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

**Zur Bedeutung der Cyclooxygenase-2 für die Thromboxanbildung in
Blutplättchen von gesunden Probanden –
Wirkungen von Acetylsalicylsäure, Indometacin, Diclofenac und NS-398**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der
Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

vorgelegt von

Andrea Schanz
2002

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

gez.: Prof. Dr. med. Dr. phil. Alfons Labisch M.A.
Dekan

Referent: Univ.-Prof. Dr. med. Karsten Schrör
Korreferent: Univ.-Prof. Dr. med. Rüdiger E. Scharf

Verwendete Abkürzungen

AA	Arachidonsäure
Abb.	Abbildung
ACD	Acidic citrate dextrose
ADP	Adenosindiphosphat
aq. dest.	Aqua destillata
ASA	Acetylsalicylsäure
COX	Cyclooxygenase
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
GP	Glykoprotein
HRP	Horseradish Peroxidase
IC 50	Halbmaximale Hemmkonzentration
MW	Mittelwert
NSAR	nichtsteroidale Antirheumatika
NS-398	N[2-(cyclohexyloxy)-4-nitrophenyl]-methansulphonamid
PG	Prostaglandin
PRP	Plättchenreiches Plasma
RIA	Radioimmunoassay
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
Tab.	Tabelle
TRASI	Thromboxan-Rezeptorantagonist/Thromboxansyntheseinhibitor
TX	Thromboxan
TXA ₂	Thromboxan A ₂
TXB ₂	Thromboxan B ₂
VASP	Vasodilatator-stimuliertes Phosphoprotein
vWF	von Willebrand Faktor

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	5
1.1 Die Rolle der Thrombozytenaggregation.....	5
1.2 Pharmakologische Beeinflussung der Thrombozytenaggregation.....	8
1.3 Eigenschaften der Cyclooxygenase.....	10
1.4 Acetylsalicylsäure/-Resistenz.....	12
1.5 Diclofenac / Indometacin.....	15
1.6 NS-398.....	15
1.7 Fragestellungen.....	15
2. Material und Methoden	17
2.1 Versuchsplan.....	17
2.1.1 Probandenkollektiv.....	17
2.1.2 Versuchsprotokoll.....	17
2.2 Material.....	17
2.2.1 Blutentnahme.....	17
2.2.2 PRP-Gewinnung.....	17
2.2.3 Serumgewinnung.....	18
2.2.4 Thrombozytengewinnung.....	18
2.2.5 Substanzen und Lösungen.....	18
2.3 Methoden.....	24
2.3.1 Messung der Thrombozytenaggregation.....	24
2.3.2 Serumversuche.....	26
2.3.3 Radioimmunologische Bestimmung des Thromboxan-B ₂ -Gehaltes im PRP und im Serum.....	26
2.3.4 Reinheitsüberprüfung des PRPs.....	26
2.3.5 COX-2-Nachweis mittels Western-blot.....	27
2.3.6 Statistische Auswertung.....	28

3.	
Ergebnisse.....	29
3.1	Reinheit der Thrombozytenpräparate.....29
3.2	<i>In vitro</i> -Wirkungen der Substanzen auf die Thrombozyten.....30
3.2.1	Kollagen-induzierte Thrombozytenaggregation im PRP.....30
3.2.2	Hemmung der Thrombozytenaggregation im PRP.....32
3.2.3	Hemmung der Thromboxanbildung im PRP.....34
3.2.4	Hemmung der Thromboxanbildung im Serum.....36
3.2.5	IC 50-Korrelationen für Thrombozytenaggregationshemmung.....37
3.2.6	IC 50-Korrelationen für die Hemmung der Thromboxanbildung.....41
3.2.7	Korrelationen zwischen der Thrombozytenaggregation und der Hemmung der Thromboxanbildung.....44
3.3	Densitometrische Western-blot-Analyse.....46
3.3.1	Korrelationen zwischen der COX-2-Expression in den Thrombozyten und den IC-50 der Thromboxanhemmung.....47
3.3.2	Korrelationen zwischen der COX-2-Expression in den Thrombozyten und der Aggregationshemmung.....48
4. Diskussion.....	49
4.1	COX-2-Expression in Thrombozyten.....49
4.2	Bedeutung der COX für die Thromboxanbildung.....51
4.3	Einfluss der COX-Inhibitoren auf die Thrombozytenaggregation.....52
4.4	Interindividuelle Variabilität der COX-Inhibitoren als Klassenphänomen...54
4.5	ASA-Resistenz.....55
4.6	Thrombozytenaggregation als Marker für COX-Hemmung.....57
5. Zusammenfassung.....	60
6. Literatur.....	62
7. Veröffentlichungen in Zusammenhang mit dieser Arbeit.....	70
8. Danksagung.....	71
9. Lebenslauf.....	72

1. Einleitung

1.1 Die Rolle der Thrombozytenaggregation

Die Plättchenaggregation ist sowohl für physiologische, wie die Hämostase(1) und Blutverlust nach Gewebetrauma(2;3), als auch für pathophysiologische Vorgänge, wie Thrombusbildung oder Entstehung eines Myokardinfarktes(4;5), bedeutsam. Eine Thrombozytenadhäsion an die Gefäßwand, die von einer Thrombozytenaktivierung gefolgt wird, führt zur Aggregatbildung. Unter physiologischen Bedingungen findet eine Thrombozytenaktivierung in zirkulierendem Blut nicht statt. Durch Thrombinbildung an der thrombozytären Oberfläche wird auch das Gerinnungssystem aktiviert. Aktivierte Thrombozyten können durch Freisetzung von Thromboxan A₂ (TXA₂) und Serotonin (5-HT) Gefäßspasmen induzieren. Diese Vorgänge tragen zur Blutstillung bei, können aber auch akute bzw. subakute thrombotische Gefäßverschlüsse bewirken.

Seit den sechziger Jahren setzte sich die Auffassung durch, dass der Myokardinfarkt in der Regel Folge eines thromboembolischen Koronararterienverschlusses ist und nicht eines Gefäßspasmus(6). In der arteriellen Zirkulation, besonders in den Koronargefäßen, folgt aus der Thrombozytenadhäsion und -aggregation auf rupturierten arteriosklerotischen Plaques ein arterieller Verschluss bzw. eine ischämische Herzmuskelfunktionsstörung(7-9). Aus solchen Vorgängen ließ sich schlussfolgern, daß eine der Ursachen das Ungleichgewicht zwischen Thrombozyten-aktivierenden und -inhibierenden Faktoren ist, wobei die aktivierenden überwiegen. Damit wurde die Therapie mit plättchenaggregationshemmenden Medikamenten, wie Acetylsalicylsäure, zur Verhinderung eines thromboembolischen Gefäßverschlusses begründet. Mit ersten Ergebnissen der Framinghamstudie wurde 1961 das Konzept der kardiovaskulären Risikofaktoren etabliert(10). So wurde zuerst der arteriellen Hypertonie und der Hypercholesterinämie, später auch dem Rauchen und dem Diabetes mellitus, eine entscheidende Rolle in der Entwicklung einer koronaren Herzkrankheit, dem Herzinfarkt und dem Schlaganfall zugewiesen(11). Neuere Untersuchungen weisen darauf hin, dass kardiovaskuläre Risikofaktoren über die Induktion einer endothelialen Dysfunktion die Entwicklung und Progression einer Arteriosklerose begünstigen(4;5;12). Der Begriff der endothelialen Dysfunktion wird zur Beschreibung einer Vielzahl von pathologischen Situationen verwendet. Diese umfassen veränderte antikoagulatorische und antiinflammatorische Eigen-

schaften des Endothels, eine eingeschränkte Modulation des Gefäßwachstums sowie eine Dysregulation von vaskulären Umbauprozessen.

Ablauf der Thrombozytenaggregation (Abb.1)

Den ersten Schritt der Thrombozytenaggregatbildung *in vivo* stellt die Adhäsion von Thrombozyten an das Subendothel dar. Die initiale Adhäsion von Thrombozyten an das Subendothel wird durch die Interaktion von thrombozytärem Glykoprotein (GP) Iba und Matrix-gebundenem von Willebrand-Faktor (vWF) vermittelt(13). Die adhätierenden Thrombozyten binden über GPVI an subendotheliale Kollagenfibrillen(14), welches zu einer stabilen Adhäsion und einer Aktivierung der Thrombozyten führt.

Die Thrombozytenaggregation stellt einen komplexen Vorgang dar, der folgende Schritte beinhaltet(15;16):

- ▶ die Expression von vWF auf der Oberfläche immobilisierter Thrombozyten
- ▶ Bindung von GPIb α (auf frei fließenden Thrombozyten) an vWF (auf der Oberfläche immobilisierten, aktivierten Thrombozyten)
- ▶ eine irreversible, auf der Aktivierung von GPIIb/IIIa beruhende Thrombozytenadhäsion, die durch plasmatisches Fibrinogen (und möglicherweise auch durch plasmatischen vWF) vermittelt wird

Die initiale Phase der Thrombozytenadhäsion verläuft aktivierungsunabhängig. Für die Ausbildung von stabilen Aggregaten ist eine Aktivierung der Thrombozyten mit daraus resultierender Affinitätserhöhung von GPIIb/IIIa für die Bindung von plasmatischem Fibrinogen erforderlich. Thrombozytenaktivierung bedeutet biochemische Veränderungen, wie die Erhöhung der Ca²⁺-Konzentration oder Aktivierung der Protein-Kinase C, die zum Formwandel mit Abrundung und Ausbildung von Pseudopodien, sowie zur Aktivierung von Oberflächenrezeptoren (GPIIa/IIIb) führen(17).

Bei den primären Mediatoren, die zur Aktivierung der Thrombozyten führen, handelt es sich vor allem um humorale Faktoren (z. B. ADP, Thromboxan A₂), immobilisierte (z. B. Kollagen) sowie mechanische Faktoren (Scherstress). Nur wenige dieser Mediatoren (z. B. Thrombin) können allein eine Thrombozytenaggregation bewirken. Daher verfügen Thrombozyten über Verstärkungsmechanismen, die die Aktivierung

unterstützen. Hierzu gehört die Freisetzung von Adenosindiphosphat aus elektronendichten Granula und die Bildung und Freisetzung von Prostaglandin-endoperoxiden (PGG₂/PGH₂) und Thromboxan A₂ (TXA₂) (Abb.1).

TXA₂ wirkt proaggregatorisch und vasokonstriktorisch. Einmal in die Blutbahn freigesetzt, wird TXA₂ schnell zu TXB₂, die chemisch stabile, aber biologisch inaktive Form hydrolysiert(18). Diese sekundären Mediatoren binden an Rezeptoren der Thrombozytenmembran und sind nicht nur in der Lage die Thrombozytenaggregation zu komplettieren, sondern beziehen auch primär nicht betroffene Thrombozyten in die Aktivierung mit ein. Auf diese Weise wird die Entstehung von intravasalen Thromben gefördert. Für die endgültige Aggregation wird noch ein weiterer Faktor, Fibrinogen, benötigt. Dies bindet an aktivierte Glykoprotein IIb/IIIa-Komplexe und ermöglicht durch inter-thrombozytäre Brückenbindung die Aggregatbildung.

1.2 Pharmakologische Beeinflussung der Thrombozytenfunktion

Thrombozytenfunktionshemmer haben heute einen festen Stellenwert in der Prophylaxe arterieller thrombotischer Gefäßverschlüsse, wie Schlaganfall und Herzinfarkt(19). Wie in Abbildung 1 gezeigt wird, ist die Thrombozytenaggregation auf verschiedenen Mediatorebenen zu beeinflussen. Am häufigsten werden Aggregationshemmer eingesetzt, die mit Thromboxan A_2 interferieren. Thrombozyten können durch verschiedene Stimuli (z. B. Kollagen, α -Thrombin, Scherstress) aktiviert werden. Die initiale Aktivierung wird durch die Freisetzung von ADP, Serotonin und TXA_2 komplettiert und resultiert in einer Aggregatbildung. Diese wird durch plasmatisches Fibrinogen und vWF vermittelt. Eine pharmakologische Thrombozytenfunktionshemmung kann auf der Ebene der initialen Aktivierung (Aktivierung der cAMP- oder cGMP-Bildung durch PGI_2 -Mimetika bzw. durch NO-Donatoren), auf der Ebene der Verstärkungsmechanismen (Hemmung der Thromboxanbildung durch ASA oder Thromboxan-Synthaseinhibitoren, Hemmung der Thromboxanwirkung durch Thromboxan-Rezeptorantagonisten, Hemmung der ADP-Wirkung durch Thienopyridine) sowie auf der Ebene der Ligandenbindung (Hemmung der Fibrinogenbindung an den GPIIa/IIIb-Komplex) erreicht werden. Die für die initiale, aktivierungsunabhängige Thrombozytenadhäsion wichtige Interaktion zwischen GPIb und vWF ist in Abb. 1 nicht dargestellt.

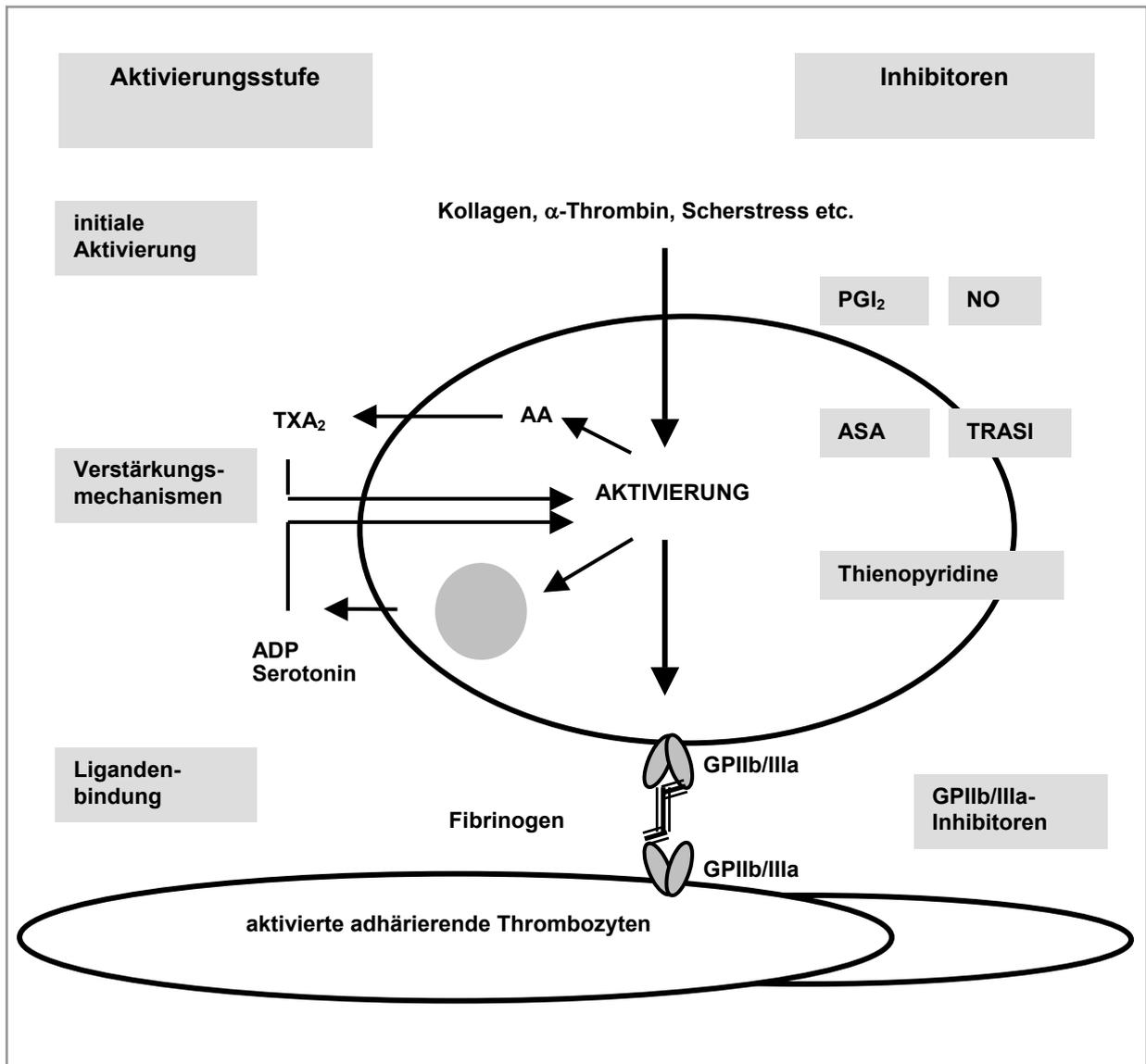


Abb. 1
 Schematische Darstellung der Thrombozytenaktivierung sowie die prinzipiellen Möglichkeiten ihrer pharmakologischen Beeinflussung.

1.3 Eigenschaften der Cyclooxygenase

Die Cyclooxygenase (COX) ist das Schlüsselenzym bei der Synthese von Prostaglandin H₂ aus dem Arachidonsäurestoffwechsel. Aus PGH₂ entstehen unter anderem Prostacyclin, PGE₂, PGF_{2α} sowie TXA₂.

Von der COX sind bislang zwei Isoformen bekannt. Eine sogenannte konstitutive (COX-1) und eine induzierbare Form (COX-2)(20). COX-1 und COX-2 sind an unterschiedlicher Stelle im Genom verankert. Die kodierten Cyclooxygenaseproteine unterscheiden sich nur minimal und die synthetisierten Produkte, Prostaglandinperoxide, sind gleich. Unterschiede bestehen in der Genexpression und damit in der Menge an synthetisierten Produkten(21). Ein Unterschied der beiden Isoformen besteht in der sterischen Struktur des katalytischen Zentrums und in einer Reihe von Unterschieden im Kanal des aktiven Zentrums. Dies verleiht den COX-Hemmern die Möglichkeit zur Selektivität(22;23). Die COX-1 wird konstitutiv im endoplasmatischen Retikulum in fast allen Zellen, auch in Thrombozyten(24), exprimiert. Die synthetisierten Prostaglandine sind verantwortlich für die normale Zellfunktion, wie z.B. den Schutz der Magenschleimhaut, die Aufrechterhaltung des renalen, kardialen und gastralen Blutflusses und die Regulation von Plättchenaktivierung und –aggregation(25). Im Gegensatz dazu wird die COX-2 zum Beispiel unter dem Einfluß von Zytokinen, Endotoxinen und Wachstumsfaktoren exprimiert(26-28) und oft im Zusammenhang mit entzündlichen Stimuli gefunden(29;30). Es wird vermutet, dass die COX-2 ihre Aufgaben im Bereich der Infektabwehr(31), bei Entzündungsreaktionen und auch der Mitogenese(32) hat.

Ursprünglich wurde angenommen, dass die COX-2 bei der Synthese der COX-1-abhängigen PG für die Hämostase bzw. Vasodilation und Gewebeprotektion im gastrointestinalen Trakt keine Funktion hat(33). Dieses Konzept wird inzwischen durch den Nachweis von COX-2 in Thrombozyten(34), verschiedenen Geweben und Organen, wie Niere(35), Gehirn(36), Epithel der Trachea(37) und Magenschleimhaut (38) widerlegt. Seit der Entdeckung der COX-2 stellt sich die Frage, warum zwei Isoformen der COX existieren(39). Zu diesem Zweck wurden COX-1-knockout Mäuse(40), COX-2-knockout Mäuse(41;42) und selektive Medikamente entwickelt, um die physiologischen Funktionen der COX-1 und der COX-2 darstellen zu können. Es wurde festgestellt, dass COX-2-knockout Mäuse schwere Nephropathien entwickelten(42), während sie gleichzeitig noch auf entzündliche Stimuli reagieren konnten(41). Im Kontrast dazu entwickelten COX-1-knockout Mäuse keine

gastrointestinalen Ulzera(40). Folglich sind die biologischen Funktionen, sowohl der COX-1 als auch der COX-2, wesentlich komplexer als ursprünglich angenommen (43).

In verschiedenen Studien wurden Plättchenaggregation, Ovulation(44;45), Implantation von Embryonen(46), Entbindung(47), Entzündung(40), Karzinogenese (48-50) sowie auch der Verschluss des Ductus arteriosus(51) auf die Abhängigkeit von COX-1 und COX-2 untersucht. Aus dieser Diskussion über die Funktionsbereiche der COX stellte sich die entscheidende Frage:

„Ist die thrombozytäre COX-2 bei gesunden Probanden an der Thromboxanbildung beteiligt und wie ist ihre Bedeutung für die Thrombozytenfunktion?“

Zur Untersuchung dieser Hypothese wurden in der vorliegenden Arbeit unterschiedlich selektive COX-Hemmer verwendet (Tab.1).

Tab.1

Cyclooxygenase Inhibitoren und ihre IC 50-Werte in intakten Zellen

NSAID	IC 50 COX-1 [µM]	IC 50 COX-2 [µM]	Verhältnis IC 50 (COX-1/COX-2)	Referenz
ASA	1,66	278	166	Mitchell et al., 1994(33)
Indometacin	0,028	1,7	60	Mitchell et al., 1994(33)
Diclofenac	1,7	1,2	0,7	Mitchell et al., 1994(33)
NS-398	16,8	0,103	0,006	Panara et al., 1995(52)

1.4 Acetylsalicylsäure (ASA) / -Resistenz

Standardsubstanz für die Hemmung der Thrombozytenfunktion, als antithrombotische Prophylaxe oder Akuttherapie des Myokardinfarkts oder Apoplex ist die Acetylsalicylsäure(32;53). Die antithrombotische Wirkung von ASA beruht auf der Acetylierung eines Serinrestes im Molekül der COX. Diese Bindung führt zur Verhinderung des Zugangs von Arachidonsäure zum distal gelegenen katalytischen Zentrum des Enzyms. Die Enzymaktivität wird irreversibel gehemmt(54;55). Dabei besteht eine relative (ca. 1:166) Selektivität von ASA für die Hemmung der COX-1 im Vergleich zu COX-2(20) (Tab.1).

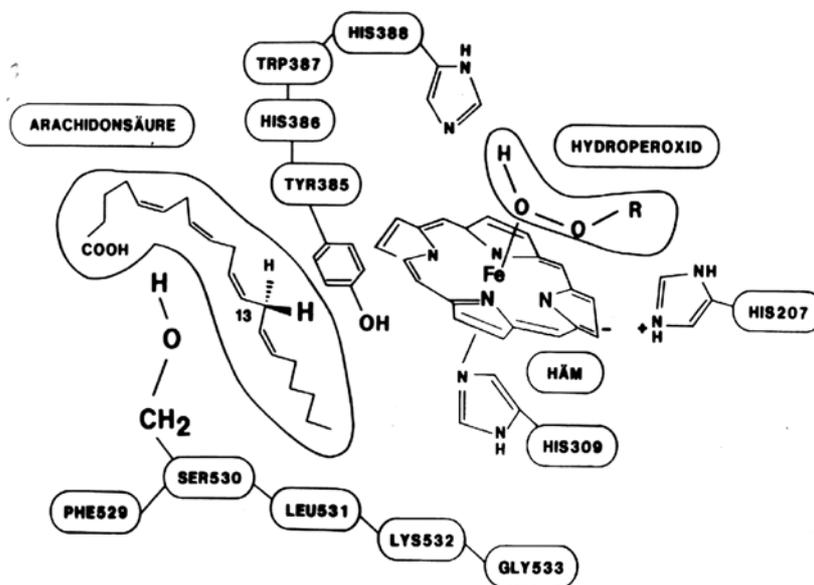


Abb. 2

Molekularer Mechanismus der ASA-Wirkung auf die Cyclooxygenase-1(COX-1)(56).

ASA wirkt antithrombotisch in verschiedenen hohen Dosen. Die antithrombotische Wirkung von ASA wurde hauptsächlich auf die Hemmung der TXA_2 -Bildung zurückgeführt, auch wenn vermutet wird, dass unabhängige Mechanismen existieren(57-60). Es inhibiert sowohl TXA_2 als auch Prostacyclin. Während TXA_2 die Plättchenaggregation induziert und zur Vasokonstriktion führt, wirkt PGI_2 genau gegensätzlich(61). Bei vergleichenden pharmakologischen Untersuchungen erwies sich die Acetylsalicylsäure als ein relativ spezifischer Inhibitor der konstitutiven Isoform COX-1(33). Die 166-fache Selektivität von ASA für die COX-1 erklärt, dass die Dosierung von ASA als Thrombozytenaggregationshemmer niedriger ist als die Dosierung, die für einen entzündungshemmenden Effekt benötigt wird. Dafür ist eine

höhere Dosis von ASA und auch ein kürzeres Dosierungsintervall erforderlich(62). Niedrige Dosierungen, wie 30 mg verursachen weniger Nebenwirkungen, wie gastroduodenale Ulzera, als höhere, wie 300 mg (63). In mehreren klinischen Studien wurde die Fragestellung der Dosierung verfolgt. So kann eine effektive, antithrombotische Wirkung von ASA mit Dosierungen zwischen 75-150 mg/d (53) angenommen werden. 75 mg/d ASA reduziert das Risiko eines Myokardinfarkt oder den Tod durch chronisch stabile(64) oder instabile Angina pectoris(65), sowie auch eines Hirninfarktes(66) mit oder ohne Plaqueentfernung in den Carotiden(67) effektiv. Nach Auffassung der Antiplatelet Trialists' Collaboration sind niedrige Dosierungen, wie 50-100mg/d, nicht weniger effektiv, als hohe Dosierungen, wie 650-1500 mg/d(62). Allerdings kann eine Dosis von 100 mg/d eine vergessene Einnahme, z.B. bei Compliance-Problemen kompensieren, während z.B. 40 mg/d dafür nicht ausreichen(68). Aus diesen theoretischen Gründen, wäre es sinnvoll, die Dosis von ASA so zu wählen, dass die TXA₂-Synthese gehemmt wird, ohne die PGI₂-Synthese zu beeinflussen(62). Da ASA vor allem die Thromboxansynthese der Thrombozyten hemmt, nicht aber andere Aktivierungsmechanismen, wird die antithrombotische Wirksamkeit der Substanz entscheidend von der Bedeutung des Thromboxan-abhängigen Verstärkungsmechanismus für die Plättchenaktivierung bestimmt. So können die TXA₂-unabhängigen Aktivierungsmechanismen, wie Thrombin, ADP und Kollagen, den ASA-Hemmeffekt umgehen und zur Thrombose führen(69). Die Thrombozytenadhäsion sowie die Freisetzung von vasokonstriktorisches und mitogenen Thrombozytenfaktoren nach ADP-, Noradrenalin- und Scherstress-induzierter Thrombozytenaktivierung *in vivo*, werden durch ASA nicht beeinflusst(70-73). Auch wenn ASA zu einer etwa 15 %-igen Reduktion der vaskulären Todesfälle sowie zu einer 30 %-igen Reduktion nicht-letaler thrombotischer Komplikationen bei Patienten mit Atherosklerose führt(53), zeigt sich bei einem variablen Teil der Patienten eine Resistenz gegenüber der antithrombotischen Wirkung dieser Substanz(74-77). In diesem Zusammenhang stellt sich die weitgehend ungelöste Frage, was die Mechanismen und die klinische Bedeutung der „Aspirinresistenz“ sind(21). Die Ursachen hierfür sind bislang nicht klar definiert (74;78). So versteht man unter der Acetylsalicylsäure-Resistenz das Eintreten eines atherothrombotischen Ereignisses, eine fehlende Verlängerung der Blutungszeit, eine unzureichende Hemmung der Thrombozytenaggregation oder eine unzureichende Hemmung der thrombozytären Thromboxanbildung *in vitro* unter einer Therapie mit

ASA(62). Inzwischen kann die „Aspirin-Resistenz“ in drei verschiedene Klassen eingeteilt werden(79). Bei gesunden Probanden (Acetylsalicylsäure-„Responder“) wurde nach einer oralen Behandlung mit ASA (100 mg/d über 5 Tage) eine 95%-Hemmung der Kollagen-induzierten Thromboxanbildung sowie eine vollständige Hemmung der Kollagen-induzierten Thrombozytenaggregation beobachtet.

Tab. 2

Die drei ASA-Resistenz-Typen im direkten Vergleich(79).

ASA-Resistenz-Typ	Definition	evtl. Pathomechanismus
Typ I „pharmakokinetische Resistenz“	<i>in vivo</i> : keine Hemmung der TXB ₂ -Bildung, bzw. Thrombozytenaggregation nach 5-tägiger Therapie mit 100 mg/d ASA <i>in vitro</i> : > 95%-ige Hemmung der Kollagen-induzierten TXB ₂ -Bildung, bzw. Thrombozytenaggregation nach Zugabe von ASA (100µM)	- reduzierte Bioverfügbarkeit von ASA durch eine erhebliche intra- und interindividuelle Variabilität(80) - fehlende Compliance der Patienten
Typ II „pharmakodynamische Resistenz“	<i>in vivo</i> : keine Hemmung der TXB ₂ -Bildung, bzw. Thrombozytenaggregation nach 5-tägiger Therapie mit 100 mg/d ASA <i>in vitro</i> : keine ausreichende Hemmung der TXB ₂ -Bildung nach Zugabe von ASA (100µM)	-vermehrte COX-2-Expression in Thrombozyten(34) - evtl. Polymorphismen im COX-1-Gen, die mit einer verminderten Hemmbarkeit durch ASA einhergehen(62)
Typ III	- Kollagen-induzierte TXB ₂ -Bildung nach 5-tägiger ASA (100 mg/d) fast vollständig gehemmt - Thrombozytenaggregation nach Kollagenstimulation und Zugabe von ASA nicht gehemmt	- Thrombozyten sind in der Lage auch ohne Thromboxan-Verstärkungsmechanismus zu aggregieren - erhöhte Sensitivität von Thrombozyten gegenüber Kollagen bei Patienten mit ASA-Resistenz(81)

1.5 Diclofenac / Indometacin

Während ASA die COX-Aktivität irreversibel hemmt, handelt es sich bei Diclofenac und Indometacin um reversible, kompetitive Hemmer der Cyclooxygenase. Jedes NSAR zeigt individuelle Selektivität gegenüber COX-1 bzw. COX-2. Die anti-inflammatorische Wirkung der verschiedenen NSAR wird hauptsächlich auf die Hemmung der COX-2 zurückgeführt. Die unerwünschten Wirkungen, wie zum Beispiel die Magentoxizität auf die COX-1-Hemmung (82).

Aus Tabelle 1 geht hervor, dass die Selektivität von Diclofenac beiden COX-Isoformen gegenüber gleich ist, während Indometacin stärker die COX-1 hemmt.

Sowohl Indometacin als auch Diclofenac werden nicht in der antithrombotischen, sondern hauptsächlich in der antirheumatischen Therapie angewandt.

1.6 NS-398

NS-398 hemmt die COX-2 kompetitiv. Es gehört zu den ersten NSAR, welche selektiv die COX-2 hemmen und die COX-1-Aktivität nicht verändern(52).

Die COX-2-Selektivität ist jedoch dosisabhängig. Deswegen ist die Beurteilung der COX-2-Hemmung in verschiedenen, entstandenen Wirkungskurven auf die COX-2-selektiven Konzentrationen ($\leq 1 \mu\text{M}$) zu beschränken.

Die Wirkung von NS-398 auf die COX-Aktivität und die Thrombozytenaggregation wurde auch in anderen Arbeitsgruppen untersucht(52).

1.7 Fragestellungen, die in dieser Arbeit untersucht werden sollen:

1. Ist die thrombozytäre COX-2 bei gesunden Probanden an der TX-Bildung in Thrombozyten beteiligt und was ist deren Bedeutung für die Thrombozytenfunktion?
2. Wie ist die interindividuelle Variabilität bei der Ansprechbarkeit auf verschiedenen COX-Inhibitoren?
3. Ist die interindividuelle Variabilität (falls vorhanden) ein Klassenphänomen oder bei den einzelnen Substanzen unterschiedlich?
4. Ist die Thrombozytenaggregation ein sensibler Parameter für die Wirksamkeit von ASA, Indometacin, Diclofenac oder NS-398?

Zur Klärung dieser Fragestellungen wurde eine Probandenstudie durchgeführt. Das Blut von 20 gesunden Probanden wurde für die Versuche verwendet. Alle Versuche wurden *in vitro* durchgeführt. Die Grundlage des Experiments bildeten Aggregationsversuche mit separiertem plättchenreichen Plasma. Die Tangentensteigung der Aggregationskurven und die prozentuale TX-Hemmung dienten der statistischen Auswertung. Die COX-2-Expression in den Thrombozyten der Probanden wurde mittels Western-blot bestimmt.

2. Material und Methode

2.1 Versuchsplan

2.1.1 Probandenkollektiv

Die Studie wurde mit 20 gesunden Probanden durchgeführt, die im Alter von $30,3 \pm 9,26$ (Standardabweichung) Jahren waren. Dreizehn der Probanden waren weiblich. Eine Kontraindikation für die Rekrutierung der Probanden war die Einnahme von Thrombozyten-hemmenden Therapeutika. Eine schriftliche Einverständniserklärung wurde eingeholt.

2.1.2 Versuchsprotokoll

Akutversuche: Am Versuchstag wurde das Probandenblut entnommen, das PRP separiert und die Kollagen-induzierte Thrombozytenaggregation im PRP gemessen. Spätere Bestimmungen: Aus dem Material PRP und Serum, wurden nach Abschluss der Akutversuche TXB₂-Werte bestimmt. Zudem erfolgte der Nachweis von COX-2 mittels des Western-blot-Verfahrens.

2.2 Material

2.2.1 Blutentnahme

Die Blutentnahme erfolgte durch die Punktion einer Armvene mit einer Kanüle der Größe 19 G. Der Innendurchmesser der Nadel entsprach 0,8 mm. Zuerst wurden 45 ml Blut in eine Perfusorspritze mit 5 ml Citratvorlage (ACD,1:9) aufgezogen. Zur Serumgewinnung wurden weitere 15 ml Blut separat ohne Citratvorlage entnommen.

2.2.2 PRP-Gewinnung

Zur Gewinnung des PRPs wurde das antikoagulierte Blut nach der Entnahme für 10 min bei $260 \times g$ und Raumtemperatur (Laborfuge, Heraeus Christ, Osterode) zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Plasmaüberstand mit einer Pipette abgehoben und dessen pH-Wert mit 1N NaOH bzw. 1N HCl auf 7,4 eingestellt.

Der Aktivierungszustand der Thrombozyten wurde durch die Überprüfung des „swirl-Phänomens“ festgestellt. Dieses Phänomen spiegelt das „Herumwirbeln“ der diskoidalen Thrombozyten wieder und verschwindet bereits in frühen

Aktivierungsstadien durch Abrundung der Plättchen. Diese bilden sogenannte „Reizformen“ aus(8;83).

2.2.3 Serumgewinnung

Das nicht-antikoagulierte Vollblut wurde zunächst in Glasgefäßen für 2 h bei 37 °C inkubiert und dann für 10 min mit 260 x g zentrifugiert. Der Serumüberstand wurde abgehoben und für die spätere Thromboxanwertbestimmung bei –20 °C eingefroren.

2.2.4 Thrombozytengewinnung

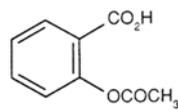
Durch 10-minütige Zentrifugation bei 10.000 x g und Raumtemperatur wurden die nach den Aggregationsversuchen verbliebenen Thrombozyten pelletiert und bei –80 °C eingefroren.

2.2.5 Substanzen und Lösungen

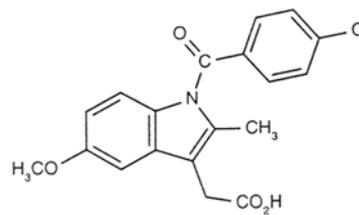
Substanzen

ACD	(Biostabil®) Biotest Pharma, Dreieich
Acetylsalicylsäure	Bayer, Leverkusen
Acrylamid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat	Merck, Darmstadt
Diclofenac	Luitpold Pharma, München
EDTA (Titriplex III)	Merck, Darmstadt
Glycin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Indometacin	Luitpold Pharma, München
Kollagen	Nycomed, Kollagenreagens Horm®, München
NS – 398	CALBIOCHEM®, Schwalbach
SDS	Sigma Chemical, St.Louis, USA
Skim Milk Powder	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
Temed	Sigma Chemical, St.Louis, USA
Tween 20	Sigma Chemical, St.Louis, USA
Tris	Carl Roth GmbH, Karlsruhe

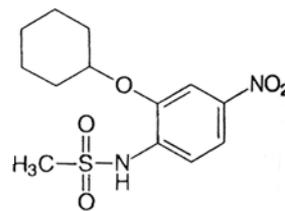
Acetylsalicylsäure



Indometacin



NS – 398
N[2-(cyclohexyloxy)-4-nitrophenyl]-
methanesulphonamid



Diclofenac

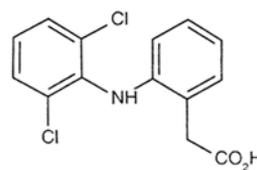


Abb. 3
Strukturformeln der verwendeten COX-Inhibitoren.

Lösungen

ACD: Antikoagulans mit Natrium-Citrat (74,8 mM), Citronensäure (38 mM) und Glukose (123,6 mM).

Acetylsalicylsäure: 18 mg Lysinsalz wurde in 1 ml PBS aufgelöst (Aspisol®, Bayer).

Diclofenac: 2,96 mg Diclofenac wurden in 1 ml Ethanol gelöst und 10 µl dieser Lösung mit 990 µl PBS verdünnt. 500 µl dieser Lösung mit 500 µl PBS gemischt. Dies ergab eine Konzentration von 10 µM.

Indometacin: 5 mg Indometacin wurde in Natriumphosphatpuffer (810 µl 0,5 M Na₂HPO₄ + 190 µl 0,5 M NaH₂PO₄) gelöst und mit 4 ml aq. dest. auf eine Stammkonzentration von 2,8 mM (1 mg/ml) verdünnt.

Kollagen: Kollagenreagens Horm[®] wurde in einer Konzentration von 1 mg/ml verwendet.

NS-398: 10 µl einer 20,1 mM konzentrierten NS-398-Lösung in 6,7 ml PBS aufgelöst. Dies entspricht einer Endkonzentration von 30 µM.

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

Stopperlösung: 0,1 mM Indometacin und 5,8 mM EDTA.

SDS-Lysepuffer: 1% SDS, 10 mM Tris-HCl, pH 7,4.

10 x Laufpuffer

Substanz	Endkonzentration	Menge
Tris-Base	24 mM	30 g
Glycin	200 mM	144 g
aq. dest.		ad 1 l

SDS - Laufpuffer

Substanz	Endkonzentration	Menge
10 x Laufpuffer		100 ml
SDS (10 %)	0,1 %	10 ml
aq. dest.		ad 1 l

Transferpuffer

Substanz	Endkonzentration	Menge
10 x Laufpuffer		250 ml
Methanol	20 %	500 ml
aq. dest.		1750 ml

10 x TBS-Puffer

Substanz	Endkonzentration	Menge
Tris-HCl (1M) pH 7,4	100 mM	100 ml
NaCl	1,5 M	87,66 g
aq. dest.		ad 1 l

TBS-T

Substanz	Endkonzentration	Menge
10 x TBS		100ml
Tween 20	0,1 %	1 ml
aqua dest		ad 1 l

TBS-TM

TBS-T plus 5 % Milchpulver

Trenngel (8 %)

aqua dest	13,9 ml
Acrylamid-Mix (30 %)	8,0 ml
Tris-HCl (1,5 M, pH 8,8)	7,5 ml
SDS (10 %)	300 µl
TEMED	18 µl
Amoniumpersulfat (10 %)	300 µl

Sammelgel (5 %)

aqua dest	6,8 ml
Acrylamid-Mix (30 %)	1,7 ml
Tris-HCl (1 M, pH 6,8)	1,25 ml
SDS (10 %)	100 µl
TEMED	10 µl
Amoniumpersulfat (10 %)	100 µl

Antikörper

Erst-Antikörper	Firma
Anti-COX-2 Antikörper	Transduction Laboratories

Zweit-Antikörper	Firma
Anti-mouse IgG HRP (Horseradish Peroxidasen)	Santa Cruz Biotechnology

Molekulargewichtsmarker

	Firma
Biotinylierter Protein Marker „Broad range“	New England Biolabs
HRP-conjugated anti Biotin-Antibody	New England Biolabs

Entwickler Processing Chemicals, Sigma Chemical, St.Louis, USA

Fixierer Na-Thiosulfat 200 g + K-Bisulfit 10 g ad 1 l

Geräte

Elektrophoresekammer: Hoefer SE 600, Freiburg

Blotkammer: BioRad, Trans-Blot, Hoefer Semiphor TE 70, München

2.3 Methoden

2.3.1 Messung der Thrombozytenaggregation

Die Messung der Thrombozytenaggregation im PRP erfolgte photometrisch mit Hilfe eines Zweikanal-Aggregometers (Labor, Hamburg) nach der von Born 1962 entwickelten Methode(84).

Das Prinzip beruht auf einer Lichtdurchlässigkeitsänderung bei Formwandel („shape-change“) und Aggregation der Thrombozyten nach Zugabe des proaggregatorisch wirksamen Stimulans (z. B. Kollagen). Da während der Aggregation die freie Partikelzahl abnimmt und Plättchenaggregate entstehen, erhöht sich die Lichtdurchlässigkeit, die von einer Photozelle in ein elektrisches Signal umgewandelt und gemessen wird.

Aggregationsversuche

400 µl PRP + 90 µl der in PBS gelösten COX-Hemmer wurden bei 37 °C über 15 min inkubiert und mit 1200 U/min eine Minute vor den Aggregationsversuchen gerührt. Die Inhibitoren wurden als Vorlage in die Reaktionsgefäße zugesetzt. 10 µl einer Kollagenlösung wurden als aggregatorischer Stimulus hinzugegeben. Die Endkonzentration des Kollagens betrug 1 µg/ml.

Die Aggregation und die Thromboxanbildung wurde mit Zugabe von Indometacin (0,1 mM) und EDTA (5,8 mM) nach 6 min beendet. Nach 10-minütiger Zentrifugation bei 10.000 x g und Raumtemperatur wurde der Überstand bis zur TXB₂ Bestimmung bei -20 °C eingefroren.

Tab. 3

Endkonzentrationen der einzelnen Substanzen in µM:

Acetylsalicylsäure	0	1,0	3,0	10,0	30,0	100,0
Indometacin	0	0,1	0,3	1,0	3,0	10,0
Diclofenac	0	0,1	0,3	1,0	3,0	10,0
NS-398	0	0,3	1,0	3,0	10,0	30,0

Die Konzentrationen für die COX-Inhibitoren wurden in Vorversuchen ermittelt. Für NS-398 wurde die höchste Konzentration durch seine Löslichkeit begrenzt.

Auswertung der Aggregationskurven

Die Kollagen-induzierte Aggregation wurde durch Bestimmung der Tangentensteigung und Thromboxanbildung ausgewertet. Die Wirkungen der NSAR wurden als %-Hemmung der Kollagen-induzierten Aggregation angegeben (Kontrolle = 0 %). Die Originalkurve zeigt den charakteristischen Verlauf einer Aggregation nach Zugabe von Kollagen (*). Zuerst erfolgte in allen Versuchen eine initiale Abnahme der Lichtdurchlässigkeit (Abrundung der Thrombozyten und Ausbildung von Pseudopodien = „shape-change“), die von einer irreversiblen Aggregation gefolgt wurde.

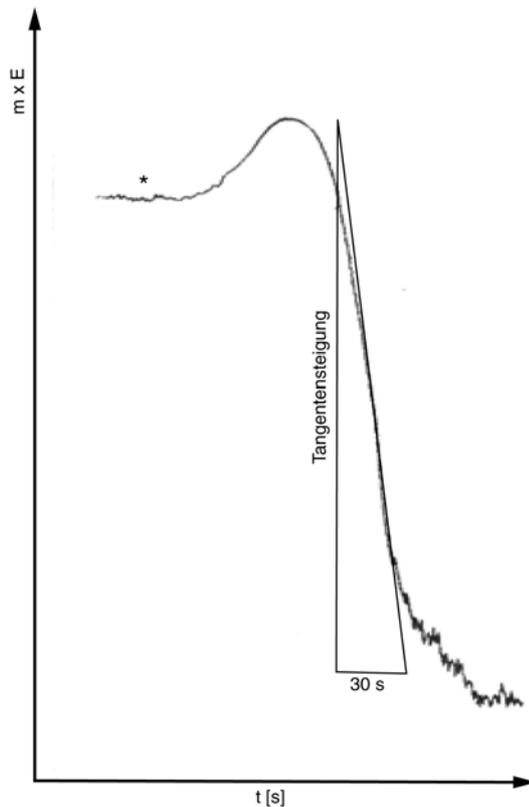


Abb. 4

Verlauf der Lichtdurchlässigkeit von PRP nach Zugabe von Kollagen (*) während der Thrombozytenaggregation. Berechnung der Tangentensteigung.

2.3.2 Serumversuche

200 µl der COX-Hemmer wurden in den verschiedenen Konzentrationen (Tab. 4) als Vorlage in 12 Glasröhrchen verteilt. Nach der Zugabe von 800 µl nicht anti-koaguliertem Vollblut wurde die Mischung über 2 h bei 37 °C inkubiert.

Tab. 4

Endkonzentrationen der NSAR in µM in den Serumversuchen

Acetylsalicylsäure	0,3	10,0	30,0
Indometacin	0,3	1,0	3,0
Diclofenac	0,3	1,0	3,0
NS-398	3,0	10,0	30,0

Außerdem wurde ein Kontrollversuch mit Zugabe von 200 µl PBS durchgeführt. Der Serumüberstand wurde nach 10-minütiger Zentrifugation bei 10.000 x g und Raumtemperatur für die spätere TXB₂ - Bestimmung bei -20°C eingefroren.

2.3.3 Radioimmunologische Bestimmung des TBX₂ - Gehaltes im Serum bzw. PRP

Die TXB₂-Bildung nach Plättchenstimulation mit Kollagen und auch in den Serumproben wurde mit einem polyklonalen Antikörper im RIA-Labor des Instituts für klinische Pharmakologie und Toxikologie gemäß einer etablierten Untersuchungsmethode (Schrör & Seidel 1988) durchgeführt. Die Nachweisgrenze lag bei 0,04 ng/ml.

2.3.4 Reinheitsprüfung des PRPs

Bisbenzimid (HOE 33258, Sigma, Deisenhofen), ein Fluoreszenzfarbstoff für DNA, wurde in einer Konzentration von 100 µg/ml in PBS gelöst und über 5 min auf das ausgestrichene, getrocknete PRP aufgetragen. Dadurch wurden die kernhaltigen Zellen (Leukozyten) erkennbar gemacht und die Reinheit des PRPs konnte mittels eines Fluoreszenzmikroskop (BX-50, Olympus Optical, Hamburg) überprüft werden.

2.3.5 COX-2-Nachweis mittels Western-blot

Zunächst erfolgte eine elektrophoretische Auftrennung von, in den Thrombozyten enthaltenen, Proteinen. Die Thrombozytenpellets wurden in SDS-Lysepuffer gelöst und mittels Ultraschall lysiert. Danach wurde mit 8500 x g bei 4 °C für 20 min zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgehoben und bei 95 °C für 10 min erhitzt. Zusammen mit einem Molekulargewichtsstandard (New England Biolabs) und einem COX-2-Proteinstandard (Lysate von Mausmakrophagen) wurden die Proteine auf ein 8 %-iges Polyacrylamidgel aufgetragen. Bei 200 Volt und variabler Stromstärke erfolgte die Auftrennung in einer mit Laufpuffer gefüllten Elektrophoresekammer (Hofer Scientific Instruments, San Francisco, CA, USA).

Die Übertragung der aufgetrennten Proteine erfolgte bei 4 °C über Nacht auf eine PVDF-Membran (Immobilon-P, Millipore, Bedford). Zur Absättigung unspezifischer Bindungen wurde die Membran 1h mit 5 % Trockenmilchpulver in TBS-T bei Raumtemperatur geblockt. Danach erfolgte die Inkubation mit dem ersten Antikörper (COX-2-AK, Maus, Verdünnung 1:500) ebenfalls für 1 h bei Raumtemperatur. Anschließend wurde die Membran zweimal für jeweils 10 min mit TBS-T gewaschen und anschließend mit dem Zweitantikörper (Anti-Maus AK, HRP-konjugiert) und dem Antibiotin-AK zur Detektion des Molekulargewichtsmarker versetzt. Im Anschluss wurde mit TBS dreimal gewaschen. Enhanced Chemiluminescence Reagenz (ECL Kit, Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, England) detektierte die Peroxidase des Zweitantikörpers. Dies wurde autoradiographisch durch peroxidasevermittelte Oxidation von Luminol sichtbar gemacht.

Die Belichtungszeiten waren versuchsabhängig und schwankten zwischen 30 s und 10 min.

2.3.6 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertungen erfolgten zum großen Teil mit Excel 97 und GraphPad Prism-Software. Es wurden jeweils der Mittelwert und der Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Die halbmaximale Hemmkonzentration (IC 50) wurde mit dem Programm Dose-X errechnet. Unterschiede zwischen den Wirkungen der COX-Hemmer in verschiedenen Konzentrationen auf die prozentuale Aggregations- bzw. TX-Synthesehemmung wurden auf ihre Signifikanz mit der Einwegvarianzanalyse (ANOVA) geprüft. Der Einzelgruppen-Vergleich erfolgte mit Hilfe des konsekutiven post-hoc-Test (Bonferroni). Das Signifikanzniveau für α wurde mit $p < 0,05$ festgelegt. Zusätzlich erfolgte die Erstellung des Konfidenzintervalls. Korrelationen wurden mit Hilfe der Berechnung der Varianz und des Korrelationskoeffizienten durch das Programm GraphPad Prism berechnet.

3. Ergebnisse

3.1 Reinheit der Thrombozytenpräparate

Abbildung 5 (I.) zeigt (ca. 35) fluoreszierende Zellkernanfärbungen, die das Vorkommen von Leukozyten aufzeigen. In dem PRP-Ausstrich, Abb.5 (II.) , sind die kernhaltigen Zellen derart vermindert, dass auf 20-50 Gesichtsfelder nur eine kernhaltige Zelle entdeckt werden kann. Die Kontamination ist also sehr gering und der COX-2-Nachweis in dem PRP kann somit den Thrombozyten zugeschrieben werden.

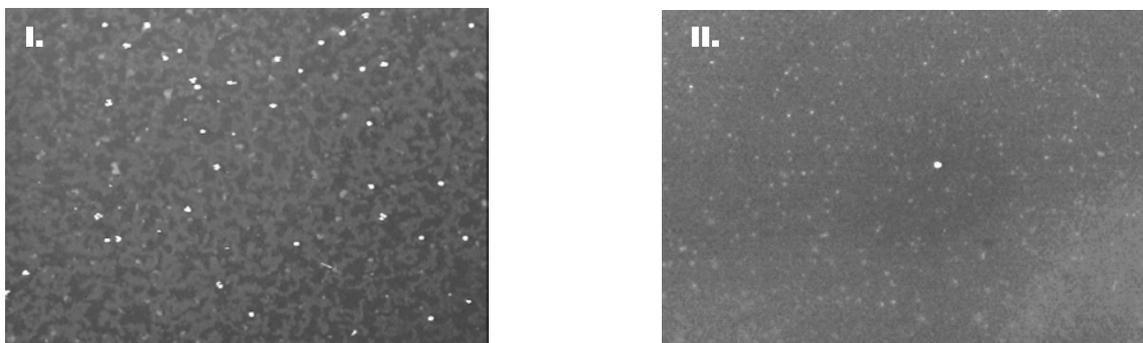


Abb. 5

Fluoreszenzmikroskopische Bilder von DNA-haltigen Zellen im Vollblutausstrich (I.) und im PRP (II.).

3.2 *In vitro* Wirkungen der Substanzen auf die Thrombozyten

3.2.1 Kollagen-induzierte Thrombozytenaggregation im PRP

Kollagen führte in allen Versuchen zu einer initialen Abnahme der Lichtdurchlässigkeit, Abrundung der Thrombozyten und Ausbildung von Pseudopodien („shape-change“), die von einer irreversiblen Aggregation gefolgt war. Anhand dieser Originalkurven wurde wie im Methodenteil beschrieben die Tangentensteigung der einzelnen Verläufe bestimmt. Mit Zunahme der COX-Inhibitorenkonzentration nahm die Steigung der Aggregationskurven ab (Abb.6). Es kam zu einer Aggregationshemmung.

NS-398 zeigte eine deutliche, jedoch nicht so ausgeprägte, Steigungsänderung in Konzentrationen > 3 µM. Die prozentuale Hemmung der Tangentensteigung wurde in Form von Konzentrations-Wirkungskurven weiter aufgearbeitet. ASA, Indometacin und Diclofenac erreichten eine maximale Hemmung der Tangentensteigung. Dies ermöglichte die Bestimmung der IC 50.

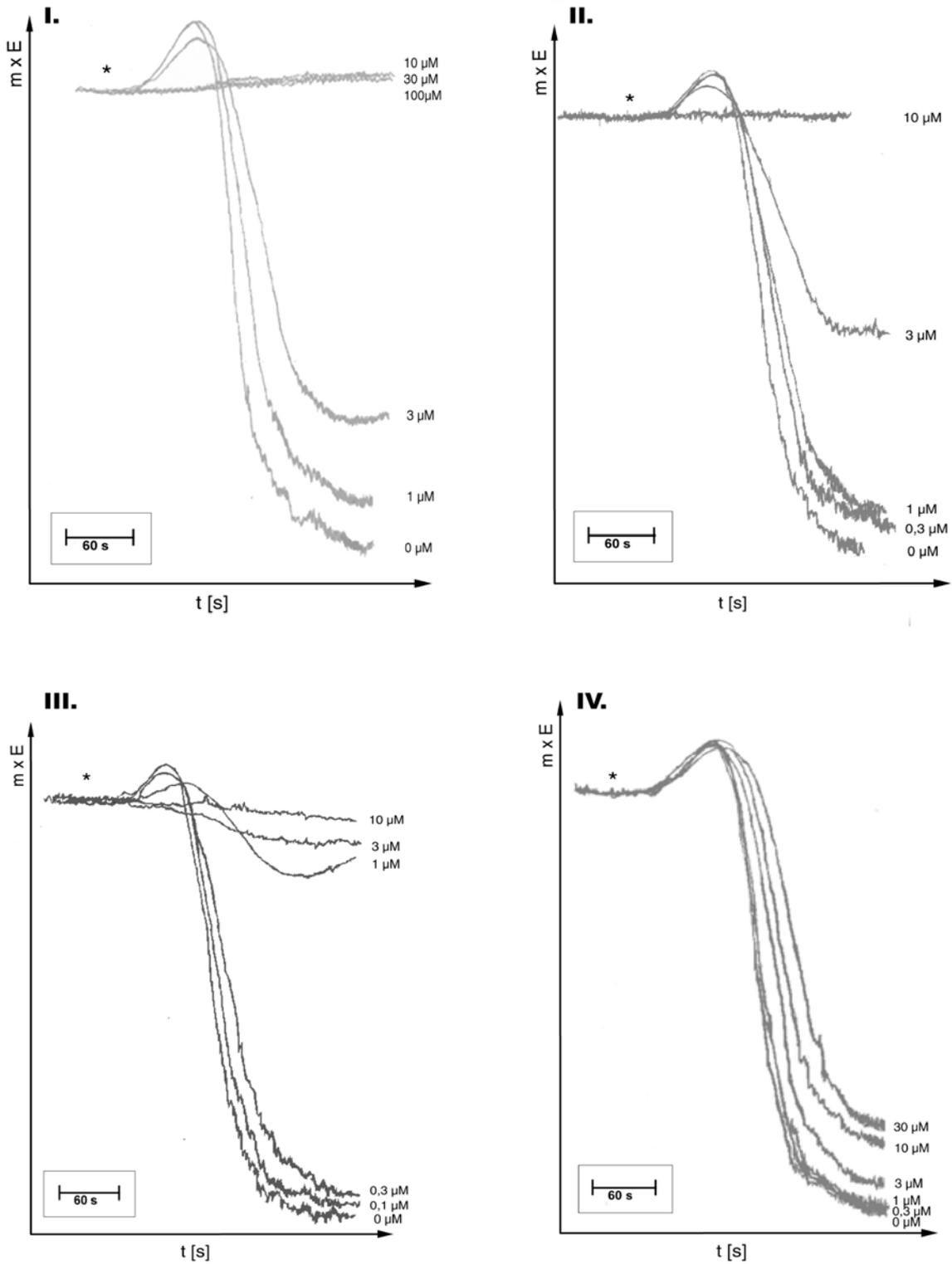


Abb. 6

Originalkurven der Lichtdurchlässigkeitsänderung für die Thrombozytenaggregation von PRP nach Zugabe unterschiedlicher Konzentrationen von ASA (I.), Indometacin (II.), Diclofenac (III.) und NS-398 (IV.). Kollagenzugabe mit * gekennzeichnet.

3.2.2 Hemmung der Thrombozytenaggregation im PRP

Die Konzentrations-Wirkungskurven für ASA (I.), Indometacin (II.), Diclofenac (III.) und NS-398 (IV.) zeigen, dass mit steigender Konzentration der NSAR die Hemmung der Aggregation zunimmt. Die Kurven von ASA, Indometacin und Diclofenac verlaufen sigmoidal. In hohen Konzentrationen trat eine maximale Aggregationshemmung ein. Die Konzentrations-Wirkungskurve von NS-398 zeigt keine maximale Aggregationshemmung und verläuft langsam ansteigend. Ab einer Konzentration von 3 μM NS-398 ist der Unterschied zum Kontrollversuch signifikant (*= $p < 0,05$). Im Gegensatz dazu besteht bei allen Konzentrationen von ASA, Diclofenac und Indometacin ein signifikanter Unterschied zur Kontrolle. ASA zeigt den steilsten Kurvenverlauf.

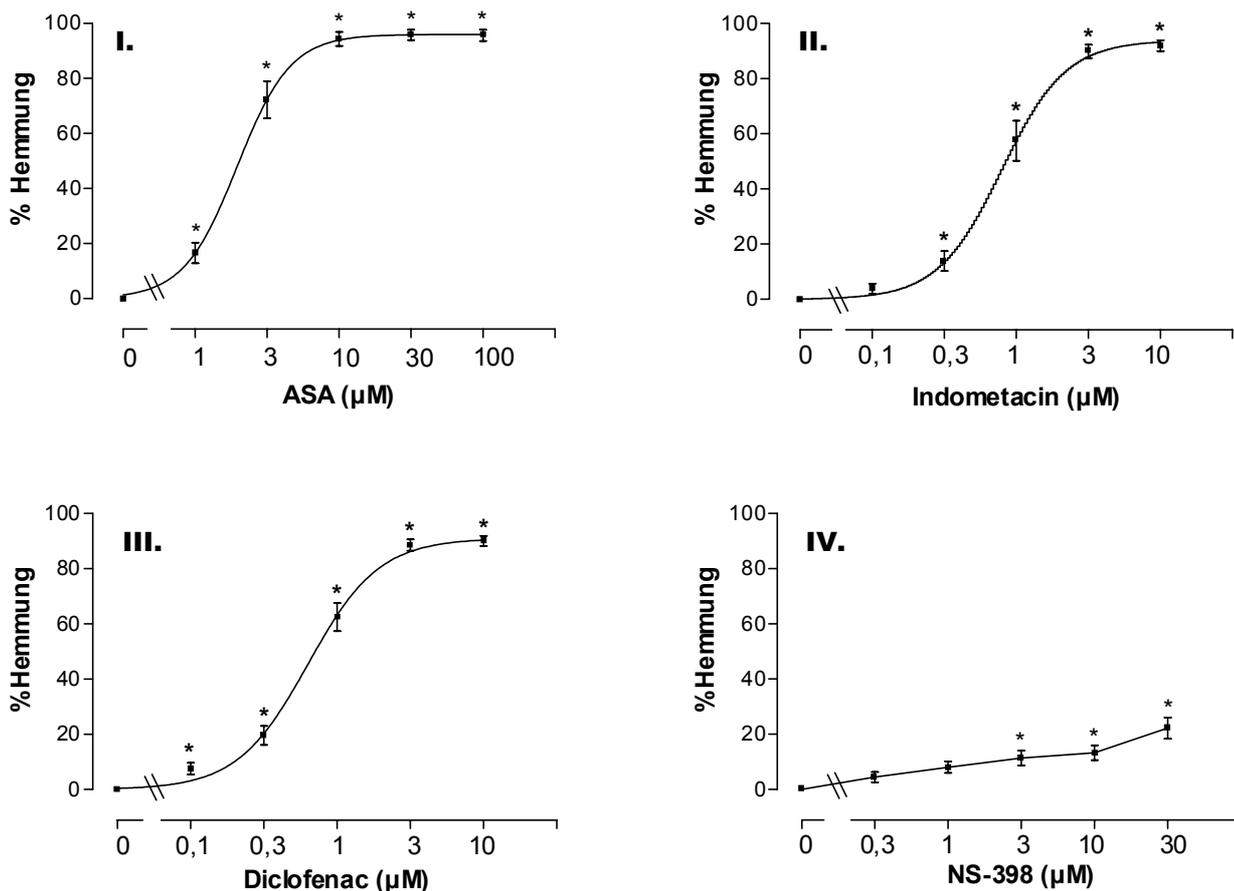


Abb. 7

Prozentuale Hemmung der Thrombozytenaggregation durch ASA (I.), Indometacin (II.), Diclofenac (III.) und NS-398 (IV.) in ansteigenden Konzentrationen.

Aus der Berechnung der halbmaximalen Inhibition durch ASA, Indometacin und Diclofenac ergab sich die Tab. 4. Der Wert der halbmaximale Inhibition (IC 50) der Aggregation entspricht dem Wendepunkt der Konzentrations-Wirkungskurven. Da die Konzentrations-Wirkungskurve von NS-398 kein Maximum zeigt, ist es nicht möglich IC 50-Werte zu erheben.

Tab. 5

Halbmaximale Hemmkonzentration der verwendeten NSAR für die Thrombozytenaggregation

Proband	IC 50-ASA (µM)	IC 50-Indometacin (µM)	IC 50-Diclofenac (µM)
A	2,01	1,77	0,93
B	11,8	3,77	4,69
C	1,16	1,96	1,47
D	1,29	0,96	1,19
E	1,31	0,46	0,55
F	3,39	1,53	1,59
G	1,32	0,64	0,45
H	1,61	0,34	0,56
I	2,34	1,25	0,74
J	1,14	0,56	0,44
K	1,92	0,52	0,42
L	0,08	0,42	0,6
M	2,59	1,48	0,95
N	2,42	0,88	0,4
O	1,03	0,4	0,83
P	2,91	0,9	0,58
Q	1,11	0,75	1,03
R	7,34	1,9	1,12
S	2,91	1,0	0,81
T	5,43	0,58	0,33
MW ± SEM	2,75 ± 0,6	1,10 ± 0,18	0,98 ± 0,21

3.2.3 Hemmung der Thromboxanbildung im PRP

Die im RIA-Labor bestimmten Thromboxanwerte im PRP wurden in Beziehung zu den steigenden Konzentrationen der COX-Inhibitoren gesetzt. Die Abbildung zeigt die Konzentrations-Wirkungskurven von Acetylsalicylsäure (I.), Indometacin (II.), Diclofenac III.) und NS-398 (IV.). Die Hemmung der Thromboxanbildung wird in Prozent der unbehandelten Kontrolle (% Hemmung; Ordinate) dargestellt. Der Verlauf der Konzentrations-Wirkungskurven erinnert an die Konzentrations-Wirkungskurven der Thrombozytenaggregation. Wieder fällt auf, dass ASA, Indometacin und Diclofenac eine maximale Hemmung erreichen. Die halbmaximale Hemmkonzentration konnte bestimmt werden (Tab. 5). Alle verwendeten Konzentrationen weisen eine signifikante Hemmung der Thromboxanbildung auf. Für NS-398 verläuft die Wirkungskurve nicht sigmoidal und zeigt kein absehbares Maximum. Erst ab 1 μM NS-398 unterscheidet sich die Wirkung signifikant von der Kontrolle. Auch hier zeigt die Wirkungskurve von ASA die größte Steilheit.

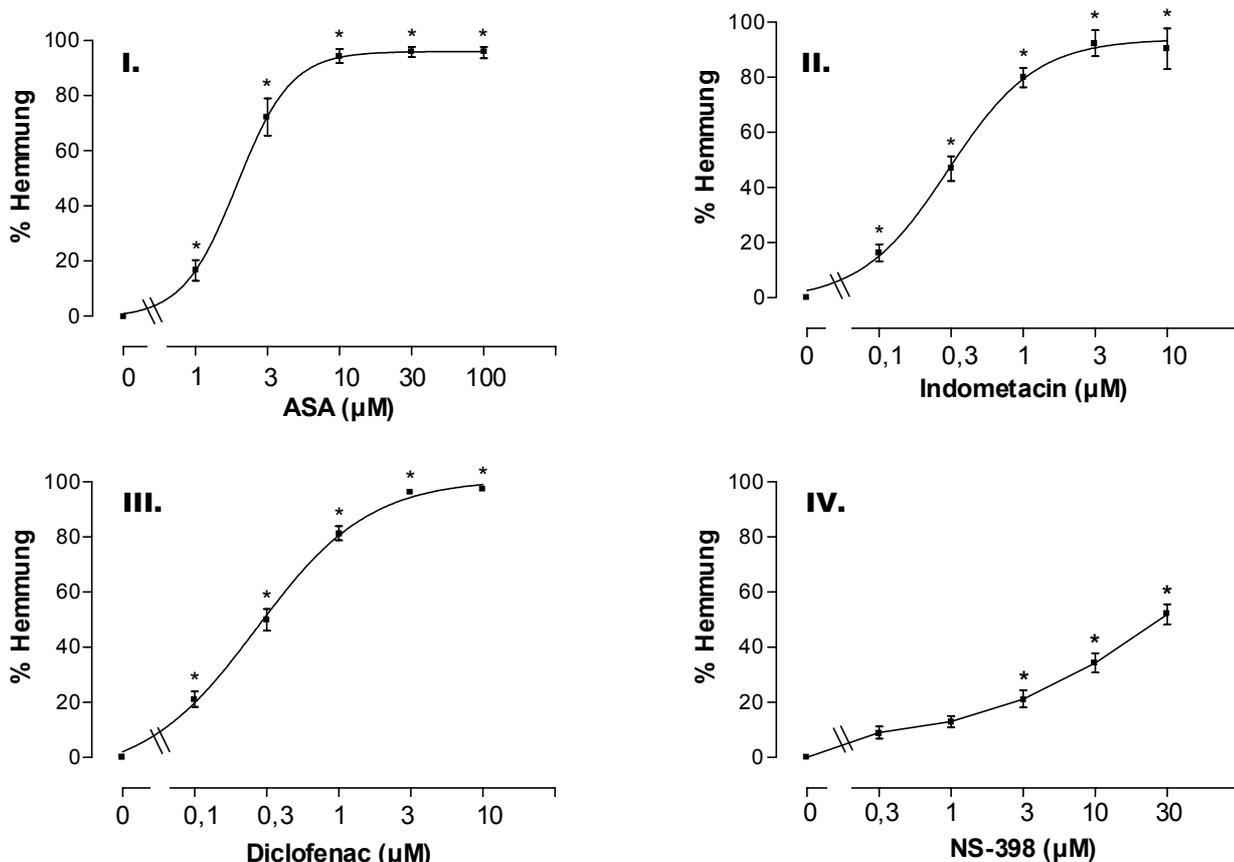


Abb. 8

Prozentuale Hemmung der Thromboxanbildung durch ASA (I.), Indometacin (II.), Diclofenac (III.) und NS-398 (IV.) in ansteigenden Konzentrationen.

Konzentrationen von Acetylsalicylsäure, Indometacin, Diclofenac, die 50 % der maximalen TX-Hemmung bewirken, sind in Tabelle 5 zusammengefasst. Da die Wirkungskurve von NS-398 kein Maximum und keinen sigmoidalen Verlauf zeigt, ist es nicht möglich IC 50-Werte zu bestimmen.

Tab. 6

Inhibitorkonzentration 50 der verwendeten NSAR in Bezug auf die TXB₂-Bildung.

Proband	IC 50-ASA (µM)	IC 50-Indometacin (µM)	IC 50-Diclofenac (µM)
A	1,56	0,75	0,21
B	1,47	0,39	0,28
C	1,02	0,27	0,35
D	1,10	0,51	0,38
E	1,41	0,24	0,26
F	1,88	0,70	0,43
G	0,72	0,20	0,18
H	1,02	0,33	0,22
I	0,98	0,17	0,11
J	0,58	0,18	0,15
K	0,98	0,34	0,19
L	0,83	0,38	0,30
M	1,18	0,34	0,30
N	1,58	0,32	0,36
O	0,90	0,15	0,26
P	1,61	0,45	0,25
Q	1,30	3,18	0,99
R	1,53	0,42	0,29
S	1,43	0,73	0,55
T	2,97	0,83	0,54
MW ± SEM	1,3 ± 0,17	0,54 ± 0,15	0,33 ± 0,04

3.2.4 Hemmung der Thromboxanbildung im Serum

Mit steigender Konzentration der NSAR wird die Thromboxanbildung im nicht-antikoaguliertem Blut vermindert. Alle verwendeten Konzentrationen von ASA (I.), Indometacin (II.), Diclofenac (III.) sowie NS-398 (IV.) in den Konzentrationen von 10 μM und 30 μM zeigen einen signifikanten ($*=p<0,05$) Unterschied von der Kontrolle.

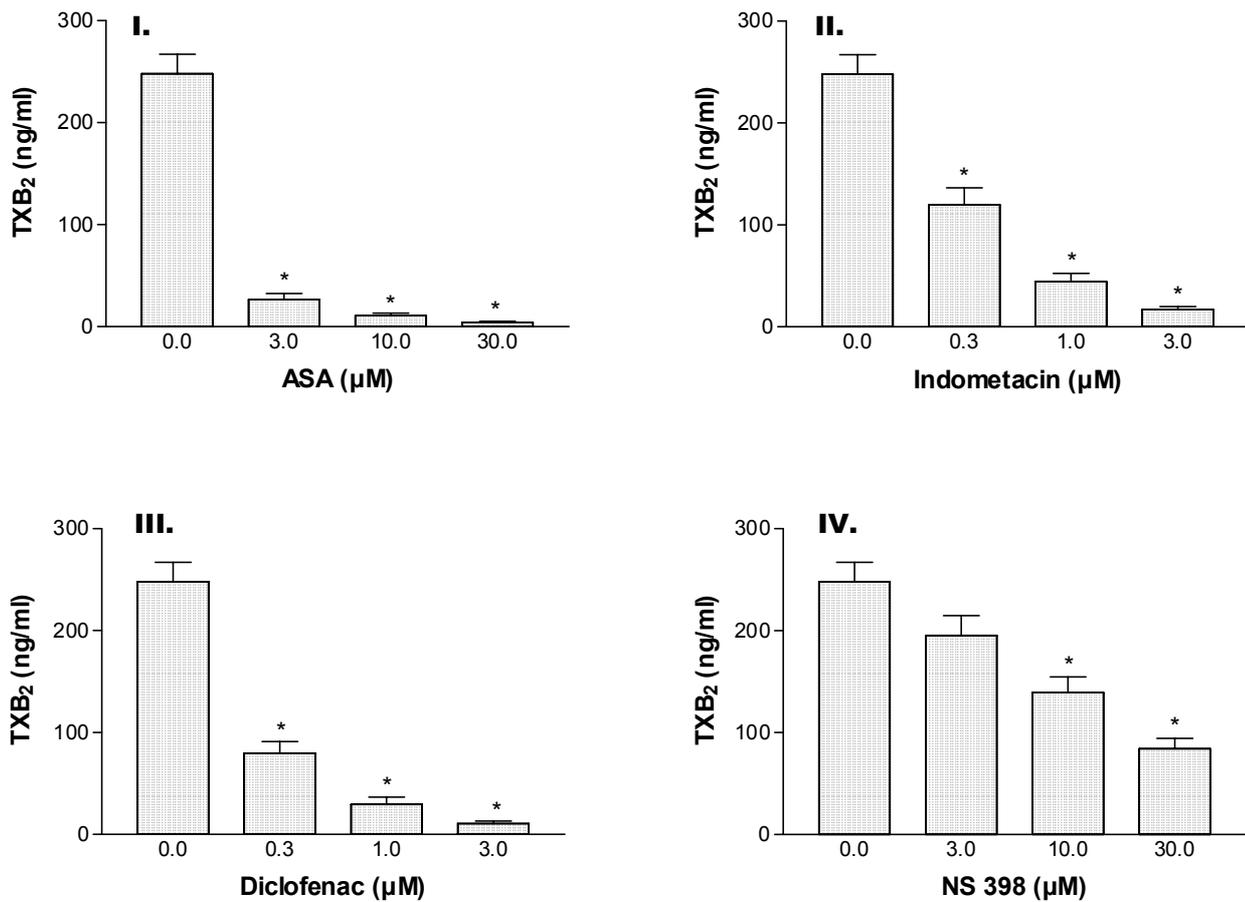


Abb. 9

Hemmung der Thromboxanbildung im Serum unter dem Einfluss von ASA (I.), Indometacin (II.), Diclofenac (III.) und NS 398 (IV.) in ansteigenden Konzentrationen.

3.2.5 IC 50-Korrelationen für die Thrombozytenaggregationshemmung

Die Hemmung der Thrombozytenaggregation durch die COX-Hemmer wird durch folgende Korrelationskurven untersucht. Die nächsten Abbildungen zeigen die Korrelationen mit den entsprechenden statistischen Auswertungen, dem Korrelationskoeffizienten und Signifikanzniveau. In allen Versuchen entsprach die Anzahl der Proben der Probandenzahl ($n=20$).

Die Korrelation von NS-398 mit den anderen COX-Hemmern wurde mit der COX-2 spezifischen Konzentration von $0,3 \mu\text{M}$ durchgeführt.

Zwischen ASA und Indometacin besteht eine positive, signifikante Korrelation ($r=0,77$; $p<0,05$). Dieses Ergebnis überrascht nicht, wenn man bedenkt, dass es sich bei beiden Substanzen um eher COX-1 selektive Verbindungen handelt, die eine ähnliche Aggregationshemmung erwarten lassen.

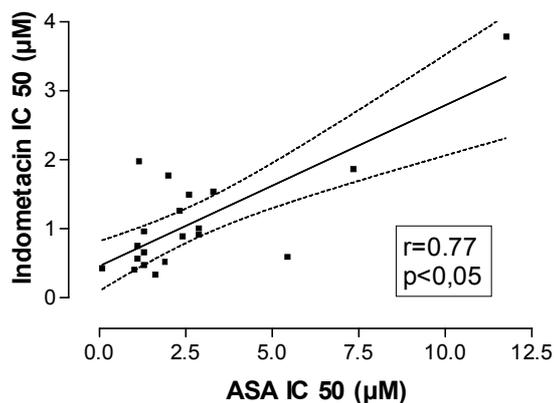


Abb. 10

Korrelation zwischen den IC 50 der Thrombozytenfunktionshemmung von ASA und Indometacin.

Es besteht eine positive, schwache Korrelation zwischen ASA und Diclofenac ($r=0,44$).

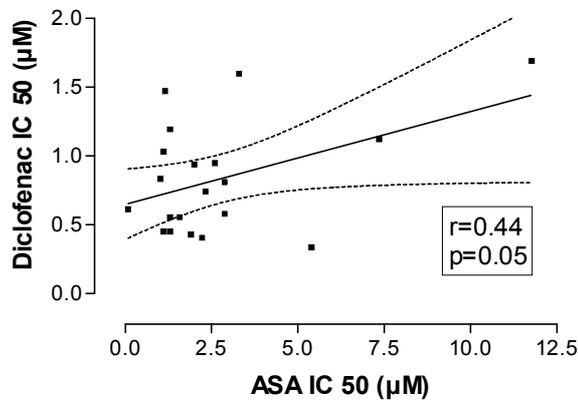


Abb. 11

Korrelation zwischen den IC 50 der Thrombozytenaggregationshemmung von ASA und Diclofenac.

Das Streudiagramm zwischen der Aggregationshemmung durch NS-398 (0,3 µM) und den IC 50 von ASA zeigt keine Korrelation.

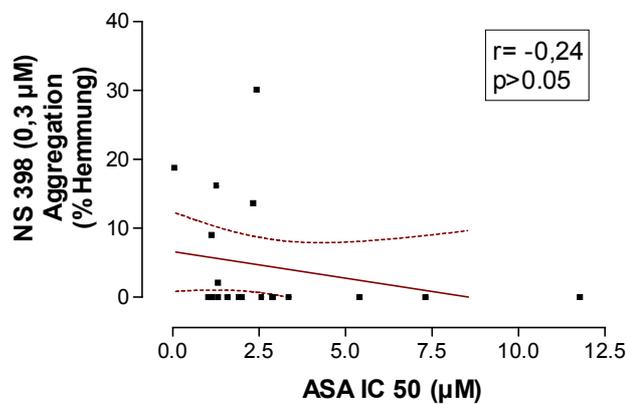


Abb. 12

Korrelation zwischen der IC 50 der Thrombozytenaggregationshemmung von ASA und der prozentualen Aggregationshemmung durch NS-398 in einer Konzentration von 0,3 µM.

Zwischen Indometacin und Diclofenac herrscht eine positive, starke Korrelation ($r=0,78$).

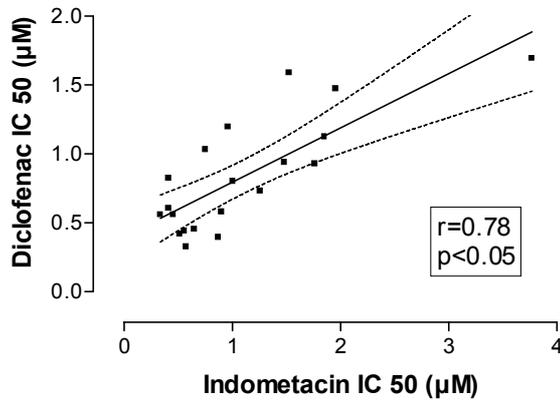


Abb. 13

Korrelation zwischen den IC 50 der Thrombozytenaggregationshemmung von Indometacin und Diclofenac.

NS-398 (0,3 µM) und Indometacin zeigen keine Korrelation.

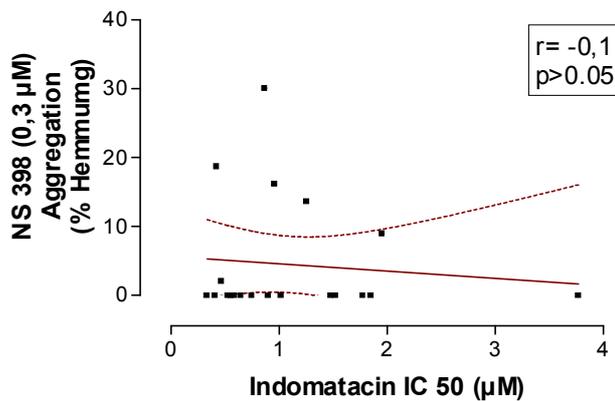


Abb.14

Korrelation zwischen der IC 50 der Thrombozytenaggregationshemmung von Indometacin und der prozentualen Aggregationshemmung durch NS-398 in einer Konzentration von 0,3 µM.

Auch in diesem Streudiagramm zwischen NS-398 0,3 μM und Diclofenac zeigt sich keine Korrelation.

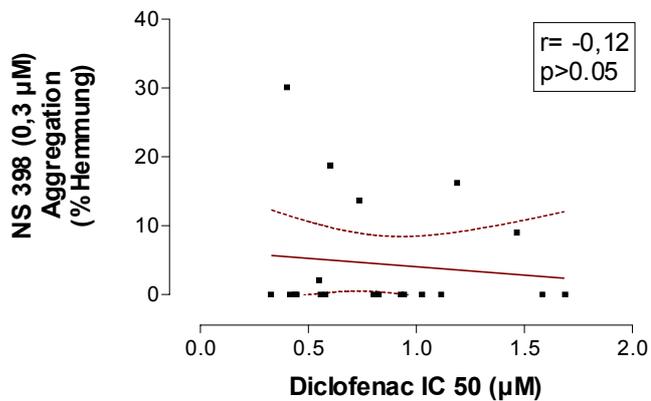


Abb.15

Korrelation zwischen der IC 50 der Thrombozytenaggregationshemmung von Diclofenac und der prozentualen Aggregationshemmung durch NS-398 in einer Konzentration von 0,3 μM .

Zusammenfassend ist festzustellen, dass ASA, Indometacin und Diclofenac bezüglich ihrer Aggregationshemmung eine signifikante Korrelation aufweisen. NS-398 zeigt keine Korrelation zu der Hemmung durch ASA, Indometacin und Diclofenac.

3.2.6 IC 50 Korrelationen für die Hemmung der Thromboxanbildung

Es wurden Korrelationskurven für die Hemmung der TX-Bildung durch die verwendeten NSAR erstellt. Die NS-398-Konzentration wurde auf 0,3 μM festgelegt. Diese garantierte eine ausreichende COX-2-Selektivität.

Das Streudiagramm zwischen ASA und Indometacin zeigt eine starke, positive Korrelation.

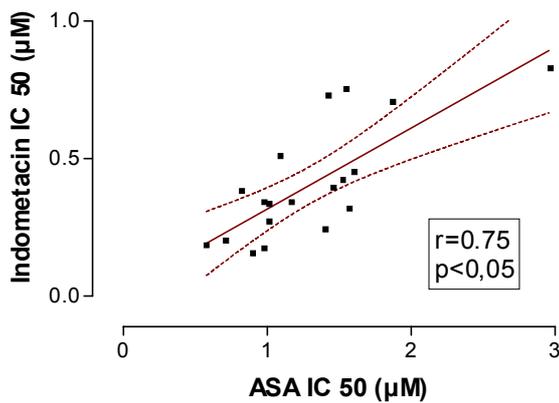


Abb. 16

Korrelation zwischen der IC 50 der Thromboxanhemmung von ASA und Indometacin.

Es besteht eine positive Korrelation zwischen ASA und Diclofenac.

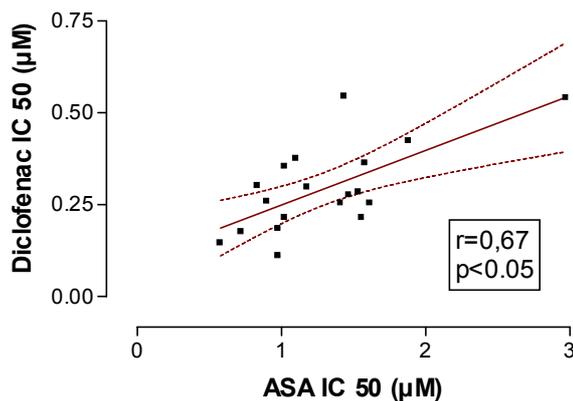


Abb. 17

Korrelation zwischen der IC 50 der Hemmung der Thromboxanbildung von ASA und Diclofenac.

Wie es auch in den Korrelationen der Aggregationshemmung zu beobachten war, zeigt auch die Korrelation zwischen ASA und NS-398 im Hinblick auf die Thromboxanwerte keine Abhängigkeit der Variablen. Es existiert keine Korrelation.

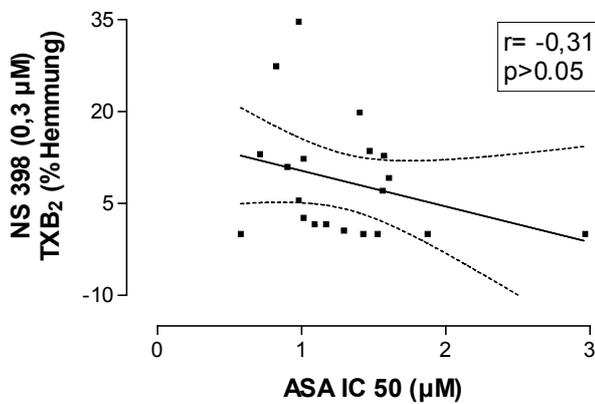


Abb. 18

Korrelation zwischen der IC 50 der Thromboxanhemmung von ASA und der prozentualen Hemmung der Thromboxanbildung bei einer NS-398-Konzentration von 0,3 µM.

Das Streudiagramm zwischen Indometacin und Diclofenac zeigt eine starke, positive Korrelation ($r=0,71$), die sich auch schon im Hinblick auf die Tangentensteigung der Aggregationskurven gezeigt hat.

Es besteht ein signifikanter Zusammenhang zwischen den beiden Substanzen.

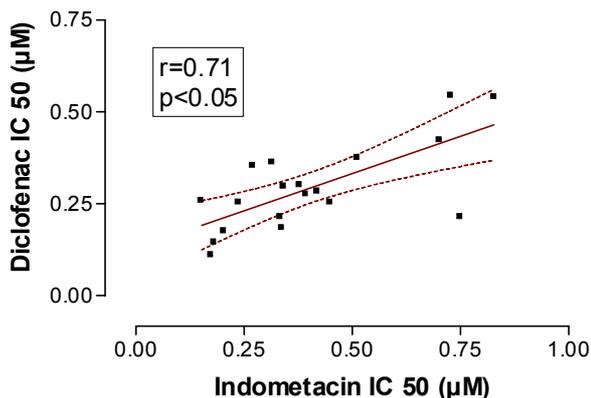


Abb. 19

Korrelation zwischen den IC 50 für die Hemmung der Thromboxanbildung von Diclofenac und Indometacin.

NS-398 (0,3 µM) und Indometacin zeigen eine schwache, negative Korrelation.

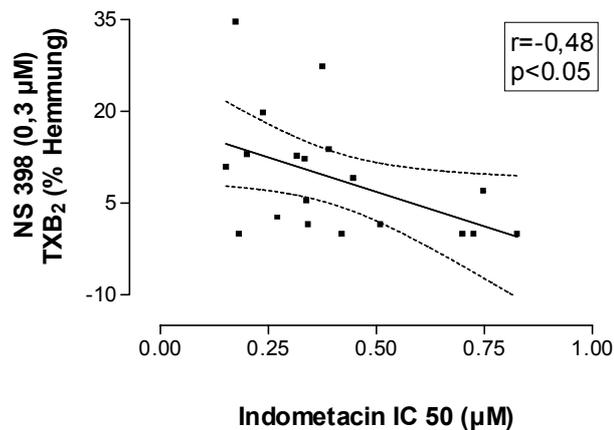


Abb. 20

Korrelation zwischen der IC 50 der Thromboxanhemmung von Indometacin und der prozentualen Hemmung der Thromboxanbildung bei einer NS-398-Konzentration von 0,3 µM.

Zwischen den IC 50 von Diclofenac und der prozentualen Hemmung der Thromboxanbildung bei 0,3 µM NS-398 ist keine Korrelation vorhanden.

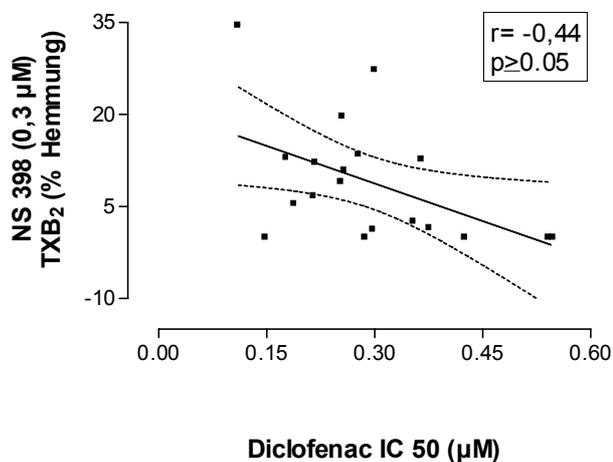


Abb. 21

Korrelation zwischen der IC 50 der Thromboxanhemmung von Diclofenac und der prozentualen Hemmung der Thromboxanbildung bei einer NS-398-Konzentration von 0,3 µM.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass es sich bei den Korrelationen zwischen ASA, Indometacin und Diclofenac um positive, signifikante Korrelationen handelt. Es besteht keine Korrelation zwischen den COX-Inhibitoren und der prozentualen Hemmung der Thromboxanbildung bei einer NS-398-Konzentration von 0,3 µM.

3.2.7 Korrelation zwischen Thrombozytenaggregationshemmung und Hemmung der Thromboxanbildung

Es handelt sich um ein Streudiagramm zwischen den IC 50-Werten von ASA mit positiver, schwacher ($r=0,47$), aber signifikanter Korrelation.

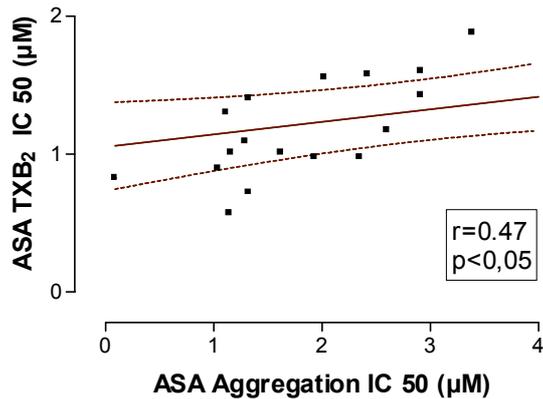


Abb. 22

Korrelation zwischen den IC 50 der Hemmung der Thromboxanbildung und den IC 50 der Thrombozytenaggregationshemmung von ASA.

Das Streudiagramm zwischen den IC 50-Werten von Indometacin zeigt keine Korrelation.

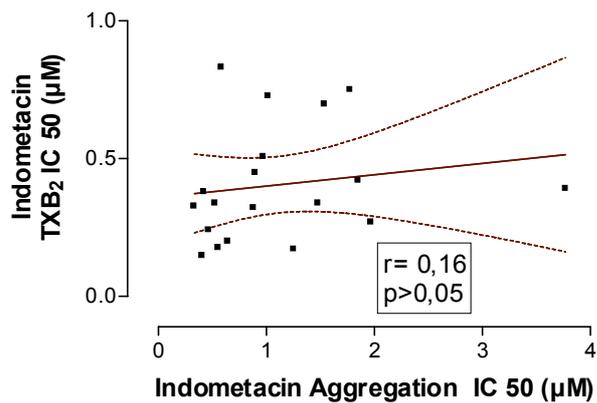


Abb. 23

Korrelation zwischen den IC 50 der Hemmung der Thromboxanbildung und den IC 50 der Thrombozytenaggregationshemmung von Indometacin.

Auch die Korrelationskurve zwischen den IC 50-Werten von Diclofenac zeigt keine Korrelation.

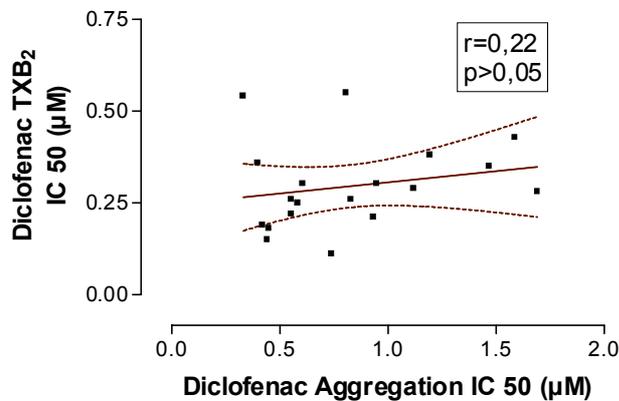


Abb. 24

Korrelation zwischen den IC 50 der Hemmung der Thromboxanbildung und den IC 50 der Thrombozytenaggregationshemmung von Diclofenac.

NS-398 (0,3µM) zeigt keine Korrelation der Thrombozytenaggregation und der Hemmung der TX-Bildung.

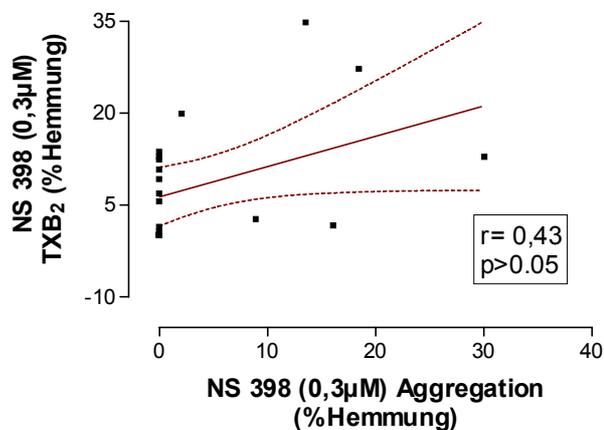


Abb. 25

Korrelation zwischen der prozentualen Hemmung der Thromboxanbildung und der Thrombozytenaggregation bei einer Konzentration von 0,3 µM NS-398.

Zusammenfassend in dieser Auswertungsreihe weist nur ASA einen Zusammenhang zwischen den IC 50-Werten für Aggregations- und Thromboxanhemmung auf. Alle anderen, verwendeten COX-Inhibitoren zeigen, dass kein Zusammenhang zwischen den Tangentensteigungshemmung und der Hemmung der TX-Bildung besteht.

3.2.8 Densitometrische Western-blot-Analyse

Western-blot-Analysen zeigten die COX-2-Expression in den Thrombozyten der Probanden. Die densitometrische Messung wurde mit Hilfe eines EPSON-GJ-8000-Scanners und der Biometra-Scansoftware durchgeführt. Die Bande bei ca. 70 kDa konnte der COX-2-Immunoreaktivität zugeordnet werden. Die weitere statistische Auswertung wurde anhand der Erhebung densitometrischer Werte durchgeführt. Die einzelnen Spuren stehen für die COX-Expression der Thrombozyten jeweils eines Probanden.

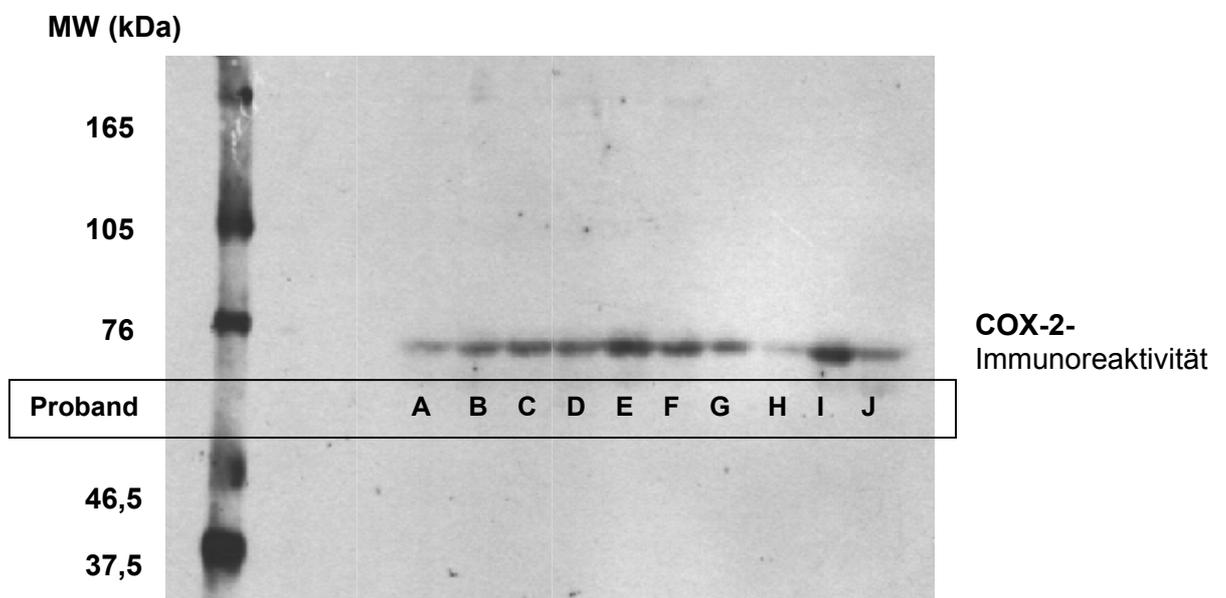


Abb. 30

Repräsentativer Western-blot der COX-2-Immunoreaktivität.

3.3.1 Korrelationen zwischen COX-2-Expression in den Thrombozyten und den IC 50 der Thromboxanhemmung

Die Quantifizierung der COX-2 Expression zeigte keine Korrelation zwischen der COX-2-Expression in Thrombozyten und der Hemmung der TX-Bildung durch die verwendeten NSAR. Da für NS-398 IC 50 nicht berechnet werden konnte, wurde die Thromboxanbildungshemmung für NS-398 in einer Konzentration von 0,3 μM festgelegt. Auch für NS-398 bestand keine Korrelation zwischen der Hemmung der TX-Bildung und der COX-2-Expression in den Thrombozyten.

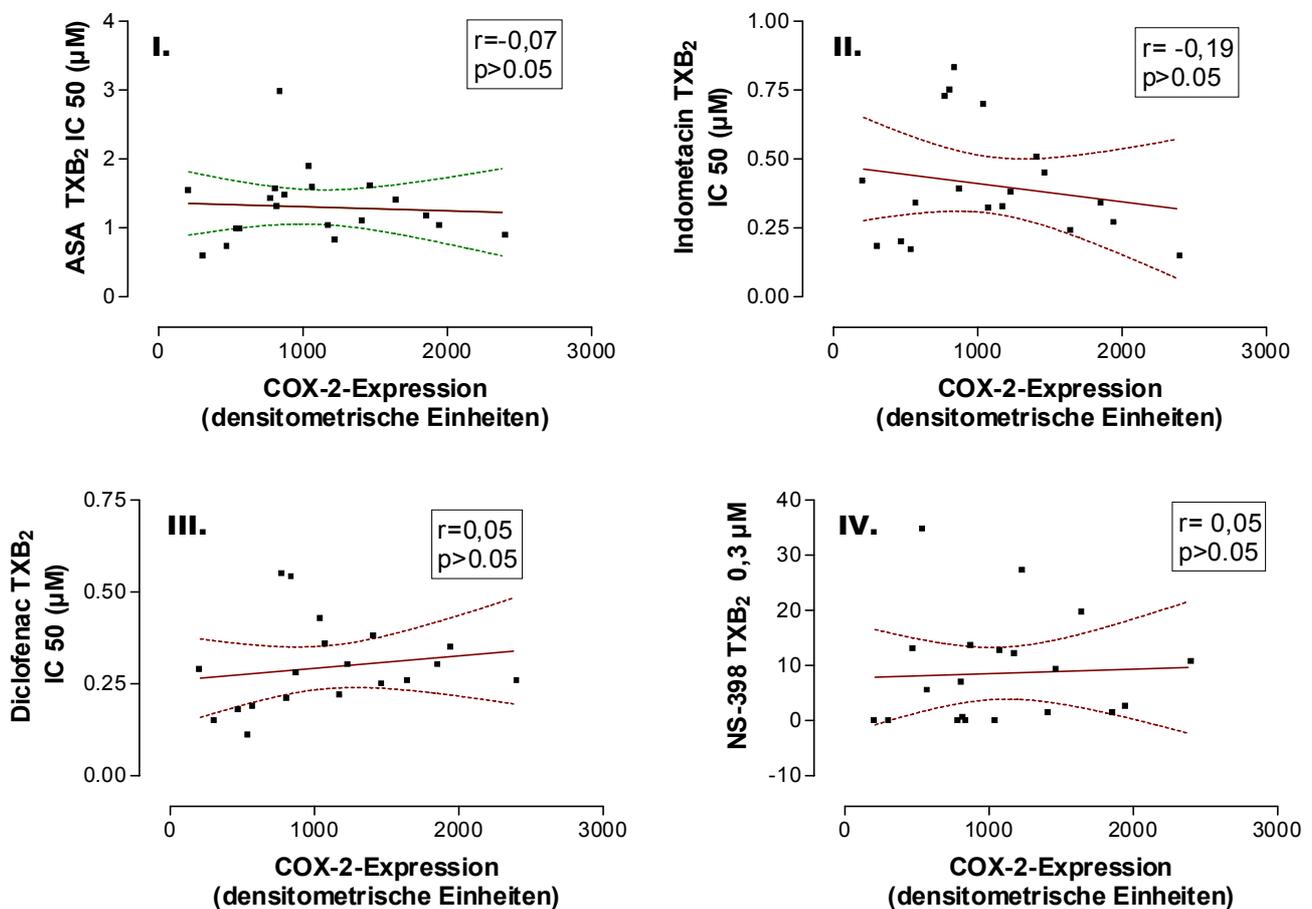


Abb.31

Korrelation zwischen den IC 50 der Hemmung der TXB₂-Bildung durch ASA(I.), Indometacin(II.), Diclofenac(III.), NS-398(IV.) und der COX-2-Expression in den Thrombozyten.

3.3.2 Korrelation zwischen COX-2-Expression in den Thrombozyten und der IC 50 der Aggregationshemmung

Eine Korrelation zwischen den IC 50 der Thrombozytenaggregationshemmung und der COX-2-Expression in den Thrombozyten ist bei den vier verwendeten NSAR nicht nachweisbar. Die Konzentration für NS-398 wurde, aus bereits erläuterten Grund, auf 0,3 μM festgelegt.

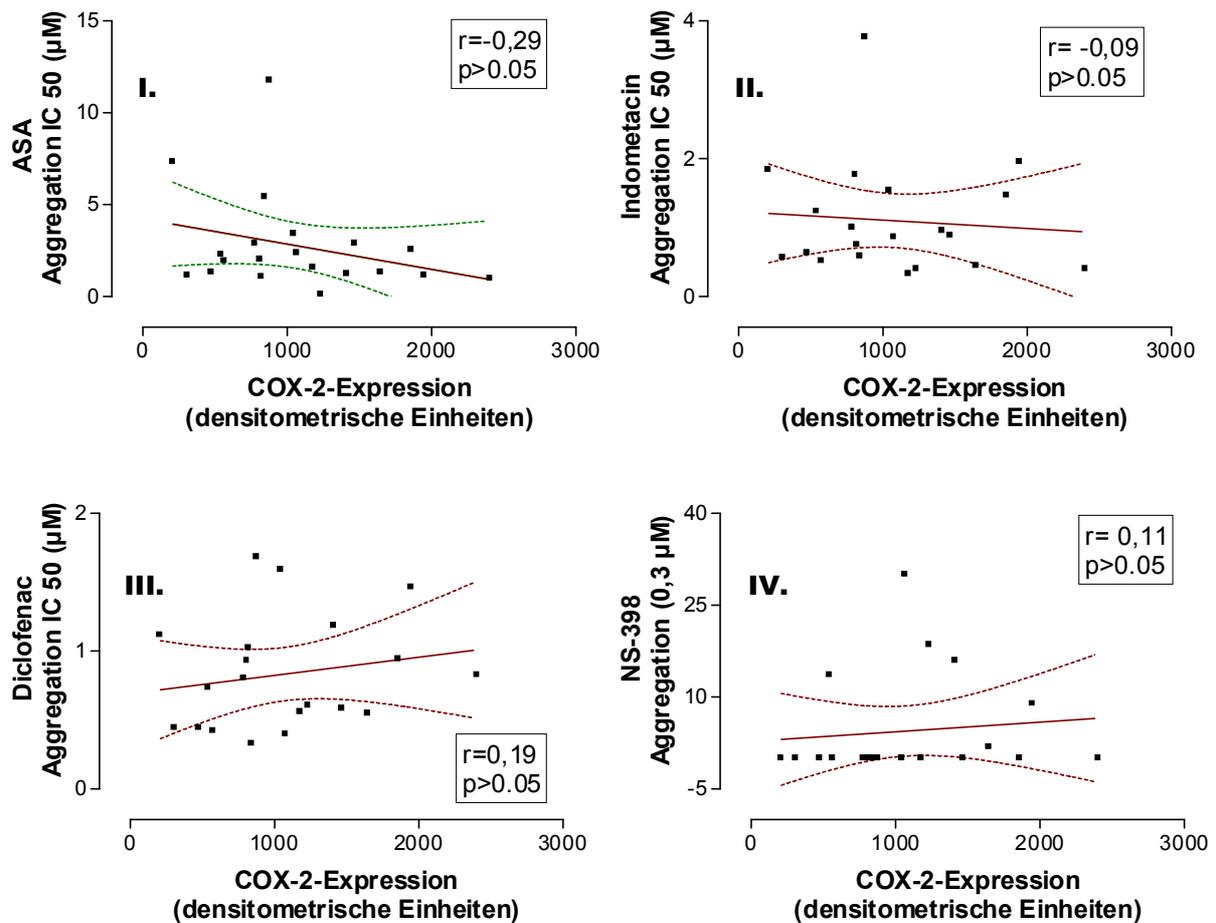


Abb. 32

Korrelation zwischen den IC 50 der Thrombozytenaggregationshemmung durch ASA(I.), Indometacin(II.), Diclofenac(III.), NS-398(IV.) und der COX-2-Expression in den Thrombozyten.

4. Diskussion

Die wesentlichen Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen sich wie folgt zusammenfassen:

1. Die COX-2 ist bei gesunden Probanden zumindest teilweise an der Thromboxansynthese beteiligt, scheint aber keine funktionelle Bedeutung für die Thrombozytenaggregation zu haben.
2. Die interindividuelle Variabilität bei der Ansprechbarkeit der COX-Hemmer ist ein Klassenphänomen, welches Zusammenhänge zwischen der Wirksamkeit der einzelnen COX-Hemmer aufweist.
3. Die Thrombozytenaggregationsmessung in Kollagen-induzierten Aggregationsversuchen hat nur eine limitierte Aussage in Hinblick auf die COX-hemmende Wirkung der verwendeten Substanzen.
4. Die COX-2 scheint für die ASA-Resistenz *in vitro* keine bedeutende Rolle zu spielen.

4.1 COX-2-Expression in Thrombozyten

Lange herrschte Unklarheit, ob die COX-2 neben Niere(35), Magenmukosa(38), Hirngewebe(36) oder Epithel der Trachea(37) auch in Thrombozyten exprimiert wird. Da die Expression der COX-2 auf mRNA und auf Proteinebene in einer megakryozytären Zelllinie nachgewiesen werden konnte (85), wurde durch Weber et al die mögliche Expression der COX-2 in Thrombozyten untersucht. Es konnten in der Western-blot-Analyse die COX-2-Immunoreaktivität in Thrombozyten von mehr als 20 gesunden Probanden nachgewiesen werden. Darüberhinaus konnte der Nachweis von COX-2 mRNA in Thrombozyten erbracht werden(34;86). Nach dieser Erstbeschreibung wurde dieser Befund kontrovers diskutiert.

Dabei wurden verschiedene Aspekte hervorgehoben(87):

1. andere Arbeitsgruppen konnten die COX-2 in Thrombozyten nicht nachweisen
2. Kontamination des verwendeten Plasmas durch Leukozyten

Zu 1:

Zwischenzeitlich wurde eine Kreuzreaktivität des zur Erstbeschreibung der COX-2-Expression in Thrombozyten und auch in dieser Arbeit verwendeten Antikörpers(34) (monoklonaler Antikörper C22429, Transduction Laboratories) angenommen. In jüngster Zeit wird jedoch laut Hersteller eine COX-2-Spezifität garantiert. Um sich mit

dieser Kritik auseinander zu setzen, wurden andere Methoden und Materialien verwendet, um den COX-2-Nachweis in Thrombozyten zu prüfen.

Zusätzliche Western-blots mit einem weiteren anti-COX-2-Antikörper wurden durchgeführt. Dieser anti-Peptid-Antikörper bindet an einer spezifischen COX-2-Sequenz (Aminosäuren 580-599), die in dieser Form keine Wiederholung in der COX-1-Sequenz findet. Auch mit diesem Antikörper konnte COX-2-Expression in Thrombozyten detektiert werden. Inzwischen wurde in Anlehnung an die Messung der thrombozytären VASP(88), eine Methode zum durchflusszytometrischen Nachweis der COX-1 und COX-2 etabliert(53). Diese Methode hat den Vorteil, dass Thrombozyten anhand ihrer Streulichteigenschaften von anderen Blutzellen differenziert werden können. Diese Differenzierung kann durch Anfärbung Thrombozyten-spezifischer Proteine wie CD41 und CD42b, verifiziert werden. Mit Hilfe dieser neu etablierten Methode wurde eine im Vergleich zu unspezifischen Antikörpern, signifikante COX-2-spezifische Fluoreszenz detektiert.

Dabei waren die Fluoreszenzsignale nur in permeabilisierten Thrombozyten nachweisbar, was für eine intrazelluläre Lokalisation spricht. Zusätzliche Spezifitätskontrollen wurden mit blockierenden Peptiden durchgeführt. Das zur Immunisierung benutzte COX-2-Peptid hemmte das Fluoreszenzsignal vollständig, während ein Peptid aus der COX-1-Sequenz nur marginale Hemmeffekte aufwies. Die thrombozytäre Expression eines COX-2-immunoreaktiven Proteins wurde bei einem Patienten mit aortokoronarer Bypass-Operation exemplarisch dargestellt(89). Bei diesem Patienten kam es, bei vorhandener basaler Expression, zu einem transienten Anstieg der COX-2-Immunoreaktivität mit einem Maximum am 5. Tag nach der Operation. Interessanterweise war bei diesem Patienten die COX-1-Immunoreaktivität im zeitlichen Verlauf unverändert(89). Auch die durchflusszytometrische ermittelte COX-2-Fluoreszenzintensität entsprach bei diesem Patienten exakt dem zeitlichen Verlauf der durch Western-blot analysierte COX-2-Immunoreaktivität. In Übereinstimmung mit der Western-blot-Analyse änderte sich die COX-1-Fluoreszenzintensität auch in der durchflusszytometrischen Analyse im zeitlichen Verlauf nicht.

Zu 2:

Im menschlichem Blut ist die COX-2 sowohl in Thrombozyten als auch in Leukozyten exprimiert. Um die COX-2-Expression vom Thrombozyten im Plasma zu untersuchen, ist es notwendig eine Kontamination mit Leukozyten auszuschließen.

Deshalb wurde von jeder Plasmaprobe (PRP) ein Austrich angefertigt. Die Differenzierung zwischen Thrombozyten und Leukozyten wurde mittels DNA-Anfärbung durchgeführt. Im Gegensatz zum Vollblutausstrich (Abb. 5 (I.)) wurde im PRP (Abb.5 (II.)) auf 20-50 Gesichtsfelder nur eine kernhaltige Zelle nachgewiesen. Durch diesen Nachweis konnte wahrscheinlich gemacht werden, dass die in den Western-blots aufgezeigte COX-2- Expression tatsächlich thrombozytären Ursprungs war.

Aus den Aspekten von Punkt eins und zwei kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass in der vorliegenden Arbeit tatsächlich der Nachweis der thrombozytären COX-2 durchgeführt wurde.

4.2 Bedeutung der COX für die Thromboxanbildung.

Die Cyclooxygenase (COX) ist das Schlüsselenzym bei der Synthese von Prostaglandin aus dem Arachidonsäurestoffwechsel. Die Prostaglandin-Endoperoxide sind unmittelbare Vorläuferstufen der Prostaglandine (z. B. Prostacyclin, PGE₂, PGF_{2α}) und TXA₂. Thromboxan wirkt proaggregatorisch und vasokonstriktorisch. So kann TX in pathophysiologischer Hinsicht zu intravasalen Thrombenbildung führen. Zur Verhinderung solcher thrombotischer Ereignisse werden COX-Hemmer, wie z. B. ASA therapeutisch und prophylaktisch eingesetzt (32). Dabei ist für einen klinisch relevanten antithrombotischen Effekt eine Hemmung der TX-Bildung von > 90 % notwendig(90). Unter dieser Annahme ist der Effekt der COX-2-Expression in Thrombozyten, als möglicher Faktor von therapeutischen Versagen von COX-Hemmern zu berücksichtigen(34).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Hemmung der TX-Bildung durch ASA, Indometacin, Diclofenac und NS-398 untersucht (Abb. 8). Zusammenfassend wirken ASA, Indometacin und Diclofenac signifikant auf die TX-Bildung in jeder verwendeten Konzentration. NS-398 wirkt ab einer Konzentration $\geq 3 \mu\text{M}$ (nicht COX-2 spezifisch) signifikant auf die TX-Bildung. Eine nicht signifikante Hemmung der TX-Bildung ist für NS-398 auch in niedrigeren Konzentrationen sichtbar. Der Verlauf der Kurven lässt es zu, Rückschlüsse auf die Wirkungsart der COX-Inhibitoren zu ziehen. ASA zeigt im Gegensatz zu den kompetitiv wirkenden COX-Inhibitoren, wie Indometacin und Diclofenac, eine sigmoidale, steile Kurve, in welcher ein geringer Abstand zwischen

der maximalen und der minimalen Hemmung zu erkennen ist. Es gilt sozusagen eine „Alles oder Nichts“-Regel.

Dies spricht für COX-1-Hemmung als in diesem Zusammenhang entscheidendes Enzym. Auch die Korrelationen zwischen der COX-2-Expression in Thrombozyten und der TX-Bildungshemmung durch die verwendeten COX-Hemmer waren nicht signifikant (Abb.31). Die Hypothese, dass die COX-2 relevant für einen antithrombotischen Effekt, im Sinne einer TX-Bildungshemmung, konnte nicht bestätigt werden. Auch andere Arbeitsgruppen konnten keine entscheidende Hemmung der Thromboxanbildung oder Thrombozytenaggregation durch COX-2-spezifische Inhibitoren beobachten(86). Eine etwa 10%-ige Hemmung der thrombozytären Thromboxanbildung durch NS-398 wurde jedoch von anderen Arbeitsgruppen beschrieben(52). Es ist nicht auszuschließen, dass zumindest ein kleiner Teil der Thromboxansynthese über die COX-2 katalysiert wird.

4.3 Einfluss der COX- Inhibitoren auf die Thrombozytenaggregation

Die Thrombozytenaggregation stellt einen komplexen Vorgang dar(15;16). Thromboxan gehört zu den primären Mediatoren, die zu einer Thrombozytenaktivierung führen. Eine Hemmung der Thrombozytenaggregation ist somit über die Hemmung der COX möglich. Die Untersuchung der Aggregationskurven (Abb. 6, Abb. 7) ergab, dass vor allem ASA, Indometacin und Diclofenac die Thrombozytenfunktion, im Sinne ihrer Aggregabilität, inhibieren. Die Zugabe von NS-398 bewirkte in COX-2-spezifischen Konzentrationen keine signifikante Thrombozytenaggregationshemmung (Abb. 7(IV.)). Der Unterschied zwischen NS-398 und den anderen verwendeten COX-Hemmern wird in den Original-Aggregationskurven der Akutversuche sichtbar. Die Steilheit der Aggregationskurven nimmt mit zunehmender NS-398-Konzentration langsam ab. Eine komplette Hemmung, wie sie zum Beispiel bei einer ASA-Konzentration von 30 μM zu beobachten ist, wird nicht erreicht. Einschränkend ist zu erwähnen, dass aufgrund von Löslichkeitsproblemen für NS-398 keine höhere Konzentration als 10 μM verwendet werden konnte. Erst in Konzentrationen $\geq 3 \mu\text{M}$ wird die Hemmung der Thrombozytenaggregation für NS-398 signifikant. Dagegen war die Hemmung durch ASA, Indometacin und Diclofenac in allen Konzentrationen (außer Indometacin 0,1 μM) signifikant (Abb. 7).

Die Kurven von ASA, Indometacin und Diclofenac verliefen sigmoidal und eine maximale Hemmung konnte als Plateau in der prozentualen Hemmung der Thrombozytenaggregation erreicht werden. Die halbmaximale Hemmkonzentration für ASA, Indometacin und Diclofenac wurde berechnet (Tab. 4, Tab. 5).

Die Korrelationen zwischen der COX-2-Expression in den Thrombozyten und den IC₅₀ der verwendeten COX-Hemmer waren nicht signifikant. Auch die Korrelation zwischen der COX-2-Expression und der prozentualen Thrombozytenaggregationshemmung für NS-398 (in einer Konzentration von 0,3 µM) war nicht signifikant. Folglich konnte eine signifikante Beteiligung der COX-2 für die Thrombozytenaggregation in der vorliegenden Arbeit nicht gezeigt werden. Es besteht zudem kein, hier nachweisbarer, Zusammenhang zwischen der COX-2-Expression in den Thrombozyten und ihrer Hemmbarkeit durch die verwendeten COX-Inhibitoren.

4.4 Interindividuelle Variabilität der COX-Inhibitoren als Klassenphänomen?

Trotz standardisierten Konzentrationen der verwendeten COX-Hemmer war in den Versuchen eine unterschiedliche Ansprechbarkeit festzustellen (Tab. 5/6). Dies spricht für eine interindividuelle Variabilität für die Hemmung der Thrombozytenaggregation sowie für die Hemmung der TX-Bildung. Dieses Phänomen ist bekannt und kann zum Beispiel durch eine Variabilität in der Pharmakokinetik oder Pharmakodynamik erklärt werden(80). So können Polymorphismen im COX-1-Gen mit einer verminderten Hemmbarkeit einhergehen(62). Zudem besitzen Thrombozyten Thromboxan-unabhängige Verstärkungsmechanismen, wie zum Beispiel eine Freisetzung von ADP. Ein vermindertes Ansprechen auf ASA ist auch bei erhöhter Sensitivität gegenüber Kollagen beschrieben(81). Methodische Einflüsse durch die Verwendung von PRP könnten ebenfalls einen Erklärungsansatz bieten. Die differierende Thrombozytenanzahl im Pellet, wie auch interthrombozytäre Wechselwirkungen im hochkonzentrierten PRP stellen wichtige Faktoren dar. Insgesamt muss von einem multifaktoriellen Geschehen ausgegangen werden.

Intraindividuell wurde eine signifikante Korrelation (Abb.10, 13, 16, 17, 19) für die nicht-selektiven, verwendeten NSAR (ASA, Indometacin, Diclofenac) festgestellt. Lassen sich die Thrombozyten gut, z.B. durch ASA hemmen, kann geschlussfolgert werden, dass auch die anderen COX-Hemmer gut auf diese Thrombozyten wirken. Auch NS-398 in nicht mehr COX-2-selektiven Konzentrationen zeigt schwache, negative, z.T. signifikante Korrelationen mit den anderen COX-Hemmern.

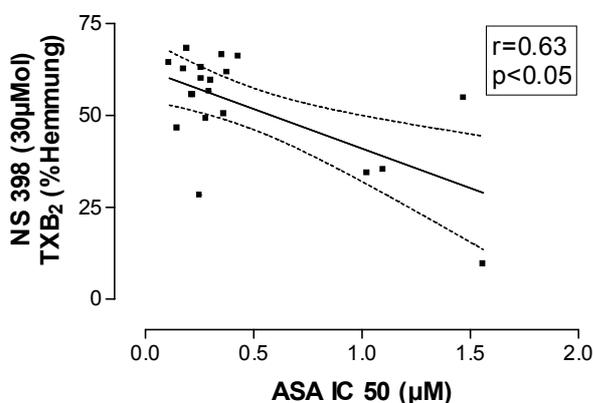


Abb. 33

Beispiel einer Korrelation zwischen der IC₅₀ der Thromboxanhemmung von ASA und der prozentualen Hemmung der Thromboxanbildung bei einer nicht COX-2-selektiven NS-398-Konzentration von 30 µM.

Diese Ergebnisse sprechen für ein Klassenphänomen für die Inhibitoren der COX-1. Daraus ergab sich die klinische Fragestellung, ob die Therapie mit nicht-selektiven NSAR eine ausreichende antithrombotische Wirkung erzielen kann, welche eine ASA-Therapie ersetzen könnte. Indometacin und Diclofenac hemmen die COX reversibel und kompetitiv. Obwohl Diclofenac die TXB₂-Bildung hemmt und eine Thrombozytenaggregationshemmung bewirkt, kommt es zu keiner Verlängerung der Blutungszeit(91-93). Dieser Effekt kann auf eine relativ kurze Halbwertszeit ($t_{1/2} = 2$ Stunden) zurückgeführt werden. Dieser fehlende Einfluss auf die Blutungszeit durch Diclofenac ist eine Erklärung dafür, warum NSAR nicht generell als antithrombotische Therapie verwendet werden können. NSAR werden vor allem in analgetisch wirksamen Dosierungen benutzt und erreichen dabei eine reversible COX-Hemmung von 70-90 %(62). Dies scheint bei einer erheblichen TX-Synthese durch die Thrombozyten nicht ausreichend für eine adäquate Thrombozytenaggregationshemmung zu sein(90;94). Diese These wird gestützt durch eine prospektive Studie für postmenopausale Frauen. Dabei konnte keine effektive, klinisch nachweisbare Kardioprotektion durch reversible und inkomplette Hemmung der Plättchen-COX durch NSAR, nicht ASA, erreicht werden(95). Zusammenfassend kann eine Therapie mit nicht selektiven NSAR, die ASA-Therapie nicht ersetzen. Die hier zusätzlich untersuchte COX-2-Expression in Thrombozyten zeigte keinen Zusammenhang für die Ansprechbarkeit der Thrombozyten auf die verwendeten COX-Hemmer. Klinisch ist vor allem die ASA-Resistenz für die antithrombotische Prophylaxe bzw. Therapie von Bedeutung. *In vitro* zeigte sich keine Korrelation zwischen der COX-2-Expression und Thrombozytenaggregationshemmung bzw. Hemmung der TX-Bildung. Die Ursache für die interindividuelle Variabilität scheint nicht in der differentiellen COX-2-Expression zu liegen.

4.5 ASA-Resistenz

Die Entdeckung der COX-2 in Thrombozyten führte zu der Fragestellung, welche Bedeutung diese für die Funktion der Thrombozyten hat. Ereignisse, wie die ASA-Resistenz wurden mit der COX-2-Expression in Zusammenhang gebracht(34). Eine unvollständige Hemmung der Thrombozytenaggregation unter ASA-Therapie tritt in bis zu 57 % der behandelten Patienten mit einem zerebro-, kardiovaskulärem Geschehen oder peripherer arterieller Erkrankung auf(76-78;96;97). Außerdem

schien bis zu einem Drittel der Patienten auch bei höherer Dosierung eine ASA-Resistenz zu entwickeln(62). Die klinische Folge ist Therapieversagen(98). Die Ursachen sind komplex und ein Versagen der ASA-Wirkung kann sowohl pharmakodynamische als auch pharmakokinetische Ursachen haben(21). Mehr als 90 % TX-Hemmung ist notwendig, um einen antithrombotischen Effekt von ASA zu erreichen(90). So könnten schon geringe Mengen an COX-2 einen Einfluss auf die klinische Wirksamkeit von ASA haben(99). Deswegen ist es *in vivo* wünschenswert eine nahezu komplette Hemmung der Thromboxansynthese zu erreichen.

In anderen Untersuchungen hingegen konnte eine solche ASA-Resistenz nicht beobachtet werden(100-102). Die Ursache für diese unterschiedlichen Befunde mag daran liegen, dass es für die ASA-Resistenz keine einheitliche Definition gibt. Der Begriff wurde bisher zur Beschreibung von einer Reihe unterschiedlicher Phänomene benutzt. So versteht man unter der ASA-Resistenz das Eintreten eines atherothrombotischen Ereignisses, eine fehlende Verlängerung der Blutungszeit, eine unzureichende Hemmung der Thrombozytenaggregation oder eine reduzierte Hemmung der thrombozytären Thromboxanbildung *in vitro* unter einer Therapie mit ASA(62).

In der vorliegenden Arbeit wurde der Zusammenhang zwischen der COX-2-Expression in Thrombozyten und der Thrombozytenaggregation bzw. der Thromboxanbildung unter dem Einfluss von den verwendeten COX-Hemmern untersucht (Abb. 31, 32). Die Ergebnisse konnten nicht zeigen, dass die COX-2-Expression in Thrombozyten eine Rolle bei der Thromboxansynthese spielt. Die Hemmung der TX-Bildung durch NS-398 (in COX-2-spezifischen Konzentrationen) war nicht signifikant (Abb. 9(IV.)). Zudem ergab sich kein Zusammenhang zwischen der COX-2-Expression und der Hemmung der TX-Bildung durch NS-398 (Abb. 31(IV.)). Die ASA-Resistenz ist inzwischen von Weber et al. typisiert worden (Tab.2). Als Ursache für die pharmakodynamische Resistenz (TypII) konnte in der vorliegenden Arbeit die COX-2-Expression *in vitro* nicht bestätigt werden.

Das Ziel einer ASA-Resistenz-Typisierung ist es, eine antithrombotische Therapie für Patienten nach Resistenz-Profil anzupassen. Dafür wäre die Entwicklung eines Schnelltests denkbar, welcher die Entdeckung des Therapieversagens bzw. der Resistenz erleichtern und einen frühzeitigen Übergang auf andere Plättchenfunktionshemmer ermöglicht. Ein Therapieversagen könnte dann, bei Compliance des Patienten, weitgehend ausgeschlossen werden und thrombotische

Rezidive verhindert werden. In diesem Zusammenhang der angepassten antithrombotischen Therapie wurde auch die Wirkung von ASA auf Raucher untersucht(103). Da Nikotin zu einem der Risikofaktoren für die Entwicklung einer koronaren Herzerkrankung, als auch für andere Gefäßerkrankungen gehört(104), ist es von Interesse, diese Risikogruppe, im Hinblick auf eine gezielte antithrombotische Therapie zu untersuchen. Auch wenn die Mechanismen nicht genau bekannt sind, ist eine Veränderung der Plättchenfunktion bei einem rauchenden Patienten von Bedeutung in Hinblick auf das Risikoprofil für den Myokardinfarkt oder plötzlichen Herztod(105;106).

56 verschiedene Studien(107) wurden inzwischen vorgenommen, um den Zusammenhang zwischen Rauchen und Plättchenaggregation zu klären.

Zwei wesentliche Effekte konnten beobachtet werden:

- ein akuter Anstieg der Aggregabilität direkt nach dem Rauchen einer Zigarette und
- eine langfristige Reduktion der Aggregabilität in den Phasen zwischen den Zigaretten.

Ein weiterer ASA-Effekt auf die Thrombozytenaggregation bei Rauchern bzw. Nichtrauchern war jedoch bei Untersuchungen in unserer Arbeitsgruppe nicht nachzuweisen(103). Die ASA bewirkte bei beiden Gruppen eine vergleichbare Hemmung sowohl der Aggregation als auch der Thromboxanbildung. Auch die COX-2-Expression in den Thrombozyten korrelierte nicht signifikant mit dem inhibierenden Effekt von ASA auf die Thrombozyten von Rauchern und Nichtrauchern. Dieser Effekt mag jedoch unter klinischen Bedingungen anders sein.

4.6 Thrombozytenaggregation als Marker für COX-Hemmung

Obwohl sich die Wirkung der COX-Hemmer klar auf die Thromboxan-abhängigen Plättchenfunktionen beschränkt, ist eine häufig benutzte Methode zur Abschätzung der Wirkung die Messung der Thrombozytenaggregation.

Zum einen wird durch COX-Hemmung, zum Beispiel die Kollagen-induzierte (low-dose, $\leq 1 \mu\text{g/ml}$) Plättchenaggregation gehemmt, zum anderen existieren auch Thromboxan-unabhängige Aktivierungsmechanismen. Eine Thromboxanunabhängige Plättchenaggregation kann z. B. durch höhere Kollagenkonzentrationen oder durch Thrombin verursacht werden. Diese Mechanismen werden z.B. durch ASA nicht beeinflusst. Auch können in Aggregationsversuchen *in vitro* Situationen erzeugt

werden, die *in vivo* nicht auftreten. So zeigt eine ADP-induzierte Plättchenaggregation in Citrat-Plasma eine biphasische Aggregationskurve(108;109). Nach der ersten, reversiblen Aggregationswelle folgt die zweite irreversible Aggregation, die mit Thromboxanbildung einhergeht. In diesem Fall kann z.B. nur die zweite Aggregation gehemmt werden. Dieser biphasische Verlauf kann durch die niedrigen Ca^{2+} -Konzentrationen in dem Citrat-Plasma (50-100 μ M) erklärt werden. Physiologisch beträgt die Ca^{2+} -Konzentration ca. 2 mM. Bei dieser Konzentration stimuliert ADP nicht die Thromboxansynthese und die zweite Aggregationswelle tritt nicht auf. Daraus kann geschlossen werden, dass *in vivo* die ADP-induzierte Plättchenaggregation nicht durch ASA hemmbar ist. Diese Untersuchung ist nur ein Beispiel dafür, dass die ASA-Wirkung in Aggregationsversuchen mit Citrat-Plasma zum Teil überschätzt bzw. falsch beurteilt wird. Auch die Ableitung der TP-Rezeptorantagonisten- oder Thromboxansynthesehemmer-Wirkung an Aggregationsversuchen mit Citratplasma ist vor diesem Hintergrund kritisch zu beurteilen(110). Außerdem verhalten sich isolierte Plättchen anders als im Vollblut. Schon allein das Vorhandensein von Erythrocyten erhöht das Vorkommen von ADP und die Thromboxanbildung. Jedoch kann auch die Plättchenstimulation durch Erythrocyten mit ASA gehemmt werden (111-113).

Bei der Erstellung von Korrelationskurven zwischen den IC 50 der Hemmung der Thromboxansynthese sowie der Aggregationshemmung konnte festgestellt werden, dass der Zusammenhang nur für ASA (Abb.22) signifikant ist. Da ASA vor allem die COX-1 hemmt, spricht dieses Ergebniss wieder dafür, dass die Thrombozytenaggregation sowie die TX-Bildung hauptsächlich über den COX-1-Effekt erklärbar ist. Das bedeutet, dass die Rückschlüsse, die aus der Aggregationshemmung gezogen werden können, nicht unbedingt die Wirkung des jeweiligen COX-Hemmers widerspiegeln müssen. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die *in vitro* Plättchenaggregation nur eine limitierte Sensitivität für die Detektion von COX-Hemmer-Effekten hat. Deswegen ist die direkte Thromboxanmessung im Serum ohne Kollagenstimulation eine gute Alternative zu den herkömmlichen Aggregationsversuchen. TXB_2 wird unter dem maximalen Stimulus der Thrombinausschüttung in der Blugerinnungskaskade direkt messbar (Abb. 9). Dabei muss beachtet werden, dass die entstehenden TXB_2 -Werte wesentlich höher sind (300-400ng/ml) als die physiologisch (1-2 pg/ml) gebildeten(94). Auch die Serumproben in dieser Arbeit zeigen mit steigender

Konzentration der COX-Inhibitoren eine steigende, signifikante Hemmung der Thromboxanbildung. Die Methode, das nicht antikoagulierte Vollblut in Glasröhrchen zu inkubieren, ahmt eine Art, der endogenen Systemaktivierung der Blutgerinnung nach und ist ein starker Stimulus für die Thromboxansynthese. Die TXB₂-Messung im Serum vermeidet einige methodische Probleme, da es direkt den Parameter erfasst, den COX-Hemmer beeinflussen, nämlich die TX-Synthese.

5. Zusammenfassung

Die Thrombozytenaggregation ist für zahlreiche physiologische, wie Hämostase, als auch pathophysiologische Vorgänge, wie Myokardinfarkt, bedeutsam. In der Therapie pathologischer thrombotischer Ereignisse werden Cyclooxygenasehemmer, wie Acetylsalicylsäure (ASA), eingesetzt.

1. Die Thrombozytenaggregation hemmende Wirkung dieser Substanzen wurde hauptsächlich auf eine Hemmung der COX-1 und damit Hemmung der Thromboxan(TX)- Bildung zurückgeführt. Wichtig war eine erneute Untersuchung der vorliegenden Ergebnisse auf die Signifikanz der Korrelation zwischen der Thrombozytenaggregation und der TX-Bildung. Die Thrombozytenaggregation von plättchenreichen Plasma, 20 gesunder Probanden, wurde nach Zugabe von ASA, Indometacin, Diclofenac und NS-398 photometrisch gemessen und aufgezeichnet. Eine Korrelation zwischen der Thromboxanbildung und der Thrombozytenaggregation bestand nur bei der Hemmung durch ASA.

2. Da in Thrombozyten ein weitere Isoform, COX-2, nachgewiesen werden konnte und diese ebenfalls in unterschiedlichem Ausmass durch NSAR gehemmt wird, ergab sich die Fragestellung, ob die COX-2 an der Regulation der Thrombozytenaggregation und der Thromboxanbildung beteiligt sein könnte. Die COX-2-Expression in den Thrombozyten wurde mit Western-Blot-Analysen durchgeführt und durch densitometrische Messung quantifiziert. Es besteht keine Korrelation zwischen der COX-2-Expression und der Thromboxanhemmung oder Thrombozytenaggregationshemmung durch die einzelnen NSAR.

3. Klinische Studien ergaben, dass ein variabler Anteil der mit NSAR behandelten Patienten keine Reduktion von thrombotischen Ereignissen zeigte. Als Ursache wurde eine individuelle Variabilität bei der Ansprechbarkeit auf NSAR angenommen. Diese Arbeit zeigt durch statistische Auswertungen, dass eine interindividuelle Variabilität besteht, die mit einem Klassenphänomen der COX-1 erklärt werden kann. Die COX-2-Expression in Thrombozyten zeigt *in vitro* keinen Zusammenhang mit der interindividuellen Variabilität für die Hemmbarkeit der Thrombozytenfunktion.

Die Kernaussagen dieser Untersuchung können wie folgt zusammengefasst werden:

1. Die Thrombozytenaggregationsmessung in Kollagen-induzierten Aggregationsversuchen hat nur eine limitierte Aussage in Hinblick auf die COX-hemmende Wirkung der verwendeten Substanzen.
2. Die COX-2 ist bei gesunden Probanden zumindest teilweise an der Thromboxan-

synthese beteiligt, hat aber keine funktionelle Bedeutung für die Thrombozytenaggregation.

3. Die interindividuelle Variabilität bei der Ansprechbarkeit der COX-Hemmer ist ein Klassenphänomen.
4. Die COX-2-Expression zeigt keine signifikante Bedeutung für die Ansprechbarkeit der Thrombozyten für die verwendeten COX-Hemmer. Eine ASA-Resistenz kann *in vitro* nicht durch eine vermehrte COX-2-Expression erklärt werden.

6. Literatur

- (1) George J. Platelets. *Lancet* 2000; 355:1531-1539.
- (2) Weiss H. Platelet physiology and abnormalities of platelet function. *N Engl J Med* 1975; 293:531-541.
- (3) Weiss H. Platelet physiology and abnormalities of platelet function. *N Engl J Med* 1975; 293:580-588.
- (4) Fuster V, Badimon L, Badimon J, Chesebro J. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes (1). *N Engl J Med* 1992; 326:242-250.
- (5) Fuster V, Badimon L, Badimon J, Chesebro J. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes (2). *N Engl J Med* 1992; 326:310-318.
- (6) Chapman I. Morphogenesis of occluding coronary artery thrombosis. *Arch Pathol* 1965; 80:256-261.
- (7) Jakubowski JA, Jordan RE, Weisman HF. Current antiplatelet therapy. 2001: 175-208.
- (8) Krzywanek.H. Klinische Bedeutung der Thrombozytenfunktionsdiagnostik. Gustav Fischer, Stuttgart 1987.
- (9) Davies M, Woolf N, Robertson W. Pathology of acute myocardial infarction with particular reference to occlusive coronary thrombi. *Br Heart J* 1976; 38:659-664.
- (10) Kannel W, Dawber T, Kagan A, Revotskie N, Stokes III J. Factors of risk in the development of coronary heart disease - six year follow-up experience- The Framingham study. *Annals Intern Med* 1961; 55:33-50.
- (11) Grundy S, Balady G, Criqui M, Fletcher G, Greenland P, Hiratzka L, Houston-Miller N, Kris-Etherton P, Krumholz H, LaRosa J, Ockene I, Pearson P, Reed J, Washington R, Smith S. Primary prevention of coronary heart disease: guidance from Framingham. *Circulation* 1998; 97:1876-1887.
- (12) Ross R. Atherosclerosis - an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999; 340:115-126.
- (13) Savage B, Saldivar E, Ruggeri Z. Initiation of platelet adhesion by arrest onto fibrinogen or translocation on von Willebrand Factor. *Cell* 1996; 84:289-297.
- (14) Nieswandt B, Brakebusch C, Bergmeier W, Schulte V, Bouvard D, Mokhtari-Nejad R, Lindhout T, Heemskerk J, Zirngibl H, Fässler R. Glycoprotein VI but not $\alpha 2\beta 1$ integrin is essential for platelet interaction with collagen. *EMBO J* 2001; 20:2120-2130.

-
- (15) Goto S, Ideda Y, Saldivar E, Ruggeri Z . Distinct mechanisms of platelet aggregation as a consequence of different shearing flow conditions. *J Clin Invest* 1998; 101:479-486.
 - (16) Kulkarni S, Dopheide S, Yap c, Ravanat C, Freund M, Mangin P, Heel K, Street A, Harber I, Lanza F, Jackson S. A revised model of platlet aggregation. *J Clin Invest* 2000; 105:783-791.
 - (17) Gawaz M. Physiologie, Pathophysiologie, Membranrezeptoren, antithrombozytäre Wirkstoffe und Therapie bei koronarer Herzkrankheit. Thieme Stuttgart, 1999.
 - (18) Patrono C. Biosynthesis and pharmacological modulation of thromboxane in humans. *Circulation* 1990; 81(Suppl. 1):12-15.
 - (19) Weber A-A, Schrör K. Pharmakologie von Ticlopidin und Clopidogrel im Vergleich zu Acetylsalicylsäure. *Internist* 1997; 38:1115-1120.
 - (20) Vane JR, Bakhle Y, Botting R. Cyclooxygenase 1 and 2. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1998; 38:97-120.
 - (21) Schrör K. Grundlagen der antithrombotischen Wirkung von Acetylsalicylsäure. Birkhäuser Verlag Basel/Switzerland 1996;36-61.
 - (22) Gierse J, McDonald J, Hauser S, Rangwala S, Koboldt C, Seibert A. A single amino acid difference between cyclooxygenase-1 (COX-1) and -2 (COX-2) reverses the selectivity of COX-2 specific inhibitors. *J Biol Chem* 1996; 271:15810-15814.
 - (23) Hawkey C. COX-2 inhibitors. *Lancet* 1999; 353:307-314.
 - (24) Morita I, Schindler M, Regier M, Otto J , Hori T, DeWitt D, Smith W. Different intracellular locations for prostaglandin endoperoxide H synthase-1 and -2. *J Biol Chem* 1995; 270:10902-10908.
 - (25) Smith W. Prostanoid biosynthesis and the mechanism of action. *Am J Physiol* 1992; 263:F118-F191.
 - (26) Habib A, Creminon C, Frobert Y, Grassi J, Pradelles P, Maclouf J. Demonstration of an inducible cyclooxygenase in human endothelial cells using antibodies raised against the carboxyl-terminal region of the cyclooxygenase-2. *J Biol Chem* 1993; 268:23448-23454.
 - (27) Hempel S, Monick M, Hunninghake G. Lipopolysaccharide induces prostaglandin H synthase-2 protein and mRNA in human alveolar macrophages and blood monocytes. *J Clin Invest* 1994; 93:391-396.
 - (28) Lyons-Giordano B, Pratta M, Galbraith W, Davis G, Arner E. Interleukin-1 differentially modulates chondrocyte expression of cyclooxygenase-2 and phospholipase A₂. *Exp Cell Res* 1993; 206:58-62.

-
- (29) Xie W, Chipman J, Robertson D, Erikson R, Simmons D. Expression of a mitogen-responsive gene encoding prostaglandin synthase is regulated by mRNA splicing. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88:2692-2696.
- (30) Kujubu D, Fletcher B, Varnum B, Lim R, Herschman H. TIS 10, a phorbol ester tumor promoter-inducible mRNA from Swiss 3T3 cells, encodes a novel prostaglandin synthase/cyclooxygenase homologue. *J Biol Chem* 1991; 266:12866-12872.
- (31) Otto J, Smith W. Prostaglandin endoperoxide synthases-1 and -2. *Lipid Med* 1995; 12:139-156.
- (32) 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.
- (33) Mitchell J, Akarasereenont P, Thiemermann C, Flower R, Vane J. Selectivity of nonsteroidal antiinflammatory drugs as inhibitors of constitutive and inducible cyclooxygenase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90:11693-11697.
- (34) Weber A-A, Zimmermann K, Meyer-Kirchrath J, Schrör K. Cyclooxygenase-2 in human platelets as a possible factor in aspirin resistance. *The Lancet* 1999; 353:900.
- (35) Harris R, McKanna J, Akai Y, Jacobson H, DuBois R, Breyer M. Cyclooxygenase-2 is associated with the macula densa of rat kidney and increases with salt restriction. *J Clin Invest* 1994; 94:2504-2510.
- (36) Breder C, DeWitt D, Kraig R. Characterization of inducible cyclooxygenase in rat brain. *J Comp Neurol* 1995; 355:296-315.
- (37) Walenga R, Kester M, Coroneos E, Butcher S, Dwivedi R, Statt C. Constitutive expression of prostaglandin endoperoxide G/H synthase (PGHS)-2 but not PGHS-1 in human tracheal epithelial cells *in vitro*. *Prostaglandins* 1996; 52:341-359.
- (38) Zimmermann K, Sarbia M, Schrör K, Weber A. Constitutive cyclooxygenase-2 expression in healthy human and rabbit gastric mucosa. *Mol Pharmacol* 1998; 54:536-540.
- (39) Smith W, Langenbach R. Why there are two cyclooxygenase isozymes. *J Clin Invest* 2001; 107:1491-1495.
- (40) Langenbach R, Morham S, Tiano H, Loftin C, Ghanayem B, Chuluda P, Mahler J, Lee C, Goulding E, Kluckman K, Kim H, Smithies O. PG synthase 1 gene disruption in mice reduces arachidonic acid-induced inflammation and indomethacin-induced gastric ulceration. *Cell* 1995; 83:483-492.
- (41) Dinchuk J, Car B, Focht R, Johnston J, Jaffee B, Covington M, Contel N, Eng V, Collins R, Czerniak P, Gorry S, Trzaskos J. Renal abnormalities and an altered inflammatory response in mice lacking cyclooxygenase-II. *Nature (Lond)* 1995; 378:406-409.

-
- (42) Morham S, Langenbach R, Loftin C, Tiano H, Vouloumanos N, Jennette J, Mahler J, Kluckman K, Ledford A, Lee C, Smithies O. Prostaglandin synthase 2 gene disruption causes severe renal pathology in the mouse. *Cell* 1995; 83:473-482.
- (43) Wu K-K. Biochemical pharmacology of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Biochem Pharmacol* 1998; 55:543-547.
- (44) Lim H, Paria B, Das S, Dinchuk J, Langenbach R, Trzaskos J, Dey S. Multiple female reproductive failures in cyclooxygenase 2-deficient mice. *Cell* 1997; 91; 1:197-208.
- (45) Gross G, Imamura T, Luedke C, Vogt S, Olson L, Nelson D, Sadovsky Y, Muglia LJ. Opposing actions of prostaglandins and oxytocin determine the onset of murine labor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95:11875-11879.
- (46) Davis B, Lennard D, Lee C, Tiano H, Morham S, Wetsel W, Langenbach R. Anovulation in cyclooxygenase-2-deficient mice is restored by prostaglandin E2 and interleukin-1beta. *Endocrinology* 1999; 140:2685-2695.
- (47) Lim H, Gupta R, Ma W, Paria B, Moller D, Morrow J, DuBois R, Trzaskos J, Dey S. Cyclo-oxygenase-2-derived prostacyclin mediates embryo implantation in the mouse via PPARdelta. *Genes Dev* 1999; 13:1561-1574.
- (48) Chulada P, Thompson M, Mahler J, Doyle C, Gaul B, Lee C, Tiano HF, Morham S, Smithies O, Langenbach R. Genetic disruption of Ptgs-1, as well as Ptgs-2, reduces intestinal tumorigenesis in Min mice. *Cancer Res* 2000; 60:4705-4708.
- (49) Houchen C, Stenson W, Cohn S. Disruption of cyclooxygenase-1 gene results in an impaired response to radiation injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000; 279:G858-G865.
- (50) Prescott S, White R. Self-promotion? Intimate connections between APC and prostaglandin H synthase-2. *Cell* 1996; 87:783-786.
- (51) Loftin C, Trivedi D, Tiano H, Clark J, Lee C, Epstein J, Morham S, Breyer M, Nguyen M, Hawkins B, Goulet J, Smithies O, Koller B, Langenbach R. Failure of ductus arteriosus closure and remodeling in neonatal mice deficient in cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98:1059-1064.
- (52) Panara M, Greco A, Santini G, Sciulli M, Rotondo M, Padovano R, di Gamberardino M, Cipollone F, Patrono C, Patrignani P. Effects of the novel anti-inflammatory compounds, N[2-(cyclohexyloxy)-4-nitrophenyl]methanesulphonamide (NS398) and 5-methanesulphonamido-6-(2,4-difluorothiophenyl)-1-indanone(L-745,337), on the cyclooxygenase activity of human blood prostaglandin endoperoxide synthases. *Br J Pharmacol* 1995; 116:2429-2434.
- (53) Antithrombotic Trialists' Collaboration. Collaborative meta-analysis of randomised trials of antiplatelet therapy for prevention of death, myocardial infarction, and stroke in high risk patients. *BMJ* 2002; 324:71-86.

-
- (54) Loll P, Picot D, Garavito R. The structural basis of aspirin activity inferred from the crystal structure of inactivated prostaglandin H₂ synthase. *Nature Struct Biol* 1995; 2:637-643.
- (55) Roth G, Stanford N, Majerus P. Acetylation of prostaglandin synthase by oral aspirin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1975; 72:3073-3077.
- (56) Smith W, Marnett L. Prostaglandin endoperoxide synthase: structure and catalysis. *Biochim Biophys Acta* 1991; 1083:1-17.
- (57) Hanson S, Harker L, Bjornsson T. Effect of platelet-modifying drugs on arterial thromboembolism in baboons: aspirin potentiates the antithrombotic actions of dipyridamole and sulfinpyrazone by mechanism(s) independent of Platelet cyclooxygenase inhibition. *J Clin Invest* 1985; 75:1591-1599.
- (58) Harker L, Fuster V. Pharmacology of platelet inhibitors. *J Am Coll Cardiol* 1986; 8 (suppl):21B-32B.
- (59) Buchanan M, Rischke J, Hirsh J. Aspirin inhibits platelet function independent of the acetylation of cyclo-oxygenase. *Thromb Res* 1982; 25:363-373.
- (60) Gaspari F, Vigano G, Orsio S, Bonati M, Livio M, Remuzzi G. Aspirin prolongs bleeding time in uremia by a mechanism distinct from platelet cyclooxygenase inhibition. *J Clin Invest* 1987; 79:1788-1797.
- (61) Majerus P. Arachidonate metabolism in vascular disorders. *J Clin Invest* 1983; 72:1521-1525.
- (62) Patrono C, Collier B, Dalen J, Fitzgerald G, Fuster V, Gent M, Hirsh J, Roth G. Platelet-active drugs. The relationship among dose, effectiveness, and the side effects. *Chest* 2001; 119 (Suppl):39S-63S.
- (63) The 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.
- (64) Juul-Moller S, Edvardsson N, Jahnmatz B. Double-blind trial of aspirin in primary prevention of myocardial infarction in patients with stable chronic angina pectoris. *Lancet* 1992; 340:1421-1425.
- (65) The RISC Group. Risk 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.
- (66) The SALT Collaborative Group. Swedish Aspirin Low-Dose Trial (SALT) of 75 mg aspirin as secondary prophylaxis after cerebrovascular ischemic events. *Lancet* 1991; 338:1345-1491.
- (67) Lindblad B, Persson N, Takolander R, Bergqvist D. Does low-dose acetylsalicylic acid prevent stroke after carotid surgery?: A double-blind, placebo-controlled randomized trial. *Stroke* 1993; 24:1125-1128.

-
- (68) Weber A-A, Liesener S, Hohlfeld T, Schrör K. 40 mg aspirin are not sufficient to inhibit platelet function under conditions of limited compliance. *Thromb Res* 2000; 97:365-367.
- (69) Tohgi H, Konno S, Tamura K, Katsumi K. Effects of low-to-high doses of aspirin on platelet aggregability and metabolites of thromboxane A₂ and prostacyclin. *Stroke* 1992; 23:1400-1403.
- (70) Larsson P, Wallen N, Hjemdahl P. Norepinephrine-induced human platelet activation *in vivo* is only partly counteracted by aspirin. *Circulation* 1994; 89:1951-1957.
- (71) Maalej N, Folts J. Increased shear stress overcomes the antithrombotic platelet inhibitory effect of aspirin in stenosed dog coronary arteries. *Circulation* 1996; 93:1201-1205.
- (72) Moake J, Turner N, Stathopoulos N, Nolasco L, Hellums J. Shear-induced platelet aggregation can be mediated by vWF released from platelets, as well as by exogenous large or unusually vWF multimers, requires adenosine diphosphate, and is resistant to aspirin. *Blood* 1988; 71:1366-1374.
- (73) Moritz M, Reimers R, Baker R, Sutera S, Joist J. Role of cytoplasmic and releasable ADP in platelet aggregation induced by laminar shear stress. *Lab Clin Med* 1983; 101:537-544.
- (74) Helgason C, Bolin K, Hoff J, Winkler S, Mangat A, Tortorice K, Brace L. Development of aspirin resistance in persons with previous ischemic stroke. *Stroke* 1994; 25:2331-2336.
- (75) Buchanan M, Brister S. Individual variation in the effects of ASA on platelet function: implication for the use of ASA clinically. *Can J Cardiol* 1995; 11:221-227.
- (76) Helgason C, Hoff J, Kondos G, Brace L. Platelet aggregation in patients with atrial fibrillation taking aspirin or warfarin. *Stroke* 1993; 24:1458-1461.
- (77) Mueller M, Salat A, Stangl P, Murabito M, Pulaki S, Boehm D, Koppensteiner R, Ergun E, Mittlboeck M, Schreiner W, Losert U, Wolner E. Variable platelet response to low-dose ASA and the risk of limb deterioration in patients submitted to peripheral arterial angioplasty. *Thromb Haemost* 1997; 78:1003-1007.
- (78) Helgason C, Tortorice K, Winkler S, Penney D, Schuler J, McClelland T, Brace L. Aspirin response and failure in cerebral infarction. *Stroke* 1993; 24:345-350.
- (79) Weber A-A, Przytulski B, Schanz A, Hohlfeld T, Schrör K. Towards a definition of aspirin resistance: a typological approach. *Platelets* 2002; 13:37-40.
- (80) Benedek I, Joshi A, Pieniaszek H, King S, Kornhauser D. Variability in the pharmacokinetics and pharmacodynamics of low dose aspirin in healthy male volunteers. *J Clin Pharmacol* 1995; 35:1181-1186.

-
- (81) Kawasaki T, Ozeki Y, Igawa T, Kambayashi J. Increased platelet sensitivity to collagen in individuals resistant to low-dose aspirin. *Stroke* 2000; 31:591-595.
- (82) Vane J, Botting R. Mechanisms of aspirin-like drugs. *Semin Arthritis Rheum* 1997; 26:2-10.
- (83) Zucker M. Platelet aggregation measured by the photometric method. *Methods Enzymol* 1989; 169:117-133.
- (84) Born G. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature* 1962; 332:927-929.
- (85) Matijevic-Aleksic N, Sanduja S, Wang L-H, Wu K-K. Differential expression of thromboxane A synthase and prostaglandin H synthase in megakaryocytic cell line. *Biochim Biophys Acta* 1995; 1269:167-175.
- (86) Patrignani P, Sciulli M, Manarini S, Santini G, Cerletti C, Evangelista V. COX-2 is not involved in thromboxane biosynthesis by activated human platelets. *J Physiol Pharmacol* 1999; 63:661-667.
- (87) Reiter R, Resch U, Sinziger H. Do human platelets express COX-2? *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2001; 64:299-305.
- (88) Schwarz U, Geiger J, Walter U, Eigenthaler M. Flow cytometry analysis of intracellular VASP phosphorylation for the assessment of activating and inhibitory signal transduction pathways in human platelets-definition and detection of ticlopidine/clopidogrel effects. *Thromb Haemost* 1999; 82:1145-1152.
- (89) Zimmermann N, Kienzle P, Weber A-A, Winter J, Schrör K, Hohlfeld T. Transient induction of platelet COX-2 immunoreactivity after coronary artery bypass grafting. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2001; 121:982-984.
- (90) Reilly I, Fitzgerald G. Inhibition of thromboxane formation *in vivo* and *ex vivo*: Implications for therapy with platelet inhibitory drugs. *Blood* 1987; 69:180-186.
- (91) Laitinen J, Nuutinen L. Intravenous diclofenac coupled with PCA fentanyl for pain relief after total hip replacement. *Anesthesiology* 1992; 76:194-198.
- (92) Niemi T, Taxell C, Rosenberg P. Comparison of the effect of intravenous ketoprofen, ketorolac and diclofenac on platelet function in volunteers. *Acta Anaesthesiol Scand* 1997; 41:1353-1358.
- (93) Laitinen J, Nuutinen L, Puranen J, Ranta P, Salomaki T. Effect of a non-steroidal anti-inflammatory drug, diclofenac, on haemostasis in patients undergoing total hip replacement. *Acta Anaesthesiol Scand* 1992; 36:486-489.
- (94) Patrono C, Ciabatonni G, Pugliese F, Perucci A, Blair I, Fitzgerald G. Estimate rate of thromboxane secretion into the circulation of normal humans. *J Clin Invest* 1986; 77:590-594.

-
- (95) Garcia Rodriguez L, Varas C, Patrono C. Differential effects of aspirin and non-aspirin nonsteroidal antiinflammatory drugs in the primary prevention of myocardial infarction in postmenopausal women. *Epidemiology* 2000; 11:382-387.
- (96) Gum P, Kottke-Marchant K, Gurm H, Welsh P, Brooks L, Sapp S, Topol E. Profile and prevalence of aspirin resistance in patients with cardiovascular disease. *American Journal of Cardiology* 2001; 88:230-235.
- (97) Zimmermann N, Kienzle P, Weber A-A, Winter J, Gams E, Schror K, Hohlfeld T. Aspirin resistance after coronary artery bypass grafting. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2001; 121:982-984.
- (98) Wu KK. Platelet activation mechanisms and markers in arterial thrombosis. *J Intern Med* 1996; 239:17-34.
- (99) Zimmermann N, Kienzle P, Weber A-A, Gams E, Hohlfeld T. Platelet aspirin resistance is associated with an increased platelet content of cyclooxygenase-2. *Circulation* 100 (Suppl.), I-327. 1999.
- (100) Weksler B, Kent J, Rudolph D, Scherer P, Levy D. Effects of low-dose aspirin on platelet function in patients with recent cerebral ischemia. *Stroke* 1985; 16:5-9.
- (101) Berglund U, Wallentin L. Persistent inhibition of platelet function during long-term treatment with 75 mg acetylsalicylic acid daily in men with unstable coronary artery disease. *Eur Heart J* 1991; 12:428-433.
- (102) Weksler B, Tack-Godman K, Subramanian V, Gay W. Cumulative inhibitory effect of low-dose aspirin on vascular prostacyclin and platelet thromboxane production in patients with atherosclerosis. *Circulation* 1985; 71:332-340.
- (103) Weber A-A, Liesener S, Schanz A, Hohlfeld T, Schrör K. Habitual smoking causes an abnormality in platelet thromboxane A₂ metabolism and result altered susceptibility to aspirin effects. *Platelets* 2000; 11:140-145.
- (104) Wilhelmsen L. Coronary heart disease: epidemiology of smoking and intervention studies of smoking. *Am Heart J* 1988; 115(1 Pt 2):242-249.
- (105) Levine P. An acute effect of cigarette smoking on platelet function: a possible link between smoking and arterial thrombosis. *Circulation* 1973; 48:619-623.
- (106) Hung J, Lam JY, Lacoste L, Letchacovski G. Cigarette smoking acutely increases platelet thrombus formation in patients with coronary artery disease taking aspirin. *Circulation* 1995; 92:2432-2436.
- (107) Smith C, Steichen T, Fischer T. Platelet and aggregation in cigarette smokers: a meta-analysis. *Inhal Toxicol* 1998; 10:765-793.
- (108) Packham M, Bryant N, Guccione M, Kinlough-Rathbone R, Mustard J. Effect of the concentration of Ca²⁺ in the suspending medium on the responses of human and rabbit platelets to aggregating agents. *Thromb Haemost* 1989; 62:968-976.

-
- (109) Weber A-A, Hohlfeld T, Schrör K. ADP-induced second wave aggregation in platelet-rich-plasma from hypercholesterolemic rabbits. *Thromb Res* 1991; 64:703-712.
- (110) Bretschneider E, Glusa E, Schror K. ADP-, PAF- and adrenaline-induced platelet aggregation and thromboxane formation are not affected by a thromboxane receptor antagonist at physiological external Ca⁺⁺ concentrations. *Thromb Res* 1994; 75:233-242.
- (111) Valles J, Santos M, Aznar J, Marcus A, Martinez-Sales V, Portoles M, Broekman M, Safier L. Erythrocytes metabolically enhance collagen-induced platelet responsiveness via increased thromboxane production, adenosine diphosphate release, and recruitment. *Blood* 1991; 78:154-162.
- (112) Valles J, Santos M, Aznar J, Osa A, Lago A, Cosin J, Sanchez E, Broekman M, Marcus A. Erythrocyte promotion of platelet reactivity decreases the effectiveness of aspirin as an antithrombotic therapeutic modality: the effect of low-dose aspirin is less than optimal in patients with vascular disease due to prothrombotic effects of erythrocytes on platelet reactivity. *Circulation* 1998; 97:350-355.
- (113) Santos B, Valles J, Aznar J, Marcus A, Broekman M, Safier L. Prothrombotic effects of erythrocytes on platelet reactivity. Reduction by aspirin. *Circulation* 1997; 95:63-68.

7. Veröffentlichungen im Zusammenhang mit dieser Arbeit

Weber A-A, Liesener S, Schanz A, Hohlfeld T, Schrör K. Habitual smoking causes an abnormality in platelet thromboxane A₂ metabolism and result altered susceptibility to aspirin effects. *Platelets* 2000; 11:140-145.

Weber A-A, Przytulski B, Schanz A, Hohlfeld T, Schrör K. Towards a definition of aspirin resistance: a typological approach. *Platelets* 2002; 13:37-40.

8. Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. K. Schrör danke ich für die Überlassung des Themas sowie für die äusserst hilfreiche Unterstützung bei dieser Arbeit.

Herrn PD Dr. med. A-A. Weber möchte ich für die hervorragende und produktive Betreuung sowie für die unschätzbare Hilfe den roten Faden nicht zu verlieren, danken. Ohne seine konstruktive Kritik und den Einsatz seiner kostbaren Freizeit würde die vorliegende Arbeit womöglich noch immer ausschließlich aus einer Aneinanderreihung von Worten und Fakten bestehen.

Frau Erika Lohmann und Karin Montag danke ich für ihre allgegenwärtige, tatkräftige Unterstützung bei allen organisatorischen Angelegenheiten und die jederzeit freundliche Atmosphäre.

Herrn Dipl.-Math. Dr. Dieter Hafner danke ich für seine Hilfe bei der statistischen Auswertung und für hervorragende Anleitung bei verschiedensten Software-Problemen

Den größten Dank bin ich meiner Großmutter Gertrud Schanz, meinen Eltern Antje und Georg Schanz, meinen Geschwistern Michael und Claudia und meinen Großeltern Inge und Kurt Lenz schuldig. Jedoch auch für die Unterstützung durch meine lieben Freunde, die mich in meinem Handeln immer unterstützt und viel Verständnis gezeigt haben, möchte ich meinen tiefsten Dank aussprechen.

9. Lebenslauf

Andrea Schanz
Flurstr. 46
40235 Düsseldorf
Deutschland

25.11.1974 Geboren in Haan

Schulbildung

1980-1984 Grundschule Erkrath-Hochdahl
1984-1994 Gymnasium Hochdahl
1994 Abitur

Hochschulausbildung

1995-2001 Studium der Humanmedizin an der Heinrich-Heine-Universität
 Düsseldorf
03/1997 Ärztliche Vorprüfung
03/1998 Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
08/2000 Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
10/2000 Praktisches Jahr
 1. Tertial: Klinik der Landeshauptstadt Düsseldorf, Gerresheim
 2. Tertial: Texas Heart Institute, Houston, TX, USA
 3. Tertial: Klinik der Landeshauptstadt Düsseldorf, Gerresheim
11/2001 Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung

Beruflicher Werdegang

seit 03/2002 Ärztin im Praktikum, Klinik für Frauenheilkunde der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Zur Bedeutung der Cyclooxygenase-2 für die Thromboxanbildung in Blutplättchen von gesunden Probanden –Wirkungen von Acetylsalicylsäure, Indometacin, Diclofenac und NS-398

Die Thrombozytenaggregation ist für zahlreiche physiologische, wie Hämostase, als auch pathophysiologische Vorgänge, wie Myokardinfarkt, bedeutsam. In der Therapie pathologischer thrombotischer Ereignisse werden Cyclooxygenasehemmer, wie Acetylsalicylsäure (ASA), eingesetzt.

1. Die Thrombozytenaggregation hemmende Wirkung dieser Substanzen wurde hauptsächlich auf eine Hemmung der COX-1 und damit Hemmung der Thromboxan(TX)- Bildung zurückgeführt. Wichtig war eine erneute Untersuchung der vorliegenden Ergebnisse auf die Signifikanz der Korrelation zwischen der Thrombozytenaggregation und der TX-Bildung. Die Thrombozytenaggregation von plättchenreichen Plasma, 20 gesunder Probanden, wurde nach Zugabe von ASA, Indometacin, Diclofenac und NS-398 photometrisch gemessen und aufgezeichnet. Eine Korrelation zwischen der Thromboxanbildung und der Thrombozyten-aggregation bestand nur bei der Hemmung durch ASA.

2. Da in Thrombozyten ein weitere Isoform, COX-2, nachgewiesen werden konnte und diese ebenfalls in unterschiedlichem Ausmass durch NSAR gehemmt wird, ergab sich die Fragestellung, ob die COX-2 an der Regulation der Thrombozytenaggregation und der Thromboxanbildung beteiligt sein könnte. Die COX-2-Expression in den Thrombozyten wurde mit Western-Blot-Analysen durchgeführt und durch densitometrische Messung quantifiziert. Es besteht keine Korrelation zwischen der COX-2-Expression und der Thromboxanhemmung oder Thrombozytenaggregationshemmung durch die einzelnen NSAR.

3. Klinische Studien ergaben, dass ein variabler Anteil der mit NSAR behandelten Patienten keine Reduktion von thrombotischen Ereignissen zeigte. Als Ursache wurde eine individuelle Variabilität bei der Ansprechbarkeit auf NSAR angenommen. Diese Arbeit zeigt durch statistische Auswertungen, dass eine interindividuelle Variabilität besteht, die mit einem Klassenphänomen der COX-1 erklärt werden kann. Die COX-2-Expression in Thrombozyten zeigt *in vitro* keinen Zusammenhang mit der interindividuellen Variabilität für die Hemmbarkeit der Thrombozytenfunktion.

Die Kernaussagen dieser Untersuchung können wie folgt zusammengefasst werden:

1. Die Thrombozytenaggregationsmessung in Kollagen-induzierten Aggregationsversuchen hat nur eine limitierte Aussage in Hinblick auf die COX-hemmende Wirkung der verwendeten Substanzen.
2. Die COX-2 ist bei gesunden Probanden zumindest teilweise an der Thromboxan-synthese beteiligt, hat aber keine funktionelle Bedeutung für die Thrombozyten-aggregation.
3. Die interindividuelle Variabilität bei der Ansprechbarkeit der COX-Hemmer ist ein Klassenphänomen.

Die COX-2-Expression zeigt keine signifikante Bedeutung für die Ansprechbarkeit der Thrombozyten für die verwendeten COX-Hemmer. Eine ASA-Resistenz kann *in vitro* nicht durch eine vermehrte COX-2-Expression erklärt werden.