

Aus dem Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Prof. Dr. Karsten Schrör

ZUR THROMBOZYTENFUNKTION IM PLÄTTCHENREICHEN PLASMA VON
GESUNDEN MÄNNLICHEN NICHTRAUCHERN UND RAUCHERN -
WIRKUNGEN VON 40 mg UND 100 mg ACETYLSALICYLSÄURE

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der
Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

vorgelegt von

SVEN-FRIEDHELM LIESENER

2002

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
gez. Prof. Dr. D. Häussinger
Dekan

Referent: Prof. Dr. K. Schrör
Korreferant: Prof. R. E. Dr. Scharf
Tag der mündlichen Prüfung: 23.04.02

Diese Arbeit wurde als elektronische Dissertation veröffentlicht.
<http://www.ulb.uni-duesseldorf.de/diss/Medizinische/2002/Liesener.pdf>

VERWENDETE ABKÜRZUNGEN

AA	Arachidonsäure
ACD	Acidic citrate dextrose (Biostabil [®])
ADP	Adenosindiphosphat
ASA	Acetylsalicylsäure
ATP	Adenosintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FC	Schaumzellen
Kon	Kontrolle
LDL	Lipoproteine geringer Dichte
MM-LDL	LDL mit minimal oxidativ veränderter Lipidfraktion
NO	Stickstoffmonoxid
NR	Nichtraucher
ox-LDL	LDL mit oxidativ veränderter Proteinfraction
PDGF	platelet derived growth factor
PGI ₂	Prostazyklin
PGI-M	Prostazyklinmetaboliten
PPP	Plättchenarmes Plasma
PRP	Plättchenreiches Plasma
R	Raucher
SMC	Glatte Muskelzellen
TXA ₂	Thromboxan A ₂
TXB ₂	Thromboxan B ₂
TX-M	Thromboxanmetaboliten

INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung	6
1.1	Pathogenese der Atherosklerose	7
1.2	Rolle des Tabakmissbrauchs bei der Atheroskleroseentstehung	15
1.3	Rolle der Thrombozyten bei der Atherogenese und den Komplikationen der Atherosklerose	19
1.4	Optimale Dosis einer chronischen ASA-Therapie bei koronarer Herzkrankheit	22
1.5	Chronische ASA-Therapie bei koronarer Herzkrankheit und Problem der Compliance	25
1.6	Fragestellung	27
2	Material und Methoden	28
2.1	Versuchsplan	28
2.2	Material	31
2.2.1	Blutentnahme	31
2.2.2	Plasmagewinnung, Erythrozytengewinnung und Thrombozytenzählung	31
2.2.3	Urinproben	32
2.2.4	Substanzen und Lösungen.....	33
2.3	Methoden	34
2.3.1	Thrombozytenaktivitätsmessungen	34
2.3.2	Messung der ATP-Freisetzung.....	40
2.3.3	Radioimmunoassay zur Bestimmung von TXB ₂ im PRP und Releasat....	41
2.3.4	Radioimmunoassay zur Bestimmung von Thromboxan- und Prostazyklinmetaboliten im Urin	42
2.3.5	Statistische Auswertung	43
3	Ergebnisse	45
3.1	Kollagen-induzierte Thrombozytenaggregation	45
3.1.1	Ausmaß der Kollagen-induzierten Thrombozytenaggregation	45
3.1.2	Kollagen-induzierte Thromboxanbildung	47
3.1.3	Zusammenfassung.....	48
3.2	ADP-induzierte Thrombozytenaggregation	53
3.2.1	Ausmaß der ADP-induzierten Thrombozytenaggregation	53
3.2.2	ADP-induzierte Thromboxanbildung	55
3.2.3	Zusammenfassung.....	57

3.3	Rekrutment.....	62
3.3.1	Rekrutment: Aggregation beim Rekrutment.....	62
3.3.2	Rekrutment: Thromboxan im Generatorsystem (Releasat)	64
3.3.3	Zusammenfassung.....	65
3.4	Thromboxanfreisetzung.....	70
3.4.1	Ausscheidung von Thromboxanmetaboliten im Urin	70
3.4.2	Zusammenfassung.....	71
3.5	Prostazyklinfreisetzung	72
3.5.1	Ausscheidung von Prostazyklinmetaboliten im Urin	72
3.5.2	Zusammenfassung.....	73
3.6	Serumchemie- und EDTA-Blut-Basisuntersuchungen.....	76
3.7	Verträglichkeit der Acetylsalicylsäure-Behandlung.....	76
4	Diskussion	79
4.1	Kritik der Methoden	79
4.2	Thrombozytenfunktion bei Nichtrauchern und Rauchern	83
4.2.1	Ergebnisübersicht.....	83
4.2.2	Physiologie der Thrombozytenaktivierung und Untersuchung der Thrombozytenfunktion.....	84
4.2.3	Thrombozytenfunktion bei den Rauchern.....	89
4.2.4	Schlussfolgerungen.....	98
4.3	Wirkungen von 40 mg und 100 mg Acetylsalicylsäure	99
4.3.1	Ergebnisübersicht.....	99
4.3.2	Bedeutung von ASA für die Prophylaxe ischämischer Koronarsyndrome.....	100
4.3.3	Wirkungen von 40 mg und 100 mg ASA im Non-Compliance-Modell	104
4.3.4	Schlussfolgerungen.....	106
5	Zusammenfassung der Arbeit	107
6	Literatur	110
7	Veröffentlichungen im Zusammenhang mit dieser Arbeit	119

1. EINLEITUNG

Die **Atherosklerose** ist eine multifaktorielle Erkrankung, deren Pathogenese bislang nur teilweise geklärt ist. Wesentliche Risikofaktoren sind Bluthochdruck, Fettstoffwechselstörungen, Diabetes mellitus und eine genetische Komponente.

Während die oben genannten Risikofaktoren nicht oder nur schwierig zu beeinflussen sind, ist der **Nikotinmissbrauch** ein vermeidbarer Risikofaktor. Eine gefährliche Komplikation der Atherosklerose ist der Herzinfarkt. Bei Vorliegen anderer Risikofaktoren und gleichzeitigem Nikotinmissbrauch potenziert sich das Infarktisiko.

Die Komplikationen der Atherosklerose sind wesentlich durch an der Gefäßwand anhaftende Thrombozyten verursacht. Als Folge der Atherosklerose tritt eine **Thrombozytenhyperreaktivität** auf, die der Hauptansatzpunkt einer symptomatischen Therapie zur Verminderung thrombembolischer Ereignisse ist.

Es stehen eine Reihe von Thrombozytenaggregationshemmern zur Verfügung. Die älteste dieser Substanzen ist auch heute noch das Medikament der ersten Wahl: **Acetylsalicylsäure (ASA)** (Leschke et al., 1998). Die Entstehung der Atherosklerose lässt sich durch Einnahme von ASA nicht verhindern, eine Regression einer koronaren Herzkrankheit ist mit einer ASA-Therapie nicht zu erwarten (Ridker et al., 1991). Wirksam ist ASA in der **Primär- und Sekundärprophylaxe** thrombembolischer Ereignisse, insbesondere lässt sich die Herzinfarkthäufigkeit reduzieren (Meade und Brennan, 2000; Hennekens et al., 1989; Antiplatelet Trialists' Collaboration, 1994).

Die **tägliche ASA-Dosierung** zur Herzinfarktprophylaxe ist mit zunehmendem Verständnis der Eigenschaften von ASA in den letzten Jahren um den Faktor zehn reduziert worden. 75-325 mg ASA täglich sind genauso wirksam wie höhere ASA-Dosierungen (Antiplatelet Trialists' Collaboration, 1994). Möglicherweise ist eine Dosierung von 40-50 mg ASA täglich ausreichend (Patrono 1989).

Ein Problem jeder Pharmakotherapie ist die **mangelnde Compliance**. Dies ist bei einer chronischen ASA-Therapie zum Teil durch die gastrointestinalen Nebenwirkungen der Substanz bedingt. Eine Reduzierung der täglichen ASA-Dosierung auf 30 mg könnte die dosisabhängigen **unerwünschten Wirkungen** noch weiter vermindern (Förster, 1995) und somit die Compliance verbessern. Fraglich ist allerdings, ob dann noch die erforderliche therapeutische Effektivität von ASA gegeben ist (Schrör, 1995a).

1.1 Pathogenese der Atherosklerose

Morphologie atherosklerotischer Läsionen:

Grundlage des heutigen Verständnisses der Atherogenese (**Abb.1**) ist die response-to-injury-Hypothese (Ross 1993). Befördert durch eine **Dysfunktion der Endothelzellen** kann es zur Ausbildung von Lipidplaques, fibrösen Plaques oder adhärennten Plättchenthromben kommen. Diese Formen der Gefäßschädigung können ineinander übergehen und nebeneinander vorkommen.

Eine endotheliale Dysfunktion kann zur **Einwanderung und Akkumulation von Monozyten und Lymphozyten** in die Gefäßwand führen. Durch unregulierte Aufnahme von oxidierten LDL-Partikeln in die Makrophagen kommt es zur Bildung von cholesterinhaltigen Schaumzellen. Es entstehen **Lipidplaque**. Eine endotheliale Dysfunktion kann allerdings auch direkt durch **Thrombozytenadhäsion** zu einer Stenosierung des Gefäßlumens führen. Beim Überwiegen einer proliferativen Reaktion kommt es zur Bildung eines **fibrösen Plaque**. Eine proliferative Reaktion wird durch Wachstumsfaktoren aus Endothelzellen, Makrophagen, glatten Muskelzellen und Thrombozyten unterhalten.

Ein Plaque kann über viele Jahre stabil bleiben ohne Komplikationen zu verursachen. Eine Zunahme der entzündlichen und Abnahme der proliferativen Aktivität kann das Atherom instabil machen. Auch eine übermäßige mechanische Beanspruchung z. B. bei einer Hypertonie kann ein Atherom destabilisieren. Die Gewebsdecke des Plaque kann aufbrechen, es kommt zur Bildung eines **atherosklerotischen Ulkus**. Beim akuten Aufbruch eines solchen Plaque kann es zu einer Stenosierung oder zum vollständigen Verschluss des betroffenen Gefäßes kommen. Dabei kommt es zur Thrombozytenaggregation, zur Aktivierung der Gerinnungskaskade und zur Freisetzung vasokonstriktiver Substanzen. Auch ein asymptomatischer Aufbruch eines Atheroms führt durch Förderung der entzündlichen und proliferativen Reaktion zu einer schnellen Progression der Läsion und weiteren Verengung des Gefäßes.

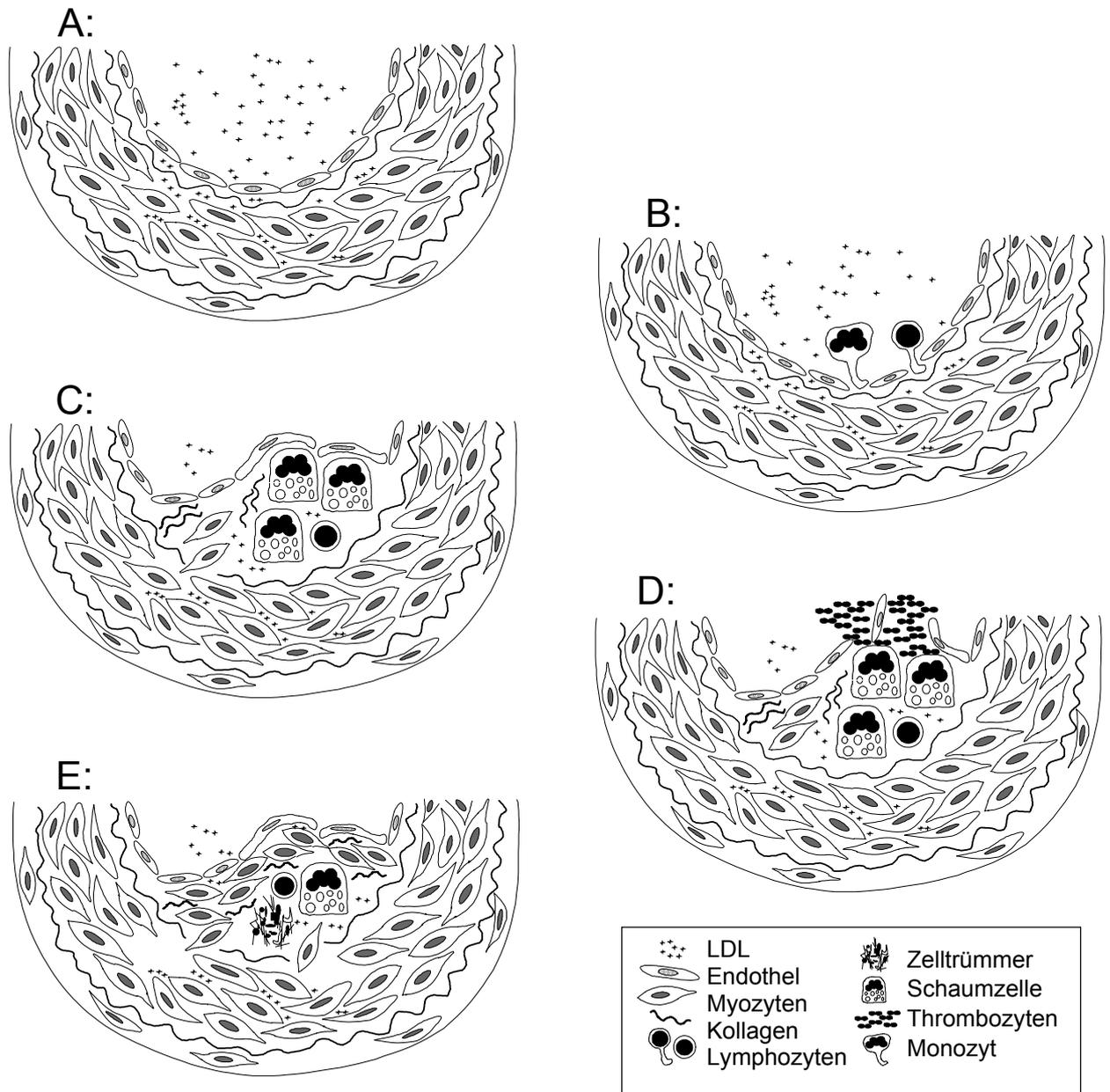


Abbildung 1: response-to-injury-Hypothese. **A:** Eine chronische Gefäßschädigung (z. B. durch Hypercholesterinämie) führt zur endothelialen Dysfunktion. Alle weiteren Gefäßveränderungen können sich direkt aus einer endothelialen Dysfunktion entwickeln und ineinander übergehen. **B:** Folge der endothelialen Dysfunktion ist eine vermehrte Monozyten/Lymphozyten-Adhäsion und Einwanderung dieser Zellen in die Intima. **C:** Fatty streak: Eine dysregulierte Aufnahme von oxidierten LDL-Partikeln führt zur Bildung und Akkumulation von Schaumzellen. Es bildet sich eine fatty streak. **D:** Plättchenthrombus: Über einer fatty streak kann das Endothel abgeschert werden. Die Folge ist die Ausbildung eines Plättchenthrombus mit Gefäßstenosierung und Freisetzung thrombozytärer Wachstumsfaktoren. **E:** Fibröser Plaque: Lymphozyten, Makrophagen, glatte Muskelzellen und Endothelzellen in einer Plaque produzieren Wachstumsfaktoren, die zu einer Migration und Proliferation von glatten Muskelzellen führen. Es bildet sich ein fibröser Plaque, in dessen Zentrum sich ein nekrotischer Kern befinden kann. (modifiziert nach Ross, 1993)

Klinik und Progression der koronaren Herzkrankheit in Relation zur Plaquemorphologie:

Die Progression der koronaren Herzkrankheit lässt sich nach Fuster (1994) in fünf Phasen einteilen (**Abb. 2**). Phase 1 ist durch eine kleine Läsion charakterisiert, die schon bei den meisten 30-jährigen nachzuweisen ist und die nur eine sehr **langsame Progression** zeigt (stabiler Plaque). Phase 2 beschreibt den lipidreichen, nicht unbedingt stenotischen Plaque (instabiler Plaque= Atherom), der **rupturgefährdet** ist und dadurch akute Koronarsyndrome hervorrufen kann. Diese Veränderungen können in der Koronarangiographie unterschätzt werden. Phase 3/4 entspricht der **Plaqueruptur**. Die Ruptur kann eine **Stenose** zur Folge haben, die asymptomatisch verläuft oder mit akuter Pektangina einhergeht (Phase 3). Die Phase 4 hingegen ist durch einen **akuten Gefäßverschluss** charakterisiert, der zu instabiler Angina pectoris, Herzinfarkt und plötzlichem Herztod führen kann. Phase 5 bezeichnet die **Thrombusorganisation**. Das Gefäß bleibt verschlossen oder es kann zu einer teilweisen **Rekanalisierung** und Reendothelisierung des betroffenen Gefäßsegmentes kommen. Stenosen nach Thrombusorganisation sind allerdings weiterhin **reokklusionsgefährdet**. Durch wiederholte Thrombusbildung oder in Folge einer myoproliferativen Reaktion kann es zum erneuten Verschluss des Gefäßes kommen.

In Bezug auf die Koronarangiographie ist besonders hervorzuheben, dass ein Herzinfarkt durch die Ruptur eines **instabilen, gering stenotischen Plaque** verursacht werden kann, der angiografisch kaum zu sehen ist. So weist Fuster darauf hin, dass die initiale Stenose beim akutem Myokardinfarkt in der Mehrzahl der Fälle < 50 % ist. Nicht der Stenosegrad, sondern die Plaquemorphologie ist entscheidend für die Prognose einer Koronarsklerose.

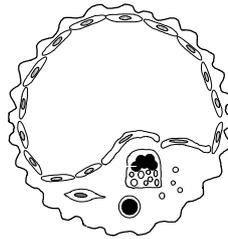
Klinik

Einteilung nach Fuster

Plaquemorphologie

Stabiler Plaque (Phase 1)

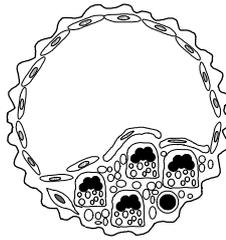
- langsame Progression
- keine Symptome



- I: vereinzelt Schaumzellen (FC)
- II: FC, glatte Muskelzellen (SMC)
- III: FC, SMC, vereinzelt extrazelluläre Fetttröpfchen

Instabiler Plaque (Phase 2)

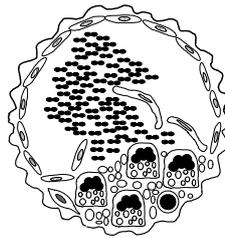
- schnelle Progression
- Gefahr akuter Koronarsyndrome durch Ruptur trotz geringen Stenosegrades
- keine Symptome



- IV: FC, SMC, konfluierende extrazelluläre Lipidtröpfchen = Atherom
- Va: Atherom mit fibröser Kappe

Plaqueruptur (Phase 3/4)

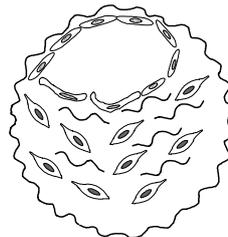
- zumeist Ruptur eines instabilen Plaques
- klinisch stumm oder Angina (Stenose: Phase 3)
- instabile Angina pectoris, Herzinfarkt, plötzlicher Herztod (Okklusion: Phase 4)



- VI: Plaqueruptur mit thrombotischer Gefäßstenose/ -okklusion, dabei Thrombozytenaggregation und Aktivierung der Gerinnung

Thrombusorganisation (Phase 5)

- meist stabile, aber auch instabile Koronarsyndrome
- bei Kollateralbildung klinisch stumm
- Progression durch neuen Thrombus oder durch proliferative Reaktion



- Vb/c: Thrombusorganisation mit fibröser Gefäßstenose/ -okklusion, zellarm, faserreich



Abbildung 2: Plaquemorphologie und Klinik der koronaren Herzkrankheit. Nicht der Stenosegrad, sondern die Plaquemorphologie ist entscheidend für die Prognose einer Koronarsklerose. Hochgradig rupturgefährdet ist der instabile Plaque (Phase 2), auch wenn er nur geringgradig stenotisch ist. Hochgradig stenotische Gefäßläsionen der Phase 5 verursachen seltener akute Koronarsyndrome, da die Rupturgefahr gering ist und nicht selten eine ausreichende Kollateralbildung vorhanden ist. (modifiziert nach Fuster, 1994; dargestellt ist nur die Intima der Gefäßwand)

Risikofaktoren:

Die Atherosklerose ist eine chronische Erkrankung großer Arterien, die schleichend verläuft und viele Jahre asymptomatisch bleiben kann. Die Atherosklerose befällt ein Gefäß typischerweise herdförmig (atherosklerotischer Plaque) und zeigt Prädilektionsstellen. Die wichtigsten Risikofaktoren für die Entwicklung einer Atherosklerose sind **Hypertonie, Diabetes mellitus, Rauchen, Hyperlipidämie und eine genetische Komponente**. Die Bedeutung der Hypertonie wird heute kontrovers diskutiert. Es gibt Hinweise darauf, dass die Hypertonie und die Atherosklerose zwei verschiedene Manifestationen eines gemeinsamen zellulären Defektes sind (Bondjers, 1991). Dabei ist unstrittig, dass eine Hypertonie an sich auch zu einer Schädigung des Gefäßendothels führt (Simon et al., 1999). Über die **Rolle des Tabakmißbrauchs** in der Atheroskleroseentstehung wird in Abschnitt **1.2** berichtet.

Patienten mit einer Hypertonie haben ein erhöhtes Risiko vor allem für eine Atherosklerose der hirnversorgenden Gefäße, während es beim Raucher bevorzugt zu einer peripheren arteriellen Verschlusskrankheit kommt. Die Bedeutung von mikrobiellen Läsionen insbesondere durch Herpes simplex Virus Typ I, Cytomegalie Viren und Clamydia pneumoniae ist derzeit noch Gegenstand der Forschung.

Nicht nur chronisch-mikrobielle sondern auch chemisch-toxische und psychische Belastungen könnten durch Interleukine zu einer Entzündungsreaktion des Organismus führen, die auch die Gefäße schädigt (Yudkin et al., 2000). Die Erhöhung von Entzündungsparametern wie dem C-reaktiven Protein und dem Fibrinogen bei Patienten mit Atherosklerose ist lange bekannt und könnte als eine Interleukin-6 vermittelte Reaktion auf chronische Belastungen des Organismus aufzufassen sein.

Molekulare Basis der Atherosklerose bei koronarer Herzkrankheit:

Für die Entwicklung einer koronaren Herzkrankheit ist die Hypercholesterinämie der entscheidende Faktor (Castelli, 1998). Durch Senkung des Cholesterinspiegels ließ sich das Risiko eines tödlichen Herzinfarktes um 42 % senken (Scandinavian Simvastatin Survival Group, 1994). Cholesterinhaltige Lipidplaques lassen sich schon bei Kindern nachweisen. Die Häufigkeit und Ausdehnung solcher Lipidplaques nimmt insbesondere bei übergewichtigen **rauchenden Männern** mit Hyperlipidämie ab dem 30. Lebensjahr schnell zu (McGill & McMahan, 1998).

In Abhängigkeit von der Serumkonzentration der Lipoproteine geringer Dichte (LDL) kommt es Akkumulation dieser Lipoproteine in der Gefäßwand, wo sie oxidiert und phagozytiert werden (Schaumzellbildung) und zu einer chronisch-proliferativen Entzündungsreaktion führen (Berliner et al., 1995). Der Autor stellt in seinem Review die Bedeutung der LDL-Oxidation für die Expression von Adhäsionsmolekülen und die Sekretion von Chemokinen für die Bildung eines Lipidplaque dar: Es handelt sich nicht nur um eine einfache Ablagerung von LDL, sondern auch um eine Bindung von LDL an die **Interzellularmatrix**. Zunächst werden die Lipide der LDL oxidiert (**MM-LDL**), ohne dass es zu wesentlichen Modifikationen der Proteinfraction kommt. Veränderungen der Interzellulärsubstanz könnten dazu führen, dass die wasserlöslichen Plasma-Antioxidanzien nicht mehr in den Interzellularraum eindringen können.

MM-LDL, die oxidierte Lipidfraktion der LDL, könnten eine besondere Bedeutung bei der Einwanderung von Monozyten in die Gefäßwand haben, die am Beginn der Ausbildung eines Lipidplaque steht. MM-LDL führen in den Endothelzellen zur Produktion von Faktoren, welche die Adhäsion an das Endothel, die Migration von Monozyten in die Gefäßwand und deren Differenzierung in Makrophagen befördern. Dazu zählen **MCP-1** (monocyte chemoattractant protein-1) und **M-CSF** (monocyte colony stimulating factor). Lysophosphatidylcholin, ein Bestandteil oxidativ veränderter LDL, wirkt chemotaktisch auf Monozyten und T-Lymphozyten und kann die Expression von **VCAM-1 und ICAM-1** (vascular cell adhesion molecule-1 und intercellular adhesion molecule-1) erhöhen. Damit kommt es zu einer weiteren **Akkumulation** von Entzündungszellen in dem Lipidplaque (Berliner et al., 1995).

Kaninchen, die mit einer cholesterinreichen Diät und Rotwein gefüttert wurden, zeigten nach Ballondilatation der Aorta eine geringere Expression von MCP-1-mRNA und

-Protein in der Gefäßwand als Kaninchen mit cholesterinreicher Diät ohne Rotwein. Das verminderte Risiko von Weintrinkern, einen Herzinfarkt zu erleiden, könnte auf eine Hemmung der Expression von MCP-1 zurückzuführen sein (Feng et al., 1999).

Nachdem Monozyten in die Läsion eingewandert sind und sich zu Makrophagen differenziert haben, kommt es durch die oxidative Kapazität dieser Zellen nicht nur zu einer weiteren Oxidation der Lipide, sondern auch zu einer Veränderung der Proteinfraction der LDL. Diese **oxidierten LDL** (Ox-LDL) können nun nicht mehr vom LDL-Rezeptor erkannt und kontrolliert aufgenommen werden. Stattdessen kommt es zu einer massiven, unregulierten Aufnahme von Ox-LDL in die Makrophagen über einen scavenger-Rezeptor und einen Ox-LDL-bindenden Rezeptor. Diese Rezeptoren unterliegen nicht der Regulation durch den Cholesterolgehalt der Zelle. Die Akkumulation von Cholesterol in den Makrophagen verleiht dem Zytoplasma dieser Zellen einen charakteristischen schaumigen Aspekt, der ihnen den Namen **Schaumzellen** verliehen hat. Ansammlungen dieser Zellen führen zu den Lipidplaques, den sog. „fatty streaks“ (Berliner et al., 1995).

Die Akkumulation von Schaumzellen in einem Lipidplaque führt zur Produktion großer Mengen an **tissue factor** (Libby, 1995).

Bei der Ulzerierung eines an tissue factor (Gewebefaktor, Gewebsthromboplastin) reichen, ausgedehnten Lipidplaque kann es zur Aktivierung der plasmatischen Gerinnung kommen, die zum kompletten, tödlichen Gefäßverschluß führen kann. Die Thrombozytenaggregation kann hierbei im Verhältnis zur Gerinnungsaktivierung durch tissue factor im Hintergrund stehen (Born, 1999). Diese Überlegung wird auch durch eine neuere Studie zur Primärprävention bei Hochrisikopatienten mit Aspirin und/oder Warfarin unterstützt, bei der nur eine Warfarin-Therapie eine Senkung der Inzidenz tödlicher Herzinfarkte zeigte. (The medical research council's general practice research framework, 1998).

Das Endothel besitzt physiologischerweise antientzündliche, antiproliferative und glattmuskulärrelaxierende Eigenschaften. Diese Eigenschaften können allerdings bei der Atherosklerose verlorengehen und das Endothel kann mitogene und vasokonstriktorische Eigenschaften annehmen (Simon et al., 1999). Die Autoren stellen in ihrem Review die vasoprotektiven Eigenschaften des NO dar und weisen auf die

Bedeutung von Endothelin im Rahmen einer endothelialen Dysfunktion hin: Durch eine Hemmung der Expression von Adhäsionsmolekülen blockiert NO die Leukozytenadhäsion. Durch Hyperpolarisation der glatten Gefäßmuskulatur vermittelt NO eine Vasodilatation. NO hemmt die Thrombozytenaggregation und -adhäsion und wirkt antiproliferativ. Durch die Risikofaktoren der Atherosklerose kommt es zu einer **endothelialen Dysfunktion**. Sie ist durch einen **funktionellen Mangel an NO** gekennzeichnet. Zusätzlich kommt es zur **Expression von Endothelin**, das zum Teil dem NO entgegengesetzte Wirkungen hat. Oxidierte LDL führen zu einer direkten Induktion der Endothelinexpression in kultivierten Endothelzellen und Makrophagen. Endothelin wirkt vasokonstriktorisch und mitogen. In der Summe führt die endotheliale Dysfunktion zu einer Leukozyten- und Thrombozytenadhäsion, zu einer Erhöhung des Gefäßtonus und zu einer Proliferation und Migration von glatten Muskelzellen.

Unter dem Einfluss von Zytokinen, die in einer atherosklerotischen Läsion nachgewiesen wurden, kann die fibröse Deckschicht eines Atheroms destabilisiert werden (Libby, 1995): Glatte Muskelzellen stabilisieren unter dem Einfluss von PDGF (platelet derived growth factor) durch die Produktion von Kollagen den atheromatösen Plaque. T-Lymphozyten können über die **Sekretion von IFN- γ** (Interferon- λ) die Proliferation der glatten Muskelzellen und deren Kollagenproduktion hemmen und so zur Destabilisierung des Atheroms und zur Plaqueruptur beitragen. In vitro induzieren **Interleukin-1 oder TNF α** (Tumor-Nekrose-Faktor- α) in humanen glatten Muskelzellen die Expression von Gelatinase B und Stromelysin. Beides sind Enzyme aus der Gruppe der Metalloproteinasen, die außerhalb von Lysosomen bei physiologischem pH-Wert aktiv sind. Da die ubiquitär vorkommenden Gewebeinhibitoren der Metalloproteinasen nicht verstärkt exprimiert werden, könnten die Metalloproteinasen aktiv werden, die Interzellulärmatrix degradieren und zur Destabilisierung eines Atheroms beitragen.

Über die **Rolle der Thrombozyten** bei der Atherogenese wird im Abschnitt **1.3** berichtet.

1.2 Rolle des Tabakmissbrauchs bei der Atheroskleroseentstehung

Die Rolle des Tabakmissbrauchs als Risikofaktor für die Entstehung und Progression einer Atherosklerose und für das Auftreten thrombembolischer Komplikationen ist epidemiologisch gesichert. Es wird geschätzt, dass in den USA der Tabakmissbrauch für **30% bis 40% der 565.000 koronar bedingten Todesfälle** mitverantwortlich ist (FitzGerald et al., 1988).

Auch das Passivrauchen ist ein Risikofaktor der Atheroskleroseentstehung (Howard et al., 1998).

In einer **post-mortem-Studie** an ca. 3000 tödlich Verunglückten im Alter von 15-34 Jahren zeigte sich, dass Rauchen schon **bei jungen Menschen** die Gefäße schädigt und hierbei die Bauchaorta stärker betroffen ist als die Koronargefäße (McGill, 1988): Bei gleicher Läsionsgröße fanden sich in den Koronargefäßen der Raucher in der Sektion häufiger atherosklerotische Läsionen im Vergleich zu den Nichtrauchern. Hingegen wies die Bauchaorta von Rauchern im Alter zwischen 25-34 Jahren ca. 3-fach größere Läsionen auf als die Bauchaorta von Nichtrauchern. Das Risiko zur Entwicklung einer Atherosklerose potenzierte sich, wenn zum Nikotinmissbrauch weitere Risikofaktoren wie Hypercholesterinämie und Hypertonie dazukommen.

Bereits bei **jungen gesunden Rauchern** läßt sich mittels Ultraschalltechnik eine Verdickung der Gefäßwand nachweisen (Bergmortel et al., 2000): Bei der sonographischen Untersuchung der Karotiden und der Femoralarterien von Rauchern im Durchschnittsalter von 44 Jahren war im Vergleich zu den Nichtrauchern in beiden Gefäßregionen eine signifikante Verdickung der Gefäßwand festzustellen. Diese Verdickung war in den Femoralarterien besonders ausgeprägt.

In der Göteborg-Studie von 1986 war das Risiko, eine koronare Herzkrankheit zu entwickeln, **bereits beim täglichen Konsum von 1-4 Zigaretten** deutlich erhöht und wurde durch höheren Zigarettenkonsum nicht wesentlich weiter gesteigert (Wilhelmsen, 1988). Dabei ist das Risiko für eine Angina pectoris nicht erhöht, während besonders das Risiko für schwerwiegende Komplikationen einer koronaren Herzkrankheit wie dem plötzlichen Herztod und Myokardinfarkt erhöht ist. Dies wird darauf zurückgeführt, dass Rauchen die Atheroskleroseprogression an den Koronargefäßen nur leicht bis mäßig beeinflusst, aber das Risiko thrombembolischer Komplikationen deutlich erhöht.

Obwohl der Zusammenhang zwischen Rauchen und Atherosklerose bzw. Komplikationen der Atherosklerose epidemiologisch gesichert ist, ist der Pathomechanismus weitgehend unklar. Es gibt zur Zeit kein Tiermodell, welches den Zusammenhang zwischen Rauchen und Atherosklerose reproduzieren könnte.

Raucher haben Veränderungen im **Cholesterinstoffwechsel und Veränderungen im roten Blutbild** (McGill, 1988): Bei normalem Cholesterinspiegel haben Raucher einen leicht erhöhten Anteil von LDL-Cholesterin und einen geringeren Anteil von HDL am Gesamtcholesterin. Die Erythrozytenzahlen, der Hämatokrit und das Hämoglobin sind erhöht. Dies könnte die Fließeigenschaften des Blutes verschlechtern und das Risiko einer Thrombose erhöhen.

Raucher haben **erhöhte Leukozytenzahlen**, was bei einem thrombembolischen Ereignis die Fließeigenschaften des Blutes verschlechtern könnte und so den Ischämieschaden vergrößern könnte (Ernst et al., 1987). Die Autoren weisen auf eine mögliche Störung der Mikroperfusion durch hohe Leukozytenzahlen und die Korrelation von kardiovaskulärem Risiko und Leukozytenzahlen hin. Das Risiko eines akuten Myokardinfarktes oder eines Schlaganfalls ist bereits bei hochnormalen Leukozytenzahlen ($<9000/\mu\text{l}$) erhöht. Hohe Leukozytenzahlen gehen mit einer höheren Rate an Komplikationen oder Todesfällen nach einem Infarkt oder Schlaganfall einher. Eine leichte Leukozytose könnte dabei die Folge einer Atherosklerose sein. Andererseits gibt es Hinweise darauf, dass chronisch erhöhte Leukozytenzahlen die Fließeigenschaften des Blutes beeinträchtigen könnten, kleine Gefäße verschließen oder Endothelzellen schädigen könnten. Dies könnte die Mikroperfusion bei einem ischämischen Ereignis verschlechtern und so die Infarktgröße und die Komplikationen ungünstig beeinflussen. Inwieweit die Atheroskleroseprogression beeinflusst wird, ist unklar.

Eine **sympathoadrenale Aktivierung des Gerinnungssystems** könnte am erhöhten kardiovaskulären Risiko von Rauchern beteiligt sein (FitzGerald et al., 1988). Der Autor unterstreicht die Erhöhung des Fibrinogenspiegels bei Rauchern und die Korrelation von Fibrinogenspiegel und KHK: Gesunde Raucher haben erhöhte Plasma-Fibrinogenkonzentrationen im Vergleich zu Nichtrauchern. Bei einer koronaren Herzkrankheit ist dieser Unterschied der Fibrinogenkonzentration zwischen Nichtrauchern und Rauchern noch vergrößert. Prospektive Studien haben gezeigt, dass der Fibrinogenspiegel direkt mit der KHK assoziiert ist. Besondere berufliche

Belastungen korrelieren mit einer Erhöhung des Plasma-Fibrinogenspiegels. Sowohl Berufsbelastungen als auch Zigarettenrauchen erhöhen die Aktivität des sympathischen Nervensystems. Daher wird vermutet, dass die negativen Wirkungen des Zigarettenrauchens zu einem großen Teil über eine sympathikusvermittelte Erhöhung des Fibrinogenspiegels vermittelt werden. Andererseits ist Fibrinogen ein Akute-Phase-Protein, das bei Entzündungsprozessen erhöht ist. Die Erhöhung des Fibrinogenspiegels könnte also das Zeichen einer chronischen Entzündung sein, wäre also Folge und nicht Ursache der Atherosklerose.

Bei Versuchen mit Endothelzellen aus humanen Umbilikalvenen konnte gezeigt werden, dass die Endothelzellen weiblicher Raucher im Vergleich zu Zellen von Nichtrauchern verstärkt **LDL oxidieren** und vermehrt Superoxid-Anionen produzieren (Pech-Amsellen et al., 1996). Dies könnte auf eine chronische Aktivierung des Glutathion-Stoffwechsels zurückzuführen sein, was einerseits als Anpassung auf oxidativen Stress aufgefaßt werden kann, andererseits aber über die Akkumulation von Thiolen zur Bildung von freien Radikalen führen könnte.

Rauchen vermindert die **koronare Flussreserve** (Kaufmann et al., 2000). Bei gesunden Rauchern, die mindestens drei Stunden vor Messung der Koronarreserve nicht geraucht hatten, war die Koronarreserve signifikant geringer als bei Nichtrauchern. Durch Infusion von 3 g Vitamin C ließ sich die Koronarreserve bei Rauchern im Vergleich zu Nichtrauchern normalisieren. Die Autoren führen die Reduzierung der Koronarreserve bei gesunden Rauchern auf eine oxidative Schädigung des Endothels mit der Folge einer endothelialen Dysfunktion zurück.

Nach der **Entwöhnung vom Zigarettenrauchen** haben Ex-Raucher im Verhältnis zu Nichtrauchern nach einigen Jahren kein höheres Risiko mehr, eine koronare Herzkrankheit mit allen ihren Folgen zu entwickeln. Das Zigarettenrauchen scheint insgesamt gesehen also vor allem das Risiko einer thrombembolischen Komplikation bei bereits bestehender Atherosklerose zu erhöhen und scheint nur ein nachrangiger Faktor in der Atherogenese der Herzkranzgefäße zu sein (Wilhelmensen, 1988).

Die beim Menschen am beste belegte und eindrucklichste Wirkung des Zigarettenrauchens ist die akute Aktivierung der Thrombozyten. In **Abschnitt 4.2.3** wird dies ausführlich dargestellt.

Fazit:

Der Tabakmissbrauch ist ein vermeidbarer Risikofaktor der Atherosklerose. Schon bei jungen Rauchern lassen sich Gefäßschädigungen zeigen. Raucher haben neben einer erhöhten Morbidität für viele andere Erkrankungen ein erhöhtes Herzinfarkttrisiko. Das Risiko potenziert sich, wenn weitere Risikofaktoren hinzukommen. Pathogenetisch bedeutsam sind eine erhöhte Fibrinogenkonzentration, erhöhte Leukozytenzahlen, Veränderungen im Cholesterinstoffwechsel und eine ungünstige Beeinflussung der Fließeigenschaften des Blutes durch Veränderungen im roten Blutbild. Nach Entwöhnung vom Zigarettenrauchen haben Ex-Raucher nach einigen Jahren kein erhöhtes kardiales Risiko mehr.

1.3 Rolle der Thrombozyten bei der Atherogenese und den Komplikationen der Atherosklerose

Bei Hypercholesterinämie sind die Thrombozytenzahlen und die Serum-PDGF-Konzentrationen erhöht (Bath und Martin, 1991): Die Erhöhung dieser beiden Parameter bei Hypercholesterinämie könnte zum erhöhten vaskulären Risiko dieser Patienten beitragen. Da in dieser Studie keine Untersuchung des Gefäßstatus durchgeführt wurde, ist allerdings nicht klar, ob die erhöhten Serum-PDGF-Konzentrationen nicht auch Ausdruck einer chronischen Aktivierung der Thrombozyten aufgrund einer bereits bestehenden Atherosklerose sein könnten.

Bei Hypercholesterinämie ist die Aktivität der Thrombozyten gesteigert, was sich durch einen gesteigerten Plättchenumsatz, eine gesteigerte Aggregabilität, eine erhöhte Serotoninfreisetzung und erhöhte Konzentrationen von β -Thromboglobulin zeigen lässt (Aviram und Brook, 1987).

Patienten mit angiographisch gesicherter koronarer Herzkrankheit hatten im Vergleich zu angiographisch unauffälligen Patienten signifikant erhöhte Plättchenzahlen und signifikant erhöhte Serotoninkonzentrationen im plättchenreichen Plasma als Ausdruck einer gesteigerten Plättchensekretion (Vikenes et al., 1999).

Die Akkumulation und Oxidation von LDL in der Gefäßwand sind frühe Ereignisse in der Pathogenese der Atherosklerose. Neben anderen Zellen produzieren auch aktivierte Thrombozyten in vitro reaktive Sauerstoffspezies, was zur **Oxidation von LDL** führen kann (Gorog und Kovacs, 1995).

Alpha-Thrombin-stimulierte Thrombozyten könnten die Einwanderung von Monozyten in die Gefäßwand fördern (Gawaz, 2000): In Experimenten mit kultivierten Endothelzellen induzierten aktivierte Thrombozyten die Sekretion von **MCP-1** und die **Expression von ICAM-1** über einen Interleukin-1- und NF- κ B- (nuclear factor- κ B) abhängigen Mechanismus.

Aktivierte Thrombozyten könnten über die Stimulierung der Synthese von Cholesterinestern in Makrophagen zur Bildung von **Schaumzellen** beitragen (Farstad, 1998).

Die Freisetzung thrombozytärer Wachstumsfaktoren könnte an der Migration und Proliferation glatter Muskelzellen beteiligt sein. Bisher galt PDGF als das entscheidende

thrombozytäre Mitogen. Im Tierexperiment wies **PDGF** nach Ballondilatation allerdings keine mitogenen Eigenschaften auf (Reidy, 1994). In Kulturen glatter Muskelzellen aus der Kaninchenaorta verursachten **Serotonin und Thromboxan A₂** (TXA₂) eine Zellproliferation (Pakala et al., 1997). Dieser mitogene Effekt war durch Blockade der 5-HT₂- und der TXA₂-Rezeptoren hemmbar. **TXA₂ potenzierte** die mitogenen Effekte von **Thrombin** auf kultivierte glatte bovine Gefäßmuskelzellen aus Koronararterien (Zucker et al., 1998b). Die **Plasma-Serotonin- und Thromboxankonzentrationen** (Knapp et al., 1988) sind bei Patienten mit Atherosklerose erhöht. **ATP und ADP** haben in vitro mitogene Effekte auf glatte Muskelzellen (Erlinge et al., 1995).

Andererseits nehmen die mitogenen Effekte von Thrombozytenlysaten auf humane glatte Muskelzellen nach einem Maximum mit weiter steigender Thrombozytenzahl ab (Unterberg et al., 1996): Interessanterweise war bei physiologischer Thrombozytenzahl (225000/μl) im Stimulationsmedium die ³H-Thymidin-Inkorporation von glatten Muskelzellen nicht höher als die basale ³H-Thymidin-Inkorporation. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass konzentrationsabhängig Thrombozyten zunehmend **Hemmstoffe der Wachstumsfaktoren** wie z. B. TGF-β (transforming growth factor-β) freisetzen.

Zusammenfassend läßt sich sagen, dass die zahlreichen Sekretionsprodukte von Thrombozyten sowohl mitogene als auch antimitogene Eigenschaften aufweisen und die Befunde von in-vivo- und in-vitro-Experimenten differieren (Weber und Schrör, 1999). Die Autoren kommen zu der Schlußfolgerung, dass **Sekretionsprodukte der Thrombozyten per saldo an der Atheroskleroseprogression** beteiligt sind.

Eine **pharmakologische Progressionsverzögerung** der Atherosklerose durch Hemmung der Thrombozytenfunktion konnte bisher nicht erreicht werden. Eine Langzeittherapie mit ASA kann durch die mangelnde Selektivität und Effektivität der Plättchenhemmung nicht vor Atherosklerose schützen (Schrör, 1995b). Dabei ist ein Mangel einer chronischen ASA-Therapie die Hemmung der vasoprotektiven Prostazyklinsynthese und die unzureichende Blockade der Sekretionsreaktion und Thrombozytenadhäsion.

Die Bedeutung der Thrombozyten für die thrombembolischen Komplikationen der Atherosklerose ist schon in **Abschnitt 1.1** dargestellt worden. Die Effektivität einer

Antiplättchentherapie zur Verhütung thrombembolischer Komplikationen bei Risikopatienten ist eindrucksvoll und erreicht bei Patienten mit instabiler Angina pectoris eine 69 % ige Reduktion des Infarkttrisikos oder der kardiovaskulären Mortalität (RISC group, 1990). Acetylsalicylsäure ist dabei das Mittel der ersten Wahl.

Fazit:

Thrombozyten sind pathogenetisch bedeutsam für die endotheliale Dysfunktion, die Einlagerung und Oxidation von Lipiden und somit die Entwicklung eines fettreichen Plaque. Sie könnten die Proliferation von glatten Muskelzellen fördern und somit zur Ausbildung fibröser Plaques und zur Atheromprogression beitragen. Ganz wesentlich sind Thrombozyten an der Entstehung von thrombembolischen Komplikationen beteiligt, deren Häufigkeit durch eine Thrombozytenaggregationshemmung vermindert werden kann.

1.4 Optimale Dosis einer chronischen ASA-Therapie bei koronarer Herzkrankheit

In der Sekundärprophylaxe thrombembolischer Komplikationen bei koronarer Herzkrankheit hat sich Acetylsalicylsäure (ASA) bewährt (Schrör, 1997b).

ASA hemmt in den Thrombozyten die PGH-Synthase (Prostaglandin H-Synthase) und damit die Thromboxansynthese. Dadurch wird ein wichtiger Weg der autokrinen Stimulation blockiert. Gleichzeitig wird aber die vasoprotektive Prostazyklinsynthese gehemmt. Beim gesunden Probanden beträgt die niedrigste Dosierung zur ausreichenden Thrombozytenhemmung in der Langzeitbehandlung mit ASA ca. 30 mg/Tag (Patrono et al., 1985).

Bei der Frage nach der optimalen klinischen ASA-Dosierung herrscht Uneinigkeit. Bei der Sekundärprophylaxe kardiovaskulärer Ereignisse gilt eine tägliche Dosis von 100 mg ASA als ausreichend, aber auch niedrigere Dosierungen von z. B. 75 mg pro Tag erwiesen sich als wirksam (Antiplatelet Trialists' Collaboration, 1994). Von Förster wird zur Schonung der vaskulären Prostazyklinsynthese und zur Verbesserung der Compliance eine Dosisreduktion auf 30 mg täglich gefordert (Förster, 1995).

Eine Dosierung von 30 mg ASA täglich könnte allerdings im Vergleich zu 100 mg weniger wirksam sein, ohne Vorteile in Bezug auf die Schonung der Prostazyklinsynthese und die Verbesserung der Compliance zu bieten.

Schonung der Prostazyklinsynthese:

Prostazyklin zeigt vielfache Effekte auf vaskuläre und nichtvaskuläre Zellen. Diese Effekte sind insgesamt antiatherosklerotischer Natur (Schrör, 1997a). Experimentelle Untersuchungen zur Proliferationshemmung glatter Muskelzellen bei Koronarsklerose durch Prostazyklinmimetika waren bisher allerdings nicht ermutigend (Zucker et al., 1998a). Trotzdem ist eine Schonung der vaskulären Prostazyklinsynthese anzustreben. Durch Reduzierung der täglichen ASA-Dosierung auf 30 mg ließ sich bei gesunden Probanden eine Schonung der Prostazyklinsynthese erreichen (Kallmann et al., 1987). Andere Untersuchungen fanden allerdings auch bei einer 30 mg ASA-Behandlung eine Hemmung der Prostazyklinsynthese (Chiabrando et al., 1992). Knapp et al. (1988)

zeigten, dass eine einwöchige Behandlung mit 2 x 20 mg ASA bei älteren gesunden Menschen und bei Patienten mit Atherosklerose die Prostazyklinsynthese deutlich stärker hemmt als bei jungen gesunden Probanden.

Zur Lösung des Problems der mangelnden Selektivität auch solch niedriger ASA-Dosierungen ist die alternierende Gabe von ASA (z. B. jeden zweiten Tag) und eine kontrollierte Freisetzung des Wirkstoffes diskutiert worden. In einer Studie mit 45 gesunden männlichen Probanden wurden 75 mg ASA mit kontrollierter Wirkstofffreisetzung mit 325 mg ASA alternierend (jeden zweiten Tag) verglichen. Nach 28-tägiger Behandlung war kein Unterschied in Bezug auf die Hemmung der Serum-Thromboxansynthese festzustellen. Die Urin-Prostazyklinausscheidung war nach der 325 mg ASA-Behandlung allerdings im Vergleich zur 75 mg ASA-Behandlung signifikant erniedrigt. Der Autor kommt zu dem Ergebnis, dass sich eine Schonung der vaskulären Prostazyklinsynthese mit einer ASA-Formulierung erzielen lässt, die den Wirkstoff kontrolliert freisetzt (Clarke et al., 1991).

Pharmakokinetik niedriger ASA-Dosierungen:

Bei 23 Patienten mit TIA oder Schlaganfall wurde der Effekt von 40 mg ASA täglich nach einer Woche Therapie getestet (Weksler et al., 1985). Die Aggregation mit vier Agonisten war im gleichen Umfang gehemmt wie nach höheren ASA-Dosierungen. Die Thromboxansynthese nach Koagulation im Glasröhrchen und die Serotonin-Sekretion während der Aggregation waren um jeweils 95 % gehemmt. Kurzfristig war 40 mg ASA täglich auch bei Patienten mit thrombembolischen Komplikationen genauso effektiv wie höhere ASA-Dosierungen. Interessanterweise war allerdings die Thromboxansynthese nach Wochen oder Monaten Therapiedauer bei den Patienten in einer Spannbreite zwischen 70 % und 100 % gehemmt. Aufgrund individuell unterschiedlicher Kinetik könnte also bei einer Langzeittherapie eine Individualisierung der Dosis im Sinne einer Dosiserhöhung bei einigen Patienten nötig sein, so die Folgerung der Autoren.

In einer Untersuchung zur Bioverfügbarkeit von ASA nahmen zehn gesunde Probanden im Abstand von zwei Wochen drei einzelne ASA-Dosierungen von 80 mg ein. Es zeigte sich eine intra- und interindividuelle Variabilität in Bezug auf die Hemmung der Arachidonsäureaggregation und die orale Bioverfügbarkeit von ASA (Benedek et al., 1995). Bei insgesamt 28 verwertbaren Experimenten war in fünf Experimenten nur eine

geringe Hemmung der Aggregation zu beobachten (Low responder). Vier dieser Low responder zeigten auch eine geringere Bioverfügbarkeit von ASA in Relation zu den anderen Probanden. Der Autor kommt zu dem Ergebnis, dass bei höheren Dosierungen die Zahl der Low responder weiter gesenkt werden kann.

Fazit:

Zur Schonung der vaskulären Prostazyklinsynthese und zur Verbesserung der Compliance wird eine Dosisreduktion auf 30 mg täglich gefordert (Förster, 1995).

Eine tägliche Dosierung von 30 mg könnte aufgrund von inter- oder intraindividuellen Variabilitäten der **Pharmakokinetik** zu einer nicht mehr 95 % igen Hemmung der PGH-Synthese führen und damit die Wirksamkeit einer chronischen ASA-Therapie beeinträchtigen. Eine Schonung der Prostazyklinsynthese lässt sich mit einer ASA-Formulierung erzielen, die den Wirkstoff kontrolliert freisetzt.

1.5 Chronische ASA-Therapie bei koronarer Herzkrankheit und Problem der Compliance

Eine Reduzierung der täglichen ASA-Dosierung von 100 mg auf 30 mg soll nicht nur die Prostazyklinsynthese bewahren, sondern auch zu einer Verbesserung der Compliance führen (Förster, 1995). Die mangelnde Compliance ist ein entscheidendes Problem bei jeder Pharmakotherapie. Beim älteren Patienten mit endogener Depression war die Compliance einer ASA-Therapie bei KHK geringer als 50 % (Carney et al., 1995).

Bei der retrospektiven Auswertung der Medikamentenrezepte von 7247 Patienten mit Herzinsuffizienz im Alter zwischen 65 und 99 Jahre zeigte sich, dass die Patienten im Durchschnitt an 111 von 365 Tagen kein Digoxin oder andere Herzinsuffizienzmedikamente zur Verfügung hatten. Nur 10 % aller Patienten hatten genügend Rezepte, um eine tägliche Herzinsuffizienzmedikation durchzuführen (Monane et al., 1994).

In der britischen Ärztstudie zur Primärprophylaxe kardiovaskulärer ischämischer Ereignisse mit ASA betrug die Therapieabbruchquote bis zu 25 % pro Jahr (Peto et al., 1988).

Durch eine Reduzierung der bisher üblichen ASA-Dosierung soll die Magenverträglichkeit verbessert werden. Magenbeschwerden sind der häufigste benennbare Grund für die mangelnde Compliance einer ASA-Therapie (Peto et al., 1988). Hierbei kommt es nicht nur zu Völlegefühl, Magendrücken, Übelkeit und Erbrechen, sondern auch vorzugsweise bei höheren ASA-Dosierungen zur Ulkusaktivierung und erosiven Gastritiden.

Bereits zwei Tage nach Absetzen von ASA zirkulieren etwa 20 % Thrombozyten, deren Zyklooxygenase nicht azetyliert ist (Di Minno et al., 1983). Dieser Anteil funktionsfähiger Thrombozyten ist im Vollblut unter dem fördernden Einfluss der Erythrozyten zur Aktivierung von ASA-gehemmten Thrombozyten fähig (Valles et al., 1991). Nach Absetzen von ASA kommt es also schnell wieder zu einer effektiven Thrombozytenaggregation. Selten erfolgt dabei das Absetzen von ASA unter ärztlicher Aufsicht.

Dosisabhängigkeit der Magentoxizität von ASA:

Tendenziell kommt es, so die Schlussfolgerung vieler Autoren, bei geringeren ASA-Dosierungen seltener zu Magenbeschwerden und zu ernsten gastrointestinalen Blutungszwischenfällen, da die toxische Wirkung auf die Magenmukosa dosisabhängig ist (Schrör, 1992). ASA verursacht eine Zellschädigung durch Hemmung des mukosaprotektiv wirkenden PGE₂ (Prostaglandin E₂) und durch einen direkten chemisch-toxischen Mechanismus.

Eine ASA-Dosierung von 30 mg täglich für einen Zeitraum von 4 Wochen führte bei gesunden männlichen Probanden zu keiner signifikanten, endoskopisch feststellbaren, gastroduodenalen Schleimhautschädigung (Müller et al., 1990).

Bei 75 mg ASA täglich (RISC group, 1990) wurden nach drei Monaten Therapie gastrointestinale Beschwerden in der Therapiegruppe ca. 4 mal häufiger berichtet als in der Plazebogruppe.

Eine Reduzierung der täglichen ASA-Dosierung auf 30 mg könnte also bei besserer Verträglichkeit durch eine Complianceverbesserung die Effektivität einer ASA-Therapie erhöhen. Die Magenverträglichkeit lässt sich ferner durch magensaftresistente, mikroverkapselte Präparate verbessern. Auch gepufferte Präparate werden besser vertragen und erhöhen so die Compliance (Schrör, 1992).

Complianceproblematik unabhängig von Nebenwirkungen:

Andererseits ist gerade bei Risikopatienten die Compliance einer Pharmakotherapie unabhängig von Nebenwirkungen vermindert. So war in der amerikanischen Ärztstudie der Anteil der Teilnehmer, die weniger als 50 % der Studientabletten einnahmen, in der Plazebogruppe mit 13 % nicht wesentlich geringer als in der ASA-Gruppe mit 14 % (Glynn et al., 1994). Interessanterweise war eine niedrige Compliance mit kardiovaskulären Risikofaktoren assoziiert: Nikotinmißbrauch, Adipositas, Bewegungsarmut und Angina pectoris in der Vorgeschichte.

Fazit:

Für eine Pharmakotherapie mit ASA zur Prophylaxe thrombembolischer Komplikationen sollte die niedrigste wirksame Dosierung angewendet werden, um Complianceprobleme aufgrund von Nebenwirkungen zu reduzieren. Trotzdem ist das gelegentliche Auslassen von Tabletten insbesondere bei Risikopatienten wie z. B. Rauchern ein Grundproblem jeder Pharmakotherapie. Wenn unter Non-Compliance-Bedingungen die Wirksamkeit einer Standardtherapie mit 100 mg ASA sicherer ist, als die Wirksamkeit einer deutlich niedrigeren ASA-Dosierung, sollte die bisher übliche Dosierung nicht vermindert werden.

1.6 Fragestellung

Ausgehend von der Bedeutung des Nikotinmissbrauchs für die Atherosklerose und der Bedeutung von ASA zur Prophylaxe thrombembolischer Komplikationen auf dem Hintergrund mangelnder Compliance sollen in dieser Arbeit folgende Fragestellungen untersucht werden:

1. Wie wirksam sind eine 40 mg ASA-Behandlung und eine 100 mg ASA-Behandlung in einem Non-Compliance-Modell?
2. Sind schon bei gesunden Rauchern Veränderungen der Thrombozytenfunktion zu beobachten?
3. Gibt es Unterschiede in der Wirksamkeit einer ASA-Behandlung zwischen Nichtrauchern und Rauchern?

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Versuchsplan

Probanden:

Die Studie wurde in Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki durchgeführt und durch die Ethikkommission der Heinrich-Heine-Universität genehmigt. Alle Probanden wurden über Methoden und Fragestellung der Studie aufgeklärt und erklärten sich schriftlich damit einverstanden.

An der Untersuchung nahmen 10 gesunde männliche Nichtraucher (Alter 23-37 Jahre, Durchschnittsalter 28 Jahre) sowie 10 gesunde männliche Raucher (Alter 21-34 Jahre, Durchschnittsalter 25 Jahre, 10-30 Zigaretten pro Tag, durchschnittlich 15 Zigaretten pro Tag) teil. Sie hatten nach eigenen Angaben innerhalb der letzten 14 Tage vor Studienbeginn keine Medikamente eingenommen. Bei allen Probanden wurde eine Anamnese erhoben sowie Standardlaboruntersuchungen durchgeführt. Es ergaben sich keine pathologischen Befunde.

Behandlung:

Es wurde die Wirkung einer 40 mg ASA-Behandlung (Aspirin[®], Bayer, Leverkusen) mit der Wirkung einer 100 mg ASA-Behandlung (Aspirin[®], Bayer, Leverkusen) verglichen. Die Behandlung mit jeder Dosierung dauerte zwei Wochen. Nach einer zweiwöchigen Auswaschphase folgte eine weitere zweiwöchige Behandlungsphase mit der jeweils anderen ASA-Dosierung (siehe **Abb. 3**). In den Behandlungsphasen wurde jeden zweiten Tag eine Tablette ASA eingenommen (insgesamt sieben Tabletten einer Dosierung). Die Compliance wurde durch Zählung der übriggebliebenen Tabletten überprüft.

Studiendesign:

Die Studie war im Cross-over-Design angelegt, Raucher und Nichtraucher nahmen beide ASA-Dosierungen. Die Blutabnahmen für die Standardlaboruntersuchungen erfolgten 24 Stunden vor der ersten Tablette des ersten Dosierungsschemas und 24

Stunden nach der letzten Tablette des zweiten Dosierungsschemas. Die Blutabnahmen für die Aggregationsversuche erfolgten 24 Stunden nach der letzten Tablette des ersten Dosierungsschemas, am Ende der Auswaschphase und 24 Stunden nach der letzten Tablette des zweiten Dosierungsschemas. Zusammen mit der Blutabnahme für die Aggregationsversuche wurde eine Urinprobe abgegeben.

Versuchsprotokoll:

Aus dem am Abnahmetag gewonnenen venösen Blut wurden plättchenreiches Plasma (PRP), plättchenarmes Plasma (PPP) und Erythrozytenkonzentrat gewonnen. Ca. 90 min nach der Blutabnahme wurden die Messungen (Rekrutment, ADP-Aggregation, Kollagenaggregation) durchgeführt. Dabei wurde gleichzeitig die ATP-Sekretion gemessen. Nach den Versuchen wurden die Thrombozyten im PRP ausgezählt. Am selben Tag wurden ein Kleines Blutbild und eine Serumchemie bestimmt. Die Messung von Thromboxan B₂ im PRP und Thromboxan- und Prostazyklinmetaboliten im Urin erfolgte später aus bei -80°C gelagerten Proben.

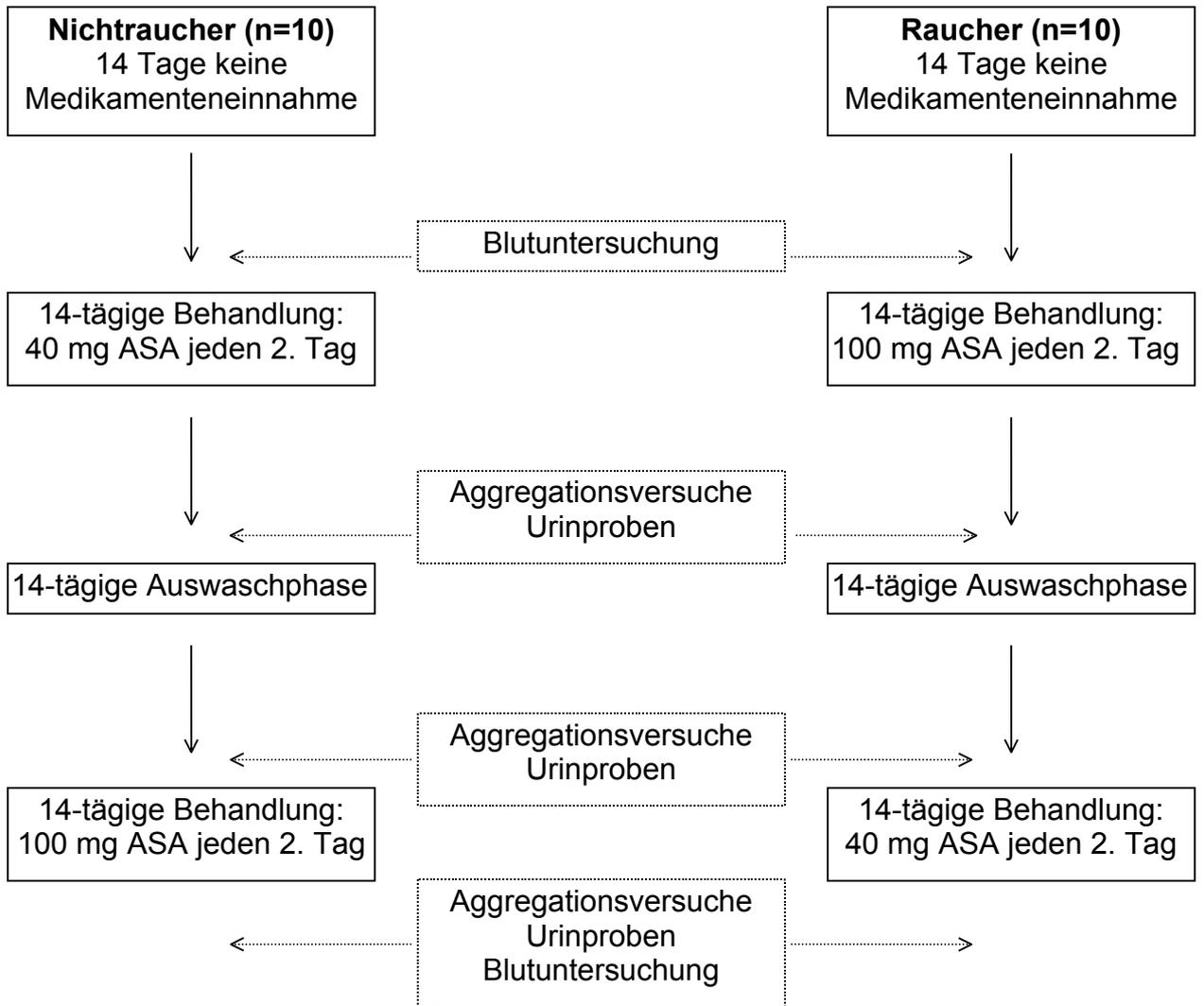


Abbildung 3: Versuchsplan. Bei zehn Nichtrauchern bzw. Rauchern wurden jeweils eine 40 mg ASA-Behandlung und eine 100 mg ASA-Behandlung durchgeführt. Dazwischen lag eine 14-tägige Auswaschphase.

2.2 Material

2.2.1 Blutentnahme

Alle Probanden erklärten erneut mündlich ihr Einverständnis mit der Blutentnahme. Aus der vena mediana cubiti wurde den Probanden 100 ml Blut entnommen. Als Antikoagulans diente eine 1:9 (V/V) Zitratvorlage (ACD Biostabil, Biotest, Frankfurt, Deutschland). Die Blutabnahme erfolgte mit W.I.N. 19G (Abbott, Sligo, Irland) Butterfly und Perfusor-Spritze (B. Braun, Melsungen, Deutschland). Die weitere Verarbeitung und Aufbewahrung erfolgte in Falcon-Polystyrolröhrchen (Becton Dickinson Labware, Meylan Cedex, Frankreich).

2.2.2 Plasmagewinnung, Erythrozytengewinnung und Thrombozytenzählung

Das Zitratblut wurde sofort nach Abnahme für 10 min bei Raumtemperatur und 230 x g zentrifugiert (Zentrifuge Minifuge GL, Heraeus Christ, Osterode, Deutschland) und das plättchenreiche Plasma (PRP) abgehoben. Die Thrombozytenzahlen im PRP lagen bei 320000-860000 pro μl . Es wurde nicht auf eine bestimmte Thrombozytenzahl pro μl eingestellt. Plättchenarmes Plasma (PPP) wurde durch Zentrifugation des Sedimentes für 5 min bei Raumtemperatur und 1200 x g gewonnen und abgehoben. 10 ml der sedimentierten Erythrozyten wurden entnommen und mit 40 ml Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS, pH 7,4) gewaschen und für 5 min bei Raumtemperatur und 1200 x g sedimentiert. 6 ml des Erythrozytenkonzentrates wurden entnommen und wie PRP und PPP in Falcon-Polystyrolröhrchen bis zum Beginn der Versuche ca. eine 3/4 Stunde bei Raumtemperatur gelagert. 20 μl PRP wurden in einem Thrombo-Plus-Röhrchen (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) verdünnt und die Thrombozytenzahl in einer Thomakammer mit Hilfe eines Phasenkontrastmikroskopes (Olympus, Tokyo, Japan) bestimmt.

2.2.3 Urinproben

Die Messung des im Urin ausgeschiedenen stabilen Thromboxanmetaboliten TXB₂, des stabilen Prostazyklinmetaboliten 6-oxo-PGF_{1α} und die Messung des Urinkreatinins erfolgte aus Urinproben, die am Tag der Blutabnahme gewonnen worden waren. Die Proben wurden zur späteren Aufarbeitung bei -80°C tiefgefroren.

2.2.4 Substanzen und Lösungen

Substanzen:

ACD (Biostabil)	Biotest Pharma, Dreieich
Adenosindiphosphat	Boehringer, Mannheim
Adenosintriphosphat	Boehringer, Mannheim
Aktivkohle	Fluka, Neu-Ulm
ATP-Biolumineszenz	Boehringer, Mannheim
Dextran 500	Serva, Heidelberg
EDTA (Titriplex III)	Merck, Darmstadt
Indometazin	Luitpolt, München
Kollagenreagenz Horm	Nycomed, München
Thromboxan B ₂	Cayman Chemical Co, Ann Arbor
[³ H] Thromboxan B ₂	Amersham, Braunschweig
Thromboxan B ₂ Antiserum	Institut für Pharmakologie und klinische Pharmakologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Lösungen:

ACD (Biostabil): Na-Citrat 74,8 mM, Zitronensäure 38 mM, Glucose 123,6 mM.

Adenosindiphosphat: Für jeden Versuchstag wurden 5 mg ADP in PBS gelöst und auf die verwendeten Endkonzentrationen verdünnt.

Adenosintriphosphat: 5 mg ATP wurden in PBS-Puffer gelöst und auf 10^{-6} bis 10^{-10} M verdünnt.

HEPES-Tyrodepuffer: NaCl 134 mM, NaHCO₃ 12 mM, KCl 2,9 mM, Na₂HPO₄ 0,36 mM, MgCl₂ 1 mM, CaCl₂ 2 mM, HEPES 5 mM, pH 7,4.

EDTA-Indometazin-Lösung: 5 mg Indometazin wurden in 810 µl Na₂HPO₄ und 190 µl Na₂HPO₄ gelöst und mit 4 ml Aqua bidest verdünnt. Von dieser Lösung wurden 1370 µl mit 630 µl EDTA-Lösung (77 mM) gemischt. Die Endkonzentration im PRP betrug für Indometazin 80 µM und für EDTA 4,8 mM.

Kollagen: Kollagenreagenz Horm (1 mg/ml native Kollagenfibrillen equiner Sehnen) wurde an jedem Versuchstag mit SKF Horm Puffer auf Konzentrationen zwischen 0,3 und 5 µg/ml verdünnt.

PBS-Puffer: NaCl 138 mM, KCl 2,3 mM, Na₂HPO₄ 8,1 mM, KH₂PO₄ 1,5 mM, pH 7,4.

RIA-Puffer: NaCl 150 mM, Na₂HPO₄ 8,1 mM, NaH₂PO₄ 1,7 mM, pH 7,4.

2.3 Methoden

2.3.1 Thrombozytenaktivitätsmessungen

Prinzip der Aggregometrie:

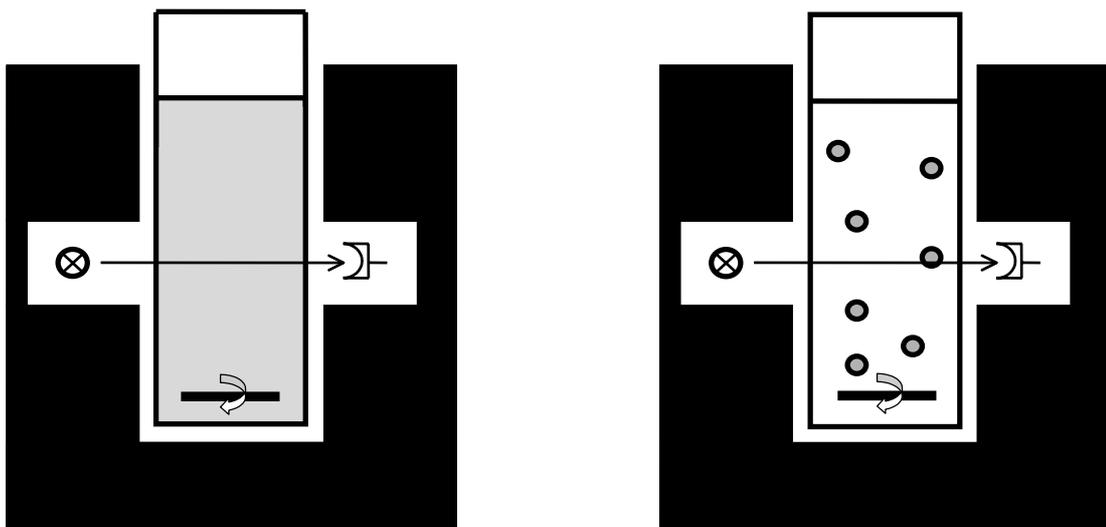
In dieser Arbeit wurden die Wirkungen von 40 mg vs. 100 mg Acetylsalicylsäure auf die Thrombozytenfunktion untersucht. Als Verfahren diente die von Born (1962) entwickelte Methode, die auf dem Prinzip der Messung der Zunahme der Lichtdurchlässigkeit einer Thrombozytensuspension im Verlauf einer Aggregation beruht (**Abb. 4**). Die Messungen wurden in einem Zweikanalaggregometer (Labor, Hamburg) durchgeführt, wobei die Veränderung der Lichtdurchlässigkeit photometrisch gemessen und mit einem Schreiber aufgezeichnet wurde. Dabei wurden typischerweise vier Arten von Aggregationskurven beobachtet (siehe auch **Abb. 6a-d**). Die basale Transmission wurde auf PRP und die maximale Transmission auf PPP geeicht (Zucker, 1989). Als Stimulus für das PRP diente Kollagen (Zucker, 1962), ADP (Born, 1962) und beim Rekrutmentversuch der Überstand einer mit Kollagen stimulierten und dann zentrifugierten Thrombozyten-Erythrozyten-Suspension (Perez-Requejo et al., 1985). Auch bei einer vollständigen Aggregation wird im PRP nur ca. 90 % der Transmission von PPP erreicht.

Kollagen- und ADP-Aggregation:

Die Aggregationsversuche wurden mit einem Probevolumen von 500 µl durchgeführt. Hierzu wurden 400 µl PRP mit 90 µl HEPES-Tyrodepuffer (pH 7,4) 1 min im Heizblock bei 37°C ohne Rühren und eine weitere Minute unter Rühren (1200 U/min) inkubiert. Die Aggregation wurde durch Zugabe von 10 µl Stimulanz ausgelöst und unter Rühren (1200 U/min) als Transmission/Zeit für 5 min aufgezeichnet. Als Stimulanz wurde Kollagen-Horm-Verdünnungspuffer als Kontrolle und 0,3 bis 5,0 µg/ml Kollagen oder PBS pH 7,4 als Kontrolle und 0,2 bis 20 µM ADP (jeweils Endkonzentration) verwendet.

Die Kollagenaggregation ist ein klassisches Modell zur Beurteilung der Wirkungen von Acetylsalicylsäure auf die Thrombozytenfunktion. Bei einer Gefäßschädigung kommen Thrombozyten in Kontakt mit der freiliegenden extrazellulären Matrix in der das Kollagen enthalten ist. Dieses Modell untersucht also stark vereinfacht die Thrombozytenfunktion an der Stelle eines Gefäßdefektes.

Die ADP-Aggregation ist bei physiologischer Ca^{++} -Konzentration thromboxanunabhängig und wird daher durch Acetylsalicylsäure in vivo nicht beeinflusst (Bretschneider et al., 1994). ADP ist ein Inhaltsstoff der elektronendichten Granula der Thrombozyten und dient zur autokrinen Stimulation der Thrombozyten und zur Aktivierung weiterer Thrombozyten. Damit wird also ein wichtiger Mechanismus zur Selbstaktivierung von Thrombozyten an der Stelle einer Gefäßläsion untersucht. In vitro ist die ADP-Aggregation bei niedrigen Konzentrationen thromboxanabhängig und daher zur Untersuchung einer Thrombozytenhemmung durch Acetylsalicylsäure geeignet.



A) Kontrolle

B) Stimulation

Abbildung 4: Schema des Prinzips der turbidometrischen Aggregationsmessung. Eine unstimulierte, gerührte Thrombozytensuspension (A) hat eine gewisse Trübung, die zum Teil durch freie Thrombozyten bedingt ist. Nach Zugabe einer proaggregatorisch wirksamen Substanz (z. B. Kollagen oder ADP) in die Thrombozytensuspension (B) kommt es zur Aggregation der Thrombozyten mit Erhöhung der Lichtdurchlässigkeit, die gemessen wird.

Rekrutment:

Unter verschiedenen klinischen Bedingungen mit erhöhter Thromboseneigung kommt es zu einer Plättchenhyperreaktivität, die von anderen Blutbestandteilen beeinflusst werden kann. Erythrozyten können z. B. über die Förderung der Freisetzung von ADP die Aggregabilität von Thrombozyten beeinflussen (Perez-Requejo et al., 1985).

Auch nach einer ASA-Behandlung fördern Erythrozyten die Thromboxanbildung und Aggregation ASA-behandelter Thrombozyten im Vergleich zu einer klassischen Aggregation im plättchenreichen Plasma. Mit diesem System kann also möglicherweise die in-vivo-Effektivität einer ASA-Behandlung besser abgeschätzt werden als mit der ADP- und Kollagenaggregation (Valles et al., 1991).

Im Kollagen-stimulierten Vollblut sind noch vor einer Aggregation schnell gebildete pro- und antiaggregatorische Substanzen nachweisbar (Perez-Requejo et al., 1985). Diese schnell gebildeten Substanzen können ihrerseits eine Aggregation auslösen.

Beim Rekrutment wird die aggregationsauslösende Wirkung dieser löslichen Substanzen untersucht, die kurz nach Inkubation einer Thrombozyten-Erythrozyten-Suspension (Generatorsystem) mit Kollagen entstehen. Dazu wird eine zellfreie Probe gewonnen, die mit plättchenreichem Plasma in einer zweiten Probe (Indikatorsystem) inkubiert wird.

Hierzu werden also ein Generatorsystem und ein Indikatorsystem hintereinandergeschaltet (**Abb. 5**). Das Indikatorsystem beruht auf dem Prinzip der Aggregometrie und besteht aus PRP und Puffer (400 µl PRP und 100 µl HEPES-Tyrodepuffer pH 7,4). Das Generatorsystem ist eine Suspension aus 245 µl PRP plus 245 µl Erythrozyten (Perez-Requejo et al., 1985).

Das Generatorsystem wurde für 4 min bei 37 °C vorinkubiert. Nach Zugabe von 10 µl Kollagen wurde die Suspension innerhalb von 10 Sekunden durch fünfmaliges Wenden vorsichtig gemischt. Zur Gewinnung einer zellfreien Probe aus dem Generatorsystem wurde die Suspension für 75 s bei Raumtemperatur und 15000 x g zentrifugiert. 50 µl des zellfreien Überstandes (Releasat) wurden ohne Verzug in das PRP (Indikatorsystem) gegeben. Zuvor wurde das Indikatorsystem 1 min bei 37°C ohne Rühren und eine weitere Minute mit Rühren inkubiert. Die durch das Releasat ausgelöste Aggregation wurde für 5 min aufgezeichnet und wie die ADP- bzw. Kollagen-induzierte Aggregation ausgewertet.

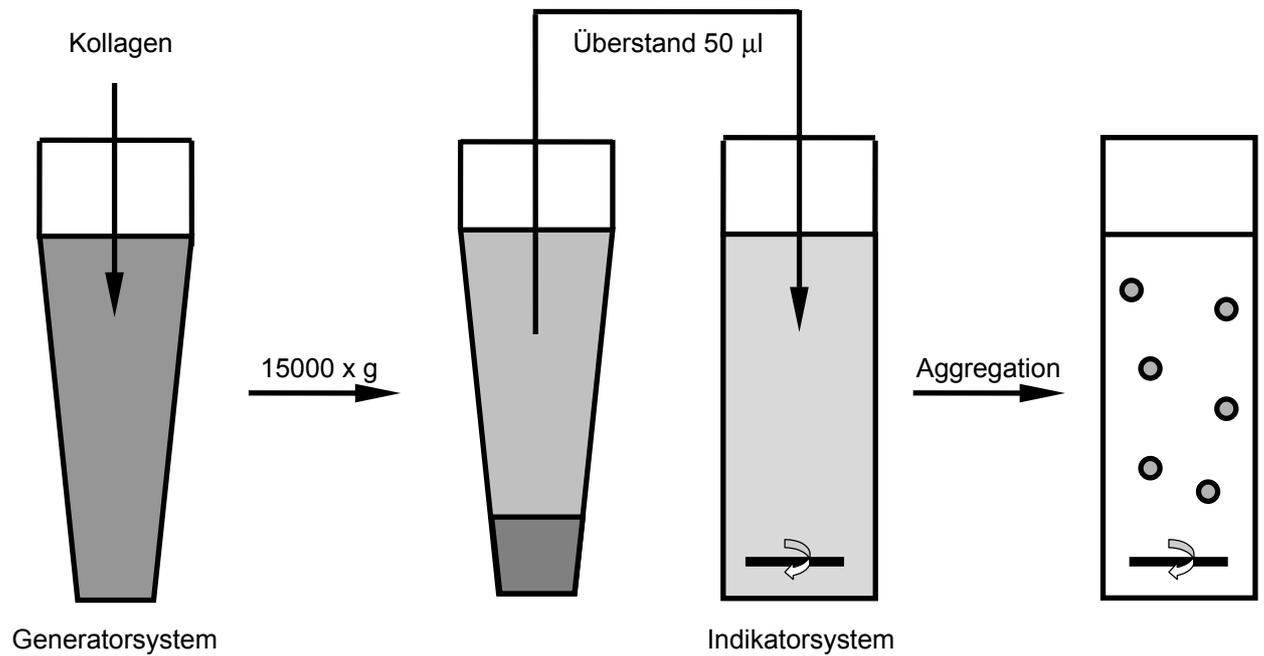


Abbildung 5: Prinzip des Rekrutment. Eine Thrombozyten-Erythrozyten-Suspension (Generatorsystem) wird mit Kollagen stimuliert, durchmischt und kurz darauf zentrifugiert. Es wird der Überstand abgehoben und zu gerührtem PRP gegeben, welches hier als Indikatorsystem dient. Dabei werden reversible, biphasische und bei höheren Kollagenkonzentrationen auch irreversible Aggregationen beobachtet.

Auswertung der Aggregationskurven:

Die Auswertung der durch die Aggregometrie aufgezeichneten Kurven erfolgte durch die Bestimmung des Maximums T_{\max} der Aggregationskurve (**Abb. 6a-d**), durch die Bestimmung der Tangentensteigung der Aggregationskurve und durch Beurteilung der Reversibilität der Aggregation.

Das Maximum der Aggregationskurve T_{\max} wurde ins Verhältnis zur Transmission von PPP (T_{PPP}) gesetzt. Die Einheit der Amplitude ist also % (der Transmission von PPP). Die Bestimmung der Amplitude (%) erfolgte bei der irreversiblen (**Abb. 6a**) und biphasischen Aggregation (**Abb. 6b**) am Ende des einzelnen Aggregationsexperimentes, während die Bestimmung der Amplitude bei einer reversiblen (**Abb. 6c**) bzw. vollständig reversiblen Aggregation (**Abb. 6d**) im Punkt der höchsten Transmission erfolgte.

Die Messung der Tangentensteigung (mV/min) erfolgte im Wendepunkt der Aggregationskurve (**Abb. 6a**). Sie erfolgte nur bei der Kollagenaggregation.

Eine Aggregation wurde als reversibel eingestuft, wenn die Transmissionsabnahme nach der primären Aggregation mindestens 33 % (**Abb. 6c/d**) betrug.

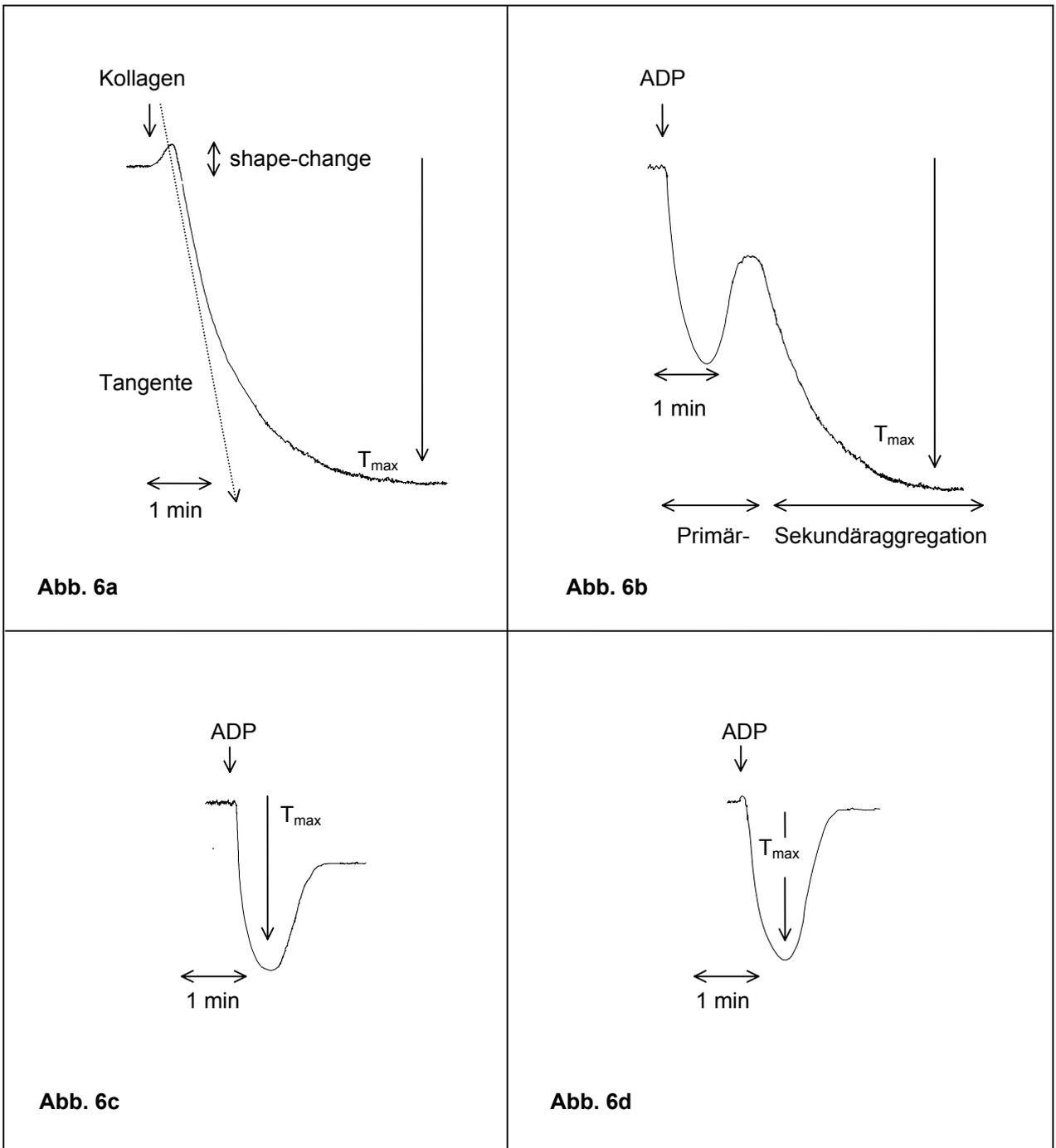


Abbildung 6: Auswertung der Aggregationskurven der ADP- und Kollagen-induzierten Aggregation. Abb. 6a: Irreversible Aggregation, **Abb. 6b:** biphasische Aggregation, **Abb. 6c:** reversible Aggregation, **Abb. 6d:** vollständig reversible Aggregation. Messung der Tangentensteigung (mV/min) und der maximalen Transmission T_{max} (mV) bei der irreversiblen Aggregation (**Abb. 6a**); Bei der reversiblen Aggregation (**Abb. 6c/d**) und der biphasischen Aggregation (**Abb. 6b**) wurde zur Auswertung T_{max} bestimmt. Auch die Aggregation beim Rekrutment wurde durch Messung der maximalen Transmission T_{max} (mV) ausgewertet.

2.3.2 Messung der ATP-Freisetzung

Für die Bestimmung des aus den Thrombozyten während der Aggregation freigesetzten ATP ist die Biolumineszenztechnik nach Holmsen (1972) angewendet worden. Das Enzym Luciferase aus *Photinus pyralis* setzt D-Luciferin unter ATP-Verbrauch zu Oxiluciferin um, wobei Photonen emittiert werden:



Die Intensität des mit einer Wellenlänge von 562 nm emittierten Lichtes ist proportional zu der ATP-Konzentration und als Lichtsignal meßbar. Um die freigesetzte ATP-Menge quantifizieren zu können, wurden Eichkurven mit den ATP-Konzentrationen 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} molar mitgeführt. Die dazugehörige Funktion $\log[ATP] = 1,5 \times \log(\text{cpm}) - 15,57$ wurde mit Hilfe der linearen Regression (GraphPad Prism) ermittelt. Die bilogarithmisch aufgetragenen Messwerte und die daraus abgeleitete Eichkurve sind in **Abb. 7** dargestellt. Beim Rekrutment erfolgte die ATP-Messung 9 min nach Stimulation des PRP mit dem Überstand des Kollagen-stimulierten Generatorsystems und damit 4 min nach Rührstopp, bei der ADP- und Kollagenaggregation erfolgte die ATP-Messung 7 min nach Stimulation des PRP und damit 2 min nach Rührstopp. Bei irreversibler Aggregation wurden die PRP-Proben mit PBS-Puffer verdünnt. Es wurden 50 µl Probe mit 50 µl ATP-Biolumineszenz-Lösung (ATP Bioluminescence Assay Kit CLS II, Boehringer Mannheim, Deutschland) inkubiert und nach 20 s die maximalen counts per minute (cpm) registriert (6-Kanal Biolumat LB 9505, Berthold, Wildbad, Deutschland). Die cpm konnten mittels der ATP-Eichkurven auf eine ATP-Konzentration umgerechnet werden. Die ATP-Konzentration wurde in $\text{nmol}/10^{11}$ Plättchen angegeben.

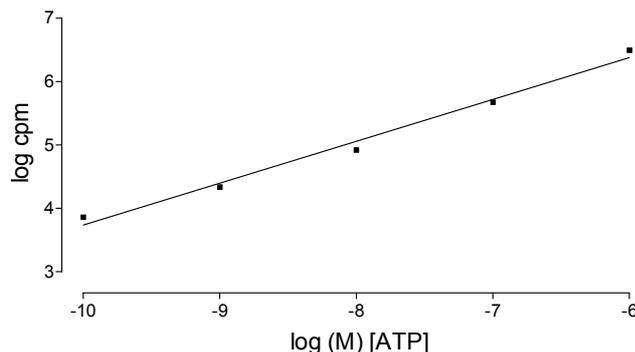


Abbildung 7: ATP-Eichkurve: Bilogarithmisch aufgetragene Messwerte zur Analyse mittels linearer Regression und zur Bestimmung der Eichkurve. Die Funktion der Eichkurve lautet: $\log [\text{ATP}] = 1,5 \times \log \text{cpm} - 15,57$.

2.3.3 Radioimmunoassay zur Bestimmung von TXB₂ im PRP und Releasat

Sämtliche Radioimmunoassays wurden im RIA-Labor des Instituts für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf durchgeführt. Für die Messung der Thromboxanbildung im Generatorsystem beim Rekrutment wurden 50 µl Probe zur Unterbrechung der Thromboxansynthese mit einer EDTA-Indometazin-Lösung (80 µM bzw. 4,8 mM) inkubiert. Die Probe wurde wie das Releasat durch Zentrifugation (75 s bei Raumtemperatur und 15000 x g) des Generatorsystems gewonnen. Die Inkubation mit der EDTA-Indometazin-Lösung erfolgte 2 min nach Kollagenstimulation.

Für die Messung der Thromboxanbildung im PRP-Indikatorsystem beim Rekrutment und bei der ADP- und Kollagenaggregation wurden 400 µl Probe mit oben beschriebener EDTA-Indometazin-Lösung inkubiert. Die Inkubation erfolgte 10 min nach Stimulation und damit 5 min nach Rührstopp, verwendet wurde nicht zentrifugiertes PRP. Die EDTA-Indometazin-Lösung und das PRP wurden mindestens 5 min inkubiert, bevor die Zentrifugation (3 min bei Raumtemperatur und 15000 x g) zur Abtrennung der Plättchen erfolgte. Alle mit der EDTA-Indometazin-Lösung inkubierten Proben wurden bei -80° C eingefroren. Der thrombozytäre Arachidonsäuremetabolit TXA₂ hat bei physiologischem pH-Wert lediglich eine Halbwertszeit von ca. 30 Sekunden (Granström et al., 1985). Daher wurde sein stabiles, nichtenzymatisches Hydrolyseprodukt TXB₂ mit Hilfe eines Kohle-Einfachantikörper-Radioimmunoassays für

wässrige Proben bestimmt. Das Antiserum wurde aus Kaninchenblut gewonnen und entstammt eigener Herstellung (Schrör und Seidel, 1988).

Radioimmunoassay:

Das Prinzip der Messung basiert auf der Konkurrenz einer in der Probe enthaltenen unbekanntem Menge TXB_2 mit einer bekannten Menge zugesetzten radioaktiv markierten TXB_2 (^3H - TXB_2) um die Bindungsstellen spezifischer Antikörper. Die Trennung des freien vom gebundenen ^3H - TXB_2 erfolgte durch Oberflächenadsorption an Aktivkohle. Das an Antikörper gebundene ^3H - TXB_2 wurde mit einer Szintillationslösung inkubiert und die Lichtimpulse im Szintillationszähler gemessen. Die Zahl der counts per minute (cpm) ist dabei umgekehrt proportional zur Konzentration des TXB_2 in der zu untersuchenden Probe.

2.3.4 Radioimmunoassay zur Bestimmung von Thromboxan- und Prostazyklinmetaboliten im Urin

Zusammen mit der Blutabnahme wurde eine Urinprobe abgegeben. 3 x 2 ml davon wurden bei -20°C zum späteren Kohle-Einfachantikörper Radioimmunoassay (s. o.) und zur Kreatininbestimmung eingefroren. Für den Radioimmunoassay wurde Kaninchen-Antiserum eigener Herstellung verwendet (Schrör und Seidel, 1988). Sowohl die Thromboxan- als auch die Prostazyklinmetaboliten wurden auf die Urin-Kreatininkonzentration bezogen, die im Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsdiagnostik der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf bestimmt wurde.

2.3.5 Statistische Auswertung

Es wurden jeweils der Mittelwert (mean) und der Standardfehler des Mittelwertes (SEM) von n -Versuchen angegeben. Unterschiede zwischen der 40 mg ASA-Behandlung, der 100 mg ASA-Behandlung und der Kontrolle sowie die Unterschiede zwischen Nichtrauchern und Rauchern wurden hinsichtlich ihrer Signifikanz mit der Zwei-Wege-ANOVA untersucht. Der exakte Test nach Fisher wurde für die Beurteilung der Unterschiede der Häufigkeiten irreversibler ADP-Aggregationen in den einzelnen Gruppen verwendet.

Bei der Auswertung der Ausscheidung von Thromboxanmetaboliten im Urin wurde der t-Test verwendet. Bei Nichtraucher vs. Raucher in der Kontrolle wurde der ungepaarte einseitige t-Test verwendet, da in der Literatur ausschließlich erhöhte oder unveränderte, aber niemals reduzierte Thromboxankonzentrationen bei Rauchern gefunden wurden (Smith et al., 1998).

Bei Nichtraucher vs. Raucher nach ASA-Behandlung wurde der ungepaarte zweiseitige t-Test verwendet, da nach einer ASA-Behandlung keine Unterschiede zwischen Nichtrauchern und Rauchern mehr zu erwarten sind (Nowak et al., 1987).

Bei Kontrolle vs. ASA-Behandlung und 40 mg ASA vs. 100 mg ASA wurde der gepaarte einseitige t-Test verwendet, weil davon auszugehen ist, dass die Thromboxanfreisetzung nach der ASA-Behandlung absinkt (Schrör, 1992).

Auch bei der Auswertung der Ausscheidung von Prostazyklinmetaboliten wurde der t-Test verwendet. Bei Nichtraucher vs. Raucher in der Kontrolle wurde der ungepaarte einseitige t-Test verwendet, da in der Literatur ausschließlich erhöhte oder unveränderte, aber niemals reduzierte Prostazyklinkonzentrationen bei Rauchern gefunden wurden (Smith et al., 1998).

Bei Nichtraucher vs. Raucher nach ASA-Behandlung wurde der ungepaarte zweiseitige t-Test verwendet, da nach einer ASA-Behandlung keine Unterschiede zwischen Nichtrauchern und Rauchern mehr zu erwarten sind (Nowak et al., 1987).

Bei Kontrolle vs. ASA-Behandlung und 40 mg ASA vs. 100 mg ASA wurde der gepaarte einseitige t-Test verwendet, weil ein Absinken der Prostazyklinfreisetzung auch bei gesunden Probanden nach einer low-dose ASA-Behandlung zu erwarten ist (Knapp et al., 1988).

Beim Vergleich der Ergebnisse der Nichtraucher mit den Ergebnissen der Raucher wurden die Daten der Behandlungsgruppen vor der Testung auf Signifikanz normalisiert. Die Mittelwerte der einzelnen Konzentrationen aus den Kontrollversuchen wurden dazu gleich 100 % gesetzt und die Mittelwerte nach ASA-Behandlung als Prozentwert im Vergleich zur Kontrolle der jeweiligen Konzentration angegeben.

Das Signifikanzniveau p für α wurde bei den Einzeltests (Zwei-Wege-ANOVA, t-Test, exakter Test nach Fisher) mit 0,05 festgelegt.

Zur Signifikanzbestimmung bei multiplen Vergleichen wurde das modifizierte Bonferroni-Verfahren nach Holm (Holm 1979) durchgeführt (Gesamtsignifikanzniveau $\alpha' = 0,05$). Ergebnisse, die nach der Bonferroni-Holm-Korrektur nicht mehr signifikant waren, wurden in dieser Arbeit als Hinweis auf eine Tendenz angesehen. Das Signifikanzniveau p , welches in den einzelnen Experimenten angegeben ist, ist als Gesamtirrtumswahrscheinlichkeit der Familie aller signifikanten Tests nach der Korrektur mit dem Bonferroni-Holm-Verfahren aufzufassen.

Alle Graphiken und statistischen Tests wurden mit Hilfe der Software GraphPad Prism ausgeführt.

3. ERGEBNISSE

3.1 Kollagen-induzierte Thrombozytenaggregation

3.1.1 Ausmaß der Kollagen-induzierten Thrombozytenaggregation

Kontrollgruppen: Abb. 9a

Kollagen (0,3-10 µg/ml) führte in allen Versuchen zu einer initialen Abnahme der Lichtdurchlässigkeit des plättchenreichen Plasmas (Abrundung der Thrombozyten und Ausbildung von Pseudopodien= "shape-change"). Nach dem shape-change kam es durch die Thrombozytenaggregation zu einer Zunahme der Lichtdurchlässigkeit. Eine Darstellung von Originalableitungen eines Probanden ist in der **Abb. 8a** zu sehen.

Ab 0,6 µg/ml Kollagen zeigten alle Probanden eine irreversible Aggregation. Eine Erhöhung der Kollagenkonzentration bis auf 5 µg/ml führte konzentrationsabhängig zu einer größeren Tangentensteigung (Lichtdurchlässigkeitszunahme). Unter Berücksichtigung aller Konzentrationen war kein signifikanter Unterschied zwischen Nichtrauchern und Rauchern feststellbar.

Behandlungsgruppen: Abb. 9b

1.) *ASA vs. Kon*: Beide ASA-Behandlungen hemmten bei Nichtrauchern und Rauchern die Kollagenaggregation signifikant (2-Wege-ANOVA mit $p < 0,05$ nach Bonferroni-Holm). Eine Darstellung von Originalregistrierungen eines Probanden nach der 40 mg bzw. 100 mg ASA-Behandlung ist in den **Abb. 8b** und **8c** zu sehen.

Nach der ASA-Behandlung war die Aggregationsamplitude vermindert und die Aggregation setzte verzögert ein. Bei niedrigen Kollagenkonzentrationen (0,3-0,6 µg/ml) waren reversible Aggregationen zu beobachten. Die Wiederauflösung der Thrombozytenaggregate erfolgte langsamer als bei der ADP-Aggregation oder dem Rekrutment. Die Thrombozyten eines Probanden zeigten auch nach der 100 mg ASA-Behandlung irreversible Aggregationen bei allen Kollagenkonzentrationen (**Abb. 8c**).

2.) *40 mg vs. 100 mg ASA*: Nach der 100 mg ASA-Behandlung war die Kollagenaggregation signifikant ($p < 0,05$) stärker gehemmt als nach der 40 mg ASA-Behandlung.

Die Hemmung war bei einer Kollagenkonzentrationen von 0,3 µg/ml am größten und nahm mit steigenden Kollagenkonzentrationen ab.

3.) *NR vs. R*: Die Kollagenaggregation wurde bei den Rauchern sowohl durch 40 mg ASA als auch durch 100 mg ASA signifikant ($p < 0,05$) stärker gehemmt als bei den Nichtrauchern.

Dieser Unterschied war bei 0,3 µg/ml Kollagen nach der 100 mg ASA-Behandlung am stärksten ausgeprägt. Es kam nur bei einem Raucher zu einer reversiblen Aggregation mit einer Amplitude von 7 %, die Thrombozyten der anderen acht Raucher reagierten nicht auf 0,3 µg/ml Kollagen. Die Thrombozyten von sieben Nichtrauchern zeigten reversible Aggregationen (Amplitude 3-23 %), bei einem Probanden war sogar eine irreversible Aggregation zu beobachten.

3.1.2 Kollagen-induzierte Thromboxanbildung

Kontrollgruppen: Abb. 10a

Die Thromboxanbildung war bei den Rauchern signifikant geringer ($p < 0,05$). Bei $5 \mu\text{g/ml}$ Kollagen wurden bei den Nichtrauchern im Mittel 245 ± 19 nmol und bei den Rauchern 193 ± 16 nmol $\text{TXB}_2/10^{11}$ Plättchen gemessen. Die Thrombozyten hatten eine hohe Kapazität zur Bildung von Thromboxan. Bei $0,3 \mu\text{g/ml}$ Kollagen zeigten bereits 15 von 18 Probanden (Nichtraucher und Raucher) eine irreversible Aggregation. Dabei wurden bei den Nichtrauchern 17 ± 5 nmol und bei den Rauchern 10 ± 2 nmol $\text{TXB}_2/10^{11}$ Plättchen gemessen. Die Thromboxansynthese nahm bei $5 \mu\text{g/ml}$ Kollagen im Verhältnis zu $0,3 \mu\text{g/ml}$ Kollagen bei den Nichtrauchern um den Faktor 14 und bei den Rauchern um den Faktor 17 zu.

Behandlungsgruppen: Abb. 10b

1.) *ASA vs. Kon:* Sowohl bei Nichtrauchern als auch bei Rauchern wurde die Thromboxanbildung durch beide ASA-Behandlungen signifikant ($p < 0,05$) gehemmt. Die Thromboxansynthese war bei allen Kollagenkonzentrationen gehemmt. Bei Nichtrauchern bzw. Rauchern betrug die Hemmung nach 40 mg ASA bei $5 \mu\text{g/ml}$ Kollagen 70 % bzw. 65 %. Nach der 100 mg ASA-Behandlung waren die Vergleichswerte 90 % bzw. 95 %. Auch nach 100 mg ASA war also keine 95 % ige Hemmung der Thromboxansynthese in beiden Gruppen erreicht.

2.) *40 mg vs. 100 mg:* Die 100 mg ASA-Behandlung war der 40 mg ASA-Behandlung signifikant ($p < 0,05$) überlegen.

3.) *NR vs. R:* Nach der 40 mg ASA-Behandlung zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen Nichtrauchern und Rauchern. Dagegen wurde nach der 100 mg ASA-Behandlung die Thromboxanbildung bei den Rauchern signifikant stärker gehemmt ($p < 0,05$).

3.1.3 Zusammenfassung der Kollagen-induzierten Thrombozytenaggregation

ASA-Behandlung vs. Kontrolle:

Kollagenaggregation und Thromboxansynthese waren nach beiden ASA-Behandlungen gehemmt. Bei Nichtrauchern und Rauchern war die Aggregation nur bei niedrigen Kollagenkonzentrationen gehemmt. Die Thromboxansynthese war bei allen Probanden auch bei hohen Kollagenkonzentrationen gehemmt. **Tab. 1** zeigt eine Zusammenfassung der Ergebnisse. Eine 95 % ige Hemmung der Thromboxansynthese konnte nur nach 100 mg ASA bei den Rauchern beobachtet werden.

40 mg ASA-Behandlung vs. 100 mg ASA-Behandlung:

Kollagenaggregation und Thromboxansynthese waren nach der 100 mg ASA-Behandlung stärker gehemmt. **Tab. 1** zeigt eine Zusammenfassung der Ergebnisse.

NR vs. R in der Kontrolle und nach ASA-Behandlung:

In der Kontrolle war die Thromboxansynthese bei den Rauchern geringer als bei den Nichtrauchern.

Nach der 40 mg ASA-Behandlung war nur die Aggregation bei den Rauchern stärker gehemmt.

Nach der 100 mg ASA-Behandlung war sowohl Aggregation als auch Thromboxansynthese bei den Rauchern stärker gehemmt. **Tab. 2** zeigt eine Zusammenfassung der Ergebnisse.

Fazit:

1. Beide ASA-Behandlungen hemmten die Thrombozytenfunktion nur bei niedrigen Kollagenkonzentrationen. 100 mg ASA war dabei der 40 mg ASA-Behandlung überlegen. Eine 95 % ige Hemmung der Thromboxansynthese konnte nur nach 100 mg ASA bei den Rauchern beobachtet werden.
2. In der Kontrolle war die Thrombozytenfunktion der Raucher im Vergleich zu den Nichtrauchern vermindert.
3. Nach der ASA-Behandlung war die Thrombozytenfunktion der Raucher im Vergleich zu den Nichtrauchern im verstärkten Ausmaß vermindert.

	Hemmung nach 40 mg ASA-Behandlung im Vergleich zur Kontrolle		Hemmung nach 100 mg ASA-Behandlung im Vergleich zur Kontrolle		Überlegenheit von 100 mg ASA im Vergleich zur 40 mg ASA-Behandlung	
	NR	R	NR	R	NR	R
Kollagenaggregation	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05
TXA ₂ -Synthese	-70 %*	-65 %*	-90 %*	-95 %*	p<0,05	p<0,05

Tabelle 1: Auswirkungen einer ASA-Behandlung (40 mg bzw. 100 mg) auf die Parameter der Thrombozytenfunktion im Vergleich zu unbehandelten (Kontrolle) Nichtrauchern (NR) und Rauchern (R). Signifikante Hemmung der Kollagenaggregation nach ASA-Behandlung. Signifikante Hemmung der Kollagen-induzierten TXA₂-Synthese in Prozent (%) nach ASA-Behandlung (%*=signifikant). Überlegenheit von 100 mg ASA im Vergleich zur 40 mg ASA-Behandlung.

	Verminderte Thrombozytenfunktion der Raucher im Vergleich zu den Nichtrauchern		
	Kontrolle	40 mg ASA-Behandlung	100 mg ASA-Behandlung
Kollagenaggregation	n.s.	p<0,05	p<0,05
TXA ₂ -Synthese	p<0,05	n.s.	p<0,05

Tabelle 2: Auswirkungen von Zigarettenrauchen auf die Parameter der Thrombozytenfunktion bei unbehandelten (Kontrolle) sowie bei ASA-behandelten (40 mg bzw. 100 mg) Probanden. Signifikant verminderte Thrombozytenfunktion bei Kollagenaggregation bzw. Kollagen-induzierter TXA₂-Synthese bei den Rauchern in der Kontrolle und nach ASA-Behandlung (n.s.= nicht signifikant).

Abbildung 8: Wirkungen von ASA auf die Kollagen-induzierte Thrombozytenaggregation, Aggregationskurven eines Probanden. Abb. 8a: Vor ASA-Behandlung (Kontrolle), Abb. 8b: nach 40 mg ASA-Behandlung, Abb. 8c: nach 100 mg ASA-Behandlung.

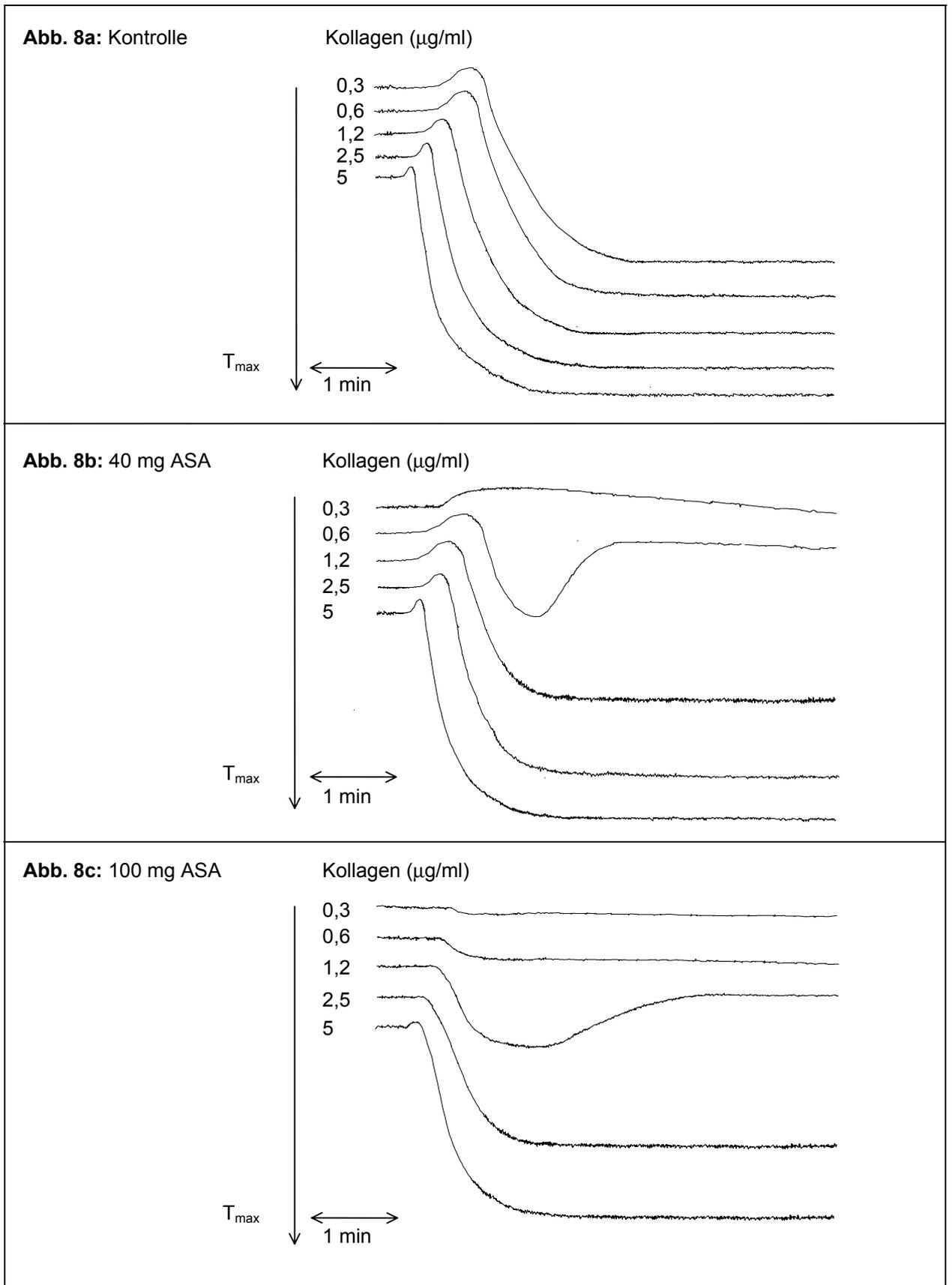


Abb. 9: Kollagen-induzierte Thrombozytenaggregation bei unbehandelten (Kon) Nichtrauchern (NR) bzw. Rauchern (R) und nach ASA-Behandlung (40 mg bzw. 100 mg). Abb. 9a: Ergebnisse der Kontrolle (Kon); Abb. 9b: nach ASA-Behandlung mit 40 mg bzw. 100 mg ASA, Tangentensteigung (% Kontrolle) im Vergleich zur Kontrolle bei der jeweiligen Kollagenkonzentration. Statistische Auswertung (sofern nicht in der Abb. enthalten): Kontrolle (Abb. 9a) vs. ASA-Behandlung (Abb. 9b): NR Kon vs. NR 40 mg: $p < 0,05$; NR Kon vs. NR 100 mg: $p < 0,05$; R Kon vs. R 40 mg: $p < 0,05$; R Kon vs. R 100 mg: $p < 0,05$.

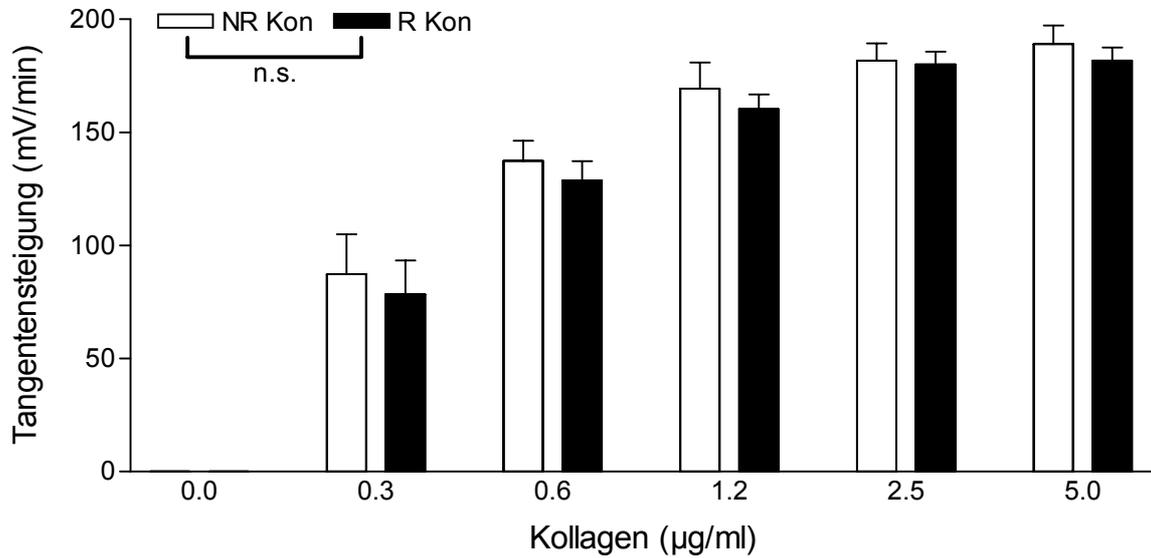


Abbildung 9a: Kontrolle

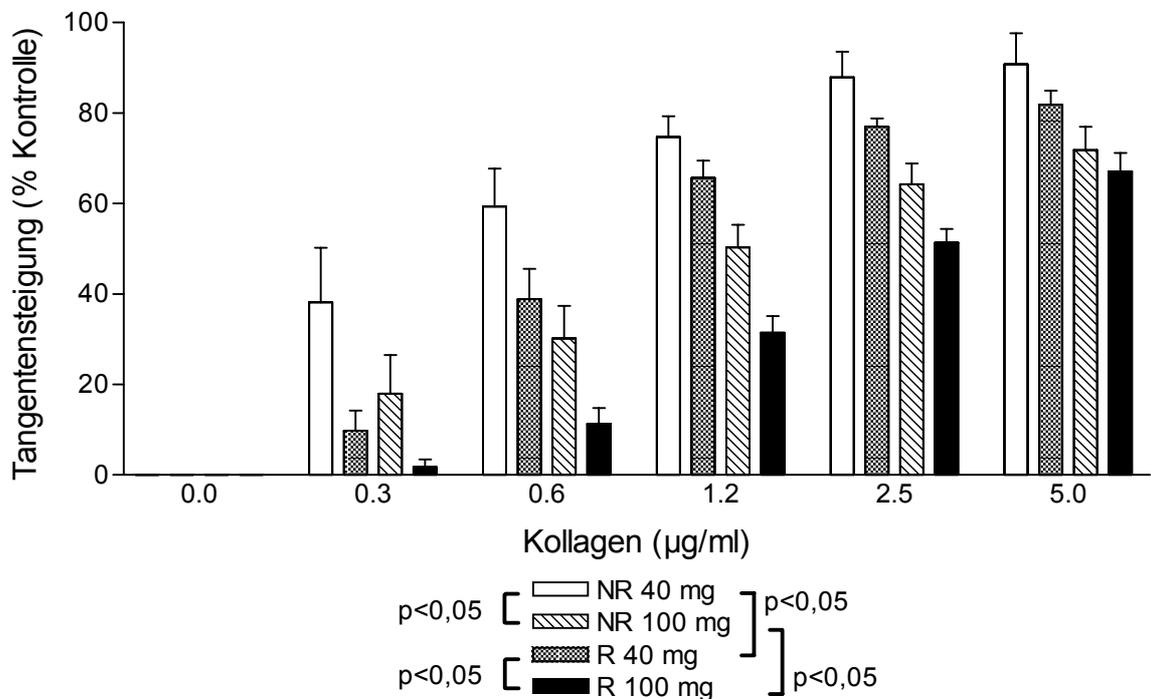


Abbildung 9b: nach ASA-Behandlung

Abb. 10: Kollagen-induzierte Thromboxanbildung (TXB₂) bei unbehandelten (Kon) Nichtrauchern (NR) bzw. Rauchern (R) und nach ASA-Behandlung (40 mg bzw. 100 mg). **Abb. 10a:** Ergebnisse der Kontrolle (Kon); **Abb. 10b:** nach ASA-Behandlung mit 40 mg ASA bzw. 100 mg ASA, TXB₂ (% Kontrolle) im Vergleich zur Kontrolle bei der jeweiligen Kollagenkonzentration. Statistische Auswertung (sofern nicht in der Abb. enthalten): Kontrolle (**Abb. 10a**) vs. ASA-Behandlung (**Abb. 10b**): NR Kon vs. NR 40 mg: p<0,05; NR Kon vs. NR 100 mg: p<0,05; R Kon vs. R 40 mg: p<0,05; R Kon vs. R 100 mg: p<0,05.

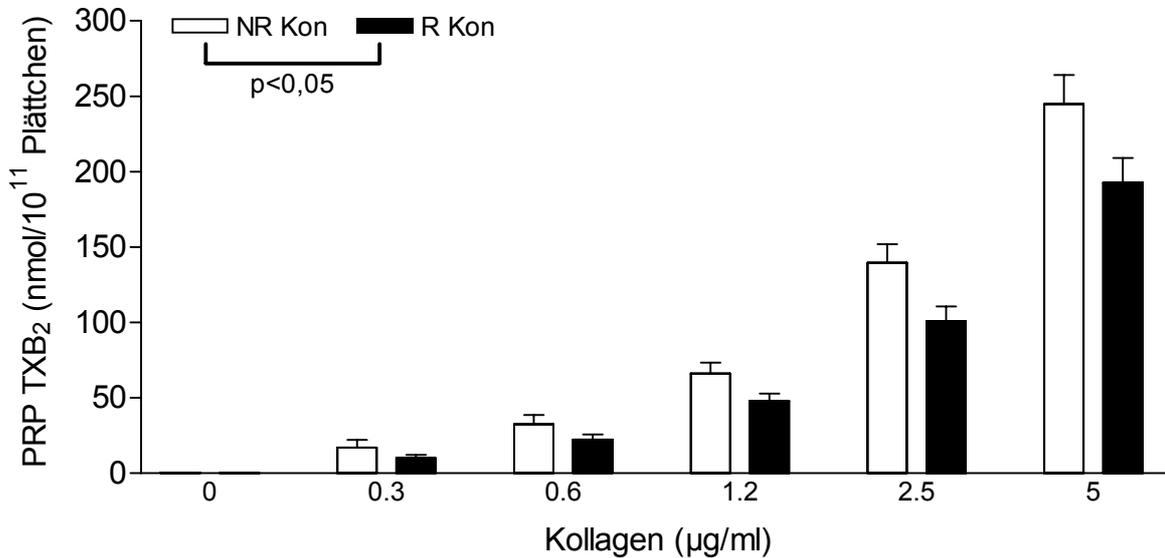


Abbildung 10a: Kontrolle

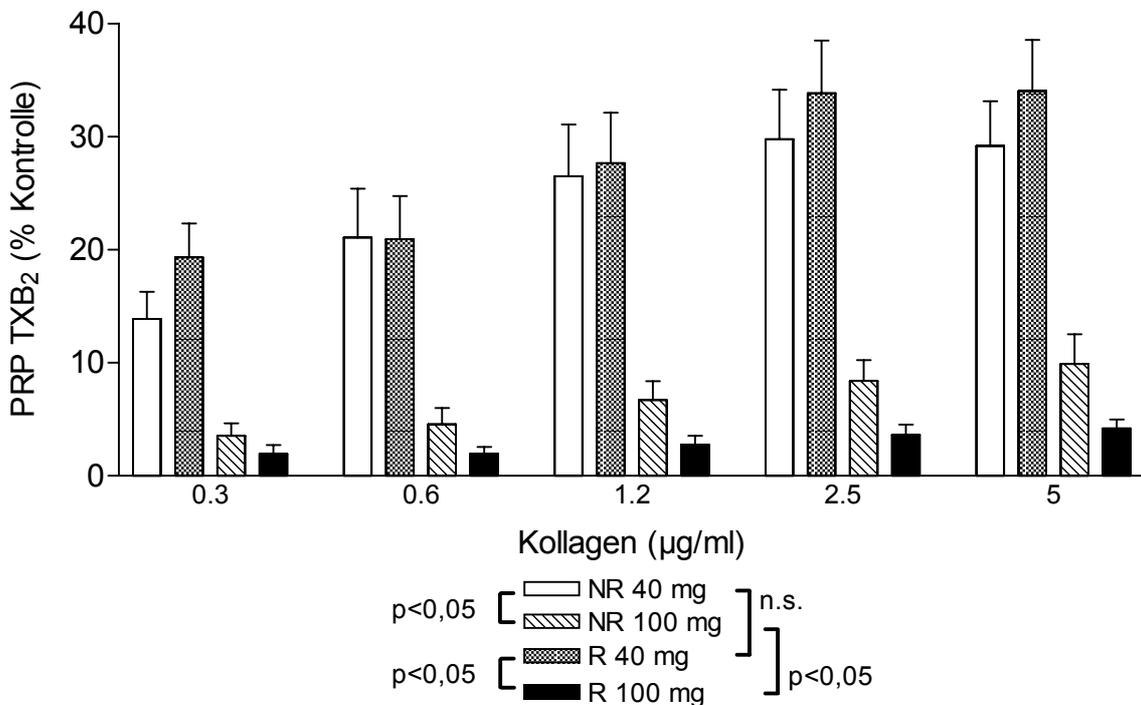


Abbildung 10b: nach ASA-Behandlung

3.2 ADP-induzierte Thrombozytenaggregation

3.2.1 Ausmaß der ADP-induzierten Thrombozytenaggregation

Kontrollgruppen: **Abb. 12a**

ADP (0,2-20 μM) führte unmittelbar zu einer Thrombozytenaggregation. Eine Darstellung von Originalregistrierungen eines Probanden ist in **Abb. 11a** zu sehen. In der Kontrolle war das Ausmaß der ADP-Aggregation bei den Rauchern tendenziell geringer als bei den Nichtrauchern. Dieser nach der Bonferroni-Holm-Korrektur nicht mehr signifikante Unterschied war bei 0,6 μM ADP besonders ausgeprägt. Bei allen Probanden kam es bei 0,2 μM ADP zu einer reversiblen Aggregation. Bei 0,6 μM ADP waren bei den Nichtrauchern fünf irreversible Aggregationen zu beobachten, bei den Rauchern traten nur reversible Aggregationen auf. Bei 2-20 μM ADP kam es bei allen Probanden zu irreversiblen Aggregationen.

Behandlungsgruppen: **Abb. 12b**

1.) *ASA vs. Kon:* Bei Nichtrauchern und Rauchern war die ADP-Aggregation nach beiden ASA-Behandlungen signifikant ($p < 0,05$) gehemmt.

Eine Darstellung von Originalregistrierungen eines Probanden ist in den **Abb. 11b** und **11c** zu sehen. Es wurden sowohl die irreversible Aggregation als auch die reversible Aggregation gehemmt. Die Hemmung war bei 0,6 μM ADP am größten. Bei der reversiblen Aggregation erfolgte die Wiederauflösung der Thrombozytenaggregate schneller als bei der Kollagenaggregation. Die ADP-Aggregation wurde bei höheren ADP-Konzentrationen nur noch schwach gehemmt.

2.) *40 mg vs. 100 mg ASA:* Nur bei den Rauchern war die 100 mg ASA-Behandlung der 40 mg ASA-Behandlung tendenziell überlegen.

3.) *NR vs. R*: Nach der 40 mg ASA-Behandlung gab es keinen signifikanten Unterschied.

Nach der 100 mg ASA-Behandlung waren die Thrombozyten der Raucher tendenziell stärker gehemmt als die Thrombozyten der Nichtraucher. Besonders deutlich war dieser nach der Bonferroni-Holm-Korrektur nicht mehr signifikante Unterschied bei der Auswertung der Reversibilität der Aggregation bei 2 μM ADP. Hier wurden bei den Nichtrauchern nach der 100 mg ASA-Behandlung acht irreversible Aggregationen beobachtet, während bei den Rauchern nur eine irreversible Aggregation auftrat. Interessanterweise war bei 2 μM ADP die Thromboxansynthese und ATP-Sekretion (Daten nicht gezeigt) in beiden Gruppen um 99 % gehemmt.

Durch die Normalisierung entstand bei 0,2 μM ADP nach der 100 mg ASA-Behandlung bei den Nichtrauchern eine Verzerrung der Ergebnisse. Der Mittelwert für T_{max} war nach 100 mg ASA-Behandlung 9 % (NR-Kontrolle 7,5 %). Nach der Normalisierung (die bei der Bearbeitung der Daten zur besseren Vergleichbarkeit der Ergebnisse *NR vs. R* nach ASA-Behandlung immer durchgeführt wurde) war der Mittelwert der neun Nichtraucher 119 % (im Vergleich zur Kontrolle).

3.2.2 ADP-induzierte Thromboxanbildung

Kontrollgruppen: Abb. 13a

Die Thromboxanbildung der Raucher war tendenziell geringer als die der Nichtraucher. Besonders ausgeprägt war dieser nach der Bonferroni-Holm-Korrektur nicht mehr signifikante Unterschied bei 0,6 μM ADP. Hier war die TXB_2 -Konzentration bei den Nichtrauchern mit $11 \pm 4 \text{ nmol TXB}_2/10^{11}$ Plättchen etwa fünf mal so hoch wie bei den Rauchern.

Dies erklärt auch, warum bei 0,6 μM ADP irreversible Aggregationen bei fünf Nichtrauchern aber nur bei einem Raucher zu beobachten waren. Hierbei lag die TXB_2 -Konzentration bei den Nichtrauchern zwischen 17 und 44 nmol, die irreversible Aggregation des Rauchers ging mit einer TXB_2 -Konzentration von 15 $\text{nmol}/10^{11}$ Plättchen einher. Bei allen Probanden mit reversiblen Aggregationen war die TXB_2 -Konzentration bei 0,6 μM ADP kleiner 3,5 $\text{nmol TXB}_2/10^{11}$ Plättchen.

Bei 20 μM ADP betrug die TXB_2 -Konzentration bei den Nichtrauchern $21 \pm 7 \text{ nmol}$ und bei den Rauchern $11 \pm 2 \text{ nmol TXB}_2/10^{11}$ Plättchen. Im Verhältnis zur Kollagenaggregation betrug die maximale TXB_2 -Konzentration bei der ADP-Aggregation weniger als 10 %.

Behandlungsgruppen: Abb. 13b und 13c

1.) *ASA vs. Kon:* Sowohl bei Nichtrauchern als auch bei Rauchern wurde die Thromboxanbildung durch beide ASA-Behandlungen signifikant ($p < 0,05$) gehemmt.

Bei Nichtrauchern bzw. Rauchern war nach der 40 mg ASA-Behandlung bei der höchsten ADP-Konzentration eine Verminderung der Thromboxanbildung um 82 % bzw. 88 % erreicht.

Nach der 100 mg ASA-Behandlung betrug die Hemmung in beiden Gruppen ca. 99 %. Bei den Rauchern lag die TXB_2 -Konzentration bei allen ADP-Konzentrationen im Bereich der Nachweisgrenze des Radioimmunoassays.

Die ADP-Aggregation ist bei hohen ADP-Konzentrationen thromboxanunabhängig. Trotz fast vollständiger Hemmung der Thromboxansynthese wurde bei 6 μM und 20 μM ADP bei 17 von 18 Probanden eine irreversible Aggregation beobachtet.

2.) *40 mg vs. 100 mg ASA*: Die 100 mg ASA-Behandlung war der 40 mg ASA-Behandlung signifikant ($p < 0,05$) überlegen.

3.) *NR vs. R*: Nach der 40 mg ASA-Behandlung war die Thromboxanbildung bei 0,6 μM bis 20 μM ADP bei den Rauchern tendenziell stärker gehemmt als bei den Nichtrauchern. Bei 0,2 μM ADP war bei den Rauchern in der Kontrolle die Thromboxansynthese sehr gering, so dass nach Normalisierung auch hier eine Verzerrung der Ergebnisse entstand.

Auch nach der 100 mg ASA-Behandlung war die Thromboxanbildung bei 0,2 μM bis 20 μM ADP bei den Rauchern tendenziell stärker gehemmt.

3.2.3 Zusammenfassung der ADP-induzierten Thrombozytenaggregation

ASA-Behandlung vs. Kontrolle:

Nach beiden ASA-Behandlungen waren die Aggregation und die Thromboxansynthese gehemmt. **Tab. 3** zeigt eine Zusammenfassung der Ergebnisse. Die Aggregation wurde bei hohen ADP-Konzentrationen kaum gehemmt. Die Thromboxansynthese war bei allen ADP-Konzentrationen gehemmt. Bei Nichtrauchern und Rauchern wurde eine 95 % ige Hemmung der Thromboxanbildung nur nach der 100 mg ASA-Behandlung erreicht.

40 mg ASA-Behandlung vs. 100 mg ASA-Behandlung:

Bei den Rauchern war die Aggregation nach der 100 mg ASA-Behandlung tendenziell stärker gehemmt als nach der 40 mg ASA-Behandlung. Die Thromboxansynthese war bei Nichtrauchern und Rauchern nach 100 mg ASA stärker gehemmt. **Tab. 3** zeigt eine Zusammenfassung der Ergebnisse.

Nichtraucher vs. Raucher:

In der Kontrolle waren die Aggregation und die Thromboxansynthese bei den Rauchern tendenziell geringer als bei den Nichtrauchern.

Nach der 40 mg ASA-Behandlung war die Thromboxanbildung bei den Rauchern tendenziell stärker gehemmt.

Nach der 100 mg ASA-Behandlung waren die Aggregation und Thromboxanbildung bei den Rauchern tendenziell stärker gehemmt. Diese Hypoaggregabilität war bei fast vollständiger Hemmung der Thromboxansynthese zu beobachten.

Tab. 4 zeigt eine Zusammenfassung der Ergebnisse.

Fazit:

1. Beide ASA-Behandlungen hemmten die Thrombozytenfunktion nur bei niedrigen ADP-Konzentrationen. 100 mg ASA war der 40 mg ASA-Behandlung überlegen. Nur nach der 100 mg ASA-Behandlung war die Thromboxansynthese um mehr als 95 % gehemmt.
2. In der Kontrolle war die Thrombozytenfunktion der Raucher im Vergleich zu den Nichtrauchern tendenziell vermindert.
3. Nach der ASA-Behandlung war die Thrombozytenfunktion der Raucher im Vergleich zu den Nichtrauchern tendenziell vermindert. Auch bei fast vollständiger Hemmung der Thromboxansynthese nach der 100 mg ASA-Behandlung war diese Hypoaggregabilität zu beobachten.

	Hemmung nach 40 mg ASA-Behandlung im Vergleich zur Kontrolle		Hemmung nach 100 mg ASA-Behandlung im Vergleich zur Kontrolle		Überlegenheit von 100 mg ASA im Vergleich zur 40 mg ASA-Behandlung	
	NR	R	NR	R	NR	R
ADP-Aggregation	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	n.s.	tendenziell*
TXA ₂ -Synthese	-82 %*	-88 %*	-99 %*	-99 %*	p<0,05	p<0,05

Tabelle 3: Auswirkungen einer ASA-Behandlung (40 mg bzw. 100 mg) auf die Parameter der Thrombozytenfunktion im Vergleich zu unbehandelten (Kontrolle) Nichtrauchern (NR) und Rauchern (R). Signifikante Hemmung der ADP-Aggregation nach ASA-Behandlung. Signifikante Hemmung der ADP-induzierten TXA₂-Synthese in Prozent (%) nach ASA-Behandlung (%*= signifikant). Überlegenheit von 100 mg ASA im Vergleich zur 40 mg ASA-Behandlung (tendenziell*= nicht mehr signifikant nach Bonferroni-Holm-Korrektur, n.s.= nicht signifikant).

	Verminderte Thrombozytenfunktion der Raucher im Vergleich zu den Nichtrauchern		
	Kontrolle	40 mg ASA-Behandlung	100 mg ASA-Behandlung
ADP-Aggregation	tendenziell*	n.s.	tendenziell*
TXA ₂ -Synthese	tendenziell*	tendenziell*	tendenziell*

Tabelle 4: Auswirkungen von Zigarettenrauchen auf die Parameter der Thrombozytenfunktion bei unbehandelten (Kontrolle) sowie bei ASA-behandelten (40 mg bzw. 100 mg) Probanden. Tendenzuell verminderte Thrombozytenfunktion bei ADP-Aggregation bzw. ADP-induzierter TXA₂-Synthese bei den Rauchern in der Kontrolle und nach ASA-Behandlung (tendenziell*= nicht mehr signifikant nach Bonferroni-Holm-Korrektur, n.s.= nicht signifikant).

Abb. 11: Wirkungen von ASA auf die ADP-induzierte Thrombozytenaggregation, Aggregationskurven eines Probanden. Abb. 11a: Vor ASA-Behandlung (Kontrolle), Abb. 11b: nach 40 mg ASA-Behandlung, Abb. 11c: nach 100 mg ASA-Behandlung.

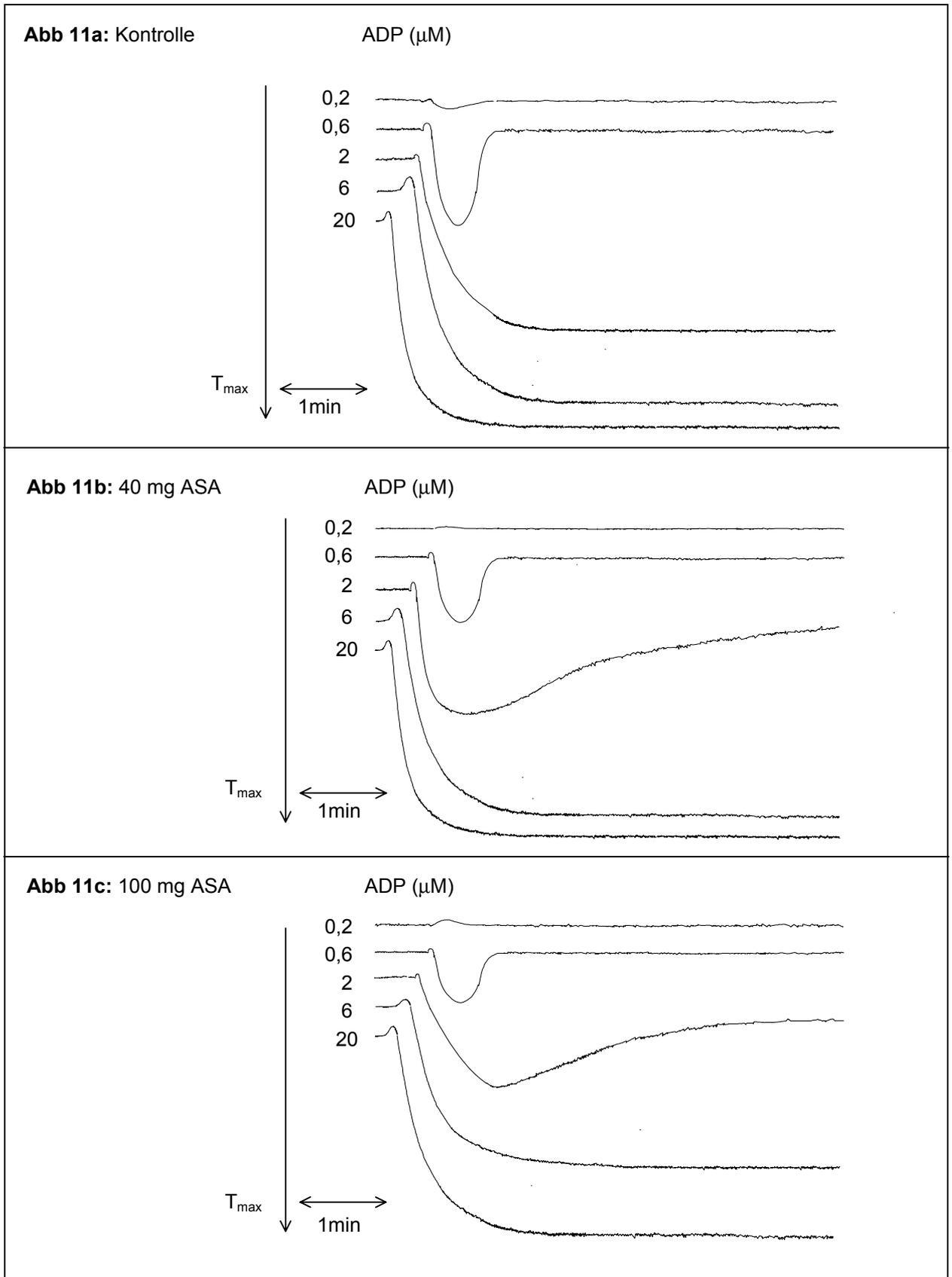


Abbildung 12: ADP-induzierte Thrombozytenaggregation bei unbehandelten (Kon) Nichtrauchern (NR) bzw. Rauchern (R) und nach ASA-Behandlung (40 mg bzw. 100 mg). Abb. 12a: Ergebnisse der Kontrolle (Kon); **Abb.12b:** nach ASA-Behandlung, Lichttransmission (% Kontrolle) im Vergleich zur Kontrolle bei der jeweiligen ADP-Konzentration. Statistische Auswertung (sofern nicht in der Abb. enthalten): Kontrolle (**Abb. 12a**) vs. ASA-Behandlung (**Abb. 12b**): NR Kon vs. NR 40 mg: $p < 0,05$; NR Kon vs. NR 100 mg: $p < 0,05$; R Kon vs. R 40 mg: $p < 0,05$; R Kon vs. R 100 mg: $p < 0,05$.

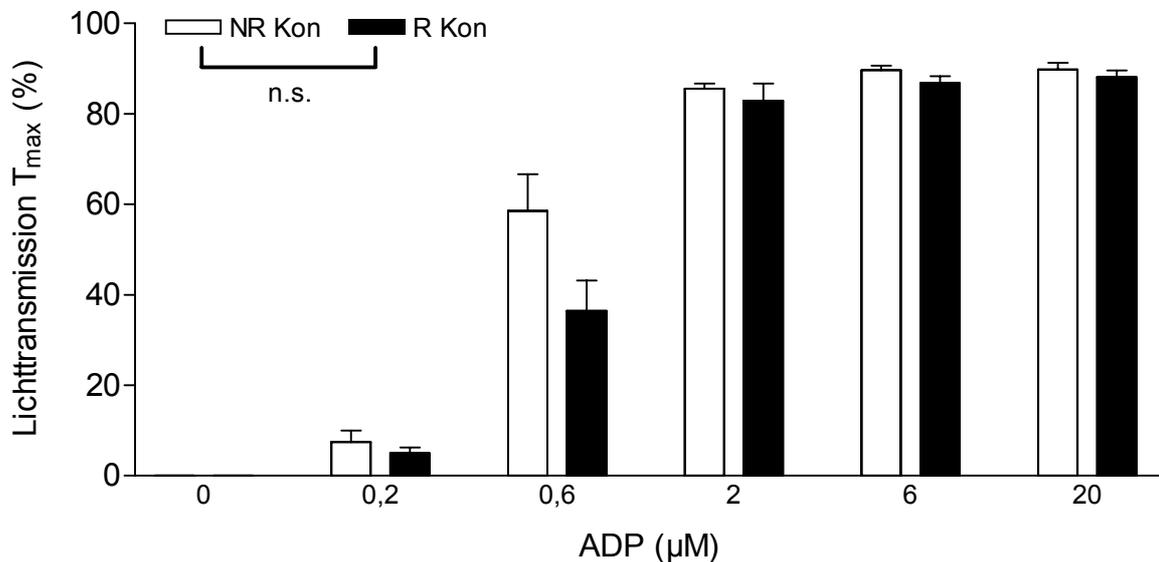


Abbildung 12a: Kontrolle

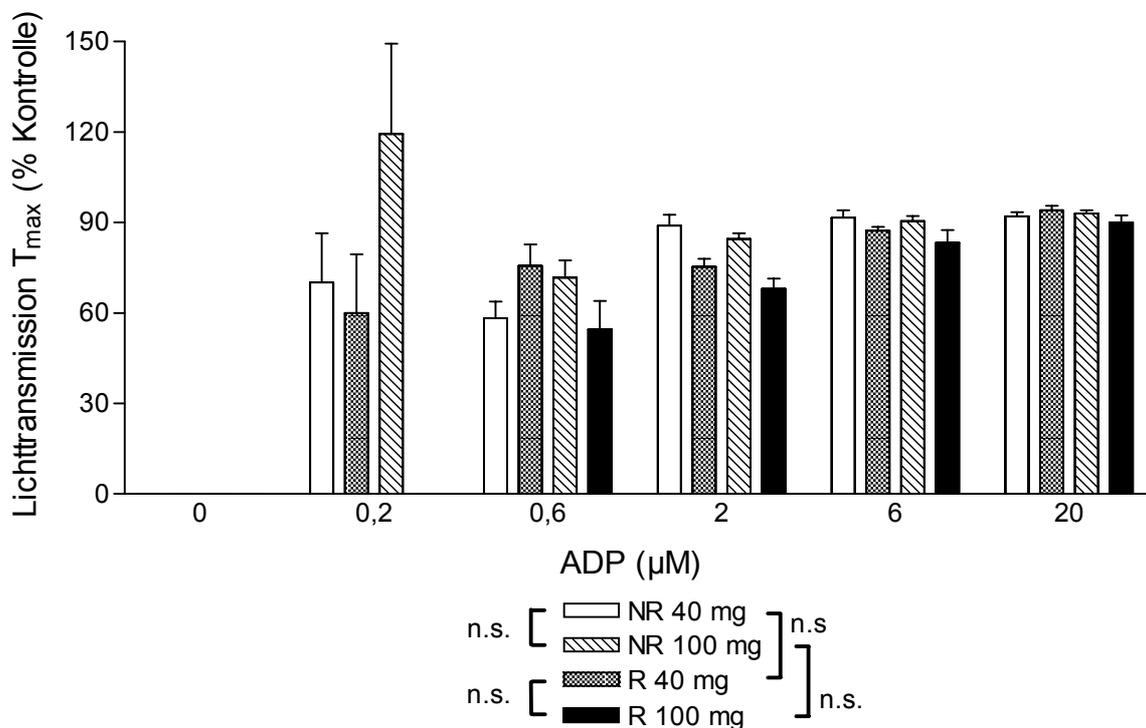


Abbildung 12b: ASA-Behandlung

Abbildung 13: ADP-induzierte Thromboxanbildung (TXB₂) bei unbehandelten (Kon) Nichtrauchern (NR) bzw. Rauchern (R) und nach ASA-Behandlung (40 mg bzw. 100 mg). Abb. 13a: Ergebnisse der Kontrolle (Kon); Abb. 13b: nach 40 mg ASA-Behandlung, Abb. 13c: nach 100 mg ASA-Behandlung. Abb. 13b und 13c: TXB₂ (% Kontrolle) im Vergleich zur Kontrolle bei der jeweiligen ADP-Konzentration. Statistische Auswertung (sofern nicht in der Abb. enthalten): Kontrolle (Abb. 13a) vs. ASA-Behandlung (Abb. 13b und 13c): NR Kon vs. NR 40 mg: p<0,05; NR Kon vs. NR 100 mg: p<0,05; R Kon vs. R 40 mg: p<0,05; R Kon vs. R 100 mg: p<0,05.

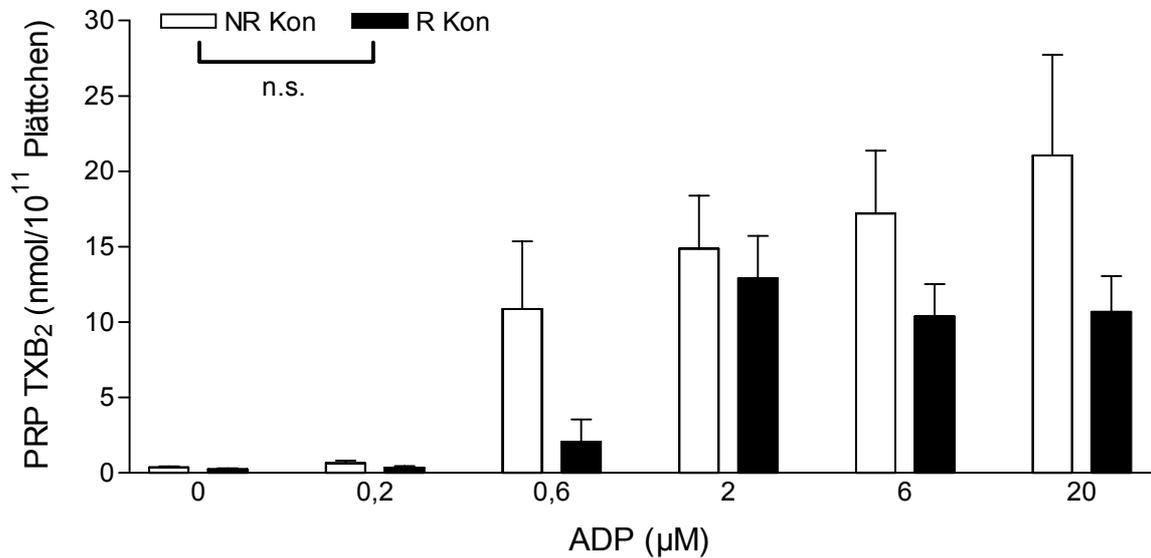


Abbildung 13a: Kontrolle

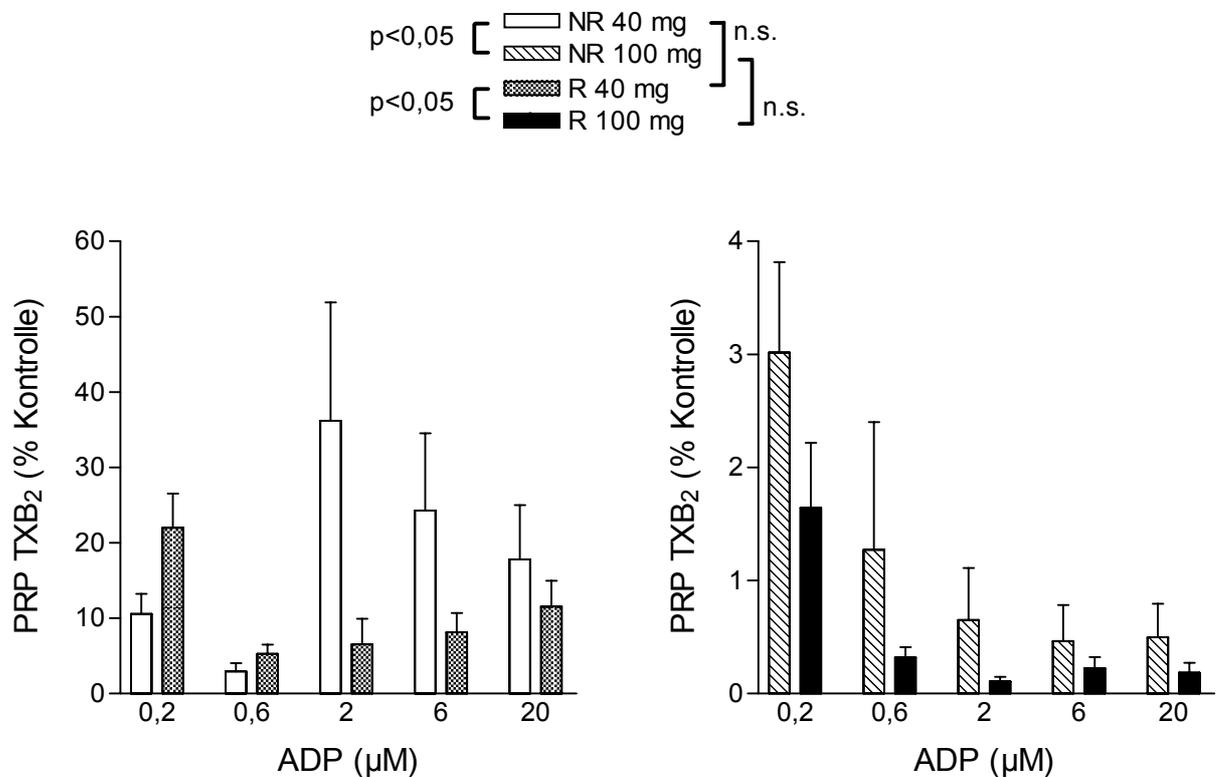


Abbildung 13b: 40 mg ASA-Behandlung

Abbildung 13c: 100 mg ASA-Behandlung

3.3 Rekrutment

3.3.1 Aggregation beim Rekrutment

Die Aggregation beim Rekrutment zeigt in ihren Eigenschaften viele Ähnlichkeiten mit der ADP-Aggregation. Eine Darstellung von Originalregistrierungen eines Probanden vor und nach ASA-Behandlung ist in der **Abb. 14** zu sehen. Die Aggregation setzt unmittelbar nach Inkubation mit dem durch Zentrifugation gewonnenen Überstand (Releasat) ein. Die Aggregation ist bei niedrigen Kollagenkonzentrationen wie die ADP-Aggregation reversibel. Es werden biphasische Aggregationen beobachtet, bei denen eine zunächst reversible Primäraggregation nach einer Latenz in eine irreversible Sekundäraggregation übergeht. Bei höheren Kollagenkonzentrationen kommt es zu irreversiblen Aggregationen. Im Unterschied zur ADP-Aggregation, bei der in der Kontrolle bei 2 μM ADP schon eine Maximalaggregation erreicht wird, ist beim Rekrutment über den gesamten Konzentrationsbereich eine fein abgestufte Aggregationsamplitude zu beobachten.

Kontrollgruppen: **Abb. 15a**

In der Kontrolle bestand kein signifikanter Unterschied zwischen Nichtrauchern und Rauchern. Bei den Nichtrauchern waren bei 0,3 $\mu\text{g/ml}$ Kollagen drei irreversible Aggregationen und bei den Rauchern eine irreversible Aggregation zu beobachten. Bei den Kollagenkonzentrationen 0,6 $\mu\text{g/ml}$, 1,2 $\mu\text{g/ml}$ bzw. 2,5 $\mu\text{g/ml}$ waren in beiden Gruppen jeweils vier, sieben bzw. neun irreversible Aggregationen zu beobachten. Eine Darstellung von Originalregistrierungen eines Probanden ist in **Abb. 14a** zu sehen.

Behandlungsgruppen: **Abb. 15b**

1.) *ASA vs. Kon:* Bei Nichtrauchern und Rauchern war die Aggregation nach beiden ASA-Behandlungen signifikant ($p < 0,05$) gehemmt. Eine Darstellung von Originalregistrierungen eines Probanden nach der 40 mg bzw. 100 mg ASA-Behandlung ist in den **Abb. 14b** und **14c** zu sehen.

2.) *40 mg vs. 100 mg ASA*: Nach der 100 mg ASA-Behandlung war die Aggregation bei den Nichtrauchern tendenziell und bei den Rauchern signifikant ($p < 0,05$) stärker gehemmt als nach der 40 mg ASA-Behandlung. Die Aggregation wurde bei allen Kollagenkonzentrationen gehemmt.

3.) *NR vs. R*: Die Aggregation war bei den Rauchern nach 40 mg ASA tendenziell und nach 100 mg ASA signifikant ($p < 0,05$) stärker gehemmt als bei den Nichtrauchern.

Bei den Rauchern waren bei 5 $\mu\text{g/ml}$ Kollagen nach der 40 mg bzw. 100 mg ASA-Behandlung fünf bzw. null, bei den Nichtrauchern acht bzw. zwei irreversible Aggregationen zu beobachten.

3.3.2 Rekrutment: Thromboxan im Generatorsystem (Releasat)

Kontrollgruppen: Abb. 16a

Die Thromboxanbildung war bei den Rauchern signifikant geringer ($p < 0,05$) als bei den Nichtrauchern.

Bei 5 $\mu\text{g/ml}$ Kollagen war die Thromboxankonzentration bei den Nichtrauchern 350 ± 27 nmol und bei den Rauchern 240 ± 22 nmol/ 10^{11} Plättchen. Die Thromboxansynthese beim Rekrutment war damit deutlich höher als bei der Kollagenaggregation.

Behandlungsgruppen: Abb. 16b

1.) *ASA vs. Kon:* Sowohl bei Nichtrauchern als auch bei Rauchern wurde die Thromboxanbildung durch beide ASA-Behandlungen signifikant ($p < 0,05$) gehemmt. Die Thromboxansynthese war bei allen Kollagenkonzentrationen gehemmt. Bei den Nichtrauchern bzw. Rauchern betrug die Hemmung nach 40 mg ASA bei 5 $\mu\text{g/ml}$ Kollagen 59 % bzw. 49 %. Nach der 100 mg ASA-Behandlung waren die Vergleichswerte 90 % bzw. 92 %. Auch nach 100 mg ASA war also keine 95 % ige Hemmung der Thromboxansynthese erreicht.

2.) *40 mg vs. 100 mg ASA:* Bei Nichtrauchern und Rauchern war 100 mg ASA der 40 mg ASA-Behandlung signifikant ($p < 0,05$) überlegen.

3.) *NR vs. R:* Nach der 40 mg ASA-Behandlung gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen Nichtrauchern und Rauchern. Nach der 100 mg ASA-Behandlung waren die Thrombozyten der Raucher tendenziell stärker gehemmt.

3.3.3 Zusammenfassung des Rekrutments

ASA-Behandlung vs. Kontrolle:

Aggregation und Thromboxansynthese im Generatorsystem waren nach beiden ASA-Behandlungen gehemmt. Bei Nichtrauchern und Rauchern war diese Hemmung bei allen Kollagenkonzentrationen zu sehen. **Tab. 5** zeigt eine Zusammenfassung der Ergebnisse.

Eine 95 % ige Hemmung der Thromboxansynthese war auch nach der 100 mg ASA-Behandlung nicht erreicht.

40 mg ASA-Behandlung vs. 100 mg ASA-Behandlung:

Nach der 100 mg ASA-Behandlung war die Aggregation beim Rekrutment bei den Rauchern stärker gehemmt, bei den Nichtrauchern zeigte sich eine Tendenz zu einer stärkeren Hemmung. Die TXB₂-Konzentration im Generatorsystem bei Nichtrauchern und Rauchern war nach der 100 mg ASA-Behandlung stärker vermindert. **Tab. 5** zeigt eine Zusammenfassung der Ergebnisse.

NR vs. R in der Kontrolle und nach ASA-Behandlung:

In der Kontrolle war die TXB₂-Synthese im Generatorsystem bei den Rauchern signifikant geringer als bei den Nichtrauchern.

Nach 40 mg ASA war das Rekrutment bei den Rauchern tendenziell stärker gehemmt.

Nach 100 mg ASA war das Rekrutment bei den Rauchern signifikant stärker gehemmt und die TXB₂-Synthese im Generatorsystem war tendenziell stärker vermindert als bei den Nichtrauchern. **Tab. 6** zeigt eine Zusammenfassung der Ergebnisse.

Fazit:

1. Beide ASA-Behandlungen hemmten die Thrombozytenfunktion bei allen Kollagenkonzentration. 100 mg ASA war dabei der 40 mg ASA-Behandlung überlegen. Eine 95 % ige Hemmung der Thromboxansynthese war auch nach der 100 mg ASA-Behandlung nicht erreicht.
2. In der Kontrolle war die Thrombozytenfunktion der Raucher im Vergleich zu den Nichtrauchern vermindert.
3. Nach ASA-Behandlung war die Thrombozytenfunktion der Raucher im Vergleich zu den Nichtrauchern besonders nach 100 mg ASA in verstärktem Umfang vermindert.

	Hemmung nach 40 mg ASA-Behandlung im Vergleich zur Kontrolle		Hemmung nach 100 mg ASA-Behandlung im Vergleich zur Kontrolle		Überlegenheit von 100 mg ASA im Vergleich zur 40 mg ASA-Behandlung	
	NR	R	NR	R	NR	R
Aggregation	p<0,05	p<0,05	p<0,05	p<0,05	tendenziell*	p<0,05
TXA ₂ -Synthese (Gen)	-59 %*	-49 %*	-90 %*	-92 %*	p<0,05	p<0,05

Tabelle 5: Auswirkungen einer ASA-Behandlung (40 mg bzw. 100 mg) auf die Parameter der Thrombozytenfunktion im Vergleich zu unbehandelten (Kontrolle) Nichtrauchern (NR) und Rauchern (R). Signifikante Hemmung der Aggregation nach ASA-Behandlung. Signifikante Hemmung der TXA₂-Synthese in Prozent (%) im Generatorsystem (Gen) nach ASA-Behandlung (%*= signifikant). Überlegenheit von 100 mg ASA im Vergleich zur 40 mg ASA-Behandlung (tendenziell*= nicht mehr signifikant nach Bonferroni-Holm).

	Verminderte Thrombozytenfunktion der Raucher im Vergleich zu den Nichtrauchern		
	Kontrolle	40 mg ASA-Behandlung	100 mg ASA-Behandlung
Aggregation	n.s.	tendenziell*	p<0,05
TXA ₂ -Synthese (Gen)	p<0,05	n.s.	tendenziell*

Tabelle 6: Auswirkungen von Zigarettenrauchen auf die Parameter der Thrombozytenfunktion bei unbehandelten (Kontrolle) sowie bei ASA-behandelten (40 mg bzw. 100 mg) Probanden. Verminderte Thrombozytenfunktion bei Aggregation bzw. TXA₂-Synthese im Generatorsystem (Gen) bei den Rauchern in der Kontrolle und nach ASA-Behandlung (tendenziell*= nicht mehr signifikant nach Bonferroni-Holm, n.s.= nicht signifikant).

Abb. 14: Wirkungen von ASA auf die Aggregation beim Rekrutment, Aggregationskurven eines Probanden. Abb. 14a: Vor ASA-Behandlung (Kontrolle), Abb. 14b: nach 40 mg ASA-Behandlung, Abb. 14c: nach 100 mg ASA-Behandlung.

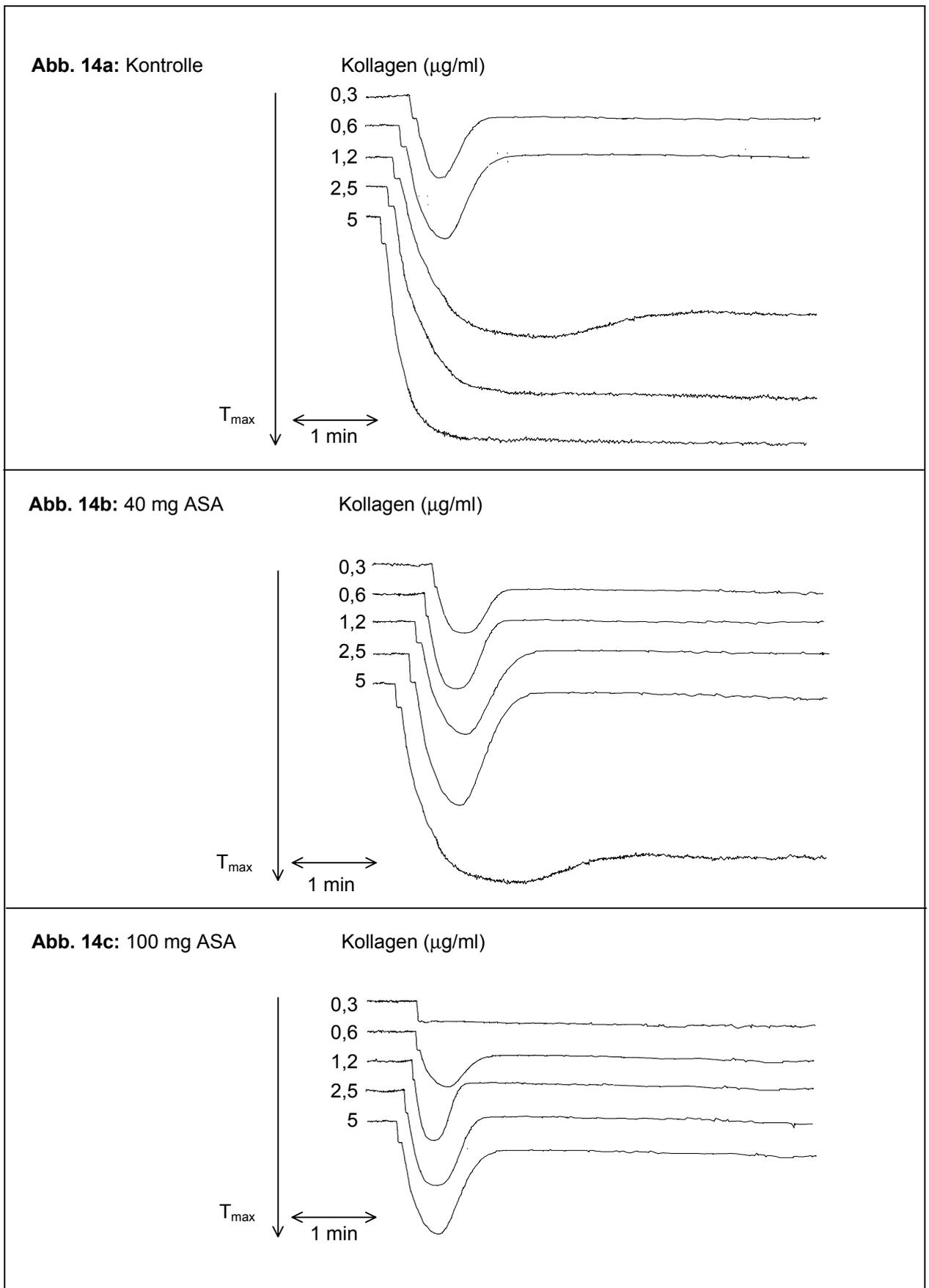


Abb. 15: Aggregation beim Rekrutment bei unbehandelten (Kon) Nichtrauchern (NR) bzw. Rauchern (R) und nach ASA-Behandlung (40 mg bzw. 100 mg). Abb. 15a: Ergebnisse der Kontrolle (Kon); Abb. 15b: nach ASA-Behandlung, Lichttransmission (% Kontrolle) im Vergleich zur Kontrolle bei der jeweiligen Kollagenkonzentration. Statistische Auswertung (sofern nicht in der Abb. enthalten): Kontrolle (Abb. 15a) vs. ASA-Behandlung (Abb. 15b): NR Kon vs. NR 40 mg: $p < 0,05$; NR Kon vs. NR 100 mg: $p < 0,05$; R Kon vs. R 40 mg: $p < 0,05$; R Kon vs. R 100 mg: $p < 0,05$.

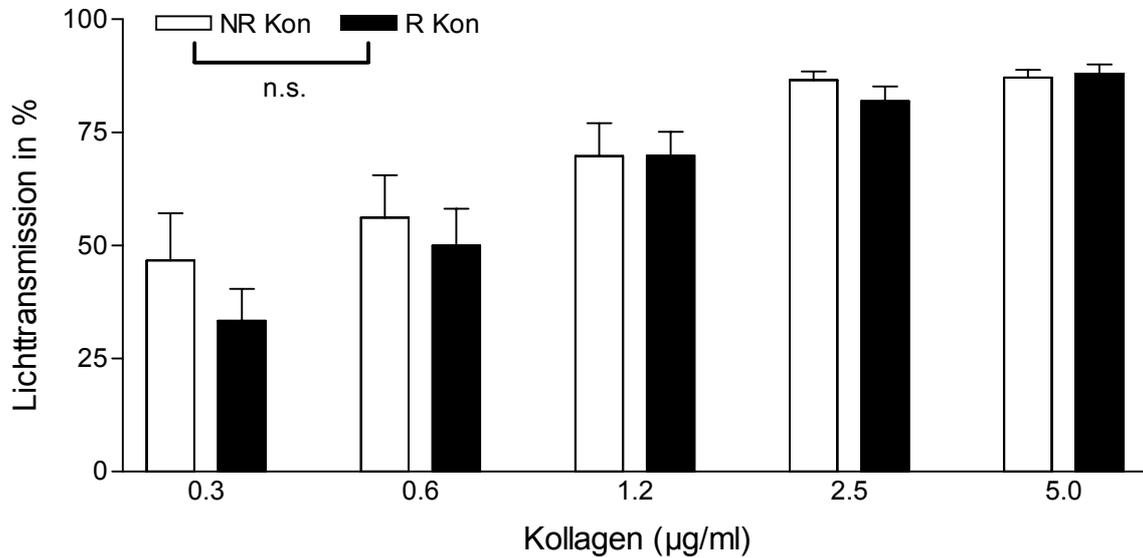


Abbildung 15a: Kontrolle

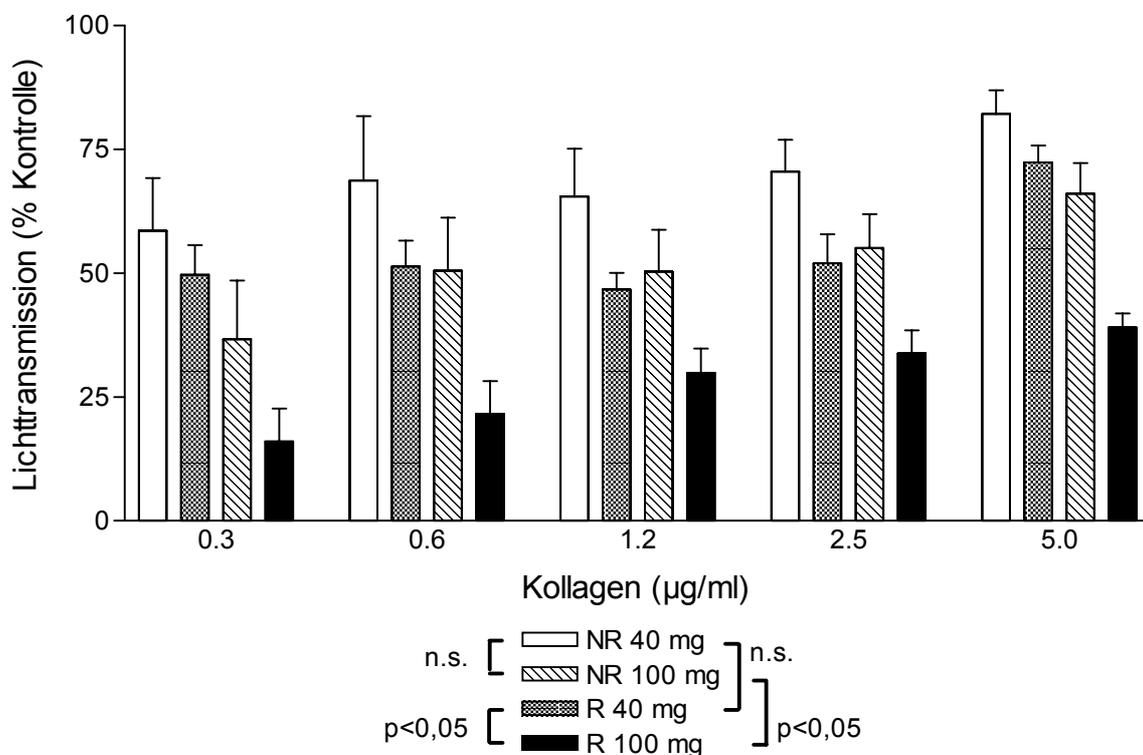


Abbildung 15b: ASA-Behandlung

Abb. 16: Rekrutment: Thromboxan (TXB₂) im Releasat (Generatorsystem) bei unbehandelten (Kon) Nichtrauchern (NR) bzw. Rauchern (R) und nach ASA-Behandlung (40 mg bzw. 100 mg). Abb. 16a: Ergebnisse der Kontrolle (Kon); Abb. 16b: nach ASA-Behandlung, TXB₂ (% Kontrolle) im Vergleich zur Kontrolle bei der jeweiligen Kollagenkonzentration. Statistische Auswertung (sofern nicht in der Abb. enthalten): Kontrolle (Abb. 16a) vs. ASA-Behandlung (Abb. 16b): NR Kon vs. NR 40 mg: p<0,05; NR Kon vs. NR 100 mg: p<0,05; R Kon vs. R 40 mg: p<0,05; R Kon vs. R 100 mg: p<0,05.

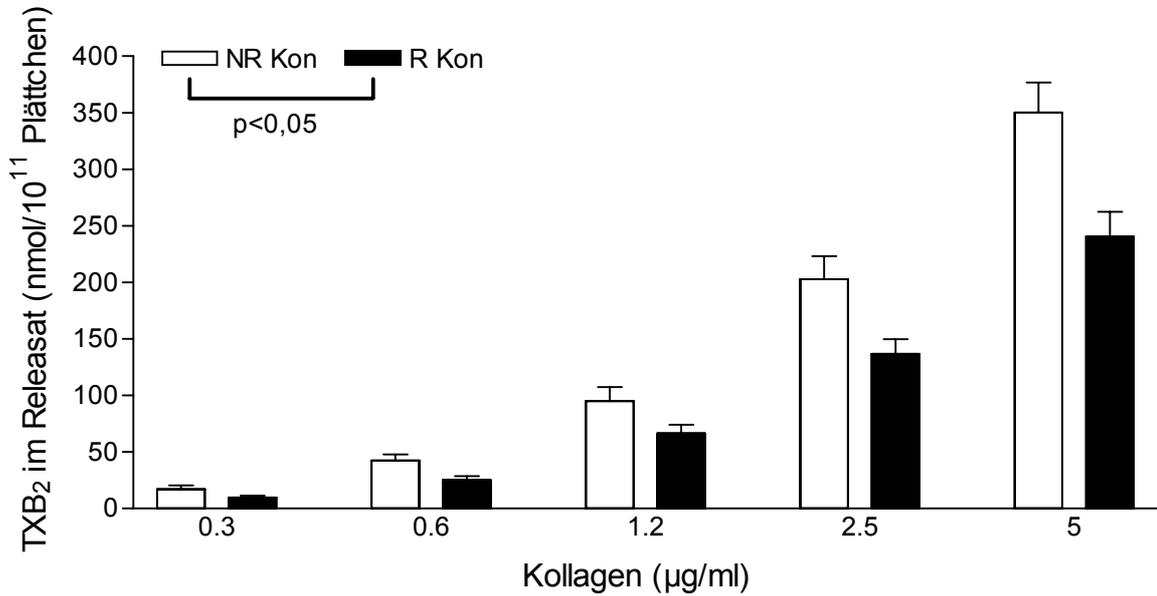


Abbildung 16a: Kontrolle

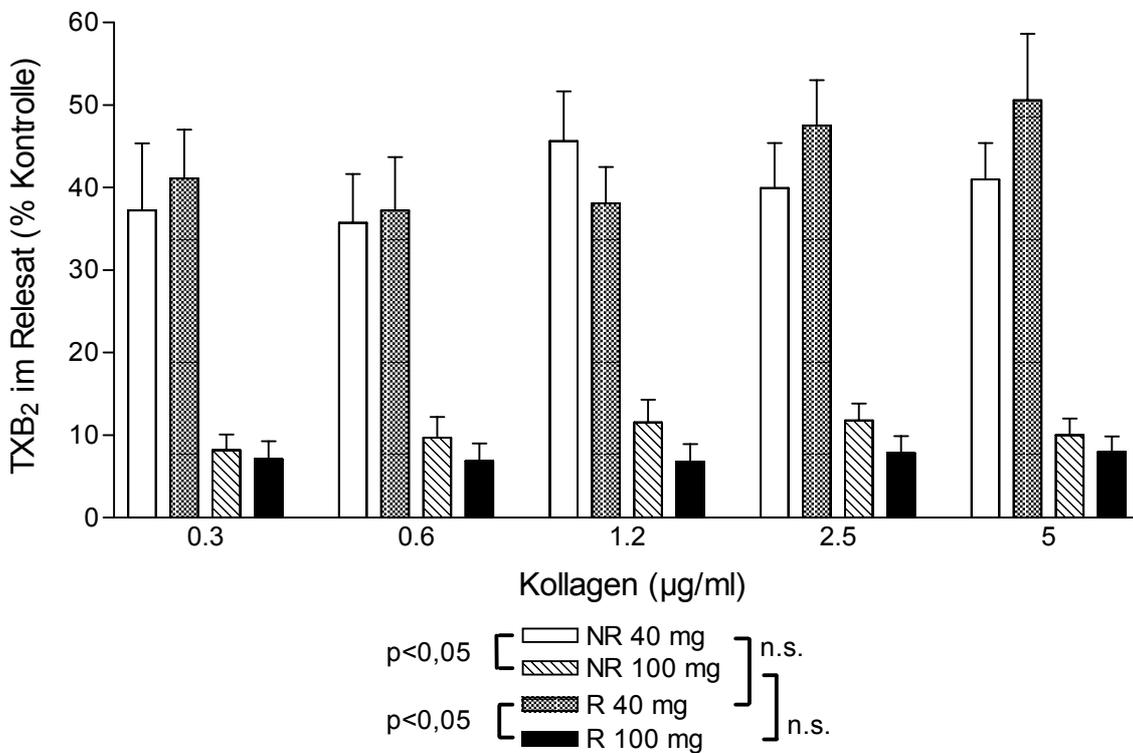


Abbildung 16b: ASA-Behandlung

3.4 Thromboxanfreisetzung

3.4.1 Ausscheidung von Thromboxanmetaboliten im Urin

Kontrollgruppen: **Abb. 17a/b**

Die Nichtraucher hatten tendenziell weniger Thromboxanmetaboliten (TX-M) pro g Kreatinin im Urin als die Raucher (nach der Bonferroni-Holm-Korrektur nicht mehr signifikant). Bei den Nichtrauchern betrug die Ausscheidung von TX-M im Mittel 263 ± 34 ng/g Kreatinin, bei den Rauchern 383 ± 44 ng/g Kreatinin.

Behandlungsgruppen: **Abb. 17a/b**

1.) *ASA vs. Kon:* Die TX-M-Ausscheidung wurde bei Nichtrauchern und Rauchern durch die 40 mg ASA-Behandlung tendenziell gehemmt (nach der Bonferroni-Holm-Korrektur nicht mehr signifikant). Nach der 100 mg ASA-Behandlung war bei Nichtrauchern und Rauchern die TX-M-Ausscheidung signifikant gehemmt (einseitiger gepaarter t-Test mit $p < 0,05$).

Bei den Nichtrauchern bzw. Rauchern war die Hemmung nach der 40 mg ASA-Behandlung 47 % bzw. 48 % und nach 100 mg ASA 60 % bzw. 67 %.

2.) *40 mg vs. 100 mg ASA:* Nach der 100 mg ASA-Behandlung war die TX-M-Ausscheidung im Vergleich zu 40 mg ASA nur bei den Nichtrauchern tendenziell stärker gehemmt (nach der Bonferroni-Holm-Korrektur nicht mehr signifikant).

In Bezug auf die 40 mg ASA-Behandlung war nach 100 mg ASA bei Nichtrauchern bzw. Rauchern eine Hemmung von 26 % bzw. 37 % zu beobachten. Bei den Rauchern ergab sich aufgrund eines sehr stark abweichenden Messwertes nach 40 mg ASA ein großer Standardfehler. Somit ist trotz einer Hemmung von 37 % aufgrund der großen Streuung bei dieser Messung eine Interpretation der Ergebnisse schwierig.

3.) *NR vs. R:* Nach beiden ASA-Behandlungen bestand kein signifikanter Unterschied zwischen Nichtrauchern und Rauchern.

3.4.2 Zusammenfassung der Thromboxanfreisetzung

ASA-Behandlung vs. Kontrolle; 40 mg ASA-Behandlung vs. 100 mg ASA-Behandlung:

Bei Nichtrauchern und Rauchern war nach der 40 mg ASA-Behandlung bzw. 100 mg ASA-Behandlung die Ausscheidung von TX-M tendenziell bzw. signifikant gehemmt.

Nur bei den Nichtrauchern war die Ausscheidung von TX-M nach der 100 mg ASA-Behandlung im Vergleich zur 40 mg ASA-Behandlung tendenziell stärker vermindert.

NR vs. R in der Kontrolle und nach ASA-Behandlung:

In der Kontrolle hatten die Nichtraucher tendenziell weniger TX-M (ng/g Kreatinin) im Urin als die Raucher.

Nach ASA-Behandlung ergab sich kein signifikanter Unterschied.

3.5 Prostazyklinfreisetzung

3.5.1 Ausscheidung von Prostazyklinmetaboliten im Urin

Kontrollgruppen: **Abb. 18a/b**

Es bestand kein signifikanter Unterschied zwischen Nichtrauchern und Rauchern bei der Ausscheidung von Prostazyklinmetaboliten (PGI-M).

Bei den Nichtrauchern betrug die Ausscheidung von PGI-M im Mittel 421 ± 47 ng/g Kreatinin, bei den Rauchern 432 ± 37 ng/g Kreatinin.

Behandlungsgruppen: **Abb. 18a/b**

1.) *ASA vs. Kon:* Nur bei den Nichtrauchern war nach der 100 mg ASA-Behandlung eine tendenzielle Hemmung der Ausscheidung von PGI-M zu beobachten (nach der Bonferroni-Holm-Korrektur nicht mehr signifikant). Die PGI-M-Ausscheidung war im Vergleich zur Kontrolle um 25 % vermindert.

2.) *40 mg vs. 100 mg ASA:* Es fand sich kein signifikanter Unterschied zwischen der 40 mg ASA-Behandlung und der 100 mg ASA-Behandlung.

3.) *NR vs. R:* Nach beiden ASA-Behandlungen bestand kein signifikanter Unterschied zwischen Nichtrauchern und Rauchern.

3.5.2 Zusammenfassung der Prostazyklinfreisetzung

ASA-Behandlung vs. Kontrolle; 40 mg ASA-Behandlung vs. 100 mg ASA-Behandlung:

Nur bei den Nichtrauchern war nach der 100 mg ASA-Behandlung eine tendenzielle Hemmung der Ausscheidung von PGI-M zu beobachten. Es bestand kein signifikanter Unterschied zwischen der 40 mg ASA-Behandlung und der 100 mg ASA-Behandlung.

NR vs. R in der Kontrolle und nach ASA-Behandlung:

In der Kontrolle und nach ASA-Behandlung fand sich kein signifikanter Unterschied zwischen Nichtrauchern und Rauchern.

Abbildung 17: Ausscheidung von Thromboxanmetaboliten im Urin (TX-M) vor ASA-Behandlung (Kon) und nach 40 mg bzw. 100 mg ASA-Behandlung. Abb. 17a: Ergebnisse der Nichtraucher (NR), **Abb. 17b:** Ergebnisse der Raucher (R). Statistische Auswertung (sofern nicht in der Abb. enthalten): NR (**Abb. 17a**) vs. R (**Abb. 17b**): keine signifikanten Unterschiede in der Kontrolle und nach ASA-Behandlung.

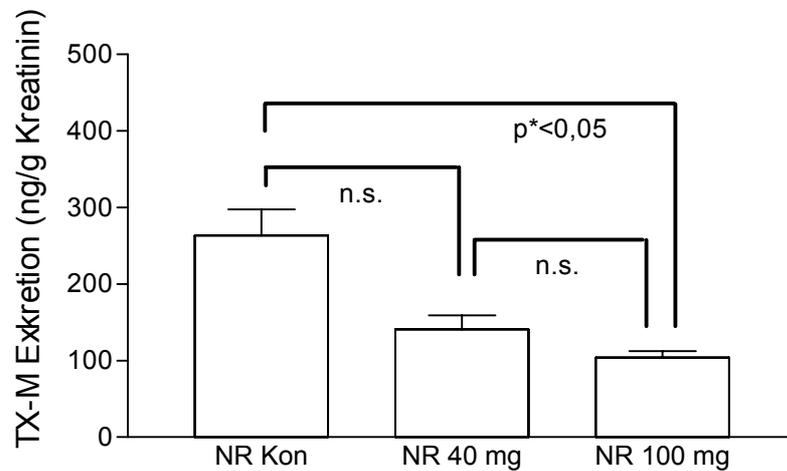


Abbildung 17a: Nichtraucher

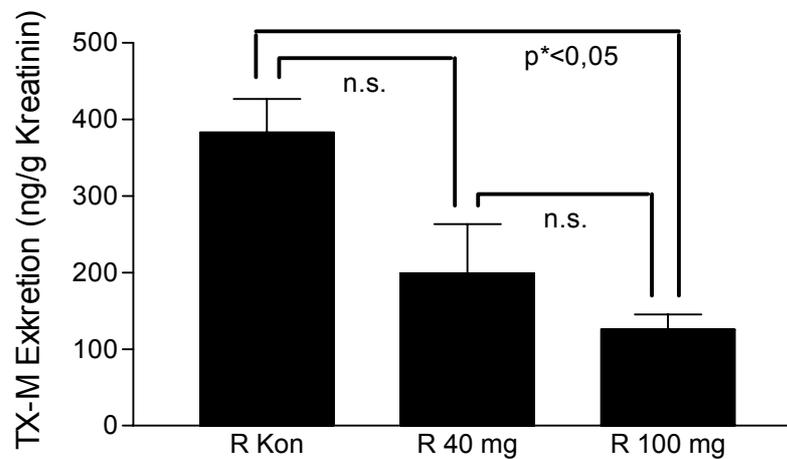


Abbildung 17b: Raucher

Abbildung 18: Ausscheidung von Prostazyklinmetaboliten im Urin (PGI-M) vor ASA-Behandlung (Kon) und nach 40 mg bzw. 100 mg ASA-Behandlung. Abb. 18a: Ergebnisse der Nichtraucher (NR), **Abb. 18b:** Ergebnisse der Raucher (R). Statistische Auswertung (sofern nicht in der Abb. enthalten): NR (**Abb. 18a**) vs. R (**Abb. 18b**): keine signifikanten Unterschiede in der Kontrolle und nach ASA-Behandlung.

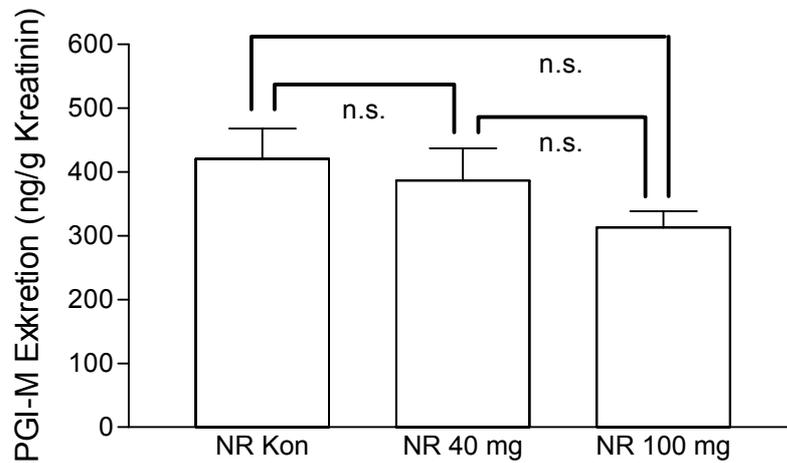


Abbildung 18a: Nichtraucher

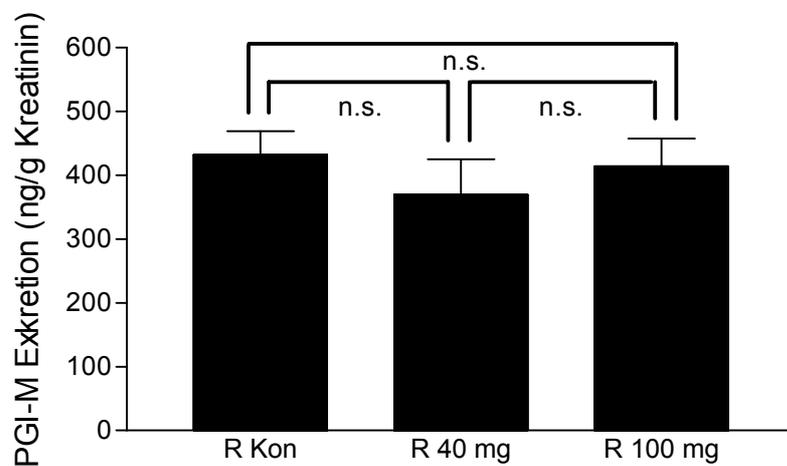


Abbildung 18b: Raucher

793.6 Serumchemie- und EDTA-Blut-Basisuntersuchungen

Bei allen Probanden wurden zu Beginn der Studie (Kontrolle) und am Studienende im Serum sowie im EDTA-Blut die in **Tabelle 7** aufgeführten Parameter bestimmt. Die Tabelle zeigt die Mittelwerte der Probanden mit Standardfehler (SEM). Alle Mittelwerte lagen im Bereich der methodenbedingten Streuung, es wurde kein statistischer Test durchgeführt.

Es gab zu Studienbeginn keinen Unterschied bei den erhobenen Parametern zwischen Nichtrauchern und Rauchern. Insbesondere waren die Leukozytenzahlen und der Hämatokrit bei den Rauchern im Vergleich zu Nichtrauchern nicht erhöht. Nach Abschluss der Studie gab es ebenfalls keinen Unterschied zwischen Nichtrauchern und Rauchern. Durch die beiden ASA-Behandlungen kam es zu keinen Veränderungen im Vergleich zur Kontrolle. Auch bei den Thrombozytenzahlen im EDTA-Blut (**Abb. 19a**) war zwischen Studienbeginn und Studienende bzw. Nichtrauchern und Rauchern kein Unterschied festzustellen.

Im PRP wurden die Thrombozyten in einer Thoma-Zählkammer unter einem Phasenkontrastmikroskop ausgezählt. Nach der 40 mg ASA-Behandlung hatten die Raucher im Vergleich zu den Nichtrauchern tendenziell weniger Thrombozyten im PRP (**Abb. 19b**). Darüber hinaus waren nach der 40 mg ASA-Behandlung die Thrombozytenzahlen im PRP bei den Rauchern im Verhältnis zur Kontrolle bzw. 100 mg ASA-Behandlung tendenziell niedriger.

3.7 Verträglichkeit der ASA-Behandlung und Compliance

Alle Probanden wurden nach der 40 mg ASA-Behandlung und nach der 100 mg ASA-Behandlung nach unerwünschten Wirkungen befragt. Die Probanden vertrugen beide Behandlungen gut, sie gaben keine unerwünschten Wirkungen zu Protokoll. Alle Probanden nahmen die Tabletten gemäß dem Protokoll ein. Kein Proband brach die Studie vorzeitig ab.

Tabelle 7: Serumchemie und Kleines Blutbild zu Studienbeginn (Tab. 7a: Kontrolle) und nach beiden ASA-Behandlungen (Tab. 7b: Studienende). Mittelwerte von *n* Probanden mit Standardfehler (SEM). Keine Unterschiede zwischen Nichtrauchern (NR) und Rauchern (R). Keine Unterschiede zwischen Kontrolle und Studienende. Keine pathologischen Werte beim einzelnen Probanden.

Referenzbereich	NR Kontrolle			R Kontrolle		
	Mittelwert	SEM	<i>n</i>	Mittelwert	SEM	<i>n</i>
GOT < 17 U/l	10	1,3	9	13	3,9	9
GPT < 23 U/l	12	2,2	9	10	1,7	9
GGT < 28 U/l	12	1,5	9	12	2,1	9
AP < 180 U/l	107	11	8	106	9,1	9
LDH 120-240 U/l	130	9,3	7	129	5,3	8
Leukozyten 4.0-11.0 x1000/ μ l	5,8	0,3	9	6,0	0,4	9
Erythrozyten 3.90-5.60 Mio/ μ l	4,95	0,1	9	4,91	0,1	9
Hämoglobin 12.0-17.5 g/dl	14,9	0,4	9	15,2	0,4	9
Hämatokrit 37.0-50.0 %	42,8	0,8	9	43,4	1,2	9
MCV 84.0-98.0 fl	86,6	1,2	9	88,5	1,1	9
MCH 28.0-34.0 pg	30,1	0,5	9	31,0	0,5	9
MCHC 32.0-36.0 g Hb/dl	34,8	0,3	9	35,0	0,2	9
EBV 11.6-14.6 %	12,4	0,2	9	12,6	0,2	9
Thrombozyten 150-400 x1000/ μ l	243	22,3	9	225	12,8	9
MTV 7.8-11.0 fl	11,0	0,3	9	11,2	0,2	9

Tabelle 7a: Kontrolle

Referenzbereich	NR Studienende			R Studienende		
	Mittelwert	SEM	<i>n</i>	Mittelwert	SEM	<i>n</i>
GOT < 17 U/l	10	1,1	7	10	1,1	8
GPT < 23 U/l	13	2,3	7	9	0,8	8
GGT < 28 U/l	12	1,3	7	13	2,2	8
AP < 180 U/l	105	12,0	7	111	8,5	8
LDH 120-240 U/l	146	10,3	7	139	6,2	8
Leukozyten 4.0-11.0 x1000/ μ l	6,2	0,4	9	6,6	0,4	8
Erythrozyten 3.90-5.60 Mio/ μ l	4,93	0,1	9	4,94	0,1	8
Hämoglobin 12.0-17.5 g/dl	14,8	0,4	9	15,3	0,4	8
Hämatokrit 37.0-50.0 %	42,6	0,8	9	44,0	1,3	8
MCV 84.0-98.0 fl	86,5	1,3	9	89,2	1,3	8
MCH 28.0-34.0 pg	30,1	0,6	9	30,9	0,5	8
MCHC 32.0-36.0 g Hb/dl	34,8	0,3	9	34,7	0,3	8
EBV 11.6-14.6 %	12,6	0,3	9	12,8	0,3	8
Thrombozyten 150-400 x1000/ μ l	248	22,6	9	229	14,0	8
MTV 7.8-11.0 fl	11,4	0,2	9	11,2	0,3	8

Tabelle 7b: Studienende

Abbildung 19: Thrombozytenzahlen im EDTA-Blut und im PRP bei Nichtrauchern und Rauchern.
 Im EDTA-Blut (**Abb. 19a**) wurde die Thrombozytenzahl zu Beginn der Studie (Kontrolle) und am Studienende (Studienende) bestimmt. Im PRP (**Abb. 19b**) erfolgte die Thrombozytenzählung zu Studienbeginn, nach der 40 mg ASA-Behandlung und nach der 100 mg ASA-Behandlung. **Abb. 19b:** Statistische Auswertung (sofern nicht in der Abb. 19b enthalten): NR vs. R: keine statistischen Unterschiede in der Kontrolle und nach ASA-Behandlung.

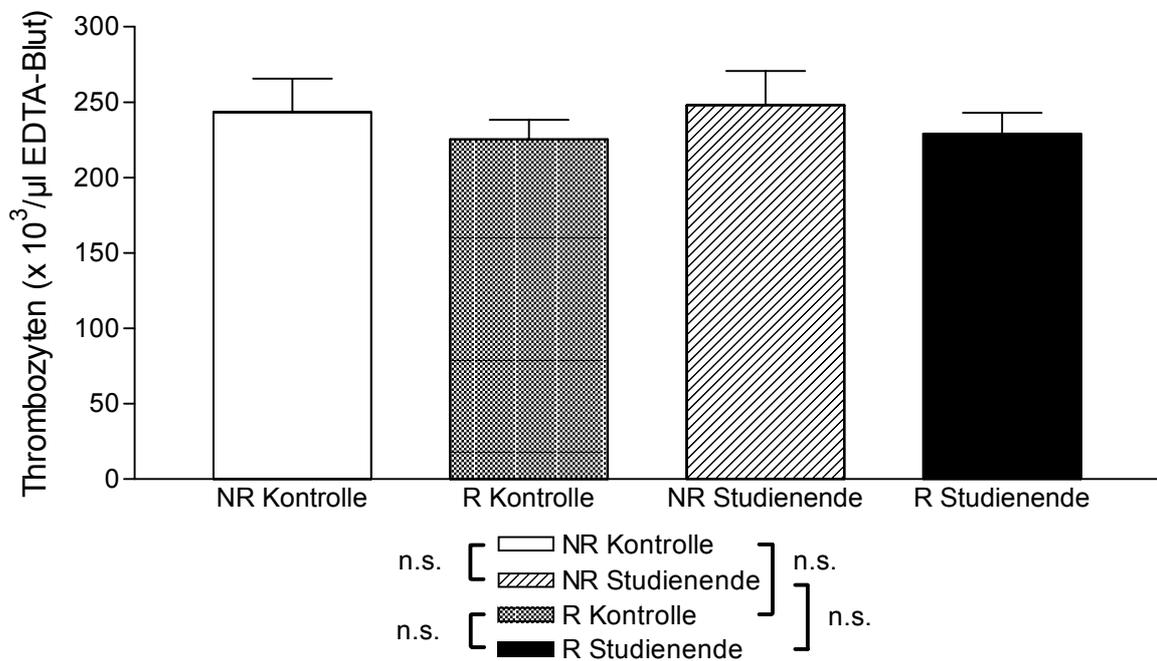


Abbildung 19a: Thrombozytenzahlen im EDTA-Blut

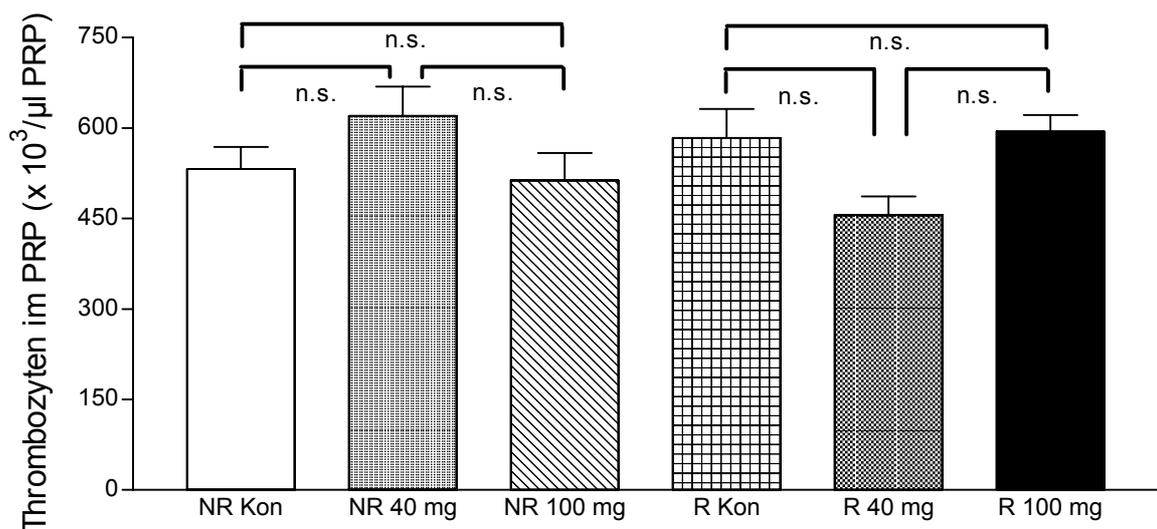


Abbildung 19b: Thrombozytenzahlen im PRP

4. DISKUSSION

4.1 Kritik der Methoden

Gewinnung des PRP:

Die Thrombozyten werden bei der Blutabnahme und insbesondere bei der Zentrifugation im Rahmen der Präparation voraktiviert, was zu einer Sekretion von Serotonin und Adenosinnukleotiden führen kann (Zucker, 1972). Hierbei könnte ADP unter den Bedingungen des Ca^{++} -armen Mediums zur Synthese von Thromboxan führen, was über eine positive Rückkopplung zu einer starken Aktivierung der Thrombozyten führen könnte. In den hier durchgeführten Experimenten führte die Zentrifugation allerdings zu keiner effektiven Thromboxanbildung.

Bei je einem Nichtraucher und einem Raucher kam es nach oder während der Zentrifugation zur Gewinnung des PRP zu einer Aktivierung der Gerinnung im Probenröhrchen, so dass das Material verworfen werden musste. Die Daten beider Probanden wurden nicht berücksichtigt.

Nach der 40 mg ASA-Behandlung war bei den Rauchern die Thrombozytenzahl im PRP tendenziell niedriger im Vergleich zur Kontrolle und zur 100 mg ASA-Behandlung. Auch im Vergleich zu den Nichtrauchern war die Thrombozytenzahl tendenziell niedriger. Dies ist auf die Präparation zurückzuführen, die eine große Variabilität in Bezug auf die Thrombozytenzahlen im PRP zuließ. Der Einfluss auf die Ergebnisse ist allerdings gering, da die beobachtete Hyporeaktivität der Thrombozyten der Raucher auch in der Kontrolle und nach der 100 mg ASA-Behandlung beobachtet wurde und nach der 40 mg ASA-Behandlung im Vergleich zur 100 mg ASA-Behandlung schwächer ausgeprägt war.

Gewinnung der Urinproben:

Die Gewinnung der Proben zur Messung der Urin TX-M- und PGI-M-Ausscheidung erfolgte aus Mittelstrahlurin, der kurz nach dem Eintreffen der Probanden im Institut gewonnen wurde. Die Menge an TX-M und PGI-M im Urin wurde auf die Kreatininkonzentration im Urin bezogen, so dass grobe Verfälschungen der Menge der

ausgeschiedenen Metaboliten durch z. B. besonders konzentrierten Morgenurin ausgeschlossen werden konnten.

Bei allen Rauchern war es üblich, kurz vor dem Eintreffen im Labor noch eine Zigarette zu rauchen. Die gemessenen Veränderungen der Urin-TX-M bei den Rauchern könnten also sowohl eine kurzfristige Reaktion auf zuvor gerauchte Zigaretten darstellen als auch auf chronische Veränderungen im Arachidonsäurestoffwechsel hinweisen. Die Gewinnung eines 24-Stunden-Sammelurins könnte hier besser beurteilbare Daten liefern.

Aggregation:

Die Aggregationsmessungen wurden in der vorliegenden Arbeit turbidometrisch im plättchenreichen Plasma (PRP) durchgeführt. Diese Methode hat den Vorteil einer guten Reproduzierbarkeit und Standardisierbarkeit (Zucker, 1989). Allerdings sollte beachtet werden, dass das Verhalten der Thrombozyten im PRP nicht unbedingt ihr Verhalten im Vollblut bzw. unter in-vivo-Bedingungen widerspiegeln muss. So haben Larsson et al. (1990) beim Vergleich der „Filtragometry“ (Abschnitt 4.2.2) mit der konventionellen Aggregometrie nach Born gezeigt, dass eine Erhöhung der Aggregabilität in vivo mit einer Verminderung der Aggregabilität in vitro einhergehen kann.

Die Thrombozyten werden zur Gewinnung von PRP aus ihrer natürlichen „Umwelt“ isoliert, die Aggregationsversuche finden in einem unphysiologischen Milieu statt. Der Ionengehalt im Versuchsansatz ist durch die Zugabe von Citrat-Puffer verändert. Die niedrige Ca^{++} -Konzentration führt zu einer irreversiblen ADP-Aggregation und zu einer deutlich erhöhten TXB_2 -Bildung. Bei normaler Ca^{++} -Konzentration ist die ADP-Aggregation reversibel, Thromboxansynthese und Sekretion von Serotonin und ATP sind erheblich niedriger (Bretschneider et al., 1994).

Erythrozyten steigern die Reaktivität der Thrombozyten (Perez-Requejo et al., 1985), während Leukozyten die Reaktivität hemmen (Valles et al., 1993).

In vitro besteht nicht mehr die Möglichkeit zur Interaktion mit der Gefäßwand. Im physiologischen Milieu stehen die Thrombozyten unter dem hemmenden Einfluss von PGI_2 und NO.

Ferner sind die Strömungsverhältnisse in der kontinuierlich mit 1200 Umdrehungen gerührten Versuchsküvette andere als im Blutgefäß. Bei einer physiologischen Ca^{++} -Konzentration von 2 mM unter hohem „shear-stress“ (z. B. im Bereich einer Gefäßstenose) ist die Bildung von Plättchenaggregaten thromboxanunabhängig (Rajagopalan et al., 1988). In einer solchen Situation lässt sich die Thrombozytenaggregation durch ASA kaum beeinflussen.

Rekrutment:

Zur Gewinnung eines zellfreien Überstandes (Releasat) ist die Zentrifugation der Thrombozyten-Erythrozyten-Suspension notwendig. Die Thrombozyten könnten bei der Zentrifugation ADP freisetzen (Zucker, 1972). Beim Rekrutment ist ADP das entscheidende Stimulanz der Aggregation (Perez-Requejo et al., 1985). Die Aggregation könnte also durch die Zentrifugation beeinflusst werden.

Bezogen auf 0,3 $\mu\text{g/ml}$ Kollagen stieg die Thromboxan- und ATP-Konzentration im Releasat bei 5 $\mu\text{g/ml}$ Kollagen um mehr als den Faktor 13. Das Ausmaß von Aggregation, Sekretion (Daten nicht gezeigt) und Thromboxanfreisetzung verhielt sich proportional zur Kollagenkonzentration, die Aggregationsamplitude war bei den verschiedenen Kollagenkonzentrationen sogar feiner abgestuft als bei der ADP- oder Kollagenaggregation. Insgesamt scheint das Rekrutment trotz Zentrifugation ein besonders sensibles System zur Untersuchung der Thrombozytenfunktion zu sein.

ATP-Messung:

Ein Aliquot des stimulierten PRP wurde nach Ablauf der Aggregationsmesszeit (5 min) mit dem entsprechenden Volumen ATP-Biolumineszenz-Lösung inkubiert und im Biolumat gemessen. Diese Methode hat den Nachteil, dass bei der Gewinnung der Probe mittels einer Pipette in stark variierendem Ausmaß Plättchenaggregate aspiriert wurden. Der ATP-Gehalt der einzelnen Probe könnte daher stark variieren. In der Praxis war der Unterschied der beiden Messwerte einer Doppelbestimmung allerdings gering. Die Unterschiede zwischen den einzelnen Probanden hingegen waren erheblich. Der Standardfehler des Mittelwertes bei der ATP-Messung trug dazu bei, dass sich kein signifikanter Unterschied bei der ADP-induzierten ATP-Sekretion zwischen Nichtrauchern und Rauchern ergab. Die Hemmung der ATP-Sekretion nach ASA-Behandlung war allerdings signifikant.

In eigenen Versuchen ließen sich genauere Messwerte erzielen, wenn das stimulierte PRP vor der Gewinnung des Aliquots mit EDTA-Indometazin-Lösung inkubiert und die Thrombozytenaggregate pelletiert wurden. Dies könnte sinnvoll sein, um Unterschiede zwischen Nichtrauchern und Rauchern besser herauszuarbeiten. Diese Methode ist recht zeitaufwendig, eine Messung vieler Proben während der Aggregationsversuche ist nicht möglich.

4.2 Thrombozytenfunktion bei Nichtrauchern und Rauchern

4.2.1 Ergebnisübersicht

Ausgehend von der Bedeutung des Nikotinmissbrauchs für die Atherogenese und für ischämische Ereignisse bei Atherosklerose und der Bedeutung von ASA zur Prophylaxe thrombembolischer Komplikationen sollen an dieser Stelle folgende Fragestellungen untersucht werden:

1. Sind schon bei gesunden Rauchern Veränderungen der Thrombozytenfunktion zu beobachten?
2. Gibt es Unterschiede in der Wirksamkeit einer ASA-Behandlung zwischen Nichtrauchern und Rauchern?

Zu 1: Die Thrombozytenfunktion unbehandelter Raucher war bei den in-vitro-Experimenten vermindert. Sowohl Aggregation als auch Thromboxansynthese waren davon betroffen. Es zeigten sich bei unbehandelten Rauchern Hinweise auf eine Thrombozytenaktivierung in vivo durch eine tendenziell erhöhte Ausscheidung von TX-M im Urin (**Tab. 8**).

Zu 2: Die Thrombozytenhyporeaktivität war nach der ASA-Behandlung verstärkt. Sie war auch bei fast vollständiger Hemmung von Sekretion und Thromboxansynthese nachzuweisen. Ein von der Thromboxansynthese unabhängiger, nicht durch ASA beeinflussbarer Mechanismus könnte an der Hyporeaktivität beteiligt sein (**Tab. 8**).

	Kontrolle	40 mg ASA	100 mg ASA
Kollagenaggregation	n.s.	↓↓	↓↓
Kollagen-induzierte TXA ₂ -Synthese	↓↓	n.s.	↓↓
ADP-Aggregation	↓	n.s.	↓
ADP-induzierte TXA ₂ -Synthese	↓	↓	↓
Aggregation beim Rekrutment	n.s.	↓	↓↓
TXA ₂ -Synthese beim Rekrutment	↓↓	n.s.	↓
Urin-TX-M-Ausscheidung	↑	n.s.	n.s.
Urin-PGI-M-Ausscheidung	n.s.	n.s.	n.s.

Tabelle 8: Auswirkungen von Zigarettenrauchen auf die Parameter der Thrombozytenfunktion bei unbehandelten (Kontrolle) sowie bei ASA-behandelten (40 mg bzw. 100 mg) Probanden. In der Kontrolle und nach ASA-Behandlung war die Thrombozytenfunktion bei den Rauchern im Vergleich zu Nichtrauchern signifikant (↓↓) oder tendenziell (↓) vermindert. Die Urin-TX-M-Ausscheidung war in der Kontrolle tendenziell erhöht (↑). (n.s.= nicht signifikant)

4.2.2 Physiologie der Thrombozytenaktivierung und Untersuchung der Thrombozytenfunktion

Vor der Interpretation dieser Ergebnisse soll zunächst kurz die Physiologie der Thrombozytenaktivierung erläutert werden (Holmsen, 1994; Colman, 1994).

Die vier Hauptreaktionen der Thrombozytenaktivierung sind „shape-change“, Aggregation, Sekretionsreaktion und die Synthese und Freisetzung von Arachidonsäuremetaboliten. Die Thrombozyten reagieren dabei auf so verschiedene Agonisten wie z. B. ADP, Serotonin, TXA₂, Adrenalin, Kollagen und Thrombin. Die Thrombozyten interagieren mit Plasmaproteinen, Erythrozyten, Leukozyten und der Gefäßwand. In **Abb. 20** ist die Thrombozytenaktivierung mit Kollagen bzw. ADP dargestellt.

Nach Bindung eines Agonisten an den spezifischen Rezeptor kommt es zur Aktivierung verschiedener intrazellulärer Signalübertragungswege. So wird beispielsweise die Phospholipase C aktiviert, die Phosphatidylinositolbisphosphat in Diacylglycerol (DAG) und Inositoltrisphosphat (IP₃) spaltet. IP₃ führt zu einer Erhöhung der intrazellulären Ca⁺⁺-Konzentration sowohl durch eine Freisetzung aus intrazellulären Speichern als auch durch einen Einstrom von Ca⁺⁺ in die Zelle. Ca⁺⁺-Calmodulin-vermittelt kommt es zur Myosin-Phosphorylierung, die zur Abrundung der im Ruhezustand diskoidalen

Thrombozyten und Ausbildung von Pseudopodien führt. Diese Abrundung der Thrombozyten wird als „**shape-change**“ bezeichnet.

Die **Thrombozytenaggregation** wird durch die Aktivierung von Fibrinogenrezeptoren (Glykoprotein IIb/IIIa) eingeleitet. Obwohl gesichert ist, dass die Phospholipase C und die Proteinkinase C eine wesentliche Rolle spielen und viele weitere Zwischenschritte aufgeklärt wurden, ist der genaue Mechanismus dieser Aktivierung unklar (Topol et al., 1999). Es kommt zunächst zur **reversiblen Vernetzung** der Thrombozyten durch Fibrinogen, welches bivalent Brücken zwischen den Thrombozyten ausbilden kann. Dies ist die reversible Primäraggregation. Zur **irreversiblen Sekundäraggregation** kommt es, wenn ADP sezerniert und TXA₂ gebildet wird. Die Sekundäraggregation lässt sich durch Blockade der ADP-Rezeptoren (Weber et al., 1999) oder durch Blockade der PGH-Synthase durch ASA (Braun et al., 1994) hemmen.

Wesentlich für die irreversible Aggregation ist die Hemmung der Adenylatzyklase und damit die Hemmung der Synthese von cAMP aus ATP. Hierbei spielt die ADP-Sekretion und die folgende gleichzeitige Aktivierung des P2Y₁ und des kürzlich geklonten P2Y₁₂-Rezeptors (Hollopeter et al., 2001) bei vielen Thrombozytenagonisten und insbesondere beim Thromboxan eine wichtige Rolle (Paul et al., 1999).

Die Phospholipase C-induzierte Diacylglycerolsynthese aktiviert die Proteinkinase C (PKC), die über die Phosphorylierung eines 47 kD-Proteins an der **Sekretionsreaktion** beteiligt ist. Aus den elektronendichten Granula wird ATP, ADP und Serotonin, aus den α-Granula PDGF, Serotonin und Fibrinogen freigesetzt. Diese Substanzen dienen physiologischerweise der autokrinen Stimulation der Thrombozyten, führen zur Aggregation und werden mit der Schädigung des Endothels und der Migration und Proliferation von glatten Muskelzellen in Verbindung gebracht.

Beim „shear-stress“ hat die Sekretion von ADP besondere klinische Bedeutung. Eine Situation mit hohem „shear-stress“ liegt beim akuten Verschluss von hochgradig stenosierten Gefäßen vor (Rajagopalan et al., 1988).

Zu Beginn der Synthese von **Thromboxan A₂** steht die Aktivierung der Phospholipase A₂, die aus Membranphospholipiden Arachidonsäure freisetzt. Durch die Zyklusogenase- und Peroxidaseaktivität der PGH-Synthase wird zunächst PGG₂ und schließlich PGH₂ synthetisiert. PGH₂ ist der Vorläufer von TXA₂. TXA₂ ist ein

Thrombozytenagonist mittlerer Stärke. Es bindet an den TP-Rezeptor und aktiviert die Gq-abhängige intrazelluläre Signalkaskade, was zur Ca^{++} -Freisetzung und Aktivierung der Proteinkinase C führt. Es folgen shape-change und Sekretion. Die Thrombozyten haben eine große Kapazität zur Synthese von TXA_2 , so dass es neben ADP und Thrombin zu den wichtigsten proaggregatorisch wirkenden Substanzen zählt. Die Synthese von TXA_2 führt, wie die ADP-Sekretion, zur irreversiblen Aggregation.

Neuerdings gibt es Hinweise darauf, dass die thrombozytenaggregierende Wirkung des Thromboxans primär durch Stimulierung der Sekretionsreaktion vermittelt wird (Paul et al., 1999). Die Sekretion von ADP führt über den P_2Y_{12} -Rezeptor zur Verminderung der intrazellulären cAMP-Konzentration, eine Reaktion die für die thromboxanvermittelte Aggregation notwendig zu sein scheint.

Die Bedeutung der Erythrozyten für die Thrombozytenaktivierung kann mit dem Rekrutment genauer untersucht werden (Perez-Requejo et al., 1985). Dabei werden ASA-gehemmte Thrombozyten durch die Anwesenheit von Erythrozyten im PRP aktiviert. Die Anwesenheit von **Leukozyten** im PRP hingegen hemmt die Reaktivität (Perez-Requejo et al., 1985). ADP, TXA_2 und PAF sind wesentliche Mediatoren für die proaggregatorische Wirkung des Überstandes einer mit Kollagen stimulierten und zentrifugierten Thrombozyten-Erythrozyten-Suspension (Perez-Requejo et al., 1985).

Es existieren verschiedene Ansätze zur Beobachtung der Thrombozytenfunktion. Eine auch in dieser Untersuchung angewendete Methode ist die Messung der **Ausscheidung von Thromboxan- und Prostazyklinmetaboliten**. TXA_2 wird im Plasma schnell zu TXB_2 hydrolysiert und über die Niere ausgeschieden. Obwohl es noch andere Quellen von TXB_2 im Organismus gibt, erfasst die Untersuchung der Urin- TXB_2 -Ausscheidung einen wesentlichen Thrombozytenaktivitätsparameter (Chiabrando et al., 1992). PGI_2 wird durch das Endothel über Metabolisierung von PGH_2 durch die Zyklooxygenase synthetisiert. Eine Steigerung der Prostazyklinsynthese wird bei einer Thrombozytenaktivierung beobachtet. Bei der Interaktion von aktivierten Thrombozyten mit Zellen der Gefäßwand kommt es zum Transfer von Prostaglandinendoperoxiden und einer daraus resultierenden Bildung von PGI_2 (Muck et al., 1998).

Mit zunehmendem Schweregrad der Atherosklerose ist die Prostazyklinsynthese erhöht (Knapp et al., 1988). Auch bei den Rauchern haben einige Untersuchungen eine

Erhöhung der Ausscheidung von Prostazyklinmetaboliten nachgewiesen (Nowak et al., 1987).

Eine weitere Möglichkeit zur Untersuchung der Thrombozytenfunktion ist die **Aggregation der Thrombozyten in vitro**. In den hier durchgeführten Versuchen wurden die ADP-Aggregation, die Kollagenaggregation und das Rekrutment verwendet. Die Interpretation solcher Experimente kann Probleme bereiten. Es gibt Hinweise darauf, dass eine Hypoaggregabilität von Thrombozyten in vitro keineswegs einer generellen Hypoaggregabilität in vivo entsprechen muss, sondern auf eine akute Aktivierung der Thrombozyten in vivo mit nachfolgender Hypoaggregabilität zurückzuführen ist (Smith et al., 1998). So konnte bei gesunden Probanden nach Adrenalininfusion eine Hypoaggregabilität in der klassischen Aggregometrie (in vitro) beobachtet werden. Während der Adrenalininfusion konnte allerdings bei Verwendung der „**filtragometry**“ eine erhöhte Aggregabilität beobachtet werden (Larsson et al., 1990). Bei dieser Methode wird kontinuierlich ausgeleitetes Venenblut durch einen Nickelfilter geleitet und die Zeit bis zur Okklusion des Filters gemessen. Eine akute Aktivierung von Thrombozyten in vivo muss besonders dann vermutet werden, wenn gleichzeitig die Ausscheidung von TX-M im Urin erhöht ist (Nowak et al., 1987).

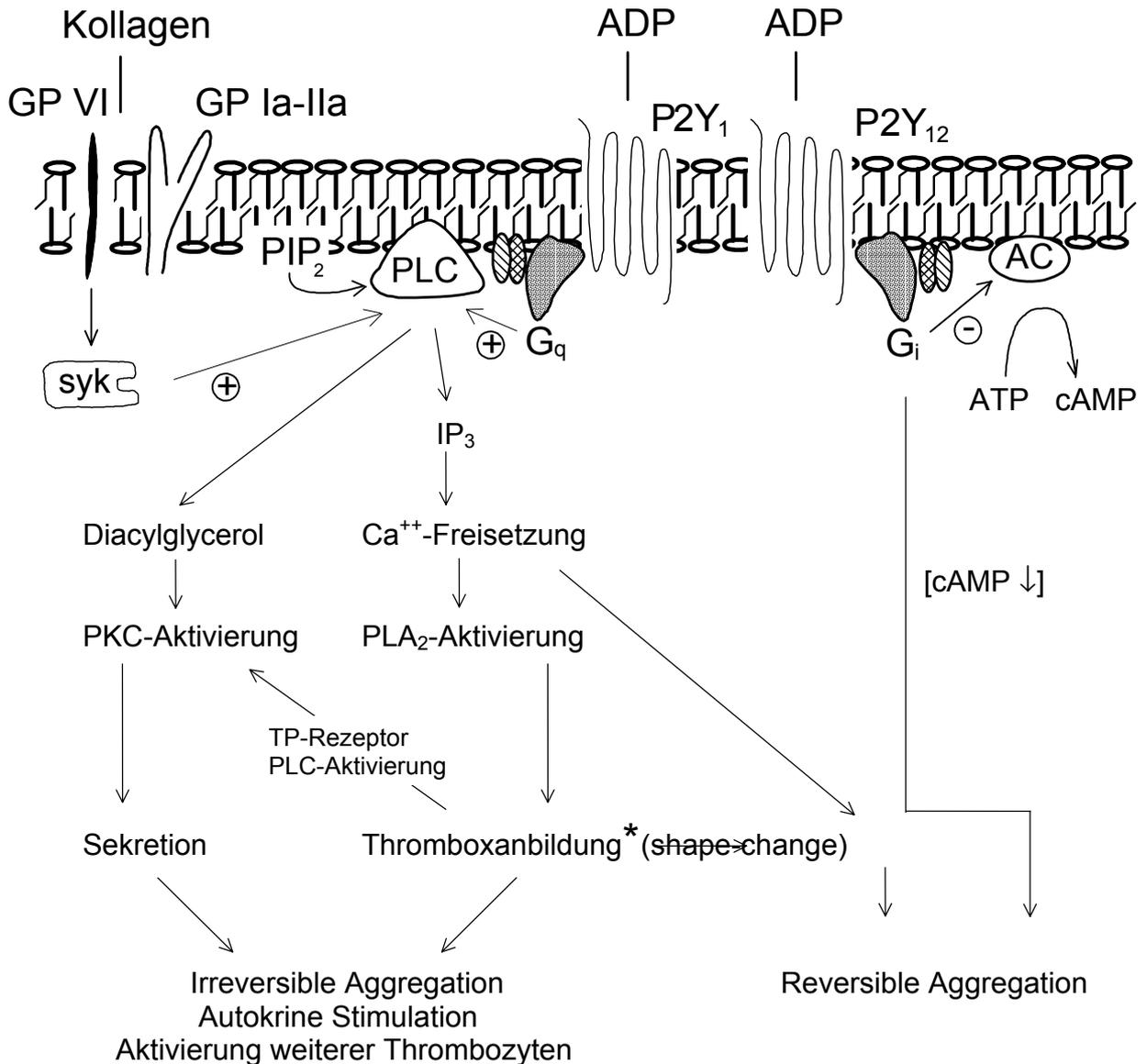


Abbildung 20: Thrombozytenaktivierung durch Kollagen und ADP. Kollagen bindet an Glykoprotein GP VI und GP Ia-IIa. GP VI-vermittelt kommt es zur Aktivierung einer Tyrosinkinase (syk), die die Phospholipase C (PLC) aktiviert. Dies führt zur Spaltung von Phosphatidylinositolbisphosphat (PIP₂) in Diacylglycerol (DAG) und Inositoltrisphosphat (IP₃), welches eine Ca⁺⁺-Freisetzung verursacht. Schließlich kommt es nach Phospholipase C (PKC)- und Phospholipase A₂ (PLA₂)-Aktivierung zur Bildung von Thromboxan und zur Sekretionsreaktion. Wesentliches Sekretionsprodukt ist dabei das ADP. Die Bildung von Thromboxan und die Sekretion sind Voraussetzung der irreversiblen Aggregation und fördern die Aktivierung weiterer Thrombozyten. Thromboxan bindet dabei an den TP-Rezeptor und führt durch PLC-Aktivierung zum Ca⁺⁺-vermittelten shape-change und durch DAG-Bildung zur (ADP)-Sekretion, die über eine gleichzeitige Aktivierung der P2Y-Rezeptoren zur Aggregation führt. ADP führt nach Bindung an den P2Y₁-Rezeptor bei physiologischer extrazellulärer Ca⁺⁺-Konzentration über eine G-Protein (G_q)-vermittelte PLC-Aktivierung nach initialem shape-change zu einer reversiblen Aggregation, welche nur bei gleichzeitiger Bindung von ADP an den P2Y₁₂-Rezeptor beobachtet wird. Die Bindung an diesen Rezeptor führt zu einer G-Protein (G_i) vermittelten Hemmung der Adenylatzyklase (AC), so dass die Bildung von zyklischem AMP (cAMP) aus ATP vermindert wird. (modifiziert nach Ashby, 2001; FitzGerald, 2001; Paul et al., 1999)

*Bei niedriger extrazellulärer Ca⁺⁺-Konzentration (wie in den Experimenten in dieser Arbeit) führt auch ADP zur Thromboxanbildung, Sekretion und irreversibler Aggregation; bei physiologischer Ca⁺⁺-Konzentration wird nur wenig Thromboxan gebildet und die Aggregation ist reversibel.

4.2.3 Thrombozytenfunktion bei Rauchern

Thrombozytenfunktion bei unbehandelten Rauchern:

Die Thrombozytenfunktion unbehandelter Raucher war bei den in-vitro-Experimenten vermindert. Sowohl Aggregation als auch Thromboxansynthese waren davon betroffen. Es zeigten sich bei unbehandelten Rauchern Hinweise auf eine Thrombozytenaktivierung in vivo durch eine tendenziell erhöhte Ausscheidung von TX-M im Urin.

Diese Ergebnisse decken sich mit den Ergebnissen anderer Untersuchungen. Zigarettenrauchen führt **akut** zu einer **Thrombozytenhyperaggregabilität**, während im Intervall eine **chronische Hypoaggregabilität** zu beobachten ist (Smith et al., 1998).

Die chronische Hypoaggregabilität ist vermutlich Folge einer Modifikation der Thrombozyten durch eine akute Aktivierung in vivo (Nowak et al., 1987; Benowitz et al., 1993). Als ein Hinweis auf diese akute in-vivo-Thrombozytenaktivierung wird dabei die regelmäßig zu beobachtende erhöhte Thromboxanausscheidung bei Rauchern im Vergleich zu Nichtrauchern angesehen (Nowak et al., 1987). Eine Darstellung dieses Zusammenhangs unter beispielhafter Berücksichtigung der Ergebnisse dieser Arbeit findet sich in **Abb. 21**.

Die Hyperaggregabilität der Thrombozyten besteht vor allem kurz nach dem Rauchen einer Zigarette. Bei der Vollblutaggregation mit ADP wurde die Hyperaggregabilität nur beobachtet, wenn die Blutabnahme innerhalb einer halben Stunde nach dem Rauchen erfolgte. Die Hyperaggregabilität war in dieser Untersuchung nicht mit der Serumnikotinkonzentration korreliert (Sharp et al., 1995).

In der hier durchgeführten Untersuchung konnte zwar eine erhöhte Ausscheidung von TX-M gezeigt werden, es fand sich allerdings bei den Rauchern **keine Erhöhung der Urin-PGI-M-Ausscheidung**. Eine Metaanalyse zur Thrombozytenfunktion von Rauchern (Smith et al., 1998) ergab einen signifikanten Zusammenhang zwischen einer akuten (durch Zigarettenrauchen herbeigeführten) Plättchenaktivierung und einer chronischen Erhöhung der Urin-PGI-M-Ausscheidung. Allerdings war der Zusammenhang zwischen einer akuten Thrombozytenaktivierung und einer chronischen Erhöhung der Urin-TX-M-Ausscheidung deutlicher. Von 17 Studien zeigte

sich nur bei fünf Studien eine Erhöhung der Ausscheidung von PGI-M im Urin, während die Ausscheidung von TX-M in allen 16 untersuchten Studien bei den Rauchern erhöht war.

Für den Mechanismus der **akuten Thrombozytenaktivierung in vivo** durch das Rauchen einer Zigarette gibt es verschiedene Erklärungsversuche, während die Ursache der chronischen Hypoaggregabilität in vitro spekulativ bleibt.

Ein gut dokumentierter Mechanismus der akuten Thrombozytenaktivierung ist dabei die **Ausschüttung von Adrenalin und anderen Katecholaminen**. Raucher scheiden im Urin vermehrt Adrenalin, Dopamin und Noradrenalin aus (Benowitz et al., 1993). Adrenalin ist selbst nur ein schwacher Thrombozytenagonist, im Zusammenwirken mit anderen Agonisten wird bei Patienten mit KHK die Aggregabilität von Thrombozyten allerdings deutlich erhöht (Hung et al., 1995).

Durch Zigarettenrauchen **oxidierte freie Fettsäuren** (ox-FFA) könnten an der erhöhten Aggregabilität der Thrombozyten von Rauchern beteiligt sein (Blache, 1995). Die ox-FFA-Plasmakonzentration von Rauchern ist akut nach dem Rauchen einer Zigarette erhöht. Die Thrombin-induzierte Thrombozytenaggregation bei Nichtrauchern war bei Inkubation der Thrombozyten mit aus dem Plasma der Raucher gewonnenen ox-FFA gesteigert. Diese Hyperaggregabilität war nicht mehr nachweisbar, wenn das Plasma der Raucher mit reduziertem Glutathion und Peroxidase vorinkubiert wurde.

Die **Ursache der chronischen Hypoaggregabilität** der Thrombozyten von Rauchern in vitro bleibt unklar. Rauchen führt nicht nur zur Thromboxanbildung, sondern auch zur Thrombozytensekretion (Benowitz et al., 1993). Bei Rauchern war die Serumkonzentration von Plättchenfaktor 4 und β -Thromboglobulin (Inhaltsstoffe der α -Granula der Thrombozyten) erhöht. Möglicherweise führt eine akute Thrombozytenaktivierung durch Rauchen mit Sekretion und Thromboxanbildung zu einer Verarmung an Inhaltsstoffen der Granula und Substraten für die Thromboxanbildung, so dass in vitro eine verminderte autokrine Stimulation mit Hypoaggregabilität resultiert (Nowak et al., 1987; Benowitz et al., 1993).

In den hier durchgeführten Experimenten war bei unbehandelten Rauchern diese Hypoaggregabilität nur bei der ADP-Aggregation zu beobachten und dort im wesentlichen nur bei 0,6 μ M ADP. Rekrutmentaggregation und Kollagenaggregation

waren nicht geeignet, diese Hypoaggregabilität bei Rauchern in vitro zu erfassen. Andere Autoren (Foo et al., 1991) haben eine Hypoaggregabilität bei Rauchern allerdings auch bei der Kollagen-induzierten Vollblutaggregation beobachtet.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen in allen drei Aggregationsexperimenten eine geringere Thromboxansynthese im plättchenreichen Plasma. Dies steht im Einklang mit der Überlegung, dass an der in-vitro-Hypoaggregabilität **Veränderungen im Arachidonsäurestoffwechsel** beteiligt sein könnten.

Andererseits könnten auch **Alterationen der Signaltransduktion oder der Sekretion** zu einer verminderten Thromboxansynthese führen. Diese Überlegung wird durch eine tendenziell verminderte ADP-induzierte ATP-Sekretion in den hier durchgeführten Experimenten unterstützt. Es fanden sich bei 20 μM ADP bei Nichtrauchern 846 ± 176 nmol ATP und bei Rauchern 484 ± 107 nmol ATP/ 10^{11} Plättchen (Daten nicht gezeigt). Dieser nicht-signifikante Unterschied könnte aber auch auf die in diesem Experiment tendenziell verminderte Thromboxansynthese zurückzuführen sein. Neuere Arbeiten führen die thrombozytenaggregierende Wirkung des Thromboxans auf eine Stimulation der Thrombozytensekretion zurück (Paul et al., 1999).

Auch andere Autoren konnten bei aktiven Rauchern im Vergleich zu abstinenten Rauchern eine verminderte ADP-induzierte ATP-Sekretion zeigen (Benowitz et al., 1993).

Thrombozytenfunktion bei Rauchern nach ASA-Behandlung:

Die bereits bei unbehandelten Rauchern beobachtete in-vitro-Hyporeaktivität war nach der ASA-Behandlung verstärkt. Sie war auch bei fast vollständiger Hemmung von Sekretion und Thromboxansynthese nachzuweisen. Ein von der Thromboxansynthese unabhängiger, nicht durch ASA beeinflussbarer Mechanismus könnte an der Hyporeaktivität beteiligt sein.

Die in-vitro-Hyporeaktivität trotz ASA-Behandlung könnte ein Hinweis auf eine durch Rauchen verursachte akute Thrombozytenaktivierung in vivo sein, die sich nicht durch ASA hemmen läßt.

In den Kontrollversuchen war in allen drei Experimenten die Thromboxansynthese bei den Rauchern geringer, was ein Hinweis auf eine Beteiligung des Arachidonsäurestoffwechsels an der Hypoaggregabilität der Thrombozyten der Raucher sein könnte. Die Ergebnisse nach ASA-Behandlung weisen in eine weitere Richtung: Auch nach der 100 mg ASA-Behandlung war in allen drei Versuchsansätzen nicht nur die Thromboxansynthese, sondern darüber hinaus auch die Aggregation der Thrombozyten der Raucher im Vergleich zu den Nichtrauchern vermindert. Dies könnte zu der vorschnellen Interpretation verleiten, dass die Thrombozyten der Raucher **durch ASA stärker gehemmt** werden als die Thrombozyten der Nichtraucher.

Die Ergebnisse der ADP-Aggregation widersprechen dieser Überlegung. Die Hypoaggregabilität bei der ADP-Aggregation war bei Rauchern besonders bei 2 µM ADP nach 100 mg ASA ausgeprägt. Bei Rauchern war nur eine irreversible Aggregation auszulösen, während bei den Nichtrauchern acht irreversible Aggregationen beobachtet wurden. Die Thromboxankonzentration im PRP war bei Nichtrauchern und Rauchern kleiner 0,2 nmol/10¹¹ Thrombozyten. Die Thromboxansynthese (und auch die ATP-Sekretion, Daten nicht gezeigt) war damit um mehr als 99 % gehemmt. Bei einer fast vollständigen Hemmung der Thromboxansynthese (> 99 %) bei Nichtrauchern und Rauchern ist eine postulierte thromboxanabhängige günstigere Wirkung von ASA bei Rauchern nicht mehr zu erwarten. Andererseits könnten im engen Zellkontakt bei der reversiblen Primäraggregation im Mikromilieu eines Plättchenaggregates effektive Konzentrationen von TXA₂ und ADP entstehen, die zu einer Aktivierung der Thrombozyten führen, ohne

dass höhere Konzentrationen von Agonisten im PRP messbar sind (Colman, 1994). Insgesamt gesehen könnte an der Hypoaggregabilität der Thrombozyten der Raucher bei der ADP-Aggregation ein Mechanismus beteiligt sein, der unabhängig von der TXA₂-Synthese und der Sekretionsreaktion ist und sich somit nicht durch ASA hemmen lässt. Durch eine ASA-Behandlung könnte in diesem Experiment also eine **durch Rauchen verursachte Störung der Thrombozytenfunktion** aufgedeckt worden sein, die sonst durch die autokrine Stimulation der Thrombozyten zum Teil kompensiert wird.

Auch unter Berücksichtigung anderer Arbeiten und klinischer Studien kann nicht von einer stärkeren ASA-Wirkung bei Rauchern ausgegangen werden:

In einer Untersuchung an gesunden Nichtrauchern und Rauchern (Chant et al., 1997) wurde die Thrombozytenfunktion vor ASA-Behandlung und nach einer einwöchigen Behandlung mit 325 mg ASA (2 x täglich) mittels der Kollagen-induzierten Vollblutaggregation untersucht. Nach ASA-Behandlung fanden sich keine Hinweise auf eine stärkere ASA-Wirkung bei Rauchern.

Rauchen führt zu einer akuten, nicht ASA-hemmbarer Thrombozytenaktivierung: Bei Rauchern mit koronarer Herzkrankheit und chronischer ASA-Therapie mit 325 mg täglich (Hung et al., 1995) wurde die durch Zigarettenrauchen ausgelöste akute ex vivo Thrombusbildung an arterieller Schweine-Media in der Flusskammer untersucht. Es fand sich trotz chronischer ASA-Therapie eine signifikante durch Rauchen ausgelöste akute Plättchenthrombusbildung an der Schweine-Media.

ASA-Wirkung bei Rauchern in klinischen Studien:

Aufschlussreich sind bei der Frage nach einer besseren ASA-Wirkung bei Rauchern auch Subgruppenanalysen klinischer Studien. Hierbei ist besonders von Bedeutung, dass nicht nur ein Teilaspekt, nämlich die Thrombozytenaggregationshemmung durch ASA beurteilt wird. Vielmehr kann die klinische Effektivität einer ASA-Therapie bei Rauchern im Vergleich zu Nichtrauchern durch Auswertung der Häufigkeit ischämischer kardiovaskulärer Ereignisse eingeschätzt werden.

In der Physicians' Health Study, einer plazebokontrollierten Untersuchung zur Primärprävention kardiovaskulärer Erkrankungen bei amerikanischen männlichen Ärzten (Steering committee of the physicians' health study research group, 1989),

wurden 325 mg ASA jeden zweiten Tag für durchschnittlich 60 Monate eingenommen. Die Verminderung des Infarkttrisikos war in einer Subgruppenanalyse bei den Nichtrauchern 42 % und bei den Rauchern 43 %. Bei gleicher Risikoreduktion war die Inzidenz des Herzinfarktes in der Subgruppe der Raucher trotz ASA-Behandlung mit 1,7 % höher als in der Subgruppe der Nichtraucher mit 1 %.

Bei 27 Patienten mit pAVK wurde für den Zeitraum von einem Jahr eine tägliche ASA-Dosierung von 50 mg mit 900 mg ASA in Bezug auf die Progression von duplexsonographisch gesicherten Atheromen in der Halsschlagader verglichen (Ranke et al., 1993). In der 50 mg ASA-Gruppe war eine signifikante Progression der Läsionen im Vergleich zu 900 mg ASA festzustellen. Dieses ungünstige Ergebnis der 50 mg-Gruppe war hauptsächlich auf die Subgruppe der Raucher zurückzuführen, die eine signifikante Progression im Vergleich zu den Nichtrauchern zeigten. 50 mg ASA täglich werden bei dieser Indikation und insbesondere bei Rauchern als nicht ausreichend wirksam angesehen.

Bei der Primärprophylaxe des Schlaganfalls bei 79319 Frauen und einer Beobachtungszeit von 14 Jahren (Iso et al., 1999) erwiesen sich 1-6 x 325 mg ASA pro Woche als günstig, eine höhere ASA-Dosierung war nicht mit einer Verbesserung der Risikoreduktion verbunden. In der Subgruppe der Raucherinnen war die Risikoreduktion für den Territorialhirninfarkt mit 63 % (signifikant im Vergleich zu unbehandelten Raucherinnen) deutlicher als in der Subgruppe der Nichtraucherinnen (Risikoreduktion 39 %, nicht signifikant im Vergleich zu unbehandelten Nichtraucherinnen). Andererseits war die Inzidenz des Territorialinfarktes bei Raucherinnen pro 10000 Patientinnenjahre mit 0,98 im Vergleich zu den Nichtraucherinnen mit 0,44 trotz ASA-Therapie mehr als doppelt so hoch. Eine Normalisierung der Inzidenz des Territorialinfarktes bei Raucherinnen auf das Niveau von Nichtraucherinnen liess sich also durch eine ASA-Therapie nicht erreichen.

Einige große klinische Studien konnten zeigen, dass Raucher mit einem akuten Herzinfarkt eine bessere Prognose haben als Nichtraucher. In der GUSTO-I-Studie wurden 41021 Nichtraucher, Ex-Raucher und Raucher mit einem akuten Herzinfarkt mit ASA und einer Thrombolyse-Therapie behandelt (The GUSTO Investigators, 1993; Barbash et al., 1995). Die Nichtraucher hatten eine höhere Reinfarktrate, eine höhere

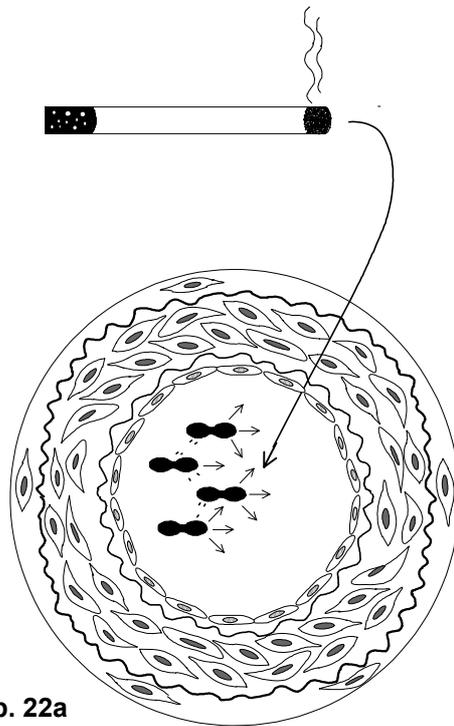
Schlaganfallrate, entwickelten häufiger ein Lungenödem, ein Herzversagen oder einen Schock. Die 1-Monat-Mortalität war bei Nichtrauchern 10,3 %, während sie bei Rauchern nur 4 % betrug. Die Autoren führen dies aber nicht auf eine bessere Wirksamkeit von ASA und der Lysetherapie bei Rauchern zurück, sondern auf das wesentlich günstigere Risikoprofil der Raucher im Vergleich zu den Nichtrauchern: Raucher waren im Schnitt 10 Jahre jünger (Raucher 55,4 Jahre vs. Nichtraucher 66 Jahre), hatten signifikant seltener eine Hypertonie oder einen Diabetes mellitus, die Vorderwand war seltener infarziert. Raucher hatten signifikant seltener eine koronare Mehrgefäßerkrankung und häufiger einen Verschluss der rechten Koronararterie. Raucher hatten die beste linksventrikuläre Ejektionsfraktion und die Hypokinesie im Infarktareal war bei Rauchern am geringsten ausgeprägt.

Auch die Ergebnisse der Studien zur Primärprophylaxe sprechen sowohl für eine ASA-hemmbar und damit thromboxanabhängige schädigende Wirkung des Rauchens aufgrund der Risikoreduktion kardiovaskulärer Ereignisse auch in der Subgruppe der Raucher. Andererseits haben Raucher auch bei einer ASA-Behandlung ein erhöhtes Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse im Vergleich zu ASA-behandelten Nichtrauchern. Dies könnte einerseits durch eine nicht ASA-hemmbar Thrombozytenhyperreaktivität bedingt sein, andererseits führt Rauchen aber zu einer Vielzahl anderer Störungen wie z. B. zu einer erhöhten Fibrinogenkonzentration (FitzGerald et al., 1988), die nicht durch ASA beeinflussbar sind.

Fazit:

Die Ergebnisse der hier vorliegenden Untersuchung sprechen gegen eine stärkere ASA-Wirkung auf die Thrombozyten von Rauchern im Vergleich zu Nichtrauchern: Die bei unbehandelten Rauchern nachgewiesene chronische Hyporeaktivität in vitro als Folge einer akuten transienten Thrombozytenhyperreaktivität in vivo war trotz ASA-Behandlung weiter nachweisbar. Bei unbehandelten Rauchern war die Thromboxansynthese vermindert, ein thromboxanabhängiger Mechanismus könnte beteiligt sein. Die Hypoaggregabilität war auch bei fast vollständiger Hemmung der Thromboxansynthese nach ASA-Behandlung erhalten, zusätzlich könnte also ein thromboxanunabhängiger Mechanismus an der chronischen Hypoaggregabilität beteiligt sein.

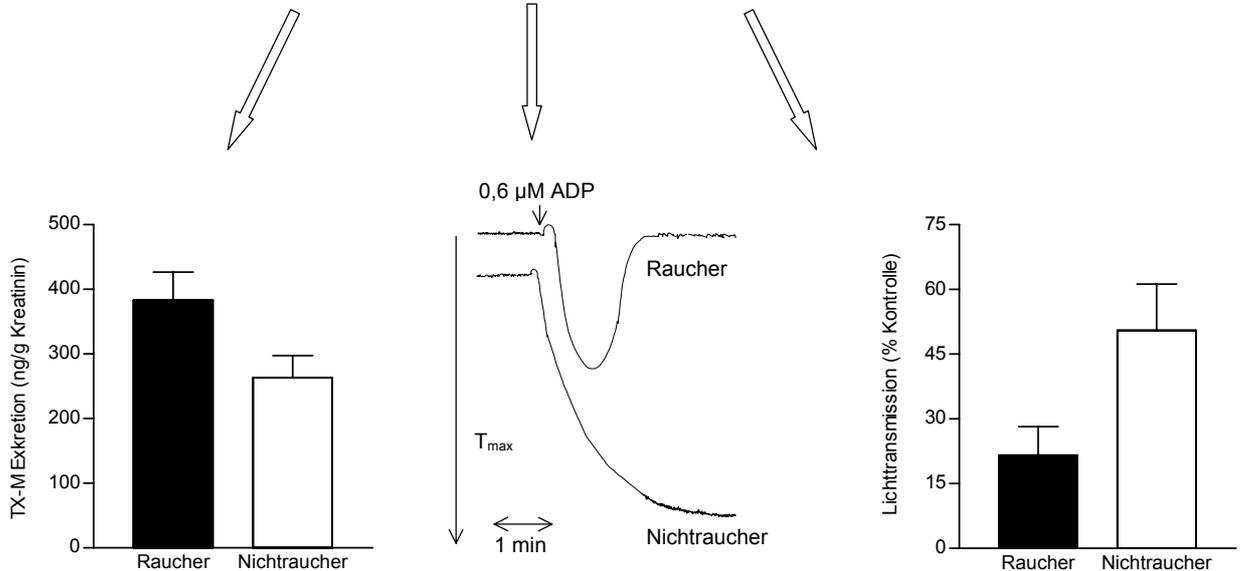
Eine ASA-Behandlung bei Rauchern ist nicht geeignet, die gestörte Thrombozytenfunktion zu normalisieren. Lediglich eine thromboxanabhängige Komponente kann durch eine ASA-Behandlung beeinflusst werden. Die in dieser Arbeit postulierte thromboxanunabhängige Komponente bleibt von einer ASA-Behandlung unberührt. Tabakrauch enthält über 4000 z. T. in ihren komplexen Wechselwirkungen toxikologisch nicht beurteilbare Substanzen. Nur der Verzicht auf Tabakkonsum kann vor den fatalen Schädigungen des Gefäßsystems schützen.



Akute Thrombozytenhyperreaktivität

Thromboxanbildung
Sekretion?
Reversible Aggregation?

Abb. 22a



22b: Vor ASA-Behandlung: Erhöhte Thromboxanausscheidung im Urin bei Rauchern im Vergleich zu Nichtrauchern.

22c: Vor ASA-Behandlung: Verminderte ADP-Aggregation bei Rauchern im Vergleich zu Nichtrauchern.

22d: Nach 100 mg ASA-Behandlung: Vermindertes Rekrutment bei Rauchern im Vergleich zu Nichtrauchern

Abbildung 22: Akute Thrombozytenhyperreaktivität und chronische Hyporeaktivität bei Rauchern. Das Rauchen einer Zigarette (**Abb. 22a**) führt in vivo bei unbehandelten Probanden zu einer akuten Thrombozytenaktivierung mit Thromboxansynthese. Es kommt zu einer vermehrten Thromboxanausscheidung im Urin (**Abb. 22b**) im Vergleich zu Nichtrauchern. Dies ist vermutlich Folge einer reversiblen Aggregation, die auch von einer Sekretionsreaktion begleitet wird. Bei der Messung der Thrombozytenfunktion in vitro findet sich bei Rauchern eine chronische Hyporeaktivität, hier beispielhaft dargestellt durch eine verminderte ADP-Aggregation (**Abb. 22c**). Auch nach ASA-Behandlung bleibt eine chronische Hypoaggregabilität (bei mehr als 95 % iger Hemmung von Thromboxansynthese und Sekretionsreaktion) nachweisbar, hier beispielhaft dargestellt durch eine verminderte Aggregation beim Rekrutment (**Abb. 22d**).

4.2.4 Schlussfolgerungen

- 1.) Thrombozyten von unbehandelten Rauchern wiesen im Vergleich mit Nichtrauchern eine Hyporeaktivität *in vitro* auf, die mit einer verminderten Thromboxanbildung einher ging. Die Ausscheidung von Urin-TX-M war bei unbehandelten Rauchern erhöht und könnte ein Zeichen einer akuten transienten Thrombozytenaktivierung *in vivo* sein. Ein thromboxanabhängiger Mechanismus könnte an der chronischen Hyporeaktivität beteiligt sein.
- 2.) Die *in-vitro*-Hyporeaktivität der Thrombozyten der Raucher im Vergleich zu Nichtrauchern war nach beiden ASA-Behandlungen verstärkt. Die Hypoaggregabilität war nach der 100 mg ASA-Behandlung bei fast vollständig gehemmter Sekretion und Thromboxansynthese besonders ausgeprägt. Ein von der Thromboxansynthese und Sekretionsreaktion unabhängiger Mechanismus könnte also zusätzlich an der chronischen Hyporeaktivität beteiligt sein.
- 3.) Es kann nicht von einer stärkeren ASA-Wirksamkeit bei Rauchern *in vivo* ausgegangen werden. Die bei Rauchern beobachtete *in-vitro*-Hyporeaktivität auch nach ASA-Behandlung könnte auf eine Aktivierung der Thrombozyten *in vivo* trotz ASA-Behandlung zurückzuführen sein. Eine ASA-Behandlung bei Rauchern war nicht geeignet, die gestörte Thrombozytenfunktion zu normalisieren. Nur der Verzicht auf Tabakkonsum kann vor den fatalen Schädigungen des Gefäßsystems schützen.

4.3 Wirkungen von 40 mg und 100 mg Acetylsalicylsäure

4.3.1 Ergebnisübersicht

Ausgehend von der Forderung einer Dosisreduktion auf 30 mg ASA täglich zur Prophylaxe ischämischer Ereignisse bei koronarer Herzkrankheit und auf dem Hintergrund mangelnder Compliance als Grundproblem jeder Pharmakotherapie soll hier folgende Fragestellung untersucht werden:

Wie wirksam sind eine 40 mg ASA-Behandlung und eine 100 mg ASA-Behandlung in einem Non-Compliance-Modell?

In dem hier vorgestellten Non-Compliance-Modell war nach beiden ASA-Behandlungen keine ausreichende Hemmung der Thrombozytenfunktion zu beobachten. Das Rekrutment erwies sich als besonders sensitiv im Vergleich zur ADP- und Kollagenaggregation. Die 100 mg ASA-Behandlung war der 40 mg ASA-Behandlung überlegen. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse ist in **Tab. 9** zu sehen.

	40 mg ASA vs. Kontrolle		100 mg ASA vs. Kontrolle		100 mg ASA vs. 40 mg ASA	
	NR	R	NR	R	NR	R
Kollagenaggregation	++	++	++	++	++	++
Kollagen-induzierte TXA ₂ -Synthese	-70%	-65%	-90%	-95%	++	++
ADP-Aggregation	++	++	++	++	n.s.	+
ADP-induzierte TXA ₂ -Synthese	-82%	-88%	-99%	-99%	++	++
Aggregation beim Rekrutment	++	++	++	++	+	++
TXA ₂ -Synthese beim Rekrutment	-59%	-49%	-90%	-92%	++	++
Urin-TX-M-Ausscheidung	+	+	++	++	+	n.s.
Urin-PGI-M-Ausscheidung	n.s.	n.s.	+	n.s.	n.s.	n.s.

Tabelle 9: Auswirkungen einer ASA-Behandlung (40 mg bzw. 100 mg) auf die Parameter der Thrombozytenfunktion im Vergleich zu unbehandelten (Kontrolle) Nichtrauchern (NR) und Rauchern (R). Signifikante (++) oder tendenzielle (+) Hemmung der Thrombozytenfunktion bei Nichtrauchern und Rauchern nach 40 mg bzw. 100 mg ASA-Behandlung im Vergleich zur Kontrolle. Signifikante (++) oder tendenzielle (+) Überlegenheit der 100 mg ASA-Behandlung gegenüber der 40 mg ASA-Behandlung. TXA₂-Synthese: Hemmung in % im Vergleich zur Kontrolle bei der höchsten Agonistenkonzentration, die TXA₂-Synthese war nach ASA-Behandlung in allen Experimenten signifikant gehemmt. (n.s.= nicht signifikant)

Bevor die Ergebnisse diskutiert werden, soll kurz auf die Bedeutung von ASA in der Primär- und Sekundärprophylaxe bei koronarer Herzkrankheit eingegangen werden. Dabei ist in den letzten Jahren die tägliche ASA-Dosierung immer weiter reduziert worden. 100 mg ASA täglich gelten heute als effektiv.

4.3.2 Bedeutung von ASA für die Prophylaxe ischämischer Koronarsyndrome

Acetylsalicylsäure wird zur Sekundärprophylaxe von thrombembolischen Komplikationen bei Atherosklerose eingesetzt. Zur Primärprophylaxe kardiovaskulärer Ereignisse ist ASA aufgrund des ungünstigen Nutzen/Risikoverhältnisses nicht indiziert. Diskutiert wird die Primärprophylaxe für asymptomatische Patienten mit Risikofaktoren, wobei eine strenge Indikationsstellung und Therapieüberwachung erforderlich ist.

Primärprophylaxe der koronaren Herzkrankheit:

Zur Primärprophylaxe des Myokardinfarktes gibt es zwei Studien, die an **männlichen Ärzten** durchgeführt wurden und daher möglicherweise nicht auf die Gesamtbevölkerung zu übertragen sind. Noch dazu sind die Ergebnisse inkonsistent. Bei der amerikanischen Ärztstudie (Steering committee of the physicians' health study research group, 1989) konnte eine Senkung der Inzidenz nicht-letaler und letaler Myokardinfarkte um 44 % nach fünf Jahren im Vergleich zu Plazebo beobachtet werden. Es wurden 325 mg ASA jeden zweiten Tag eingenommen. Bei gleicher Mortalität in der ASA-Gruppe und der Plazebogruppe war in dieser Studie die kardiovaskuläre Mortalität nur 15 % einer Vergleichspopulation mit ähnlicher Altersstruktur. Das Verhältnis tödlicher zu nicht-tödlichen Herzinfarkten, welches in der Normalbevölkerung etwa eins zu drei beträgt (Fuster, 1994) lag in der amerikanischen Ärztstudie bei etwa eins zu zehn. Dies unterstreicht die Zweifel an der Übertragbarkeit der Ergebnisse auf die Gesamtbevölkerung, die amerikanische Ärztstudie wurde offensichtlich an einer besonders herzgesunden Population durchgeführt.

Bei der britischen Ärztstudie (Peto et al., 1988), die nicht plazebokontrolliert war, konnte bei einer täglichen ASA-Dosierung von 500 mg keine signifikante Senkung der Infarktinzidenz beobachtet werden.

Wenn man die Daten beider Studien zusammennimmt (Hennekens et al., 1989) ergibt sich eine signifikante Reduktion der Inzidenz nicht-letaler Myokardinfarkte um 32 %. Aufgrund schwerwiegender Komplikationen einer regelmäßigen ASA-Einnahme wie z. B. der negativen Wirkung auf die **Inzidenz von hämorrhagischen Schlaganfällen** (Hennekens et al., 1989) ist allerdings eine individuelle **Nutzen-Risiko-Abwägung** bei jeder regelmäßigen prophylaktischen ASA-Einnahme erforderlich (Schrör, 1992; Willard et al., 1992).

Auch wenn die Ergebnisse der Ärztestudien mit Vorbehalt betrachtet werden müssen, scheint sich der Sinn einer Primärprophylaxe mit ASA zu bestätigen. In einer neueren plazebokontrollierten Studie zur Primärprophylaxe kardiovaskulärer Komplikationen mit Warfarin und/oder Aspirin bei 5499 **Hochrisikopatienten** (The medical research council's general practice research framework, 1998) wurden 1268 Männer über einen durchschnittlichen Zeitraum von 6,8 Jahren mit 75 mg ASA täglich behandelt. Er zeigte sich eine Risikoreduktion im Vergleich zu Plazebo um 36 % für den nicht-letalen Herzinfarkt ohne Wirkung auf die Inzidenz tödlicher Herzinfarkte.

In der Primärprophylaxe bei **älteren Patienten** ohne Risikofaktoren bestehen Bedenken, ob der Schäden durch Blutungskomplikationen nicht größer sein könnte als der Nutzen durch die Verhinderung ischämischer Ereignisse. In einer plazebokontrollierten Studie an 400 über 70-jährigen Patienten, die keine kardiovaskuläre Erkrankung in der Anamnese hatten, wurde eine einjährige Therapie mit 100 mg ASA (magensaftresistent) durchgeführt (Silagy et al., 1993). Weder in der Plazebo- noch in der ASA-Gruppe wurde ein Herzinfarkt oder ein Schlaganfall beobachtet. In der ASA-Gruppe wurden 6 gastrointestinale Blutungsereignisse beobachtet (in einem Fall war eine Krankenhausbehandlung notwendig) im Vergleich zu keinem Ereignis in der Plazebogruppe. Extrapoliert auf 1000 Patientenjahre ergäbe sich, so die Autoren weiter, eine Blutungsrate von 30/1000 Patientenjahre, während in der Primärprophylaxe bei über 70-jährigen Patienten mit einer Rate von ischämischen kardiovaskulären Ereignissen von 9/1000 zu rechnen ist. Weitere Studien an älteren Patienten wären notwendig um den Nutzen einer Primärprophylaxe mit ASA in dieser Altersgruppe beurteilen zu können. Die Autoren weisen in dem Zusammenhang darauf hin, dass die amerikanische Ärztestudie zur Primärprophylaxe an vergleichsweise jungen Männern mit besonders niedrigem kardiovaskulären Risiko durchgeführt wurde.

Insgesamt muss der Nutzen von ASA in der Primärprophylaxe durch weitere Studien noch besser belegt werden, aber auch bei der Primärprophylaxe zeigt sich eine Wirksamkeit von 75 mg ASA täglich.

Sekundärprophylaxe der koronaren Herzkrankheit:

In der Sekundärprophylaxe bei chronisch-ischämischer Herzkrankheit hat sich ASA bei der stabilen und instabilen Angina pectoris, bei der Verhütung des Reinfarktes und bei der Behandlung des akuten Myokardinfarktes bewährt.

Bei 333 Männern mit **stabiler Angina pectoris** liess sich das Risiko eines ersten Myokardinfarktes um bis zu 87 % senken (Ridker et al., 1991), ohne die Ausprägung und Häufigkeit pektanginöser Beschwerden zu beeinflussen. Auch die Mortalität in der ASA-Therapiegruppe war nicht geringer als in der Plazebogruppe. Untersucht wurde eine Subgruppe in der amerikanischen Ärztstudie, es wurden jeden zweiten Tag 325 mg ASA über einen Zeitraum von 60,2 Monaten eingenommen. Es sei in diesem Zusammenhang noch einmal darauf hingewiesen, dass diese Studie nicht repräsentativ für ein Normalkollektiv ist.

In einer Studie mit 2035 Patienten mit stabiler Angina pectoris fand sich mit 75 mg ASA täglich über einen Zeitraum von 50 Monaten eine Risikoreduktion für den nicht-tödlichen Herzinfarkt um 39 % (Juul-Möller, 1992). Diese Studie ist sicher repräsentativer als die Subgruppenanalyse der amerikanischen Ärztstudie und zeigt, dass 75 mg ASA täglich zur Herzinfarktprophylaxe bei stabiler Angina pectoris ausreichend sind.

Bei **instabiler Angina pectoris** lässt sich die Sterblichkeit und das Infarktisiko zwischen 50 und 70 % senken. Die erste Studie zu diesem Krankheitsbild war die Veterans Administration Trial (Lewis et al., 1983). Mit 324 mg ASA/Tag für drei Monate zeigte sich eine Senkung der Infarktinzidenz und der Mortalität um jeweils 51 % im Vergleich zu Plazebo. Die Senkung der Mortalität war allerdings nicht signifikant (21 Todesfälle Plazebo, 10 Todesfälle ASA).

Theroux et al. (1988) verglichen in einer plazebokontrollierten Studie die Wirksamkeit von intravenös verabreichtem Heparin, ASA 325 mg 2 x täglich und einer Kombination

aus beiden in der Akutbehandlung der instabilen Angina pectoris (Therapiedauer 6 ± 3 Tage). Es zeigte sich eine Senkung der Infarktinzidenz um 71 %.

In der RISC-Studie (RISC group, 1990) wurde mit 75 mg ASA täglich nach drei Monaten Therapiedauer eine Senkung der Infarktinzidenz und der Mortalität um 64 % gezeigt. 75 mg ASA täglich sind also genauso wirksam wie höhere Dosierungen.

Bei 17187 Patienten mit **akutem Myokardinfarkt** wurde der Einfluss einer 30-tägigen Therapie mit 160 mg ASA (enteric coated) auf eine Lysetherapie mit Streptokinase untersucht. ASA zusätzlich zu einer Plazebo- oder Streptokinaseinfusion bewirkte eine Reduktion vaskulär bedingter Todesfälle um 23 % im Vergleich zu Plazebetabletten plus Plazebo- oder Streptokinaseinfusion (ISIS-2, 1988). Die Inzidenz nicht-letaler Herzinfarkte wurde um 49 % gesenkt.

Bei einer Metaanalyse von 145 Studien zur Wirksamkeit von ASA zur Sekundärprophylaxe ischämischer Ereignisse (Antiplatelet trialists' collaboration, 1994) kommen die Autoren zu dem Ergebnis, dass 75-325 mg täglich wirksam sind und höhere Dosierungen keinen Vorteil bieten.

4.3.3 Wirkungen von 40 mg und 100 mg ASA im Non-Compliance-Modell

In der Sekundärprophylaxe thrombembolischer Erkrankungen ist eine Dosis von 75-325 mg täglich wirksam (Antiplatelet trialists' collaboration, 1994). Auch bei der Primärprävention scheint eine Dosierung von 75 mg täglich ausreichend zu sein. Eine weitere Dosisreduktion auf 30 mg ASA täglich (Förster, 1995) wird zur Reduzierung von Nebenwirkungen zur Verbesserung der Patientencompliance (**Abschnitt 1.5**) gefordert.

Als Maß für eine effektive Antiplättchentherapie wird die **95 % ige Reduktion der Serum-Thromboxankonzentration** gefordert (Reilly und FitzGerald, 1987). Bereits ASA-Dosierungen von 20-40 mg pro Tag reduzieren bei chronischer Einnahme die Plättchentromboxanbildung beim gesunden Probanden im Serum um 95 % (Patrono et al., 1985; Kallmann et al., 1987).

Aussagekraft der Aggregationsmodelle für die Einschätzung der ASA-Wirkung:

In der vorliegenden Arbeit wurde die Thrombozytenfunktion mittels dreier Aggregationsmodelle untersucht. Das plättchenreiche Plasma (PRP) wurde mit Citrat antikoaguliert, so dass die Ca^{++} -Konzentration unphysiologisch niedrig ist. Die ADP-Aggregation ist bei physiologischer Ca^{++} -Konzentration thromboxanunabhängig und lässt sich nicht durch ASA hemmen (Bretschneider et al., 1994). Die Kollagenaggregation ist auch bei physiologischer Ca^{++} -Konzentration thromboxanabhängig und eignet sich daher in vitro besser für die Einschätzung der Wirksamkeit einer ASA-Behandlung. Beim Rekrutment wird die thrombozytenaktivierende Wirkung einer Kollagen-stimulierten Thrombozyten-Erythrozyten-Suspension untersucht. Auch dieses Modell ist daher aussagekräftiger als die ADP-Aggregation und möglicherweise auch aussagekräftiger als die Kollagenaggregation, da es den fördernden Einfluss der Erythrozyten auf ASA-behandelte Thrombozyten miteinbezieht (Valles et al., 1991).

40 mg ASA vs. Kontrolle:

In der hier vorliegenden Untersuchung war im Non-Compliance-Modell nach der 40 mg ASA-Behandlung in keinem der drei Aggregationsmodelle (Kollagenaggregation, ADP-Aggregation und Rekrutment) die Thromboxansynthese um mehr als 95 % gehemmt. Lediglich bei der ADP-Aggregation betrug die Hemmung zwischen 80 und 90 %. Die Thromboxansynthese beim Rekrutment war nur zwischen 50 % und 60 % gehemmt. Die Ausscheidung von Thromboxanmetaboliten im Urin war nur tendenziell vermindert.

100 mg ASA vs. Kontrolle:

Nach der 100 mg ASA-Behandlung war nur bei der ADP-Aggregation eine ausreichende Hemmung der Thromboxansynthese bei Nichtrauchern und Rauchern erreicht. Beim Rekrutment zeigte sich eine Hemmung zwischen 90 und 92 %. Auch nach der 100 mg Behandlung war somit keine ausreichende Hemmung der Thrombozytenfunktion zu beobachten. Es zeigte sich im Gegensatz zur 40 mg Behandlung allerdings eine signifikante Verminderung der Ausscheidung von Thromboxanmetaboliten im Vergleich zu unbehandelten Probanden.

100 mg ASA vs. 40 mg ASA:

In Bezug auf die Hemmung der Thromboxansynthese war im Non-Compliance-Modell die 100 mg Behandlung der 40 mg Behandlung überlegen. In allen drei Aggregationsmodellen war auch die Aggregation nach der 100 mg Behandlung stärker gehemmt. Dem Ziel einer Hemmung der Thromboxanbildung um 95 % kam die 100 mg ASA-Behandlung deutlich näher. Während beim Rekrutment die Hemmung nach der 40 mg ASA-Behandlung nur zwischen 50 % und 60 % lag, erreichte sie nach 100 mg ASA mehr als 90 %.

4.3.4 Schlussfolgerungen

- 1.) Die Untersuchung der Wirksamkeit einer ASA-Behandlung durch in vitro-Messungen kann je nach Methode zu einer Überschätzung der ASA-Wirkung führen. Das Erythrozytenrekrutment war in dieser Arbeit bei der Quantifizierung der Hemmung der Thromboxansynthese eine wichtige Ergänzung und möglicherweise sensitiver als die gängigen Methoden der Kollagen- und ADP-Aggregation.
- 2.) Im Non-Compliance-Modell war mit 40 mg ASA jeden zweiten Tag für zwei Wochen beim gesunden, jungen Probanden keine effektive Plättchenhemmung mehr möglich.
- 3.) Die 100 mg ASA-Behandlung war der 40 mg ASA-Behandlung im Non-Compliance-Modell überlegen. Es konnte allerdings in einer zweiwöchigen Behandlung auch mit 100 mg ASA keine ausreichende Hemmung der Thrombozytenfunktion erreicht werden.

5 ZUSAMMENFASSUNG DER ARBEIT

- (1) In der vorliegenden Arbeit wurde die Thrombozytenfunktion von **Nichtrauchern und Rauchern** verglichen. Es wurden die Wirkungen von **40 mg und 100 mg ASA** in einem **Non-Compliance-Modell** untersucht. An der Untersuchung nahmen 10 gesunde männliche Nichtraucher im Durchschnittsalter von 28 Jahren sowie 10 gesunde männliche Raucher im Durchschnittsalter von 25 Jahren teil. Die Raucher rauchten durchschnittlich 15 Zigaretten pro Tag. Es wurde die Wirkung einer 40 mg ASA-Behandlung (Aspirin[®], Bayer, Leverkusen) mit der Wirkung einer 100 mg ASA-Behandlung (Aspirin[®], Bayer, Leverkusen) verglichen. Die Behandlung mit einer Dosierung dauerte zwei Wochen. Nach einer zweiwöchigen Auswaschphase folgte eine weitere zweiwöchige Behandlungsphase mit der jeweils anderen ASA-Dosierung. In den Behandlungsphasen wurde jeden zweiten Tag eine Tablette ASA eingenommen (insgesamt sieben Tabletten einer Dosierung).

- (2) Es wurden folgenden **Bestimmungen** durchgeführt:
Kollagen- und ADP-induzierte Aggregation und Aggregation beim Rekrutment, Thromboxansynthese im PRP und im Generatorsystem. ATP-Sekretion bei der ADP-Aggregation und im Generatorsystem (Daten nicht gezeigt). Hemmung von Aggregation und Thromboxansynthese durch 40 mg ASA und 100 mg ASA.
Ausscheidung von Thromboxan- und Prostazyklinmetaboliten im Urin.
Thrombozytenzahlen im PRP und EDTA-Blut, Kleines Blutbild, Serumchemie.

- (3) Bei den Thrombozyten von **Rauchern im Vergleich zu Nichtrauchern** zeigte sich in der Kontrolle und nach beiden ASA-Behandlungen in vitro eine Hyporeaktivität bei Hinweisen auf eine in-vivo-Hyperreaktivität. Diese in-vitro-Hyporeaktivität war nach 100 mg ASA besonders ausgeprägt.
In der Kontrolle war bei den Rauchern bei der Kollagenaggregation, bei der ADP-Aggregation und beim Rekrutment die Thromboxansynthese geringer als bei den Nichtrauchern. Bei der ADP-Aggregation kam es bei den Rauchern zu weniger irreversiblen Sekundäraggregationen. Die Urin-TX-M-Ausscheidung war bei den Rauchern erhöht.

Nach der **40 mg ASA-Behandlung** waren bei den Rauchern die Kollagen-induzierte Aggregation und das Rekrutment stärker gehemmt als bei den Nichtrauchern. Die Thromboxansynthese war bei der ADP-Aggregation stärker gehemmt.

Nach der **100 mg ASA-Behandlung** war die Aggregation und die Thromboxansynthese bei den Rauchern im Vergleich zu den Nichtrauchern in allen drei Aggregationsmodellen stärker gehemmt. Die Hyporeaktivität der Thrombozyten der Raucher war nach 100 mg ASA bei fast vollständig gehemmter Sekretion und Thromboxansynthese besonders ausgeprägt.

- (4) Im **Vergleich zur Kontrolle waren nach der 40 mg ASA-Behandlung** bei Nichtrauchern und Rauchern die Kollagenaggregation, die ADP-Aggregation und das Rekrutment gehemmt. In allen drei Versuchsansätzen war die Thromboxansynthese nicht ausreichend gehemmt. Die Ausscheidung von Urin-TX-M bei Nichtrauchern und Rauchern war im Vergleich zur Kontrolle vermindert. Die Ausscheidung von PGI-M war nicht vermindert.
- (5) **Die 100 mg ASA-Behandlung war der 40 mg ASA-Behandlung überlegen.** Im Vergleich zu 40 mg ASA waren nach 100 mg ASA bei Nichtrauchern und Rauchern die Kollagenaggregation und das Rekrutment stärker gehemmt. Die ADP-Aggregation war nur bei den Rauchern stärker gehemmt. Die Thromboxansynthese war bei Nichtrauchern und Rauchern in allen drei Versuchsansätzen stärker gehemmt als nach der 40 mg ASA-Behandlung. Bei der Kollagenaggregation bei Nichtrauchern und beim Rekrutment bei Nichtrauchern und Rauchern war die Hemmung der Thromboxansynthese geringer als 95 %. Bei den Nichtrauchern war die Urin-TX-M-Ausscheidung im Vergleich zur 40 mg ASA-Behandlung vermindert. Bei den Nichtrauchern war die PGI-M-Ausscheidung nach der 100 mg ASA-Behandlung im Vergleich zur Kontrolle vermindert.
- (6) Bei den im **EDTA-Blut und im Serum bestimmten Parametern** waren zwischen Nichtrauchern und Rauchern vor und nach der Studie keine Unterschiede festzustellen. Beide ASA-Dosierungen wurden gut vertragen. Es wurden alle Tabletten eingenommen. Alle Probanden führten die Studie zu Ende. Bei den Rauchern waren die Thrombozytenzahlen im PRP nach der 40 mg ASA-

Behandlung geringer im Vergleich zur Kontrolle, zur 100 mg Behandlung und im Vergleich zu den Nichtrauchern.

- (7) **Schlussfolgerungen:** Die Befunde zeigen, dass die Thrombozyten von Rauchern *in vitro* eine Hyporeaktivität aufweisen, die *in vivo* mit einer Hyperreaktivität einhergeht. Diese Hyporeaktivität war nach der 40 mg ASA-Behandlung verstärkt. Nach der 100 mg ASA-Behandlung war sie bei nahezu vollständiger Hemmung von Thromboxansynthese und Sekretionsreaktion besonders ausgeprägt. Ein von der Thromboxansynthese unabhängiger, nicht durch ASA beeinflussbarer Mechanismus könnte an der Hyporeaktivität beteiligt sein.

In dem hier vorgestellten Non-Compliance-Modell war nach beiden ASA-Behandlungen keine ausreichende Hemmung der Thrombozytenfunktion zu beobachten. Das Rekrutment erwies sich als besonders sensitiv im Vergleich zur ADP- und Kollagenaggregation. Die 100 mg ASA-Behandlung war der 40 mg ASA-Behandlung überlegen.

6 LITERATUR

1. Antiplatelet Trialists' Collaboration. Collaborative overview of randomised trials of antiplatelet therapy- 1: prevention of death, myocardial infarction, and stroke by prolonged antiplatelet therapy in various categories of patients. *Brit Med J* 1994; 308:81-106.
2. Ashby B, Colman RW, Daniel JL, Kunapuli SP, Smith JB. Platelet stimulatory and inhibitory receptors. *Aus: Hemostasis and Thrombosis*, Lippincott Williams & Wilkins 2001.
3. Aviram M, Brook JG. Platelet activation by plasma proteins. *Progr Cardiovasc Dis* 1987; 30:61-76.
4. Barbash G, Reiner J, White HD, Wilcox RG, Armstrong PW, Sadowsky Z, Morris D, Aylward P, Woodlief LH, Topol EJ, Califf RM, Ross AM, for the GUSTO-I Investigators. Evaluation of paradoxical beneficial effects of smoking in patients receiving thrombolytic therapy for acute myocardial infarction: mechanism of the „smokers paradox“ from the GUSTO-I trial, with angiographic insights. *J Am Coll Cardiol* 1995; 26:1222-1229.
5. Bath PMW, Martin JF. Serum platelet-derived factor and endothelin concentrations in human hypercholesterolemia. *J Intern Med* 1991; 230:313-317.
6. Benedek IH, Joshy AS, Pieniaszek HJ, King S-YP, Kornhauser DM. Variability in the pharmacokinetics and pharmacodynamics of low dose aspirin in healthy male volunteers. *J Clin Pharmacol* 1995; 35:1181-1186.
7. Benowitz NL, FitzGerald GA, Wilson M, Zhang Q. Nicotine effects on eicosanoid formation and hemostatic function: comparison of transdermal nicotine and cigarette smoking. *J Am Coll Cardiol* 1993; 22:1159-67.
8. Bergmortel FWPJ, Smilde TJ, Wollersheim H, van Langen H, de Boo T, Thien T. Intima-media thickness of peripheral arteries in asymptomatic cigarette smokers. *Atherosclerosis* 2000; 150:397-401.
9. Berliner JA, Navab M, Fogelman AM, Frank JS, Demer LL, Edwards PA, Watson AD, Lusis AJ. Atherosclerosis: basic mechanisms- oxidation, inflammation, and genetics. *Circulation* 1995; 91:2488-2496.
10. Blache D. Involvement of hydrogen and lipid peroxides in acute tobacco smoking-induced platelet hyperactivity. *Am J Physiol* 1995; 268:679-685.
11. Bondjers G, Glukhova M, Hansson G, Postnov YV, Reidy MA, Schwartz SM. Hypertension and atherosclerosis- cause and effect, or two effects with one unknown cause? *Circulation* 1991; 84 (suppl VI):2-16.
12. Born GVR. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature* 1962; 332:927-929.

13. Born GVR. Effects of aspirin and warfarin on fatal and non-fatal heart attacks. *Lancet* 1999; 354:1472.
14. Braun M, Kramann J, Strobach H, Schrör K. Incomplete inhibition of platelet secretion by low-dose aspirin. *Platelets* 1994; 5:325-331.
15. Bretschneider E, Glusa E, Schrör K. ADP-, PAF- and adrenaline-induced platelet aggregation and thromboxane formation are not affected by a thromboxane receptor antagonist at physiological Ca^{++} concentration. *Thromb Res* 1994; 75:233-242.
16. Chant C, Fagan SC, Aurora SK, Gidal BE, Joseph R. Effects of aspirin on platelet aggregation in smokers and nonsmokers. *Ann Pharmacother* 1997; 31:290-293.
17. Carney RM, Freedland KE, Eisen SA, Rich MW, Jaffe AS. Major depression and medication adherence in elderly patients with coronary artery disease. *Health Psychol* 1995; 14:88-90.
18. Castelli WP. The new pathophysiology of coronary artery disease. *Am J Cardiol* 1998; 82:60T-65T.
19. Chiabrando C, Rivoltella L, Martelli L, Valzacchi S, Fanelli R. Urinary excretion of thromboxane and prostacyclin metabolites during chronic low-dose aspirin: evidence for an extrarenal origin of urinary thromboxane B_2 and 6-keto-prostaglandin $F_{1\alpha}$ in healthy subjects. *Biochim Biophys Acta* 1992; 1133:247-254.
20. Clarke J, Mayo G, Price P, FitzGerald GA. Suppression of thromboxane A_2 but not of systemic prostacyclin by controlled release aspirin. *N Engl J Med* 1991; 325:1137-1141.
21. Colman RW. Mechanisms of platelet aggregation. *Aus: Hemostasis and Thrombosis: basic principles and clinical practice, Third Edition*. Lippincott Company, Philadelphia, 1994.
22. Di Minno G, Silver MJ, Murphy S. Monitoring the entry of new platelets into the circulation after ingestion of aspirin. *Blood* 1983; 61:1081-1085.
23. Dutch TIA Trial Study Group. A comparison of two doses of aspirin (30 mg vs 283 mg a day) in patients after a transient ischemic attack or minor ischemic stroke. *N Engl J Med* 1991; 325:1261-1266.
24. Erlinge D, You J, Wahlested C, Edvinsson L. Characterisation of an ATP receptor mediating mitogenesis in vascular smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol* 1995; 289:135-149.
25. Ernst E, Hammerschmidt DE, Bagge U, Matrai A, Dormandy JA. Leucocytes and the risk of ischemic heart diseases. *JAMA* 1987; 257:2318-2324.
26. Farstad M. The role of blood platelets in coronary atherosclerosis and thrombosis. *Scand J Clin Lab Invest* 1998; 58:1-10.

27. Feng AN, Chen YL, Chen YT, Ding YZ, Lin SJ. Red wine inhibits monocyte chemotactic protein-1 expression and modestly reduces neointimal hyperplasia after balloon injury in cholesterol-fed rabbits. *Circulation* 1999; 100:2254-2259.
28. FitzGerald GA, Moran N. Molecular mechanisms of platelet activation and inhibition. Aus: Hemostasis and Thrombosis, Lippincott Williams & Wilkins 2001.
29. FitzGerald GA, Oates JA, Nowak J. Cigarette smoking and hemostatic function. *Am Heart J* 1988; 115:267-27.
30. Förster W. Reinfarktprophylaxe mit 100 mg oder 30 mg ASS täglich? *Z Kardiol* 1995; 84:335-343.
31. Foo LC, Roshidah I, Aimy MB. Platelets of habitual smokers have reduced susceptibility to aggregating agent. *Thromb Haemost* 1991; 65:317-319.
32. Force T, Milani R, Hibbert P, Lorenz R, Uedelhoven W, Leaf A, Weber P. Aspirin-induced decline in prostacyclin in patients with coronary artery disease is due to decreased endoperoxide shift. *Circulation* 1991; 84:2286-2293.
33. Fuster V. Mechanisms leading to myocardial infarction: insights from studies of vascular biology. *Circulation* 1994; 90:2126-2146.
34. Gawaz M, Brand K, Dickfeld T, Pogatsa-Murray G, Page S, Bogner C, Koch W, Schömig A, Neumann FJ. Platelets induce alterations of chemotactic and adhesive properties of endothelial cells mediated through an interleukin-1-dependent mechanism. Implications for atherogenesis. *Atherosclerosis* 2000; 148:75-85.
35. Glynn RJ, Buring JE, Manson JE, LaMotte F, Hennekens CH. The physicians' health study, adherence to aspirin in the prevention of myocardial infarction. *Arch Intern Med* 1994; 154:2649-2657.
36. Gorog P, Kovacs IB. Lipid peroxidation by activated platelets: a possible link between thrombosis and atherogenesis. *Atherosclerosis* 1995; 115:121-128.
37. Hennekens CH, Buring JE, Sandercock P, Collins R, Peto R. Aspirin and other antiplatelet agents in the secondary and primary prevention of cardiovascular disease. *Circulation* 1989; 80:749-756.
38. Hollopeter G, Jantzen HM, Vincent D, Li G, England L, Ramakrishnan V, Yang RB, Nurden P, Nurden A, Julius D, Conley PB. Identification of the platelet ADP receptor targeted by antithrombotic drugs. *Nature* 2001; 409:202-207.
39. Holm S. A simple sequentially rejective multiple test procedure, *Scandin J Statist* 1979; 6:65-70.
40. Holmsen H. Determination of ATP and ADP in blood platelets: A modification of the firefly luciferase assay for plasma. *Anal Biochem* 1972; 46:489-501.

41. Holmsen H. Platelet secretion and energy metabolism. Aus: Hemostasis and Thrombosis: basic principles and clinical practice, Third Edition. Lippincott Company, Philadelphia, 1994.
42. Howard G, Wagenknecht LE, Burke GL, Diez-Roux A, Evans GW, McGovern P, Nieto J, Tell GS for the ARIC Investigators. Cigarette smoking and progression of atherosclerosis. JAMA 1998; 279:119-124.
43. Hung J, Lam JYT, Lacoste L, Letchacovski G. Cigarette smoking acutely increases platelet thrombus formation in patients with coronary artery disease taking aspirin. Circulation 1995; 92:2432-2436.
44. ISIS-2 collaborative group. Randomised trial of intravenous streptokinase, oral aspirin, both, or neither among 17187 cases of suspected acute myocardial infarction: ISIS-2. Lancet 1988; 2:349-360.
45. Iso H, Hennekens CH, Stampfer MJ, Rexrode KM, Colditz GA, Speizer FE, Willett WC, Manson JE. Prospective study of aspirin use and risk of stroke in women. Stroke 1999; 30:1764-1771.
46. Jaffe EA, Weksler BB. Recovery of endothelial cell prostacyclin production after inhibition by low doses of aspirin. J Clin Invest 1979; 63:532-535.
47. Juul-Möller S, Edvardsson N, Jahnmatz B, Rosen A, Sorensen S, Ömblus R, for the Swedish Angina Pectoris Aspirin Trial (SAPAT) Group. Double-blind trial of aspirin in primary prevention of myocardial infarction in patients with stable chronic angina pectoris. Lancet 1992; 340:1421-1425.
48. Kallmann R, Nieuwenhuis HK, de Groot PG, van Gijn J, Sixma JJ. Effects of low doses of aspirin, 10 mg and 30 mg daily, on bleeding time, thromboxane production and 6-keto-PGF_{1α} excretion in healthy subjects. Thromb Res 1987; 45:355-361.
49. Kaufmann PA, Gneccchi-Ruscione T, di Terlizzi M, Schäfers KP, Lüscher TF, Camici PG. Coronary heart disease in smokers. Vitamin C restores coronary microcirculatory function. Circulation 2000; 102:1233-1238.
50. Knapp HR, Healy C, Lawson J, FitzGerald GA. Effects of low-dose aspirin on eicosanoid formation in normal and atherosclerotic men. Thromb Res 1988; 50:377-386.
51. Larsson PT, Hjemdahl P, Olsson G, Angelin B, Hornstra G. Platelet aggregability in humans: contrasting in vivo and in vitro findings during sympatho-adrenal activation and relationship to serum lipids. Eur J Clin Invest 1990; 20:398-405.
52. Leschke M, Schoebel FC, Stiegler H, Fischer Y, Schannwell CM, Strauer BE. Antithrombotische Therapie bei chronischen Koronarsyndromen- Stellenwert der Thrombozytenaggregationshemmung, Antikoagulation und chronischen Thrombolysen. Z Kardiol 1998; 87 (suppl 2):145-151.

53. Lewis HD Jr, Davis JW, Archibald DG, Steinke WE, Smitherman TC, Doherty JE, Schnaper JW, LeWinter NM, Linares E, Pouget JM, Sabharwal SC, Chesler E, DeMots H. Protective effects of aspirin against acute myocardial infarction and death in men with unstable angina: results of a veterans administration cooperative study. *N Engl J Med* 1983; 309:396-403.
54. Libby P. The molecular bases of the acute coronary syndromes. *Circulation* 1995; 91:2844-2850.
55. Lorenz RL, Boehling B, Uedelhoven WM, Weber PC. Superior antiplatelet action of alternate day pulsed dosing versus split dose administration of aspirin. *Am J Cardiol* 1989; 64:1185-1188.
56. McGill HC. The cardiovascular pathology of smoking. *Am Heart J* 1988; 115:250-257.
57. McGill HC, McMahan CA. Determinations of atherosclerosis in the young. *Am J Cardiol* 1998; 82 (suppl):30T-36T.
58. The medical research council's general practice research framework. Thrombosis prevention trial: randomised trial of low-intensity oral anticoagulation with warfarin and low-dose aspirin in the primary prevention of ischemic heart disease in men at increased risk. *Lancet* 1998; 351:233-241.
59. Monane M, Bohn RL, Gurwitz JH, Glynn RJ, Avorn J. Noncompliance with congestive heart failure therapy in the elderly. *Arch Intern Med* 1994; 154:433-437.
60. Müller P, Dammann H-G, Marinis E, Simon B. Gastroduodenale Verträglichkeit von 30 mg versus 300 mg Acetylsalicylsäure täglich. *Med Klin* 1990; 7:429-431.
61. Muck S, Weber A-A, Schrör K. Effects of terbufel on platelet function and prostaglandin endoperoxide transfer. *Eur J Pharmacol* 1998; 344:45-48.
62. Nowak J, Murray JJ, Oates JA, FitzGerald GA. Biochemical evidence of a chronic abnormality in platelet and vascular function in healthy individuals who smoke cigarettes. *Circulation* 1987; 76:6-14.
63. Pakala R, Willerson JT, Benedict CR. Effects of serotonin, thromboxane A₂, and specific receptor antagonists on vascular smooth muscle cell proliferation. *Circulation* 1997; 96:2280-2286.
64. Patrignani P, Filabozzi P, Patrono C. Selective cumulative inhibition of platelet thromboxane production by low-dose aspirin in healthy subjects. *J Clin Invest* 1982; 69:1366-1372.
65. Patrono C, Ciabattoni G, Patrignani P. Clinical pharmacology of platelet cyclooxygenase inhibition. *Circulation* 1985; 72:1177-1184.
66. Patrono C. Aspirin and human platelets: from clinical trials to acetylation of cyclooxygenase and back. *TIPS* 1989; 10:453-458.

67. Paul BZS, Jin J, Kunapuli SP. Molecular mechanism of thromboxane A₂-induced platelet aggregation. Essential role for P2T_{AC} and α_{2A} receptors. *J Biol Chem* 1999; 274:29108-29114.
68. Pech-Amsellen MA, Myara I, Storogenko M, Demuth K, Proust A, Moatti N. Enhanced modifications of low-density lipoproteins (LDL) by endothelial cells from smokers: a possible mechanism of smoking-related atherosclerosis. *Cardiovasc Res* 1996; 31:975-983.
69. Perez-Requejo JL, Aznar J, Santos MT, Valles J. Early platelet-collagen interactions in whole blood and their modifications by aspirin and dipyramidole evaluated by a new method (Basic Wave). *Thromb Haemostas* 1985; 54:799-803.
70. Peto R, Gray R, Collins R, Wheatley K, Hennekens C, Jamrozik K, Warlow C, Hafner B, Thompson E, Norton S, Gilliland J, Doll R. A randomised trial of prophylactic daily aspirin in british male doctors. *Br Med J* 1988; 296:313-316.
71. Rajagopalan S, McIntire LV, Hall ER, Wu KK. The stimulation of arachidonic acid metabolism in human platelets by hydrodynamic stress. *Biochim Biophys Acta* 1988; 958:108-115.
72. Ranke C, Hecker H, Creutzig A, Alexander K. Dose-dependent effect of aspirin on carotid atherosclerosis. *Circulation* 1993; 87:1873-1879.
73. Rasmanis G, Green K, Vesterquist O, Edhag O. Effects of intermittend treatment with aspirin on thromboxane and prostacyclin formation in patients with acute myocardial infarction. *Lancet* 1988; 245-247.
74. Reidy MA. Growth factors and arterial smooth muscle cell proliferation. *Ann NY Acad Sci* 1994; 714:336-230.
75. Reilly IAG, FitzGerald GA. Inhibition of thromboxane formation in vivo and ex vivo: implication for therapy with platelet inhibitory drugs. *Blood* 1987; 69:180-186.
76. Ridker PM, Manson JE, Gaziano M, Buring JE, Hennekens CH. Low-dose aspirin therapy for chronic stable angina pectoris: a randomised, placebo controlled clinical trial. *Ann Intern Med* 1991; 114:835-839.
77. RISC group. Risc of myocardial infarction and death during treatment with low-dose aspirin and intravenous heparin in men with unstable coronary artery disease. *Lancet* 1990; 336:827-830.
78. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 1993; 362:801-809.
79. Schafer AI, Crawford DD, Gimbrone A. Unidirectional transfer of prostaglandin endoperoxides between platelets and endothelial cells. *J Clin Invest* 1984; 73:1105-1112.

80. Schrör K, Seidel H. Blood-vessel wall arachidonate metabolism and its pharmacological modification in a new in vitro assay system. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1988; 337:177-182.
81. Schrör K. *Acetylsalicylsäure*. Thieme 1992.
82. Schrör K. Reinfarktprophylaxe mit 100 mg oder 30 mg ASS täglich? *Z Kardiol* 1995 (a); 84:496-498.
83. Schrör K. Antiplatelet drugs. *Drugs* 1995 (b); 1:7-28.
84. Schrör K. Prostacyclin and atherosclerosis, in: Rubanyi GM, Dzau VJ (Herausgeber), *The endothelium in clinical practice*, Marcel Dekker Inc. New York 1997.
85. Schrör K. Aspirin and platelets: The antiplatelet action of aspirin and its role in thrombosis treatment and prophylaxis. *Sem Thromb Haemost* 1997; 23:349-356.
86. Sharp DS, Benowitz NL, Bath PMW, Martin JF, Beswick AD, Elwood PC. Cigarette smoking sensitizes and desensitizes impedance-measured ADP-induced platelet aggregation in whole blood. *Thromb Haemost* 1995; 74:730-735.
87. Silagy CA, McNeil JJ, Donnan GA, Tonkin AM, Worsam B, Campion K. Adverse effects of low-dose aspirin in a healthy elderly population. *Clin Pharmacol Ther* 1993; 54:84-89.
88. Simon BC, Noll B, Maisch B. Endotheliale Dysfunktion- eine Bestandsaufnahme und Ansätze zur Therapie. *Herz* 1999; 24:62-71.
89. Smith CJ, Steichen TJ, Fischer TH. Platelet aggregation in cigarette smokers: a meta-analysis. *Inhal Toxicol* 1998; 10:765-793.
91. Steering Committee of the physicians' health study research group. Final report on the aspirin component of the ongoing physicians' health study. *N Engl J Med* 1989; 321:129-135.
92. The GUSTO Investigators. An international randomized trial comparing four thrombolytic strategies for acute myocardial infarction. *NEJM* 1993; 329:673-682.
93. Theroux P, Quimet H, MacCans J, Latour JG, Joly P, Levy G, Pelletier P, Juneau M, Stasiak J, DeGuise P, Pelletier G, Rinzler D, Waters D. Aspirin, heparin or both to treat acute unstable angina. *N Engl J Med* 1988; 319:1105-1111.
94. Topol EJ, Byzova T, Plow EF. Platelet GPIIb-IIIa blockers. *Lancet* 1999; 353:227-231.
95. Unterberg C, Meyer T, Wiegand V, Kreuzer H, Buchwald AB. Proliferative response of human and minipig smooth muscle cells after coronary angioplasty to growth factors and platelets. *Basic Res Cardiol* 1996; 91:407-417.

96. Valles J, Santos MT, Aznar J, Marcus AJ. Erythrocytes metabolically enhance collagen-induced platelet responsiveness via increased thromboxane production, adenosine diphosphate release and recruitment. *Blood* 1991; 78:154-162.
97. Valles J, Santos MT, Marcus AJ, Safier LB, Broekman MJ, Islam N, Ullman HL, Aznar J. Downregulation of human platelet reactivity by neutrophils. *J Clin Invest* 1993; 92:1357-1365.
98. Vikenes K, Farstad M, Nordrehaug JE. Serotonin is associated with coronary artery disease and cardiac events. *Circulation* 1999; 100:483-489.
99. Weber A-A, Schrör K. Review: Significance of platelet-derived growth factors for proliferation of vascular smooth muscle cells. *Platelets* 1999; 10:77-96.
100. Weber A-A, Schrör K. Pharmakologie von Ticlopidin und Clopidogrel im Vergleich zu Acetylsalicylsäure. *Internist* 1997; 38:1115-1120.
101. Weber A-A, Reimann S, Schrör K. Specific inhibition of ADP-induced platelet aggregation by clopidogrel in vitro. *Brit J Pharmacol* 1999; 126:415-420.
102. Weksler BB, Kent JL, Rudolph D, Scherer PB, Levy DE. Effects of low-dose aspirin on platelet function in patients with recent cerebral ischemia. *Stroke* 1985; 16:5-9.
103. Wilhelmsen L. Coronary heart disease: epidemiology of smoking and intervention studies of smoking. *Am Heart J* 1988; 115:242-249.
104. Wilhelmsen L. Thrombocytes and coronary heart disease. *Circulation* 1991; 84:936-938.
105. Willard JE, Lange RA, Hillis LD. The use of aspirin in ischaemic heart disease. *New Engl J Med* 1992; 327:175-181.
106. Yudkin JS, Kumari M, Humphries SE, Mohamed-Ali V. Inflammation, obesity, stress and coronary heart disease: is interleukin-6 the link? *Atherosclerosis* 2000; 148:209-214.
107. Zucker MB. Platelet aggregation measured by photometric method. *Methods Enzymol* 1989; 169:117-133.
108. Zucker MB. Platelet clumping produced by connective tissue and by collagen. *Proc Soc Exp Biol Med* 1962; 109:779-787.
109. Zucker MB. Proteolytic inhibitors, contact and other variables in the release reaction of human platelets. *Thromb Diath Haemorrh* 1972; 28:393-407.
110. Zucker TP, Bönisch D, Hasse A, Grosser T, Weber A-A, Schrör K. Tolerance development to antimitogenic actions of prostacyclin but not of prostaglandin E₁ in coronary artery smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol* 1998 (a); 345:213-220.

111. Zucker TP, Bönisch D, Muck S, Weber A-A, Bretschneider E, Glusa E, Schrör K. Thrombin-induced mitogenesis in coronary artery smooth muscle cells is potentiated by Thromboxane A₂ and involves upregulation of thromboxane receptor mRNA. *Circulation* 1998 (b); 97:589-595.

7 VERÖFFENTLICHUNGEN IM ZUSAMMENHANG MIT DIESER ARBEIT

I. Zeitschriftenartikel

Weber A-A, Liesener S, Hohlfeld T, Schrör K. 40 mg of aspirin are not sufficient to inhibit platelet function under conditions of limited compliance. *Thromb Res* 2000; 97:365-367.

Weber A-A, Liesener S, Schanz A, Hohlfeld T, Schrör K. Habitual smoking causes an abnormality in platelet thromboxane A₂ metabolism and results in an altered susceptibility to aspirin effects. *Platelets* 2000; 11:177-182.

II. Kurzveröffentlichungen (Abstracts)

Liesener S, Weber A-A, Hohlfeld T, Schrör K. Is 40 mg acetylsalicylic acid sufficient to inhibit platelet function? XIIth Platelet Symposium, Herrsching a. Ammersee, 1997.

Liesener S, Weber A-A, Schrör K. Is 40 mg acetylsalicylic acid sufficient to inhibit platelet function? *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1998; 357 (Suppl.):R37.

DANKSAGUNGEN

Herrn Prof. KARSTEN SCHRÖR möchte ich für die Aufnahme in das Institut, für die Überlassung des Themas sowie für die Betreuung und Unterstützung dieser Arbeit herzlich danken.

Herrn Dr. ARTUR-ARON WEBER, der diese Studie mit großem Engagement geleitet hat, danke ich ganz herzlich für die Hilfe bei den Aggregationsversuchen und für die vielen wertvollen Anregungen und Ratschläge, die er mir während aller Phasen dieser Arbeit gewährte.

Frau IRMHILD RÜTER danke ich für die Durchführung der Thromboxan-Bestimmungen, Herrn Dr. DIETER HAFNER für die Beratung über Datenverarbeitung und Statistik und Herrn HANS-JÜRGEN SPRINGER für die technische Beratung.

Besonderer Dank gilt auch Frau LOHMANN und Frau MONTAG.

Den Herstellerfirmen danke ich für die freundliche Überlassung der Substanzen. Besonders danke ich auch der Firma Bayer, Leverkusen für die Unterstützung und die Überlassung der Aspirin[®]-Tabletten.

LEBENS LAUF

- 07.07.1968 geboren in London als Sohn von Ursula Schneewind, Einzelhandelskauffrau und Georg Diederichs, Unternehmer.
- 1974-1978 Grundschule in Remscheid
- 1978-1988 Ernst-Moritz-Arndt-Gymnasium in Remscheid, Abitur
- 1988-1989 Wehrdienst
- 1989-1990 Zivildienst in den Krankenanstalten der Stadt Remscheid
- 1990 Pflegehelfer in der ev. Nervenlinik Remscheid
- 1990-1993 Krankenpflegeausbildung in den Krankenanstalten der Stadt Remscheid und der ev. Nervenlinik Remscheid, Krankenpflegeexamen
- 1993 Krankenpfleger im Krankenhaus Mörsenbroich-Rath in Düsseldorf
- 1994 Krankenpfleger im psych. Landeskrankenhaus Grafenberg in Düsseldorf
- 1994 Aufnahme des Studiums der Medizin an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- 1996 Ärztliche Vorprüfung
- 1997 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
- 1997 Experimenteller Teil der Promotionsarbeit am Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf unter Leitung von Prof. Dr. K. Schrör
- 2000 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
- 2001 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Düsseldorf, den 23.04.02