktivierung auftretende Veränderungen der Membran zu detektieren (Durchflusszytometrie). Eine im Jahr 2000 eingeführte Methode zur Messung der Plättchenfunktion stellt der PADA (Platelet Adhesion Assay) dar. Hierbei wird unter relativ geringen Scherkräften und ohne jegliche Zugabe von Agonisten die Thrombozytenadhäsion gemessen. Er eignet sich damit zusätzlich zum Drug Monitoring von GPIIb/IIIa- und ADP-Rezeptor-Antagonisten. Er steht zudem in modifizierter Form als PADA-RASS (RASS = Resistenz auf ASS) auch zur Erkennung von ASS-Nonrespondern zur Verfügung.

Während diese sogenannten Plättchenfunktionstests Auskunft über das Aggregationsverhalten der Thrombozyten allgemein bzw. unter gerinnungshemmender Therapie geben, kann zum direkten Nachweis der COX-1-Aktivität der TXB<sub>2</sub>-Spiegel in Blut oder Urin gemessen werden (Weber et al. 2008).

Es existieren noch weitere Methoden wie die *in vivo*-Blutungszeit, welche anhand eines definierten Schnittes in den Oberarm gemessen wird. Im Folgenden soll nun auf eine Auswahl der genannten Funktionstests näher eingegangen werden.

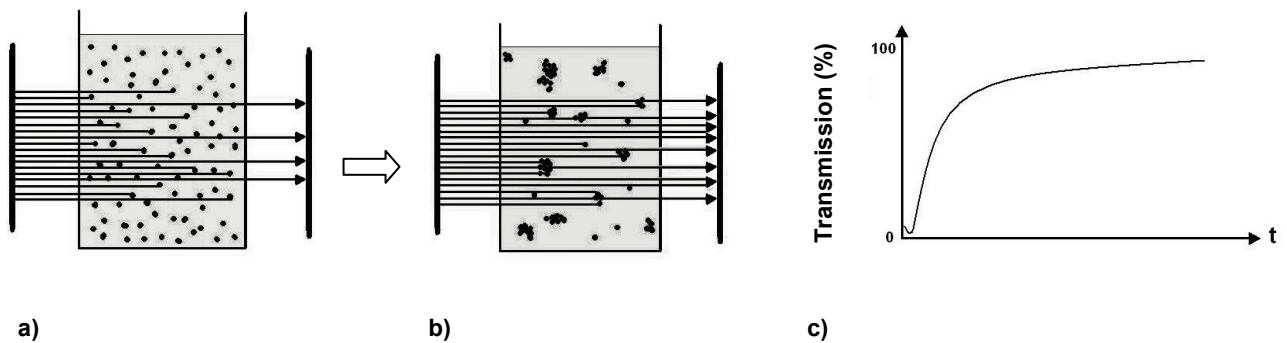
### 1.4.1. Optische Aggregometrie nach Born

Bei dieser auch als Light Transmission Aggregometry (LTA) bezeichnete Methode kommt plättchenreiches (PRP) sowie plättchenarmes Plasma (PPP) zum Einsatz, welches man durch initiales Zentrifugieren von Citrat-Vollblut erhält. Von beiden Proben wird in lichtdurchlässigen Küvetten bei 37°C und unter konstantem Rühren die Licht-Transmission gemessen, wobei das PPP als 100% definiert ist und das PRP als 0% (Abb. 8 a). Nach Zugabe eines Agonisten, z.B. ADP oder Kollagen, nimmt die Lichtdurchlässigkeit proportional zu der nun

einsetzenden Plättchenaggregation zu (Abb. 8 b). Dies wird über einen gewissen Zeitraum photometriert, als steigende Aggregationskurve aufgezeichnet und anschließend ausgewertet (Abb. 8 c). Hierbei können Auffälligkeiten im Kurvenverlauf, z. B. ein verzögerter Anstieg oder ein späteres Abfallen (Desaggregation) auf eine veränderte Plättchenfunktion hinweisen. Darüber hinaus kommen folgende Messwerte zum Tragen:

- maximale Aggregation der Plättchen (maximale Lichtdurchlässigkeit des PRP)
- maximale Geschwindigkeit der Plättchenaggregation (stärkste Steigung der Kurve).

Nicht geeignet ist das optische Messverfahren bei lipämischen, ikterischen oder hämolytischen Proben (Brodde und Kehrel S. 846f).



**Abb. 8 a-c: Messprinzip der optischen Aggregometrie**

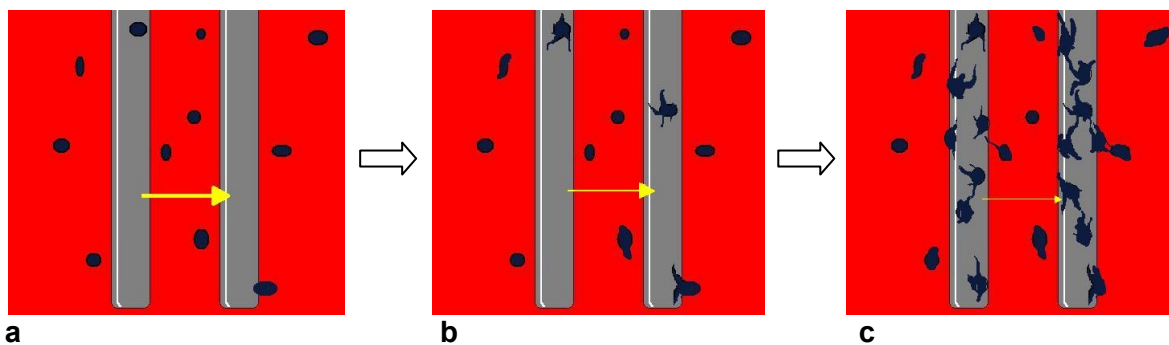
Das PRP (plättchenreiches Plasma) besitzt durch die hohe Zahl an Plättchen eine geringe Lichtdurchlässigkeit (**Abb. 8 a**). Nach Zugabe eines Agonisten bilden sich Plättchenaggregate, wodurch die Transmission stetig zunimmt (**Abb. 8 b-c**).

#### 1.4.2. Impedanzaggregometrie (Multiplate)

Die Multiplate-Analyse (Dynabyte medical, München) stützt sich auf das Prinzip der elektrischen Widerstandsmessung, welche im Gegensatz zu optischen Messverfahren nicht von der Anwesenheit anderer Blutzellen wie Erythrozyten und Leukozyten beeinträchtigt wird. Dies erlaubt die Verwendung von Vollblut statt PRP, was den natürlichen Bedingungen näher kommt und die Technik vereinfacht. Das Gerät besitzt zwei Sensoreinheiten bestehend aus jeweils zwei silberbeschichteten Elektroden, die in eine Messzelle getaucht sind. In der Messzelle wird Blut mit isotoner Kochsalzlösung verdünnt und mittels eines teflonbeschichteten Rührstabes für 3 min bei niedrigem Scherstress in Bewegung gehalten, bis durch Zugabe eines Agonisten der Aggregationsvorgang gestartet wird. Die Plättchen

beginnen sich an die Elektroden anzulagern, was den elektrischen Widerstand zwischen ihnen kontinuierlich erhöht und von der Software als steigende Aggregationskurve 6 min lang aufgezeichnet wird (**Abb. 9 a-c**). Die doppelte Messung zwischen den beiden Elektrodenpaaren wird automatisch gemittelt und dient der Qualitätssicherung sowie Reproduzierbarkeit der Analyse. Neben der AUC (area under the curve) als quantitatives Maß können auch die Steigung der Kurve und die absolute Aggregationszunahme abgelesen werden.

Vom Hersteller wird die Verwendung von Heparin- oder Hirudinblut empfohlen, da der extrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Entzug durch Citrat die Analyse verfälschen könnte. Um speziell die ASS-Sensitivität zu messen, eignen sich die Assays mit Arachidonsäure oder Kollagen als Agonisten.



**Abb. 9 a-c: Messprinzip der Vollblutaggregation mit dem Multiplate**

Zwischen den beiden Elektroden in der Blutprobe wird der elektrische Widerstand gemessen (**Abb. 9 a**). Nach Zugabe eines Agonisten beginnen die Thrombozyten an den Elektroden zu adhären und agglutinieren, wodurch sich der Widerstand bis zu einem Maximalwert erhöht (**Abb. 9 b-c**). (Gelber Pfeil = elektrischer Fluss)

### 1.4.3. Durchflusszytometrie (P-Selektin-Expression)

Die Durchflusszytometrie stellt keinen Funktionstest im eigentlichen Sinne dar. Sie gibt jedoch Auskunft über den Aktivierungsgrad des Gerinnungssystems, indem Blutplättchen, aber auch Mikropartikel, Leukozyten-Plättchen-Aggregate etc. analysiert werden können. Die Blutprobe wird als stark verdünnte Zellsuspension durch eine kapillarähnliche Messkammer geleitet, in welcher die einzelnen Blutbestandteile nacheinander von einem Laserstrahl erfasst werden. Je nach Größe und biochemischen Eigenschaften der Zelle wird der Strahl abgelenkt, was mittels zweier Detektoren erfasst (Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht) und im sogenannten Dot-Plot als punktförmiges Signal graphisch dargestellt wird (**Abb. 10**).



Wurden die zu untersuchenden Zellen oder Zellpartikel zuvor mit fluoreszierenden Markern (z. B. Antikörper) versehen, lassen sich aus dem Fluoreszenzspektrum und der Intensität Informationen zu ihrer Beschaffenheit sammeln. In unserer Studie differenzierte der Phycoerythin-markierte monoklonale Antikörper Anti-CD41a, welcher an den Plättchen-spezifischen Fibrinogen-Rezeptor GP IIb/IIIa bindet, innerhalb der Blutprobe die Plättchen von anderen Blutbestandteilen. Kombiniert mit dem nur an P-Selektin bindenden CD62p-Antikörper konnten nun anhand der CD41a-positiven Plättchenfraktion die Plättchen erkannt werden, welche im Rahmen eines Aktivierungsprozesses P-Selektin aus ihren  $\alpha$ -Granula auf die Membranoberfläche transportiert haben. Die Fluoreszenz-intensität gibt Auskunft über die Menge des pro Plättchen exprimierten P-Selektins.

P-Selektin (Synonyme: granule membrane protein/GMP-140, Antigen CD62) ist ein Adhäsions-molekül, welches normalerweise auf der Membraninnenseite der alpha-Granula in Plättchen und den Weibel-Palade-Körperchen in Endothelzellen gespeichert wird. Eine Aktivierung von Endothelzellen und Plättchen bei Verletzung oder Entzündung bewirkt die unmittelbare Translokation von P-Selektin auf ihre äußere Membranoberfläche und initiiert eine Plättchenadhäsion und -aggregation (Sternberg et al. 1985, McEver et al. 1989, van Gils et al. 2009). Leukozyten exprimieren konstitutiv den für P-Selektin wichtigen Rezeptor PSGL-1 (Geng et al. 1990), was ebenso zu ihrer Anheftung an das Endothel bzw. den plättchenreichen Thrombus und zu ihrer weiteren Aktivierung führt (van Gils et al. 2009). P-Selektin spielt beim Entstehen der Atherosklerose eine entscheidende Rolle (Dong et al. 2000) und fördert die Bildung von stabilen arteriellen Thromben (Yokoyama et al. 2005). Die Interaktion zwischen Endothel und Plättchen/Leukozyten verursacht auch die Bildung von PSGL-1-präsentierenden Mikropartikeln, deren vermehrtes Vorhandensein im Blut ein Marker für kardiovaskuläre Krankheiten darstellt (Furie und Furie 2005, Gordon et al. 2011, Macey et al. 2010).

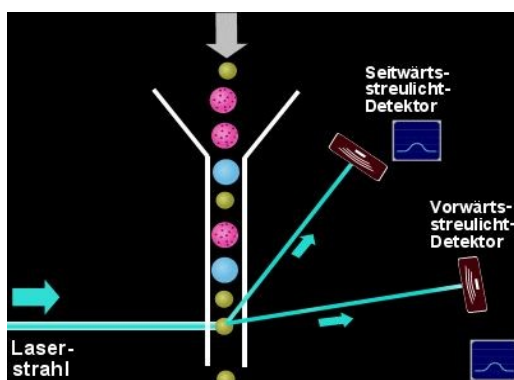
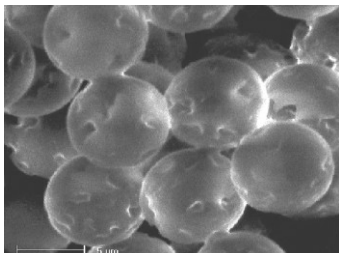


Abb. 10: Prinzip der Durchflusszytometrie  
(nach Zeilinger und Hübl 2011)

#### 1.4.4. Platelet adhesion assay (PADA)

Grundlage des Tests ist die Bindung von Adhäsionsmolekülen am GPIIb/IIIa-Rezeptor der Thrombozyten, was nur bis zu gewissen Scherkräften möglich ist (**Abb. 1 e**). Bei ruhenden Plättchen befindet sich der Rezeptor in inaktivem Zustand. Nach ausreichender Stimulation, z. B. durch Scherstress, kommt es durch Veränderungen im Zytoskelett zur Aktivierung und damit stark erhöhten Affinität des Rezeptors zu Fibrinogen, vWF, Fibronectin und Vitronectin, welche allesamt der Adhäsion und Quervernetzung des Thrombus dienen (Schrör 2010 S. 796, Savage und Ruggeri 1991).

Beim PADA soll durch Schüttelinkubation eine mittelhohe Scherrate ( $300-400^{-1}$ ) erreicht werden, ähnlich wie sie noch physiologisch in präkapillaren Arteriolen (20-30  $\mu\text{m}$ ) entsteht. Dadurch kommt es normalerweise auf ruhenden Thrombozyten nur geringfügig zur



Aktivierung von GPIIb/IIIa und anderen Rezeptoren. Befanden sich die Thrombozyten jedoch aufgrund bereits vorausgegangener, wenngleich auch nur unterschwelliger Stimuli in einem angeregten Zustand, reagieren sie hochempfindlich und rasch mit der Aktivierung ihrer Rezeptoren und binden an die entsprechenden Liganden.

**Abb. 11: Partikel im Elektronenmikroskop**

Um den Anteil dieser voraktivierten Blutplättchen im Kreislauf detektieren zu können, wird noch vor dem Schütteln eine definierte Menge einer Suspension mit 5-6  $\mu\text{m}$  kleinen Polyalkyl-Methacrylat-Partikeln (**Abb. 11**) der Blutprobe beigemischt. Diese Polymer-Partikel werden innerhalb kürzester Zeit von körpereigenem Fibrinogen und anderen Plasmaproteinen überzogen, an welchen nun die voraktivierten Plättchen adhären. Dies geschieht ganz überwiegend über die Bindung von GPIIb/IIIa an Fibrinogen, weniger an vWF. Die partikelgebundenen Thrombozyten werden im Anschluss bei der Zählung im Blutzellautomaten nicht mehr erfasst. Anhand einer Vergleichsprobe ohne Partikel lässt sich daraus ein Index (AI = Adhäsionsindex) errechnen, der als quantitativer Maßstab für die rein durch geringe Scherkraft induzierte Adhäsivität und damit Thrombogenität der Plättchen gewertet werden kann.

Der Scherstress ist dabei zeitlich so definiert worden, dass es bei den Plättchen normalerweise noch zu keiner Aggregation mit Formveränderung und Granulafreisetzung kommt. Dies gilt es zu beachten, wenn man Ergebnisse des PADA mit anderen Funktionstests vergleichen will, bei denen mittels zugegebenen Agonisten bzw. Einwirkung

hoher Scherkräfte eine irreversible Plättchenaktivierung regelrecht erzwungen wird. Da der PADA in erster Linie die Bindungsfähigkeit von GPIIb/IIIa an Fibrinogen und zum kleinen Teil auch an den vWF misst, machen sich auch Abnormalitäten der Rezeptoren bzw.

Adhäsionsmoleküle bemerkbar wie z. B. beim von-Willebrand-Syndrom (Nowak et al. 2005). Andererseits konnte gezeigt werden, dass der Test von Erythrozytenzahl, Hämatokrit, Alter, Geschlecht und Fibrinogen-Spiegel weitgehend unabhängig ist, sich gleichzeitig aber unter Gabe von GPIIb/IIIa- und ADP-Rezeptor-Antagonisten dosisabhängig verhält und damit als einfach und schnell durchführbarer Point-of-care-Test zum Drug Monitoring dieser Pharmaka empfohlen werden kann. Auch wurde eine negative Korrelation zwischen Plättchenzahl und AI gefunden (Halbmayer et al. 2005, Hentrich 2011).

#### **1.4.5. Platelet adhesion assay – Reaktion auf ASS (PADA-RASS)**

Im Unterschied zum PADA wird hier die Funktion von Thrombozyten in Anwesenheit von ASS ermittelt, wofür heparinisieretes Vollblut zum Einsatz kommt. Für den PADA-RASS muss der Patient kein ASS eingenommen haben, was ein Screening schon vor Beginn einer geplanten Therapie erlaubt. Die Verwendung von Heparin als Antikoagulationsmittel beruht auf der Beobachtung, dass der im PADA ermittelte AI hier wesentlich höher ist als bei Citrat oder Hirudin. Man erklärt sich dies durch die direkte Interaktion von Heparin mit dem Plättchenrezeptor GPIIb/IIIa, was zur Aktivierung und damit gesteigerten Adhäsion der Plättchen führt (Nowak 2009 b). Diese auch als HIT-1 (Heparin induzierte Thrombozytopenie Typ 1) bekannte Nebenwirkung von Heparin lässt sich *in vitro* durch ASS inhibieren, wonach der Patient als ASS-Responder eingestuft wird. Verändert sich der AI unter ASS-Zugabe dagegen nicht, spricht man vom ASS-Nonresponder. Mit keinem anderen der bis dato entwickelten Verfahren wurde dabei das Phänomen einer *gegenteiligen* Wirkung von ASS entdeckt, kurz: PRASA (*paradoxical reaction on ASA*). Hierbei kommt es nach Inkubation der Plättchen mit ASS sogar zu einer stärkeren Adhäsion als in der Kontrollprobe ohne ASS.

#### **1.4.6. Testauswahl**

Alle Thrombozytenfunktionstests sind kritisch zu hinterfragen, da neben der notwendigen Antikoagulation und Probenvorbereitung ihre Durchführung unter mehr oder weniger unphysiologischen Bedingungen stattfindet. So beinhaltet die optische Aggregometrie den wesentlichen Nachteil der PRP-Herstellung, wo durch das initiale Zentrifugieren Plättchenfraktionen verloren bzw. bereits voraktiviert werden können. Desweiteren bleibt durch die Verwendung von Plasma der Einfluss von anderen Blutzellen auf die Hämostase

gänzlich vernachlässigt. Neuere Messmethoden funktionieren daher i. d. R. mit Vollblut, sodass das natürliche Milieu für die Plättchen erhalten bleibt. Mit geringen Mengen und weniger Manipulation der Blutproben kommt die Aggregometrie mittels Impedanzmessung aus, wo außerdem durch Adhäsion der Plättchen an die Elektrodenoberfläche der Prozess der primären Hämostase besser simuliert wird als beim optischen Verfahren. Man entschied sich daher in dieser Studie für den Einsatz des bereits viel angewandten Multiplate-Systems. Der Einsatz von Vollblut kann allerdings auch zum Problem werden, wenn explizit ein einzelner Aktivierungsweg der Plättchen getestet werden soll, z. B. der Effekt von ASS auf die COX-1; die Plättchen könnten trotz effektiver Inhibition des Enzyms etwa durch Leukozyten-Interaktionen angeregt werden und so ein Nonresponding vortäuschen, was die höhere Inzidenz einer „Aspirin-Resistenz“ gegenüber der klassischen Aggregometrie erklären würde (Lordkipanidzé et al. 2007).

Der klinische Nutzen dieser beiden Methoden ist umstritten (Oestreich et al. 2009). Sie werden von vielen Faktoren wie z. B. Hämatokrit beeinflusst, was bei der Impedanzmessung wiederum durch eine unphysiologische Verdünnung der Probe mit Kochsalzlösung abgeschwächt werden soll. Neben einer geringen Reproduzierbarkeit wird insbesondere die fehlende Standardisierung dieser Testmethoden bemängelt (Mani et al. 2010, Nowak 2007). Trotz dieser Einschränkungen wird die optische Aggregometrie aufgrund ihrer langen Anwendung und damit auch umfangreicheren Datenlage vielfach als „Goldstandard“ gewertet, erfordert jedoch nicht zuletzt ein hohes Maß an Erfahrung für die Durchführung und Interpretation (Klouche 2007). Hier bietet der vereinfachte Point-of-care-Test VerifyNow (Accumetrics) als Weiterentwicklung der Born-Methode zwar einige Vorteile, z. B. die Verwendung von Vollblut, seine Aussagekraft scheint jedoch disputabel und erfordert noch weiterführende Studien (Breet et al. 2010, Mani et al. 2010).

Die Durchflusszytometrie wurde als weitere Methode für diese Studie ausgewählt, da sich aufgrund ihrer hohen Spezifität auch geringe Veränderungen in den Plättchen detektieren lassen. Sie hat sich zur Diagnostik komplexer Gerinnungsstörungen etabliert, eignet sich jedoch auch zur Überwachung der Plättchenreaktivität sowie der Wirkung von Aggregationshemmern. Das Verfahren ist weitgehend unabhängig von der Thrombozytenzahl, reagiert allerdings empfindlich auf Schwankungen des extrazellulären  $Ca^{2+}$  und damit auf Art und Menge des zugesetzten Antikoagulanz. Dies unterstreicht erneut die Wichtigkeit eines standardisierten Prozederes in den einzelnen Laboren, um deren Ergebnisse miteinander vergleichen zu können (Klouche 2007).

Die Durchflusszytometrie ist anspruchsvoll und verlangt gut geschultes Personal. Selbst wenn die vorherige Probenpräparation gering ausfällt und Vollblut verwendet wird, so muss dieses vor Passieren des Laserstrahls mit einer Trägerlösung erst verdünnt werden, was

zwangsläufig wieder zu falsch niedrigen Konzentrationen von z. B. relevanten Mediatoren wie TXA2 führt (Weber et al. 2008).

Alle bisher genannten Methoden arbeiten mit nur geringem Scherstress, welcher die *in vivo*-Verhältnisse gerade im atherosklerotisch veränderten Blutgefäß nur unzureichend wiedergibt (Mani et al. 2010). Beim PFA-100 (Siemens GmbH, Eschborn) wirken dagegen sehr hohe Scherraten von  $5000-6000\text{s}^{-1}$  aktivierend auf die Thrombozyten, was ihn besonders anfällig für veränderte vWF-Spiegel macht, aber auch für anderen Faktoren wie Plättchenzahl und Hämatokrit (Nowak 2007, Hankey und Eikelboom 2004). Ansonsten lässt sich der standardisierte Test unkompliziert durchführen und hat die *in vivo*-Blutungszeit bereits weitgehend ersetzt (Harrison 2005).

Im Gegensatz zum PFA-100 arbeitet der PADA ohne künstliche Zugabe eines Agonisten und orientiert sich an nur mäßig starken Strömungskräften, ähnlich denen in kleinen Arteriolen. Diese reichen aus, um voraktivierte Plättchen zum Adhären zu bringen, was somit den natürlichen Bedingungen recht nahe kommt. Dieser noch wenig verbreitete Test wurde daher als dritte Methode zur Plättchenfunktionsmessung herangezogen. Positiver Aspekt ist zudem, dass die Vollblutprobe abgesehen vom Zusetzen der Partikelsuspension nicht weiter manipuliert werden muss und ohne spezielles Personal, da ohne viel Aufwand und in kurzer Zeit, verarbeitet werden kann. Der Test erweist sich als stabil gegenüber Plättchenzahlen von  $100$  bis  $350 \times 10^3/\mu\text{l}$ , was in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden konnte (**Abb. 28** im Anhang). Hämatokritwerte zwischen 25 und 44% und selbst hohe Fibrinogenspiegel ( $> 5 \text{ g/l}$ ) führen zu keinerlei Veränderungen in den Ergebnissen (Nowak et al. 2005). Zu bemängeln ist allerdings die geringe Automatisierung, um stets gleiche Messbedingungen zu gewährleisten.

Die Methoden wie oben beschrieben werden auch für die Diagnostik der ASS-Response verwendet, sofern man einen TXA2-abhängigen Aktivator wählt - am sinnvollsten natürlich AA (Hankey und Eikelboom 2004). Zusätzlich kommt hier noch die Bestimmung der TXA2-Synthese anhand seiner Metabolite entweder im Serum (TXB2) oder Urin (11-Dehydro-Thromboxan-B2) zum Einsatz. Letzteres korreliert offenbar auch mit thrombotischen Ereignissen in der Klinik, wird jedoch von der Nierenfunktion beeinflusst. Beide Parameter sind zwar direkt COX-1-abhängig, welche bekanntlich aber nicht plättchenspezifisch ist. Durch den hohen Aufwand ist die Methode zudem sehr kostenintensiv (Zimmermann und Hohlfeld 2008, Nowak 2007).

Der PADA-RASS als modifizierte Form des PADA wurde in unserer Studie eingesetzt, da er am besten mit den Ergebnissen des PADA verglichen werden kann. Seine Vorteile sind wie

dort die Verwendung von Vollblut, was Interaktionen von Plättchen mit anderen Blutzellen und -bestandteilen zulässt, sowie der Verzicht auf die Zugabe eines Agonisten. Der PADA-RASS relativiert im Grunde Schwankungen des AI im PADA, indem kein fixer Wert ermittelt wird, sondern zwei identisch gewonnene und verarbeitete Blutproben miteinander verglichen werden. Da das Blut beider Proben aus ein und derselben Monovette stammt, reduzieren sich präanalytische Fehler wie ungleich gefüllte oder geschwenkte Monovetten oder eben auch unterschiedlich starke Interaktionen mit anderen Blutzellen. Die *in vitro*-Zugabe von ASS ermöglicht die Messung ohne dass der Patient dafür selbst ASS einnehmen muss und verhindert falsche Ergebnisse aufgrund mangelnder Compliance oder Bioverfügbarkeit. Weil die Plättchenaktivität am Tag der Messung ungewöhnlich hoch bzw. niedrig sein kann, ist es günstig beim PADA-RASS eine Kontrollprobe ohne ASS zum Vergleich heranziehen zu können.

Es existieren noch weitere Methoden zur Messung der Plättchenaggregation bzw. ASS-Response, welche aber seltener im Gebrauch sind, keine wesentlichen Vorteile gegenüber den hier dargestellten besitzen oder deren klinische Aussagekraft noch nicht genügend untersucht ist. Allen gemeinsam ist jedoch, dass sich keine bisher als Standard-Verfahren durchsetzen konnte und die Ergebnisse untereinander meist schlecht übereinstimmen ((Lordkipanidzé et al. 2007).

## 2. Zielsetzung

Zum Schutz vor thrombotischen Ereignissen werden Blutplättchen standardmäßig mit Aggregationshemmern wie ASS behandelt. Das Problem „ASS-Resistenz“ gewinnt jedoch zunehmend an Bedeutung, sodass man versucht ist alternative Wirkstoffe zu finden. Das Polyphenol Resveratrol steht im Verdacht vor kardiovaskulären Erkrankungen wie Atherosklerose zu schützen und das Thromboserisiko zu verringern, indem es u. a. die Plättchenaggregation hemmt. Hauptsächlich existieren *in vitro*-Studien, die allerdings die geringe Bioverfügbarkeit der Substanz nicht berücksichtigen. In dieser Pilotstudie sollte daher der systemische Effekt einer einmaligen Einnahme von Resveratrol an gesunden Probanden *ex vivo* auf deren Plättchenaktivität untersucht werden. Zudem sollte die Frage beantwortet werden, inwieweit das eingenommene Resveratrol die Wirkung von ASS beeinflussen kann und ob sich fortführende Studien zum pharmakologischen Nutzen von Resveratrol als potentiell Antithrombotikum anbieten.

Dabei kommen unterschiedliche Messverfahren und Antikoagulationsmittel zum Einsatz, um festzustellen, inwieweit das Ergebnis von der Methodik abhängt. Der PADA (platelet adhesion assay) ist eine noch wenig verbreitete Technik zur Messung der Plättchenaktivität, gibt aber zusätzliche Informationen über die Beladung der Plättchen mit Antikörpern, was möglicherweise im Zusammenhang mit einer erhöhten Plättchenaktivität und verminderten ASS-Wirkung steht. Auch mit dem PADA-RASS (platelet adhesion assay – Reaktion auf ASS) wird insofern Neuland betreten, da laut Erfahrung des Herstellers erstmals auch paradoxe Reaktionen auf ASS festgestellt werden können, deren Ursachen noch nicht klar sind. Zum Vergleich dienen bereits etablierte Methoden wie die Impedanzaggregometrie (Multiplate-System) und die Durchflusszytometrie (Messung der P-Selektin-Expression auf der Plättchenmembran). Letztere soll mittels ihrer hohen Sensitivität schon geringfügige Veränderungen der Plättchenaktivität sichtbar machen, welche in den anderen Tests aufgrund der vielfältigen Einflussfaktoren in Vollblut untergehen könnten.

### 3. Material und Methoden

Vor Beginn der Untersuchungen wurde das zustimmende Votum der Ethik-Kommission der Friedrich-Schiller-Universität Jena eingeholt.

#### 3.1. Studienkollektiv

##### 3.1.1. Probanden

Es wurden insgesamt 17 Probanden gewonnen, welche über das Wesen und die Bedeutung der Studie aufgeklärt wurden und hierfür ihr schriftliches Einverständnis gaben. Die Ergebnisse von zwei Probanden gingen wegen fehlender Mitarbeit bzw. einem Messfehler nicht in die Auswertung mit ein.

##### 3.1.1. Ein- und Ausschlusskriterien

Als Probanden wurden Männer im Alter zwischen 18 und 30 Jahre gewählt, um hormonell bedingte Schwankungen in der Hämostase und die Wahrscheinlichkeit von Herz-Kreislauf-Erkrankungen gering zu halten. Ausgeschlossen wurden Probanden mit bereits bekannten kardiovaskulären Erkrankungen. Infekte und/oder die Einnahme von NSAIDs sollten mindestens eine Woche vor einer Blutentnahme zurückliegen.

#### 3.2. Studiendesign

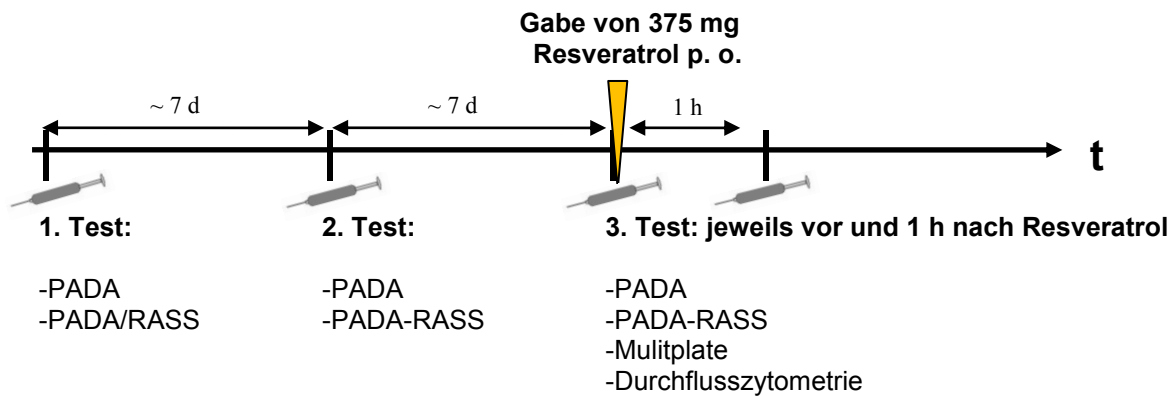
##### 3.2.1. Studienablauf

Den Testpersonen wurde an insgesamt drei Terminen mit zeitlichem Abstand von mindestens einer Woche unter standardisierten Bedingungen jeweils Heparin-, Citrat- und Hirudinblut abgenommen. Im direkten Anschluss an die dritte Blutentnahme wurde den Probanden p. o. 375 mg *trans*-Resveratrol (3,75 – 5,80 mg/kg KG) als pulverisiertes Pflanzenextrakt unter Aufsicht gegeben und eine Stunde später nochmals Blut genommen (**Abb. 12**).

Neben den allgemeinen Blutwerten erfolgte bei allen drei Tests und in allen drei Antikoagulantien die Bestimmung des AI (Adhäsionsindex) mit dem PADA (Platelet Adhesion Assay) und der ASS-Sensitivität mit dem PADA-RASS (Reaktion auf ASS). Die ersten zwei Tests dienten dabei zur Kontrolle für den dritten.

Am dritten Versuchstag wurde vor und nach Resveratroleinnahme zusätzlich die Plättchenaggregation und ASS-Sensitivität mittels Impedanzaggregometrie (Multiplate) in Hirudinblut gemessenen. Zudem erfolgte mit der Durchflusszytometrie eine Plättchenaktivitätsmessung in Citratblut anhand von fluoreszenzmarkierten CD41a-Antikörpern für P-Selektin.





**Abb. 12: Reihenfolge der Blutentnahmen mit den jeweils durchgeführten Tests**

### 3.2.2. Probandenbefragung

Jeder Proband wurde in einem Erhebungsbogen zu allgemeinen Informationen (Größe, Gewicht, Alter) sowie vorbestehenden Erkrankungen und Risikofaktoren befragt (Familienanamnese, Herz-Kreislauf-Erkrankungen, Allergien, Infektionen). Auch wurden regelmäßig eingenommene Medikamente oder Nahrungsergänzungsmittel notiert und zusammen mit dem geschätzten Konsum von resveratrolreichen Lebensmitteln, Alkohol und Nikotin festgehalten.

### 3.2.3. Allgemeine Blutwerte

Vor jedem Test wurden in allen drei Blutproben (Heparin, Citrat, Hirudin) folgende Blutparameter am Blutzellautomaten bestimmt:

- Plättchenanzahl PLT ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )
- Leukozyten WBC ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )
- Hämatokrit HK (%)
- Hämoglobin HGB (g/dl)

### 3.2.4. Probengewinnung

Die Blutentnahme wurde zwischen 12 und 14 Uhr gelegt, um zirkadiane Schwankungen in der Plättchenaggregation auszuschließen, und wurden stets von Fr. Dr. Balogh im Gebäude der AG Pharmakologische Hämostaseologie am Uniklinikum Jena durchgeführt. Alle Patienten sollten sich an den Versuchstagen körperlich gesund fühlen und in der Zeit zwischen dritter und vierter Blutentnahme auf starke körperliche Anstrengung sowie schwer verdauliches Essen verzichten, um eine annähernd gleiche Absorption von Resveratrol zu gewährleisten.

Die Blutentnahme erfolgte nach möglichst kurzer Stauung in der Ellenbeuge, wobei auf vorsichtiges Mischen mit dem Antikoagulant und gleiche Monovetten-Reihenfolge geachtet wurde: 1. Heparin, 2. Hirudin und 3. Citrat. Am dritten Tag wurde für die zweite Blutentnahme

der andere Arm benutzt. Die Kanüle wurde möglichst dick gewählt, um eine frühzeitige Aktivierung der Plättchen zu vermeiden. Für die Versuche mit Hirudin wurden leere Sarstedt-Monovetten mit Lepirudin befüllt (20 µg Lepirudin/ml Blut).

### 3.3. Materialien

Geräte	Hersteller
Blutzellautomat KX-21	Sysmex Europe GmbH, Hamburg
Schüttler	IKA® Works, Staufen
Vortex Mixer ZX3	VELP® Scientifica Europe, Usmate, Italien
<b>Testkits</b>	
HaemoSys® PADA Platelet Adhesion Assay	JenAffin GmbH, Jena
HaemoSys® PADA-RASS	JenAffin GmbH, Jena
<b>Verbrauchsmaterialien</b>	
S-Monovette® 2,6 ml (16 I.E. Heparin/ml)	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
S-Monovette® 2,6 ml (Trinatriumcitrat 0,106 mol/l)	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
S-Monovette® 2,6 ml (leer)	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
S-Monovette®-Kanüle 20 G x 1 ½"	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
<b>Chemikalien und Antikörper</b>	
Aspirin® i. v.	Bayer Schering Pharma, Leverkusen
Lepirudin gefriergetrocknet (Refludan®)	Celgene GmbH, UK
<i>trans</i> -Resveratrol, Polygonum cuspidatum-Extrakt (125 mg Resveratrol pro 500 mg-Kapsel)	Biotikon, Gornheimertal
Isotone Kochsalzlösung 0,9%	B. Braun AG, Mesungen
IgG1-Anti-CD41a-PE	
Anti-CD62p-FITC	
Lysin-Reagenz	
Bovines Serumalbumin	
Phago-Waschpuffer	
TRAP-6	
Cell-Wash und -FIX	

### 3.4. Durchführung der Thrombozytenfunktionstests

#### 3.4.1. Durchführung des PADA

Es wird für die Blutabnahme eine kommerzielle Citrat-Monovette benutzt, zum Mischen leicht geschwenkt und bei Zimmertemperatur innerhalb von 40-50 min ausgewertet. Es genügen insgesamt 0,5 ml Citrat-Vollblut, womit als erstes die Plättchenzahl am Blutzellautomaten ermittelt wird. In dieser Studie wurden die Messung mit Citrat-, Heparin- und Hirudin-antikoagulierten Blutproben durchgeführt und begannen jeweils mit einem kleinen Blutbild (PLT, WBC, HK, HGB).

Es werden möglichst vorsichtig 200 µl Blut in ein Probenröhrchen (rot markiert) und weitere 200 µl in ein Kontrollröhrchen (farblos) pipettiert. Danach gibt man 10 µl der Partikelsuspension nach vorheriger Homogenisierung im Vortexer zur Probe hinzu sowie die identische Menge Puffer (NaCl 0,9%, im Testkit enthalten) zur Kontrolle. Beide Röhrchen werden für exakt 5 min (Stoppuhr) im von HaemoSys geeichten Schüttler inkubiert, welcher mindestens 20 min zuvor in Betrieb genommen wurde. Dadurch werden abweichende Schüttelfrequenzen und somit fehlerhafte Ergebnisse wegen ungleichem Scherstress vermieden.

Im Anschluss erfolgt die Zählung der noch freien Plättchen am Blutzellautomaten, wobei auf eine stets gleiche Systematik geachtet wurde (erst Kontrolle, dann Probe). Um Überschneidungen bei der Zählung zu vermeiden, war es nötig die drei verschiedenen Proben zeitlich etwas versetzt zu messen (erst Heparin, dann Citrat und zuletzt Hirudin). Jedes Röhrchen wird doppelt, ggf. auch ein drittes mal gemessen und das Ergebnis daraus gemittelt. Der Adhäsionsindex berechnet sich aus diesen Mittelwerten dann folgendermaßen:

$$AI = \frac{\text{Plättchenzahl}_{\text{(Kontrolle)}} - \text{Plättchenzahl}_{\text{(Probe)}}}{\text{Plättchenzahl}_{\text{(Kontrolle)}}} \times 100$$

Er entspricht also dem prozentualen Anteil der Plättchen, welche an die Partikel gebunden haben, und spiegelt so das Maß ihrer Reaktivität wider. Die Stärke und Dauer des Scherstresses wurde dabei so festgelegt, dass gesunde Menschen einen durchschnittlichen AI von 50 aufweisen (Möller 2010). Beim Gesunden kommt es also bereits bei ca. 50% aller Plättchen während des Schüttelns zur Adhäsion an die Partikel.

### 3.4.2. Durchführung des PADA-RASS

PADA und PADA-RASS wurden immer gleichzeitig und mit dem Blut aus derselben Monovette durchgeführt. Es wird für den PADA-RASS ca. 1 ml Heparin-Vollblut benötigt, welches mit kommerziellen Abnahmesystemen gewonnen werden kann. Auch hier erfolgt zunächst die Bestimmung der Plättchenzahl, um anschließend jeweils 200 µl in ein rot markiertes Proberöhrchen und ein farbloses Kontrollröhrchen zu pipettieren. Diese werden nun mit 10 µl einer zuvor hergestellten ASS-Lösung (200 µg/ml) versetzt, sodass im Blut eine Endkonzentration von ca. 10 µg ASS/ml resultiert. Als Referenz benötigt man zwei weitere Röhrchen, in welche die gleiche Menge Puffer (NaCl 0,9% aus dem Testkit) ohne ASS pipettiert wird. Alle vier Röhrchen werden für exakt 10 min auf einem wie für den PADA geeichten Schüttler inkubiert. Danach verfährt man analog dem PADA, d. h. man gibt in die Proberöhrchen 10 µl der Partikel-Suspension, in die Kontrollen nur Puffer und schüttelt wiederum für 5 min (Abb. 13). Nach der Zählung der noch freien Plättchen werden die Als miteinander verglichen.

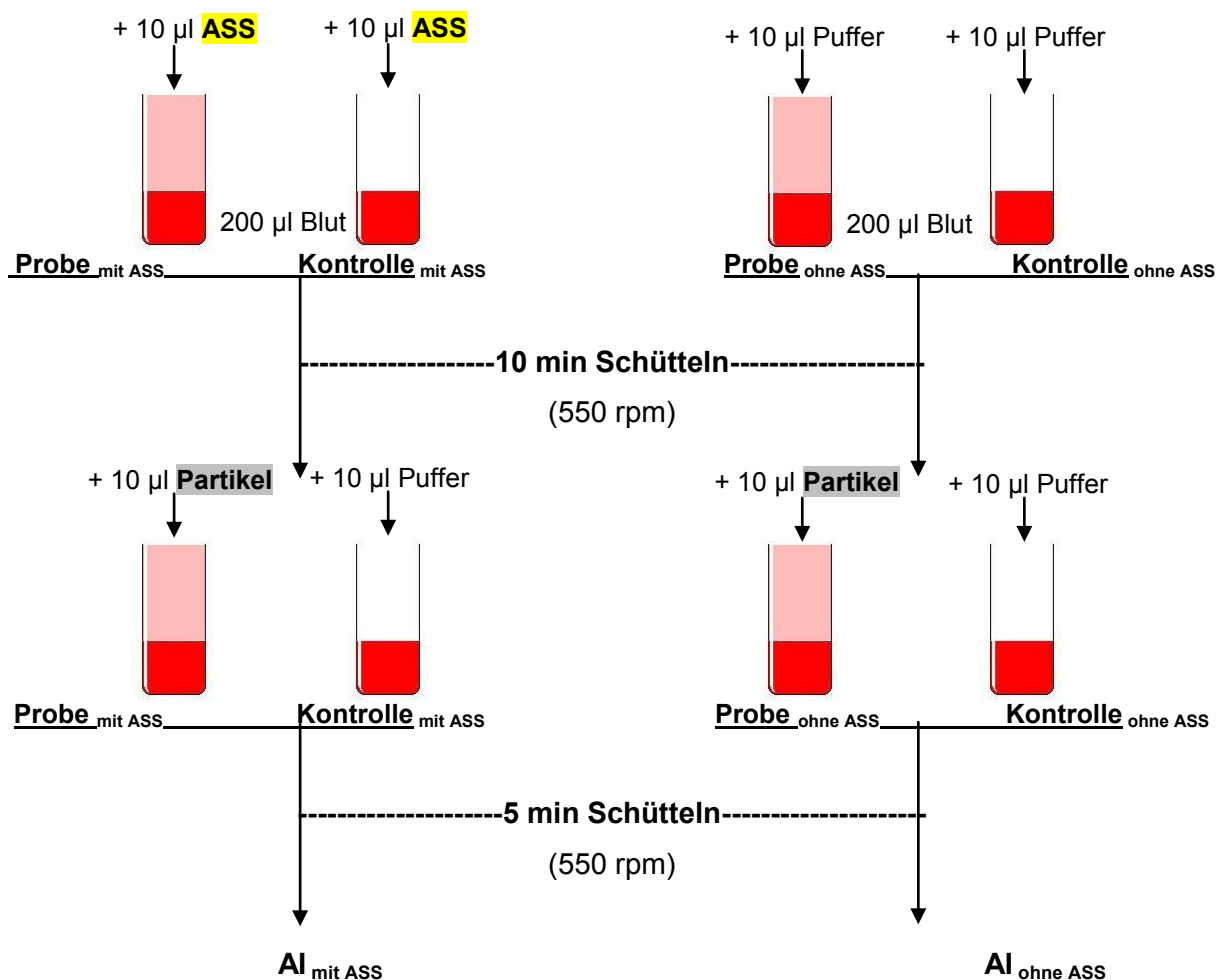


Abb. 13: Schematischer Ablauf des PADA-RASS

Die Auswertung der AIs wurde vom Hersteller folgendermaßen definiert:

$$\begin{aligned}
 AI_{\text{mit ASS}} < AI_{\text{ohne ASS}} &= \text{ASS-Responder} \\
 AI_{\text{mit ASS}} = AI_{\text{ohne ASS}} \pm 3 &= \text{ASS-Nonresponder} \\
 AI_{\text{mit ASS}} > AI_{\text{ohne ASS}} &= \text{PRASA (paradoxe Reaktion auf ASS)}
 \end{aligned}$$

Es muss erwähnt werden, dass der PADA-RASS zu Beginn dieser Arbeit noch standardmäßig mit einer Endkonzentration von 625 µg ASS/ml durchgeführt worden war, was jedoch in Anlehnung an diverse andere Studien angeglichen wurde. Dort zeigten sich bereits 18 µg/ml (Weber et al. 2008) bzw. 10 µg/ml (Hinz et al. 2007) und sogar 5,4 µg/ml (Hohlfeld et al. 2008) ausreichend um die TXA2-Synthese komplett zu inhibieren, wohingegen bei einem Serumspiegel von 300-500 µg/ml bereits von einer milden Salicylat-Intoxikation ausgegangen werden muss (Dargan et al. 2002). Die ersten Versuche der Probanden, in welchen noch die alte Dosis ASS zugegeben wurde, stimmten aber mit den Ergebnissen der darauf folgenden überein, sodass dieser Umstand bei der Gesamtauswertung außer Acht gelassen wurde.

### 3.4.3. Durchführung von Multiplate

Für die Impedanzaggregometrie wurde eine Monovette mit Hirudin-Vollblut vom Probanden persönlich ins Forschungszentrum des Uniklinikums Jena gebracht und vom dortigen Personal bis spätestens 180 min nach Abnahme bei Raumtemperatur verarbeitet. Folgende Tests kamen zum Einsatz:

Test	Agonist/Zusatz	Endkonzentration
TRAPtest	TRAP-6 (thrombin receptor activating peptide)	32 µM
COLtest	Kollagen	3,2 µg/ml
ADPtest	ADP	6,5 µM
ASPItest	Arachidonsäure	0,5 mM
ASA control	ASS	1 mg/ml

Bei allen Multiplate-Tests werden zunächst 300 µl Blut mit 300 µl NaCl 0,9% (auf 37°C vorgewärmt) für 180 sec bei niedrigem Scherstress gemischt. Beim ASA control pipettiert man noch zusätzlich 20 µl ASS-Lösung des Herstellers mit in den Ansatz (Endkonzentration 1 mg ASS/ml). Durch Zugabe der jeweiligen Agonisten wird dann die Plättchenaggregation gestartet. Im ASA control wird AA als Agonist zugefügt. Das Gerät misst nun über 6 min die

Impedanz-Änderung als AUC (area under the curve) mit der Einheit [AU\*min] (aggregation units mal Minuten).

#### **3.4.4. Durchführung der Durchflusszytometrie**

Die Durchführung der Durchflusszytometrie erfolgte ebenfalls durch das Personal des Forschungszentrums am Uniklinikum Jena. Laut deren Angaben wurden die Plättchen im Citratblut zunächst mit bovinem Serumalbumin auf  $20 \times 10^3/\mu\text{l}$  verdünnt. 5  $\mu\text{l}$  davon wurden dann entweder mit 5  $\mu\text{l}$  TRAP-6 versetzt bzw. Phago-Waschpuffer, leicht geschüttelt und für 10 min im Brutschrank bei 37°C gelagert. Zu beiden Proben folgte dann die Zugabe von 5  $\mu\text{l}$  CD41p-PE-Antikörper zur Identifikation der einzelnen Plättchen sowie 5  $\mu\text{l}$  CD62p-FITC zur Detektion von aktivierten Plättchen (exprimiertes P-Selektin), um anschließend alles bei Raumtemperatur für 15 min im Dunkeln reagieren zu lassen. 2 ml Lysin-Reagenz stoppte die Prozedur und die Proben ruhten für weitere 8 min. Nach Zentrifugieren (5 min bei 1.800 rpm) und Abgießen des Überstandes wurden die Plättchen mit 2 ml Cell-Wash gewaschen und nochmals zentrifugiert. Das Sediment wurde dann mit 2 ml Cell-FIX fixiert und konnte auf ruhende (CD41+/CD62-) oder aktivierte (CD41+/CD62+) Plättchen hin analysiert werden. Der Grad der Aktivierung wurde hierbei mithilfe der mittleren Fluoreszenzintensität (Mean Fluorescence Intensity, MFI) ausgedrückt, ein Maß für die Menge gebundener Antikörper.

#### **3.5. Statistische Auswertung**

Die Erstellung der Diagramme und Tabellen erfolgte mit Excel 2007 und PowerPoint 2007 für Windows XP.

Zur Auswertung der Daten wurde IBM SPSS Statistics 19 verwendet. Es kamen folgende nichtparametrische Tests für verbundene Stichproben zum Einsatz:

- 2-seitiger Vorzeichentest
- 2-seitiger Wilcoxon-Test

Korrelationen wurden mit dem 2-seitigen Test nach Pearson berechnet.

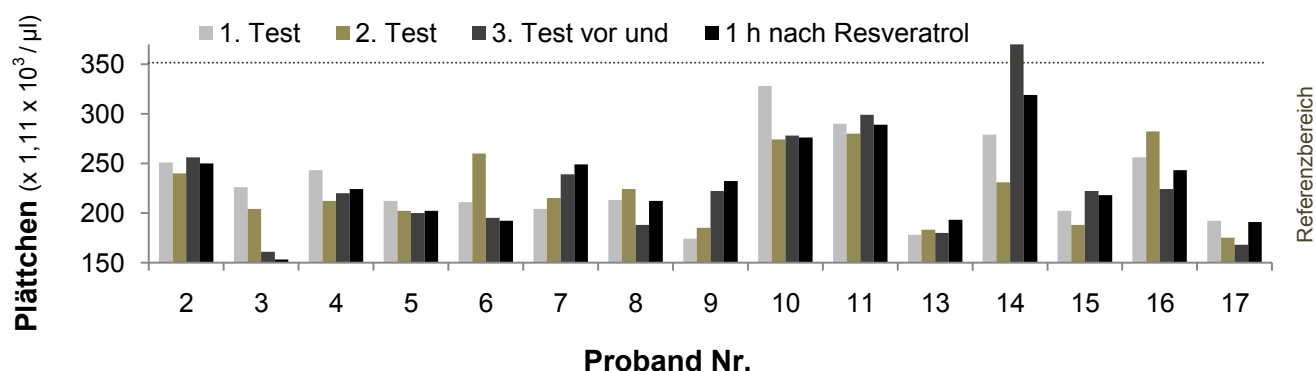
Ein p-Wert < 0,05 gilt als signifikant.

Mittelwerte sind als arithmetische Mittel mit Standardabweichung angegeben.

## 4. Ergebnisteil

### 4.1. Allgemeine Blutparameter

Bei den allgemeinen Blutparametern Leukozytenzahl, Hämatokrit und Hämoglobin gab es in den drei Tests keine Auffälligkeiten (**Tab. 10** im Anhang). Bei der Plättchenzahl hatte Proband Nr. 14 allerdings in seinem dritten Test vor Resveratroleinnahme einen vergleichsweise hohen Wert (**Abb. 14**):



**Abb. 14: Plättchenzahl im Citratblut** der 15 Probanden an je drei zeitlich verschiedenen Versuchstagen. Nach der dritten Messung nahmen die Probanden 375 mg Resveratrol zu sich und 1 h Stunde später wurde nochmals gemessen.

### 4.2. Messung der Plättchenreaktivität

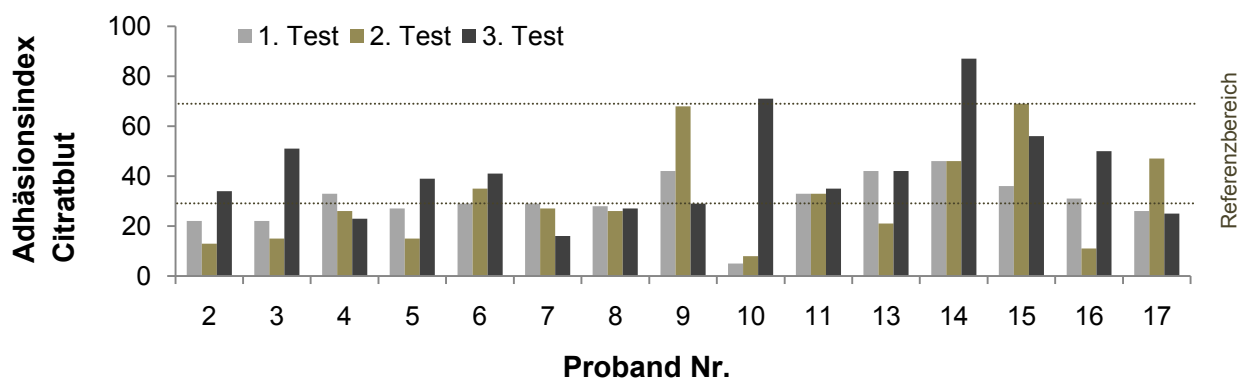
#### 4.2.1. Messung der Plättchenreaktivität ohne Resveratrol mit dem PADA

Es wurde bei den 15 gesunden Probanden in drei aufeinander folgenden Tests im Abstand von mindestens einer Woche der Adhäsionsindex (AI) in Citrat-, Hirudin- und Heparinblut gemessen (**Abb. 15 a-c**).

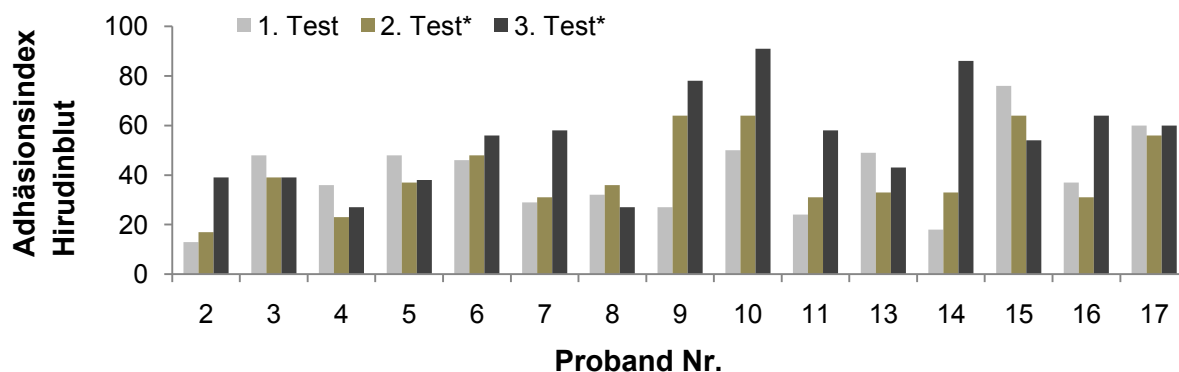
**Citrat (Abb. 15 a):** Laut Hersteller wird der PADA mit Citratblut durchgeführt. Der mittlere AI lag dort mit  $30,1 \pm 9,6$  im ersten Test bzw.  $30,7 \pm 18,7$  im zweiten und  $41,7 \pm 18,4$  im dritten stets im unteren Referenzbereich. Die Probanden Nr. 10 und 14 lagen einmal mit ihrem Wert deutlich höher als in den anderen Versuchen. Der entsprechende AI dieser Personen in den Hirudinproben war ebenso erhöht. Für den PADA in Hirudin- und Heparinblut existieren keine Referenzwerte.

**Hirudin (Abb. 15 b):** Die AIs im zweiten und dritten Test in Hirudinblut waren signifikant höher als die in Citratblut ( $p = 0,036$  und  $p = 0,017$ ) und sie korrelierten mit den Werten in Citratblut (zweiter Test  $r = 0,555$  und  $p = 0,032$ ; dritter Test  $r = 0,573$  und  $p = 0,026$ ). Im ersten Test war der Unterschied nicht signifikant ( $p = 0,14$ ) und es gab keine Korrelation ( $r = -0,184$  und  $p = 0,511$ ).

**Heparin (Abb. 15 c):** Bei Heparin ist der Unterschied im AI zu Citratblut wesentlich deutlicher: hier lag der Mittelwert bei  $68,6 \pm 28,9$  im ersten Test,  $76,9 \pm 17,3$  im zweiten Test und  $85,6 \pm 10,2$  im dritten Test (jeweils  $p = 0,000$ ) und war damit signifikant höher (um mehr als das Doppelte) als der AI in Citratblut. Der erste und dritte Test korrelierte mit dem AI in Citratblut ( $r = 0,517$  und  $p = 0,049$  bzw.  $r = 0,604$  und  $p = 0,017$ ), der zweite nicht ( $r = 0,231$  und  $p = 0,407$ ).



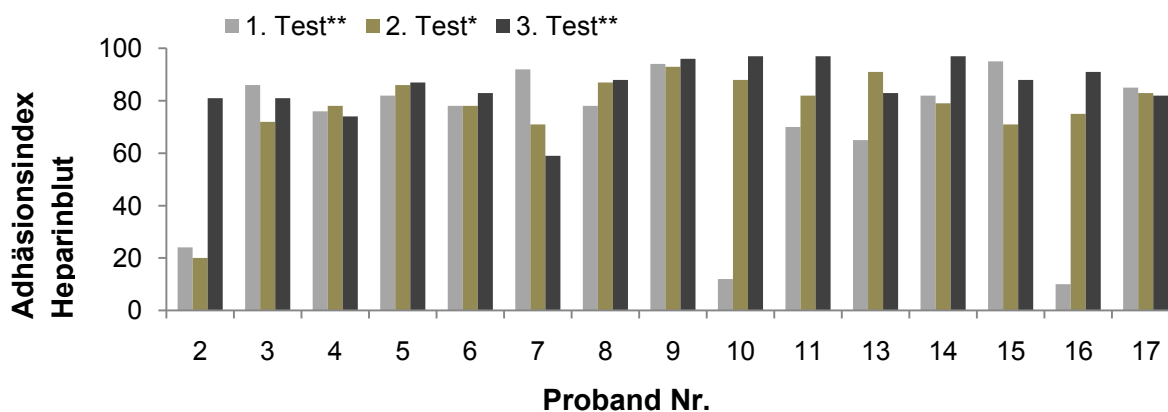
**Abb. 15 a:** AI in Citratblut von 15 gesunden Probanden, die im zeitlichen Abstand von mindestens 1 Woche dreimal getestet wurden (1.-3. Test).



**Abb. 15 b:** AI in Hirudinblut von 15 gesunden Probanden, die im zeitlichen Abstand von mindestens 1 Woche dreimal getestet wurden (1.-3. Test).

\* Die AI waren signifikant höher als in Citratblut (2. Test  $p = 0,036$ ; 3. Test  $p = 0,017$ ; Wilcoxon-Test) und korrelierten mit dem AI in Citratblut (2. Test  $r = 0,555$  und  $p = 0,032$ ; 3. Test  $r = 0,573$  und  $p = 0,026$ ; Korrelation nach Pearson).





**Abb. 15 c:** AI in Heparinblut von 15 gesunden Probanden, die im zeitlichen Abstand von mindestens 1 Woche dreimal getestet wurden (1.-3. Test).

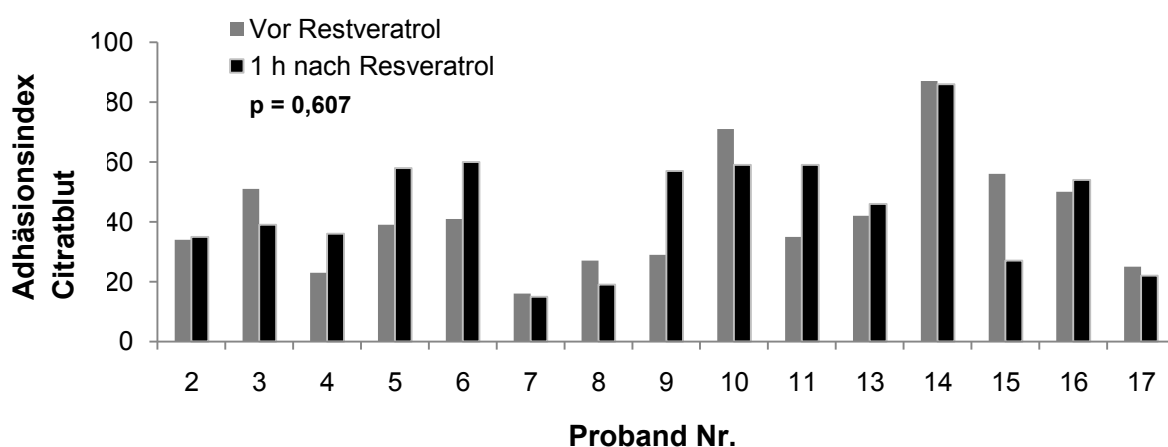
\* Die AI waren signifikant höher als in Citratblut ( $p = 0,000$ ; Wilcoxon-Test).

\*\* Die AI waren signifikant höher als in Citratblut ( $p = 0,000$ , Wilcoxon-Test) und korrelierten mit dem AI in Citratblut (1. Test  $r = 0,517$  und  $p = 0,049$ ; 3. Test  $r = 0,604$  und  $p = 0,017$ ; Korrelation nach Pearson).

#### 4.2.2. Messung der Plättchenreaktivität vor und nach Resveratrol

##### 4.2.2.1. Messung der Plättchenreaktivität vor und nach Resveratrol mit dem PADA

Um den Effekt von Resveratrol auf den PADA zu testen, wurde am dritten Versuchstag der AI unmittelbar vor und 1 h nach Resveratrol verglichen. Es ergab sich hierbei kein signifikanter Unterschied im AI sowohl in Citrat- ( $p = 0,607$ ; **Abb. 16 a**) als auch in Hirudin- ( $p = 1,000$ ; **Abb. 16 b**) und Heparinblut ( $p = 0,118$ ; **Abb. 16 c**). Allerdings war der Unterschied vor/nach Resveratrol wie in **Abb. 17** zu sehen in Hirudinblut signifikant abhängig vom Ausgangswert des AI vor Resveratrol: je höher der AI vor Resveratrol war, desto mehr ist er gesunken ( $r = 0,629$  und  $p = 0,012$ ). Im Citrat- bzw. Heparinblut war dieser Zusammenhang nicht mehr signifikant ( $r = 0,489$  und  $p = 0,065$  bzw.  $r = 0,000$  und  $0,999$ ).



**Abb. 16 a:** AI in Citratblut vor und 1 h nach Einnahme von 375 mg Resveratrol bei 15 gesunden Probanden. Der Unterschied im AI vor/nach Resveratrol ist nicht signifikant (2-seitiger Vorzeichentest).

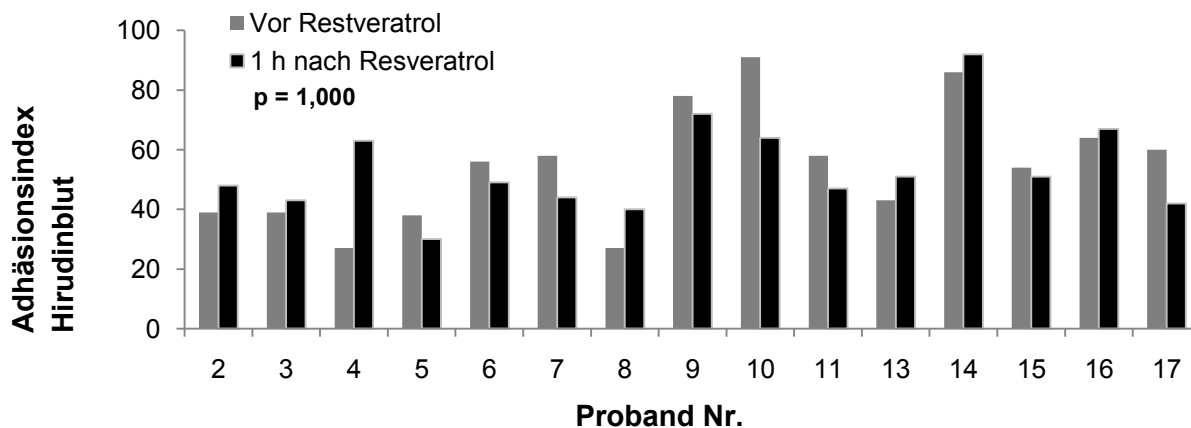


Abb. 16 b: AI in Hirudinblut vor und 1 h nach Einnahme von 375 mg Resveratrol bei 15 gesunden Probanden. Der Unterschied im AI vor/nach Resveratrol ist nicht signifikant (2-seitiger Vorzeichentest).

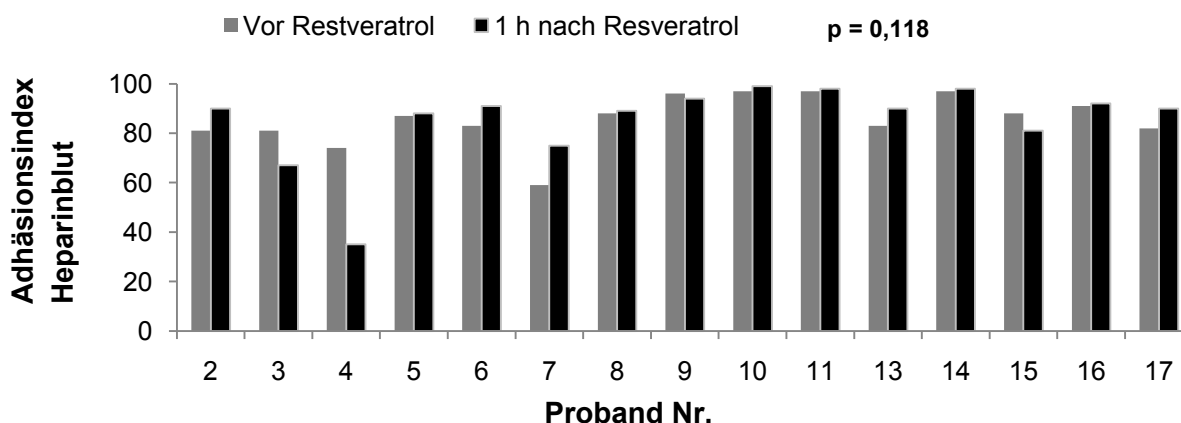
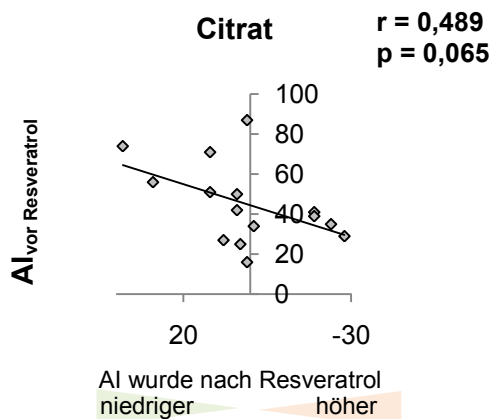
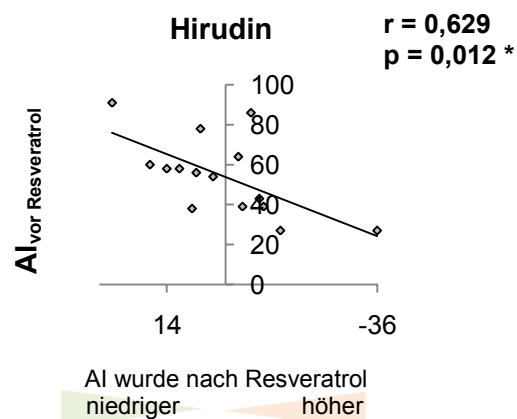


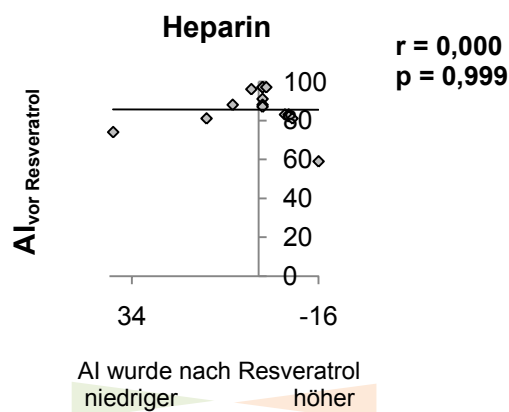
Abb. 16 c: AI in Heparinblut vor und 1 h nach Einnahme von 375 mg Resveratrol bei 15 gesunden Probanden. Der Unterschied im AI vor/nach Resveratrol ist nicht signifikant (2-seitiger Vorzeichentest).



Differenz  $AI_{\text{vor Resveratrol}} - AI_{\text{nach Resveratrol}}$   
a)



Differenz  $AI_{\text{vor Resveratrol}} - AI_{\text{nach Resveratrol}}$   
b)



**Abb. 17 a-c: Änderung des AI vor und 1 h nach Einnahme von 357 mg Resveratrol bei 15 gesunden Probanden in Citrat-, Hirudin- und Heparinblut in Abhängigkeit von der Höhe des AI vor Resveratrol.**  
\* Korrelation ist signifikant (Korrelation nach Pearson).

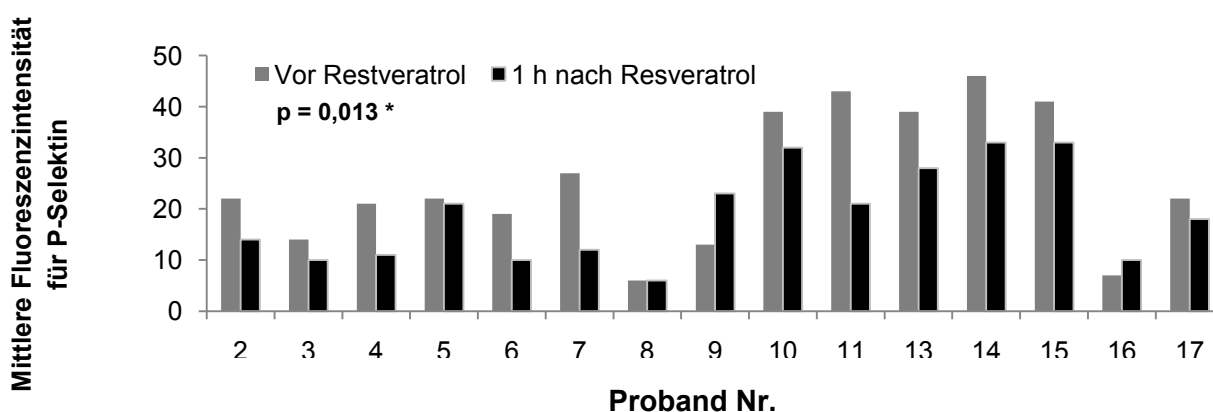
Differenz  $AI_{\text{vor Resveratrol}} - AI_{\text{nach Resveratrol}}$

c)

#### 4.2.2.2. Messung der Plättchenreaktivität vor und nach Resveratrol mit der Durchflusszytometrie

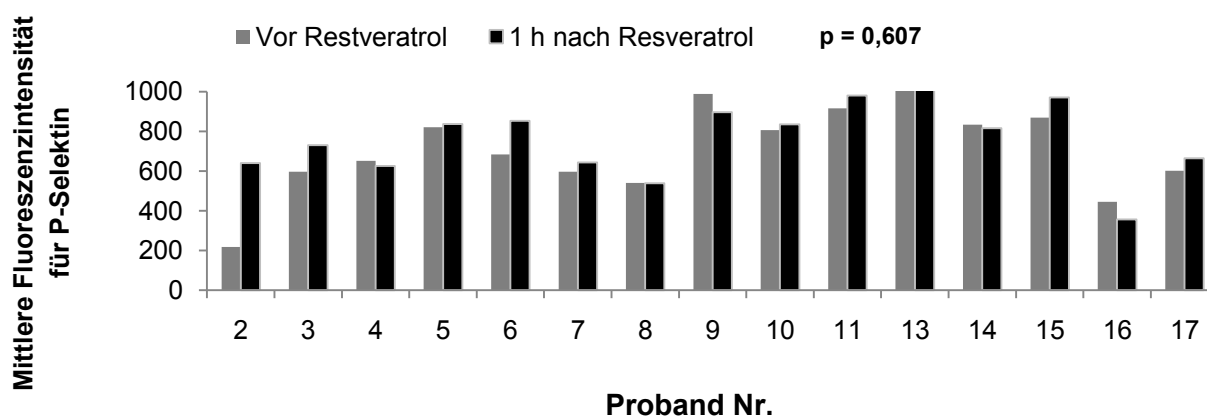
Am dritten Versuchstag wurde die Plättchenaktivität anhand der P-Selektin-Expression direkt vor sowie 1 h nach Einnahme von Resveratrol gemessen. Wie in **Abb. 18 a** zu sehen, war in den unstimulierten Plättchen die Expression von P-Selektin nach Resveratrol signifikant geringer ( $p = 0,013$ ). Je höher die zuvor ohne Resveratrol gemessene MFI (Mittlere Fluoreszenzintensität) für P-Selektin und damit der Aktivierungsgrad der Plättchen in Ruhe war, desto stärker war diese nach Resveratrol verringert (**Abb. 19**); diese Korrelation ist signifikant ( $r = 0,721$  und  $p = 0,002$ ).

In den TRAP-6-stimulierten Proben war kein signifikanter Unterschied der P-Selektin-Expression vor/nach Resveratrol zu sehen ( $p = 0,607$ ). Man beachte hier allerdings den wesentlich größeren Maßstab in der Ordinatenachse (**Abb. 18 b**).

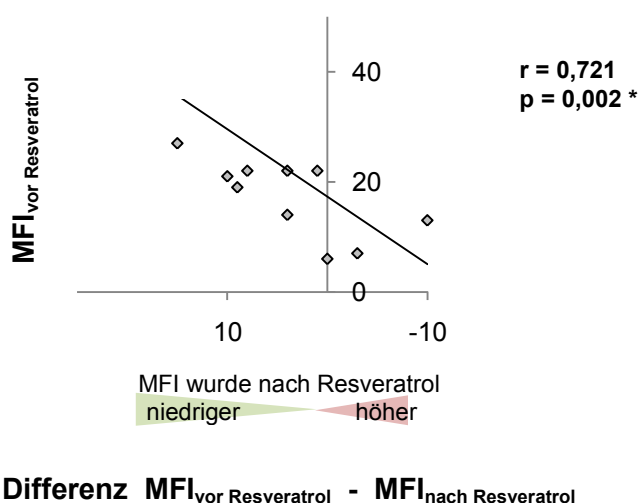


**Abb. 18 a: Messung der P-Selektin-Expression in ruhenden Plättchen vor und 1 h nach Einnahme von 375 mg Resveratrol** anhand fluoreszenzmarkierter Antikörper mit der Durchflusszytometrie bei 15 gesunden Probanden.

\* Die Abnahme der P-Selektin-Expression nach Resveratrol ist signifikant (2-seitiger Vorzeichentest).



**Abb. 18 b:** Messung der P-Selektin-Expression in TRAP-6-aktivierten Plättchen vor und 1 h nach Einnahme von 375 mg Resveratrol anhand fluoreszenzmarkierter Antikörper mit der Durchflusszytometrie bei 15 gesunden Probanden. Der Unterschied vor/nach Resveratrol ist nicht signifikant.

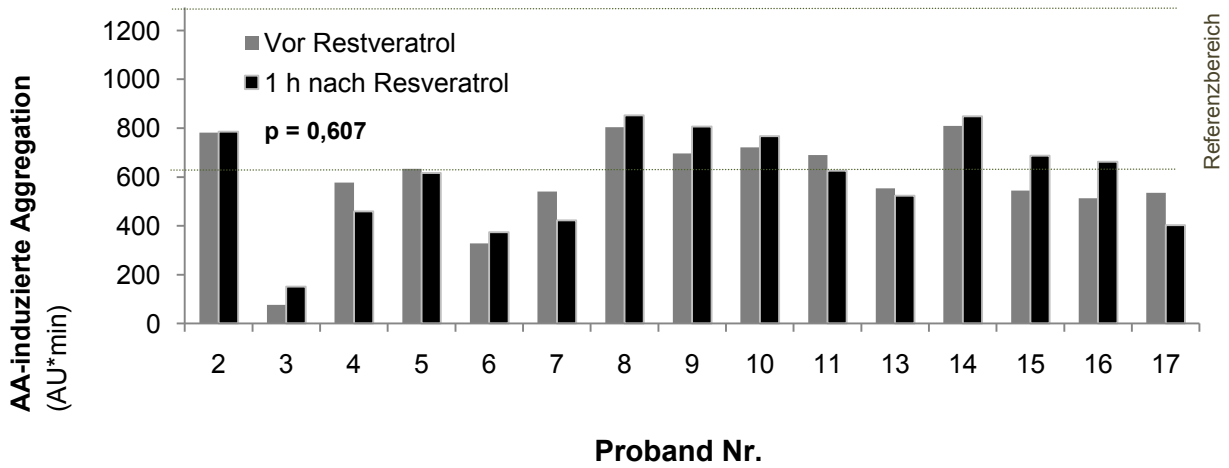


**Abb. 19:** Änderung der MFI (Mittlere Fluoreszenzintensität) für P-Selektin vor und 1 h nach Einnahme von 375 mg Resveratrol bei 15 gesunden Probanden in Abhängigkeit von der Höhe der MFI vor Resveratrol.

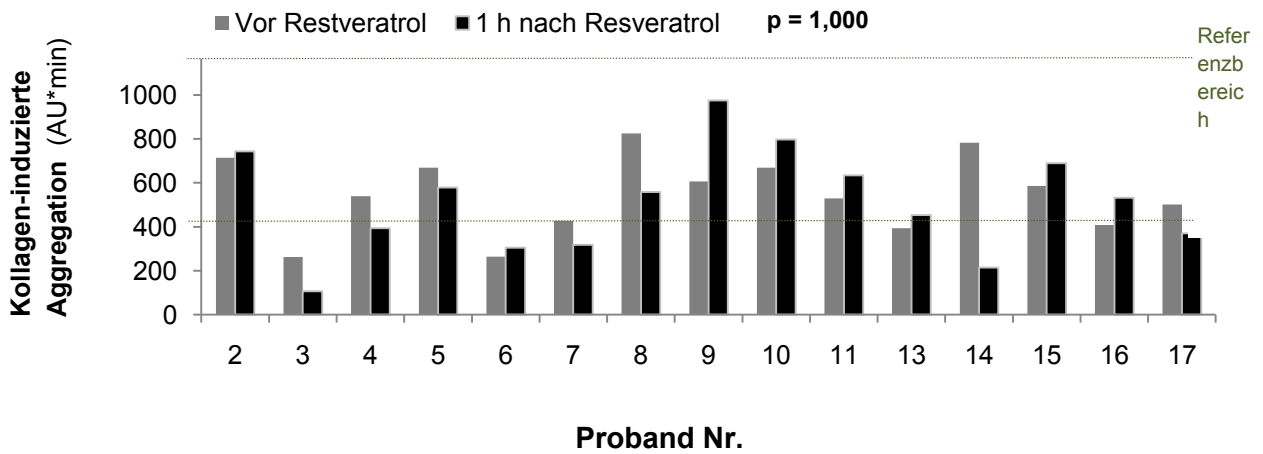
\* Korrelation ist signifikant (Korrelation nach Pearson).

#### 4.2.2.3. Messung der Plättchenreaktivität vor und nach Resveratrol mit dem Multiplate

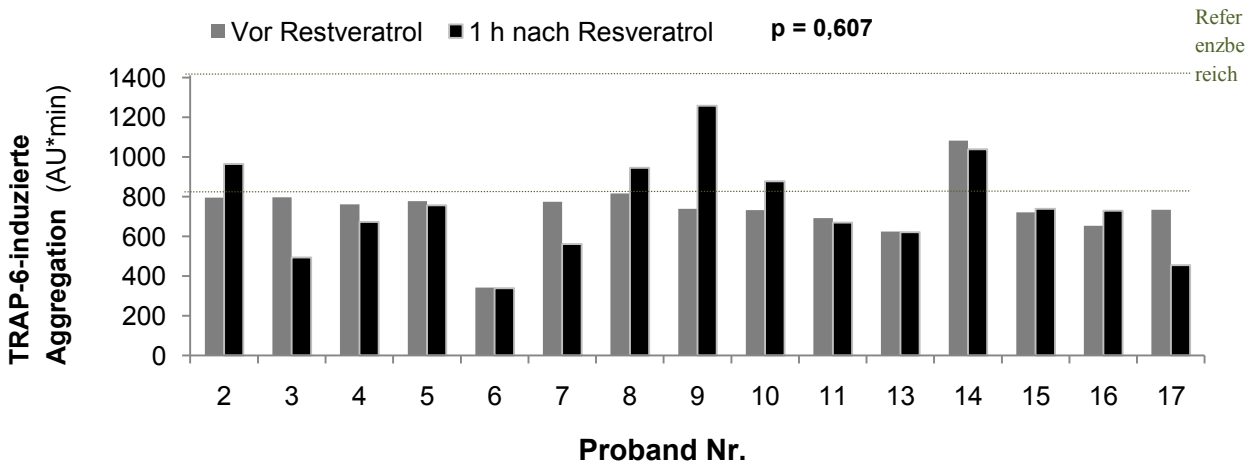
Parallel zum PADA wurde mit Multiplate die Plättchenaggregation am dritten Versuchstag vor und 1 h nach Resveratroleinnahme unter Zugabe der Agonisten AA, Kollagen, TRAP-6 oder ADP in Hirudin-Vollblut getestet (**Abb. 20 a-d**). Insgesamt betrachtet lagen die Probanden wie schon beim PADA meist unterhalb der vom Hersteller angegebenen Referenzwerte. Resveratrol hatte keinen Effekt auf die AA-, Kollagen-, TRAP-6- oder ADP-induzierte Aggregation. Die Veränderung der Plättchenaggregation nach Resveratrol war zudem unabhängig vom Ausgangswert vor Resveratrol (**Abb. 21 a-d**).



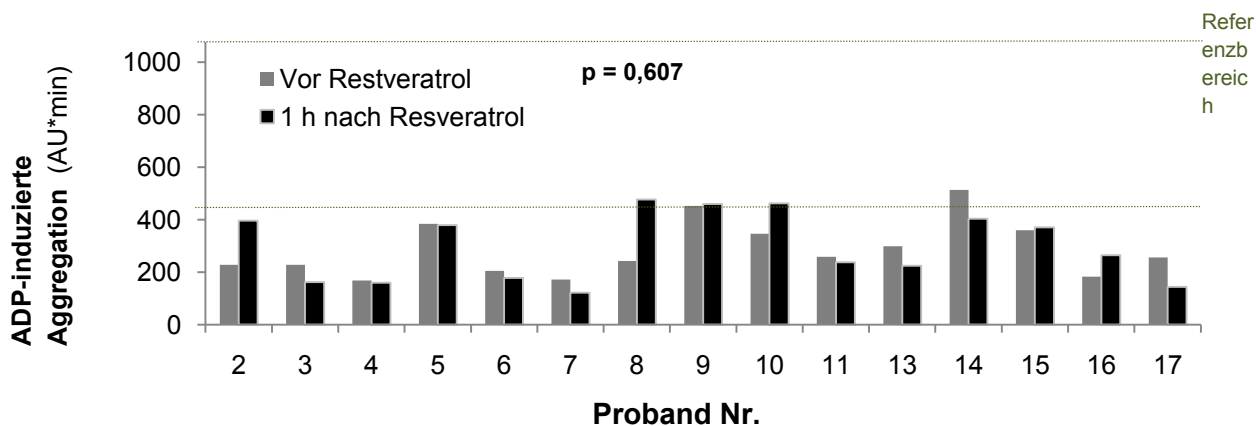
a)



b)



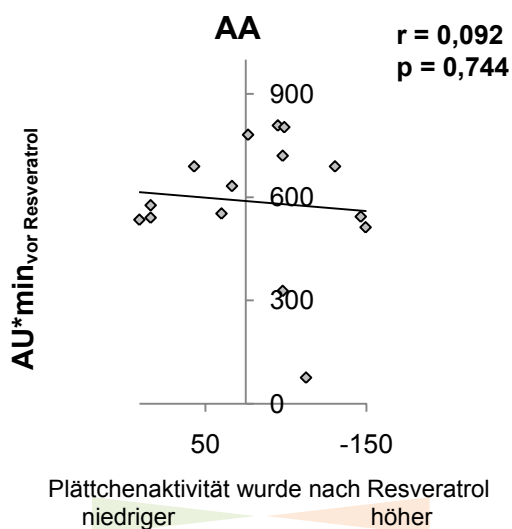
c)



d)

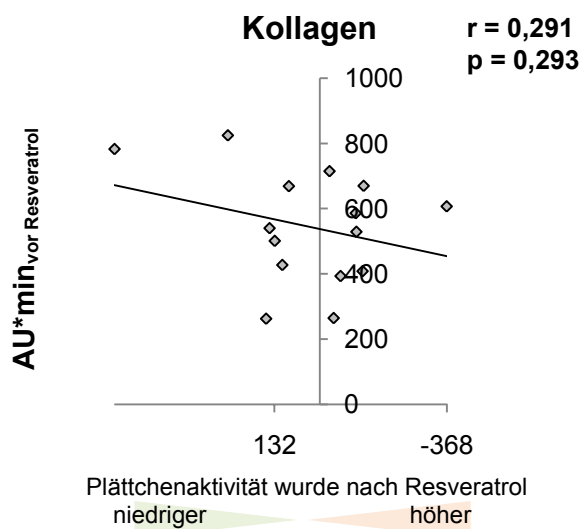
Abb. 20 a-d: AA-, Kollagen-, TRAP-6- und ADP-stimulierte Plättchenaggregation mit dem Multipate vor und 1 h nach Einnahme von 375 mg Resveratrol bei 15 gesunden Probanden.

Der Unterschied ist in keinem Test signifikant (2-seitiger Vorzeichentest).



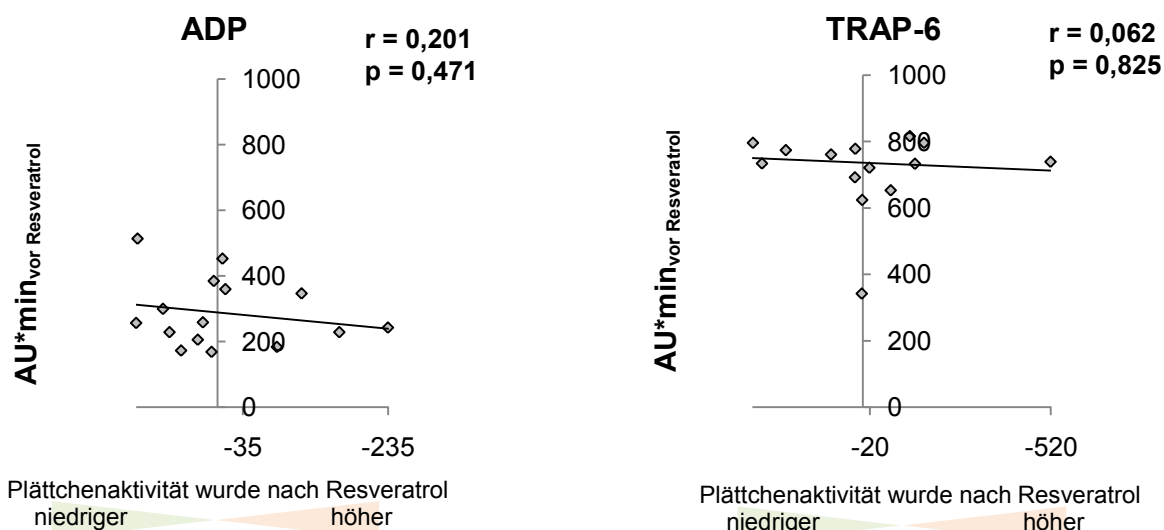
$AU*min_{vor\ Resveratrol} - AU*min_{nach\ Resveratrol}$

a)



$AU*min_{vor\ Resveratrol} - AU*min_{nach\ Resveratrol}$

b)



$AU^*min_{vor\ Resveratrol} - AU^*min_{nach\ Resveratrol}$

c)

$AU^*min_{vor\ Resveratrol} - AU^*min_{nach\ Resveratrol}$

d)

**Abb. 21 a-d:** Änderung der AA-, Kollagen-, TRAP- und ADP-induzierten Plättchenaggregation ( $AU^*min$ ) vor und 1 h nach 375 mg Resveratrol in Abhängigkeit von der Plättchenaktivität vor Resveratrol ( $AU^*min_{vor\ Resveratrol}$ ) mit dem Multiplate bei 15 gesunden Probanden.

Es besteht kein signifikanter Zusammenhang (Korrelation nach Pearson).

### 4.3. Messung der Plättchenaggregation unter ASS-Zusatz *in vitro*

#### 4.3.1. Messung der ASS-Response ohne Resveratrol mit dem PADA-RASS

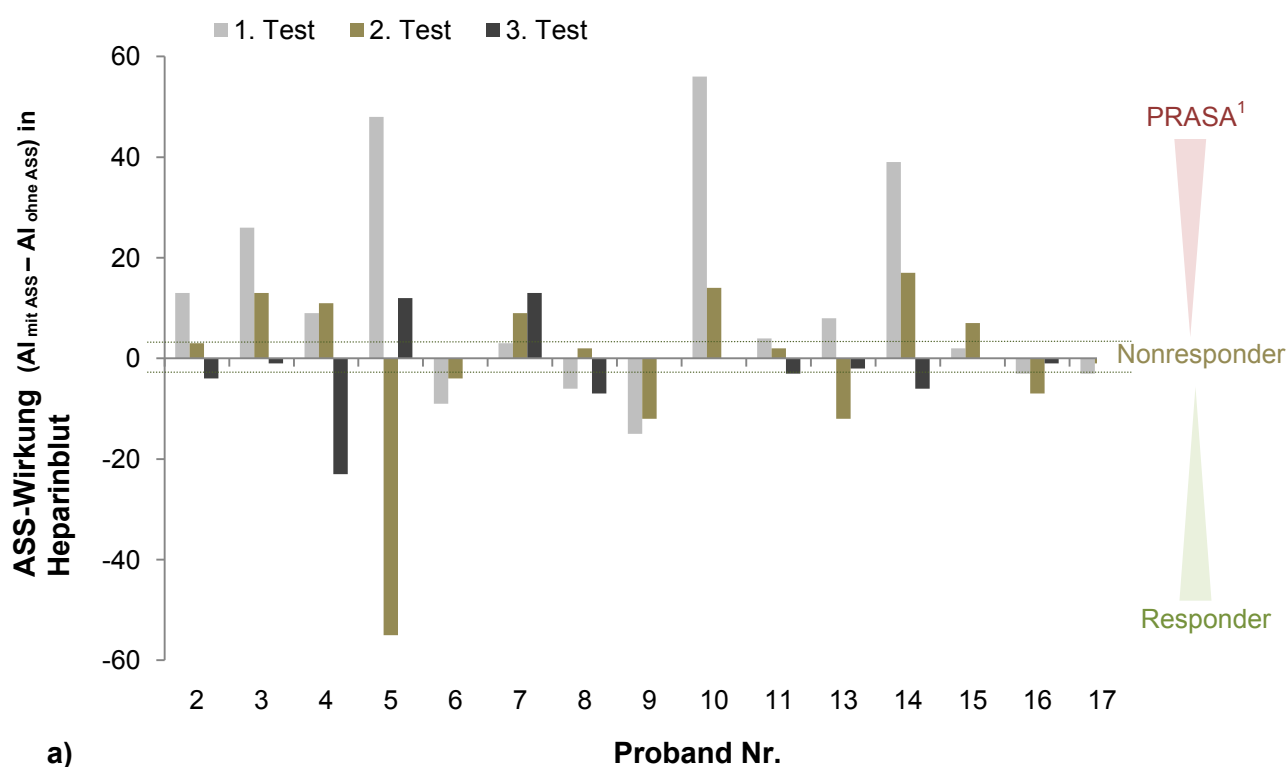
Parallel zur Messung der Plättchenaggregation wurden alle 15 Probanden dreimal im zeitlichen Abstand von mindestens einer Woche mit dem PADA-RASS auf ihre Sensitivität für ASS hin geprüft. Laut Hersteller wird der PADA-RASS in Heparinblut durchgeführt, wir verwendeten zusätzlich Proben mit Citrat- und Hirudinblut. Wie in **Tab. 2** zu sehen, war die Prävalenz der drei Respondertypen (Responder, Nonresponder, PRASA = paradoxe Reaktion auf ASS) nicht in jedem Test gleich. **Tab. 2** zeigt auch, dass die Probanden überwiegend mit einer ASS-Nonresponse oder einer PRASA reagierten. Wie man in **Abb. 22 a-c** erkennt, war die intraindividuelle ASS-Response zeitlich und innerhalb der verschiedenen Antikoagulanzen nicht immer konstant. Bei etwa 35 % aller Messungen ohne Resveratrol war der Respondertyp in allen drei Antikoagulanzen identisch, bei knapp 50 % stimmten nur zwei Ergebnisse überein und bei ca. 15 % war er in jeder Probe völlig unterschiedlich. Die ASS-Response (ASS-Wirkung) entspricht der Differenz aus dem Adhäsionsindex mit und ohne ASS ( $AI_{mit\ ASS} - AI_{ohne\ ASS}$ ), anhand derer man den Respondertyp - wie unter 3.4.2. beschrieben - einteilen kann. Eine negative Differenz

bedeutet also, dass ASS den AI und damit die Plättchenaggregation erwartungsgemäß verringert hat. Eine positive Differenz wäre dementsprechend eine paradoxe Reaktion auf ASS, bei der sich die Aggregation unter ASS erhöht. Bei ASS-Nonrespondern bleibt die Differenz  $\leq 3$ . Wegen den intraindividuellen Schwankungen wurde für den späteren Vergleich mit Resveratrol nur der dritte Wert unmittelbar vor Einnahme der Testsubstanz verwendet.

**Tab. 2: Prävalenz der ASS-Respondertypen im PADA-RASS bei 15 gesunden Probanden, die an je drei verschiedenen Terminen (= Test 1-3) im Abstand von mindestens einer Woche in Heparin-, Citrat- und Hirudinblut getestet wurden.**

Antikoagulation	Test	ASS-Respondertyp (Häufigkeit in %)		
		Responder	Nonresponder	PRASA <sup>1</sup>
Heparin	1	20,0	26,7	53,3
	2	33,3	26,7	40,0
	3	26,7	60,0	13,3
Citrat	1	20,0	20,0	60,0
	2	26,7	33,3	40,0
	3	6,7	26,7	66,7
Hirudin	1	33,3	6,7	60,0
	2	33,3	26,7	40,0
	3	46,7	33,3	20,0

<sup>1</sup> PRASA = Paradoxe Reaktion auf ASS





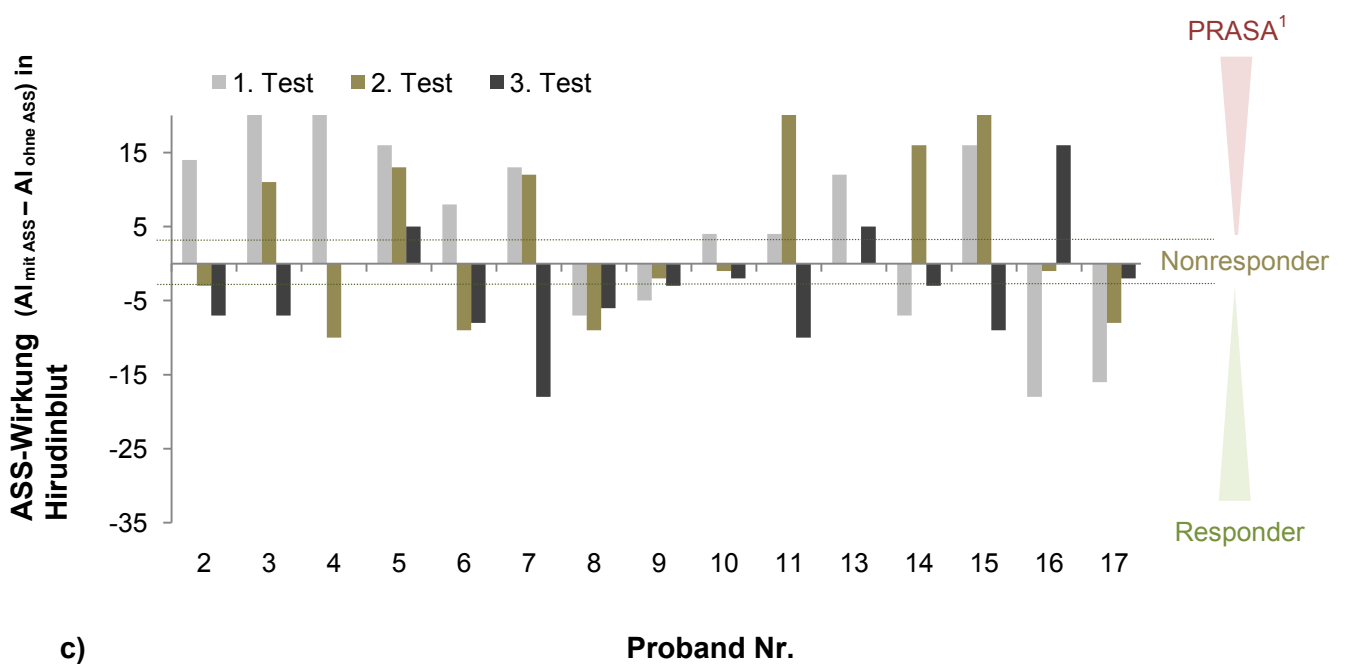
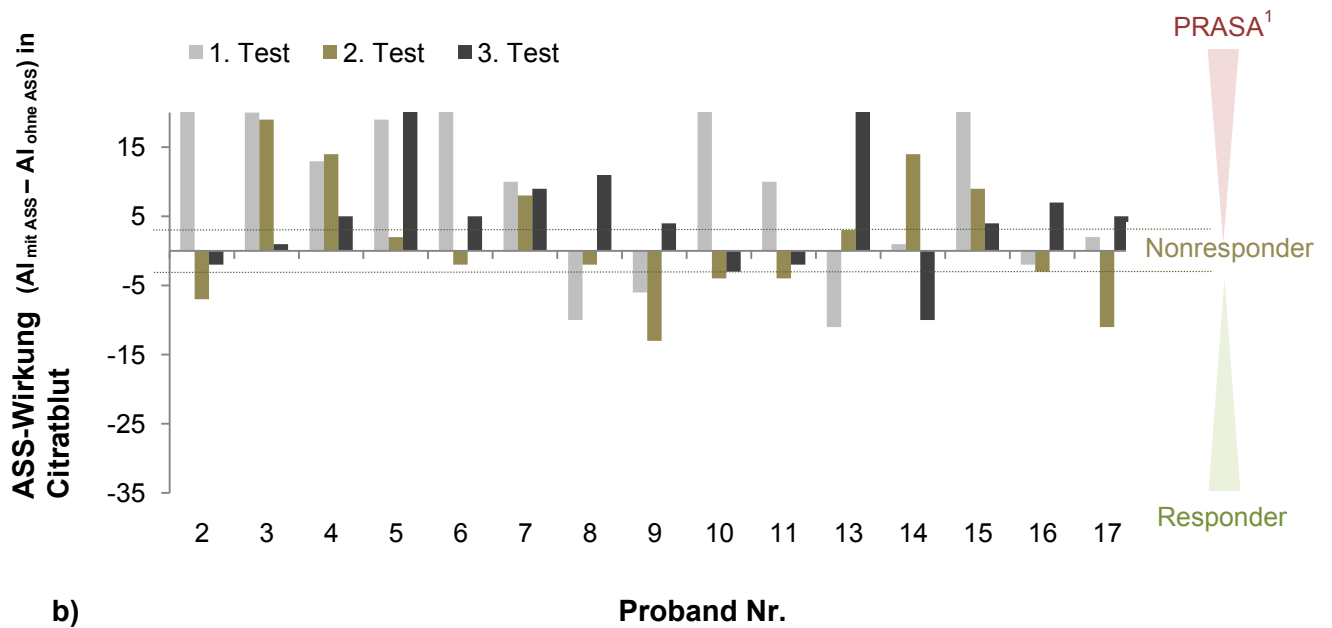


Abb. 22 a-c: ASS-Response im PADA-RASS in a) Heparin-, b) Citrat- und c) Hirudinblut bei 15 gesunden Probanden, die an je drei verschiedenen Terminen im zeitlichen Abstand von mindestens einer Woche getestet wurden (1.-3. Test).

<sup>1</sup> PRASA = Paradoxe Reaktion auf ASS

### 4.3.2. Messung der ASS-Response vor und nach Resveratrol

#### 4.3.2.1. Messung der ASS-Response vor und nach Resveratrol mit dem PADA-RASS

Vergleicht man die ASS-Response am dritten Versuchstag direkt vor Einnahme von Resveratrol mit der eine Stunde später, lässt sich Folgendes feststellen:

a) Es erhöhte sich der Anteil von ASS-Respondern nach Einnahme von Resveratrol bei allen drei Antikoagulanzen bzw. die Häufigkeit einer Nonresponse und einer PRASA wurde geringer.

b) Diese Zunahme des aggregationshemmenden Effektes von ASS konnte fast ausschließlich bei den Probanden festgestellt werden, welche vor Resveratroleinnahme mit einer Nonresponse oder PRASA reagierten. Alle ASS-Responder wiesen dagegen nach Resveratrol eine nahezu unveränderte bzw. verminderte Wirkung von ASS auf.

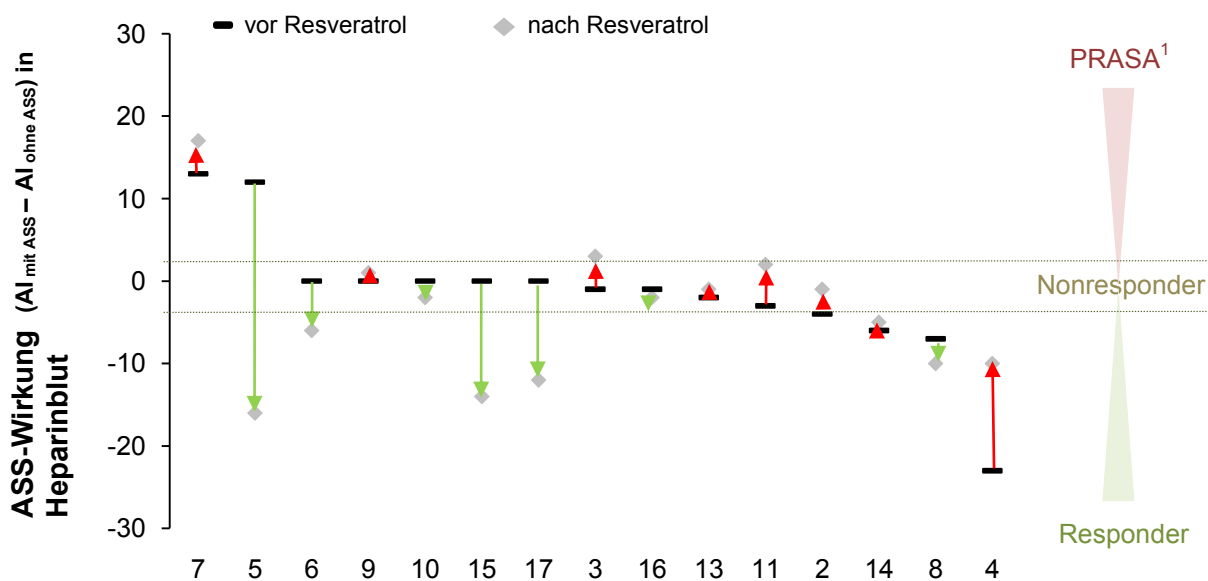
Tab. 3: Prävalenz der ASS-Respondertypen im PADA-RASS vor und 1 h nach Einnahme von 375 mg Resveratrol bei 15 gesunden Probanden in Heparin-, Citrat- und Hirudinblut

Antikoagulation	ASS-Respondertyp vor/1 h nach Resveratrol (Häufigkeit in %)		
	Responder	Nonresponder	PRASA <sup>1</sup>
Heparin	26,7/46,7	60,0/46,7	13,3/6,7
Citrat	6,7/40,0	26,7/26,7	66,7/33,3
Hirudin	46,7/60,0	33,3/33,3	20,0/6,7

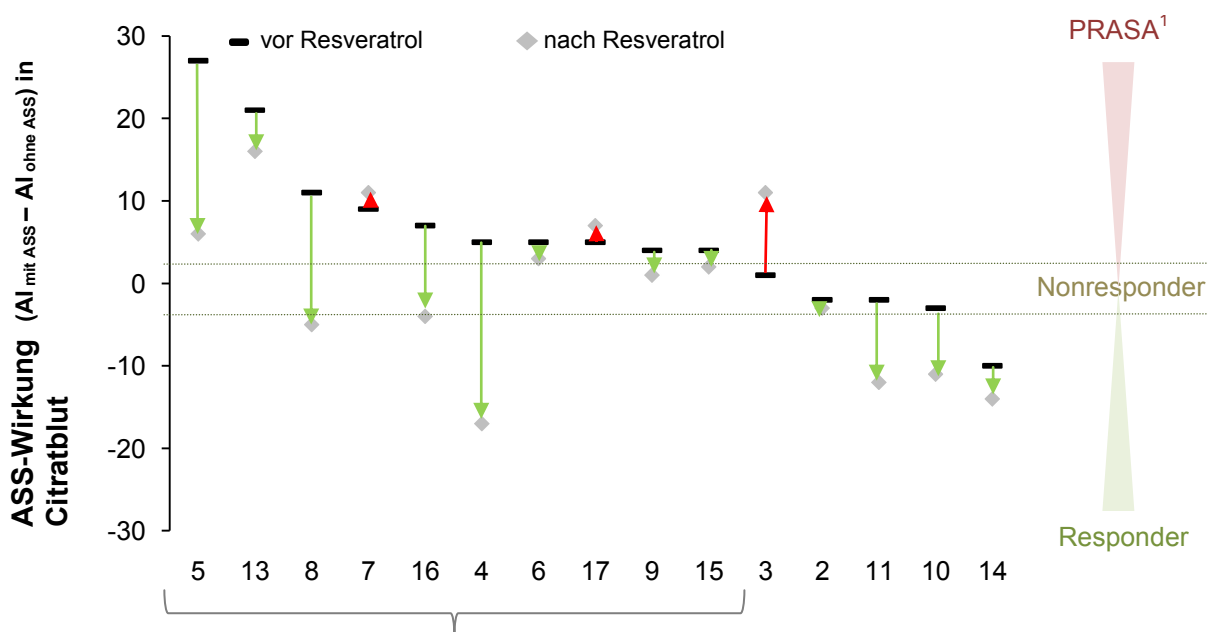
<sup>1</sup> PRASA = Paradoxe Reaktion auf ASS

Es wurde untersucht, ob Resveratrol abhängig vom jeweiligen Respondertyp eine signifikante Wirkung auf die ASS-Response besitzt: Bei den Messungen in Heparinblut (**Abb. 23 a**) war die Veränderung der ASS-Response nach Resveratrol weder bei Respondern ( $p = 0,500$ ;  $n = 4$ ) noch bei Nonrespondern ( $p = 0,438$ ;  $n = 9$ ) oder Personen mit einer PRASA signifikant ( $p = 1,000$ ;  $n = 2$ ). Ebenso war dies in Citratblut bei den Nonrespondern der Fall ( $p = 0,750$ ;  $n = 4$ ), doch wurde die ASS-Wirkung bei Probanden mit einer PRASA nach Resveratrol signifikant besser ( $p = 0,023$ ;  $n = 10$ ). Es gab nur einen Probanden in den Citratproben, welcher Responder war; dessen Response blieb nach Resveratrol nahezu gleich (**Abb. 23 b**). In Hirudinblut hatten ASS-Responder nach Resveratrol eine signifikant verminderte ASS-Wirkung ( $p = 0,031$ ;  $n = 7$ ), während es bei Nonrespondern ( $p = 0,688$ ;  $n = 5$ ) und Probanden mit einer PRASA ( $p = 0,250$ ;  $n = 3$ ) keinen signifikanten Unterschied gab (**Abb. 23 c**).

Die Diagramme in **Abb. 23 a-c** stellen jeweils vor und nach Resveratrol die Differenz aus dem AI mit und ohne ASS ( $AI_{mit\ ASS} - AI_{ohne\ ASS}$ ) dar, die der ASS-Wirkung entspricht: je negativer die Differenz ist, desto stärker ist die Abnahme des AI nach Zugabe von ASS und damit die zu erwartende Plättchen hemmende Wirkung von ASS. Die Veränderung der ASS-Wirkung vor/nach Resveratrol der einzelnen Probanden ist mit Pfeilen eingezeichnet (grün = stärkere bzw. rot = verminderte ASS-Response nach Resveratrol).



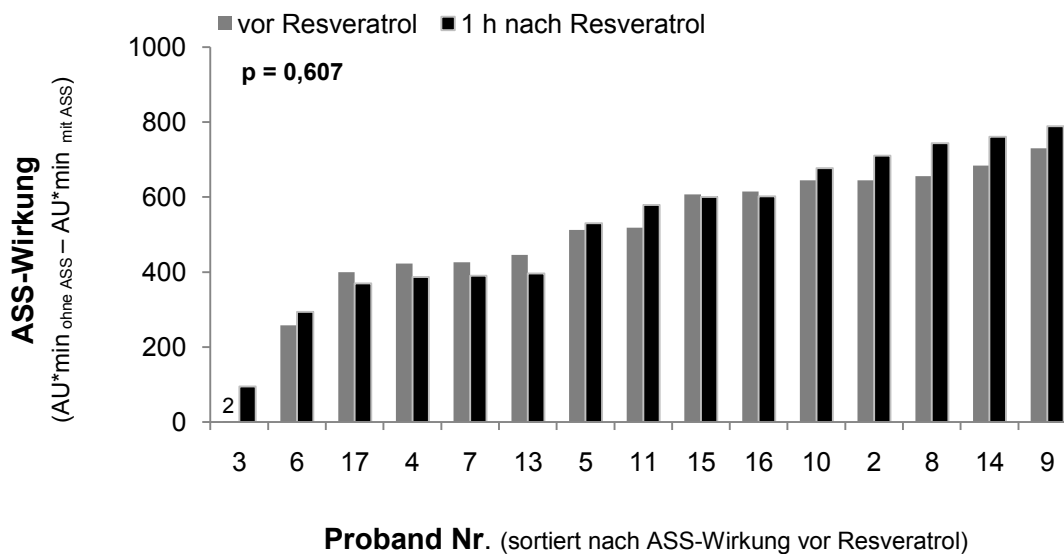
a) **Proband Nr.** (sortiert nach ASS-Wirkung vor Resveratrol)



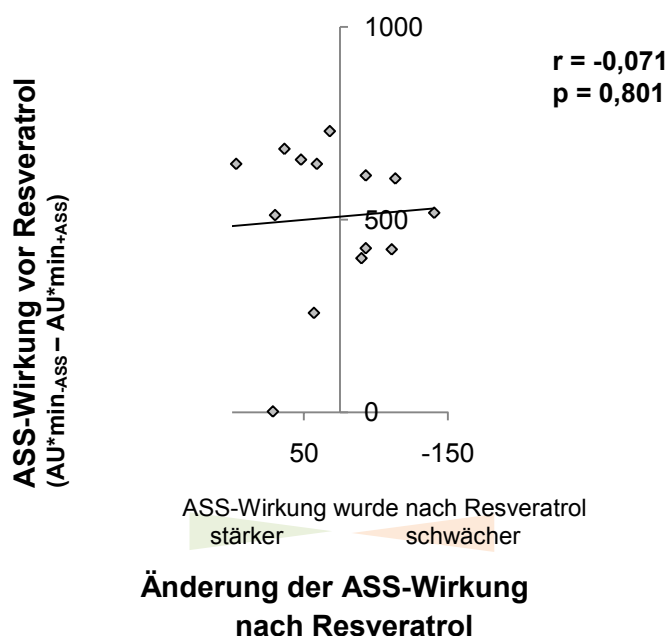
\* p = 0,023

b) **Proband Nr.** (sortiert nach ASS-Wirkung vor Resveratrol)





**Abb. 24: ASS-Wirkung mit dem Multiplate vor und 1 h nach Einnahme von 375 mg Resveratrol bei 15 gesunden Probanden in Hirudinblut.** Die ASS-Wirkung ergibt sich aus der Differenz des Wertes ohne und mit ASS mit der AA-induzierten Impedanzaggregation (AU\*min): je größer die Differenz, desto mehr wurden die Plättchen durch ASS gehemmt. Die ASS-Wirkung hat sich nach Resveratrol nicht signifikant verändert (2-seitiger Vorzeichentest).



**Abb. 25: Abhängigkeit der Veränderung in der ASS-Response 15 gesunder Probanden vor und 1 h nach 375 mg Resveratrol von der ASS-Response ohne Resveratrol mit dem Multiplate.** Die Korrelation ist nicht signifikant (Korrelation nach Pearson).

#### 4.4. Gegenüberstellung der drei Testmethoden

##### 4.4.1. Vergleich der Testmethoden zur Messung der Plättchenaktivität

Um zu prüfen, inwieweit die drei Methoden PADA, Multiplate und Durchflusszytometrie übereinstimmen, wurden die mit dem PADA ermittelten Adhäsionsindizes (AI), die Plättchenaggregation mit dem Multiplate und die P-Selektin-Expression auf ruhenden sowie TRAP-stimulierten Plättchen miteinander verglichen (**Tab. 4-6**). Dabei konnte zwischen der ADP-stimulierten Plättchenaggregation und dem AI in Citrat- ( $p = 0,012$ ), Hirudin- ( $p = 0,032$ ) und Heparinblut ( $p = 0,010$ ) sowie der TRAP-stimulierten P-Selektin-Expression ( $p = 0,016$ ) ein signifikanter Zusammenhang festgestellt werden.

**Tab. 4: Korrelation zwischen dem Adhäsionsindex im PADA und der AA-, Kollagen-, ADP- und TRAP-induzierten Plättchenaggregation mit dem Multiplate bei 15 gesunden Probanden am dritten Versuchstag vor Einnahme von Resveratrol.**

<b>Adhäsionsindex mit dem PADA in Citratblut</b>		
<b>Aggregation mit dem Multiplate</b>	<b>Korrelation nach Pearson</b>	<b>Signifikanz</b>
AA	0,069	0,808
Kollagen	0,192	0,492
ADP	0,588	0,012*
TRAP	0,316	0,251
<b>Adhäsionsindex mit dem PADA in Hirudinblut</b>		
<b>Aggregation mit dem Multiplate</b>	<b>Korrelation nach Pearson</b>	<b>Signifikanz</b>
AA	0,229	0,412
Kollagen	0,104	0,712
ADP	0,554	0,032*
TRAP	0,128	0,649
<b>Adhäsionsindex mit dem PADA in Heparinblut</b>		
<b>Aggregation mit dem Multiplate</b>	<b>Korrelation nach Pearson</b>	<b>Signifikanz</b>
AA	0,371	0,173
Kollagen	0,398	0,141
ADP	0,642	0,010*
TRAP	0,125	0,657

\* Korrelation ist signifikant.

**Tab. 5: Korrelation zwischen der P-Selektin Expression auf ruhenden und TRAP-stimulierten Plättchen und dem Adhäsionsindex mit dem PADA bei 15 gesunden Probanden am dritten Versuchstag vor Einnahme von Resveratrol.**

	P-Selektin-Expression in unstimulierten Plättchen	
Adhäsionsindex mit dem PADA	Korrelation nach Pearson	Signifikanz
Citratblut	0,502	0,057
Hirudinblut	0,410	0,129
Heparinblut	0,222	0,426
	P-Selektin-Expression in TRAP-stimulierten Plättchen	
Adhäsionsindex mit dem PADA	Korrelation nach Pearson	Signifikanz
Citratblut	0,246	0,377
Hirudinblut	0,341	0,213
Heparinblut	0,396	0,144

**Tab. 6: Korrelation zwischen der P-Selektin Expression auf ruhenden und TRAP-stimulierten Plättchen und der AA-, Kollagen-, ADP- und TRAP-induzierten Plättchenaggregation mit dem Multiplate bei**

	P-Selektin-Expression in unstimulierten Plättchen	
Aggregation mit dem Multiplate	Korrelation nach Pearson	Signifikanz
AA	0,272	0,327
Kollagen	0,163	0,560
ADP	0,440	0,101
TRAP	0,214	0,444
	P-Selektin-Expression in TRAP-stimulierten Plättchen	
Aggregation mit dem Multiplate	Korrelation nach Pearson	Signifikanz
AA	0,069	0,806
Kollagen	-0,026	0,927
ADP	0,608	0,016*
TRAP	-0,055	0,846

15 gesunden Probanden am dritten Versuchstag vor Einnahme von Resveratrol.

\* Korrelation ist signifikant.

#### 4.4.2. Vergleich der Testmethoden zur Messung der ASS-Response

Am dritten Versuchstag wurde die ASS-Response vor und nach Resveratrol zusätzlich zum PADA-RASS noch mit Multiplate geprüft. Vergleicht man hier die Anzahl der ASS-Responder und ASS-Nonresponder, ergibt sich, wie in **Tab. 7** und **8** zu sehen, eine schlechte Übereinstimmung: während mit dem PADA-RASS in allen drei Antikoagulanzen ein hoher Anteil der Probanden Nonresponder war, reagierten bei Multiplate vor Resveratrol alle bis auf Proband Nr. 3 als Responder; nach Resveratrol waren alle Responder.

Eine paradoxe Reaktion (PRASA), wie sie im PADA-RASS besonders in Citratblut häufig vorkam, gab es mit Multiplate nicht.

Vor Resveratrol hatte keine einzige Person in allen vier Tests den gleichen Respondertyp.

Nach Resveratrol war nur bei Proband Nr. 4 und 14 das Resultat überall gleich.

Die Ergebnisse mit Multiplate stimmen noch am ehesten mit denen des PADA-RASS in Hirudinblut überein, da es dort im Vergleich zum PADA-RASS in Citrat- und Heparinblut die meisten Responder gab.

**Tab. 7: ASS-Response vor Einnahme von Resveratrol** bei 15 gesunden Probanden

Methode	ASS-Respondertyp			
	PADA-RASS			Multiplate
Antikoagulation	Heparin	Citrat	Hirudin	Hirudin
Endkonzentration von ASS	10 µg/ml	10 µg/ml	10 µg/ml	1 mg/ml
Stimulation der Plättchen	Heparin, Scherstress	Scherstress	Scherstress	AA
Proband Nr.				
2	Responder	Nonresponder	Responder	Responder
3	Nonresponder	Nonresponder	Responder	Nonresponder
4	Responder	PRASA	Nonresponder	Responder
5	PRASA	PRASA	PRASA	Responder
6	Nonresponder	PRASA	Responder	Responder
7	PRASA	PRASA	Responder	Responder
8	Responder	PRASA	Responder	Responder
9	Nonresponder	PRASA	Nonresponder	Responder
10	Nonresponder	Nonresponder	Nonresponder	Responder
11	Nonresponder	Nonresponder	Responder	Responder
13	Nonresponder	PRASA	PRASA	Responder
14	Responder	Responder	Nonresponder	Responder
15	Nonresponder	PRASA	Responder	Responder
16	Nonresponder	PRASA	PRASA	Responder
17	Nonresponder	PRASA	Nonresponder	Responder



Tab. 8: ASS-Response 1 h nach der Einnahme von 375 mg Resveratrol bei 15 gesunden Probanden

Methode	ASS-Respondertyp			
	PADA-RASS			Multiplate
Antikoagulation	Heparin	Citrat	Hirudin	Hirudin
Endkonzentration von ASS	10 µg/ml	10 µg/ml	10 µg/ml	1 mg/ml
Stimulation der Plättchen	Heparin, Scherstress	Scherstress	Scherstress	AA
Proband Nr.				
2	Nonresponder	Nonresponder	Responder	Responder
3	Nonresponder	PRASA	Nonresponder	Responder
4	Responder	Responder	Responder	Responder
5	Responder	PRASA	Responder	Responder
6	Responder	Nonresponder	Responder	Responder
7	PRASA	PRASA	Responder	Responder
8	Responder	Responder	Nonresponder	Responder
9	Nonresponder	Nonresponder	Responder	Responder
10	Nonresponder	Responder	Responder	Responder
11	Nonresponder	Responder	Nonresponder	Responder
13	Nonresponder	PRASA	Nonresponder	Responder
14	Responder	Responder	Responder	Responder
15	Responder	Nonresponder	PRASA	Responder
16	Nonresponder	Responder	Responder	Responder
17	Responder	PRASA	Nonresponder	Responder

## 5. Diskussion

### 5.1. Diskussion der Versuche ohne ASS-Zusatz

#### 5.1.1. Plättchenreaktivität mit dem PADA ohne Resveratrol

Dem PADA als Messmethode liegt der Gedanke zugrunde, dass die Plättchen durch das Schütteln allein noch nicht aktiviert werden. Das Zugeben der Polymerpartikeln verursacht dagegen einen erhöhten Scherstress und bietet den Plättchen geeignete Oberflächen (an die Partikel absorbiertes Fibrinogen), sodass sie je nach Plättchenaktivität an die Partikel adhären.

In **Tab. 9** sind die Mittelwerte des Adhäsionsindex (AI) in Citrat-, Hirudin- und Heparinblut mit Standardabweichung noch einmal übersichtlich gegenüber gestellt.

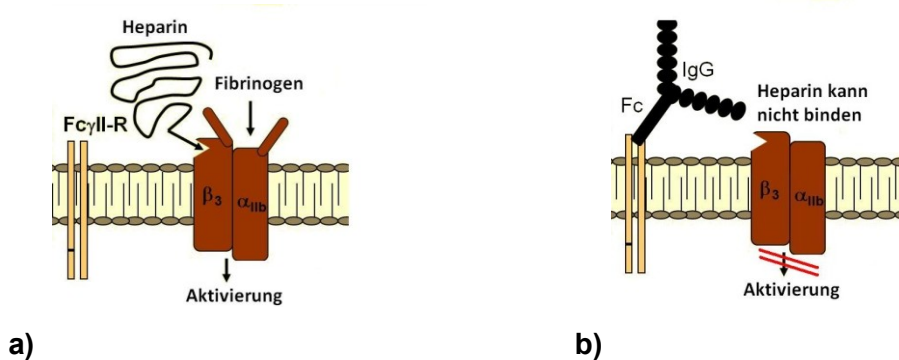
**Tab. 9: Mittelwerte AI  $\pm$  Standardabweichung (n = 15)**

	1. Test	2. Test	3. Test
Citratblut (Referenzbereich: 30-60)	30,1 $\pm$ 9,6	30,7 $\pm$ 18,7	41,7 $\pm$ 18,4
Hirudinblut	39,5 $\pm$ 16,1	40,5 $\pm$ 14,7	54,4 $\pm$ 19,1
Heparinblut	68,6 $\pm$ 27,9	76,9 $\pm$ 16,7	85,6 $\pm$ 9,8

In **Citratblut** war der mittlere AI der 15 Probanden in allen drei Tests sehr niedrig und gerade noch im unteren Referenzbereich, welcher vom Hersteller mit 30-60 angegeben wird. Grund hierfür ist vermutlich, dass es sich nur um junge und gesunde Personen mit geringer Thrombogenität handelt. Der Referenzbereich wurde dagegen anhand von Durchschnittswerten aus der allgemeinen Bevölkerung ermittelt und der AI steigt zudem mit zunehmendem Alter (Nowak et al. 2005, Kaden 2011).

Der PADA wurde zusätzlich noch in **Hirudinblut** gemessen, einem direkten Thrombininhibitor. Die AIs waren hier stets höher als in Citratblut; im zweiten und dritten Test war dieser Unterschied signifikant ( $p = 0,036$  bzw.  $0,017$ ). Im Gegensatz zu Citrat entzieht Hirudin den Plättchen nicht das physiologische  $\text{Ca}^{2+}$ , was wohl die etwas schwächere Plättchenadhäsion in den Citratproben bedingt. Die Werte der jeweiligen Citrat- und Hirudinprobe zeigten eine gute Übereinstimmung und korrelierten im zweiten und dritten Test zudem signifikant miteinander ( $r = 0,555$  bzw.  $0,573$  und  $p = 0,032$  bzw.  $0,026$ ). Demnach wäre Hirudinblut alternativ zu Citratblut für den PADA-Test denkbar.

Der in **Heparinblut** durchgeführte PADA lieferte dagegen extrem hohe AI-Werte ( $p = 0,000$  im Vergleich zu den AI in den Citratproben in allen drei Tests). Dies ist jedoch leicht erklärbar, da Heparin stimulierend auf menschliche Plättchen wirkt, indem es an ihre Fibrinogenrezeptoren binden kann (Heparin induzierte Thrombozytopenie vom Typ I, HIT-I). Der AI in Heparinblut liegt also normalerweise immer deutlich höher als in Citratblut. Bei vereinzelt Werten in dieser Studie war dies allerdings nicht der Fall, offensichtlich war Heparin an diesem Tag nicht in der Lage die Plättchen des jeweiligen Probanden zu aktivieren. Man vermutet eine Beteiligung von zirkulierenden Antikörpern, welche an die Membranoberfläche der Plättchen binden können und dadurch Heparin den Zugang zum Rezeptor verwehren:



**Abb. 26 a-b: Bindung von Heparin und Antikörpern auf der Plättchenmembran**

Heparin dockt an die  $\beta_{III}$ -Untereinheit des zu zigtausenden auf der Membran jedes einzelnen Plättchens vorkommenden Fibrinogenrezeptors und teilaktiviert diesen. Bei genügend teilaktivierten Rezeptoren wird dieser schließlich scharf geschaltet und kann nun mit Fibrinogen reagieren – das Plättchen wird aktiviert (**Abb. 26 a**). Kommt es vorher zur Bindung von Antikörpern (meist IgG) mit ihrem Fc-Fragment an spezifische Fc-Rezeptoren (für IgG sind das die  $Fc_{\gamma}$ ), behindert das die Interaktion zwischen Heparin und dem Integrin  $\beta_{III}$  (**Abb. 26 b**, modifiziert nach Nowak 2009 a).

Aus dieser Überlegung heraus entstand die Idee des Herstellers den PADA zur Diagnose einer HIT-II zu verwenden, indem der AI in Heparin- mit dem in Citratblut verglichen wird. Die HIT-II ist im Gegensatz zur HIT-I eine schwerwiegende Komplikation nach Gabe von Heparin, wo es zu Heparin-PF4-Antikörper-Komplexen kommt, die an den Rezeptoren der Plättchen binden und eine direkte Aktivierung durch Heparin verhindern: der AI in Heparinblut bleibt dann kleiner oder gleich dem in Citratblut. Die Prävalenz der „HIT-positiven“ Befunde in der vorliegenden Arbeit lag entsprechend den Ergebnissen anderer Studien bei immerhin ca. 10 % (Nowak 2009 a, Kaden 2011). Kein einziger dieser Probanden hatte jemals zuvor Heparin erhalten, weswegen es sich hier wohl um Antikörper anderer Genese handeln muss. Bakterielle Infektionen und Entzündungen, aber auch operative Eingriffe können zur Bildung von relativ unspezifischen Anti-Heparin-PF4-

Antikörpern anregen, ohne dass zuvor Kontakt zu Heparin bestand (Krauel et al. 2011, Greinacher et al. 2011, Warkentin et al. 2000). So kommt es z.B. bei Entzündungen zum Ablösen von Heparansulfat-Molekülen aus der Glykokalyx des Endothels, welche anstelle von Heparin zu solch einer „endogenen HIT II“ führen könnten (Mulivor und Lipowsky 2004, Nowak pers. Mitteilung). Prinzipiell können also auch andere, autoimmun- oder infektbedingte Antikörper die Rezeptoren besetzen und zu einem Absinken des AI in Heparinblut führen. Proband Nr. 10 gestand im Nachhinein etwa eine Woche vor dem ersten Versuchstag eine schwere Erkältung durchgemacht zu haben: sowohl am ersten als auch noch am zweiten Versuchstag war sein AI in Heparinblut annähernd so niedrig wie der in Citratblut. Am dritten Versuchstag war sein AI in Heparinblut dagegen wieder deutlich höher.

Trotz einem standardisierten Vorgehen während der gesamten Studie gab es bei allen Probanden von Tag zu Tag Schwankungen im AI und das unabhängig vom Antikoagulationsmittel. Beim PADA werden nahezu alle Arbeitsschritte manuell durchgeführt, was ihn fehleranfälliger macht als vollautomatisierte Methoden. Möglicherweise ist die Plättchenaktivität aber tatsächlich von Tag zu Tag unterschiedlich. Neben den oben genannten Antikörpern können z. B. auch psychische oder körperliche Belastung die Plättchenaktivität beeinflussen (Levine et al. 1985, Schmidt 2009). Eine einmalige Messung würde damit nur den momentanen Zustand reflektieren und wiederholte Messungen für ein aussagekräftiges Ergebnis nötig machen. Deswegen entschied man sich auch für die nachfolgenden Tests zum Vergleich vor/nach Resveratrol immer nur die Ausgangswerte vom gleichen Versuchstag zu verwenden.

### **5.1.2. Einfluss von Resveratrol auf die mit dem PADA gemessene Plättchenreaktivität**

Es zeigte sich mit dem PADA in Citrat- und Hirudinblut, dass die Plättchenadhäsion umso mehr nach Resveratrol abnahm, je höher sie vor Resveratrol gewesen ist und umgekehrt. Dieser Zusammenhang war in Hirudinblut statistisch signifikant ( $r = 0,629$  und  $p = 0,012$ ), in Citratblut verfehlte er knapp das Signifikanzniveau ( $r = 0,485$  und  $p = 0,065$ ). Im Durchschnitt allerdings konnte weder in den Citrat- noch in den Hirudin- oder Heparinproben eine signifikante Wirkung von Resveratrol auf die Plättchenaggregation festgestellt werden.

Der Einsatz von Vollblut spielt mit Sicherheit eine Rolle, dass Resveratrol keinen deutlichen Effekt auf den AI hatte. Interaktionen der Plättchen mit anderen Blutbestandteilen können hier die Wirkung abschwächen oder kaschieren (Kirk et al. 2000).

Möglicherweise war auch die in dieser Studie eingesetzte Dosis von 1 x 375 mg zu gering. Beim Erwachsenen sind 500 mg Resveratrol p. o. (ca. 7 mg/kg KG) nötig, um etwa 70 µg/l freies Resveratrol im Plasma zu erhalten (Boocock et al. 2007), was zumindest bei einer Zugabe von Resveratrol *in vitro* für eine Hemmung der Plättchen völlig ausreicht (Wang et al. 2002, Shen et al. 2007, Crescente et al. 2009). Bei *in vitro*-Versuchen spielt eine individuelle Bioverfügbarkeit allerdings keine Rolle. Es könnte daher sein, dass in dieser Studie nur subeffektive Konzentrationen im Blut einiger Probanden erreicht wurden. Die Studienteilnehmer nahmen durchschnittlich 4-6 mg/kg KG Resveratrol zu sich. *In vivo*-Tierversuche bestätigen zwar die Wirksamkeit solch niedriger Dosen, doch wurde hier Resveratrol nicht nur einmal sondern über mehrere Wochen oral verabreicht (Dudley et al. 2008, Lekli et al. 2008, Wang et al. 2002). Ähnlich unserem Vorgehen (einmalige Einnahme von Resveratrol und 1 h später Blutentnahme) waren in Mäusen 400 mg Resveratrol/kg KG nötig, um ähnlich effizient wie eine Einmaldosis von 7,5 mg ASS/kg KG die Serum-TXB<sub>2</sub>-Synthese zu reduzieren (Crescente et al. 2009). Die tägliche Standard-Dosis für ASS zur Thromboseprophylaxe beim Menschen beträgt aber nur ca. 1-3 mg/kg KG, d.h. möglicherweise wäre bei regelmäßiger Einnahme auch bei Resveratrol eine geringere Dosierung ausreichend, um einen wirksamen Effekt zu erzielen. *In vitro* ließ sich zumindest erst bei einer über mehrere Tage andauernden Zugabe von Resveratrol die NO-Produktion in Endothelzellen zunehmend steigern, was für eine akkumulierende Wirkung des Polyphenols spricht (Takahashi und Nakashima 2011). Andere Autoren führen diesen Effekt auf die eNOS jedoch schlichtweg auf eine schleichende Intoxikation der Zellen mit Resveratrol zurück (Nakata et al. 2012). In niedrigen Konzentrationen (~ nM) wirkt Resveratrol aktivierend, in höheren (100 µM) dagegen hemmend auf eNOS (Kyungmin et al. 2006). Wie viel Resveratrol will man folglich einer Zelle überhaupt zumuten und welchen Zweck will man erreichen? Seine Fähigkeit in diversen Zelltypen auch Apoptose zu induzieren, ist hinreichend erwiesen und aktueller Gegenstand der Krebsforschung (Aluyen et al. 2012, Clément et al. 1998). Um bei gesunden menschlichen Plättchen eine Apoptose auszulösen reichen *in vitro* offenbar schon 5 µM aus (Lin et al. 2009), 10 µM fördern dagegen die Neubildung von Endothelzellen (Cziszar et al. 2009). Auch wenn also der Effekt von Resveratrol im Rahmen dieser Arbeit auf die mit dem PADA gemessene Plättchenaktivität nicht signifikant war, könnte es bei der hier verwendeten Dosierung dennoch zu diversen Effekten gekommen sein, die sich möglicherweise erst auf längere Sicht bemerkbar machen.

Die Auswahl des Probandenkollektivs spielt sicherlich auch eine Rolle, denn es handelte sich um gesunde Personen mit geringem Thromboserisiko. Möglicherweise kann Resveratrol diese ohnehin schwache Thrombogenität nicht viel weiter senken, da etliche seiner postulierten Wirkungen Prozesse betreffen, welche erst im krankhaften Zustand in solchem

Maße aktiviert sind, dass ihre Hemmung zu sichtbaren Veränderungen führt. Es wäre folglich interessant die gleiche Studie noch einmal mit kardiovaskulären Patienten verschiedenen Alters durchzuführen. Logischerweise werden prophylaktische Effekte von Resveratrol, z. B. eine langsamer voranschreitende Atherosklerose, mit der einmaligen Verabreichung ebenfalls nicht sichtbar. Weitere Versuche mit dem PADA wären daher wünschenswert, wo Resveratrol über längere Zeit verabreicht wird.

Nicht zuletzt wird Resveratrol u. a. eine hemmende Wirkung auf die COX-1 zugesprochen, welche bekanntlich wenig sensibel für Scherstress ist (Höchtel et al. 2009). An gesunden Probanden konnte gezeigt werden, dass sich die Einnahme von ASS nur marginal auf den AI im PADA niederschlägt (Nowak et al. 2005). Ähnlich könnte es also auch bei Resveratrol der Fall sein.

### **5.1.3. Einfluss von Resveratrol auf die P-Selektin-Expression in Plättchen**

Mit der Durchflusszytometrie zeigte sich interessanterweise nach Resveratrol eine signifikante Abnahme der P-Selektin-Expression auf den ruhenden Plättchen ( $p = 0,013$ ), welche umso stärker ausfiel, je höher die Ruheaktivität der Plättchen vor Resveratrol gewesen ist. Dieser Zusammenhang ist signifikant ( $r = 0,721$  und  $p = 0,002$ ). In den TRAP-stimulierten Plättchen war dagegen kein Unterschied der P-Selektin-Expression nach Resveratrol festzustellen ( $p = 0,607$ ). Ähnlich verhielt es sich in einer *in vivo*-Studie zu ASS: gesunde Probanden nahmen ASS über einen längeren Zeitraum ein. Anschließend wurde auf ruhenden sowie TRAP-stimulierten Plättchen die P-Selektin-Expression gemessen (TRAP-Konzentration =  $8 \mu\text{M}$ ), wobei es nur bei den ruhenden Plättchen zu einer signifikanten Abnahme von P-Selektin kam (Lukasik et al. 2011).

Dass in der vorliegenden Arbeit die TRAP-stimulierten Plättchen nach Resveratrol keine Veränderung zeigten, hat möglicherweise mit der nur einmaligen Einnahme und/oder zu geringen Dosierung von Resveratrol zu tun. Entscheidend war allerdings wohl eher, dass die hier verwendete TRAP-Konzentration mit  $192 \mu\text{M}$  extrem hoch war und im Grunde nur validiert ist, um Patienten auf aktivierbare Plättchen hin zu prüfen (zum Vergleich: bei Multiplate betrug die TRAP-Konzentration  $32 \mu\text{M}$ ). Demnach ist hier mit großer Wahrscheinlichkeit aufgrund der massiven Aktivierung durch TRAP der Effekt von Resveratrol komplett verloren gegangen. Möglicherweise ist auch TRAP für Versuche mit Resveratrol nicht optimal: *in vitro* erwiesen sich bereits  $0,15 \mu\text{M}$  Resveratrol als effektiv, die Kollagen-induzierte P-Selektin-Expression in Plättchen zu hemmen (Shen et al. 2007), in einer weiteren Arbeit mit AA als Aktivator waren es  $6,25 \mu\text{M}$  Resveratrol (Yang et al. 2008).

Vieles deutet darauf hin, dass Resveratrol in die interzelluläre Kommunikation eingreifen und damit z. B. die adhäsiven Eigenschaften von Endothelzellen, Plättchen und Leukozyten beeinflussen kann (Gresele et al. 2011), z.B. via Molekülen wie dem P-Selektin. Mittels geringerer TRAP-Konzentrationen bzw. alternativer Agonisten wäre es daher in weiterführenden Messungen interessant zu prüfen, inwieweit der Effekt von Resveratrol in der vorliegenden Studie tatsächlich zu gering war oder aber nur von zu starken Aktivierungsmechanismen überlagert wurde. Auch wären Tests an Patienten statt gesunden Probanden wünschenswert, um das Potential von Resveratrol im Vergleich zu ASS zu untersuchen. Denn in der oben genannten Studie von Lukasik et al. wurde nicht nur Gesunden ASS gegeben, um anschließend die P-Selektin-Expression zu messen, sondern auch Patienten mit einem Myokardinfarkt: während sich hier P-Selektin auf ruhenden Plättchen bei Gesunden reduzieren ließ, war bei den Patienten durch ASS keine Veränderung mehr festzustellen (Lukasik et al. 2011). Der prothrombotische Zustand bei den Patienten könnte hier die Wirkung von ASS abgeschwächt haben. Es wäre demnach hochinteressant zu erforschen, wie Resveratrol auf die ASS-Wirkung bei kardiovaskulären Patienten Einfluss nehmen könnte.

#### **5.1.4. Einfluss von Resveratrol auf die mit dem Multiplate gemessene Plättchenreaktivität**

Im Gegensatz zur Durchflusszytometrie, wo einzelne Moleküle auf isolierten Plättchen untersucht werden, misst das Multiplate-System die Plättchenaggregation in Vollblut. Der Unterschied zum PADA ist dagegen, dass bei Multiplate noch künstlich verschiedene Aktivatoren zugegeben werden. In der vorliegenden Arbeit wurden jeweils AA, Kollagen, TRAP und ADP als Aktivator verwendet. Das Ausmaß der Aggregation wird als AUC (area under the curve) mit der Einheit AU\*min angegeben. Die mittlere AUC war mit TRAP am höchsten ( $736,1 \pm 149,8$  AU\*min), gefolgt von AA ( $586,8 \pm 192,5$  AU\*min) und Kollagen ( $545,3 \pm 172,7$  AU\*min). ADP hatte den schwächsten aktivierenden Effekt auf die Plättchen (mittlere AUC =  $286,2 \pm 104,3$  AU\*min). Diese Mittelwerte sind sehr niedrig und liegen teilweise schon unterhalb der Referenzbereiche, welche vom Hersteller folgendermaßen eingegrenzt werden: TRAP = 834-1412 AU\*min, AA = 691-1294 AU\*min, Kollagen = 459-1166 AU\*min und ADP = 474-1076 AU\*min. Ähnlich wie die niedrigen AI-Werte beim PADA wird dies durch das junge und gesunde Probandenkollektiv bedingt sein.

Resveratrol hatte bei keinem der verwendeten Aktivatoren einen Effekt auf die Plättchenaggregation. Eventuell liegt das an einer zu geringen Dosierung bzw. nur einmaligen Einnahme von Resveratrol. Die Verwendung von Vollblut spielt sicherlich eine sehr große

Rolle, da diverse Interaktionen der Plättchen mit anderen Blutbestandteilen den eigentlichen Effekt kaschieren können. Wohl war zudem die Stimulation der Plättchen durch die hier verwendeten Agonisten zu massiv. Gerade der Test mit TRAP wird vom Hersteller als eine Methode beschrieben, wo durch die starke Plättchenaktivierung sogar der Einfluss von ASS auf das Ergebnis verhindert werden soll. Folglich scheint die Multiplate-Methode mit den vorgegebenen Aktivator-Konzentrationen nicht geeignet zu sein, um einen Effekt von Resveratrol messen zu können. Zwar war mit ADP die Plättchenaktivierung noch am geringsten, doch blieb auch hier Resveratrol ohne Wirkung. Wie beim PADA bereits diskutiert, wird für Resveratrol u.a. eine Hemmung der Plättchen via COX-1 vermutet (Calamini et al. 2010). Da ADP aber unabhängig ist von der COX-vermittelten Plättchenaktivierung, wäre es als Agonist für Versuche mit Resveratrol entsprechend ungeeignet.

### 5.1.5. Gegenüberstellung der drei Testmethoden

Die Werte des PADA in Citrat-, Hirudin- und Heparinblut korrelieren interessanterweise signifikant mit dem ADP-Test von Multiplate (Citrat:  $p = 0,012$ ; Hirudin:  $p = 0,032$ ; Heparin:  $p = 0,010$ ), nicht jedoch mit den Multiplate-Tests mit TRAP, Kollagen und AA. Grund hierfür ist möglicherweise, dass die Aktivierungsmechanismen beim PADA und dem ADP-Test von Multiplate ähnlich sind: beim PADA werden die Plättchen ausschließlich durch Schütteln, d. h. durch Scherstress stimuliert. Unter Scherstress aber läuft die Plättchenaktivierung hauptsächlich ADP-vermittelt ab. AA und Kollagen sind dagegen mit dem COX/TXA<sub>2</sub>-Weg verbunden und TRAP aktiviert die Plättchen durch Bindung an ihre Thrombinrezeptoren.

Andererseits wurde auch ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem ADP-Test von Multiplate und der P-Selektin-Expression auf TRAP-stimulierten Plättchen bei der Durchflusszytometrie gefunden ( $p = 0,016$ ), obwohl es sich hier um zwei völlig verschiedene Methoden bzw. Aktivatoren handelt. Für diese Beobachtung konnte keine plausible Erklärung gefunden werden.

Die Feststellung, dass Resveratrol die Plättchenaktivität umso mehr reduzierte, je höher sie zuvor war und umgekehrt, ließ sich sowohl mit dem PADA in Citrat- und Hirudinblut als auch mit der Durchflusszytometrie bei nicht stimulierten Plättchen feststellen. Keinen Zusammenhang gab es dagegen bei dem PADA in Heparinblut, den TRAP-stimulierten Plättchen mit der Durchflusszytometrie sowie bei sämtlichen Tests mit dem Multiplate. Bei der TRAP-aktivierten Durchflusszytometrie und dem Multiplate sind es vermutlich die hohen Aktivator-Zusätze, welche den Effekt von Resveratrol überlagert haben könnten. Gleiches war wohl auch bei der Verwendung von Heparinblut für den PADA der Grund: aufgrund der Plättchen aktivierenden Eigenschaften von Heparin ließ sich hier der Einfluss von



Resveratrol womöglich nicht mehr feststellen. Interessant ist, dass sich in der vorliegenden Arbeit für ASS eine ähnliche Korrelation ergab: betrachtet man die Ergebnisse in den Multiplate-Tests mit AA als Aktivator mit und ohne Zusatz von ASS, so ergibt sich auch hier ein starker linearer Zusammenhang, d. h. je höher die Plättchenaggregation ohne ASS war, desto mehr ist sie in Anwesenheit von ASS gesunken und umgekehrt (**Abb. 28** im Anhang). Eine Abhängigkeit der Wirkung von Resveratrol vom Ausgangszustand wird in der Literatur in einer weiteren Studie beschrieben: *in vitro* wurden Plättchen mit Resveratrol inkubiert und anschließend mit Thrombin aktiviert. Dabei wurde der durch die Aktivierung ausgelöste  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom in die Plättchen gemessen. Resveratrol hemmte den Einstrom umso effektiver, je höher die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration außerhalb der Plättchen war, d. h. je mehr  $\text{Ca}^{2+}$  nach innen strömen konnte (Dobrydneva et al. 1999). Demzufolge könnte es sein, dass z. B. ein hoher AI durch Resveratrol mehr gesenkt wird als ein niedriger, weil durch die hier höhere Plättchenaktivität die Wirkung von Resveratrol deutlicher zu tragen kommt. Solch eine Korrelation könnte ganz trivial gesehen auch nur rein stochastisch bedingt sein: misst man eine Person mit einem Test viele male hintereinander, werden die Ergebnisse selbst bei stets gleichen Bedingungen in einem gewissen Maße streuen. Daneben gibt es zudem noch sogenannte „Ausreißer“, also Werte, die besonders hoch bzw. niedrig sind und damit auch am meisten vom Mittelwert abweichen. Angenommen man hat nur zwei Werte zum Vergleich und der erste davon ist ausgerechnet ein besonders niedrigen („Ausreißer“-) Wert, so ist die Wahrscheinlichkeit entsprechend hoch, dass der zweite Wert wieder in der Nähe des Mittelwertes und damit höher ausfallen wird und nicht noch niedriger. Möchte man das ausschließen, könnte man diesen Test z. B. mit einer Kontrollgruppe wiederholen, welche statt Resveratrol nur ein Placebo erhält.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass es bei Studien mit Resveratrol für die Ergebnisse sehr bedeutend ist, welcher Methode man sich bedient. Da ein Effekt durch hohe Zusätze von Plättchenaktivatoren überlagert werden könnte, scheinen die Durchflusszytometrie ohne TRAP-Aktivierung und der PADA noch am ehesten dafür geeignet zu sein.

## 5.2. Diskussion der Versuche mit ASS

### 5.2.1. ASS-Response mit dem PADA-RASS ohne Resveratrol

Der PADA-RASS basiert auf der Tatsache, dass in heparin-antikoaguliertem Blut die Plättchen durch das Heparin selbst aktiviert werden (siehe auch 5.2.1.1.). Dadurch ist kein zusätzlicher Aktivator mehr nötig, sondern es werden lediglich zwei Proben mit heparinisiertem Vollblut unter geringen Scherkräften geschüttelt, wobei zu einer Probe noch ASS zugegeben wird und zur anderen nur Puffer. Durch Zählen der noch nicht aggregierten Plättchen am Blutzellautomaten kann ein Adhäsionsindex (AI) ermittelt werden, der ausdrückt wie viel Prozent der Plättchen aktiviert worden sind. Lässt sich mit ASS der AI im Vergleich zu ohne ASS reduzieren, ist die Testperson ASS-Responder. Bleibt der AI gleich, spricht man von einem ASS-Nonresponder. Beim PADA-RASS gibt es außerdem den Sonderfall, dass die Plättchenaktivierung in der Probe mit ASS sogar höher ist als in der ohne ASS. Der Hersteller bezeichnet solch ein Ergebnis als eine PRASA (paradoxe Reaktion auf ASS).

In diesem Studienteil wurde an drei verschiedenen Versuchstagen mit dem PADA-RASS die ASS-Response von insgesamt 15 Probanden gemessen. Nicht einmal ein Drittel davon war für ASS sensibel: im 1. Test waren es drei ASS-Responder, im 2. Test fünf und im 3. Test vier ( $n = 3/5/4$ ). Es ergab sich dagegen ein hoher Anteil an Nonrespondern ( $n = 4/4/9$ ) und Probanden mit einer PRASA ( $n = 8/6/2$ ). Diese Prävalenzen decken sich mit zwei weiteren Arbeiten, welche mit dem PADA-RASS an einem großen Studienkollektiv durchgeführt worden sind (Kaden 2011, Hentrich 2011). Gründe für eine „ASS-Resistenz“ allgemein wurden bereits unter 1.2.6. beschrieben. Über eine paradoxe ASS-Wirkung findet sich dagegen wenig Literatur (Mueller et al. 1997, Taylor et al. 1999). Überhaupt wurde bislang für keinen anderen Plättchenfunktionstest dieses Phänomen so intensiv thematisiert wie für den PADA-RASS, denn nirgends sonst ergibt sich innerhalb der gesunden Bevölkerung eine Häufigkeit von knapp 40 % für eine PRASA. Bei kardiovaskulären Patienten und Dialysepatienten steigt die Prävalenz sogar auf fast 60 % an (Kaden 2011, Hentrich 2011). Die genauen Ursachen für diese Reaktion der Plättchen sind noch unklar, die klinische Relevanz wäre allerdings beträchtlich. Denn inzwischen gilt es als erwiesen, dass eine ASS-Nonresponse mit einem deutlich höheren Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse assoziiert ist (Zimmermann und Hohlfeld 2008, Mueller et al. 1997). Die Messung der individuellen ASS-Response vorab einer Therapie mit Plättchenhemmern sowie ein fortlaufendes Monitoring wäre daher - wie z. B. für Vitamin-K-Antagonisten schon lange üblich - sinnvoll für die Auswahl und Anpassung der Medikation (Kaden 2011). Die Diagnostik der ASS-Response ist allerdings nach wie vor ein heikles Thema und nicht selten kommen Studien zu widersprüchlichen Ergebnissen, da ganz unterschiedliche Messmethoden angewendet

wurden. Jedes Labor variiert zudem in der Testdurchführung und sucht sich seine eigenen Cutt-off-Werte (Zimmermann und Hohlfeld 2008). Der PADA-RASS ist einer der wenigen Tests mit Vollblut, was einerseits einen physiologischen Plättchen-Cross-talk mit Leukozyten und Erythrozyten erlaubt und möglicherweise dadurch den relativ hohen Anteil an Nonrespondern im Vergleich zu anderen Testmethoden erklärt. So ist z. B. der Kontakt zu Leukozyten weitgehend unabhängig von Syntheseprodukten der COX-1 (sprich unabhängig von ASS) und allein Scherstress als Aktivator reicht aus, um aus Erythrozyten die Freisetzung von ADP zu bewirken (Rinder et al. 1993, Moritz et al. 1983). Andererseits kann gerade Vollblut dadurch zu weniger stabilen Messwerten führen (Lordkipanidze et al. 2007). In der Tat variierte im PADA-RASS oft der individuelle Respondertyp an den verschiedenen Versuchstagen, was auf den ersten Blick als eine ungenaue Reproduzierbarkeit gewertet werden könnte (z. B. aufgrund eben der Verwendung von Vollblut und der vielen manuellen Arbeitsschritte). Oder aber die „ASS-Resistenz“ bzw. PRASA ist tatsächlich nur ein transienter Zustand, so wie bekanntlich die Plättchen bereits innerhalb eines Tages unterschiedlich reaktiv sein können. In etlichen anderen Studien konnte man ebenso einen Wechsel zwischen den Respondertypen beobachten, wenn sich der Gesundheitszustand änderte, z. B. nach einem operativen Eingriff (Börgermann 2010 et al., Mueller et al. 1997, Zimmermann et al. 2003).

Da es innerhalb aller PADA-RASS-Messungen bei allen Probanden mindestens einmal zu einer PRASA kam, soll im Folgenden auf die möglichen Ursachen dieser besonderen Reaktion eingegangen werden.

### **5.2.1.1. Mögliche Ursachen einer PRASA**

#### **5.2.1.1.1. Antikoagulation mit Heparin**

Da der PADA-RASS mit Heparin durchgeführt wird, liegt natürlich die Vermutung nahe, dass es möglicherweise durch die direkte Bindung von Heparin an die Plättchen zu einer unkontrollierten Aktivierung kommen könnte. In einer anderen Studie mit dem PFA-100 als Messmethode wurde einmal Heparin- statt Citratblut verwendet. Es ließ sich dann auch hier in den Proben mit ASS eine schnellere Aggregation feststellen im Vergleich zu ohne ASS (Kaden 2011). In der vorliegenden Arbeit wurde der PADA-RASS daher zum ersten Mal mit Heparin-, Citrat- und Hirudinblut gleichzeitig durchgeführt. Bei nur einem Probanden war das Ergebnis in allen drei Blutproben immer identisch. Bei allen anderen kam es mindestens einmal zu Abweichungen innerhalb der drei Blutproben. Den Tests mit Citrat- und Hirudinblut ist gemeinsam, dass hier ausschließlich der Scherstress des Schüttelns aktivierend auf die Blutplättchen wirkt. Allerdings stimmten die Ergebnisse zwischen Citrat und Hirudin auch nicht besser überein als der Vergleich Heparin/Citrat und Heparin/Hirudin. Zudem ließen sich

auch in den Citrat- und Hirudinblutproben paradoxe Reaktionen feststellen; am häufigsten kam eine PRASA überraschenderweise sogar in Citratblut vor. Anhand dieser Ergebnisse lässt sich die Interaktion der Plättchen mit Heparin als Grund für eine PRASA ausschließen.

#### 5.2.1.1.2. ASS als Plättchenaktivator

**Tab. 11** im Anhang zeigt die Anzahl noch freier, also noch nicht adhärierter Plättchen in den Kontrollproben mit und ohne ASS. Die Kontrollproben sind diejenigen Proben, wo nur Puffer statt Partikel zugegeben wurde, d. h. das Blut wurde erst entweder mit Puffer oder ASS versetzt und 10 min geschüttelt. Dann wurde beiden Proben Puffer zugegeben und nochmal 5 min geschüttelt. Außer Scherstress wirkte also nichts aktivierend auf die Plättchen. Vergleicht man nun die Plättchenzahlen zwischen den Proben mit und ohne ASS miteinander, so kam es bei manchen Probanden zu Abweichungen. Besonders häufig war das bei Heparinblut der Fall. Meist war der Proband in diesen Tests ASS-Nonresponder oder zeigte eine PRASA.

Unabhängig vom Antikoagulationsmittel traten diese Abweichungen bei bestimmten Probanden gehäuft auf und verfälschen möglicherweise nicht einmal das Ergebnis des PADA-RASS. Denn die ASS-Response war nahezu immer mit mindestens einem der beiden anderen Blutproben identisch, was auf eher probanden- statt methodenspezifische Ursachen schließen könnte.

Interessanterweise war ganz überwiegend und gerade bei den stärkeren Abweichungen die Plättchenzahl **mit** ASS niedriger als ohne ASS, d. h. möglicherweise kam es durch die *in vitro*-Zugabe von ASS zu spontanen Aggregationen. Die folglich aufkommende Frage, ob die Plättchen mancher Personen durch ASS sogar aktiviert werden könnten, ist zwar noch völlig offen, sie würde jedoch diesen unerwarteten Effekt von ASS im PADA-RASS erklären.

Möglicherweise ist der PADA-RASS der erste Test, anhand dessen diese - noch rein spekulative - Wirkung von ASS überhaupt nachgewiesen wurde. Es ist nicht zu erwarten, dass der Säurecharakter von ASS hierbei eine entscheidende Rolle spielt, denn die Häufigkeit einer PRASA war in einer anderen Studie unabhängig von der verwendeten ASS-Konzentration (Kaden 2011). Zudem wurde die ASS in der vorliegenden Arbeit noch um ein Vielfaches mehr mit Puffer verdünnt als in der genannten Studie von Kaden.

Wie bereits erwähnt wird bei Patienten deutlich häufiger eine PRASA festgestellt als bei Gesunden. Ebenso ist allgemein bekannt, dass bei Patienten mit kardiovaskulären Risikofaktoren die Häufigkeit einer „ASS-Resistenz“ steigt. Vermutlich spielen daher für eine PRASA ähnliche strukturelle Veränderungen in Endothel und Plättchen eine Rolle wie bei einer Nonresponse. Besonders relevant für das Wirken von ASS ist dabei der Arachidonsäure-Metabolismus, weshalb neben COX-1 auch noch andere Mechanismen

diskutiert werden. Manche Autoren schreiben von einer möglichen Beteiligung der COX-2 an der Entwicklung einer „ASS-Resistenz“. COX-2 ist gegenüber ASS wesentlich unempfindlicher als COX-1 (Maede et al. 1993). Das Enzym kommt im gesunden Endothel konstitutiv nur in geringen Mengen vor und wird hier für den Großteil der Prostacyclin-Synthese verantwortlich gemacht (McAdam et al. 1999). Ihre Expression wird bei Entzündung hochreguliert und ist daher in atherosklerotischen Plaques deutlich erhöht (Belton et al. 2000, Baker et al. 1999, Simmons et al. 2004). Entzündlich veränderte Endothelzellen verlieren allerdings zunehmend ihre Plättchen hemmenden Eigenschaften, woraus hyperreaktive Plättchen resultieren (Gawaz 2005, Dixon et al. 2006), die möglicherweise nicht mehr genügend auf ASS ansprechen. COX-2 im entzündeten Endothel wird auch als eine alternativer Ort für die TXA<sub>2</sub>-Synthese außerhalb von Plättchen diskutiert (Cipollone et al. 2000). Damit wäre eine Plättchenaktivierung über TXA<sub>2</sub> möglich, obwohl ASS die TXA<sub>2</sub>-Synthese in den Plättchen erfolgreich blockiert. Es scheint zudem denkbar, dass die Plättchen Vorstufen von TXA<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>) aus Endothelzellen beziehen und mit ihrer von ASS unberührten Peroxidase der COX-1 selbst wieder zu TXA<sub>2</sub> weiter synthetisieren können (Karim et al. 1996). Erste atherosklerotische Plaques können schon bei jungen Menschen gefunden werden (McGill et al. 2000). In der vorliegenden Studie scheint es allerdings unwahrscheinlich, dass eine entzündlich bedingte Induktion von COX-2 im Endothel der Probanden aufgrund von Atherosklerose ursächlich ist für die hohe Zahl an ASS-Nonrespondern bzw. paradoxen Reaktionen auf ASS. Da beim PADA-RASS außerdem ASS *in vitro* zugegeben wurde, scheidet die Interaktion von ASS mit dem Endothel als Ursache für eine PRASA im Grunde aus. Doch auch junge Blutplättchen verfügen noch über eine COX-2, welche allerdings wegen dem fehlenden Zellkern nicht nachsynthetisiert werden kann und daher mit der Zeit verloren geht (Weber et al. 1999 und 2002 a, Schrör 2009). Eine gesteigerte Thrombozytose oder die Induktion von COX-2 in Megakaryozyten führt dementsprechend zu einem größeren Anteil von COX-2 in Plättchen, sodass diese trotz einer vollständigen COX-1-Blockade durch ASS noch zur TXA<sub>2</sub>-Synthese imstande wären (Guthikonda et al. 2007, Mitchell und Warner 2006, Rocca et al. 2002, Zimmermann et al. 2003). Prinzipiell könnte auch jede andere Form von Entzündung als Stimulus für eine COX-2-Induktion in Megakaryozyten dienen, von banalen Impfungen (Bierend 2008) bis hin zu chronischen Darmentzündungen und Autoimmunerkrankungen (Nowak pers. Mitteilung). Folglich wäre es also möglich, dass auch bei gesunden Probanden wie in dieser Studie ein erhöhter COX-2-Besatz in Plättchen als Ursache einer PRASA (oder auch nur Nonresponse) in Frage kommt. Die Erklärung dazu liefert eine andere Dissertation zum Thema „ASS-Resistenz“, die den Effekt des selektiven COX-2-Inhibitors Celecoxib bei Patienten mit Angina pectoris unter ASS-Therapie untersuchte (Bierend 2008). Bei allen Patienten war die TXA<sub>2</sub>-Synthese effektiv durch ASS unterdrückt, auch bei ASS-Nonrespondern. Das

bedeutet, dass weder COX-1 noch COX-2 TXA<sub>2</sub> produzieren. Die Autorin stellte fest, dass sich bei ASS-Nonrespondern die Plättchenaggregation mit Celecoxib umso mehr hemmen ließ, je mehr COX-2 ihre Plättchen besaßen. Sie stellte folgende Theorie auf: wie bereits unter 1.2.4. beschrieben synthetisiert COX-2 aus AA in Anwesenheit von ASS statt Prostaglandine nun 15(R)-HETE, das Epimer zum physiologischen 15(S)-HETE. Für 15(S)-HETE ist allerdings bekannt, dass es ein potenter Plättchenaktivator ist (Teschfamiar et al. 1995, Setty et al. 1992). Gleiches könnte also auch mit 15(R)-HETE der Fall sein. Die Autorin begründet diese Theorie damit, dass es durch Celecoxib dagegen zur kompletten Hemmung von COX-2 kommt und damit auch die 15(R)-HETE-Synthese verhindert wird. Somit käme nur noch die eigentliche Wirkung von ASS (Hemmung der COX-1) zu tragen. Besitzt nun ein Plättchen gleich viel COX-2 wie COX-1, würde folglich die aktivierende Wirkung von ASS via COX-2 die hemmende Wirkung von ASS via COX-1 aufheben: die Person ist ASS-Nonresponder. Findet sich dagegen mehr COX-2 als COX-1 im Plättchen, würde die aktivierende Wirkung von ASS überwiegen. Dieser Mechanismus würde erklären, warum eine PRASA (und ASS-Nonresponse) bei Patienten mit entzündlichen Erkrankungen und damit erhöhter COX-2-Aktivität häufiger vorkommt als bei Gesunden.

Es ist bekannt, dass aus AA auch enzym-unabhängig, nämlich durch freie Radikale, prostaglandin-ähnliche Produkte entstehen können: sogenannte Isoprostane. Wenn ASS die COX-1 im Plättchen komplett blockiert, steht zwangsläufig mehr AA für die Bildung von Isoprostanen zur Verfügung (Möbert und Becker 1998). Isoprostane werden vom Plättchen ins Blut freigelassen und wirken stark vasokonstriktorisch (Morrow et al. 1999). Sie erhöhen zudem die Plättchenaktivität (Audoly et al. 2000, Patrono und FitzGerald 1997) und gelten als Marker für oxidativen Stress, d. h. für ein verschobenes Gleichgewicht aus freien Radikalen und der antioxidativen Abwehr (z. B. Glutathion und SOD). Isoprostane entstehen physiologisch z. B. bei körperlicher Belastung (McAnulty et al. 2013), bei Prozessen wie der Phagozytose, aber auch durch exogene Gifte wie z. B. beim Rauchen; sie verursachen Schäden an DNA, Lipiden und Proteinen der Zelle und werden als ein wichtiger Faktor bei kardiovaskulären Erkrankungen angesehen (Montuschi et al. 2004). Typische Risikofaktoren wie Diabetes mellitus, Adipositas oder Hypercholesterinämie gehen mit einer erhöhten Bildung von Isoprostanen einher (Davi et al. 1997 und 1999). Es überrascht daher nicht, dass Isoprostane auch im Zusammenhang mit einer ASS-Nonresponse stehen (Bierend 2008). Bei Patienten mit kardiovaskulären Erkrankungen und Diabetes mellitus wurde wiederum besonders häufig eine PRASA festgestellt (Kaden 2011, Hentrich 2011).

Oxidativer Stress führt also dazu, dass gerade durch die Blockade von COX-1 durch ASS verstärkt Isoprostane gebildet werden. Dieser Mechanismus könnte den hemmenden Effekt von ASS komplett aufheben (= ASS-Nonresponse) oder eben sogar überwiegen (= PRASA).

### 5.2.1.1.3. Beladung der Plättchen mit Antikörpern

Die Hersteller des PADA-RASS vermuten auch einen Zusammenhang zwischen einer PRASA/ASS-Nonresponse und einer Beladung der Plättchen mit autoimmun- oder infekti- bedingten Antikörpern, welche auf spezifischen Fc $\gamma$ -Rezeptoren der Plättchenmembran binden. Wie unter 5.2.1.1. beschrieben wurde zu ihrem indirekten Nachweis der PADA parallel mit Citrat- und Heparinblut durchgeführt. Der AI in Heparinblut sollte deutlich höher liegen als der in Citratblut; ist das Gegenteil der Fall, verhindern auf den Plättchen gebundene Antikörper die Interaktion mit Heparin. Bei kardiovaskulären Erkrankungen steigt nicht nur die Häufigkeit deutlich an, dass Antikörper auf den Plättchen festgestellt werden können, sondern es findet sich außerdem eine erhöhte Plättchenaktivität bei gleichzeitig reduzierter Wirkung von ASS (Kaden 2011, Nowak 2009 a). Blutplättchen werden durch die gebundenen Antikörper stimuliert (Warkentin et al. 2000). Dies könnte möglicherweise erklären, warum mit Antikörpern besetzte Plättchen oftmals auch unsensibel für ASS sind bzw. eine paradoxe Reaktion im PADA-RASS zeigen (Nowak pers. Mitteilung). In der vorliegenden Arbeit gab es jedoch keinen signifikanten Zusammenhang zwischen der Bindung von Antikörpern und der ASS-Response ( $r = 0,175$  und  $p = 0,250$ , siehe **Abb. 30** im Anhang).

### 5.2.2. Einfluss von Resveratrol auf die mit dem PADA-RASS gemessene ASS-Response

Es sollte in diesem Abschnitt der Dissertation getestet werden, inwieweit Resveratrol die Wirkung von ASS beeinflusst. Hierzu wurde für 15 gesunde Probanden mit dem PADA-RASS in Heparin-, Citrat- und Hirudinblut die ASS-Response unmittelbar vor sowie eine Stunde nach Einnahme von 375 mg Resveratrol *per os* gemessen.

In den Tests mit Heparinblut gab es zwei Probanden mit einer PRASA und neun ASS-Nonresponder. Einer von den Probanden mit einer PRASA und drei von den Nonrespondern waren nach Resveratrol ASS-Responder. Im Citratblut reagierten die meisten, nämlich 10 von 15 Probanden, mit einer PRASA; vier waren Nonresponder. Nach Resveratrol verbesserte sich in der Gruppe mit einer PRASA die ASS-Response signifikant ( $p = 0,023$ ). Von den vier Nonrespondern waren zwei nach Resveratrol ASS-Responder, einer zeigte dagegen eine PRASA. Bei Hirudinblut gab es drei Probanden mit einer PRASA und fünf Nonresponder. Von den Probanden mit einer PRASA waren zwei nach Resveratrol ASS-Responder, der dritte „nur noch“ Nonresponder. Ebenso waren vier der fünf Nonresponder nach Resveratrol ASS-Responder.

Fasst man also die Ergebnisse aus allen drei Blutproben zusammen (Heparin-, Citrat- und Hirudinblut; n = 45), so verbesserte sich die ASS-Wirkung nach Einnahme von Resveratrol in 12 von 15 Fällen einer PRASA und bei 12 von 18 getesteten ASS-Nonrespondern. Resveratrol war somit imstande in der vorliegenden Arbeit eine mit dem PADA-RASS diagnostizierte „ASS-Resistenz“ aufzuheben. Diese erstaunliche Beobachtung stützt die Ergebnisse einer anderen Studie zur Interaktion zwischen Resveratrol und ASS: Stef et al. untersuchten die Plättchen von 50 kardiovaskulären Risikopatienten, welche sich unter einer ASS-Therapie befanden. Sie diagnostizierten davon bei 19 Patienten eine ASS-Nonresponse. Bei diesen Nonrespondern führte nun die Zugabe von 10 µM Resveratrol *in vitro* auf einmal wieder zu einer effektiven Hemmung der Aggregation durch ASS (Stef et al. 2006). Crescente und Mitarbeiter nahmen Blut von gesunden Freiwilligen und bestimmten die Aggregation von Plättchen, denen entweder geringe Mengen ASS oder Resveratrol *in vitro* zugegeben. Beide Zusätze für sich allein waren nicht imstande die Plättchenaggregation zu hemmen. Wurden ASS und Resveratrol dagegen zusammen einer Blutprobe hinzugefügt, potenzierten sie sich in ihrer Wirkung und führten zu einer kompletten Hemmung der Plättchen (Crescente et al. 2009).

### **5.2.2.1. Mögliche Mechanismen wie Resveratrol die ASS-Wirkung im Plättchen beeinflusst**

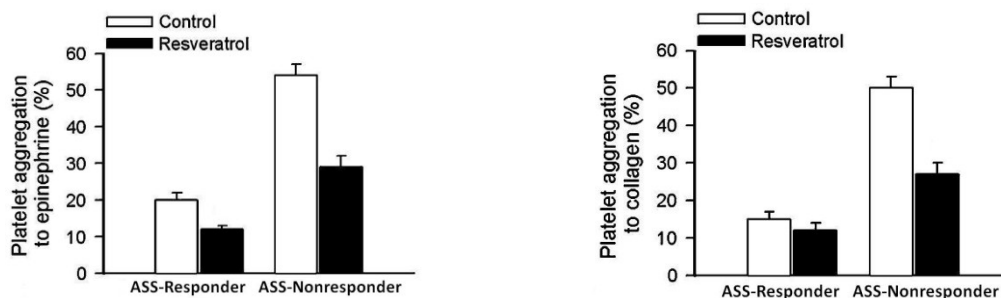
#### **5.2.2.1.1. Interaktion von Resveratrol mit COX-1**

Ähnlich wie ASS hemmt Resveratrol den COX-1-vermittelten Signalweg via AA effektiver als die scherstress- oder ADP-induzierte Aggregation (Höchtel et al. 2009, Shen et al. 2007, Stef et al. 2006, Rinder et al. 1993). Resveratrol und ASS interagieren womöglich auf ähnliche Weise mit dem aktiven Zentrum der COX-1, wodurch beide das Andocken von AA verhindern; dennoch muss der genaue Mechanismus unterschiedlich sein (Crescente et al. 2009, Calamini et al. 2010, Loll et al. 1995). Andere Autoren sind der Meinung, dass Resveratrol auch auf die Peroxidase von COX-1 eine Wirkung besitzt (Maccarrone et al. 1999, Johnson et al. 1998, Szewczuk et al. 2004).

Es könnte sein, dass Resveratrol einfach nur die Interaktion von ASS mit COX-1 erleichtert und deswegen bei Nonrespondern wieder zu einer verbesserten ASS-Wirkung führt. Denn als wesentliche Ursache für eine „ASS-Resistenz“ wird von Zimmermann et al. eine gestörte direkte Interaktion von ASS mit der Plättchen-COX-1 genannt (Zimmermann et al. 2003). In seiner Studie war der Wirkungseintritt von ASS bei Patienten nach Bypass-OP langsamer als vor der OP. Die Autoren machen vorübergehende strukturelle Veränderungen der Plättchen als Reaktion auf den chirurgischen Eingriff verantwortlich, die zu einer verlangsamen



Acetylierung von COX-1 geführt haben könnten. In der Tat konnte Mattiello et al. ein verstärktes Ausschleusen von ASS aus den Plättchen von Patienten nach Bypass-OP beobachten (Mattiello et al. 2007). Bei Protocatechualdehyd, ein anderes Rotwein-Polyphenol, scheint es zumindest so, dass es durch seine Bindung an die COX-1 deren Affinität für ASS erhöht (Sun et al. 2011). Diese Theorie würde zu der Beobachtung passen, dass Resveratrol in der Studie von Stef et al. die ASS-Wirkung nur bei ASS-Nonrespondern deutlich erhöht hat, während der Effekt bei ASS-Respondern gering war (**Abb. 27**). Es wäre denkbar, dass bei ASS-Respondern (= ungestörte Interaktion von ASS mit COX-1) ASS und Resveratrol miteinander um COX-1 konkurrieren. Möglicherweise ist ein Teil der ASS aufgrund ihrer kurzen Halbwertszeit dann bereits deaktiviert, ehe sie das aktive Zentrum erreicht. Resveratrol könnte den Zugang für ASS sogar dauerhaft blockieren, denn laut Szewczuk et al. bindet Resveratrol irreversibel an die COX-1 (Szewczuk et al. 2004). Auch bei einer nur reversiblen Bindung könnte Resveratrol ähnliche wie andere reversible COX-Hemmer (z.B. Ibuprofen) die ASS-Interaktion stören. Angenommen ASS wäre aber der potentere COX-1-Hemmer (Crescente et al. 2009), so wäre ihre an sich gute Wirkung bei ASS-Respondern durch Resveratrol eher vermindert statt verbessert.



**Abb. 27: Adrenalin- und Kollagen-induzierte Plättchenaggregation bei Respondern (n = 31) und Nonrespondern (n = 19) mit und ohne Resveratrol**

Mittelwert  $\pm$  Standardfehler (modifiziert nach Stef et al. 2006)

Das könnte auch erklären, warum in der vorliegenden Studie der Effekt von Resveratrol auf die Gruppe der ASS-Responder anders war als bei Stef et al.: Im Gegensatz zu Stef. et al. führte nämlich Resveratrol in den hier durchgeführten Tests mit dem PADA-RASS (Heparin-, Citrat- und Hirudinblut, n = 45) bei 10 von insgesamt 12 ASS-Respondern sogar zu einer verminderten Wirkung von ASS. Bei den Messungen mit Hirudinblut war die Reduzierung der ASS-Wirkung nach Resveratrol signifikant ( $p = 0,031$ ). Wichtiger Unterschied in der Methodik war, dass die Probanden zuerst Resveratrol *in vivo* bekamen und eine Stunde danach ASS *in vitro* zugesetzt wurde, sprich zu einem Zeitpunkt, wo Resveratrol bereits seinen maximalen Plasmaspiegel erreicht haben dürfte (Walle et al. 2004). Wenn Resveratrol durch

seine Interaktion mit COX-1 tatsächlich die Acetylierung durch ASS stören könnte, wäre die Plättchen hemmende Wirkung von ASS nun entsprechend niedriger als vor Resveratrol. Hochinteressant wären daher weiterführende Tests mit dem PADA-RASS, wo z. B. nicht nur nach einer Stunde, sondern zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Resveratroleinnahme die ASS-Response gemessen wird. Damit ließe sich untersuchen, ob und wie sich im Zuge der Biotransformation von Resveratrol dieser Effekt ändert.

Bei Stef et al. war der Studienablauf genau umgekehrt: die Patienten nahmen ASS *in vivo* ein und es wurde danach Resveratrol *in vitro* zugegeben. Vorausgesetzt es wäre bei Stef et al. bereits ein Großteil von COX-1 erfolgreich durch das eingenommene ASS acetyliert worden und der Patient damit ASS-Responder. Dann wären für das *in vitro* zugegebene Resveratrol nur noch vereinzelte, nicht schon von ASS besetzte Stellen übrig. Logischerweise bliebe somit auch der Plättchen hemmende Effekt von Resveratrol gering. Es käme aber nicht zu einer Reduzierung der ASS-Wirkung wie in unseren Ergebnissen, denn ASS konnte seine Wirkung ja bereits voll entfalten, ehe Resveratrol zugegeben wurde. Nimmt man dagegen an, dass bei Nonrespondern die COX-1 zum großen Teil nicht acetyliert werden konnte und somit noch „frei“ ist für Resveratrol, wäre der Effekt von Resveratrol auf einmal wesentlich größer. Bei dem von Stef et al. konzipierten Studienablauf könnte nicht nur eine gestörte Interaktion von ASS und COX-1 die Ursache sein, dass es bei Nonrespondern zur ungenügenden Acetylierung von COX-1 in den Plättchen kommt und damit der Effekt von Resveratrol besonders groß ist. Auch eine beeinträchtigte Bioverfügbarkeit von ASS, ein erhöhter Plättchenumsatz oder schlechte Compliance des Patienten wäre denkbar. Das *in vitro* zugegebene Resveratrol dagegen wird von diesen Faktoren nicht beeinflusst.

Vielmehr konnte in den unter 5.2.1.2 und 5.2.1.3. beschriebenen Messungen mit dem PADA und der Durchflusszytometrie bereits gezeigt werden, dass der Effekt von Resveratrol auf die Plättchen abhängig ist von ihrem Aktivitätszustand. Offensichtlich trifft dies auch auf die jeweilige ASS-Response zu. Es gilt also nach unterschiedlichen Merkmalen zwischen dem Plättchen eines Responders und dem eines Nonresponders zu suchen, die ebenfalls von Resveratrol beeinflusst werden. Nur über ein Wirken über COX-1 lässt sich jedenfalls nicht ausreichend erklären, wie es beim PADA-RASS zum Auftreten einer paradoxen Reaktion auf ASS kommt und warum Resveratrol diesen Zustand scheinbar aufheben kann.

#### **5.2.2.1.2. Interaktion von Resveratrol mit COX-2**

Wie stark sich mit Resveratrol neben COX-1 auch die COX-2 hemmen lässt, ist abhängig von den im Versuch verwendeten Zelltypen und -spezies. Selbst die Versuchsanordnung (ob statisch oder in Bewegung) beeinflusst das Ergebnis (Cao et al. 2011, Nakata et al. 2012).

Während einige Studien im Vergleich zu COX-1 gar keinen (Szewczuk et al. 2004) oder nur abgeschwächten Effekt sehen (Handler et al. 2007, Cao et al. 2011, Kümmerle et al. 2005), sprechen andere für eine annähernd gleich starke Hemmung beider Isoenzyme (Kang et al. 2009, Calamini et al. 2010). 5  $\mu$ M Resveratrol hemmen zwar die COX-2 in Tumorzellen, haben aber keinen Einfluss auf die COX-2 in Endothelzellen. Nakata et al. sprechen daher bei Resveratrol von einer gewebe-spezifischen COX-2-Hemmung in der Hoffnung, einen effektiveren Wirkstoff als die derzeitigen COX-2-Hemmer zu finden (Nakata et al. 2012). Ziemlich alle Studien zu Resveratrol und COX-2 haben nämlich den Hintergrund COX-2-spezifische Inhibitoren mit antiinflammatorischer oder -kanzerogener Wirkung zu entwickeln, weswegen eine Übertragung der Ergebnisse auf die COX-2 in Megakaryozyten bzw. Plättchen nicht so leicht möglich ist. Eventuell handelt es sich bei der COX-2 in Plättchen sogar um eine besondere Isoform mit einem gänzlich verschiedenen Hemm-Mechanismus (Censarek 2007).

Unter 5.2.2.1.1.2 wird erklärt, wie eine PRASA durch die Bildung von 15(R)-HETE durch COX-2 in Anwesenheit von ASS entstehen könnte. Angenommen Resveratrol könnte wie Celecoxib COX-2 komplett hemmen und damit diese endogene Plättchenaktivierung durch ASS unterbinden, sodass nur noch die eigentliche Wirkung von ASS (Hemmung der COX-1) zu tragen kommt, würde das erklären, warum in der vorliegenden Arbeit ausgerechnet Probanden mit einer PRASA nach Resveratrol eine bessere ASS-Wirkung zeigten und nicht Responder mit vielleicht nur wenig bis gar keiner COX-2 in ihren Plättchen. Bei diesen Respondern könnte dagegen der hemmende Effekt von Resveratrol auf die physiologische COX-2 im gesunden Endothel stärker ins Gewicht fallen. Durch diese „Nebenwirkung“ von Resveratrol würde weniger Prostacyclin synthetisiert werden, was sich folglich in einer gesteigerten Plättchenaktivität widerspiegelt. Die von den Respondern zuvor ASS-sensitiven Plättchen ließen sich aufgrund ihrer gesteigerten Aktivität auf einmal schwerer mit ASS hemmen. Selektive COX-2-Hemmer wie Celecoxib sind daher in den Verruf geraten das Thromboserisiko zu steigern (McAdam 1999, Yu et al. 2012). Interessanterweise war der Effekt von Resveratrol auf die mit dem PADA in Hirudinblut gemessenen Plättchenaktivität tatsächlich abhängig vom jeweiligen Respondertyp: bei acht von 11 Probanden mit einer PRASA oder ASS-Nonresponse war der AI nach Resveratrol kleiner, während alle vier ASS-Responder nach Resveratrol einen höheren AI hatten. Eine durch Resveratrol gesteigerte Plättchenaktivität aufgrund einer Hemmung von COX-2 im Endothel könnte also bei ASS-Respondern dazu geführt haben, dass bei ihnen die Wirkung von ASS nach Resveratrol vermindert war.

### 5.2.2.1.3. Einfluss von Resveratrol auf oxidativen Stress

Wie unter 5.2.2.1.1.2. geschrieben kann eine ASS-Nonresponse oder PRASA auch bedingt sein durch einen erhöhten oxidativen Stress im Plättchen und eine damit gesteigerten Bildung von Isoprostanen in Anwesenheit von ASS. Resveratrol ist aufgrund seines antioxidativen Charakters in der Lage die Entstehung freier Radikale in Plättchen zu verhindern (Crescente et al. 2009, Shen et al. 2007, Albers et al. 2004). Dies könnte sehr einfach erklären, warum in der vorliegenden Arbeit besonders die ASS-Nonresponder und Probanden mit einer PRASA von Resveratrol profitiert haben. Denn wenn sich durch Resveratrol die Menge an freien Radikalen reduziert haben sollte, würde AA weniger schnell zu Isoprostanen umgewandelt. Der Überschuss an AA könnte dann statt dessen vermehrt z. B. über COX-2 und Lipoxygenasen zu den anti-inflammatorischen ATL (aspirin triggered lipoxins) weiter umgewandelt und somit „entschärft“ werden (siehe 1.2.4.). Zudem käme die eigentliche Wirkung von ASS (Hemmung der TXA<sub>2</sub>-Synthese) wieder stärker zum Tragen, d. h. die Testperson ist wieder für ASS sensitiv.

Eine andere *in vivo*-Studie mit gesunden Probanden liefert dazu interessante Hinweise: dort wurde ganz aktuell festgestellt, dass sich durch orale Einnahme von Resveratrol der Anstieg von Isoprostanen im Blut nach körperlicher Belastung reduzieren ließ im Vergleich zu ohne Resveratrol (McAnulty et al. 2013). Eine weitere *in vivo*-Studie mit gesunden Probanden zeigt ebenfalls, dass sich durch Polyphenole wie Resveratrol die Isoprostanbildung senken lässt (Pignatelli et al. 2006).

### 5.2.3. Einfluss von Resveratrol auf die mit dem Multiplate gemessene ASS-Response

Bei der Messung mit Multiplate fanden sich im Gegensatz zum PADA-RASS keinerlei signifikante Veränderungen in der ASS-Response ( $p = 0,607$ ). Vor Resveratrol-Einnahme war nur ein einziger Proband ASS-Nonresponder. Nach Resveratrol waren alle für ASS sensitiv, auch der zuvor als „ASS-resistent“ getestete Proband. Ursächlich für diese Beobachtung könnte (wie schon bei den anderen Multiplate-Tests zur Messung der Plättchenaktivität) die Verwendung von Vollblut sein, wodurch der Effekt von Resveratrol in der Menge diverser Plättchen-Interaktionen verloren gingen (Lordkipanidze et al. 2007). Auch wenn AA an sich ein geeigneter Aktivator wäre, um die Wirkung von Resveratrol auf die COX-1 der Plättchen zu messen, könnte die Konzentration von AA möglicherweise zu hoch gewesen sein, als dass eine Veränderung messbar gewesen wäre. Eine zu starke Hemmung durch die relativ hohe ASS-Konzentration (1 mg/ml) wäre ebenso denkbar, welche die eigentliche Resveratrolwirkung überschattet haben könnte.

#### 5.2.4. Gegenüberstellung der Ergebnisse mit dem PADA-RASS und Multiplate

Die Ergebnisse beider Methoden differieren sehr stark: während ASS mit dem Multiplate bei 14 von 15 Probanden die Plättchenaggregation erfolgreich senkte, war das mit dem PADA-RASS nur bei vier Probanden der Fall. Der einzige ASS-Nonresponder bei Multiplate war beim PADA-RASS nur in den Messungen mit Heparin- und Citratblut ebenfalls Non-Responder. Der Effekt von Resveratrol war bei diesem Probanden zudem unterschiedlich: während er bei Multiplate nach Resveratrol wieder ASS-Responder war, verminderte sich bei ihm die ASS-Wirkung in allen drei Blutproben des PADA-RASS nach Resveratrol.

Diese deutliche Diskrepanz ist mit großer Wahrscheinlichkeit auf die unterschiedliche Methodik zurückzuführen, weswegen die Ergebnisse beider Tests eventuell nicht auf dieselbe Art und Weise interpretiert werden können. Während bei Multiplate das Messergebnis aus einem Diagramm berechnet wird, welches den elektrischen Widerstand einer Blutprobe über einen gewissen Zeitraum darstellt, werden beim PADA-RASS einfach nur die frei zirkulierenden Plättchen zu einem bestimmten Zeitpunkt gezählt. Zudem ist die Art und Weise der Plättchenstimulation völlig verschieden: bei Multiplate wird durch Zugabe von AA eine Plättchenaggregation ausgelöst, während beim PADA-RASS Heparin und geringer Scherstress auf die Plättchen einwirken. Da Heparin und Scherstress allerdings nicht direkt von COX-1 abhängig sind, wäre es demnach erklärbar, warum ASS bei Multiplate einen hemmenden Effekt zeigte, während es beim gleichen Probanden mit dem PADA-RASS zu keiner Wirkung kam.

Da für Multiplate Hirudinblut verwendet wurde, stellt sich die Frage, ob man nicht nur die Ergebnisse des PADA-RASS mit Hirudinblut zum Vergleich heranziehen sollte. Doch auch beim PADA-RASS in Hirudinblut gab es nur sieben ASS-Responder, obwohl das Blut für beide Tests aus ein und derselben Monovette stammte. Beim PADA-RASS mit Hirudinblut wirkt lediglich geringer Scherstress auf die Plättchen, auf welchen ASS jedoch keinen wesentlichen Einfluss hat.

Scheinbar liegt es auch nicht an der unterschiedlichen ASS-Konzentration (ASS-Endkonzentration Multiplate: 1 mg/ml im Vergleich zum PADA-RASS: 10 µg/ml), da sich beim PADA-RASS das Ergebnis auch bei Endkonzentrationen von 0,3 µg – 6 mg ASS/ml nicht wesentlich ändert (Kaden 2011).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Methodik des Multiplate-Systems im Gegensatz zum PADA-RASS wohl nicht geeignet ist, um Veränderungen von Resveratrol auf die ASS-Response festzustellen. Insbesondere die Zugabe eines künstlichen Aktivators könnte einen Effekt aufgrund der starken Plättchenaktivierung überlagern.

## 6. Zusammenfassung

Blutplättchen spielen eine wesentliche Rolle in der Entstehung arterieller Thromben. Im Rahmen kardiovaskulärer Erkrankungen erhöht sich die Plättchenaktivität und damit auch das Risiko für thrombotische Ereignisse. Standardmäßig werden Risikopatienten daher mit Plättchen hemmenden Pharmaka wie Acetylsalicylsäure (ASS) behandelt. Dennoch kommt es bei einigen Patienten zu Herzinfarkt oder Schlaganfall. Das wachsende Thema „ASS-Resistenz“ stellt die Medizin vor große Probleme, da hierfür weder die genauen Ursachen bekannt sind noch exakte Diagnostikmöglichkeiten existieren. In den letzten Jahren erlangten sekundäre Pflanzenstoffe immer mehr Aufmerksamkeit für die Thromboseprophylaxe. Insbesondere für das in Rotwein enthaltene Polyphenol Resveratrol wurde in vielen Studien gezeigt, dass es die Plättchenaggregation hemmen kann. Meist handelt es sich jedoch dabei um *in vitro*-Versuche. In dieser Arbeit sollte daher die systemische Wirkung eines oral eingenommenen pflanzlichen Resveratrol-Extrakts a) auf die Aktivität und b) auf die ASS-Sensitivität menschlicher Blutplättchen untersucht werden. Dabei kamen folgende Tests gleichzeitig zum Einsatz:

1. Mit dem PADA (platelet adhesion assay) und dem PADA-RASS (platelet adhesion assay – Resistenz auf ASS) wurden zwei neuartige Tests verwendet, welche mit geringen Scherkräften und ohne jegliche Zugabe von künstlichen Aktivatoren funktionieren. Man erhält das Ergebnis, indem die noch nicht adhären, freien Plättchen gezählt werden. Der PADA gibt dabei Auskunft über die Ruheaktivität der Plättchen. Beim PADA-RASS wird zusätzlich der Effekt einer *in vitro*-Zugabe von ASS auf die Plättchenaktivität gemessen. Zum ersten Mal wurden beide Tests mit Citrat-, Hirudin- und Heparinblut parallel durchgeführt, um den Einfluss der Antikoagulation zu untersuchen.
2. Die zweite Methode war das Multiplate-System, das auf dem Prinzip der Impedanzaggregometrie beruht. Hier induziert die Zugabe verschiedener Aktivatoren (Arachidonsäure, Kollagen, ADP = Adenosindiphosphat, TRAP = thrombin receptor activating peptide) eine Aggregation der Plättchen. Das Ergebnis drückt aus, wie sich der elektrische Widerstand in der Blutprobe während der Aggregation ändert. Der Effekt von ASS wurde durch einen *in vitro*-Zusatz von ASS getestet.
3. Im Gegensatz zu den oben genannten Plättchenfunktionstests wurde mit der Durchflusszytometrie als dritte Methode einzig und allein die Expression des Adhäsionsmoleküls P-Selektin auf der Plättchenmembran als Maß ihrer Aktivität bestimmt. Dabei wurde zum einen der Effekt von Resveratrol auf ruhende, unstimulierte Plättchen gemessen und zum anderen auf TRAP-aktivierte Plättchen.

Für die Studie nahmen 15 gesunde männliche Probanden einmalig 375 mg Resveratrol *per os* zu sich. Man kontrollierte unmittelbar vor und eine Stunde nach Einnahme

a) die Plättchenaktivität mit dem PADA, dem Multiplate sowie der Durchflusszytometrie und

b) den Effekt von ASS auf die Plättchenaktivität mit dem PADA-RASS und dem Multiplate.

Zu a): Es konnte mit dem PADA gezeigt werden, dass die Plättchenaktivität nach Resveratrol umso geringer wurde, je höher sie zuvor war und umgekehrt. In den Hirudinproben war dieser Zusammenhang signifikant ( $p = 0,012$ ), während er für Citratblut nur knapp das Signifikanzniveau verfehlte ( $p = 0,065$ ). Da Heparin auf Plättchen aktivierend wirkt, war möglicherweise der Effekt von Resveratrol im PADA mit Heparinblut nicht mehr nachweisbar.

Mit dem Multiplate kam es zu keiner signifikanten Veränderung der Plättchenaktivität nach Resveratrol, was vermutlich auf die andersartige Methodik zurückgeführt werden kann. Nur bei ADP als Aktivator stimmten die Ergebnisse des Multiplate mit denen des PADA signifikant überein. Denn ADP ist bei der scherstress-induzierten Plättchenaktivierung ein entscheidender Mediator.

Eines der wichtigsten Ergebnisse dieser Arbeit war, dass Resveratrol die P-Selektin-Expression ruhender Plättchen signifikant reduzierte ( $p = 0,013$ ). Bei 12 der 15 Probanden sank der Wert um 5-56 %. Der Effekt war umso stärker, je höher die Plättchenaktivität vor Resveratrol war; diese Korrelation war mit  $p = 0,002$  signifikant. Bei TRAP-aktivierten Plättchen war dagegen keine signifikante Wirkung von Resveratrol zu erkennen, was vermutlich auf die Anwesenheit von TRAP zurückgeführt werden kann.

Zu b): Beim PADA-RASS waren von den 15 Probanden nur vier ASS-Responder, dagegen neun ASS-Nonresponder und bei zwei Probanden stieg die Plättchenaktivität nach Zugabe von ASS sogar noch an. Der Hersteller des Tests spricht von einer PRASA (paradoxical reaction on ASA) – ein Phänomen, das in dieser Häufigkeit für anderen Plättchenfunktions-tests noch nie beschrieben wurde. Eine PRASA kommt bei kardiovaskulären Risikopatienten auffallend häufiger vor als bei Gesunden und wird mit chronisch-entzündlichen Erkrankungen assoziiert. In den PADA-RASS-Tests mit Citrat- und Hirudinblut traten ebenfalls Fälle einer PRASA auf: bei Hirudin waren es drei, bei Citrat sogar 10 Probanden.

Bei Multiplate war nur ein einziger Proband ASS-Nonresponder und dieser zeigte auch beim PADA-RASS in Heparin- und Citratblut eine ASS-Nonresponse. Bei allen anderen Probanden ließ sich die Plättchenaggregation mit ASS erfolgreich hemmen. Dies steht im krassen Gegensatz zu den Ergebnissen mit dem PADA-RASS, was vermutlich an der unterschiedlichen Methodik liegt.

Nach Einnahme von Resveratrol zeigten sich deutliche Veränderungen beim PADA-RASS: fasst man die Ergebnisse aus allen drei Blutproben zusammen (Heparin-, Citrat- und Hirudinblut;  $n = 45$ ), so erhöhte sich die ASS-Wirkung nach Resveratrol bei 12 von insgesamt 18 getesteten ASS-Nonrespondern und bei 12 von insgesamt 15 Fällen einer PRASA. Resveratrol war also imstande in der vorliegenden Arbeit eine Nonresponse oder gar paradoxe Reaktion auf ASS aufzuheben. Diese Beobachtung war beim PADA-RASS signifikant in den Tests mit Citratblut, wo sich bei acht von 10 Probanden mit einer PRASA nach Resveratrol die Wirkung von ASS verstärkte ( $p = 0,023$ ). Dagegen war die ASS-Wirkung bei 10 von insgesamt 12 getesteten ASS-Respondern nach Resveratrol vermindert. Das war signifikant in den Tests mit Hirudinblut, wo ASS bei sechs von sieben Respondern nach Resveratrol weniger wirksam war ( $p = 0,031$ ).

Bei Multiplate war der einzige ASS-Nonresponder nach Resveratrol wieder für ASS empfindlich. Alle anderen Probanden zeigten keine Veränderung ihrer ASS-Response nach Resveratrol.

Der Effekt von Resveratrol scheint demnach abhängig zu sein vom jeweiligen Ausgangszustand der Plättchen, d. h. von ihrer Ruheaktivität bzw. ihrer Sensibilität für ASS. Als mögliche Faktoren werden v.a. unterschiedliche Mengen des Enzyms Cyclooxygenase-1 und -2 im Plättchen diskutiert und/oder oxidativer Stress. Bedeutend ist die Beobachtung, dass Resveratrol in beiden Testmethoden bei Probanden mit zuvor festgestellter ASS-Nonresponse oder PRASA die Wirkung von ASS verbessert hat. Das lässt vermuten, dass Patienten mit „ASS-Resistenz“ von einer Substitution mit Resveratrol profitieren könnten. Wünschenswert wären daher weiterführende Studien zum therapeutischen Nutzen von Resveratrol. Denn überraschenderweise hatte Resveratrol bei ASS-Respondern einen gegenteiligen Effekt, weswegen Resveratrol womöglich nicht für alle Patienten von gleichem Nutzen ist.

Es konnte in dieser Arbeit mit allen drei Testmethoden gezeigt werden, dass die hier verwendete Dosis von 375 mg Resveratrol nach einmaliger Einnahme einen Effekt auf die Ruheaktivität und ASS-Sensibilität menschlicher Blutplättchen besitzt. Vermutlich ist bei längerer Einnahme mit noch stärkeren Veränderungen zu rechnen, da Resveratrol auch auf andere Zellen wirkt, welche indirekt die Plättchen beeinflussen. Der PADA bzw. PADA-RASS scheinen geeignete Methoden zu sein, um die Wirkung von Resveratrol zu messen, während beim Multiplate-System womöglich viel Information verloren geht, v.a. durch das Zusetzen von Aktivatoren. Mit der Durchflusszytometrie ließ sich die Wirkung von Resveratrol auf die Ruheaktivität der Plättchen am deutlichsten erkennen.



## 7. Literatur

- Abou-Aqaq LH, Aikens ML, Tabenqwa EM, Benza RL, Shows SR, Grenett HE, Booyse FM: Polyphenolics increase t-PA and u-PA gene transcription in cultured human endothelial cells. *Alcohol Clin Exp Res* (2001) 25(2): 155-162
- Adams RJ, Albers G, Alberts MJ et al.: Update to the AHA/ASA Recommendations for the prevention of stroke in patients with stroke and transient ischemic attacks. *Stroke* (2008) 39: 1647-1652
- Aggarwal BB, Bhardwaj A, Aggarwal RS, Seeram NP, Shishodia S, Takada Y: Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer: preclinical and clinical studies. *Anticancer Res* (2004) 24(5A): 2783-2840
- Akar JG, Jeske W, Wilber DJ: Acute onset human atrial fibrillation is associated with local cardiac platelet activation and endothelial dysfunction. *J Am Coll Cardiol* (2008) 51: 1790-1793
- Akay OM, Cantürk Z, Akin E, Bal C, Gülbas Z: Aspirin-resistance frequency: a prospective study in 280 healthy Turkish volunteers. *Clin Appl Thromb Hemost* (2009) 15(1): 98-102
- Albers AR, Varghese S, Vitseva O, Vita JA, Freedman JE: The anti-inflammatory effects of purple grape juice consumption in subjects with stable coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* (2004) 24(11): e179-80
- Aluyen JK, Ton QN, Tran T, Yang AE, Gottlieb HB, Bellanger RA: Resveratrol: potential as anticancer agent. *J Diet Suppl* (2012) 9(1): 45-56
- APTC (Antiplatelet Trialist's Collaboration): Collaborative overview of randomised trials of antiplatelet therapy prevention of death, myocardial infarction, and stroke by prolonged antiplatelet therapy in various categories of patients. *BMJ* (1994) 308: 81
- ATTC (Antiplatelet Trialist's Collaboration): Collaborative meta-analysis of randomised trials of antiplatelet therapy for prevention of death, myocardial infarction, and stroke in high risk patients. *BMJ* (2002) 324: 71-86
- Audoly LP, Rocca B, Fabre JE, Koller BH, Thomas D, Loeb AL, Coffman TM, FitzGerald GA: Cardiovascular responses to the isoprostanes iPF(2 $\alpha$ )-III and iPE(2)-III are mediated via the thromboxane A(2) receptor in vivo. *Circulation* (2000) 101(24): 2833-2840
- Aviram M, Maor I: Phospholipase D-modified low density lipoprotein is taken up by macrophages at increased rate. A possible role for phosphatidic acid. *J Clin Invest* (1993) 91(5): 1942-1952
- Awtry EH, Loscalzo J: Aspirin. *Circulation* (2000) 101: 1206-1218
- Baker CS, Hall RJ, Evans TJ, Pomerance A, Maclouf J, Creminon C, Yacoub MH, Polak JM: Cyclooxygenase-2 is widely expressed in atherosclerotic lesions affecting native and transplanted human coronary arteries and colocalizes with inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine particularly in macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* (1999) 19(3): 646-655
- Balla G, Jacob HS, Balla J, Rosenberg M, Nath K, Apple F, Eaton JW, Vercellotti GM: Ferritin: a cytoprotective antioxidant strategem of endothelium. *J Biol Chem* (1992) 267: 18148-18153

- Bassand JP, Hamm CW, Ardissino D et al.: Task force for diagnosis and treatment of non-ST-segment elevation acute coronary syndrome of European Society of Cardiology. *Eur Heart J* (2007) 28(13): 1598-660
- Bedford C, Cummings AJ, Martin BK: A kinetic study of the elimination of salicylate in man. *Br J Pharmacol* (1965) 24: 418
- Bèliveau R, Gingras D (Hrsg.): Krebszellen mögen keine Himbeeren (2008) 11. Auflage, Kösel-Verlag München
- Belton O, Byrne D, Kearney D, Leahy A, Fitzgerald DJ: Cyclooxygenase-1 and -2-dependent prostacyclin formation in patients with atherosclerosis. *Circulation* (2000) 102(8): 840-845
- Bereswill S, Munoz M, Fischer A, Plickert R, Haaq LM, Otto B, Kühl AA, Loddenkemper C, Göbel UB, Heimesaat MM: Anti-inflammatory effects of resveratrol, curcumin and simvastatin in acute small intestinal inflammation. *PloS One* (2010) 5(12): e15099
- Bhatt DL, Steg PG, Ohman EM et al.: International prevalence, recognition and treatment of cardiovascular risk factors in outpatients with atherothrombosis. *JAMA* (2006) 295: 180-189
- Biele C: Der enzymatische Mechanismus der PGH<sub>2</sub>-Synthase (Cyclooxygenase) – Vom Arachidonat zum PGG<sub>2</sub>; [http://www.chemgapedia.de/vsengine/vlu/vsc/de/ch/12/thr/vlu\\_thr/aspirin\\_4\\_cox.vlu/Page/vsc/de/ch/12/thr/wirkstoffe/aspirin/a4\\_4\\_cox\\_mechanismus/cox\\_mechanismus.vscml.html](http://www.chemgapedia.de/vsengine/vlu/vsc/de/ch/12/thr/vlu_thr/aspirin_4_cox.vlu/Page/vsc/de/ch/12/thr/wirkstoffe/aspirin/a4_4_cox_mechanismus/cox_mechanismus.vscml.html) (4.1.2014)
- Bierend A: "ASS-Resistenz" bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung. Chem Diss (2008) Universität Hamburg
- Bjornsson TD, Schneider DE, Berger H Jr: Aspirin acetylates fibrinogen and enhances fibrinolysis: fibrinolytic effect is independent of changes in plasminogen activator levels. *J Pharm Exp Ther* (1989) 250: 154-161
- Börgermann J, Kanashnik A, Sossdorf M, Gummert J, Lösche W: Individual variability of response and non-response to acetyl salicylic acid after cardiac surgery. *Platelets*. (2010) 21(8): 610-5 Epub 2010
- Bolz SS, Pohl U: Indomethacin enhances endothelial NO release: evidence for a role of PGI<sub>2</sub> in the autocrine control of calcium-dependent autacid production. *Cardiovasc Res* (1997) 36: 437-444
- Boocock D, Faust GES, Patel KR, et al.: Cancer epidemiology, biomarkers & prevention. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* (2007) 16: 1246-1252
- Breet NJ, van Werkum JW, Bouman HJ, Ruven HJ, Bal ET, Deneer VH, Harmsze AM, van der Heyden JA, Rensing BJ, Suttorp MJ, Hackeng CM, ten Berg JM: Comparison of platelet function tests in predicting clinical outcome in patients undergoing coronary stent implantation. *JAMA* (2010) 303(8): 754-762
- Brodde MF, Kehrel BE: Thrombozyten-funktionsuntersuchungen. In: Madlener K, Pötzsch B (Hrsg.) *Hämostaseologie* (2010) 2., vollst. akt. und erw. Auflage, Springer-Verlag Berlin S. 846f
- Brune K, Hinz B: Zum aktuellen Stand der Zyklooxygenase-Forschung. *Dt Arztebl* (1998) 95(7): A343-346

- Cai H, Harrison DG: Endothelial Dysfunction in Cardiovascular Diseases: The role of oxidant stress (2000) *Circ Res* 87: 840-844
- Calamini B, Ratia K, Malkowski MG, Cuendet M, Pezzuto JM, Santarsiero BD, Mesecar AD: Pleiotropic mechanisms facilitated by resveratrol and its metabolites. *Biochem J* (2010) 429: 273-282
- Cao H, Yu R, Tao Y, Nikolic D, van Breemen RB: Measurement of cyclooxygenase inhibition using liquid chromatographic-tandem mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal* (2011) 54(1): 230-235
- Capone ML, Sciulli MG, Tacconelli S, Grana M, Ricciotti E, Renda G, Di Gregorio P, Merciaro G, Patrignani P: Pharmacodynamic interactions of naproxen with low-dose aspirin in healthy subjects. *J Am Coll Cardiol* (2005) 45: 1295-1301
- Catella-Lawson F, Reilly MP, Kapoor SC, Cucchiara AJ, DeMarco S, Tournier B, Vyas SN, FitzGerald GA: Cyclooxygenase inhibitors and the antiplatelet effects of aspirin. *N Engl J Med* (2001) 345: 1809-1817
- Censarek P, Freidel K, Udelhoven M, Ku SJ, Hohlfeld T, Meyer-Kirchrath J, Schrör K, Weber AA: Cyclooxygenase COX-2a, a novel COX-2 mRNA variant, in platelets from patients after coronary artery bypass grafting. *Thromb Haemost* (2004) 92(5): 925-928
- Cipollone F, Patrignani P, Greco A: Differential suppression of thromboxane biosynthesis by indobufen and aspirin in patients with unstable angina. *Circulation* (1997) 96: 1109-1016.
- Cipollone F, Ciabattini G, Patrignani P, Pasquale M, Di Gregorio D, Bucciarelli T, Davì G, Cucurullo F, Patrono C: Oxidant stress and aspirin-insensitive thromboxane biosynthesis in severe unstable angina. *Circulation*. (2000) 102(9): 1007-1013
- Clària J, Serhan CN: Aspirin triggers previously undescribed bioactive eicosanoids by human endothelial cell-leukocyte interactions. *Proc Natl Acad Sci USA* (1995) 92(21): 9475-9479
- Cleaton HJ, Zhu WQ, Vaughan DE, Hamm HE: Differential regulation of endothelial exocytosis of P-selectin and von Willebrand factor by protease-activated receptors and cAMP. *Blood* (2004) 107(7): 2736-2744
- Clement MV, Hirpara JL, Chawdhury SH, Pervaiz S: Chemopreventive agent resveratrol, a natural product derived from grapes, triggers CD59 signaling-dependent apoptosis in human tumor cells. *Blood* (1998) 92: 998-1002
- Cotter G, Shemesh E, Zehavi M, Dinur I, Rudnick A, Milo O, Vered Z, Krakover R, Kaluski E, Kornberg A: Lack of aspirin effect: aspirin resistance or resistance to taking aspirin? *Am Heart J* (2004) 147(2): 293-300
- Craven LL: Acetylsalicylic acid, possible prevention of coronary thrombosis. *Ann West Med Surg* (1950) 4: 95
- Crescente M, Jessen G, Momi S, Höltje HD, Gresele P, Cerletti C, de Gaetano G: Interactions of gallic acid, resveratrol quercetin and aspirin at the platelet cyclooxygenase-1 level. Functional and modelling studies. *Tromb Haemost* (2009) 102 (2): 336-346
- Crowell JA, Korytko PJ, Morrissey RL, Booth TD, Levine BS: Resveratrol-Associated Renal Toxicity. *Toxicol Sci* (2004) 82(2): 614-619

- Cziszar A, Labinskyy N, Pinto JT, Ballabh P, Zhang H, Losonczy G, Pearson K, de Cabo R, Pacher P, Zhang C, Ungvari Z: Resveratrol induces mitochondrial biogenesis in endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* (2009) 297(1): 13-20
- Daniel O, Meier MS, Schlatter J, Frischknecht P: Selected phenolic compounds in cultivated plants: ecologic functions, health implications, and modulations by pesticides. *Environ Health Perspect* (1999) 107(1): 109-114
- Dargan P, Wallace C, Jones A: An evidence based flowchart to guide the management of acute salicylate (aspirin) overdose. *Emerg Med J* (2002) 19: 206-209
- Das S, Alaqappan VK, Baqchi D, Sharma HS, Maulik N, Das DK: Coordinated induction of iNOS-VEGF-KDR-eNOS after resveratrol consumption: a potential mechanism for resveratrol preconditioning of the heart. *Vascul Pharmacol* (2005) 42(5-6): 281-289
- Delmas D, Jannin B, Latruffe N: Resveratrol: natural properties against atherosclerosis, associated pro-inflammatory effects and aging. *Mol Nutr Food Res* (1995) 49(5): 377-395
- Demiroglu H: Elevated erythrocyte aggregation as a predisposing factor to aspirin resistance. *Thromb Haemost* (2003) 90: 157
- DeWitt DL, el-Harith EA, Kraemer SA, Andrews MJ, Yao EF, Armstrong RL, Smith WL: The aspirin and hemebinding sites of ovine and murine prostaglandin endoperoxide synthases. *J Biol Chem* (1990) 265(9): 5192- 5198
- Dhanjal TS, Ross EA, Auger JM, McCarty OJ, Hughes CE, Senis YA, Buckley CD, Watson SP: Minimal regulation of platelet activity by PECAM-1. *Platelets* (2007) 18(1): 56-67
- Dixon DA, Tolley ND, Bemis-Standoli K, Martinez ML, Weyrich AS, Morrow JD, Prescott SM, Zimmerman GA: Expression of COX-2 in platelet-monocyte interactions occurs via combinatorial regulation involving adhesion and cytokine signaling. *J Clin Invest.* (2006) 116(10): 2727-2738 Epub 2006
- Dobrydneva Y, Williams RL, Blackmore PF: Trans-resveratrol inhibits calcium influx in thrombin-stimulated platelets. *Br J Pharmacol* (1999) 128(1): 149-157
- Dong ZM, Brown AA, Wagner DD: Prominent role of P-selectin in the development of advanced atherosclerosis in ApoE-deficient mice. *Circulation* (2000) 101: 2290-2295
- Dopheide SM, Maxwell MJ, Jackson SP: Shear-dependent tether formation during platelet translocation on von Willebrand factor. *Blood* (2002) 99: 159-167
- Dudley J, Das S, Mukherjee S, Das DK: Resveratrol, a unique phytoalexin present in red wine, delivers either survival signal or death signal to the ischemic myocardium depending on dose. *J Nutr Biochem* (2008) 20 (6): 443-452
- Egger G: *Die akute Entzündung* (2005) 1. Auflage, Springer Verlag Wien/NY S. 57-62
- Eikelboom JW, Hirsh J, White JJ, Johnston M, Yi Q, Yusuf S: Aspirin resistant thromboxane biosynthesis and the risk of myocardial infarction, stroke or cardiovascular death in patients at high risk for cardiovascular events. *Circulation* (2000) 105(14): 1650-1655
- Engström G, Hedblad B, Juul-Möller S, Tydén P, Janzon L: Cardiac

- arrhythmias and stroke: increased risk in men with high frequency of atrial ectopic beats. *Stroke* (2000) 31: 2925-2929
- Fiorucci S, Santucci L, Wallace JL, Sardina M, Romano M, del Soldato P, Morelli A: Interaction of a selective cyclooxygenase-2 inhibitor with aspirin and NO-releasing aspirin in the human gastric mucosa. *Proc Natl Acad Sci USA* (2003) 100(19): 10937-10941
- Fragopoulou E, Nomikos T, Antonopoulou S, Mitsopoulou CA, Demopoulos CA: Separation of biologically active lipids from red wine. *J Agric Food Chem* (2000) 48(4): 1234-1238
- Friend M, Vucenik I, Miller M: Platelet responsiveness to aspirin in patients with hyperlipidaemia. *BMJ* (2003) 326(7380): 82-83
- Fukuda S, Kaga S, Zhan L, Baqchi D, Das DK, Bertelli A, Maulik N: Resveratrol ameliorates myocardial damage by inducing vascular endothelial growth factor-angiogenesis and tyrosin kinase receptor Flk-1. *Cell Biochem Biophys* (2006) 44 (1): 43-49
- Furie B, Furie CF: Thrombus formation in vivo. *J Clin Invest* (2005) 115(12): 3355-3362
- Gawaz M, Langer H, May AE: Platelets in inflammation and atherogenesis. *J Clin Invest* (2005) 115(12): 3378-3384
- Geng JG, Bevilacqua MP, Moore KL, McIntyre TM, Prescott SM, Kim JM, Bliss GA, Zimmermann GA, McEver RP: Rapid neutrophil adhesion to activated endothelium mediated by GMP-140. *Nature* (1990) 343(6260): 757-760
- Gescher AJ, Steward WP: Relationship between mechanisms, bioavailability, and preclinical chemopreventive efficacy of resveratrol: a conundrum. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* (2003) 12: 953-937
- van Gils JM, Zwaginga JJ, Hordijk PL: Molecular and functional interactions among monocytes, platelets, and endothelial cells and their relevance for cardiovascular diseases. *J Leukoc Biol* (2009) 85(2): 195-204
- Göçmen AY, Burgucu D, Gümüşlü S: Effect of resveratrol on platelet activation in hypercholesterolemic rats: CD40-CD40L system as a potential target. *Appl Physiol Nutr Metab.* (2011) 36(3): 323-30. Epub 2011
- Godson C, Mitchell S, Harvey K, Petasis NA, Hogg N, Brady HR: Cutting edge: lipoxins rapidly stimulate nonphlogistic phagocytosis of apoptotic neutrophils by monocyte-derived macrophages. *J Immunol* (2000) 164(4): 1663-1667
- Goldberg DM, Yan J, Soleas GJ: Absorption of three wine-related polyphenols in three different matrices by healthy subjects. *Clin Biochem* (2003) 36(1): 79-87
- Gonzalez-Conejero R, Rivera J, Corral J, Acuña C, Guerrero JA, Vicente V: Biological assessment of aspirin efficacy on healthy individuals: heterogeneous response or aspirin failure? *Stroke* (2005) 36(2): 276-280.
- Gordon C, Gudi K, Krause A, Sackrowitz R, Harvey BG, Strulovici-Barel Y, Mezey KG, Crystal RG: Circulating Endothelial Microparticles as a Measure of Early Lung Destruction in Cigarette Smokers. *Am J Respir Crit Care Med* (2011) 184(2): 224-232
- Greinacher A, Holtfreter B, Krauel K, Gätke D, Weber C, Ittermann T, Hammerschmidt S, Kocher T:

- Association of natural anti-platelet factor 4/heparin antibodies with periodontal disease. *Blood*. (2011) 118(5): 1395-401
- Gresele P, Cerletti C, Guglielmini G, Pignatelli P, de Gaetano G, Violi F: Effects of resveratrol and other wine polyphenols on vascular function: an update. *J Nutr Biochem*. (2011) 22(3):201-11 Epub 2010 Nov
- Grosser N, Abate A, Oberle S, Vreman HJ, Dennery PA, Becker JC, Pohle T, Seidman DS, Schröder H: Heme oxygenase-1 induction may explain the antioxidant profile of aspirin. *Biochem Biophys Res Commun* (2003) 308(4): 956-960
- Grilli M, Pizzi M, Memo M, Spano P: Neuroprotection by aspirin and sodium salicylate through blockade of NF- $\kappa$ B activation. *Science* (1996)274: 1383-1385
- Grotemeyer KH, Scharafinski HW, Husstedt IW: Two-year follow-up of aspirin responder and aspirin non responder. A pilot-study including 180 post-stroke patients. *Thromb Res* (1993) 71(5): 397-403
- Guthikonda S, Lev EI, Patel R, DeLao T, Bergeron AL, Dong JF, Kleiman NS: Reticulated platelets and uninhibited COX-1 and COX-2 decrease the antiplatelet effects of aspirin. *J Thromb Haemost*. (2007) 5(3): 490-496
- Hach-Wunderle V: Thromboseneigung: Diagnose und Therapie. In: Bruhn HD, Schambeck CM, Hach-Wunderle V (Hrsg.) *Hämostaseologie für die Praxis* (2007) 1. Auflage, Schattauer GmbH Stuttgart
- Haider UGB, Sorescu D, Griendling KK, Vollmar AM, Dirsch VM: Resveratrol suppresses angiotensin II-induced Akt/protein kinase B and p70 S6 kinase phosphorylation and subsequent hypertrophy in rat aortic smooth muscle cells. *Mol Pharmacol* (2002) 62: 772-777
- Halbmayer WM, Nowak G, Wenzel E: (Preface) Reliability of platelet function tests and drug monitoring. *Semin Thromb Hemost* (2005) 31(4): 367-369
- Halushka MK, Walker LP, Halushka PV: Genetic variations in cyclooxygenase 1: effects on response to aspirin. *Clin Pharmacol Ther* (2003) 73(1): 122-130
- Hamberg M, Samuelsson B: Prostaglandin endoperoxides. Novel transformations of arachidonic acid in human platelets. *Proc Natl Acad Sci USA* (1974) 71(9): 3400-3404
- Hamberg M, Svensson J, Samuelsson B: Thromboxanes: a new group of biologically active compounds derived from prostaglandin endoperoxides. *Proc Natl Acad Sci USA* (1975) 72(8): 2994-2998
- Handler N, Brunhofer G, Studenik C, Leisser K, Jäger W, Parth S, Erker T: 'Bridged' stilbene derivatives as selective cyclooxygenase-1 inhibitors. *Bioorg Med Chem* (2007) 15(18): 6109-18
- Hankey GJ, Eikelboom JW: Aspirin resistance. *BMJ* (2004) 328(7438): 477-479
- Harrison P: Platelet function analysis. *Blood Rev* (2005) 19(2): 111-123
- Hattori R, Otani H, Maulik N, Das DK: Pharmacological preconditioning with resveratrol: role of nitric oxide. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* (2002) 282: 1988-1995
- Hentrich J: Häufigkeit und Profil der ASS-Resistenz bei chronischen Hämodialyse-Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden. (2011) *Med Diss, FSU Jena*

- Hinz B, Cheremina O, Bachmakov J, Renner B, Zolk O, Fromm F, Brune K: Dipyron e licits substantial inhibition of peripheral cyclooxygenases in humans: new insights of the pharmacology of an old analgesic. *FASEB J* (2007) 21: 2343-2351
- Höchtl T, Schrör K, Siller-Matula J, Freynhofer M, Wojta J, Huber K: Prasugrel, ein neues Thienopyridin. *J Kardiol* (2009) 16: 217-223
- Hohlfeld T, Zimmermann N, Weber AA, Jessen G, Weber H, Schrör K, Höltje H-D, Ebel R: Pyrazolinone analgesics prevent the antiplatelet effect of aspirin and preserve human platelet thromboxane synthesis. *J Thromb Haemost* (2008) 6: 166-173
- Holme PA, Orvim U, Hamers MJ, Solum NO, Brosstad FR, Barstad RM, Sakariassen KS: Shear-induced platelet activation and platelet derived microparticle formation at blood flow conditions as in arteries with severe stenosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* (1997) 17(4): 646-653
- Horn F, Lindenmeier G, Moc I et al. (2002) *Biochemie des Menschen 2. korr Aufl Georg Thieme Verlag Stuttgart*
- Huang HM, Liang YC, Chenq TH, Chen CH, Juan SH: Potential mechanism of blood vessel protection by resveratrol, a component of red wine. *Ann N Y Acad Sci* (2005) 1042: 349-356
- Illes P, Allgaier C: Analgetika – Behandlung von Schmerzen. In: Aktories K, Förstermann U, Hofmann F, Starke K (Hrsg.) *Pharmakologie und Toxikologie* (2005) 9. Auflage Elsevier GmbH Urban & Fischer-Verlag München
- ISIS-2: Randomized trial of intravenous streptokinase, oral aspirin, both or neither among 17.187 cases of suspected myocardial infarction. *Lancet* (1988) 2: 349
- Jackson SP: The growing complexity of platelet aggregation. *Blood* (2007) 109(12): 5087-5095
- Jaffe EA, Weksler BB: Recovery of endothelial cell prostacyclin production after inhibition by low doses of aspirin. *J Clin Invest* (1979) 63: 532–535
- Jeandet P, Bessis R, Gautheron B: The production of resveratrol (3,5,4'-trihydroxystilbene) by grape berries in different development stages. *Am J Enol Vitic* (1991) 42(1): 41-46
- Johnson JL, Maddipati KR: Paradoxical effects of resveratrol on the two prostaglandin H synthases. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* (1998) 56(2-3):131-43
- Kaden, T: Häufigkeit und Profil der ASS-Resistenz bei Patienten mit akuten kardiologischen Erkrankungen im Vergleich zu gesunden Probanden. *med Diss, FSU Jena* (2011)
- Kamath S, Blann AD, Lip GYH: Platelet activation: assessment and quantification. *Eur Heart J* (2001) 22(17): 1561-1571
- Kaneider NC, Mosheimer B, Reinisch N, Patsch JR, Wiedermann CJ: Inhibition of thrombin-induced signaling by resveratrol and quercetin: effects on adenosine nucleotide metabolism in endothelial cells and platelet-neutrophil interactions. *Thromb Res* (2004) 114(3): 185-194
- Kang SS, Cuendet M, Endringer DC, Croy VL, Pezzuto JM, Lipton MA: Synthesis and biological evaluation of a library of resveratrol analogues as inhibitors of COX-1, COX-2 and NF- $\kappa$ B. *Bioorg Med Chem* (2009) 17: 1044-1054

- Karim S, Habib A, Lévy-Toledano S, Maclouf J: Cyclooxygenase-1 and -2 of endothelial cells utilize exogenous or endogenous arachidonic acid for transcellular production of thromboxane. *J Biol Chem.* (1996) 271(20): 12042-12048
- Katsuyama K, Shichiri M, Kato H, Imai T, Marumo F, Hirata Y: Differential inhibitory actions by glucocorticoid and aspirin on cytokine-induced nitric oxide production in vascular smooth muscle cells. *Endocrinology* (1999) 140(5): 2183-2190
- Kimura Y, Okuda H, Arichi S: Effects of stilbenes on arachidonate metabolism in leukocytes. *Biochim Biophys Acta* (1985) 834(8): 275-278
- Kirk RI, Deitch JA, Wu JM, Lerea KM: Resveratrol decreases early signaling events in washed platelets but has little effect on platelets in whole blood. *Blood Cells Mol Dis* (2000) 26(2): 144-150
- Klouche M: Diagnostic methods for platelet function analysis. *Tranfus Med Hemother* (2007) 34: 20-32
- Kopp E, Ghosh S: Inhibition of NF- $\kappa$ B by sodium salicylate and aspirin. *Science* (1994) 265(5174): 956-9
- Kopp P: Resveratrol, a phytoestrogen found in red wine. A possible explanation for the "French paradox"? *Eur J Endocrinol* (1998) 138(6): 619-620
- Krauel K, Pötschke C, Weber C, Kessler W, Fürll B, Ittermann T, Maier S, Hammerschmidt S, Bröker BM, Greinacher A: Platelet factor 4 binds to bacteria, [corrected] inducing antibodies cross-reacting with the major antigen in heparin-induced thrombocytopenia. *Blood.* (2011) 117(4):1370-8 Epub 2010
- Kudo I, Murakami M: Phospholipase A2 enzymes. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* (2002) 68-69: 3-58
- Kümmerle AE, Sperandio da Silva GM, Sant'Anna GM, Barreiro EJ, Fraga CA: A proposed molecular basis for the selective resveratrol inhibitor of the PGHS-1 peroxidase activity. *Bioorg Med Chem* (2005) 13(21): 5981-5985
- Kuhnle G, Spencer JP, Chowrimootoo G, Schroeter H, Debnam ES, Srail SK, Rice-Evans C, Hahn U. Resveratrol is absorbed in the small intestine as resveratrol glucuronide. *Biochem Biophys Res Commun* (2000) 272: 212-217
- Kulkarni S, Dopheide SM, Yap CL, Ravanat C, Freund M, Mangin P, Heel KA, Street A, Harper IS, Lanza F, Jackson SP: A revised model of platelet aggregation. *J Clin Vest* (2000) 105: 783-791
- Kyungmin I, Jongbong P, Heonyong P: Resveratrol in high doses acts as an apoptotic inducer in endothelial cells. *Cancer Res Treat* (2006) 38(1): 48-53
- de Lange DW, Verhoef S, Gorter G, Kraaijenhagen RJ, van de Wiel A, Akkerman JW: Polyphenolic grape extract inhibits platelet activation through PECAM-1: an explanation for the French paradox. *Alcohol Clin Exp Res* (2007) 31(8): 1308-1314
- Langenbach R, Morham SG, Tiano HF, Loftin CD, Ghanayem BI, Chulada PC, Mahler JF, Lee CA, Goulding EH, Kluckman KD, Kim HS, Smithies O: Prostaglandin synthase 1 gene disruption in mice reduces arachidonic acid-induced inflammation and indomethacin-induced gastric



- ulceration.  
Cell (1995) 83(3): 483-492
- Lanza F, Beretz A, Stierle A, Hanau D, Kubina M, Cazenave JP: Epinephrine potentiates human platelet activation but is not an aggregating agent. Am J Physiol Heart Circ (1988) 255(6): 1276-1288
- Larrosa M, Yanez-Gascon MJ, Selma MV, Gonzales-Sarrias A, Toti S, Ceron JJ, Tomas-Barberan F, Dolara P, Espin JC: Effect of a low dose of dietary resveratrol on colon microbionota, inflammation and tissue damage in a DSS-induced colitis rat model. J Agric Food Chem (2009) 57(6): 2211-2220
- Lecomte M, Laneuville O, Ji C, DeWitt DL, Smith WL: Acetylation of human prostaglandin endoperoxide synthase-2 (cyclooxygenase-2) by aspirin. J Biol Chem (1994) 269(18): 13207-13215
- Levine SP, Towell BL, Suarez AM, Knieriem LK, Harris MM, George JN: Platelet activation and secretion associated with emotional stress. Circulation (1985) 71(6): 1129-1134
- Lekli I, Szabo G, Juhasz B, Das S, Das M, Varga E, Szendrei L, Gesztelyi R, Varadi J, Bak I, Das DK, Tosaki A: Protective mechanisms of resveratrol against ischemia-reperfusion-induced damage in hearts obtained from Zucker obese rats: The role of GLUT-4 and endothelin. Am J Physiol Heart Circ Physiol (2008) 294: 859-866
- Li H, Förstermann U: Resveratrol: a multifunctional compound improving endothelial function. Cardiovasc Drugs Ther (2009) 23: 425-429
- Lin KH, Hsiao G, Shih CM, Chou DS, Sheu JR: Mechanisms of resveratrol-induced platelet apoptosis. Cardiovasc Res (2009) 83(3): 575-585
- Likhtenshtein G: Stilbenes. Application in Chemistry, Life Science and Material Science (2010) 1. Auflage, Wiley VCH Verlag GmbH & Co. KGaA Weinheim
- Liu JC, Chen JJ, Chan P, Cheng CF, Cheng TH: Inhibition of cyclic strain-induced endothelin-1 gene expression by resveratrol. Hypertension (2003) 42(6): 1198-1205
- Loll PJ, Picot D, Garavito RM: The structural basis of aspirin activity inferred from the crystal structure of inactivated prostaglandin H2 synthase. Nat Struct Biol (1995) 2(8): 637-643
- Lordkipanidzé M, Pharand C, Schampaert E, Turgeon J, Palisaitis D, Diodati J: A comparison of six platelet function tests to determine the prevalence of aspirin resistance in patients with stable coronary artery disease. Eur Heart J (2007) 28: 1702-1708
- Lukasik M, Dworacki G, Michalak S, Kufel-Grabowska J, Golanski J, Watala C, Kozubski W: Aspirin treatment influences platelet-related inflammatory biomarkers in healthy individuals but not in acute stroke patients. Thromb Res. (2011) Jul 23 Epub ahead of print
- Lüscher TF, Barton M: Biology of the Endothelium. Clin Cardiol (1997) 20(II): 3-10
- Macey MG, Wolf SI, Lawson C: Microparticle formation after exposure of blood to activated endothelium under flow. Cytometry A (2010) 77(8): 761-768
- Maccarrone M, Lorenzon T, Guerrieri P, Agrò AF: Resveratrol prevents apoptosis in K562 cells by inhibiting lipoxygenase and cyclooxygenase

- activity. *Euro J Biochem* (1999) 265: 27-34
- Madajka M, Korda M, White J, Malinski T: Effect of aspirin on constitutive nitric oxide synthase and the bioavailability of NO. *Thromb Res* (2003) 110(5-6): 317-321
- Madlener K, Pötzsch B (Hrsg.): Hämostasesystem. In: Hämostaseo-logie (2010) 2., vollst. akt. und erw. Auflage, Springer-Verlag Berlin
- Maede EA, Smith WL, DeWitt DL: Differential inhibition of prostaglandin endoperoxide synthase (cyclooxygenase) isoenzymes by aspirin and other non-steroidal antiinflammatory drugs. *J Biol Chem* (1993) 268: 6610-6614
- Malinowska J, Olas B: Effect of resveratrol on hemostatic properties of human fibrinogen and plasma during model of hyperhomocysteinemia. *Thromb Res* (2010) 126(5): e379-382
- Mani H, Wolf Z, Lindhoff-Last E: Fortschritte in der Thrombozyten-funktionsdiagnostik. *Hämostaseologie* (2010) 4(30): 217-229
- Maree AO, Curtin RJ, Chubb A, Dolan C, Cox D, O'Brien J, Crean P, Shields DC, Fitzgerald DJ: Cyclooxygenase-1 haplotype modulates platelet response to aspirin. *J Thromb Haemost* (2005) 3(10): 2340-2345
- Marnett LJ: Cyclooxygenase mechanisms. *Curr Opin Chem Biol* (2000) 4(5): 545-552
- Marnett LJ, Rowlinson SW, Goodwin DC, Kalgutkar AS, Lanzo CA: Arachidonic Acid Oxygenation by COX-1 and COX-2: Mechanisms of catalysis and inhibition. *J Biol Chem* (1999) 274: 22903-22906
- Mattiello T, Guerriero R, Lotti L, Gaudio C, Frati L, Pucinelli FM: Evidence of aspirin excretion from platelets by MRP4 transport responsible for reduced drug activity in patients 5 days CABS. *J Thromb Haemost* (2007) 5(2): O-T-070
- Maxwell MJ, Westein E, Nesbitt WS, Giuliano S, Dopheide SM, Jackson SP: Identification of a 2-stage platelet aggregation process mediating shear-dependant thrombus formation. *Blood* (2007) (109(2): 566-576
- May AE: Akutes Koronarsyndrom. In: Madlener K, Pötzsch B (Hrsg.) Hämostaseologie (2010) 2., vollst. akt. und erw. Auflage, Springer-Verlag Berlin
- Mazière C, Goldstein S, Moreau M, Mazière JC, Polonovski J: Aspirin induces alterations in low-density lipoproteins and decreases its catabolism by cultured human fibroblasts. *FEBS Lett* (1987) 218(2): 243-246
- McAdam BF, Catella-Lawson F, Mardini IA, Kapoor S, Lawson JA, FitzGerald GA: Systemic biosynthesis of prostacyclin by cyclooxygenase (COX)-2: the human pharmacology of a selective inhibitor of COX-2. *Proc Natl Acad Sci USA* (1999) 96(1): 272-277
- McEver RP, Beckstead JH, Moore KL, Marshall-Carlson L, Bainton DF: GMP-140, a platelet  $\alpha$ -granule membrane protein, is also synthesized by vascular endothelial cells and is localized in Weibel-Palade bodies. *J Clin Invest* (1989) 84: 92-99
- McGill HC Jr, McMahan CA, Herderick EE, Tracy RE, Malcom GT, Zieske AW, Strong JP: Effects of coronary heart disease risk factors on atherosclerosis of selected regions of the aorta and right coronary artery. PDAY Research Group.

- Pathobiological Determinants of Atherosclerosis in Youth. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* (2000) 20(3): 836-845
- McKee S, Sane D, Deliargyris E: Aspirin resistance in cardiovascular disease: a review of prevalence, mechanisms, and clinical significance. *Thromb Haemost* (2002) 88: 711-715
- Mehrabian M, Allayee H, Wong J, Shi W, Wang XP, Shaposhnik Z, Funk CD, Lusis AJ: Identification of 5-lipoxygenase as a major gene contributing to atherosclerosis susceptibility in mice. *Circ Res.* (2002) 91(2): 120-126
- Mitchell JA, Warner TD: COX isoforms in the cardiovascular system: understanding the activities of non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Nat Rev Drug Discov* (2006) 5(1): 75-86
- Möbert J, Becker BF: Cyclooxygenase inhibition aggravates ischemia-reperfusion injury in the perfused guinea pig heart: involvement of isoprostanes. *J Am Coll Cardiol.* (1998) 31(7): 1687-1694
- Möller P: Quantitatives Monitoring der Thrombozytenadhäsivität mit dem Platelet Adhesion Assay (PADA) bei Patienten mit akuter zerebraler Ischämie. (2010) Digitale Bibliothek Thuringen (Germany) <http://www.db-thuringen.de/servlets/DocumentServlet?id=16314> (05.01.2011)
- Moncada S, Higgs EA, Vane JR: Human arterial and venous tissues generate prostacyclin (prostaglandin X), a potent inhibitor of platelet aggregation. *Lancet* (1977) i: 18-21
- Montuschi P, Barnes PJ, Roberts LJ 2nd: Isoprostanes: markers and mediators of oxidative stress. *FASEB J.* (2004) 18(15): 1791-800.
- Moritz MW, Reimers RC, Baker RK, Sutura SP, Joist JH: Role of cytoplasmic and releasable ADP in platelet aggregation induced by laminar shear stress. *J Lab Clin Med* (1983) 101(4): 537-544
- Morrow JD, Hill KE, Burk RF, Nammour TM, Badr KF, Roberts LJ: A series of prostaglandin F<sub>2</sub>-like compounds are produced in vivo in humans by a non-cyclooxygenase, free radical-catalyzed mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA* (1990) 87: 9383-9387
- Mueller MR, Salat A, Stangl P, Murabito M, Pulaki S, Boehm D, Koppensteiner R, Ergun E, Mittlboeck M, Schreiner W, Losert U, Wolner E: Variable platelet response to low-dose ASA and the risk of limb deterioration in patients submitted to peripheral arterial angioplasty. *Thromb Haemost* (1997) 78: 1003-1007
- Mukherjee S, Dudley JI, Das DK: Dose-dependency of resveratrol in providing health benefits. *Dose response* (2010) 8(4): 478-500
- Mulivor AW, Lipowsky HH: Inflammation- and ischemia-induced shedding of venular glycocalyx. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* (2004) 286: H1672-H1680
- Musselmann D, Marzel UM, Manatunga A, Penna S, Reemsnyder A, Knight BT, Baron A, Hanson SR, Nemeroff CB: Platelet reactivity in depressed patients treated with paroxetine. *Arch Gen Psychiatry* (2000) 57: 875-882
- Nakata R, Takahashi S, Inoue H: Recent advances in the study on resveratrol. *Biol Pharm Bull* (2012) 35(3): 273-279
- Nascimento-Silva V, Arruda MA, Barja-Fidalgo C, Villela CG, Fierro IM: Novel lipid mediator aspirin-triggered lipoxin A<sub>4</sub> induces heme

- oxygenase-1 in endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* (2005) 289(3): 557-563
- Nowak G, Wiesenburg A, Schuman A, Bucha E: Platelet adhesion assay – a new quantitative whole blood test to measure platelet function. *Semin Thromb Hemost* (2005) 31(4): 470-475
- Nowak G: From aspirin to aspirin resistance – history, biochemical background, diagnostics and clinical relevance. *Tranfus Med Hemother* (2007) 34: 413-419
- (a) Nowak G: Heparin-induced thrombocytopenia (HIT II) - a drug-associated autoimmune disease. *Thromb Haemost* (2009) 102: 887-891
- (b) Nowak G: PADA-RASS: Method der Labordiagnose der Aspirinresistenz. Patent-De (2009) <http://www.patentde.com/20091119/DE102008022189A1.html> (05.01.2011)
- Numminem H, Kobayashi M, Uchiyama S, Iwata M, Ikeda Y, Riutta A, Syrjälä M, Kekomäki R, Hillbom M: Effect of alcohol and the evening meal on shear-induced platelet aggregation and urinary excretion of prostanoids. *Alcohol Alcohol* (2000) 35(6): 594-600
- Oberle S, Polte T, Abate A, Podhaisky HP, Schröder H: Aspirin increases ferritin synthesis in endothelial cells: a novel antioxidant pathway. *Circ Res* (1998) 82(9): 1016-1020
- O'Brien JR: Effects of salicylates on human platelets. *Lancet* (1968) i: 779
- Oestreich JH, Smyth SS, Campbell LC: Platelet function analysis: at the edge of meaning. *Thromb Haemost* (2009) 101(2): 217-219
- Oeth P, Mackmann N: Salicylates inhibit lipopolysaccharide-induced transcriptional activation of the tissue factor gene in human monocytic cells. *Blood* (1995) 86(11): 4144-4152
- Offermanns S: Activation of platelet function through G protein-coupled receptors. *Blood* (2006) 99: 1293-1304
- Offermanns S: Thrombozytäre Signaltransduktion. In: Madlener K, Pötzsch B (Hrsg.) *Hämostaseologie* (2010) 2., vollst. akt. und erw. Auflage, Springer-Verlag Berlin
- Olas B, Wachowicz B, Saluk-Juszczak J, Zielinski T, Kaca W, Buczynski A: Antioxidant activity of resveratrol in endotoxin-stimulated blood platelets. *Cell Biol Toxicol* (2001) 17 (2): 117-125
- Olas B, Wachowicz B, Saluk-Juszczak J, Zielinsky T: Effect of resveratrol, a natural phenolic compound, on platelet activation induced by endotoxin or thrombin. *Thromb Res* (2002) 107(3-4): 141-145
- Olas B, Wachowicz B, Holmsen H, Fukami MH: Resveratrol inhibits polyphosphoinositide metabolism in activated platelets. *Biochim Biophys Acta* (2005) 1714(2): 125-133
- Olas B, Nowak P, Ponczek M, Wachowicz B: Resveratrol, a natural phenolic compound may reduce carbonylation proteins induced by peroxynitrite in blood platelets. *Gen Physiol Biophys* (2006) 25: 215-222
- Olson ER, Naugle JE, Zhang X, Bomser JA, Meszaros JG: Inhibition of cardiac fibroblast proliferation and myofibroblast differentiation by resveratrol. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* (2005) 288: 131-138
- Pace-Asciak CR, Hahn S, Diamandis EP, Soleas G, Goldberg DM: The red wine phenolics trans-resveratrol and quercetin block human platelet aggregation and eicosanoid synthesis: implications for

- protection against coronary heart disease. *Clin Chim Acta.* (1995) 235(2): 207-219
- Pace-Asciak CR: The hepxilins and some analogues: a review of their biology. *Brit J Pharmacol* (2009) 158: 972-981
- Patel KR, Brown VA, Jones DJL, Britton RG, Hemingway D, Miller AS, West KP, Booth TD, Perloff M, Crowell JA, Brenner DE, Stewart WP, Gescher AJ, Brown K: Clinical pharmacology of resveratrol and its metabolites in colorectal cancer patients. *Cancer Res* (2010) 70(19): 7392-7399
- Patrico D, Tangirala RK, Rader DJ, Rokach J, FitzGerald GA: Vitamin E suppresses isoprostane generation in vivo and reduces atherosclerosis in ApoE-deficient mice. *Nat Med* (1998) 4(10): 1189-1192
- Patrono C, FitzGerald GA: Isoprostanes: potential markers of oxidant stress in atherothrombotic disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* (1997) 17(11): 2309-2315
- Patrono C, Collar B, Dalen J, Fuster V, Gent M, Harker L, Hirsh J, Roth G: Platelet-active drugs: the relationships among dose, effectiveness, and side effects. *Chest* (1998) 114: 470S-488S
- Patrono C: Aspirin resistance: definition, mechanisms and clinical read-outs. *J Thromb Haemost* (2003) 1: 1710-1713
- Pearson KJ, Baur JA, Lewis KN, Peshkin L, Price NL, Labinsky N, Swindell WR, Kamara D, Minor RK, Perez E, Jamieson HA, Zhang Y, Dunn SR, Sharma K, Pleshko N, Woollett LA, Csiszar A, Ikeno Y, Le Couteur D, Elliott PJ, Becker KG, Navas P, Ingram DK, Wolf NS, Ungvari Z, Sinclair DA, de Cabo R: Resveratrol delays age-related deterioration and mimics transcriptional aspects of dietary restriction without extending life span. *Cell Metab* (2008) 8(2): 157-68
- Pendurthi UR, Williams JT, Rao LVM: Resveratrol, a polyphenolic compound found in red wine, inhibits tissue factor expression in vascular cells: a possible mechanism for the cardiovascular benefits associated with moderate consumption of wine. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* (1999) 19: 419-426
- Perkkiö J, Wurzinger LJ, Schmid-Schönbein H: Plasma and platelet skimming at T-junctions. *Thromb Res* (1987) 45(5): 516-526
- Pignatelli P, Ghiselli A, Buchetti B, Carnevale R, Natella F, Germano G, Fimognari F, Di Santo S, Lenti L, Violi F: Polyphenols synergistically inhibit oxidative stress in subjects given red and white wine. *Atherosclerosis* (2006) 188(1): 77-83
- Rajakariar R, Yaqoob MM, Gilroy DW: COX-2 in inflammation and resolution. *Mol Invest* (2000) 6(4): 199-207
- Ramsey KH, Sigar IM, Rana SV, Gupta J, Holland SM, Byrne GI, Morrow JD: Inducible nitric oxide synthase regulates production of isoprostanes in vivo during chlamydial genital infection in mice. *Infect Immun.* (2003) 71(12): 7183-7187
- Reilly IA, FitzGerald GA: Inhibition of thromboxane formation in vivo and ex vivo: implications for therapy with platelet inhibitory drugs. *Blood* (1987) 69(1): 180-186
- Reininger AJ: Koagulatorische Aktivität der Thrombozyten. *Haemo* (2007) 4: 247-250
- Ridker PM, Cushman M, Stampfer MJ, Tracy RP, Hennekens CH: Inflammation, aspirin, and the risk

- of cardiovascular disease in apparently healthy men. *N Engl J Med* (1997) 336 (14): 973-979
- Rinder CS, Student LA, Bonan JL, Rinder HM, Smith BR: Aspirin does not inhibit adenosine diphosphate-induced platelet alpha-granule release. *Blood*. (1993) 82(2): 505-12.
- Rocca B, Secchiero P, Ciabattini G, Ranelletti FO, Catani L, Guidotti L, Melloni E, Maggiano N, Zauli G, Patrono C: Cyclooxygenase-2 expression is induced during human megakaryopoiesis and characterizes newly formed platelets. *Proc Natl Acad Sci U S A*. (2002) 99(11): 7634-7639
- Roth GJ, Stanford N, Majerus PW: Acetylation of prostaglandin synthase by aspirin. *Proc Natl Acad Sci USA* (1975) 72: 3073–3076
- Rowlinson SW, Crews BC, Goodwin DC, Schneider C, Gierse JK, Marnett LJ: Spatial requirements for 15-(*R*)-Hydroxy-5Z,8Z,11Z,13E-eicosatetraenoic acid synthesis within the cyclooxygenase active site of murine COX-2. *J Biol Chem* (2000) 275(9): 6586-6591
- Ruggeri ZM, Orje JN, Habermann R, Federici AB, Reininger AJ: Activation-independent platelet adhesion and aggregation under elevated shear stress. *Blood* (2006) 108 (6): 1903-1910
- Ryter SW, Otterbein LE: Carbon monoxide in biology and medicine. *Bioessays* (2004) 26(3): 270-280
- (a) De Santi C, Pietrabissa A, Mosca F, Pacifici GM: Glucuronidation of resveratrol, a natural product present in grape and wine, in the human liver. *Xenobiotica* (2000) 30(11): 1047-1054
- (b) De Santi C, Pietrabissa A, Mosca F, Pacifici GM: Sulphation of resveratrol, a natural product present in wine, and its inhibition by natural flavonoids. *Xenobiotica* (2000) 30(9): 857-866
- Saunders MA, Sansores-Garcia L, Gilroy DW, Wu KK: Selective suppression of CCAAT/enhancer-binding protein  $\beta$  binding and cyclooxygenase-2 promoter activity by sodium salicylate in quiescent human fibroblasts. *J Biol Chem* (2001) 276(22): 18897-18904
- Savage B, Ruggeri Z: Selective recognition of adhesive sites in surface-bound fibrinogen by glycoprotein IIb-IIIa on nonactivated platelets. *J Biol Chem* (1991) 266(17): 11227-11233
- Savage B, Saldívar E, Ruggeri ZM: Initiation of platelet adhesion by arrest onto fibrinogen or translocation on von Willebrand factor. *Cell* (1996) 84(2): 289-97
- Schmidt V: Beaufindungsinduzierte Veränderung von Thrombozyten – Labormethodische Aspekte. *phil Diss FSU Jena* (2009)
- Schneider DJ, Baumann PQ, Holmes MB, Taatjes DJ, Sobel BE: Time and dose dependent augmentation of inhibitory effects of abciximab by aspirin. *Thromb Haemost* (2001) 85: 309-13
- Schrör K: Acetylsalicylsäure (1992) Georg Thieme Verlag Stuttgart
- Schrör K: Acetylsalicylic acid (2008) 1. Auflage, Wiley VCH Verlag GmbH & Co. KGaA Weinheim
- Schrör K: What is aspirin resistance? *Br J Cardiol* (2009) 17(1): 5-7
- Schrör K: Antiaggregatorische Therapie. In: Madlener K, Pötzsch B (Hrsg.) *Hämostaseologie* (2010) 2., vollst. akt. und erw. Auflage, Springer-Verlag Berlin
- Serhan CN, Maddox JF, Petasis NA, Akritopoulou-Zanze I, Papayianni

- A, Brady HR, Colgan SP, Madara JL: Design of lipoxin A4 stable analogs that block transmigration and adhesion of human neutrophils. *Biochemistry* (1995) 34(44): 14609-14615
- Serhan CN: Lipoxins and aspirin-triggered 15-epi-lipoxins are endogenous components of antiinflammation: emergence of the counterregulatory side. *Arch Immunol Ther Exp* (2001) 49(3): 177-188
- Serhan CN: Resolvins and protectins: novel lipid mediators in anti-inflammation and resolution. *Scand J Food Nutr* (2006) 50(2): 68-78
- Shen MY, Hsiao G, Liu CL, Fong KH, Chou DS, Sheu JR: Inhibitory mechanisms of resveratrol in platelet activation: pivotal roles of p38 MAPK and NO/cyclic GMP. *Br J Haematol* (2007) 139(3): 475-485
- Shigematsu S, Ishida S, Hara M, Takahashi N, Yoshimatsu H, Sakata T, Korthuis RJ: Resveratrol, a red wine constituent polyphenol, prevents superoxide-dependent inflammatory response induced by ischemia-reperfusion, platelet-activating factor, or oxidants. *Free Radic Biol Med* (2003) 34 (7): 810-817
- Simmons DL, Botting RM, Hla T: Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. *Pharmacol Rev.* (2004) 56(3): 387-437
- Singh UP, Singh NP, Singh B, Hofseth LJ, Price RL, Nagarkatti M, Nagarkatti PS: Resveratrol (trans-3,5,4'-trihydroxystilbene) induces silent mating type information regulation-1 and down-regulates nuclear transcription factor-kappaB activation to abrogate dextran sulfate sodium-induced colitis. *J Pharmacol Exp Ther* (2010) 332(3): 829-39
- Smith JB, Ingermann C, Silver MJ: Persistence of thromboxane A2-like material and platelet release-inducing activity in plasma. *J Clin Invest* (1976) 58(5): 1119-1122
- Sobolev VS, Cole RJ: Trans-resveratrol content in commercial peanuts and peanut products. *J Agric Food Chem* (1999) 47(4): 1435-1439
- Soleas GJ, Goldberg DM, Diamandis EP, Karumanchiri A, Yan J, NG E: A Derivatized gas chromatographic-mass spectrometry method for the analysis of both isomers of resveratrol in juice and wine. *Am J Enol Vitic* (1995) 46(3): 346-352
- Spanier G, Xu H, Xia N, Tobias S, Deng S, Wojnowsky N, Förstermann U, Li H: Resveratrol reduced endothelial oxidative stress by modulating the gene expression of superoxide dismutase 1 (SOD1), glutathione peroxidase 1 (GPX1) and NADPH oxidase subunit (Nox4). *J Physiol Pharmacol* (2009) 60 (4): 111-116
- Sridhar GR, Nageswara Rao PV, Kaladhar DS, Devi TU, Kumar SV: In Silico Docking of HNF-1a Receptor Ligands. *Adv Bioinformatics.* (2012) 2012:705435. doi: 10.1155/2012/705435. Epub 2012
- Statistisches Bundesamt: Mortalität akuter Myokardinfarkt. [http://www.gbe-bund.de/gbe10/abrechnung.prc\\_abr\\_test\\_logon?p\\_uid=gastg&p\\_aid=&p\\_knoten=FID&p\\_sprache=D&p\\_suchstring=9115::Gestorbene#T5](http://www.gbe-bund.de/gbe10/abrechnung.prc_abr_test_logon?p_uid=gastg&p_aid=&p_knoten=FID&p_sprache=D&p_suchstring=9115::Gestorbene#T5) (30.4.2013)
- Steer KA, Wallace TM, Bolton CH, Hartog M: Aspirin protects low density lipoprotein from oxidative modification. *Heart* (1997) 77: 333-337
- Stef G, Csiszar A, Lerea K, Ungvari Z, Veress G: Resveratrol inhibits aggregation of platelets from high-risk cardiac patients with aspirin resistance. *J Cardiovasc Pharmacol* (2006) 48: 1-5

- Steffel J, Lüscher TF, Tanner FC: Tissue factor in cardiovascular diseases: molecular mechanism and clinical implications. *Circulation* (2006) 113(5): 722-731
- Sternberg PE, McEver RP, Shuman MA, Jaques YV, Bainton DF: A platelet alpha-granule membrane protein (GMP-140) is expressed on the plasma membrane after activation. *J Cell Biol* (1985) 10: 880-886
- Sun S, Hao H, Gong P, Tang Z, Li F, Chen X, Shi H, Wang G: Protocatechualdehyde Synergizes with Aspirin at the Platelet Cyclooxygenase-1 Level. *Planta Med.* (2011) Epub ahead of print
- Szewczuk LM, Forti L, Stivala LA, Penning TM: Resveratrol is a peroxidase-mediated inactivator of COX-1 but not of COX-2: a mechanistic approach to the design of COX-1 selective agents. *J Biol Chem* (2004) 279(21): 22727-22737
- Takahashi S, Nakashima Y: Repeated and long-term treatment with physiological concentrations of resveratrol promotes NO production in vascular endothelial cells. *Br J Nutr* (2011) 107(6): 774-780
- Taubert D, Berkels R, Grosser N, Schröder H, Gründemann D, Schömig E: Aspirin induces nitric oxide release from vascular endothelium: a novel mechanism of action. *Br J Pharmacol* (2004) 143(1): 159-165
- Taylor DW, Barnett HJ, Haynes RB, Ferguson GG, Sackett DL, Thorpe KE, Simard D, Silver FL, Hachinski V, Clagett GP, Barnes R, Spence JD: Low-dose and high-dose acetylsalicylic acid for patients undergoing carotid endarterectomy: a randomised controlled trial. *Lancet* (1999) 353(9171): 2179-2184
- Tesfamariam B, Brown ML, Cohen RA: 15-Hydroxyeicosatetraenoic acid and diabetic endothelial dysfunction in rabbit aorta. *J Cardiovasc Pharmacol* (1995) 25(5): 748-755
- True AL, Olive M, Boehm M, San H, Westrick RJ, Raghavachari N, Xu X, Lynn EG, Sack MN, Munson PJ, Gladwin MT, Nabel EG: *Circ Res* (2007) 101(9): 893-901
- Upchurch GR Jr, Ramdev N, Walsh MT, Loscalzo J: Prothrombotic consequences of the oxidation of fibrinogen and their inhibition by aspirin (1998) *J Thromb Thrombolysis* 5: 9–14
- Vane JR: Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nature – New Biology* (1971) 231: 232-235
- Vane JR, Bakhle YS, Botting RM: Cyclooxygenase 1 and 2. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* (1998) 38: 97-120
- Verschuren L, Wielinga PY, van Duyvenvoorde W, Tijani S, Toet K, van Ommen B, Kooistra T, Kleemann R: A dietary mixture containing fish oil, resveratrol, lycopene, catechins, and vitamins E and C reduces atherosclerosis in transgenic mice. *J Nutr* (2011) 141(5): 863-869
- Virmani R, Kolodgie FD, Burke AP, Farb A, Schwartz SM: Lessons from sudden coronary death: A comprehensive morphological classification scheme of atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* (2000) 20: 1262-1275
- Walle T, Hsieh F, DeLegge MH, Oatis JE Jr, Walle UK: High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans. *Drug Metab Dispos* (2004) 32(12): 1377-1382



- Wang Z, Huang Y, Zou J, Cao K, Xu Y, Wu JM: Effects of red wine and wine polyphenol resveratrol on platelet aggregation in vivo and in vitro. *Int J Mol Med* (2002) 9(1): 77-79
- Warkentin TE, Sheppard JA, Horsewood P, Simpson PJ, Moore JC, Kelton JG: Impact of the patient population on the risk for heparin-induced thrombocytopenia. *Blood*. (2000) 96(5): 1703-1708
- Weber AA, Zimmermann KC, Meyer-Kirchrath J, Schrör K: Cyclooxygenase-2 in human platelets as a possible factor in aspirin resistance. *Lancet* (1999) 353(9156): 900
- a) Weber AA, Przytulski B, Schumacher M, Zimmermann N, Gams E, Hohlfeld T, Schrör K: Flow cytometry analysis of platelet cyclooxygenase-2 expression: induction of platelet cyclooxygenase-2 in patients undergoing coronary artery bypass grafting. *Br J Haematol*. (2002) 117(2): 424-426.
- b) Weber AA, Przytulski B, Schanz A, Hohlfeld T, Schrör K: Towards a definition of aspirin resistance: a typological approach. *Platelets* (2002) 13: 37-40
- Weber AA, Adamzik M, Bachmann HS, Görlinger K, Grandoch M, Leineweber K, Müller-Beißenhirtz H, Wenzel F, Naber C: Methods to evaluate the pharmacology of oral antiplatelet drugs. *Herz* (2008) 33: 287-296
- Weiss HJ, Aledort LM, Kochwa S: The effects of salicylates in the hemostatic properties of platelets in man. *J Clin Invest* (1968) 47: 2169
- Wendeburg L, de Oliveira AC, Bhatia HS, Candelario-Jalil E, Fiebich BL: Resveratrol inhibits prostaglandin formation in IL-1 $\beta$ -stimulated SK-N-SH neuronal cells. *J Neuroinflammation*. (2009) 6:26
- Wilcox JN, Smith KM, Schwartz SM, Gordon D: Localization of tissue factor in the normal vessel wall and in the atherosclerotic plaque. *Proc Natl Acad Sci USA* (1989) 86: 2839-2843
- Williams CS, DuBois RN: Prostaglandin endoperoxidase synthase: Why two isoforms? *Am J Physiol* (1996) 270: G393-G400
- Wu CC, Wu CI, Wang WY, Wu YC: Low concentrations of resveratrol potentiate the antiplatelet effect of prostaglandins. *Planta Med* (2007) 73(5): 439-443
- Yang YM, Chen JZ, Wang XX, Wang SJ, Hu H, Wang HQ: Resveratrol attenuates thromboxane A2 receptor agonist-induced platelet activation by reducing phospholipase C activity. *Eur J Pharmacol*. (2008) 583(1): 148-55
- Yi CO, Jeon BT, Shin HJ, Jeong EA, Chang KC, Lee JE, Lee DH, Kim HJ, Kang SS, Cho JG, Choi WS, Roh GS: Resveratrol activates AMPK and suppresses LPS-induced NF- $\kappa$ B-dependent COX-2 activation in RAW 264.7 macrophage cells. *Anat Cell Biol*. (2011) 44(3): 194-203
- Yokoyama S, Ikeda H, Haramaki N, Yasukawa H, Murohara T, Imaizumi T: Platelet P-selectin plays an important role in arterial thrombogenesis by forming large stable platelet-leucocyte aggregates. *J Am Coll Cardiol* (2005) 45: 1280-1286
- Yu Z, Crichton I, Tang SY, Hui Y, Ricciotti E, Levin MD, Lawson JA, Puré E, FitzGerald GA: Disruption of the 5-lipoxygenase pathway attenuates atherogenesis consequent to COX-2 deletion in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. (2012) 109(17): 6727-6732 Epub 2012

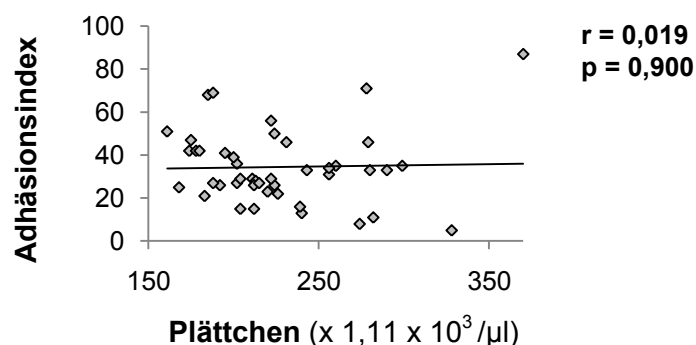
- Zbikowska HM, Olas B, Wachowicz B, Krajewski T: Response of blood platelets on resveratrol. *Platelets* (1999) 10(4): 247-252
- Zbikowska HM, Olas B: Antioxidants with carcinostatic activity (resveratrol, vitamin E and selenium) in modulation of blood platelet adhesion. *J Physiol Pharmacol* (2000) 51(3): 513-520
- Zeilinger M, Hübl W:  
[http://www.med4you.at/laborbefunde/techniken/durchflusszytometrie/lbef\\_durchflusszytometrie.htm](http://www.med4you.at/laborbefunde/techniken/durchflusszytometrie/lbef_durchflusszytometrie.htm)  
(18.06.2011)
- Zhao B, Dierichs R, Harrach-Ruprecht B, Winterhorff H: Oxidized LDL induces serotonin release from blood platelets. *Am J Hematol* (1995) 48(4): 285-287
- Zhuang H, Kim YS, Koehler RC, Doré S: Potential mechanism by which resveratrol, a red wine constituent, protects neurons. *Ann N Y Acad Sci* (2003) 993: 276-286  
Discussion 287-288
- Zimmermann N, Wenk A, Kim U, Kienzle P, Weber AA, Gams E, Schrör K, Hohlfeld T: Functional and biochemical evaluation of platelet aspirin resistance after coronary artery bypass surgery. *Circulation*. (2003) 108(5): 542-7. Epub 2003
- Zimmermann N, Hohlfeld T: Clinical implications of aspirin resistance. *Thromb Haemost* (2008) 100(3): 379-390
- Zotz RB, Winkelmann BR, Müller C, Boehm BO, März W, Scharf RE: Association of polymorphisms of platelet membrane integrins  $\alpha_{IIb}\beta_3$  (HPA-1b/PI<sup>A2</sup>) and  $\alpha_2\beta_1$  ( $\alpha_2807TT$ ) with pre-mature myocardial infarction. *J Thrombosis Haemostasis* (2005) 3(7): 1522-1529
- Zou JG, Huang YZ, Chen Q, Wie EH, Hsieh TC, Wu JM: Resveratrol inhibits copper ion-induced and azo compound-initiated oxidative modification of human low density lipoprotein. *Biochem Mol Biol Int* (1999) 47(6): 1089-1096
- Zykova TA, Zhu F, Zhai X, Ma W, Ermakova SP, Lee KW, Bode AM, Dong Z: Resveratrol Directly Targets COX-2 to Inhibit Carcinogenesis. *Mol Carcinog*. (2008) 47(10): 797-805

## 8. Anhang

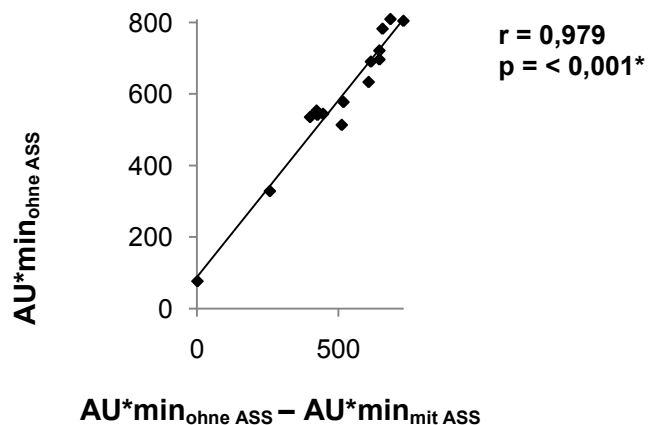
### 8.1. Abbildungen und Tabellen

**Tab. 10: Allgemeine Blutwerte** von 15 gesunden Probanden (Mittelwert  $\pm$  Standard-abweichung) in Citrat-, Hirudin- und Heparinblut an drei Tests im zeitlichen Abstand von mindestens einer Woche. Nach dem dritten Test nahmen die Probanden 375 mg Resveratrol ein und 1 h später wurde nochmals gemessen.

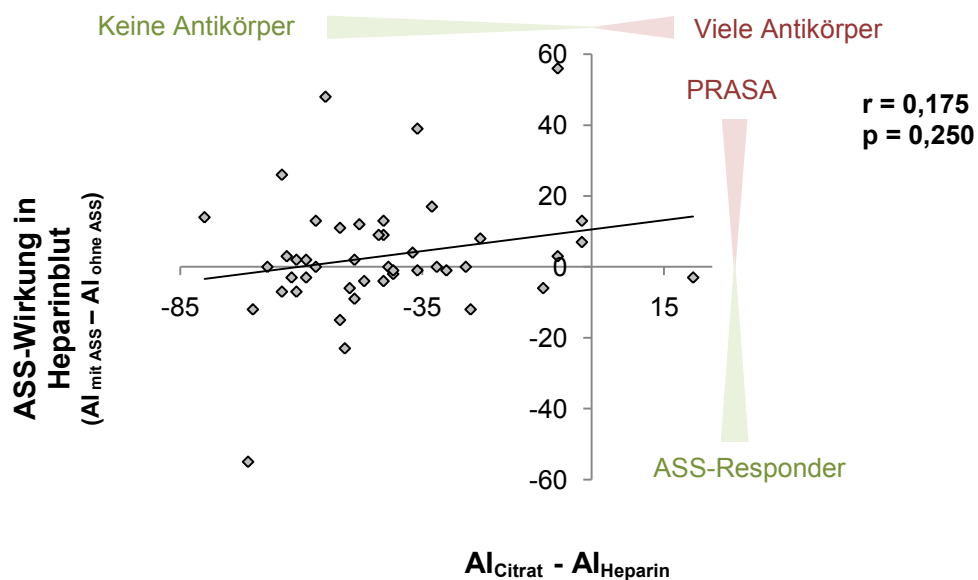
	Referenzbereich	1. Test (ohne Resveratrol)	2. Test (ohne Resveratrol)	3. Test direkt vor Resveratrol	3. Test 1 h nach Resveratrol
<b>Citrat</b>					
<b>PLT</b> ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	150-350	230,6 $\pm$ 43,6	223,7 $\pm$ 36,5	228,1 $\pm$ 55,2	229,5 $\pm$ 43,1
<b>WBC</b> ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	3,5-9	5,3 $\pm$ 1,2	5,1 $\pm$ 0,7	5,4 $\pm$ 1,4	5,7 $\pm$ 1,2
<b>HK</b> (%)	37-47	40,2 $\pm$ 2,5	39,7 $\pm$ 2,0	39,4 $\pm$ 2,3	39,0 $\pm$ 2,1
<b>HGB</b> (g/dl)	12-16	13,5 $\pm$ 1,0	13,2 $\pm$ 0,7	13,1 $\pm$ 0,9	13,0 $\pm$ 0,7
<b>Hirudin</b>					
<b>PLT</b> ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	150-350	207,9 $\pm$ 38,1	217,2 $\pm$ 35,6	223,1 $\pm$ 56,8	221,5 $\pm$ 43,4
<b>WBC</b> ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	4-10	5,9 $\pm$ 1,3	5,7 $\pm$ 0,8	6,0 $\pm$ 1,7	6,2 $\pm$ 1,2
<b>HK</b> (%)	42-52	44,5 $\pm$ 2,7	44,7 $\pm$ 2,4	44,1 $\pm$ 2,6	43,9 $\pm$ 2,4
<b>HGB</b> (g/dl)	14-18	14,8 $\pm$ 1,0	14,7 $\pm$ 0,8	14,6 $\pm$ 0,9	14,5 $\pm$ 0,8
<b>Heparin</b>					
<b>PLT</b> ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	150-350	226,7 $\pm$ 42,7	223,6 $\pm$ 37,2	227,3 $\pm$ 49,1	227,4 $\pm$ 41,7
<b>WBC</b> ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	4-10	5,9 $\pm$ 1,5	5,7 $\pm$ 0,8	5,9 $\pm$ 1,5	6,1 $\pm$ 1,2
<b>HK</b> (%)	42-52	44,3 $\pm$ 3,2	44,2 $\pm$ 2,3	43,6 $\pm$ 2,9	43,8 $\pm$ 3,7
<b>HGB</b> (g/dl)	14-18	14,7 $\pm$ 1,1	14,6 $\pm$ 0,9	14,4 $\pm$ 1,0	14,2 $\pm$ 0,9



**Abb. 28: AI von 15 gesunden Probanden in drei Tests im zeitlichen Abstand von mindestens einer Woche in Abhängigkeit von der Plättchenzahl** in Citratblut. Es lässt sich kein Zusammenhang zwischen AI und Plättchenzahl erkennen ( $n = 45$ ; Korrelation nach Pearson).



**Abb. 29: ASS-Wirkung mit dem Multiplate in Abhängigkeit von der Plättchenaktivität** bei 15 gesunden Probanden. Je höher die AA-induzierte Plättchenaggregation ( $AU^*min_{ohne\ ASS}$ ) war, desto stärker wurde sie von ASS reduziert ( $AU^*min_{ohne\ ASS} - AU^*min_{mit\ ASS}$ ).  
\* Der Zusammenhang ist signifikant (Korrelation nach Pearson).



**Abb. 30: ASS-Wirkung mit dem PADA-RASS in Abhängigkeit von der Beladung der Plättchen mit Antikörpern** bei 15 gesunden Probanden in drei verschiedenen Messungen im zeitlichen Abstand von mindestens einer Woche ( $n = 45$ ; Korrelation nach Pearson; AI = Adhäsionsindex; PRASA = paradoxe Reaktion auf ASS)

**Tab. 11: Plättchenzahl in Heparin-, Citrat- und Hirudinblut beim PADA-RASS nach Zugabe von Puffer („ohne ASS“) bzw. ASS („mit ASS“) und 10+5-minütigem Schütteln bei 15 gesunden Probanden an drei verschiedenen Tests im zeitlichen Abstand von mindestens einer Woche**

Heparin	1. Test (x10 <sup>3</sup> /µl)		2. Test (x10 <sup>3</sup> /µl)		3. Test (x10 <sup>3</sup> /µl)	
	ohne ASS	mit ASS	ohne ASS	mit ASS	ohne ASS	mit ASS
2	209	197	204	184	196	192
3	177	180	155	161	156	149
4	189	185	172	172	171	163
5	184	166	162	167	149	144
6	155	168	204	189	147	149
7	176	170	161	14 PRASA	185	187
8	171	182	187	186	150	152
9	152	146	136	109 R	138 Non-R	190
10	264	167 PRASA	224	217	218	224
11	247	235	243	216 Non-R	216	218
13	133	141	142	144	137	135
14	219	233	221	214	307	261 R
15	157	165	173	150 PRASA	172	170
16	198	198	219	225	195	190
17	146	134	128	123	152	134
Citrat	1. Test (x1,11x10 <sup>3</sup> /µl)		2. Test (x1,11x10 <sup>3</sup> /µl)		3. Test (x1,11x10 <sup>3</sup> /µl)	
Proband Nr.	ohne ASS	mit ASS	ohne ASS	mit ASS	ohne ASS	mit ASS
2	166	152	155	143	163	156
3	157	158	135	131	100	98
4	150	159	135	133	136	133
5	139	145	133	131	112	91 PRASA
6	126	133	168	181	125	114
7	145	118 PRASA	134	135	144 PRASA	175
8	149	138	159	138	129	132
9	122	105	96	103	146	140
10	213	209	186	180	169	181
11	191	185	178	172	190	184
13	106	96	128	122	112	111
14	171	165	144	148	224	223
15	125	115	112	112	137	135
16	161	143	192	184	144	151
17	131	113	110	99	105	112
Hirudin	1. Test (x10 <sup>3</sup> /µl)		2. Test (x10 <sup>3</sup> /µl)		3. Test (x10 <sup>3</sup> /µl)	
Proband Nr.	ohne ASS	mit ASS	ohne ASS	mit ASS	ohne ASS	mit ASS
2	170	166	172	170	184	182
3	164	160	145	141	124	118
4	149	153	150	137	151	145
5	146	149	130	114	129	128
6	131	118	172	169	137	138
7	129	116	142	148	157	151
8	139	131	180	162	157	153
9	108	92	122	118	167	166
10	213	207	206	189	211	215
11	189 PRASA	210	215	178 PRASA	188	190
13	108	120	131	128	127	125
14	187	180	163	178	283	300
15	139	136	124	114	140	143
16	172	170	212	210	163	158
17	128	133	128	117	135	114 Non-R

Differenzen zwischen den Proben mit und ohne ASS von > 20 x 10<sup>3</sup>/µl sowie der jeweilige ASS-Respondertyp im PADA-RASS sind **gelb unterlegt**.

**R** = Responder, **Non-R** = Nonresponder, **PRASA** = paradoxe Reaktion auf ASS

## 8.2. Probandenaufklärung

### Zum Einfluss von Resveratrol auf die Aggregationsfähigkeit menschlicher Blutplättchen

Lieber Proband,

innerhalb eines Blutgefäßes kann sich infolge von Dysbalancen im Gerinnungssystem ein Blutpfropf (Blutgerinnsel oder Thrombus) bilden, der im schlimmsten Fall am Ort der Entstehung oder in weiter peripher gelegenen Gefäßabschnitten zum Verschluss führen kann - ein Ereignis, wofür der der medizinische Begriff *Thrombose* geprägt wurde. Prinzipiell können Thrombosen in allen Gefäßen auftreten, besonders häufig sind die Venen und Arterien der Beine betroffen. Entsteht ein Thrombus in den Herzkranzgefäßen oder in den das Gehirn versorgenden Arterien, resultiert nicht selten eine lebensbedrohliche Symptomatik, bekannt als Schlaganfall bzw. Herzinfarkt. Neben Veränderungen der Gefäßauskleidung spielt die Funktionstüchtigkeit der Blutplättchen eine entscheidende Rolle als Auslöser einer Gerinnselbildung. Ihre Fähigkeit sich miteinander (Aggregation) und mit der Gefäßinnenwand (Adhäsion) zu verkleben sind fundamentale Charaktereigenschaften und nützlich für die Reparatur einer Gefäßverletzung. Physiologisches Altern und zahlreiche krankhafte Einflüsse aktivieren diese Fähigkeiten der Blutplättchen und initiieren so die Gefahr einer Thrombusbildung, ohne dass eine Gefäßverletzung vorliegt. Arzneimittel wie z. B. die Acetylsalicylsäure (ASS), welche die Plättchenaktivität hemmen, sind daher Eckpfeiler zur Vorbeugung und Behandlung von Thrombosen. Empirische Literaturdaten und moderne *in vitro*-Studien lassen vermuten, dass Naturstoffe – sogenannte sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe – aus der Gruppe der Polyphenole ebenso in der Lage sind. Resveratrol, bekannt als „der Wirkstoff im Rotwein“, ist solch eine Substanz. Wir wollen untersuchen, ob ein Einfluss eines standardisierten Pflanzenextrakts (Nahrungsergänzungsmittel) mit hohem Gehalt an Resveratrol auf die die Aggregationsfähigkeit Ihrer Blutplättchen nachweisbar ist. Da Blutplättchen eine von Person zu Person verschiedene Aggregationsfähigkeit besitzen, ist es nötig zunächst Ihren Ausgangswert zu bestimmen. Dazu wird an drei unterschiedlichen Tagen und jeweils zur gleichen Tageszeit eine Blutprobe von insgesamt 7,5 ml gewonnen. Damit stellen wir anhand geeigneter Methoden Ihre persönliche und aktuelle Plättchenfunktion sowie Ihre Sensitivität für ASS fest. Am letzten Untersuchungstag werden nach der Blutentnahme 3 Kapseln des Pflanzenextrakts auf nüchternen Magen eingenommen und eine Stunde danach ein weiteres Mal 7,5 ml Blut abgenommen. Nach dieser Blutentnahme können Sie sofort wieder Nahrung zu sich nehmen.

Wir würden uns freuen, wenn Sie bereit wären, an dieser kleinen Studie teilzunehmen. Selbstverständlich ist Ihre Teilnahme freiwillig und Sie können Ihre Zusage jederzeit ohne Nachteile für Sie zurückziehen.

### 8.3. Fragebogen

Proband Nr.:

## Anamnese

Name, Vorname:

Geburtsdatum:

Größe/Gewicht:

Anschrift:

E-mail:

Erkrankungen (Allergien, Herz-Kreislauf-/Magen-Darmkrankheiten, Infektionen etc.):

Erkrankungen in der Familie:

Medikamente/Nahrungsergänzungsmittel (wie oft, wann zuletzt):

Erfahrung mit ASS:

Rauchen (Zigaretten/Tag):

Alkohol (Menge/Woche, was bevorzugt):

Kaffee (Tassen/Tag):

Anteil von Obst und Gemüse: Obst\_\_\_\_(%) Gemüse\_\_\_\_(%)

Bevorzugtes Essen (Selbstgekochtes, Mensa, Fertigprodukte etc.):

Bevorzugtes Fett (Butter, Pflanzenöle etc.):

Nüsse (Menge/Woche):

Erdnüsse (Menge/Woche):

Trauben (Menge/Woche):

Traubensaft (Menge/Woche):

Verschiedene Kohlsorten (Menge/Woche):

## 8.4. Lebenslauf

# Lebenslauf

## Sarah Maria Forstner

Ichenhauserstraße 17a  
D-89358 Ettenbeuren  
Tel.: 08223 – 753  
www.forstner.de  
sarahforstner@gmx.de

Geboren: 13.09.1984 in Krumbach/Schwaben  
Nationalität: deutsch  
Familienstand: ledig  
Eltern: Antonie (Kunstpädagogin) und Dr. Wolfgang Forstner (Zahnarzt)  
Geschwister: David Wolfgang, Cajetano Wolfgang und Raphael Philippus Forstner

### Ausbildung und beruflicher Werdegang:

1990-1994 Grundschule Ettenbeuren  
1994-2003 Musisches Gymnasium Wettenhausen (Note 1,7)  
2004 First Certificate of English (FCE) in Christchurch, Neuseeland  
2004 3-monatiges Praktikum im Zahntechnischen Labor Knoblach, Augsburg  
2004-2010 Studium der Zahnheilkunde in Jena (Note 1)  
2010-2012 Tätigkeit als Assistenz Zahnärztin und  
seit 2012 als angestellte Zahnärztin in der väterlichen Praxis, Burgau/Schwaben,  
mit voraussichtlicher Niederlassung in einer Partnerschaft 2/2014



## 8.5. Danksagung

Ich möchte mich hiermit bei allen bedanken, die mich in irgendeiner Form in der Anfertigung meiner Promotionsarbeit unterstützt haben:

Mein Dank geht natürlich zuerst an Frau PD Dr. Annegret Balogh, die mich mit diesem tollen Thema betraut und bis zum Schluss so nett betreut hat. Sie entwarf nicht nur das gesamte Studienkonzept, sondern kümmerte sich auch um alle nötigen Formulare, Materialien und Geräte. Frau Dr. Balogh wies mich ausführlich in die verschiedenen Testmethoden ein und ließ es sich z. B. nicht nehmen einige Versuche selbst durchzuführen, wenn ich nicht ins Institut kommen konnte. Ich danke ihr für die intensive Zusammenarbeit besonders in der Schlussphase und ihre konstruktive Kritik, welche in Form von meist mehrstündigen Telefonaten zwischen Thüringen und Bayern stattgefunden haben. Ich danke ihr daher zutiefst auch für die viele Zeit und Ausdauer, welche sie für mich aufbringen musste, und wünsche ihr alles Gute für die Zukunft.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Götz Nowak für sein absolut kompetentes Fachwissen, mit welchem er allen Doktoranden im Institut ohne Pause zur Seite stand. Es war für mich besonders interessant und motivierend mit den zwei von ihm entwickelten Testmethoden PADA und PADA-RASS in gewisser Weise Neuland in der medizinischen Forschung zu betreten.

Ich danke besonders Herrn PD Dr. Klas Böer und Herrn Dr. Heinz Vogelsang für die hervorragende Unterstützung bei der Analyse der Proben mit dem Multiplate und der Durchflusszytometrie.

Mein Dank geht zudem an alle Mitarbeiter der ehemaligen Arbeitsgruppe „Pharmakologische Hämostaseologie“, da sie für technische Fragen immer für mich ansprechbar waren und mich in ihren Laborräumen arbeiten ließen.

Ich danke nicht zuletzt Frau Anja Brandstädt für die statistische Betreuung in der gesamten Zeit. Sie war mir eine sehr große Hilfe, ohne die ich meine Ergebnisse sicherlich nicht hätte auswerten können.

Mein größter Dank gilt meinem Vater und meiner verstorbenen Mutter. Ihnen widme ich diese Arbeit.

## 8.6. Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass

- mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der FSU Jena bekannt ist.
- ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind.
- mich Frau Dr. Balogh, Herrn Prof. Nowak, das Team der ehemaligen AG „Pharmakologische Hämostasologie“ und Frau Brandstädt bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts geholfen haben. Manche Versuche mit dem PADA und dem PADA-RASS wurden von Frau Dr. Balogh selbst durchgeführt.
- ich die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen habe.
- weder unmittelbar noch mittelbar Dritte von mir geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt dieser Dissertation stehen.
- ich keine gleiche, in wesentlichen Teilen ähnliche oder andere Abhandlung bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.