

**Aus dem Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie
der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf**

Direktor: Univ.-Prof. Dr. K. Schrör

**ABGESCHWÄCHTE ANTIPLÄTTCHENWIRKUNGEN VON
ACETYLSALICYLSÄURE (ASS) BEI PATIENTEN NACH ELEKTIVEN
BYPASS-CHIRURGISCHEN EINGRIFFEN (ACB). DIE BEDEUTUNG DER
THROMBOZYTÄREN CYCLOOXYGENASE-2 FÜR DIE „ASPIRIN-
RESISTENZ“**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der
Zahnmedizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

vorgelegt von

Peter Kienzle

2003

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

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. dent. Wolfgang H.-M. Raab
Dekan

Referent: Univ.-Prof. Dr. K. Schrör

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Rüdiger E. Scharf

ACB	Aorto-coronarer Bypass
ADP	Adenosindiphosphat
ASS	Acetylsalicylsäure
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
COX	Cyclooxygenase
DAG	Diacylglycerol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EKZ	extrakorporale Zirkulation
GP IIb/IIIa	Glykoprotein IIb/IIIa
HLM	Herz-Lungenmaschine
IL	Interleukin
IP ₃	Inositoltrisphosphat
M	molar (=mol/l)
MDA	Malondialdehyd
MLKK	Myosinleichtkettenkinase
P 47	Protein 47
PDGF	platelet derived growth factor
PFP	plättchenfreies Plasma
PGH ₂	Prostaglandin H ₂
PIP ₂	Phosphoinositoldiphosphat
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PRP	plättchenreiches Plasma
PVDF	Polyvinyliden Fluorid
RIA	Radioimmunoassay
RT-PCR	reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	Standard error of the means
TBS	Tris buffered saline
TNF- α	Tumor-Nekrosefaktor α
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan
TXS	Thromboxan synthase
Tween	Polyoxyethylen-Sorbitan-Monolaurat (Sigma)
TXA ₂	Thromboxan A ₂
TXB ₂	Thromboxan B ₂

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	AORTO-KORONARE BYPASS-OPERATIONEN UND DEREN THROMBOTISCHE KOMPLIKATIONEN	2
1.2	PATHOGENESE THROMBEMBOLISCHER VERSCHLÜSSE NACH BYPASS-OPERATIONEN	3
1.3	FUNKTION DER THROMBOZYTEN BEI DER PRIMÄREN HÄMOSTASE	4
1.4	BIOCHEMISCHE UND METABOLISCHE MECHANISMEN IN THROMBOZYTEN MIT EINFLUSS AUF DIE AGGREGATION	5
1.5	ANGRIFFSPUNKTE ZUR PHARMAKOLOGISCHEN THROMBOZYTEN-FUNKTIONSHemmUNG	7
1.6	DIE CYCLOOXYGENASE	8
1.7	HEMMUNG DER CYCLOOXYGENASE DURCH ASS	9
1.8	ASS ALS STANDARDPRÄPARAT IN DER THROMBOSEPROPHYLAXE	10
1.9	STELLENWERT DER ASS-THERAPIE BEI ERHÖHTEM KARDIOVASKULÄREM RISIKO	11
1.10	FRAGESTELLUNG	13
2	METHODIK	14
2.1	PATIENTEN	14
2.2	PROBANDEN	14
2.3	BLUTENTNAHME UND LEUKOZYTENZÄHLUNG	15
2.4	PLASMAGEWINNUNG UND PELLETIERUNG DER THROMBOZYTEN FÜR DIE WESTERN-BLOT-UNTERSUCHUNGEN	15
2.5	MESSUNG DER THROMBOZYTEN-AGGREGATION	16
2.6	DURCHFÜHRUNG DER AGGREGATIONSVERSUCHE	17
2.7	TESTSUBSTANZEN	17
2.8	AUSWERTUNG DER AGGREGATIONSKURVEN	17
2.9	PROTEINBESTIMMUNG	18
2.10	WESTERN-BLOT-UNTERSUCHUNGEN	19
2.11	TXB ₂ -RADIOIMMUNOASSAY	20
2.12	STATISTISCHE AUSWERTUNG	20
2.13	SUBSTANZEN UND LÖSUNGEN	21
2.14	GERÄTE	23

3	ERGEBNISSE	24
3.1	VERLAUF	24
3.2	UNTERSUCHUNGEN AN PATIENTEN	24
3.2.1	VERLAUF DER THROMBOZYTENZAHL NACH ACB-OPERATION	24
3.2.2	KOLLAGENINDUZIERTE AGGREGATION	25
3.2.3	THROMBOXAN-SYNTHESE	27
3.2.4	KORRELATION ZWISCHEN THROMBOZYTÄRER AGGREGATION UND THROMBOXAN-SYNTHESE	29
3.3	UNTERSUCHUNGEN AN GESUNDEN PROBANDEN.....	30
3.3.1	KOLLAGENINDUZIERTE AGGREGATION BEI GESUNDEN PROBANDEN.....	30
3.3.2	THROMBOXAN-SYNTHESE BEI GESUNDEN PROBANDEN.....	33
3.4	COX-2 IN THROMBOZYTEN VOR UND NACH ACB-OPERATION.....	35
4	DISKUSSION	39
4.1	BISHERIGE BEFUNDE THROMBOZYTÄRER SENSITIVITÄT GEGENÜBER ASS	39
4.2	KARDIOVASKULÄRE PROGNOSE IN ABHÄNGIGKEIT VON DER THROMBOZYTENFUNKTIONSHemmung DURCH ASS.....	40
4.3	DEFINITION UND KLASSIFIKATION DER RESISTENZ GEGENÜBER ASS	42
4.4	PHARMAKOKINETISCHE VERÄNDERUNGEN ALS MÖGLICHE URSACHE EINER TYP I ASS-RESISTENZ	43
4.5	SENSITIVITÄTSÄNDERUNGEN GEGENÜBER KOLLAGEN ODER ADHÄSIONSMOLEKÜLEN ALS MÖGLICHE URSACHE EINER TYP III ASS-RESISTENZ	44
4.6	TYP II ASS-RESISTENZ	46
4.7	DIE BEDEUTUNG DER THROMBOZYTÄREN CYCLOOXYGENASE-AKTIVITÄT FÜR DIE ASS-RESISTENZ	47
4.8	ALTERNATIVEN ZUR ANTIPLÄTTCHEN-THERAPIE	48
4.9	SCHLUSSFOLGERUNGEN FÜR DIE ANTITHROMBOTISCHE THERAPIE NACH ACB-OPERATION.....	50
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	52
6	LITERATUR.....	53
7	VERÖFFENTLICHUNGEN IM ZUSAMMENHANG MIT DIESER ARBEIT	63
8	DANKSAGUNG	65

9	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	66
10	LEBENS LAUF	67

1 EINLEITUNG

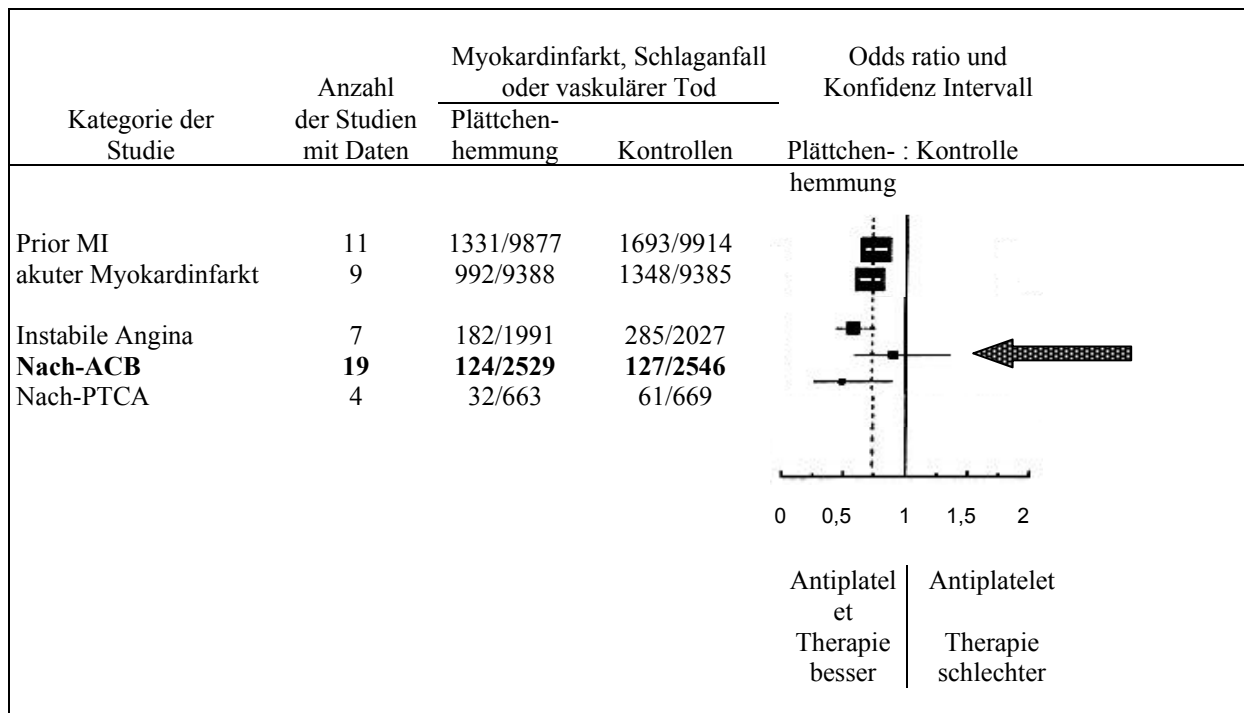
Antiphlogistische und analgetische Wirkungen von Acetylsalicylsäure (ASS) werden seit mehr als einem Jahrhundert therapeutisch genutzt. Ein nicht minder beachtetes Anwendungsgebiet dieser Substanz ist deren erst später bekannt gewordene antithrombotische Eigenschaft. Angesichts der detaillierten Erkenntnisse zum Wirkungsmechanismus von ASS und umfassender klinischen Studien überrascht es dennoch, dass auch heute noch zahlreiche Fragen, die diese Substanz betreffen, nicht ausreichend beantwortet sind.

Eine besonders aktuelle noch offene Frage in diesem Zusammenhang betrifft die präventive Wirksamkeit von ASS bei unterschiedlichen kardiovaskulären Patientengruppen. Zwar wurde in zahlreichen Studien die Effektivität von Thrombozytenfunktionshemmern einschließlich ASS überzeugend hinsichtlich einer Verbesserung der kardiovaskulären Prognose bestätigt, doch lassen Metaanalysen umfangreicher Datensätze, wie z.B. die der „Antiplatelet trialists' collaboration“ [Antiplatelet trialists' collaboration, 1994], auch erkennen, dass definierte Patientengruppen je nach Art oder Stadium der arteriellen Gefäßkrankheit in sehr unterschiedlichem Maße profitieren. Besonders auffällig ist, dass bei Patienten nach chirurgischer Myokardrevaskularisation (aortokoronare Bypassoperation, ACB) die kardiovaskuläre Prognose statistisch nicht signifikant verbessert wird, wohingegen die Prävention bei Myokardinfarkt, Angina pectoris und nach Angioplastie überzeugend belegt ist (Abbildung 1).

Intention der vorliegenden Arbeit ist es, die thrombozytäre Sensitivität gegenüber ASS bei Patienten nach ACB-Operation im Detail zu untersuchen und anhand dieses 'Paradigmas' ein pharmakologisches Konzept zur Erklärung der eingeschränkten antithrombozytären Wirkung von ASS bei Patienten mit erhöhtem kardiovaskulären Risiko zu entwickeln.

Abbildung 1

Inzidenz vaskulärer Endpunkte unter Therapie mit Thrombozytenfunktionshemmern. Für Patienten nach ACB-Operation ist kein signifikanter Benefit gesichert (Pfeil) [Abbildung modifiziert nach: ANTIPLATELET TRIALISTS' COLLABORATION, Br Med J, 1994].



1.1 AORTO-KORONARE BYPASS-OPERATIONEN UND DEREN THROMBOTISCHE KOMPLIKATIONEN

Aorto-koronare Bypass-Operationen gehören zu den am häufigsten durchgeführten kardiochirurgischen Eingriffen. Trotz großer Anstrengungen stellen der thrombotische Verschluss des Koronargefäßes bzw. die Restenose nach dieser Operation ein Risiko für die betroffenen Patienten dar. Die Inzidenz thrombotischer Graft-Verschlüsse wird im ersten postoperativen Jahr auf 15-30 % geschätzt und nimmt innerhalb von 10 Jahren auf über 50% zu. Im Verlauf von 10 Jahren benötigen mehr als 10 % der Patienten einen erneuten chirurgischen Eingriff, um den Folgen eines Verschlusses oder der fortgeschrittenen Grunderkrankung zu begegnen [Weintraub et al., 1994].

1.2 PATHOGENESE THROMBEMBOLISCHER VERSCHLÜSSE NACH BYPASS-OPERATIONEN

Früh- und Spätverschlüsse sind aufgrund pathophysiologischer Gesichtspunkte zu unterscheiden [BUTANY et al., 1998; MOTWANI & TOPOL, 1998].

Thrombotische Frühverschlüsse resultieren aus Veränderungen, die eine erhöhte Plättchenaktivität als Ursache haben und die Adhäsion der Plättchen an das Endothel erleichtern. Spätverschlüsse sind Folge eines atherosklerotischen Transplantat- Umbaus.

Verantwortliche Ursachen für thrombotische Frühverschlüsse sind überwiegend physikalische Faktoren und die Freisetzung endogener Substanzen. Zu den physikalischen Faktoren zählen beispielsweise Hypothermie im Verlauf der Operation, Scherstress des Blutes im Transplantat und präparationsbedingte Verletzung des Endothels. Als endogene Substanzen können lokale Vasokonstriktoren und Adhäsionsproteine die Thrombose begünstigen [WEERASINGHE & KENNETH, 1998].

Der Einsatz der extrakorporalen Zirkulation (EKZ) war die Grundvoraussetzung für die Entwicklung der modernen Herzchirurgie. Allerdings greift der Einsatz der Herz-Lungen-Maschine (HLM) grundlegend in physiologische Vorgänge ein. Von großer Bedeutung ist hierbei der Einfluss auf die Hämostase im allgemeinen sowie auf die Thrombozyten(funktion) im besonderen [HYDE et al., 1998; WEERASINGHE & KENNETH, 1998].

Sowohl für die Cytokine IL-6 und IL-8 als auch für das Katecholamin Adrenalin konnte intraoperativ ein Konzentrationsanstieg nachgewiesen werden. Adrenalin regt Thrombozyten durch Aktivierung α_2 -adrenerger Rezeptoren an. IL-6 und IL-8 zeigten in vitro eine Plättchenstimulation, die zur Expression von P-Selectin führte [TONNESEN et al., 1992; FRERING et al., 1994; REVES et al., 1984; LANZA et al., 1986], wobei die zur Stimulierung erforderlichen Cytokin-Konzentrationen im Bereich der in vivo gemessenen Plasma-Konzentration liegen [LUMADUE et al., 1996].

Bypass-Gefäße, die diese Phase ohne Thrombose „überstehen“, unterliegen physiologischen Veränderungen, die als „Arterialisation“ bezeichnet werden. Bereits nach einer Woche beginnt eine Dickenzunahme der Media und eine Neointimabildung, wobei beide Ereignisse zu einer Reduktion des Gefäßlumens führen. Im weiteren Verlauf kann es im so veränderten

Transplantat zu atherosklerotischen Veränderungen und fibromuskulärer Hyperplasie kommen, die ebenfalls eine erhebliche Stenose oder Gefäßverschluss zur Folge haben kann (Spätverschluss). Eine Bedeutung von Thrombozyten für diesen Vorgang, z.B. durch Freisetzung mitogener Faktoren, wird diskutiert, ist aber bisher nicht hinreichend gesichert.

1.3 FUNKTION DER THROMBOZYTEN BEI DER PRIMÄREN HÄMOSTASE

Die Adhäsion der noch ruhenden Plättchen an die verletzte Gefäßwand ist der erste Schritt der primären Hämostase. Der Adhäsionsvorgang wird durch thrombozytäre Membranglykoproteine gesteuert. Diese Adhäsionsrezeptoren erkennen spezifische Strukturkomponenten der extrazellulären Matrix im Bereich der Media und des Subendothels. Hierzu gehören vor allem die Kollagene vom Typ I und III sowie Fibronectin und Laminin als Beispiele nicht-kollagener Adhäsionsproteine.

Der erste Kontakt zwischen zirkulierenden Thrombozyten und der Zellwandläsion wird über die Interaktion von von-Willebrand-Faktor (vWF) und dem thrombozytären Membranrezeptor Glykoprotein Ib-V-IX hergestellt. Die sich daran anschließende Aktivierung der Thrombozyten wird vor allem durch die Bindung des Kollagenrezeptors ($\alpha 2\beta 1$) an Kollagen ausgelöst. Hierdurch kommt es zu einer Formänderung der Thrombozyten (shape change), die durch ein Zusammenziehen des Zytoskeletts und der Ausbildung von Pseudopodien charakterisiert ist. Infolge der Formänderung wird die Abdichtung der Gefäßwandläsion begünstigt. Ein weiterer Effekt, der durch die Bindung von ADP, Kollagen, Thrombin, von-Willebrand-Faktor (vWF), Fibronectin u.a. an spezifische Rezeptoren auf der thrombozytären Membranoberfläche ausgelöst, bzw. gefördert wird, ist die Synthese von TXA_2 aus Arachidonsäure. Das so entstandene und in den Extrazellulärraum freigesetzte TXA_2 wirkt über einen spezifischen TXA_2 -Rezeptor auf der Thrombozytenoberfläche aktivierend auf die Aggregation. Die Interaktion von noch zirkulierenden mit bereits adhärenenten Thrombozyten erfolgt u.a. über aktivierte GP IIb/IIIa Integrine.

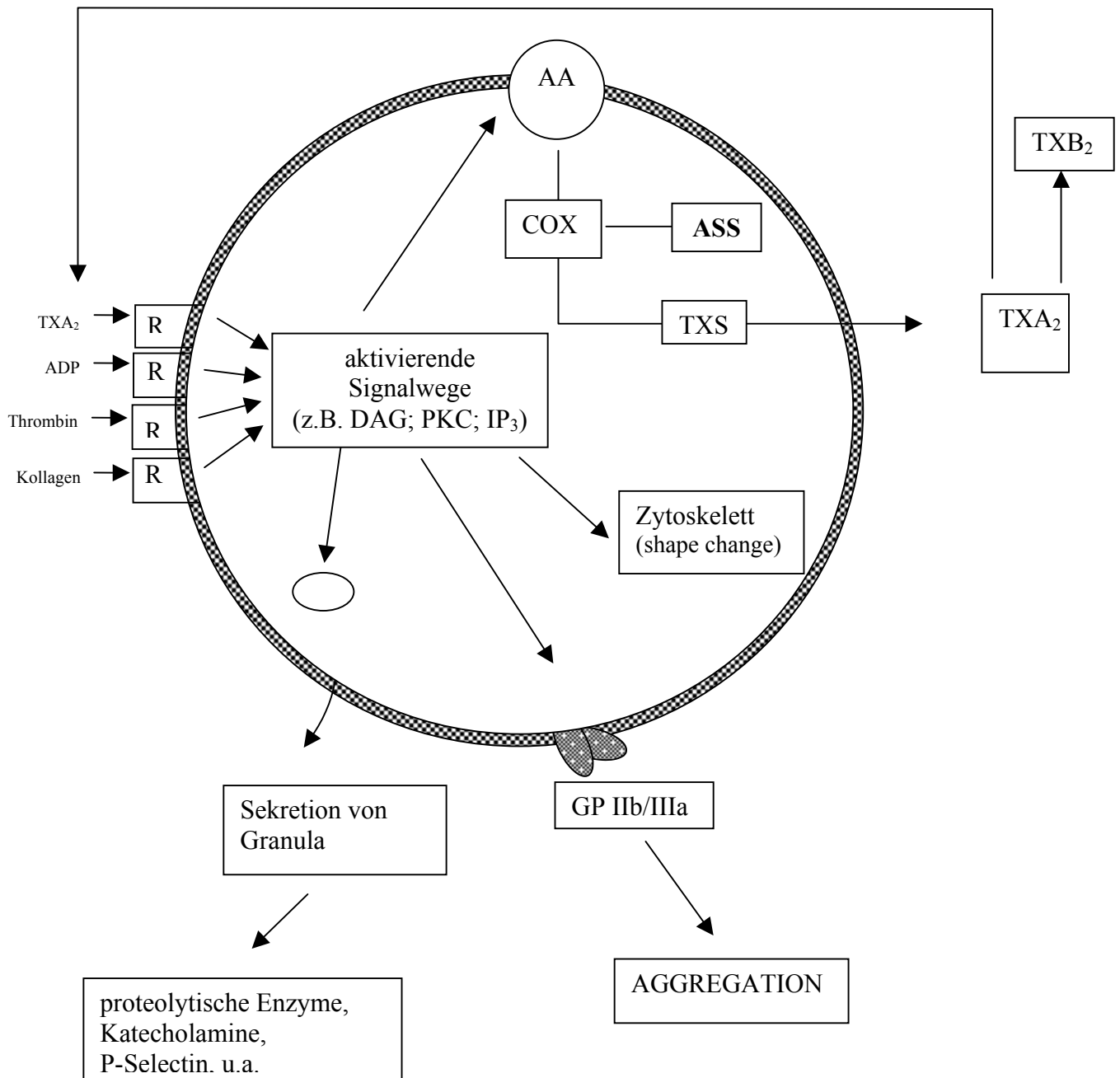
1.4 BIOCHEMISCHE UND METABOLISCHE MECHANISMEN IN THROMBOZYTEN MIT EINFLUSS AUF DIE AGGREGATION

Im Rahmen des Aktivierungsprozesses laufen zahlreiche biochemische Vorgänge ab (z.B. Erhöhung der intrazellulären Kalzium-Konzentration, Aktivierung der Proteinkinase C und der Phospholipase A_2), die letztlich durch Kontraktion des Zytoskeletts und Pseudopodienausbildung zum „shape change“ sowie zur Aktivierung von Oberflächenrezeptoren (GP-IIb/IIIa) führen [Gawaz, 1999]. Abbildung 2 gibt eine vereinfachte Darstellung der biochemischen Vorgänge in einem aggregierenden Thrombozyten wieder. Die Proteinkinase C phosphoryliert eine Reihe weiterer regulatorischer Proteine, welche die Sekretion von Granula und die Aktivierung von GP-IIb/IIIa steuern. Phospholipase A_2 katalysiert die Freisetzung von Arachidonsäure aus den Membranphospholipiden; Arachidonsäure wiederum wird durch die Cyclooxygenase zunächst zu PGG_2 umgesetzt und dann reduziert zu PGH_2 , woraus die Thromboxan-Synthase schließlich Thromboxan A_2 (TXA_2) synthetisiert (vgl. 1.6). Das so entstandene und in den Extrazellulärraum freigesetzte TXA_2 wirkt über einen spezifischen TXA_2 -Rezeptor auf der Thrombozytenoberfläche aktivierend auf die Aggregation und führt über Vasokonstriktion zu einer Verlangsamung der Strömungsgeschwindigkeit, was ebenfalls die Thrombusbildung unterstützt. TXA_2 wird allerdings sehr rasch zu Thromboxan B_2 (TXB_2) hydrolysiert und ist als stabiles Endprodukt im Plasma nachweisbar.

Ein wichtiger inhibitorischer Signalweg beinhaltet die Bildung des second messenger Moleküls cAMP durch das Enzym Adenylatzyklase. Dieses wird durch Antagonisten der Thrombozytenaktivierung wie Prostazyklin und Prostaglandin E_1 aktiviert.

Abbildung 2

Vereinfachte schematische Darstellung der Aktivierung eines Thrombozyten und der Metabolisierung von Arachidonsäure. AA: Arachidonsäure, R: Rezeptor, weitere Abkürzungen siehe Seite II.



1.5 ANGRIFFSPUNKTE ZUR PHARMAKOLOGISCHEN THROMBOZYTEN-FUNKTIONSCHEMMUNG

Eine pharmakologische Hemmung der Thrombozytenfunktion ist auf allen Stufen der Thrombozytenaktivierung möglich. Von besonderer klinischer Relevanz sind Pharmaka, die mit den Verstärkungsmechanismen der Thrombozytenaktivierung interferieren [Weber et al., 1997], wozu die Hemmung der thrombozytären Thromboxan-Synthese sowie ADP - abhängiger Aktivierungsmechanismen gehören. Hemmstoffe der Fibrinogenbindung inhibieren als GP-IIb/IIIa-Antagonisten die Thrombozyten-Aggregation, unabhängig davon, über welchen Mechanismus sie induziert wurden.

Der bedeutendste und am häufigsten eingesetzte Hemmstoff der Thrombozytenfunktion ist Acetylsalicylsäure (ASS). Klinische Studien mit ASS haben eine Abnahme der Bypass-Frühverschlüsse von bis zu 50 % zeigen können [WEBSTER & DOUGLAS, 1987], so dass ein erheblicher Anteil der Bypass-Patienten von alleiniger antithrombotischer Therapie mit ASS nicht profitiert. Ob eine Reduktion der Inzidenz perioperativer Myokardinfarkte erreicht werden kann, ist bisher nicht gesichert.

Eine alternative Möglichkeit, medikamentös Einfluss auf die Plättchenaktivierung zu nehmen ist durch GP IIb/IIIa Rezeptorantagonisten gegeben. Zu den auch klinisch eingesetzten Vertretern dieser Wirkstoffgruppe gehören z.B. Abciximab, Eptifibatid und Tirofiban. Zwar wurden diese Wirkstoffe in großen klinischen Studien untersucht, aufgrund der engen Indikationsstellung (transluminale Koronarinterventionen und akutes Koronarsyndrom) und des höheren Blutungsrisikos ist eine standardisierte Prophylaxetherapie im Rahmen der Bypass-Chirurgie im allgemeinen nicht möglich.

Ein weiterer Angriffspunkt für antithrombotische Substanzen besteht in der Interaktion mit Aktivierungsrezeptoren durch die Thienopyridine Ticlopidin und Clopidogrel. Ihr Wirkmechanismus besteht in der irreversiblen Hemmung des thrombozytären ADP-Rezeptors [HECHLER et al., 1998]. Bekannte Nebenwirkungen sind Durchfälle, Hautausschläge und Neutropenien (Ticlopidin). Sehr selten, aber potentiell lebensbedrohlich, ist die nach Ticlopidin und in Einzelfällen auch Clopidogrel beobachtete thrombotisch-thrombozytopenische Purpura. Vor allem aufgrund der hohen Therapiekosten wird

gegenwärtig ASS in der postoperativen Thromboseprophylaxe nach Bypass-Operation der Vorzug gegeben.

1.6 DIE CYCLOOXYGENASE

Die Cyclooxygenase (PGH-Synthase) ist ein ubiquitär im Organismus vorkommendes, Enzym, das die Biosynthese von Prostaglandinen und anderen Eikosanoiden einschließlich TXA_2 katalysiert.

Von diesem Enzym sind zwei Isoformen bekannt. Eine „konstitutive“ (COX-1) und eine „induzierbare“ Isoform (COX-2) werden unterschieden [VANE JR, 1998]. Im Gefäßendothel und der Magenmukosa wird durch die COX-1 hauptsächlich die Synthese von PGI_2 und PGE_2 katalysiert, welche nach Freisetzung vor allem antithrombotische bzw. zytoprotektive Wirkungen entfalten. Die thrombozytäre TXA_2 -Synthese wird ebenfalls der COX-1 zugeschrieben. Die induzierbare COX-2 wird vor allem mit der Synthese von Prostaglandinen bei Schmerz- und Entzündungsprozessen in Verbindung gebracht. Ebenfalls wird eine konstitutive Expression von COX-2 in der Niere und im ZNS beobachtet.

Unter katalytischer Mitwirkung der Cyclooxygenase wird die aus den Membranphospholipiden freigesetzte Arachidonsäure zunächst unter Einführung von Sauerstoff (Oxygenierung) und Ringschluß (Zyklisierung) in das Prostaglandin-Hydroendoperoxid PGG_2 überführt. An diese sogenannte „Cyclooxygenasereaktion“ schließt sich eine „Peroxidasereaktion“ an, in der PGG_2 zu PGH_2 reduziert wird. Beide Intermediärprodukte (Endoperoxide) sind chemisch labil. Im Thrombozyten entsteht aus den Prostaglandinendoperoxiden, unter katalytischer Einwirkung der Thromboxan-Synthase, hauptsächlich TXA_2 , das rezeptorvermittelt vasokonstriktorisch wirkt und die thrombozytäre Aggregation fördert.

1.7 HEMMUNG DER CYCLOOXYGENASE DURCH ASS

ASS hemmt selektiv und irreversibel die Cyclooxygenase. Die Grundlage dieser Wirkung ist die Acetylierung einer funktionell wichtigen Aminosäure, Serin₅₃₀, im COX-1 Molekül. [Roth et al., 1975]. Zwar führt diese Acetylierung zur irreversiblen Inaktivierung des Enzyms, sie findet aber nicht im katalytischen Zentrum statt. Es erfolgt vielmehr eine sterische Hinderung für den Zugang der AA zum aktiven Zentrum der Cyclooxygenase. Shimokawa et al. konnten zeigen, dass ein Austausch von Ser₅₃₀ durch Ala₅₃₀, eine Aminosäure ohne potentielle Acetylierungsstelle, zwar die inhibitorische Wirkung von ASS verhindert, nicht aber die katalytische Wirkung des Enzyms beeinflusst [Shimokawa & Smith, 1992]. Garavito et al. entwickelten nach der Aufklärung der Kristallstruktur der Cyclooxygenase ein Modell, das den Wirkmechanismus von ASS beschreibt [Picot et al., 1994]. Demnach muss das Substrat Arachidonsäure einen Kanal im Cyclooxygenasemolekül passieren, an dessen Ende sich das katalytische Zentrum befindet. Die Aminosäure Ser₅₃₀ befindet sich an der engsten Stelle dieses Kanals. Die Acetylierung von Ser₅₃₀ führt somit zu einer Blockierung des Tunnels und aufgrund der stabilen Bindung zu einer irreversiblen Hemmung des Enzyms. Die für die katalytische Funktion entscheidende Aminosäure ist Tyr₃₈₅ [Loll et al., 1995]. Im Unterschied zu anderen COX-Inhibitoren, wie z.B. Diclofenac und Ibuprofen, die beide Isoformen im gleichen Ausmaß hemmen, betrifft die Hemmung durch ASS in erster Linie die COX-1. Erst in ca. 150-fach höherer Konzentration wird eine vergleichbare Hemmung der COX-2 erzielt [Mitchell et al., 1993] (Tabelle 2).

Tabelle 1

Cyclooxygenase Inhibitoren und ihre IC₅₀-Werte in intakten Zellen (Auswahl)

NSAID	COX-1 IC ₅₀ [μM]	COX-2 IC ₅₀ [μM]	Verhältnis COX-2/COX-1 (COX-1/COX-2)	Referenz
ASS	1,66	278	166 (0,006)	Mitchell et al, 1994
Indometazin	0,028	1,7	60 (0,016)	Mitchell et al, 1994
Ibuprofen	4,9	72,8	15 (0,066)	Mitchell et al., 1994
Diclofenac	1,7	1,2	0,7 (1,43)	Mitchell et al, 1994
Meloxicam	0,0057	0.0019	0,33 (3)	Engelhardt et al, 1996
NS-398	16,8	0,103	0,006 (163)	Panara et al, 1995
Celecoxib	15	0,04	0,002 (375)	Penning et al, 1997

1.8 ASS ALS STANDARDPRÄPARAT IN DER THROMBOSEPROPHYLAXE

Die Cyclooxygenase ist das Schrittmacherenzym in der Prostaglandinbiosynthese. ASS hemmt sowohl die TXA_2 -Synthese in den Blutplättchen als auch die Prostazyklinsynthese in Endothelzellen. Das Ziel antithrombotischer ASS-Therapie ist, die Thrombozytenaktivierung, als Ursache koronarer Durchblutungsstörungen, zu hemmen und die endotheliale Prostazyklinsynthese möglichst unbeeinflusst zu lassen.

Die Resorption erfolgt nach oraler Gabe teilweise schon im Magen, größtenteils aber im oberen Dünndarm. Aufgrund des sauren Magenmilieus liegt ASS (pK_a 3,6) in nicht dissoziierter Form vor und wird deshalb gut resorbiert. (Die schädigende Wirkung auf die Magenschleimhaut beruht neben der Hemmung protektiver Prostaglandine auch darauf, dass sich ASS infolge Dissoziation bei intrazellulärem pH in den Magenschleimhautzellen anreichert.) ASS wird nicht nur im Plasma, sondern auch schon bei der Passage durch die Leber zu Salizylsäure hydrolysiert, so dass nur etwa 30% der gesamten Salizylatmenge im Plasma als Acetylsalicylsäure vorliegen. Thrombozyten sind aufgrund ihres fehlenden Zellkerns nicht in der Lage, COX-1 neu zu synthetisieren. Somit sind einmal gehemmte Thrombozyten für den Rest ihrer Lebensdauer von ca. 7-10 Tagen nicht mehr in der Lage, TXA_2 zu bilden. Kernhaltige Zellen (z.B. des vaskulären Endothels) können hingegen aktives Enzym innerhalb weniger Stunden resynthetisieren. Bei niedrigen ASS-Dosen ($< 100\text{mg}$ pro Tag) hat dies bei Hemmung der thrombozytären Thromboxan-Synthese eine persistierende Synthese von Prostazyklin in der Gefäßwand zur Folge. In diesem Dosisbereich findet auch eine präsystemische Acetylierung der thrombozytären Cyclooxygenase statt. Folglich hemmt ASS die thrombozytäre COX bereits in der portalen Zirkulation irreversibel, während die ASS-Plasmakonzentration im systemischen Kreislauf nach der ersten Leberpassage zu niedrig sind, um die endotheliale Cyclooxygenase wesentlich zu beeinflussen. Dadurch wird in selektiver Weise die TXA_2 -Synthese in Thrombozyten inhibiert, die Synthese des vasodilatierenden und antiaggregatorisch wirksamen Prostazyklins jedoch nicht verhindert [CLARKE et al., 1991; PARIGNANI et al., 1982; PEDERSEN & FITZGERALD, 1984; TOGHI et al., 1992]. Somit kann bei geeigneter Dosierung (100 mg/Tag), die Thrombozytenaktivierung gehemmt werden, ohne die wünschenswerte, aggregationshemmende Prostazyklinsynthese vaskulärer Zellen (Endothel, glatter Muskel) zum Erliegen zu bringen.

1.9 STELLENWERT DER ASS-THERAPIE BEI ERHÖHTEM KARDIOVASKULÄREM RISIKO

Die Prävention koronarer, zerebraler und peripherer Durchblutungsstörungen bei Patienten mit erhöhtem vaskulären Risiko durch ASS ist durch zahlreiche klinische Studien, gut belegt. Neuere Studien zeigen aber auch, dass eine erhebliche interindividuelle Variabilität bezüglich der Hemmung der Thrombozytenfunktion durch ASS besteht.

Die Problematik einer klinisch unzureichenden ASS-Wirkung bei Patienten mit atherosklerotischem Risikoprofil war in den neunziger Jahren Gegenstand mehrerer klinisch-pharmakologischer Untersuchungen. So konnten Helgason et al. eine insuffiziente Thrombozytenfunktionshemmung durch ASS bei einer Subgruppe von Patienten mit zerebrovaskulären Durchblutungsstörungen nachweisen, die zur Prävention von Schlaganfällen mit ASS behandelt wurden. Bei 20 % dieser Patienten wurde keine adäquate Thrombozytenfunktionshemmung festgestellt, wobei Complianceprobleme aufgrund des Studiendesigns ausgeschlossen wurde [HELGASON et al., 1994a; HELGASON et al., 1994b]. Nur bei einem Teil dieser Patienten konnte durch Dosissteigerung (≥ 600 mg/Tag) eine ausreichende Plättchenhemmung erzielt werden. Die Autoren schlossen daraus, dass die Ursache dieser „ASS-Resistenz“ auf einer nicht ausreichenden Bioverfügbarkeit oder einer herabgesetzten Sensitivität von Thrombozyten gegenüber ASS beruhte.

Bemerkenswert sind in diesem Zusammenhang Untersuchungen am Institut für Pharmakologie und klinische Pharmakologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. In RT-PCR und Western-Blot Untersuchungen konnte an gewaschenen humanen Thrombozyten neben COX-1 auch die Isoform COX-2 einschließlich COX-2 mRNA nachgewiesen werden [WEBER et al., 1999]. In der Annahme, dass es einer 90 %-igen Hemmung der TXA₂-Synthese bedarf um einen klinisch relevanten antithrombotischen Effekt durch ASS zu erzielen [FITZGERALD GA, 1985], würde bereits eine im Vergleich zu COX-1 nur geringe Aktivität von COX-2 im Thrombozyten ausreichen, um die Wirkung von ASS im erheblichen Maß zu reduzieren oder ganz aufzuheben [HOHLFELD & SCHRÖR, 1998].

In einer prospektiven, randomisierten Doppelblindstudie untersuchten BUCHANAN et al. die Auswirkungen einer Einmaldosis ASS in unterschiedlichen Konzentrationen (80-1300 mg)

auf die primäre Hämostase an gesunden Probanden und beobachtete bei 80 mg ASS in 40 % der Fälle eine unzureichende Verlängerung der Blutungszeit. Diese Rate ließ sich durch Dosissteigerung (1300 mg ASS) auf 10 % der Probanden senken [BUCHANAN & BRISTER, 1995]. In der gleichen Studie wurden auch die Effekte einer dauerhaften ASS-Einnahme (325 mg pro Tag über mindestens 3 Monate) an 40 KHK-Patienten einen Monat vor einer geplanten ACB-Operation untersucht. Bei 42 % der ACB-Patienten stellte BUCHANAN entweder keine Veränderung oder eine Verkürzung der Blutungszeit fest; daher wurden diese Patienten als „ASS-Non-responder“ bezeichnet. Weitere Untersuchungen in dieser Gruppe ergaben eine unveränderte oder gesteigerte 12-HETE-Syntheserate und einen Anstieg der Plättchenadhäsion bei gleichzeitig verminderter TXA₂-Synthese. Buchanan et al vermuteten, dass eine erhöhte Sensitivität der Adhäsionsrezeptoren gegenüber dem jeweiligen Liganden, hervorgerufen durch einen 12-HETE Konzentrationsanstieg, die Adhäsion der Thrombozyten begünstigt und somit die Blutungszeit verkürzt. Der 12-HETE-Konzentrationsanstieg, folgerten die Autoren weiter, könnte die Folge der COX-1 Hemmung durch ASS sein, da hierdurch der Lipoxxygenase ein erhöhter Anteil des gemeinsamen Substrats Arachidonsäure zur Verfügung steht [BUCHANAN & BRISTER, 1995]. Eine detaillierte Untersuchung der Thromboxan-Synthese von Thrombozyten und deren Beeinflussung durch ASS erfolgte aber auch in dieser Untersuchung nicht.

Im Kurzzeitverlauf erwies sich eine ASS-Therapie nach akutem Myokardinfarkt (ISIS-2 – Studie mit 160 mg ASS pro Tag; [ISIS-2 GROUP, 1988]) sowie bei akutem Apoplex [CAST, 1997] vorteilhaft. Während die ANTITHROMBOTIC TRIALISTS‘ COLLABORATION unter ASS-Therapie eine verbesserte Offenbleibensrate aorto-koronarer Umgehungsgefäße fand, zeichnete sich eine ungünstige Tendenz hinsichtlich der Überlebensrate ab [ANTITHROMBOTIC TRIALISTS‘ COLLABORATION, Br med J 1994; 2002].

Im Langzeitverlauf hingegen zeigten große Metaanalysen bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit keine Vorteile. In Studien mit Patienten nach Myokardinfarkt fand sich im Langzeitverlauf sogar ein erhöhtes Risiko für einen plötzlichen Herztod (PARIS-Studie, [PARIS-GROUP, 1980]). Auch bei chronischer Herzinsuffizienz zeigte sich unter ASS-Therapie ein Trend zu erhöhter Mortalität sowie erhöhter Hospitalisierungsrate (WASH-studies; [JONES & CLELAND, 1999]). Nach Apoplex fand sich in der ESPS-I – Studie bei einer Dosis von 975 mg ASS pro Tag eine Reduktion der Mortalität im Langzeitverlauf [ESPS-GROUP, 1990].

Sicherlich ist die Prävention thrombembolischer Durchblutungsstörungen durch ASS bei Patienten mit erhöhtem vaskulären Risiko durch klinische Studien belegt. Allerdings zeigen die Studien auch, dass eine erhebliche interindividuelle Variabilität bezüglich der Thrombozytenfunktionshemmung durch ASS existiert, wobei die Gründe bisher unklar sind.

1.10 FRAGESTELLUNG

Die vorliegende Arbeit ging der Frage nach, ob eine „Resistenz“ gegenüber ASS, die potentiell Ursache für kardiovaskuläre Komplikationen im Rahmen einer ACB-Operation sein kann, anhand der Untersuchung der Thrombozytenfunktion nachweisbar ist. Dies wurde an Patienten mit stabiler KHK untersucht, die sich einer elektiven aortokoronaren Bypass-Operation unterzogen. Sämtliche Patienten erhielten routinemäßig zur Prävention kardiovaskulärer Zwischenfälle postoperativ täglich 100 mg ASS. Der Nachweis der ASS-Resistenz sollte anhand funktioneller und biochemischer Daten zur Thrombozytenfunktion erbracht werden. Hierfür wurde die Thrombozyten-Aggregation und thrombozytäre TXA₂-Synthese herangezogen, wobei wiederholte Messungen dieser Parameter während des mehrtägigen stationären Aufenthalts, sowohl vor als auch nach der ACB-Operation, vorgesehen waren.

Folgende Teilfragen wurden betrachtet:

1. Ist die Hemmung der Thrombozytenfunktion (Aggregation) durch ASS verändert?
2. Wenn ja, betrifft dies auch den thrombozytären Angriffspunkt von ASS, d.h. die Cyclooxygenase vermittelte Thromboxan-Synthese?
3. Wenn dies auch zutrifft: kann dies mit einer Veränderung auf der Ebene der COX-2 in Verbindung gebracht werden, die potentiell die ASS-Resistenz erklären kann?

Zusätzlich wurden diese Daten an einer Gruppe gesunder Probanden erhoben und mit den Ergebnissen der Patienten verglichen.

2 METHODIK

Vor Beginn der Untersuchungen wurde das zustimmende Votum der Ethikkommission der Heinrich-Heine-Universität eingeholt (Studennummer #1377). Alle Patienten wurden über den Zweck der Untersuchung aufgeklärt und gaben ihre schriftliche Zustimmung.

2.1 PATIENTEN

Von den 20 in die Untersuchungen einbezogenen Patienten waren 5 weiblich und 15 männlich. Das Durchschnittsalter betrug 65,7 Jahre ($\pm 2,1$). Die Diagnose lautete in allen Fällen koronare Dreigefäßerkrankung mit stabiler Angina pectoris. Darüber hinaus lagen bei keinem der Patienten weitere wesentliche Erkrankungen vor.

Vom ersten postoperativen Tag an erhielten die Patienten Furosemid (2 x täglich 20 mg, p.o.) und KCl (3 x täglich 8 mval, p.o.). Zur Hemmung der Thrombozytenfunktion wurde beginnend am ersten postoperativen Tag ASS 100 mg verabreicht, zur Antikoagulation Heparin (7500 bis 10000 IE, s.c.) und zur Ulcusprophylaxe Famotidin (1 x täglich 40 mg, p.o.).

2.2 PROBANDEN

Insgesamt nahmen 5 freiwillige, gesunde Probanden an der Studie teil. Sie hatten vor Versuchsbeginn seit mindestens 14 Tagen weder ASS noch andere NSAR eingenommen. Die Probanden waren zwischen 26 und 45 Jahre alt ($34 \pm 3,2$ Jahre) und männlich.

2.3 BLUTENTNAHME UND LEUKOZYTENZÄHLUNG

Die Blutentnahme erfolgte in der Klinik für Thorax- und Kardiovaskuläre Chirurgie der Universitätskliniken der Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf. Das Blut (20 ml) wurde mit einem Vacutainer[®]-System (Becton Dickinson Vacutainer Systems, Plymouth UK, 0,129 M Citrat) entnommen und anschließend sofort aufgearbeitet. Die Entnahmen erfolgten morgens bzw. mittags.

2.4 PLASMAGEWINNUNG UND PELLETIERUNG DER THROMBOZYTEN FÜR DIE WESTERN-BLOT-UNTERSUCHUNGEN

Die Gewinnung plättchenreichen Plasmas (PRP) erfolgte durch Zentrifugation des Blutes in den Vacutainer-Röhrchen für 10 min bei 1400 U/min und Raumtemperatur (Laborfuge, Heraeus Christ, Osterode). Nach der Zentrifugation wurde das PRP mittels Kunststoffpipette vorsichtig abgehoben, der pH-Wert kontrolliert und gegebenenfalls mit 1M NaOH bzw. 1M HCl auf pH 7,4 eingestellt. Beim Aufnehmen des PRP tauchte die Pipettenspitze nur minimal in das PRP ein, um weitestgehend leukozytenfreies PRP aufzunehmen. Dies wurde mit Hilfe eines Ausstrichs nach der Entnahme des PRP dokumentiert.

Für die Western-Blot Untersuchungen wurden pro Patient 2 Eppendorf-Gefäße mit 1,5 ml PRP gefüllt, bei 14000 U/min für 10 min zentrifugiert. Die Pellets wurden bei -80 °C tiefgefroren.

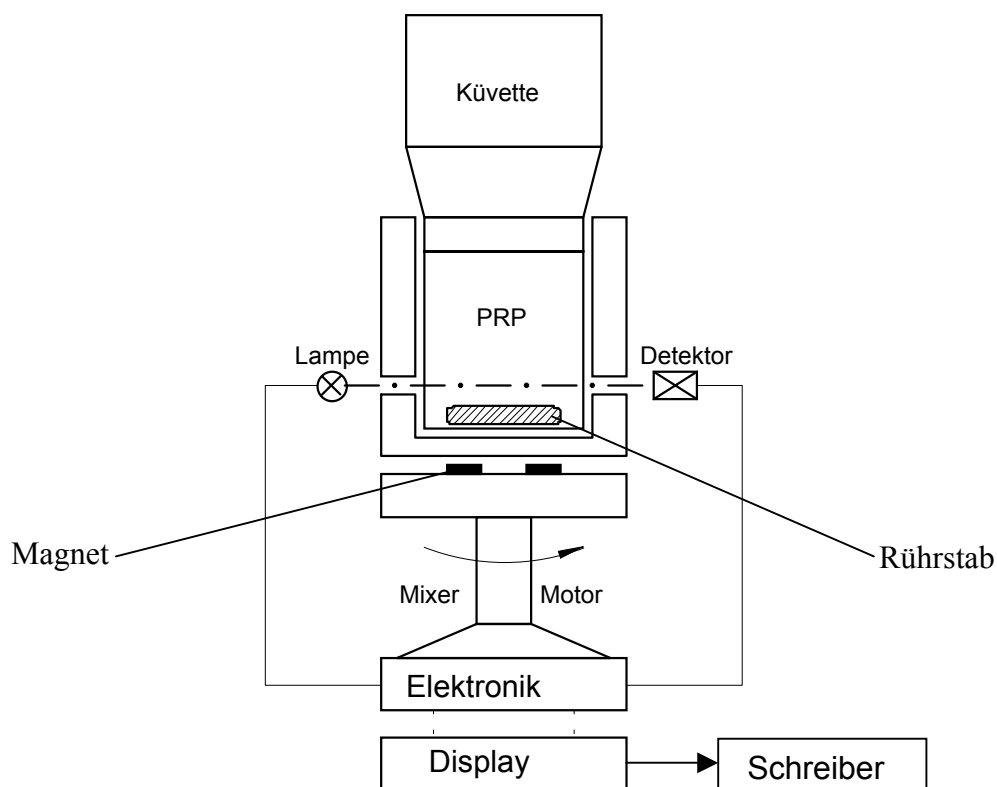
2.5 MESSUNG DER THROMBOZYTEN-AGGREGATION

Die Messung der Thrombozyten-Aggregation im plättchenreichen Plasma erfolgte photometrisch in einem Zweikanal-Aggregometer (Labor Hamburg) nach Born [1962]. Die Messung beruht auf einer Änderung der Lichttransmission, welche entweder durch Formwandel („shape change“) oder Aggregation der Thrombozyten verursacht wird. Polychromatisches Licht, welches von einer Niederspannungsglühlampe emittiert wird, trifft auf die Plättchensuspension. Die Bildung von Plättchenaggregaten führt zu einer Abnahme der Partikelzahl und damit zu einer Zunahme der Lichtdurchlässigkeit, die von einer Photozelle in ein elektronisches Signal umgewandelt und weitergeleitet wird.

Die Eichung des Gerätes erfolgte durch Proben mit plättchenfreiem (PFP) und plättchenreichem Plasma (PRP). Das PFP wurde durch Zentrifugation (10 min, 14000 U/min, Eppendorf Tischzentrifuge) hergestellt.

Abbildung 3

Schematische Darstellung der Meßzelle eines Aggregometers.



2.6 DURCHFÜHRUNG DER AGGREGATIONSVERSUCHE

200 µl PRP + 50 µl Tyrodepuffer wurden bei 37 °C für 4 min vorinkubiert. Anschließend begann die Messung und der in der Küvette befindliche Rührstab wurde mit 1200 U/min gedreht. Eine Minute nach Beginn der Messung wurden 5 µl Kollagen (1 µg/ml) als Aggregationsstimulus zu pipettiert. Die Messung endete nach 6 min und die Thromboxan-Bildung wurde zu diesem Zeitpunkt durch Zugabe von 15 µl EDTA (5,8 mM) und 3 µl Indometazin (0,1 mM) gestoppt. Die Aggregate wurden bei 14000 U/min für 10 min abzentrifugiert und der Überstand zur Messung des stabilen Thromboxan-Metaboliten TXB₂ bei -20 °C eingefroren.

2.7 TESTSUBSTANZEN

Nach jeweils einer Kontrollaggregation wurden 200 µl PRP für 4 min mit 50 µl Tyrodelösung vorinkubiert. ASS wurde als Lysinsalz (Aspisol[®]) vor Beginn der Messungen in der Tyrodelösung in 5-facher Endkonzentration gelöst.

ASS wurde in Konzentration von 30 µM und 100 µM eingesetzt. Diese wurden gewählt, da in Vorversuchen die Zugabe von 30 µM zu einer halbmaximalen und die Zugabe von 100 µM ASS zu einer annähernd maximalen Hemmung der Thromboxan-Synthese unter den gewählten Bedingungen führte. Zu Beginn und Ende der Aggregationsmessungen wurde jeweils eine Kontrollaggregation ohne ASS durchgeführt.

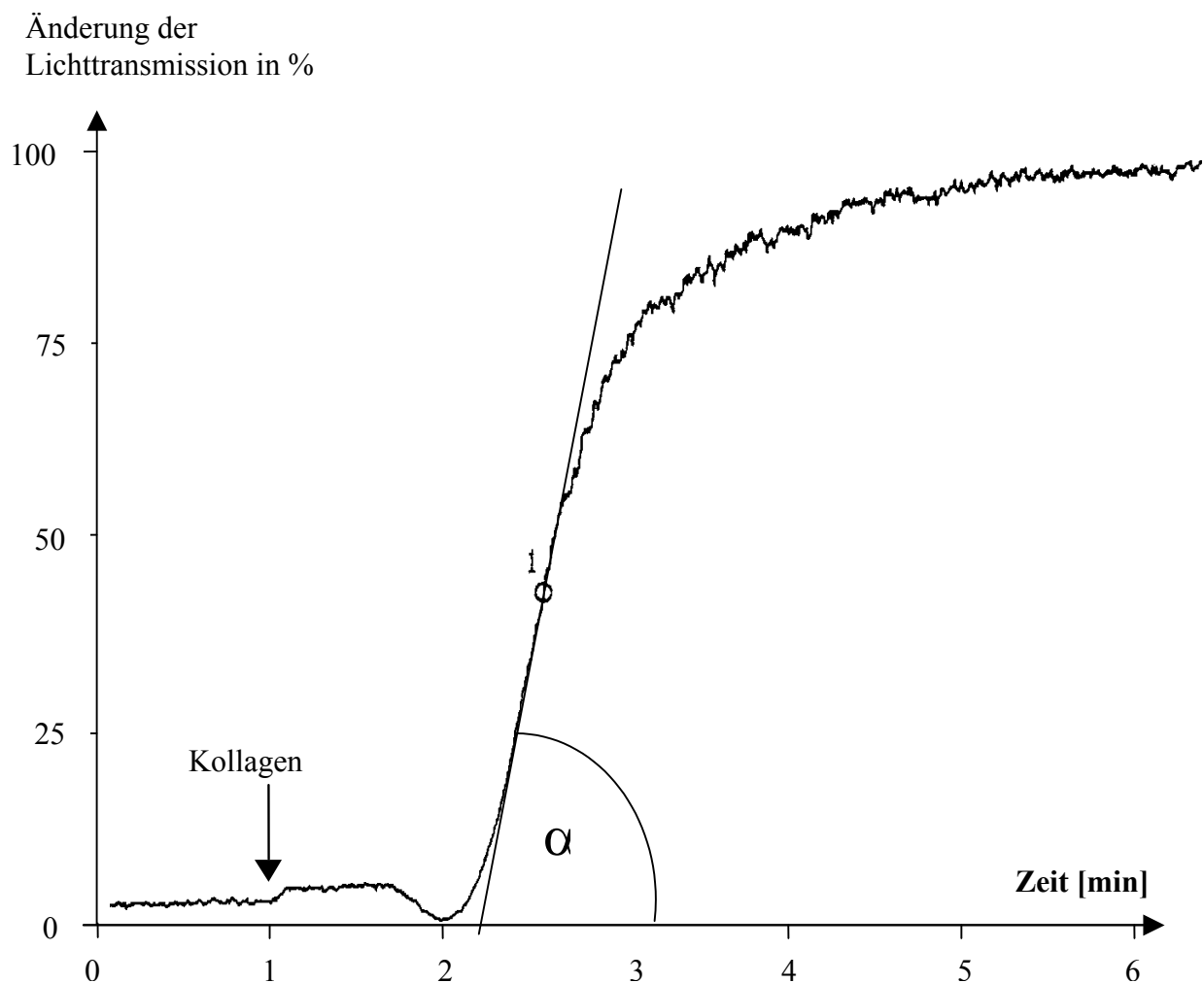
2.8 AUSWERTUNG DER AGGREGATIONSKURVEN

Sämtliche Aggregationskurven wurden mittels eines direkt mit dem Aggregometer verbundenen Druckers aufgezeichnet und ausgedruckt. Bei diesen Kurven entsprechen 100 % der Lichttransmission in plättchenfreiem Plasma und 0 % der Lichttransmission in PRP im Moment des shape change. Als Maß für die thrombozytäre Aggregation wurde die maximale Steigung der Aggregationskurve ermittelt. Hierzu wurde die Tangente durch den Punkt mit

der maximalen Steigung gelegt und der Schnittwinkel α zwischen dieser Tangente und der Abszisse gemessen. Der Tangens dieses Winkels α ergab die Steigung der Tangente.

Abbildung 4

Originale Aggregationskurve und die Ermittlung des Winkels α zwischen der Zeitachse und der Tangente an die Aggregationskurve durch den Punkt mit der größten Steigung (1).



2.9 PROTEINBESTIMMUNG

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit Hilfe des DC-Protein-Assay nach Lowry. Die Substanzen wurden als Testkit von der Firma Biorad (München) bezogen.

2.10 WESTERN-BLOT-UNTERSUCHUNGEN

Für die elektrophoretische Proteintrennung wurden die Thrombozytenpellets aufgetaut und mit Hilfe des Ripa Puffers (250 µl/ Thrombozytenpellet) lysiert. Hierzu wurden die Pellets mittels Ultraschall in dem bereits zugegebenen Puffer gelöst, anschließend mit 13000 U/min bei 4 °C für 20 min zentrifugiert, um abschließend den Überstand abzuheben und bei 95 °C für 10 min zu inkubieren.

Die Lysate wurden gleichzeitig mit einem Molekulargewichtsstandard (Sigma Deisenhofen) und einem COX-2 Proteinstandard (Maus Makrophagen) auf ein 12 % Polyacrylamidgel aufgetragen. Pro Spur wurden 20 µg Protein aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei 200 Volt und variabler Stromstärke in der mit Laufpuffer gefüllten Elektrophoresekammer (Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, CA, USA). Die Dauer lag bei einer Stunde und wurde gestoppt, sobald die Front den unteren Rand des Gels erreicht hatte.

Die aufgetrennten Proteine wurden im „Wet-Blot“-Verfahren auf eine PVDF-Membran (Immobilion P, Millipore) übertragen. Der Blot wurde bei 4 °C über Nacht durchgeführt. Im Anschluss wurde die Membran zur Absättigung unspezifischer Bindungen mit 5 % Trockenmilchpulver in TBS-T für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Erstantikörper (COX-2-AK, Maus, Cayman) in TBS-T mit 5 % Trockenmilchpulver für 1 h. Alle Schritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Vor Inkubation mit dem Zweitantikörper (Anti-Maus AK, HRP-conjugated) wurde dreimal für jeweils 10 min mit TBS-T gewaschen. Jetzt wurde die Membran für 1 h mit dem Zweitantikörper und Antibiotin Antikörper zur Detektion des Standards inkubiert. Im Anschluss wurde erneut dreimal für je 10 min mit TBS-T gewaschen und abschließend die Peroxidaseaktivität des Zweitantikörpers mit Chemilumineszenz (ECL Kit, Amersham) detektiert. Die Detektion erfolgte autoradiographisch, indem die aus der peroxidasevermittelten Oxidation von Luminol resultierende Lichtemission dazu genutzt wurde, einen Röntgenfilm (HyperfilmTM ECLTM; Amersham-Pharmacia-Biotech; Freiburg) zu belichten. Die Belichtungszeiten betrugen versuchsabhängig zwischen 30 sec und 3 min.

Die Quantifizierung der COX-2-Expression erfolgte anhand des Western-Blots unter Verwendung eines Densitometers (IL Boskamp 377, Instrumentational Laboratory Inc, USA).

2.11 TXB₂-RADIOIMMUNOASSAY

Die TXB₂-Bestimmungen wurden im RIA-Labor des Instituts für Pharmakologie und klinische Pharmakologie durchgeführt. Das Messprinzip beruht darauf, dass eine Probe mit dem zu messenden Antigen (TXB₂) zusammen mit einer bekannten Menge radioaktiv markierten Antigens ([³H]TXB₂), sowie einer definierten Menge eines spezifischen Antikörpers gegen TXB₂ inkubiert wird. Markiertes und unmarkiertes Antigen konkurrieren um die Antikörperbindungsstellen. Nach einiger Zeit (18-20 h) stellt sich ein Gleichgewicht entsprechend der Konzentrationsverhältnisse zwischen Tracer und unmarkiertem Antigen ein. Nach Trennung von freiem markiertem Antigen von den markierten Antigen-Antikörper-Komplexen (Kohlepräzipitation) wurde in beiden Fraktionen die Radioaktivität bestimmt. Über Eichkurven mit bekannten Standardkonzentrationen wird anhand der gemessenen Radioaktivität die Konzentration des Antigens in der Probe ermittelt.

Die Thromboxan-Synthese nach Plättchenstimulation mit Kollagen wurde unter Verwendung eines im eigenen Labor erzeugten, polyklonalen Antikörpers (Kaninchen) durchgeführt [Schrör & Seidel, 1988]. Die Standardkurve basierte auf Messungen mit nicht markiertem TXB₂. Die Nachweisgrenze lag bei 0,04 ng/ml.

2.12 STATISTISCHE AUSWERTUNG

Sämtliche statistischen Auswertungen wurden mit Hilfe des Tabellenkalkulationsprogrammes Excel 97 durchgeführt. Alle Ergebnisse sind als Mittelwerte $\pm$ SEM angegeben. Statistische Vergleiche wurden unter Verwendung des Student t-Testes (quantitativ, unverbunden bzw. verbunden) oder des X²-Tests (qualitativ, unverbunden) durchgeführt. Der Vergleich mehrerer Parameter erfolgte mittels Varianzanalyse (ANOVA), gefolgt von einem Bonferroni-Test. Unterschiede zwischen Versuchsgruppen wurden bei $p < 0,05$ als statistisch signifikant angesehen und in Abbildungen mit „★“ markiert.

2.13 SUBSTANZEN UND LÖSUNGEN

Aspisol®	Bayer Vital, Leverkusen (1 g enthält 0,9 g DL-Lysinmino-(acetylsalicylat), entspricht 500 mg Acetylsalicylsäure)
EDTA (Titrplex III®)	Merck, Darmstadt
Indometazin	Luitpold Pharma, München
Kollagen	Hormon Chemie, München

Sofern nicht anders erwähnt wurden die nachfolgend aufgeführten Chemikalien von Sigma (Deisenhofen), Merck (Darmstadt) oder Boehringer-Mannheim (Mannheim) bezogen.

Substanzen und Lösungen für Aggregations-Experimente:

Tyrode-Lösung (HEPES gepuffert)	134 mM NaCl ; 12 mM NaHCO ₃ ; 2,9 mM KCl ; 2 mM CaCl ₂ ; 0,36 mM NaH ₂ PO ₄ ; 1 mM MgCl ₂ ; 5 mM HEPES ; 5 mM Glucose ; 0,5 mg/ml bovines Serumalbumin ; pH 7,4 .
Testmedium	134 mM NaCl ; 0,36 mM NaH ₂ PO ₄ * H ₂ O ; 1 mM MgCl ₂ *6 H ₂ O ; 5 mM HEPES pH 7,4

Substanzen und Lösungen für die TXB₂-Messung (Radioimmunoassay):

RIA-Puffer	NaCl 8,77 g/l; Na ₂ HPO ₄ 1,44 g/l; Na ₂ PO ₄ 0,26 g/l; pH 7,4.
------------	---

Antikörper

spezifischer TXB₂-Antikörper (γ-Globulin, polyklonal, anti-rabbit), hergestellt im Labor des Institutes für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie [Schrör & Seidel, 1988].

radioaktiver Tracer

[³ H]TXB ₂	Gesamtradioaktivität: 11,84 kBq; Amersham Biosciences, Freiburg (Lot # TRK 620).
-----------------------------------	---

Substanzen und Lösungen für Elektrophorese und Western-Blotting:

Ripa-Puffer	150 mM NaCl; 1 % NP 40(Octylphenoxy-(polyethoxyethanol); 50 mM Tris-HCl (pH 7,5); 0,5% DOC (Deoxycholic Acid, Sodium Salt); 0,1 % SDS .
SDS-Laufpuffer	0,1% SDS (Sodium dodecyl sulfate); 2,4 mM Tris-Base ; 20 mM Glycin .
Transferpuffer	4,8 mM Tris-Base; 40 mM Glycin; 4 % Methanol .
TBS-T	10 mM Tris-HC ; 150 mM NaCl; 0,1 % Tween 20 .
TBS-TM	10 mM Tris-HCl; 150 mM NaCl; 0,1 % Tween 20 ; 5 % Milchpulver .
Trenngel (12 %)	12 % Acrylamid; 0,75 M Tris-HCl; 0,1 % SDS ; 0,05 % v/v TEMED; 0,5 % (NH ₄) ₂ S ₂ O ₈ .
Sammelgel (4 %)	4 % Acrylamid; 62,5 mM Tris-HCl; 0,1 % SDS; 0,05% v/v TEMED; 0,5% (NH ₄) ₂ SO ₄ .
Entwickler	Processing Chemicals, Sigma
Fixierer	Natriumthiosulfat (Na ₂ S ₂ O ₃) 200 g + Kaliumbisulfit (KHSO ₄) 10 g ad 1 l aqua .
Standards	Biotinylated Protein Marker # 77166s broad range, New England Biolabs (Lot # 10H); HRP-conjugated anti #7716s Biotin-Antibody, New England Biolabs (Lot # 8).
Antikörper	
Erst-Antikörper	(COX-2 human polyclonal Antibody): Cayman Chemical (Lot: # 10774a);
Zweit-Antikörper	(Anti-mouse IgG HRP): Santa Cruz Biotechnology (Lot: # C049) .

2.1.4 GERÄTE

Blotkammer	Hoefer Semiphor TE 70, Freiburg; BioRad Trans-Blot, München.
Elektrophorese- kammer	Hoefer SE 600, Freiburg
Netzgerät	BioRad Power Pac 300, München.
Densitometer	IL Bioskamp 377, Instrumentational Laboratory Inc., USA.

3 ERGEBNISSE

3.1 VERLAUF

Komplikationen wie postoperative Blutungen, Thrombosen oder allergische Reaktionen traten nicht auf. Patienten, die operationsbedingt Blutkonserven oder andere als die oben beschriebenen Pharmaka erhielten, wurden nicht in die Studie einbezogen.

3.2 UNTERSUCHUNGEN AN PATIENTEN

Zur Durchführung wurde von insgesamt 20 Patienten an den Untersuchungstagen (am Tag vor Operation und an den Tagen 1, 5, 10 nach Operation) PRP gewonnen. Die Thrombozyten im PRP wurden mittels Kollagen (1 μ g/ml) stimuliert. Gemessen wurde die Thromboxan-Synthese und die Aggregation.

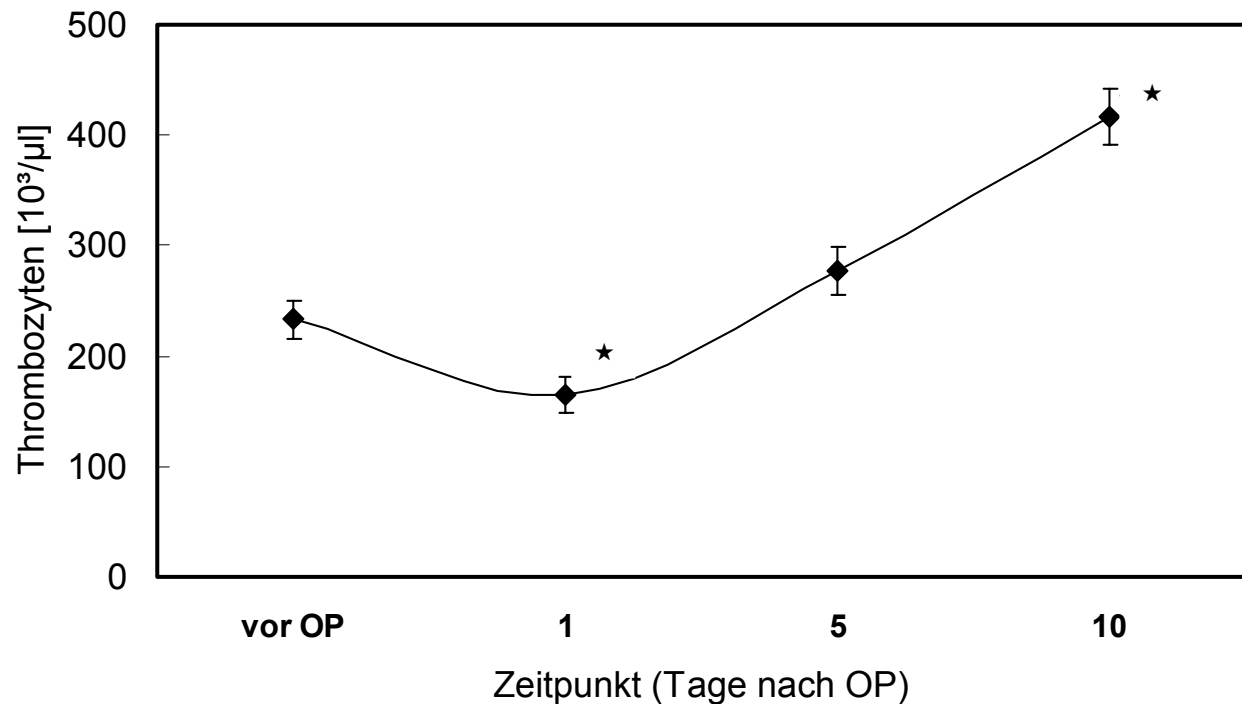
3.2.1 VERLAUF DER THROMBOZYTENZAHLE NACH ACB-OPERATION

Bei allen an den Untersuchungen teilnehmenden Patienten wurde die ACB-Operation unter Verwendung einer Herz-Lungen-Maschine und extrakorporaler Zirkulation durchgeführt. Dies führte zu charakteristischen Änderungen der Thrombozytenzahl, wie in Abbildung 5 dargestellt. An Tag 1 nach der Operation sank die Zahl der Thrombozyten signifikant gegenüber dem präoperativen Kontrollwert ($71 \pm 7 \%$; $p < 0,05$). Im weiteren Verlauf kam es zu einer kontinuierlichen Regeneration der Thrombozytenzahl. An Tag 5 nach Operation lag die Thrombozytenzahl bereits knapp, an Tag 10 nach Operation signifikant über dem präoperativen Kontrollwert ($119 \pm 9 \%$ an Tag 5 und $179 \pm 11 \%$ ($p < 0,05$) an Tag 10 nach OP).

Abbildung 5

Thrombozytenzahlen bei Patienten, die mit HLM operiert wurden.

★ $p < 0,05$ vs. Kontrolle vor Operation; $n = 20$



3.2.2 KOLLAGENINDUZIERTE AGGREGATION

In Abbildung 6 ist die Aggregation nach Kollagen-Stimulation dargestellt. Am ersten postoperativen Tag zeigte die Aggregationskurve ein Minimum, die Aggregationsfähigkeit sank gegenüber dem präoperativen Kontrollwert auf 47 ± 5 % des Kontrollwertes vor Operation. Im weiteren Verlauf nahm die Aggregation – anders als unter der Gabe von ASS zu erwarten – kontinuierlich zu. So erreichte sie an Tag 5 nach Operation einen Wert von 61 ± 3 % bezogen auf den Ausgangswert, obwohl zu diesem Zeitpunkt die orale ASS-Gabe bereits fünfmal erfolgt war. Trotz fortgeführter ASS-Therapie stieg die Aggregationsfähigkeit am Tag 10 nach Operation sogar noch weiter auf 77 ± 6 % des präoperativen Kontrollwertes. Es war im Beobachtungszeitraum somit keine adäquate Hemmung der thrombozytären Aggregation durch die Gabe von ASS nachweisbar.

Weitere Untersuchungen wurden in Gegenwart von ASS ($30\ \mu\text{M}$ bzw. $100\ \mu\text{M}$) in vitro durchgeführt. Präoperativ führte die Zugabe von $30\ \mu\text{M}$ bzw. $100\ \mu\text{M}$ zu einer signifikanten Hemmung der Aggregation auf $66 \pm 5\ %$ bzw. $31 \pm 3\ %$ des Kontrollwertes ($p < 0,05$). An den postoperativen Tagen 1 und 5 reduzierte ASS in einer Konzentration von $100\ \mu\text{M}$ in vitro die Aggregation nur inadäquat auf $70 \pm 10\ %$ bzw. $63 \pm 6\ %$. Im Gegensatz zur präoperativen Situation erhielten die Patienten täglich $100\ \text{mg}$ ASS oral. Vergleicht man die Werte an Tag 5 nach Operation untereinander führten erst $100\ \mu\text{M}$ ASS in vitro zu einer signifikanten Hemmung ($63 \pm 6\ %$; $p < 0,05$). 10 Tage nach dem operativen Eingriff war die aggregationshemmende Wirkung von ASS in vitro wieder vergleichbar mit der präoperativen Wirkung. Eine in vitro Konzentration von $30\ \mu\text{M}$ ASS führte wieder zu einer signifikanten Hemmung bezogen auf den Vergleichswert ohne ASS in vitro (siehe Tabelle 2).

Abbildung 6

Kollagen ($1\ \mu\text{g}/\text{ml}$) – induzierte Thrombozyten-Aggregation in PRP von Patienten vor (Kontrolle), 1, 5 und 10 Tage nach ACB-Operation in Gegenwart von ASS ($0, 30, 100\ \mu\text{M}$) in vitro. Die Aggregation wurde aus der maximalen Steigung der Aggregationskurve ermittelt und als $\tan \alpha$ angegeben.

★ $p < 0,05$ vs. Kontrolle (vor OP); + $p < 0,05$ vs. ASS $0\ \mu\text{M}$; $n = 20$

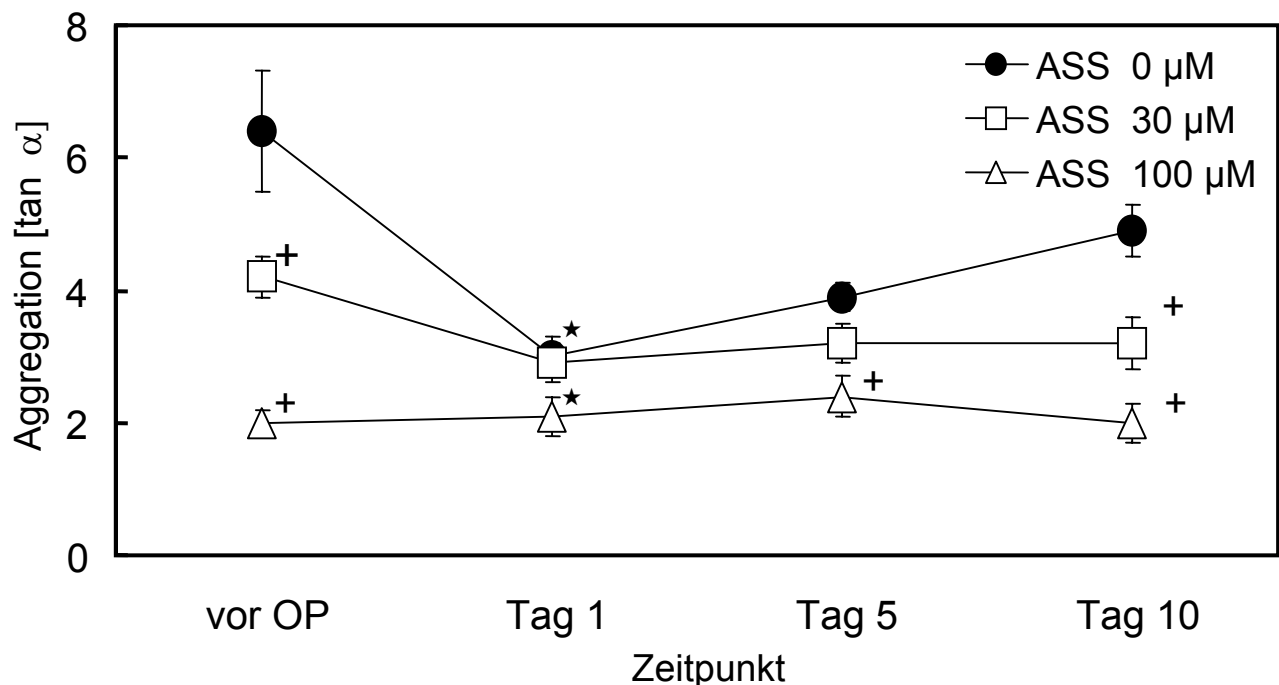


Tabelle 2

Kollageninduzierte Aggregation in PRP aus Abbildung 6. Der Einfluss von ASS auf die Aggregation ist in Prozent bezogen auf den Kontrollwert des jeweiligen Untersuchungstages angegeben.

ASS-Konzentration in vitro[μ M]	Kontrolle vor OP $\pm$ SEM	nach OP		
		Tag 1	Tag 5	Tag 10
0	100	100	100	100
30	65,6 $\pm$ 4,5	96,7 $\pm$ 10,0	82,1 $\pm$ 6,7	65,3 $\pm$ 7,6
100	31,3 $\pm$ 3,0	83,3 $\pm$ 9,3	62,5 $\pm$ 6,4	40,8 $\pm$ 5,9

3.2.3 THROMBOXAN-SYNTHESE

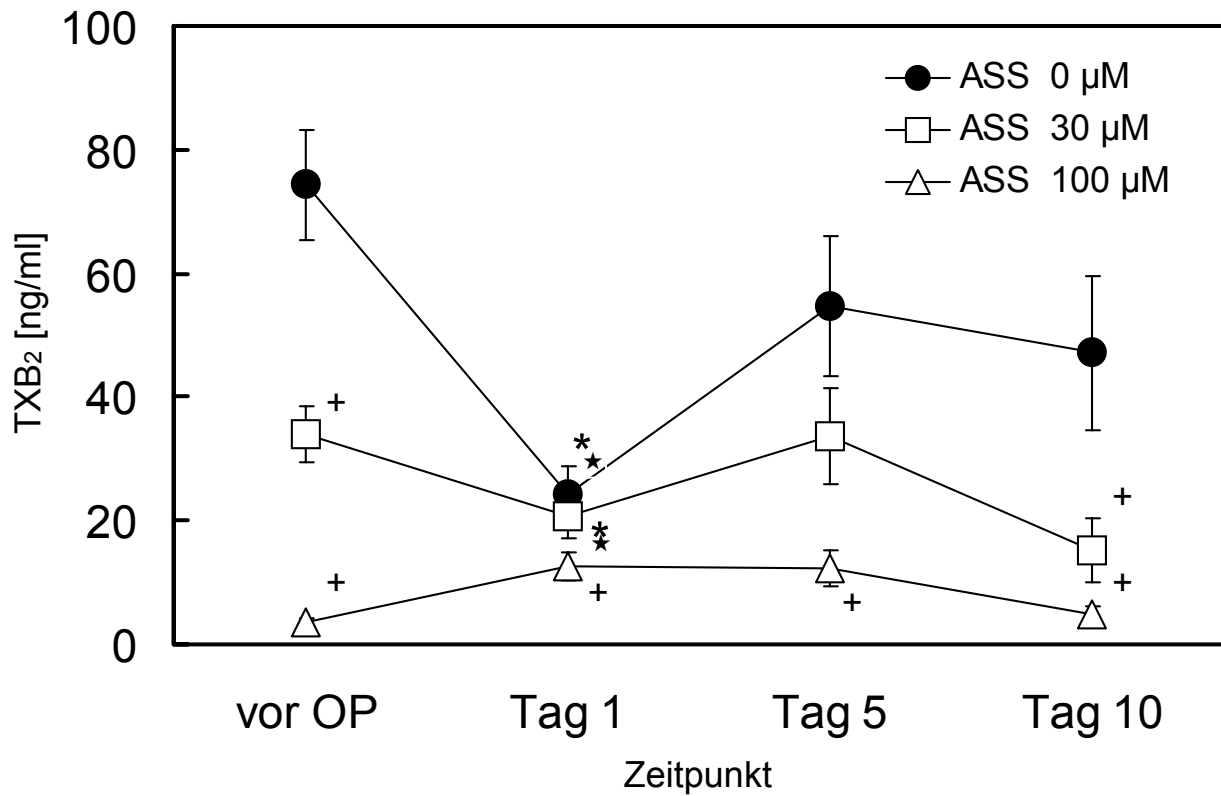
Die Thromboxanbestimmungen, die im Anschluss an die Aggregation mit Hilfe eines Radioimmunoassay durchgeführt wurden, entsprachen im wesentlichen den Befunden der Aggregationsmessung (Abbildung 7).

Am ersten postoperativen Tag fiel die Thromboxan-Synthese nach Kollagen (1 μ g/ml)-Stimulation auf etwa ein Drittel (33 ± 6 %) des präoperativen Kontrollwertes. Im weiteren Verlauf zeigte sich trotz oraler ASS-Therapie ein signifikanter Anstieg an Tag 5 im Vergleich zu Tag 1 ($p < 0,05$) auf 74 ± 15 %. An Tag 10 nach Operation betrug die Thromboxan-Synthese noch 63 ± 17 % des präoperativen Kontrollwertes. Während die Thromboxan-Synthese präoperativ durch die Zugabe von 30 μ M bzw. 100 μ M ASS signifikant gehemmt wurde, war die inhibierende Wirkung von ASS in vitro am ersten postoperativen Tag signifikant reduziert. Entsprechend der thrombozytären Aggregation führte die Zugabe von 100 μ M ASS in vitro an Tag 5 und Tag 10 nach Operation wieder zu einer stärkeren Hemmung der Thromboxan-Synthese (an Tag 5 auf 22 ± 5 % und an Tag 10 auf 10 ± 4 %).

Abbildung 7

Kollagen (1 µg/ml) –induzierte Thromboxan-Synthese in PRP der Patienten vor (Kontrolle), 1, 5 und 10 Tage nach ACB-Operation in Gegenwart von ASS (0, 30, 100 µM) in vitro. Die Thromboxan-Synthese wurde als TXB₂ mittels Radioimmunoassay gemessen und wird in ng/ml angegeben.

★ p < 0,05 vs. Kontrolle (vor Operation); + p < 0,05 vs. ASS 0 µM; n= 20

**Tabelle 3**

Kollageninduzierte Thromboxan-Synthese in PRP aus Abbildung 7. Der Einfluss von ASS auf die Thromboxan-Synthese ist in Prozent bezogen auf den Kontrollwert des jeweiligen Untersuchungstages angegeben.

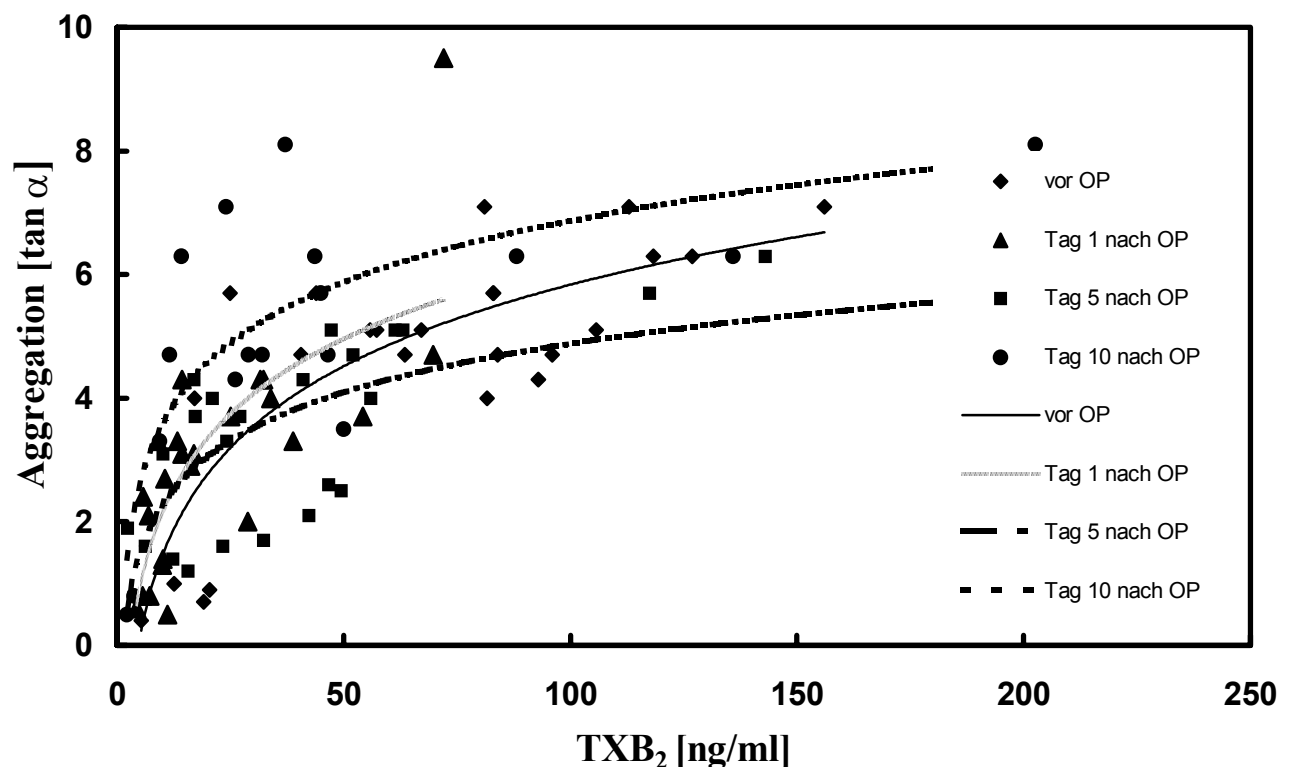
ASS-Konzentration in vitro [µM]	Kontrolle vor OP ± SEM	nach OP		
		Tag 1	Tag 5	Tag 10
0	100	100	100	100
30	45,8 ± 6,1	84,8 ± 14,5	61,6 ± 14,1	32,2 ± 11,3
100	4,8 ± 0,8	51,9 ± 8,9	22,3 ± 5,3	10,0 ± 3,5

3.2.4 KORRELATION ZWISCHEN THROMBOZYTÄRER AGGREGATION UND THROMBOXAN-SYNTHESE

Angeichts der beobachteten verminderten Sensitivität gegenüber ASS war die Frage von Interesse, ob ASS-resistente Thrombozyten auch eine möglicherweise veränderte Sensitivität gegenüber Thromboxan aufweisen. Aus diesem Grund wurden die bei jeder Einzelbestimmung gemessenen Thromboxan-Konzentrationen mit der entsprechenden Aggregationsmessung in Bezug gesetzt. (Abbildungen 8). Für jeden untersuchten Zeitpunkt ergab sich eine positive, jedoch nicht lineare Korrelation. Trotz beachtlicher interindividueller Variationen wird erkennbar, dass unter den gewählten Versuchsbedingungen für eine ca. 50%-ige Hemmung der Aggregation eine ca. 80%-ige Hemmung der Thromboxan-Synthese erforderlich ist. Beim Vergleich der Korrelationen zu den verschiedenen Zeitpunkten (vor OP, Tag 1, 5, 10 nach OP) zeigte sich kein auffallender Unterschied.

Abbildung 8

Korrelation zwischen thrombozytärer Thromboxan-Synthese und thrombozytärer Aggregation nach Stimulation mit Kollagen (1 $\mu\text{g/ml}$). Es wurde kein ASS in vitro zugegeben. Jeder Datenpunkt entspricht einem Patienten. Zusätzlich ist für jeden Untersuchungstag eine Trendlinie eingefügt.



3.3 UNTERSUCHUNGEN AN GESUNDEN PROBANDEN

Angesichts der herabgesetzten thrombozytären Sensitivität gegenüber ASS nach Bypass-Operation wurde die Hemmung der thrombozytären Aggregation und Thromboxan-Synthese auch an gesunden Probanden unter identischen Bedingungen untersucht. Insgesamt 5 Probanden nahmen über einen Zeitraum von 5 Tagen einmal täglich 100 mg ASS oral zu sich. Vor der Ersteinnahme und im Anschluss an die 5-tägige ASS-Einnahme wurden Blutproben entnommen und die Aggregation und Thromboxan-Synthese im PRP in Gegenwart von ASS (0, 30, 100 μ M) bestimmt. Diese Ergebnisse werden im folgenden den bereits beschriebenen Ergebnissen der ACB-Patienten gegenübergestellt.

3.3.1 KOLLAGENINDUZIERTE AGGREGATION BEI GESUNDEN PROBANDEN

Vor der oralen Einnahme von ASS ließ sich die thrombozytäre Aggregation durch ASS in vitro bei gesunden Probanden erwartungsgemäß deutlich hemmen (Abbildungen 9, 10). So reduzierte 30 μ M ASS in vitro die Aggregation auf 71 ± 14 % und 100 μ M ASS auf 19 ± 4 %. Diese Ergebnisse sind vergleichbar mit den präoperativen Befunden bei ACB-Patienten. Nach 5-tägiger ASS-Behandlung war die kollageninduzierte Aggregation nahezu vollständig (> 80 %) gehemmt. ASS (30 und 100 μ M) in vitro führte dementsprechend nur zu einer geringen weiteren Zunahme der Aggregationshemmung. Aufgrund der fast vollständigen Aggregationshemmung durch oral verabreichtes ASS konnte bei gesunden Probanden an Tag 5 nur noch eine geringe Wirkungssteigerung durch ASS in vitro nachgewiesen werden. (Abbildung 10).

Im Vergleich dazu lag die Aggregation bei Patienten an Tag 5 nach OP und einer Konzentration von 100 μ M ASS in vitro sogar über dem präoperativen Vergleichswert (vgl. Abbildung 6).

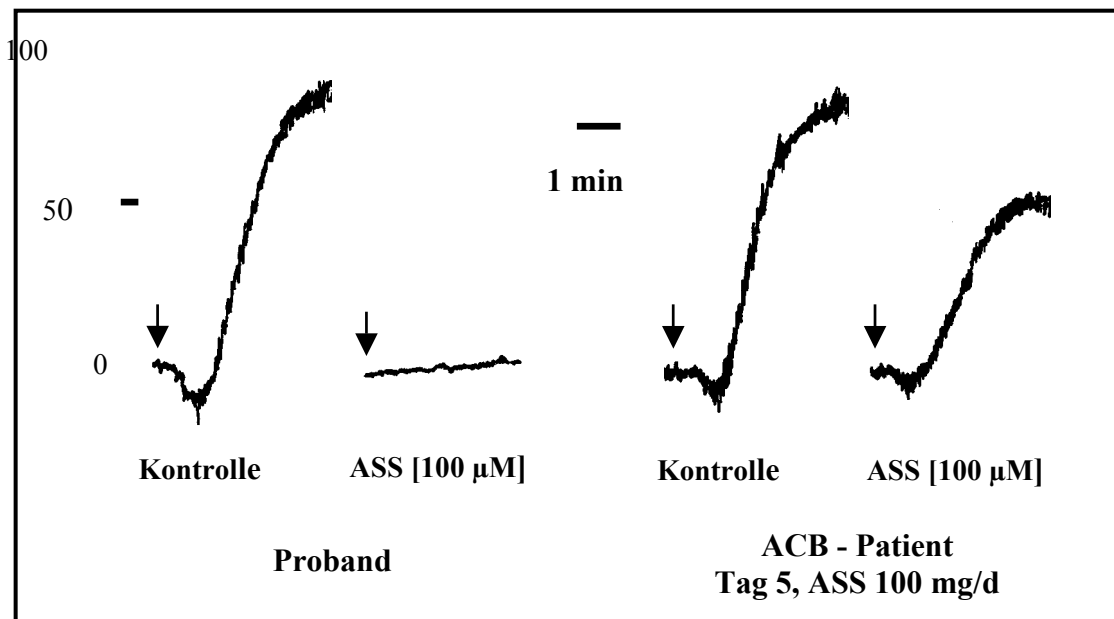
Abbildung 9

Originalregistrierungen

links: Thrombozyten-Aggregation eines gesunden Probanden (ohne ASS-Therapie)

rechts: Thrombozyten-Aggregation eines Patienten nach ACB-Operation (Tag 5 orale ASS-Therapie 100 mg/d)

Stimulus: Kollagen (1 µg/ml, Pfeil). Die Messung erfolgte ohne (Kontrolle) bzw. in Gegenwart von ASS (100µM) in vitro.

**Abbildung 10**

Kollagen (1 µg/ml)-induzierte Thrombozyten-Aggregation in PRP von gesunden Probanden (n = 5) vor und während 5-tägiger ASS-Einnahme (100 mg/d per os) in Gegenwart von ASS (0, 30, 100 µM) in vitro. Die Aggregation wurde aus dem maximalen Steigungswinkel der Aggregationskurve ermittelt.

★ p < 0,05 vs. Kontrolle (vor ASS-Einnahme); + p < 0,05 vs. ASS 0 µM.

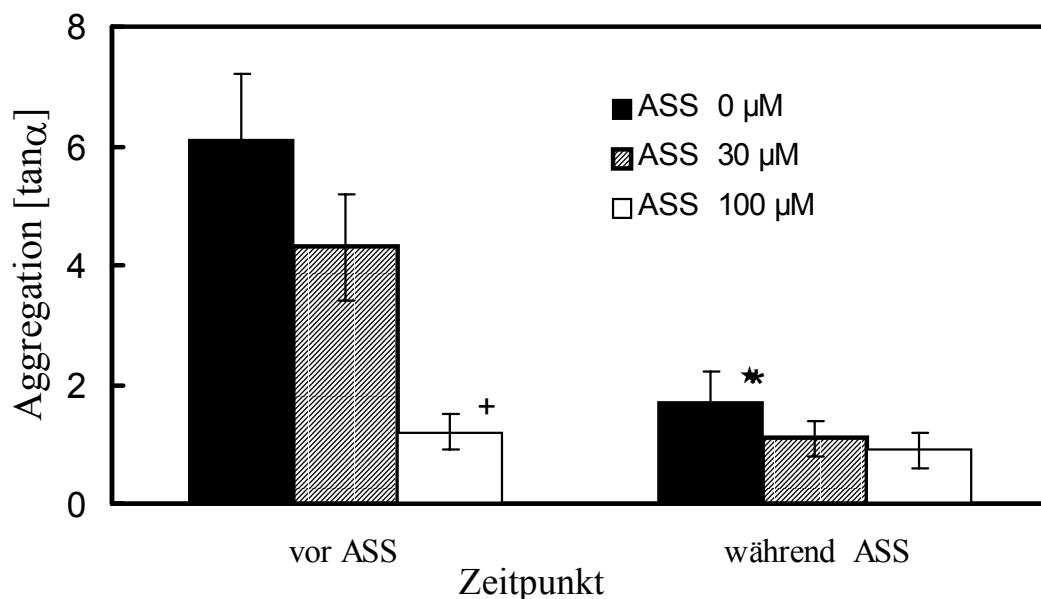


Tabelle 4

Kollageninduzierte Aggregation in PRP von gesunden Probanden aus Abbildung 10. Zusätzlich ist die Aggregation in Prozent bezogen auf den Kontrollwert vor ASS-Einnahme angegeben (kein ASS in vitro).

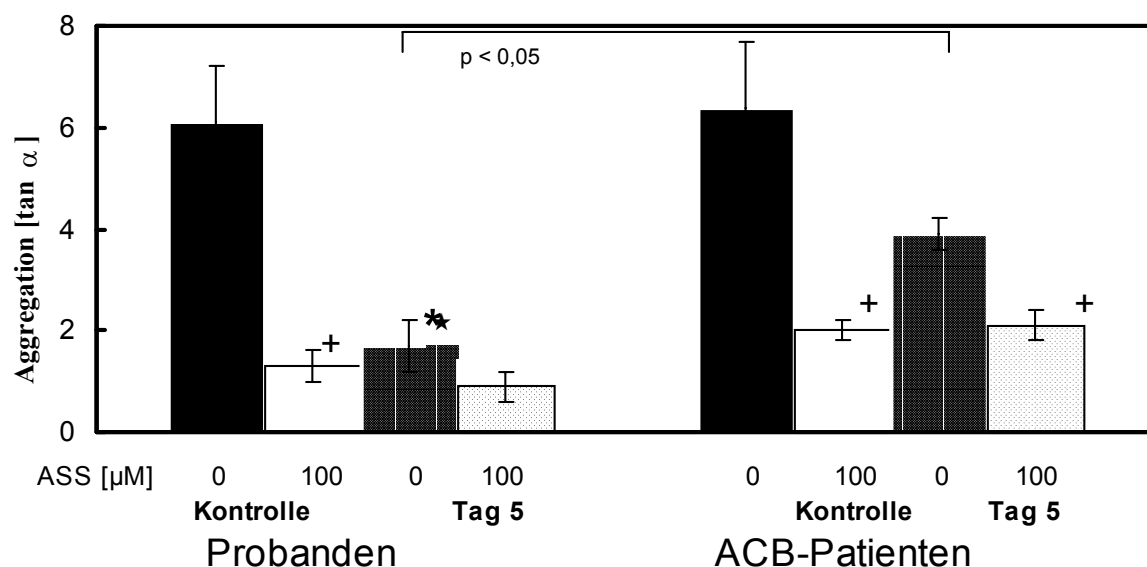
ASS in vitro [μ M]	vor ASS		nach ASS	
	Aggregation $\pm$ SEM	[%] $\pm$ SEM	Aggregation $\pm$ SEM	[%] $\pm$ SEM
0	6,1 $\pm$ 1,1	100	1,7 $\pm$ 0,5	27,3 $\pm$ 8,7
30	4,3 $\pm$ 0,9	70,7 $\pm$ 14,0	1,1 $\pm$ 0,3	18,1 $\pm$ 4,8
100	1,2 $\pm$ 0,3	19,0 $\pm$ 4,1	0,9 $\pm$ 0,3	14,6 $\pm$ 5,3

Abbildung 11 stellt die Aggregationshemmung nach 5-tägiger ASS-Einnahme (kein ASS in vitro) bei ACB-Patienten und Probanden gegenüber. In Anwesenheit von ASS 100 μ M in vitro wird bei Patienten die Aggregation an Tag 5 nach OP statistisch signifikant reduziert, liegt aber dennoch über dem Wert bei gesunden Probanden an Tag 5 (ohne ASS in vitro). Aufgrund der nahezu vollständigen Aggregationshemmung durch die Einnahme von ASS ist bei gesunden Patienten eine signifikante Hemmung der Aggregation an Tag 5 durch ASS in vitro nicht zu erwarten und war entsprechend nicht nachweisbar.

Abbildung 11

Kollagen (1 μ g/ml)-induzierte Thrombozyten-Aggregation in PRP von ACB-Patienten (n = 18) und gesunden Probanden (n =) vor und nach 5-tägiger ASS-Einnahme (100 mg pro Tag) in Gegenwart von ASS (0, 100 μ M) in vitro. Die Aggregationsfähigkeit wurde aus dem maximalen Steigungswinkel der Aggregationskurve ermittelt.

★ p < 0,05 vs. Kontrolle (vor ASS-Einnahme); + p < 0,05 vs. ASS 0 μ M.



3.3.2 THROMBOXAN-SYNTHESE BEI GESUNDEN PROBANDEN

Die während der Kollagen (1 µg/ml)-induzierten Aggregation im PRP von gesunden Probanden stattfindende Thromboxan-Synthese wurde entsprechend den Messungen bei ACB-Patienten durch Zugabe von EDTA und Indometazin gestoppt und mittels Radioimmunoassay bestimmt.

Vor Einnahme von 100 mg ASS per os zeigte sich eine konzentrationsabhängige Hemmung der Thromboxan-Synthese in Gegenwart von 30 bzw. 100 µM ASS, was erwartungsgemäß mit den Ergebnissen der thrombozytären Aggregation vergleichbar war.

Eine 5-tägige Einnahme von ASS reduzierte die Thromboxan-Synthese bei Probanden auf 3 ± 1 %, was einer nahezu vollständigen Hemmung der thrombozytären Cyclooxygenase entspricht. In vitro Zugabe von ASS konnte somit zu keiner signifikanten Änderung der Thromboxan-Synthese nach 5-tägiger ASS-Einnahme mehr führen (Abbildung 12).

Abbildung 12

Kollagen (1 µg/ml)-induzierte Thromboxan-Synthese in PRP von gesunden Probanden (n = 5) vor und nach 5-tägiger ASS-Einnahme (100 mg pro Tag) in Gegenwart von ASS (0, 30, 100 µM) in vitro. Die Thromboxan-Synthese wurde als TXB₂ mittels Radioimmunoassay in ng/ml gemessen.

★ p < 0,05 vs. Kontrolle (vor ASS-Einnahme); + p < 0,05 vs. ASS 0 µM

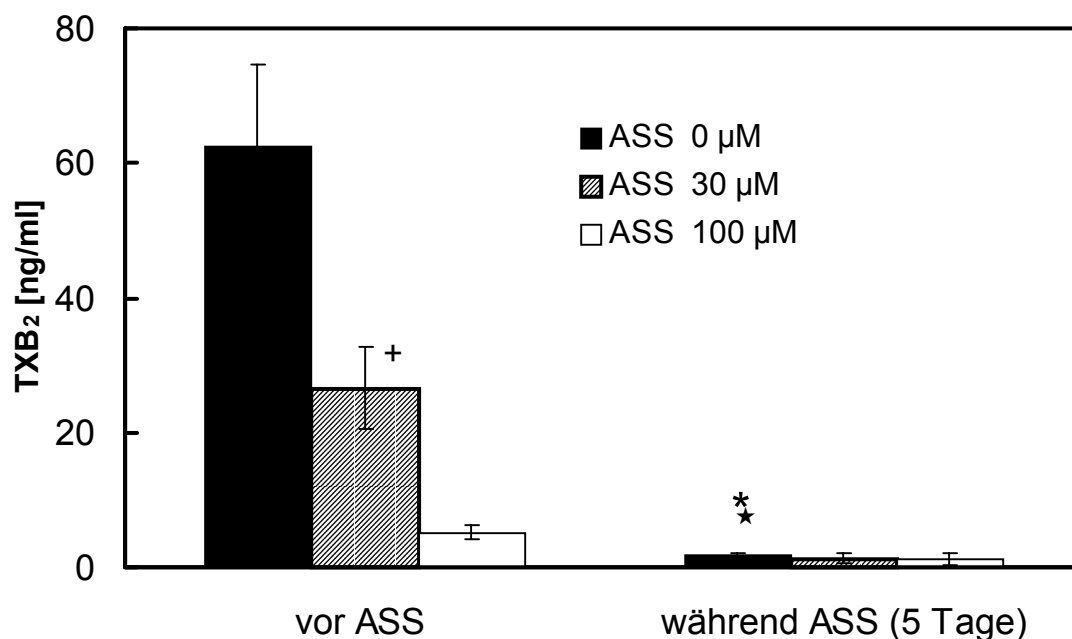


Tabelle 5

Kollagen (1 µg/ml) -induzierte Thromboxan-Synthese in PRP von gesunden Probanden aus Abbildung 12. Zusätzlich ist die Thromboxan-Synthese in Prozent bezogen auf den Kontrollwert vor ASS-Einnahme angegeben (kein ASS in vitro).

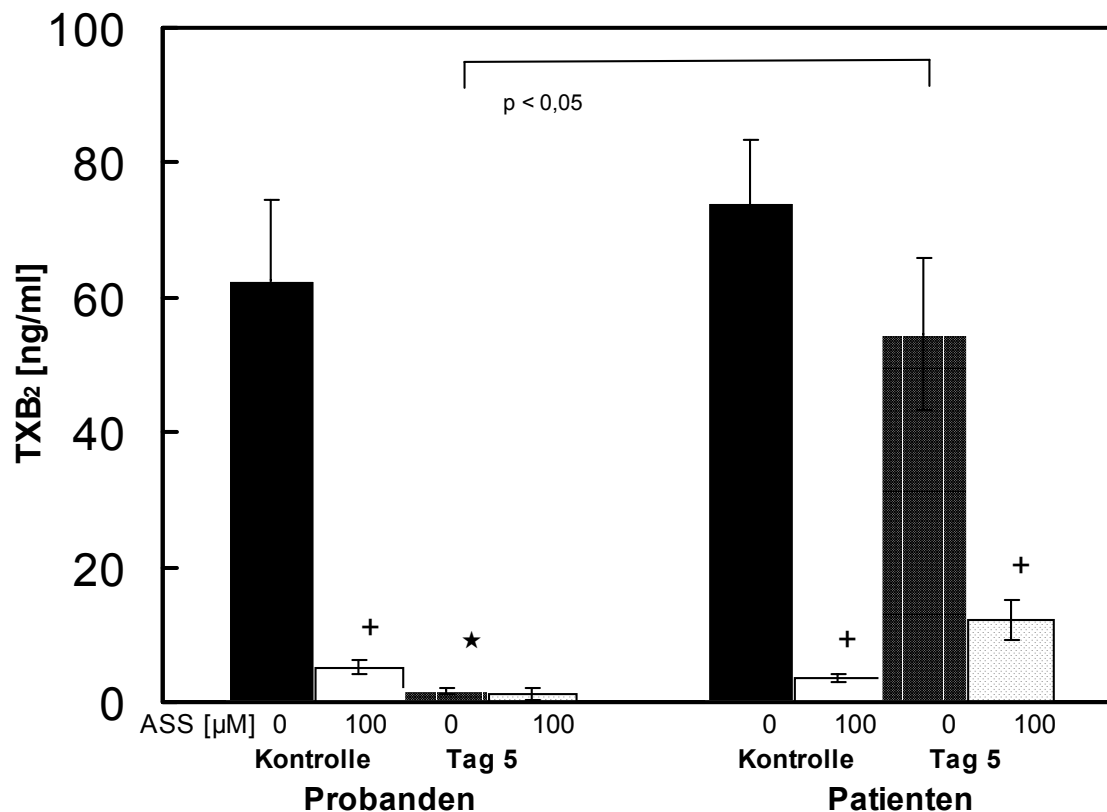
ASS in vitro [µM]	vor ASS		während ASS	
	TXB ₂ ± SEM	[%] ± SEM	TXB ₂ ± SEM	[%] ± SEM
0	62,6 ± 12,0	100	1,7 ± 0,5	2,7 ± 0,8
30	26,5 ± 6,1	42,3 ± 9,8	1,3 ± 0,8	2,1 ± 1,4
100	5,1 ± 1,0	8,2 ± 1,5	1,2 ± 0,8	1,9 ± 1,3

Entsprechend den Aggregationsergebnissen führte eine 5-tägige Einnahme von 100 mg ASS bei gesunden Probanden zu einer nahezu vollständigen Blockierung der Thromboxan-Synthese, nicht jedoch bei ACB-Patienten (3 ± 1 % bei Probanden gegenüber 64 ± 17 % bei Patienten). Die bei Patienten nur unzureichende Thromboxansynthese-Hemmung durch oral zugeführtes ASS ließ sich an Tag 5 durch 100 µM ASS in vitro noch signifikant reduzieren. Anders bei Probanden: In Folge der Reduzierung der Thromboxan-Synthese durch die tägliche Gabe von ASS 100 mg auf 3 ± 1 % war durch ASS in vitro keine signifikante weitergehende Hemmung mehr möglich. Abbildung 13 veranschaulicht dieses Ergebnis.

Abbildung 13

Kollagen (1 µg/ml)-induzierte Thromboxan-Synthese in PRP von ACB-Patienten (n = 20) und gesunden Probanden (n = 5) vor und nach 5-tägiger ASS-Einnahme (100 mg pro Tag) in Gegenwart von ASS (0, 100 µM) in vitro. Die Thromboxan-Synthese wurde als TXB₂ mittels Radioimmunoassay in ng/ml gemessen.

★p < 0,05 vs. Kontrolle (vor ASS-Einnahme); + p < 0,05 vs. ASS 0 µM.



3.4 COX-2 IN THROMBOZYTEN VOR UND NACH ACB-OPERATION

Die bisher dargestellten Ergebnisse legen nahe, dass Veränderungen auf Ebene der Cyclooxygenase eine Rolle in der verminderten ASS-Wirkung bei ACB-Patienten spielen. Aus diesem Grund wurden Veränderungen in der Expression der beiden Isoenzyme COX-1 und COX-2 im Verlauf einer ACB-Operation untersucht.

Hierfür wurde aus einem Teil der Blutproben jedes Untersuchungstages thrombozytäre Proteinextrakte präpariert, die elektrophoretisch mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und im Western-Blot mittels spezifischer COX-1 bzw. COX-2-Antikörper nachgewiesen wurden. Abbildung 14 zeigt die thrombozytäre COX-1 und COX-2-Expression eines ACB-Patienten. Während präoperativ im wesentlichen nur thrombozytäre COX-1 nachweisbar war,

zeigten sich postoperativ große Schwankungen im Expressionsmuster mit in der Mehrzahl der Patienten erheblicher Zunahme der COX-2-Immunreaktivität

Abbildung 14

Western-Blot der thrombozytären COX (Original-Blot).

Thrombozytäre Proteinpräparationen wurden präoperativ sowie an den Tagen 1, 5, 10 nach ACB-Operation hergestellt und (nach Normierung auf die Proteinmenge) elektrophoretisch aufgetrennt. Der Nachweis der Isoenzyme COX-1 und COX-2 erfolgte mittels spezifischer Antikörper.

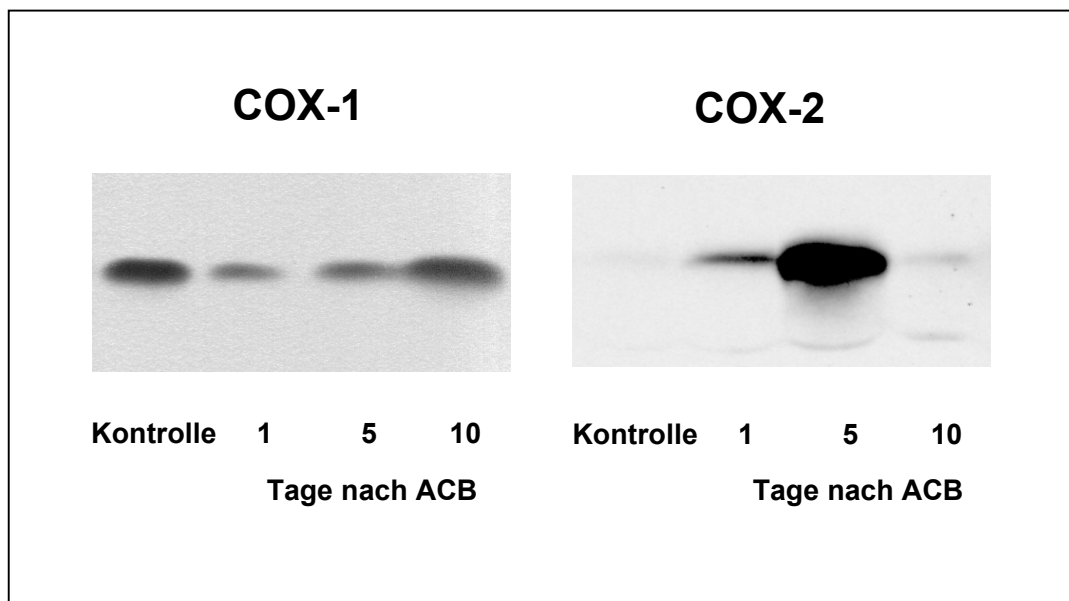


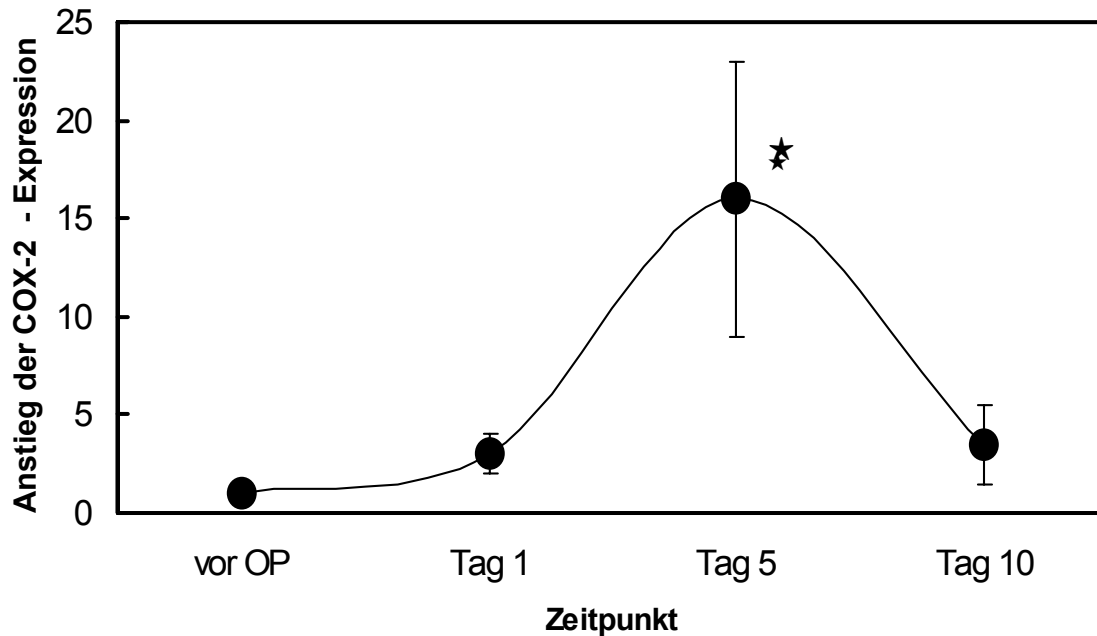
Abbildung 15 zeigt den zeitlichen Verlauf der thrombozytären COX-2. Jeder Messpunkt entspricht dem Mittelwert aus 8 Patienten. Ein deutliches Maximum bestand an Tag 5 nach ACB-Operation mit einem mittleren Anstieg der COX-2 auf das 15-fache bezogen auf den präoperativen Kontrollwert. An Tag 10 lag die COX-2-Expression noch ca. um den Faktor 4 über der präoperativen Kontrolle. Eine derartige postoperative Induktion ließ sich bei der konstitutiven Isoform COX-1 nicht nachweisen.

Es bestehen allerdings erhebliche individuelle Unterschiede sowohl in der Höhe der COX-2 Expression, die sich in hohen SEM insbesondere an Tag 5 nach Operation widerspiegeln als auch in deren zeitlichem Verlauf (Abbildung 16, 17).

Abbildung 15

Zeitlicher Verlauf der thrombozytären COX-2, gemittelt aus 8 Patienten, die sich einer ACB-Operation unterzogen. Der präoperative Referenzwert (Kontrolle) wurde gleich 1 gesetzt; die hierfür untersuchten Blutproben wurden einen Tag vor dem operativen Eingriff entnommen.

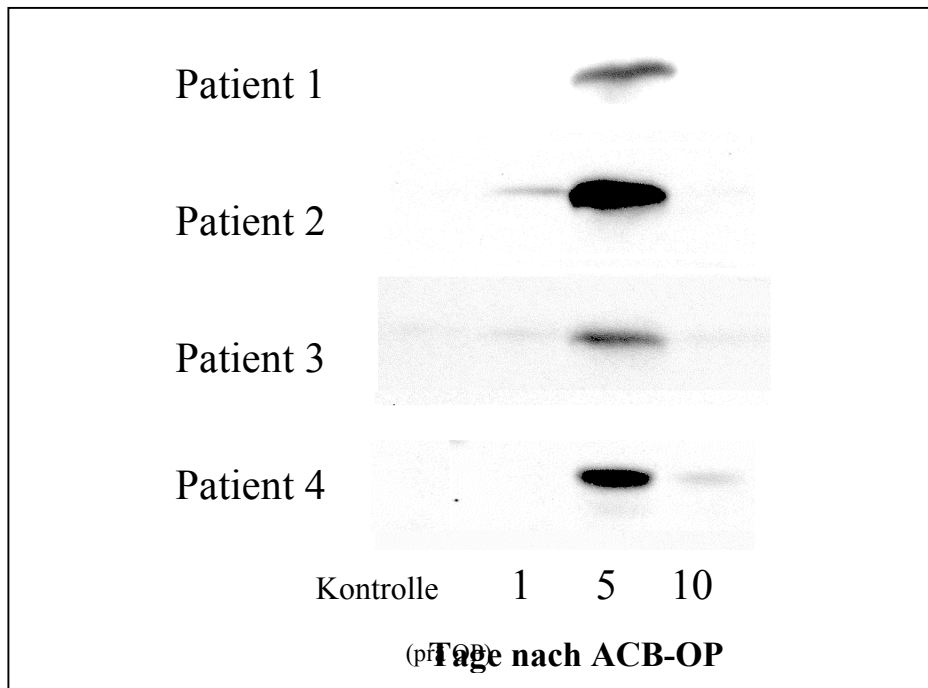
★ $p < 0,05$ vs. Kontrolle (vor ASS-Einnahme)



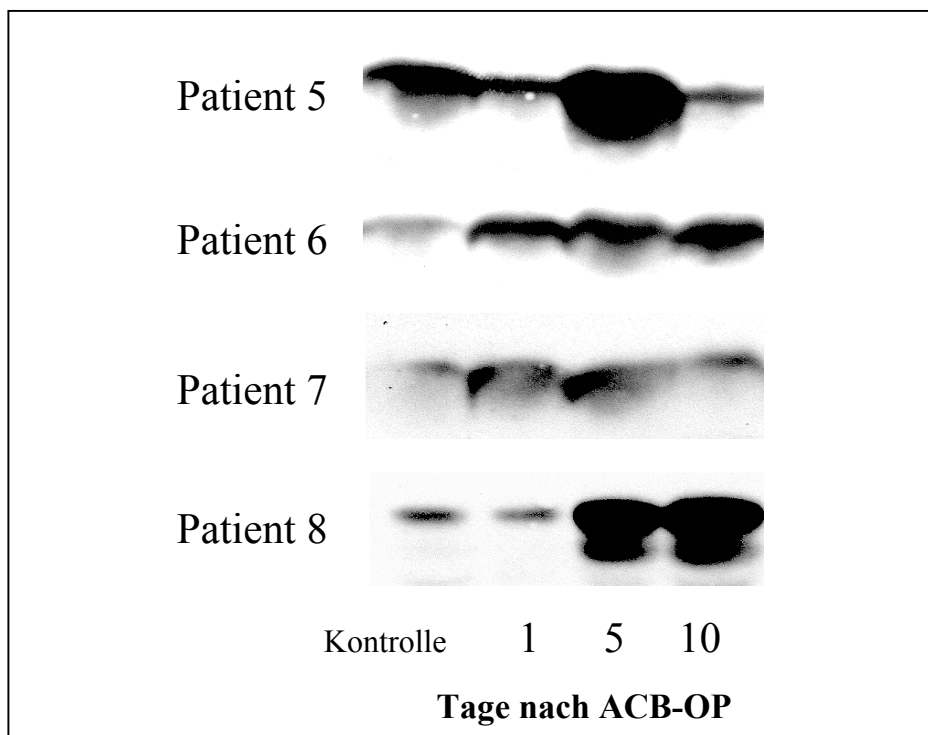
Eine Zunahme der thrombozytären COX-2 wurde sowohl bei Patienten beobachtet, welche vor dem kardiochirurgischen Eingriff nahezu keine COX-2 aufwiesen (Abbildung 16), als auch bei jenen, die bereits präoperativ thrombozytäre COX-2 Signale zeigten (Abbildung 17).

Abbildung 16

Thrombozytäre COX-2 vor und zu verschiedenen Zeitpunkten nach ACB-Operation. Auswahl von Patienten, bei welchen zum Zeitpunkt vor der Operation nahezu keine COX-2 nachweisbar war.

**Abbildung 17**

Thrombozytäre COX. Auswahl der Patienten, bei welchen vor ACB bereits deutlich erkennbare Signale für COX-2 nachgewiesen wurden. Auch hier erfolgte eine erhebliche Zunahme der COX-2 Signale im postoperativen Verlauf.



4 DISKUSSION

Gegenwärtig wird die antithrombotische Behandlung nach aortokoronarer Bypass-Operation in der Regel mit 100 mg ASS täglich durchgeführt. Der zentrale Befund der vorliegenden Arbeit zeigt, dass in den ersten 10 Tagen nach ACB-Operation und möglicherweise auch darüber hinaus hierdurch keine ausreichende Plättchenfunktionshemmung erzielt wird. Sowohl die Kollagen-induzierte Aggregation, als auch die Thromboxan-Synthese waren nicht hinreichend gehemmt.

Dagegen hemmte die 5-tägige Einnahme von ASS bei gesunden Probanden erwartungsgemäß sowohl die thrombozytäre TXA₂-Synthese, als auch die Aggregation nahezu vollständig ($2,7 \pm 0,8 \%$ bzw. $27,3 \pm 8,7 \%$). Die Thromboxan-Synthese bei Patienten an den Tagen 5 und 10 nach Operation wurde nur auf 73,6 % bzw. 63,4 % ($\pm 15,2 \%$ bzw. $\pm 17,0 \%$) des präoperativen Kontrollwertes reduziert. Ein entsprechendes Bild ergab sich auch bei der Untersuchung der Thrombozytenfunktion in Form der Kollagen-stimulierten Aggregation. Ferner waren die Thrombozyten resistent gegenüber einer in vitro Zugabe von ASS in Konzentrationen bis 100 μM , die therapeutische Plasmakonzentrationen weit übersteigen [BENEDEK et al., 1995]. An keinem der Untersuchungstage war eine Änderung des Verhältnisses zwischen Thromboxan und Aggregation erkennbar. Die thrombozytäre Sensitivität gegenüber Thromboxan war somit unverändert.

4.1 BISHERIGE BEFUNDE THROMBOZYTÄRER SENSITIVITÄT GEGENÜBER ASS

Vorausgehende klinische Studien haben eine verminderte Wirksamkeit von ASS in bestimmten Situationen oder bei bestimmten Patientengruppen beobachtet. Bei Gesunden [BUCHANAN & BRISTER, 1995], bei KHK-Patienten mit stabiler [GUM et al., 2001] bzw. instabiler [VEJAR et al., 1990] Angina pectoris, bei KHK-Patienten nach PTCA [LEON ET AL., 1998], bei zerebraler Atherosklerose [GROTEMEYER et al., 1993; HELGASON et al., 1993] und bei peripherer arterieller Verschlusskrankheit [MÜLLER et al., 1997] wurde eine verminderte antithrombotische Wirkung beschrieben. Tabelle 6 fasst diese zusammen .

Tabelle 6

Methoden zur Bestimmung der ASS-Resistenz sowie deren Inzidenz in der Literatur.

Kollektiv	n	ASS-Dosis	Methode	Resistenz	Autor
Probanden	35	80mg/d	Blutungszeit	40 %	BUCHANAN & BRISTER, 1995
	38	1300 mg/d		10 %	
Apoplex-Patienten	306	≤1300 mg/d	Aggregation	8,2 %	HELGASON et al., 1994
Apoplex-Patienten	180	3 x 500 mg/d	ratio: EDTA / Formaldehyd	33 %	GROTEMEYER et al., 1993
KHK-Patienten	325	325 mg/d	Aggregation PFA-Funktion	5,5 % 9,5%	GUM et al., 2001
ACB-Patienten	40	325 mg/d	Blutungszeit	43 %	BUCHANAN & BRISTER, 1995
ACB-Patienten	34	100 mg/d	TXB ₂ -Synthese (Aggregation)	67 %	ZIMMERMANN et al., 2000

Allerdings wurde durch keine der zitierten Arbeiten eine einheitliche Definition der ASS-Resistenz bzw. ASS-„Non-response“ etabliert. Zudem wurden unterschiedliche Messparameter verwandt (z.B.: Aggregation, TXB₂-Synthese, Blutungszeit, PFA-Funktion, EDTA/Formaldehyd-ratio; vgl. Tabelle 6) und die zugehörigen „Normbereiche“ verschieden festgelegt.

Angesichts der Tatsache, dass Thrombozyten Thromboxan im Überschuss synthetisieren, ist nicht mit einer nennenswerten Hemmung der Thrombozytenfunktion zu rechnen, wenn die thrombozytäre Thromboxan-Synthese durch ASS nicht unter 10 % des Normalwertes reduziert wird [FitzGerald et al., 1985]. Auf die vorliegenden Ergebnisse übertragen bedeutet dies, dass an Tag 5 nach Operation 94,7 % und an Tag 10 nach Operation 100 % der Patienten als Non-responder einzustufen wären.

4.2 KARDIOVASKULÄRE PROGNOSE IN ABHÄNGIGKEIT VON DER THROMBOZYTENFUNKTIONSHemmung DURCH ASS

In Anlehnung an die HOPE-Studie (Heart Outcomes Prevention Evaluation; [YUSUF et al., 2000]) verglichen EIKELBOOM et al. 488 Patienten mit Myokardinfarkt, Apoplex oder

kardiovaskulärem Tod mit derselben Anzahl von Kontrollpersonen ohne derartige Ereignisse, wobei beide Gruppen mit ASS therapiert wurden [EIKELBOOM et al., 2002]. Als Messparameter wurde die Konzentration von 11-Dehydro-TXB₂ im Urin zur Quantifizierung der thrombozytären Thromboxan-Synthese. Patienten mit einer hohen Ausscheidung dieses Thromboxan-Metaboliten hatten ein signifikant (1,8-fach) höheres Risiko für Myokardinfarkt bzw. kardiovaskulären Tod, nicht jedoch für Schlaganfall. Die Autoren schlossen daraus, dass 11-Dehydro-TXB₂ im Urin ein prospektiver Parameter für das kardiovaskuläre Risiko ASS-behandelter Patienten sei.

Ein potentieller Schwachpunkt in der Methodik dieser Untersuchung besteht darin, dass die beiden verglichenen Patientengruppen ein unterschiedliches Risikoprofil aufwiesen (höhere Inzidenz von Hypertonie, peripherer arterieller Verschlusskrankheit und Diabetes in der Ereignis-Gruppe). Unterschiede bestanden auch hinsichtlich der Medikation (ACE-Hemmer, Diuretika und Nikotinabusus). Auch ist nicht bewiesen, dass die 11-Dehydro-TXB₂-Konzentration die Thrombozytenaktivierung über eine längere Zeitperiode widerspiegelt und es ist unklar, welchen biologischen Veränderungen dieser Messwert unterliegt. Vergleichsmessungen mit TXB₂-Serumkonzentrationen zur Verifizierung wären wünschenswert oder eine Korrelation mit bekannten Risikofaktoren wie z.B. dem c-reaktiven Protein (cRP) [HALUSHKA & HALUSHKA, 2002]. Ebenfalls ist es auffällig, dass eine erhöhte 11-Dehydro-TXB₂-Ausscheidung nur mit einem erhöhten Risiko für Myokardinfarkt und kardiovaskulärem Tod, nicht jedoch für Apoplex einherging.

In Hinblick auf die in der vorliegenden Dissertation gezeigte verminderte Sensitivität für ASS ist die klinische Evidenz für eine Prävention von Bypass-Thrombosen von Bedeutung. FREMES et al. erstellten eine Metaanalyse von insgesamt 17 klinisch-pharmakologischen Studien, in denen die antithrombotische Therapie nach aorto-koronarer Bypass-Operation betrachtet wurde [FREMES et al., 1993]. In sieben Studien, in denen ASS (in Tagesdosen von 100 mg bis 1200 mg) im Vergleich zu Placebo untersucht wurde, zeigte sich stets ein Vorteil bei ASS-Therapie. Eine statistisch signifikante Reduktion des Risikos für einen Graft-Verschluss bestand aber nur in zwei Studien, wobei Dosen von 325 mg [GAVAGHAN et al., 1991] bzw. 100 mg [LORENZ et al., 1984] verabreicht worden waren.

Eine Ursache für die unterschiedlichen Ergebnisse zwischen den eben genannten Arbeiten und der hier vorliegenden Dissertation dürfte in den unterschiedlichen

Beobachtungszeiträumen liegen. Das Zeitintervall der vorliegenden Arbeit wurde durch den postoperativen Klinikaufenthalt der teilnehmenden Patienten auf 10 Tage begrenzt. Wünschenswert wären Folgeuntersuchungen über einen längeren Zeitraum.

Durch Vermeidung der ASS-Resistenz oder Einsatz alternativer pharmakologischer Strategien zur Hemmung der Thrombozytenfunktion wäre eine weitere Senkung der thrombotischen Bypassverschlüsse zu erwarten. Hierfür ist es wichtig, die Ursache(n) der verminderten Wirksamkeit von ASS auf Thrombozyten nach Bypass-Operationen zu klären.

4.3 DEFINITION UND KLASSIFIKATION DER RESISTENZ GEGENÜBER ASS

Eine präzise Definition des Begriffes „ASS-Resistenz“ bzw. „ASS-Non-responder“ existiert bislang nicht.

In einer kürzlich veröffentlichten Publikation wurde die ASS-Resistenz anhand der thrombozytären TXA₂-Synthese und der Kollagen-induzierten Aggregation in PRP in 3 Klassen eingeteilt [WEBER et al., 2001]:

- Typ I Resistenz liegt vor, wenn die Einnahme von 100 mg ASS/Tag über 5 Tage weder zu der erwarteten Hemmung der thrombozytären TXA₂-Synthese, noch zu einer Hemmung der Kollagen-induzierten Aggregation führt, ASS in vitro (100 µM) aber sowohl die TXA₂-Synthese, als auch die Aggregation vollständig hemmt (pharmakokinetischer Typ).
- Bei Typ II der ASS-Resistenz führt weder die orale Gabe von ASS noch ASS in vitro zu einer Hemmung der thrombozytären Thromboxan-Synthese bzw. der kollageninduzierten Plättchenaggregation (pharmakodynamischer Typ).
- Typ III Resistenz liegt vor, wenn die Einnahme von ASS (100 mg/Tag, mind. 5 Tage) die thrombozytäre Thromboxan-Synthese adäquat hemmt, die Aggregation aber auch nach zusätzlicher in vitro Gabe von ASS nahezu unbeeinflusst bleibt.

In Abbildung 20 wird diese Einteilung schematisch zusammengefasst.

Tabelle 7

Schematische Darstellung der 3 Typen von ASS-Resistenz nach Weber et al. Kriterium ist die Hemmung von Thromboxan-Synthese und Aggregation durch ASS in vitro.

Typ	Thromboxan-Synthese	Aggregation
I	↓	↓
II	Ø	Ø
III	↓	Ø

4.4 PHARMAKOKINETISCHE VERÄNDERUNGEN ALS MÖGLICHE URSACHE EINER TYP I ASS-RESISTENZ

Eine systematische Untersuchung an gesunden männlichen Probanden ergab eine interindividuelle Variation der maximalen Plasmakonzentrationen für ASS von 33 %. [BENEDEK et al., 1995]. Die Fläche unter dem zeitlichen Verlauf der Plasma-Konzentration (AUC), ein Maß für den Betrag, zu dem Pharmaka systemisch verfügbar sind, variierte ebenfalls. Bemerkenswert war, dass sich bei Probanden mit unterdurchschnittlich gehemmter Plättchenfunktion statistisch signifikant auch eine geringere systemische Verfügbarkeit von ASS fand. Offenbar kann damit ASS-Resistenz zumindest teilweise auf eine pharmakokinetische Variabilität, z.B. der präsystemischen Biotransformation zurückgeführt werden. Interessanterweise konnte die Studie von Benedek et al. den umgekehrten Zusammenhang nicht bestätigen: Eine verminderte systemische Verfügbarkeit von ASS bedeutet nicht, dass auch eine ungenügende Hemmung der Plättchenfunktion vorlag. Dies stellt generell die Bedeutung der pharmakokinetischen Variation in Frage.

Eine reduzierte Wirksamkeit von ASS könnte darüber hinaus auch auf der vom ersten postoperativen Tag an beobachteten erhöhten Plättchenregeneration beruhen. Unter der Annahme, dass Thrombozyten eine durchschnittliche Lebensdauer von 10 Tagen haben, beträgt die tägliche turn-over Rate 10 %. Der Anteil zirkulierender Thrombozyten mit nicht acetylierter COX sollte maximal 10 % betragen, um eine ausreichende Aggregationshemmung zu gewährleisten [FITZGERALD et al., 1985]. Bei einer ASS Tagesdosis kann diese Anforderung nur erfüllt werden, wenn neu synthetisierte

Thrombozyten adäquat gehemmt werden. Im Anschluss an die operationsbedingte Plättchendepletion an Tag 1 von 233000/ μ l auf 166000/ μ l folgte ein Anstieg der Plättchenzahl auf das 2,5-fache an Tag 10 (417000/ μ l; siehe Abbildung 11). Vorausgesetzt die Bypassoperation in Verbindung mit einer extrakorporalen Zirkulation führte zu keiner Verkürzung der Lebensdauer der Thrombozyten, stieg die tägliche Regenerationsrate ebenfalls um das 2,5-fache. Höhere ASS-Dosierungen würden dieses Problem aufgrund der nur kurzen Halbwertszeit ($t_{1/2}$ = 14-19 min) [AARSONS et al., 1989] vermutlich nicht lösen. (Gegebenenfalls könnte die Dosierung mehrmals täglich erfolgen, um regenerierte Thrombozyten effektiv zu hemmen, bevor ihr Anteil 10 % übersteigt). In diesem Fall wäre zu erwarten, dass ASS in vitro sowohl die thrombozytäre Aggregation hemmt, als auch die Thromboxan-Bildung deutlich reduziert. Nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit wurde jedoch in Gegenwart von 30 und 100 μ M ASS in vitro die Thromboxan-Synthese und Aggregation in nur geringem Maß gehemmt (Abbildung 4 und 5). Aus diesem Ergebnis lässt sich folgern, dass die Ursache der ASS-Resistenz nicht ausschließlich in einer herabgesetzten Bioverfügbarkeit der Substanz und einer erhöhten Plättchenregeneration begründet sein kann, sondern auch Veränderungen auf Thrombozytenebene beteiligt sein müssen. Eine Typ I Resistenz kann für die hier untersuchten Patienten nach koronarer Bypass-Operation ausgeschlossen werden.

4.5 SENSITIVITÄTSÄNDERUNGEN GEGENÜBER KOLLAGEN ODER ADHÄSIONSMOLEKÜLEN ALS MÖGLICHE URSACHE EINER TYP III ASS-RESISTENZ

Eine von Kawasaki veröffentlichte Studie ermittelte unter gesunden Probanden ASS-Non-responder aufgrund der durch ASS induzierten Verlängerung der Blutungszeit [KAWASAKI et al., 2000]. Die ermittelten IC₅₀-Werte für ASS waren in beiden Gruppen annähernd gleich (322 bzw. 336 μ M ASS). Andererseits zeigte diese Arbeit, dass Thrombozyten ASS-resistenter Probanden sensitiver auf den Stimulus Kollagen reagierten. Diese Arbeit folgte entsprechend, dass ASS-Resistenz auf einer Thrombozyten-Hyperreaktivität beruht (ED₅₀ = 0,91 μ g/ml Kollagen bei ASS-Respondern gegenüber 0,48 μ g/ml bei Non-respondern). Die Untersuchung wurde nach 30 Monaten mit denselben Probanden wiederholt und führte zu gleichen Ergebnissen. Die Autoren folgerten, dass eine gesteigerte Sensitivität gegenüber dem

Aggregationsstimulus Kollagen Ursache für diese Ergebnisse war und nicht eine reduzierte Wirkung von ASS. Einschränkend ist bei dieser Arbeit jedoch anzumerken, dass die IC₅₀-Werte für ASS erheblich höher waren, als bei den in der vorliegenden Arbeit ermittelten und in der Literatur angegebenen [AWTRY & LOSCALZO, 2000; MITCHELL et al., 1994; VANE et al., 1998], so dass die Argumentation von Kawasaki zurückhaltend betrachtet werden sollte. Aufgrund der deutlich höheren Konzentration des Stimulus Kollagen (2-4 µg/ml gegenüber 1 µg/ml) können die hier erhobenen Ergebnisse mit denen von Kawasaki nur mit Vorbehalt verglichen werden. Grund hierfür ist die Eigenschaft von Kollagen in hoher Konzentration die Thrombozyten-Aggregation auch über Thromboxan-unabhängige Mechanismen zu aktivieren (z.B. Steigerung der Sekretion, Aktivierung des GP IIb/IIIa-Rezeptors)

Eine andere Untersuchung charakterisierte ASS-Resistenz an Patienten vor einer Bypassoperation. Hier wurde ein Anteil von Non-respondern in Höhe von 58 % ermittelt, wobei als Kriterium wiederum die Verlängerung der Blutungszeit durch ASS festgesetzt wurde [BUCHANAN & BRISTER, 1995]. Die Aggregationshemmung wurde bei dieser Klassifizierung nicht berücksichtigt. Eine signifikante Abnahme der TXA₂-Synthese war stets mit einer Aggregationshemmung kombiniert, unabhängig davon ob es sich um ASS-Responder oder Non-responder handelte. Im Gegensatz dazu war bei ASS-Non-respondern sowohl die Bildung von 12-HETE, als auch die Adhäsionsfähigkeit der Plättchen entweder unverändert oder gesteigert. Die Autoren vermuteten, dass eine erhöhte Sensitivität der Adhäsionsrezeptoren gegenüber dem jeweiligen Liganden, hervorgerufen durch einen 12-HETE Konzentrationsanstieg, die Adhäsion der Thrombozyten begünstigte und somit die Blutungszeit verkürzte [BUCHANAN et al., 1986; GIBSON et al., 1987]. Da diese Studie zeitlich vor dem kardiochirurgischen Eingriff durchgeführt wurde und keine Angaben über die verwendeten Kollagen-Konzentrationen gemacht werden, ist ein direkter Vergleich mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit ebenfalls nicht möglich.

Die Thromboxan-Synthese wurde in der vorliegenden Arbeit weder durch die Einnahme von ASS per os noch durch ASS in vitro ausreichend gehemmt. Ebenso wurde die Kollagen-induzierte Aggregation durch ASS nur unzureichend gehemmt. Setzt man die thrombozytäre Thromboxan-Bildung in Bezug zur thrombozytären Aggregation, so zeigt sich, dass das Verhältnis über den beobachteten Zeitraum unverändert blieb (vgl. Abbildung 7). An den 4 Untersuchungstagen war stets eine vergleichbare Korrelation zwischen den beiden Untersuchungsgrößen nachweisbar. Die Vermutung, ASS-Resistenz beruhe eventuell auf

einer Sensitivitätssteigerung gegenüber dem Aggregationsstimulus Kollagen kann mit den hier vorliegenden Ergebnissen folglich nicht bestätigt werden. ASS-Resistenz vom Typ III kann somit ebenfalls ausgeschlossen werden.

4.6 TYP II ASS-RESISTENZ

Ein wichtiger Unterschied der vorliegenden Dissertation zu nahezu allen bisher durchgeführten Untersuchungen ist, dass die thrombozytäre Thromboxan-Synthese und deren Hemmung durch ASS in vitro berücksichtigt wurde. Nach akuter Myokardischämie (Myokardinfarkt) kommt es zu einer Hochregulation thrombozytärer TX-Rezeptoren [DORN et al., 1990]. Um dies bei den in dieser Untersuchung eingeschlossenen Patienten zu prüfen, wurde eine Korrelation zwischen der Kollagen-induzierten Thromboxan-Synthese und der simultan gemessenen Aggregation hergestellt. Für jeden untersuchten Zeitpunkt (präoperativ sowie am Tag 1, 5 und 10 nach ACB-Operation) ergab sich eine positive, jedoch nicht lineare Korrelation zwischen Aggregation und Thromboxan-Synthese (für eine ca. 50 %-ige Hemmung der Aggregation war eine 80 %-ige Hemmung der TXB₂-Synthese erforderlich). Beim Vergleich der Korrelationen zu den verschiedenen Zeitpunkten zeigte sich kein signifikanter Unterschied. Da die Beziehung zwischen Thromboxan-Synthese und Aggregation sowohl in der präoperativen Kontrollmessung, als auch in ASS-resistenten Proben ähnlich war, beruht die ASS-Resistenz nicht auf einer erhöhten Empfindlichkeit der Thrombozyten gegenüber endogen freigesetzten Thromboxan.

Aufgrund der in dieser Arbeit nachgewiesenen ASS-Resistenz auch in Gegenwart von ASS in vitro besteht die Möglichkeit, dass die reduzierte Wirksamkeit von ASS nach ACB-Operation im Bereich des molekularen Wirkorts von ASS am Thrombozyten liegt. Die nachgewiesene ASS-Resistenz könnte somit formal dem Typ II zugeordnet werden.

4.7 DIE BEDEUTUNG DER THROMBOZYTÄREN CYCLOOXYGENASE-AKTIVITÄT FÜR DIE ASS-RESISTENZ

Die Wirkung von ASS auf die Isoformen der Cyclooxygenase unterscheidet sich um den Faktor 100-200 zugunsten COX-1 [MITCHELL et al., 1994]. In jüngeren Untersuchungen wurde COX-2 mRNA und COX-2 Protein in Thrombozyten nachgewiesen [WEBER et al., 1999]. Bei Patienten mit erhöhtem Thrombozyten turn-over wurde ebenfalls COX-2 nachgewiesen [ROCCA et al., 2002]. Aufgrund einer moderaten Thromboxan-Hemmung durch einen hochselektiven COX-2-Inhibitor leiteten Rocca et al. die Hypothese ab, dass die ASS-Resistenz durch eine erhöhte Expression von COX-2 in solchen Thrombozyten verursacht sei. Der Nachweis von COX-2 in humanen Thrombozyten konnte in der vorliegenden Arbeit ebenfalls erbracht werden. Darüber hinaus ließ sich anhand densitometrischer Auswertungen der Western Blot Untersuchungen eine Induktion der COX-2 nachweisen. Während präoperativ eine deutliche COX-1 Expression bei meist nur geringer COX-2 Expression zu beobachten war, fanden sich postoperativ deutliche interindividuelle Unterschiede im Expressionsmuster der COX-2. Es ergab sich an Tag 5 nach Operation ein Maximum, wobei die Werte gegenüber der Kontrolle vor Operation maximal um den Faktor 15 gesteigert waren (vgl. Abbildung 14). Aufgrund der hohen Selektivität von ASS ist durch dessen Einnahme im wesentlichen eine Hemmung der COX-1, nicht aber der COX-2 zu erwarten. Im Thrombozyten könnte somit Arachidonsäure trotz einer irreversiblen Hemmung der COX-1 zu PGH₂, auf dem Weg über COX-2 metabolisiert werden. Da eine vollständige Aggregationshemmung durch ASS wahrscheinlich die Reduzierung der TXA₂-Synthese auf unter 10 % voraussetzt, würde schon ein geringer Anteil COX-2-Aktivität an der gesamten Cyclooxygenase-Aktivität ausreichen, um den inhibitorischen Effekt von ASS zu aufzuheben. Aufgrund der Tatsache, dass Thrombozyten keinen Zellkern enthalten, ist von einer COX-2 Induktion im Thrombozyten selbst nicht auszugehen. Wahrscheinlicher ist die Induktion zu einem früheren Zeitpunkt der Thrombopoese in den noch kernhaltigen Megakaryozyten. In kultivierten Megakaryozyten konnte COX-2 nachgewiesen werden [MATIJEVIC-ALEKSIC et al., 1995]. Darüber hinaus konnte in Megakaryozyten aus humanem Knochenmark eine COX-2-Induktion gezeigt werden [ROCCA et al., 2002]. Somit ergeben sich Parallelen zwischen dem Anstieg der COX-2 in Thrombozyten von Patienten mit erhöhtem turn-over nach Thrombozytopenie oder Stammzell-Transplantation [ROCCA et al., 2002] und der erhöhten COX-2-Expression nach ACB-Operation, denn die extrakorporale Zirkulation führte über

eine Thrombozytendepletion ebenfalls zu einer beschleunigten Regeneration. Ein derartig erhöhter turn-over könnte die COX-2-Expression in Megakaryozyten stimulieren, da die COX-2 ein Regulator der Hämatopoese ist [LORENZ et al., 1999] und der COX-2-Promotor eine Erkennungssequenz für den Transkriptionsfaktor GATA-1 enthält, der zur Differenzierung von Megakaryozyten beiträgt.

Ein Anstieg von Entzündungsmediatoren nach Bypass-Operationen mit Einfluss auf die Proteinbiosynthese ist in zahlreichen Studien belegt [BUTLER et al., 1992; Frering et al., 1994]. Zytokine, die in vitro zu einer Induktion der COX-2 führen wurden ebenfalls nachgewiesen. Hierzu gehören die Interleukine 1 β , 6 und 8 sowie TNF α sowie PDGF [LAHAT et al., 1992; Shivdasani, 2002; Nathan et al., 1997; Xie & Herschman, 1996; Sasaki et al., 1998].

Obwohl eine erhöhte COX-2 Expression demnach als Ursache der vorliegenden ASS-Resistenz in Betracht kommt, sprechen andere Argumente eher gegen eine Rolle der COX-2. So konnte in der vorliegenden Arbeit zwischen ASS-resistenten und ASS-sensiblen ACB-Patienten (bei erheblicher interindividueller Variabilität) kein Unterschied in der COX-2 Expression gesichert werden. Darüber hinaus ergaben Nachfolgeuntersuchungen mit selektiven COX-2 Inhibitoren (Flosulide, NS 398) in vitro weder eine Hemmung der Kollagen-induzierten Aggregation noch der thrombozytären Thromboxansynthese.

4.8 ALTERNATIVEN ZUR ANTIPLÄTTCHEN-THERAPIE

Obwohl die in dieser Arbeit nachgewiesene COX-2 Induktion bezüglich der thrombozytären ASS-Non-response eine untergeordnete Rolle zu spielen scheint, sind Sensitivitätsänderungen der Cyclooxygenase auf anderer Ebene dennoch als Ursache möglich. Hierbei könnten zur Zeit diskutierte genetische Polymorphismen der COX-1 [PATRONO et al., 2001] eine Rolle spielen.

Für den Fall, dass die in der vorliegenden Arbeit gezeigte ASS-Resistenz auf einer herabgesetzten Sensitivität der thrombozytären Cyclooxygenase beruht, sollte die pharmakologische Hemmung des nachgeschalteten Enzyms, der Thromboxan-Synthase,

weiterhin zu einer effektiven Thromboxan-Synthesehemmung führen. Dazoxiben bzw. Dazmegrel sind Beispiele für selektive Hemmstoffe der Thromboxan-Synthase. Hierbei ist zu beachten, dass PGH_2 , das Substrat der Thromboxan-Synthase, ebenfalls etwa äquipotent Thromboxanrezeptoren aktiviert [MAYEUX et al., 1988]. Aus diesem Grund ist es sinnvoll neben der Thromboxan-Synthesehemmung auch TX-Rezeptoren zu inhibieren. TXA_2 -Rezeptor-Antagonisten sind beispielsweise SQ 29548 und U 3405. Darüber hinaus sind Wirkstoffe bekannt, die sowohl Inhibitoren der Thromboxan-Synthase, als auch Antagonisten am Thromboxanrezeptor sind. Eine Substanz dieser Gruppe ist Ridogrel, welches allerdings ein deutlich potenterer Inhibitor der Synthase im Vergleich zur Rezeptorhemmung ist. Ein neuer hoch- und äquipotenter Inhibitor ist Terbogrel [MUCK et al., 1998]. Folgeuntersuchungen, die nach Abschluss des experimentellen Teils dieser Arbeit erfolgten, zeigten, dass Terbogrel tatsächlich bei ASS-resistenten Patienten und gesunden Probanden Thrombozytenfunktion und Thromboxan-Synthese vergleichbar hemmte [ZIMMERMANN et al., 2001].

Eine weitere Möglichkeit, ASS-Resistenz zu umgehen, wäre der Einsatz von Thrombozytenfunktionshemmstoffen, die Thromboxan-unabhängig wirken. Ein Beispiel hierfür sind die Thienopyridine, welche thrombozytäre ADP-Rezeptoren selektiv und irreversibel blockieren. Ticlopidin wird hepatisch umgesetzt und blockiert irreversibel den thrombozytären ADP-Rezeptor P2Y_{AC} [HECHLER et al., 1998]. Tatsächlich zeigte Ticlopidin bei 15 gesunden Probanden mit nachgewiesener ASS-Resistenz eine aggregationshemmende Wirkung [KAPLAN et al., 2000]. Des weiteren ist durch klinische Studien eine Reduzierung der Verschlussrate aorto-koronarer Bypass-Gefäße unter Ticlopidin-Therapie belegt [LIMET et al., 1987]. Allerdings wurden unter Ticlopidin gehäuft Fälle mit Neutropenien und thrombotisch thrombozytopenischen Purpura beobachtet, was unter Clopidogrel, ebenfalls aus der Gruppe der Thienopyridine, deutlich seltener auftritt. Die Effektivität von Clopidogrel gegenüber ASS wurde in der CAPRIE-Studie bestätigt. Clopidogrel führte zu einer 8,7 %-igen Risikoreduktion (ischämischer Schlaganfall, Herzinfarkt, vaskulärer Tod) gegenüber ASS, bezogen auf das Gesamtkollektiv [CAPRIE STEERING COMMITTEE, 1996].

Bhatt et al. verglichen in einer Metaanalyse der CAPRIE-Studie die Wirksamkeit von ASS mit Clopidogrel bei ACB-Patienten und kamen dabei zum Ergebnis, dass Clopidogrel das Risiko für Myokardinfarkt, ischämischer Schlaganfall und gefäßbedingter Tod gegenüber

ASS um 36,3 % reduziert [BHATT et al., 2001]. Neuere Untersuchungen mit Clopidogrel im Vergleich zu ASS scheinen eine gegenüber ASS stärkere Antiplättchenwirkung von Clopidogrel zu bestätigen, die auch die kombinierte Anwendung beider Substanzen erlaubt [CURE, 2001; PCI-CURE, 2001; CREDO, 2002]

Eine weitere Möglichkeit, die thrombozytäre Aggregation medikamentös zu reduzieren ist durch GP IIb/IIIa-Rezeptorantagonisten gegeben. Intravenös verabreichte GP IIb/IIIa-Rezeptorantagonisten haben in der akuten Phase nach Koronarangioplastie einen festen Platz [NAIR et al., 2002]. Für die perorale Langzeittherapie haben sich diese Substanzen jedoch nicht bewährt [CHEW et al., 2001].

4.9 SCHLUSSFOLGERUNGEN FÜR DIE ANTITHROMBOTISCHE THERAPIE NACH ACB-OPERATION

Zusammenfassend lässt sich die in dieser Arbeit nachgewiesene ASS-Resistenz dem Typ II zuordnen, d.h. weder die orale Gabe von ASS noch ASS in vitro führen zu einer Hemmung der thrombozytären Thromboxan-Synthese bzw. der kollageninduzierten Plättchenaggregation (pharmakodynamischer Typ). Eine Beteiligung der COX-2 an der Entwicklung einer Resistenz gegenüber ASS ist aufgrund der vorliegenden Ergebnisse von untergeordneter Bedeutung. Sensitivitätsänderungen gegenüber ASS in Folge von Modifizierungen der Cyclooxygenase aber dennoch denkbar.

Theoretisch könnte einer unzureichenden Hemmung der Thrombozyten aufgrund ausgeprägter Plättchenregeneration mit einer auf mehrere Einzeldosen verteilten ASS-Gabe begegnet werden. Darüber hinaus wären bei Patienten mit kardiovaskulären Eingriffen die Etablierung einer standardisierten Thrombozytenfunktionsmessung mit prädiktivem Wert für den Therapieerfolg sinnvoll. Bei gesteigertem Risiko könnten dann alternative Thrombozytenfunktionshemmer eingesetzt werden.

Aussichtsreich scheint darüber hinaus die kombinierte Hemmung von Thromboxan-Synthese und Thromboxanrezeptor zu sein. Dies wird beispielsweise durch Terbogrel erreicht, welches allerdings gegenwärtig für die klinische Anwendung nicht zugelassen ist.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit ging der Frage nach, ob eine „Resistenz“ gegenüber ASS, die potentiell Ursache für kardiovaskuläre Komplikationen im Rahmen einer ACB-Operation sein kann, anhand der Untersuchung der Thrombozytenfunktion nachweisbar ist

Hierzu wurden 20 Patienten der Klinik für Herz- und Thoraxchirurgie der Heinrich Heine Universität präoperativ und an den postoperativen Tagen 1, 5 und 10 Blutproben entnommen und an PRP folgende Messungen durchgeführt:

- Kollagen-induzierte (1 µg/ml) Thrombozyten-Aggregation in Gegenwart von ASS (0, 30, 100 µM)
- Messung der thrombozytären Thromboxan-Synthese nach Kollagenstimulation (1 µg/ml) in Gegenwart von ASS (0, 30, 100 µM)
- Messung der COX-1 und COX-2 Expression mittels Western-Blot.

Die Patienten erhielten routinemäßig vom ersten postoperativen Tag an 100 mg ASS/d. Ergänzend wurden entsprechende Messungen mit PRP von 5 gesunden, männlichen Probanden durchgeführt, die hierfür ASS über einen Zeitraum von 5 Tagen mit identischer Dosis einnahmen. Dies reduzierte erwartungsgemäß sowohl die Aggregation als auch die Thromboxan-Synthese nahezu vollständig. Bei Patienten kam es hingegen mit hoher Inzidenz zu einer deutlich abgeschwächten bzw. aufgehobenen Wirkung von ASS, im Sinne einer „ASS-Resistenz“. Auch die zusätzliche in vitro Zugabe führte zu keiner ausreichenden Hemmung der Thrombozytenfunktion im beobachteten postoperativen Zeitraum.

Der ebenfalls nachgewiesenen COX-2 Induktion mit Maximum an Tag 5 nach Operation scheint nur eine untergeordnete kausale Rolle an der Resistenz zuzukommen. Ein über den Beobachtungszeitraum unverändertes Verhältnis zwischen Aggregation und thrombozytärer Thromboxan-Synthese schließt eine Änderung der Sensitivität zwischen Thrombozyten und TXA₂ oder Kollagen als Ursache aus.

Die gezeigte raschere Thrombozytenregeneration in Verbindung mit der nur kurzen Halbwertszeit von ASS könnten ebenfalls an der reduzierten ASS Wirkung beteiligt sein. Modifikationen der COX-1 als Resistenzursache sind zu diskutieren, zumal Folgeuntersuchungen zeigten, dass eine Hemmung der Thromboxan-Synthase durch Terbogrel bei vorliegender ASS-Resistenz die Thromboxan-Synthese deutlich reduziert. Thromboxanrezeptor-Antagonisten und Thromboxan-Synthase Hemmer erscheinen bei vorliegender ASS-Resistenz aussichtsreich.

6 LITERATUR

AARSONS L., HOPKINS K., ROWLAND M., BROSEL S., THIERCELIN J.F.: Route of administration and sex differences in the pharmacokinetics of aspirin, administered as its lysine salt. *Pharm Res* (1989), 6: S. 660-666.

ANTIPLATELET TRIALISTS' COLLABORATION: Collaborative overview of randomised trials of antiplatelet therapy- I: Prevention of death, myocardial infarction and stroke by prolonged antiplatelet therapy in various categories of patients. *BMJ* (1995), 308: S. 81-106.

ANTITHROMBOTIC TRIALISTS' COLLABORATION: Collaborative meta-analysis of randomised trials of antiplatelet therapy for prevention of death, myocardial infarction, and stroke in high risk patients. *Br Med J* (2002), 324: S. 71-86.

AWTRY E.H., LOSCALZO J.: Aspirin (Review). *Circulation* (2000), 101: S. 1206-1218.

BARNETT H.J.M., ELIASZIW M., MELDRUM H.E.: Drugs and surgery in the prevention of ischemic stroke. *N Engl J Med* (1995), 332: S. 238-248.

BENEDEK I.H., JOSHI A.S., PIENIASZEK H.J., KING S.Y.P., KORNHAUSER D.M.: Variability in the pharmacokinetics and pharmacodynamics of low dose aspirin in healthy male volunteers. *J Clin Pharmacol* (1995), 35: S. 1181-1186.

BHATT D.L., CHEW D.P., HIRSCH A.T., RINGLEB P.A., HACKE W., TOPOL E.J.: Superiority of clopidogrel versus aspirin in patients with prior cardiac surgery. *Circulation* (2001), 103: S. 363-368.

BUCHANAN M.R., BRISTER S.J.: Individual variation in the effects of ASA on platelet function: implications for the use for ASA clinically. *Can J Cardiol* (1995), 11, S.221-227.

BUCHANAN M.R., BUTT R.W., HIRSH J., MARKHAM B., NAZIR D.J.: Role of lipoxigenase metabolism in platelet function: effect of aspirin and salicylate. *Prostaglandin Leukot Med* (1986), 21: S. 157-168.

BUTANY J.W., DAVID T.E., OJHA M.: Histological and morphometric analyses of early and late aortocoronary vein grafts and distal anastomoses. *Can J Cardiol* (1998), 14 : S. 671-677.

BUTLER J., CHONG G. L., BAIGRIE R. J., PILLAI R., WESTABY S., ROCKER G. M.: Cytokine responses to cardiopulmonary bypass with membrane and bubble oxygenation. *Ann Thorac Surg* (1992), 53: S. 833-838.

CAPRIE STEERING COMMITTEE: A randomised, blinded, trial of clopidogrel versus aspirin in patients at risk of ischaemic events. *Lancet* (1996), 348: S. 1329-1339.

CAST-GROUP: Chinese Acute Stroke Trial (CAST) - Randomised placebo-controlled trial of early aspirin use in 20000 patients with acute ischemic stroke. *Lancet* (1997), 349: S. 1641-1649.

CHEW D.P., BHATT D.L., SAPP S., TOPOL E.J.: Increased mortality with oral platelet glycoprotein IIb/IIIa antagonists. *Circulation* (2001), 103: S. 201-206.

CLARKE R.J., MAYO G., PRICE P., FITZGERALD G.A.: Suppression of thromboxane A₂ but not of systemic prostacyclin by controlled-release aspirin. *N Engl J Med* (1991), 325: S. 1137-1141.

CREDO investigators: Early and sustained dual oral antiplatelet therapy following percutaneous coronary intervention. A randomised controlled trial. *JAMA* (2002), 288 (19): S. 2411-2420.

CURE: The Clopidogrel in unstable angina to prevent recurrent events trial investigators: Effects of clopidogrel in addition to aspirin in patients with acute coronary syndromes without st-segment elevation. *N Engl J Med* (2001), 345: S. 494-502.

DORN G.W.I., LIEL N., TRASK J.L., MAIS K.E., ASSEY M.E., HALUSHKA P.V.: Increased platelet thromboxane A₂/prostaglandin H₂ receptors in patients with acute myocardial infarction. *Circulation* (1990), 65: S. 538-545.

EIKELBOOM J.W., HIRSH J., WEITZ J.I., JOHNSTON M., YI Q., YUSUF S.: Aspirin-resistant thromboxane biosynthesis and the risk of myocardial infarction, stroke, or cardiovascular death in patients at high risk for cardiovascular events. *Circulation* (2002), 105: S. 1650-1655.

FITZGERALD G.A., REILLY I.A., PEDERSEN A.K.: The biochemical pharmacology of thromboxane synthase inhibition in man. *Circulation* (1985), 72 (6): S.1194-11201.

FREMES S.E., LEVINTON C., NAYLOR C.D., CHEN E., CHRISTAKIS G.T., GOLDMAN B.S.: Optimal antithrobotic therapy following aortocoronary bypass: a meta-analysis. *Eur J Cardiothorac Surg* (1993), 7 (4): S. 169-180.

FRERING B., PHILIP I., DEHOUX M., ROLLAND C., LANGLOIS J. M., DESMONTS J. M.: Circulating cytokines in patients undergoing normothermic cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg* (1994), 108: S. 636-641.

GAVAGHAN T.P., GEBSKI V., BARON D.W.: Immediate postoperative aspirin improves vein graft patency early and late after coronary artery bypass graft surgery. *Circulation* (1991), 83: S. 1526-1533.

GAWAZ M. P.: Das Blutplättchen - Physiologie, Pathophysiologie, Membranrezeptoren, antithrombozytäre Wirkstoffe und Therapie bei koronarer Herzkrankheit. Thieme-Verlag, Stuttgart, 1999.

GIBSON B.E.S., BUCHANAN M.R., BARR R.D. WHITE J.G.: Primary thrombocythaemia in childhood: symptomatic episodes and their relationship to thromboxaneA₂, 6-keto-PGE₁ and 12-hydroxy-eicosatetraenoic acid production: a case report. *Prostaglandin Leukot Med* (1987), 26: S. 221-231.

GROTEMEYER K.H., SCHARAFINSKI H.W., HUSSTEDT I.W.: Two-year follow-up of aspirin responder and aspirin non responder. A pilot-study including 180 post-stroke patients. *Thromb Res* (1993), 71: S. 397-403.

GUM P.A., KOTTKE-MARCHANT K., POGGIO E.D., GURM H., WELSH P.A., BROOKS L., SAPP S.K., TOPOL E.J.: Profile and prevalence of aspirin resistance in patients with cardiovascular disease. *Am J Cardiol* (2001), 88: S. 230-235.

HALUSHKA M.K., HALUSHKA, P.V.: Why are some individuals resistant to the cardioprotective effects of aspirin? Could it be thromboxane A₂. *Circulation* (2002), 105 (14): S. 1620-1622.

HECHLER B., LÉON C., VIAL C., VIGNE P., FRELIN C., CAZENAVE J.-P., GACHET C.: The P2Y₁ receptor is necessary for adenosine 5'-diphosphat-induced platelet aggregation. *Blood* (1998), 92: S. 152-159.

HELGASON C.M., BOLIN K.M., HOFF J.A., WINKLER S.R., MANGAT A., TORTORICE K.L., BRACE L.D.: Development of aspirin resistance in persons with previous ischemic stroke. *Stroke* (1994), 25: S. 2331-2336.

HELGASON C.M., TORTORICE K.L., WINKLER S.R., PENNEY D.W., SCHULER J.J., MCCLELLAND T.J., BRACE L.D.: Aspirin response and failure in cerebral infarction. *Stroke* (1993), 24: S. 345-350.

HOFFMAN M.W., RAUHÖFT C., TERRES W.: Langzeitwirkungen von 50 mg Azetylsaliuylsäure täglich, allein und in Kombination mit Dipyridamol, auf die Thrombozytenfunktion nach aortokoronarer Bypass-Operation. *Z Kardiol* (1998), 87: S. 865-871.

HOHLFELD T., SCHRÖR K.: Acetylsalicylsäure und Thromboxaninhibitoren. *Hämostaseologie* (1998), 18: S. 156-200.

HYDE JA, CHINN JA, GRAHAM TR: Platelets and cardiopulmonary bypass. *Perfusion* (1998), 13: S. 389-407.

ISIS-2 – COLLABORATIVE GROUP: Randomised trial of intravenous streptokinase, oral aspirin, both, or neither among 17187 cases of suspected acute myocardial infarction. *Lancet* (1988), II: S. 349-360.

JONES C.G., CLELAND J.G.F.: Meeting report – LIDO, HOPE, MOXCON, and WASH studies. *Eur J Heart Failure* (1999), 1: S. 425-431.

KAPLAN S., KAPLAN A., MARCOE K., SAUVAGE L.R.: Ticlopidine, Alka-Seltzer, or a combination of citric acid with aspirin: effects on platelet aggregation in individuals with an insufficient response to aspirin alone. *Clin Appl Thromb Hemost* (2000), 6: S. 222-225.

KAWASAKI T., OZEKI Y., IGAWA T., KAMBAYASHI J.: Increased platelet sensitivity to collagen in individuals resistant to low-dose aspirin. *Stroke* (2000), 31: S. 591-595.

LAHAT N., ZLOTNICK A.Y., SHTILLER R., BAR I., MERIN G.: Serum levels of IL-1, IL-6 and tumour necrosis factors in patients undergoing coronary artery bypass grafts or cholecystectomy. *Clin Exp Immunol* (1992), 89: S. 255-260.

LAHAT N., ZLOTNICK A.Y., SHTILLER R., BAR I., MERIN G.: Serum levels of IL-1, IL-6 and tumour necrosis factors in patients undergoing coronary artery bypass grafts or cholecystectomy. *Clin Exp Immunol* (1992), 89: S. 255-260.

Lanza F., Cazenave J.P., Beretz A., Sutter-Bay A., Kretz J.G., Kieny R.: Potentiation by adrenaline of human platelet activation and the inhibition by the alpha-adrenergic antagonist nicergoline of platelet adhesion, secretion and aggregation. *Agents Actions* (1986), 18: S. 586-595.

LEON M.B., BAIM D.S., POPMA J.J., GORDON P.C., CUTLIP D.E., HO K.K., GIAMBARTOLOMEI A., DIVER D.J., LASORDA D.M., WILLIAMS D.O., POCOCK S.J., KUNTZ R.E.: A clinical trial comparing three antithrombotic-drug regimes after coronary artery stenting. Stent Anticoagulation Restenosis Study Investigators. *N Engl J Med* (1998), 339: S. 1665-1671.

LOLL P.L., PICOT D., GARAVITO R.M.: The structural basis of aspirin activity inferred from the crystal structure of inactivated prostaglandin H₂ synthase. *Nature Struct Biol* (1995), 2: S. 637-643.

LORENZ M., SLAUGHTER H.S., WESCOTT D.M., CARTER S.I., SCHNYDER B., DINCHUK J.E., CAR B.D.: Cyclooxygenase-2 is essential for normal recovery from 5-fluorouracil-induced myelotoxicity in mice. *Exp Hematol* (1999), 27: S.1494-1502.

LORENZ R.L., SCHACKY C.V., WEBER M., MEISTER W., KOTZUR J., REICHARDT B., THEISEN K., WEBER P.C.: Improved aortocoronary bypass patency by low-dose aspirin (100 mg daily). Effects on platelet aggregation and thromboxane formation. *Lancet* (1984) 1.8389: S. 1261-1264.

LUMADUE J.A., LANZKORN S.M., KENNEDY S.D., KUHL D.T., KICKLER T.S.: Cytokine induction of platelet activation. *Am J Clin Pathol* (1996), 106: S. 795-798.

MATCHAR D.B., MCCRORY, BARNETT J.M., FEUSSNER ET AL: Medical treatment for stroke prevention. *Ann Intern Med* (1994), 121: S. 41-53.

MATJEVIC-ALEKSIC N., SANDUJA S.K., WANG L.H., WU K.K.: Differential expression of thromboxane A synthase in megakaryocytic cell line. *Biochimica et Biophysica Acta* (1995), 1269: S. 167-175.

MAYEUX P.R., MORTON H.E., GILLARD J., LORD A., MORINELLI T.A., BOEHM A., MAIS D.E., HALUSHKA P.V.: The affinities of prostaglandin H₂ and thromboxan A₂ for their receptor are similar in washed human platelets. *Biochemical and Biophysical Research Communications* (1988), 157: S. 733-739.

MITCHELL J. A., AKARASEREENONT P., THIEMERMAN C., FLOWER R. J., VANE J. R.: Selectivity of nonsteroidal antiinflammatory drugs as inhibitors of constitutive and inducible cyclooxygenase. *Proc Natl Acad Sci USA* (1994), 90(24): S. 11693-11697.

MOTWANI J. G., TOPOL E. J.: Aortocoronary saphenous vein graft disease. Pathogenesis, predisposition, and prevention. *Circulation* (1998), 97: S. 916-931.

MUCK S., WEBER A.A., SCHRÖR K.: Effects of terbogrel on platelet function and prostaglandin endoperoxide transfer. *Eur.J.Pharmacol* (1998), 344: S. 45-48.

MÜLLER M.R., SALAT A., STANGL P., MURABITO M., PULAKI S., BOCHM D., KOPPENSTEINER R., ERGUN E., MITTLBOCK 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 Haemos* (1997) ,78: S. 1003-1007.

NAIR G.V., DAVIS C.J., MCKENZIE M.E., LOWRY D.R., SEREBRUANY V.L.: Aspirin in patients with coronary artery disease- is it irresistible. *J Thrombosis and Thrombolysis* (2001), 11: S.117-126.

NATHAN N., DENIZOT Y., CORNU E., JAUBERTEAU M.O., CHAUVREAU C., FEISS P.: Cytokine and lipid mediator blood concentrations after coronary artery surgery. *Anesth Analg* (1997), 85: S. 1240-1246.

PARIGNANI P., FILABOZZI P., PATRONO C.: Selective cumulative inhibition of platelet thromboxane production by low dose aspirin in healthy subjects. *J Clin Invest* (1982), 69: S. 1366-1372.

PARIS-GROUP: Persantine Aspirin Reinfarction Study (PARIS) – Persantine and aspirin in coronary heart disease. *Circulation* (1980), 62: S. 449-462.

PATRONO C.: Aspirin as an antiplatelet drug. *N Engl J Med* (1994), 330: S. 1287-1294

PATRONO C., COLLIER B., DALEN J.E., FITZGERALD G.A., FUSTER V., GENT M., HIRSH J., ROTH G.: Platelet-active drugs. The relationships among dose, effectiveness and side effects. *Chest* (2001), 119(suppl): S. 39-63.

PCI-CURE study group: Effects of pretreatment with clopidogrel and aspirin followed by long-term therapy in patients undergoing percutaneous coronary intervention. *Lancet* (2001) 358: S. 527-533.

PEDERSEN A.K., FITZGERALD G.A.: Dose-related kinetics of aspirin. Presystemic acetylation of platelet cyclooxygenase. *N Engl J Med* (1984), 311: S. 1206-1211.

PFISTERER M., BURKART F., JOCKERS G., MEYER B., REGENASS S., BURCKHARDT D.L., SCHMITT H.E., MULLER-BRAND J., SKARVAN K., STULZ P.: Trial of low-dose aspirin plus dipyridamole versus anticoagulants for prevention of aortocoronary vein graft occlusion. *Lancet* (1989), 19: S. 916-931.

Picot D., Loll P.J., Garavito R.M.: THE X-RAY CRYSTAL STRUCTURE OF THE MEMBRANE PROTEIN PROSTAGLANDIN H₂ SYNTHASE. *NATURE* (1994), 267: S. 243-249

REVES J.G., BUTTNER E., KARP R.B., OPARIL S., MCDANIEL H.G., SMITH L.R.: Elevated catecholamines during cardiac surgery: consequences of reperfusion of the postarrested heart. *Am J Cardiol* (1984), 53: S. 722-8.

ROCCA B., SECCHIERO P., CIABATTONI G., RANELLETTI F.O., CATANI L., GUIDOTTI L., MELLONI E., MAGGIANO N., ZAULI G., PATRONO C.: Cyclooxygenase-2 expression is induced during human megakaryopoiesis and characterizes newly formed platelets. *Proc Natl Acad Sci USA* (2002), 99: S. 7634-7639.

ROTH G.J., STANFORD N., MAJERUS P.W.: Acetylation of prostaglandin synthase by aspirin. *Proc Natl Acad Sci USA* (1975), 72: S. 3073-3076.

SASAKI E., PAI R., HALTER F., KOMURASAKI T., ARAKAWA T., KOBAYASHI K., KUROKI T., TARNAWSKI A.: Induction of Cyclooxygenase-2 in a rat gastric epithelial cell line by epiregulin and basic fibroblast growth factor. *J Clin Gastroenterol* (1998), 27 (Suppl. 1): S. 21-27.

SCHRÖR K., SEIDEL H.: Blood-vessel wall arachidonate metabolism and its pharmacological modification of in a new in vitro assay system. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* (1988), 337: S. 177-182.

SHIMOKAWA T., SMITH W.L.: Prostaglandin endoperoxide synthase: The aspirin acetylation region. *J Biol Chem* (1992), 267: S. 5192-5198.

SHIVDASANI R.A.: Molecular and transcriptional regulation of megakaryocyte differentiation. *Stem Cells* (2002), 19: S. 397-407.

TOGHI H., KONNO S., TAMURA K., KIMURA B., KAWANO K.: Effects of low to high doses of aspirin on platelet aggregability and metabolites of thromboxane A₂ and prostacyclin. *Stroke* (1992), 23: S. 1400-1404.

SHIVDASANI R.A.: Molecular and transcriptional regulation of megakaryocyte differentiation. *Stem Cells* (2002), 19: S. 397-407.

VAN DER MEER J., HILLEGE H.L., KOOSTSTRA G.J., ASCOOP C.A., MULDER B.J., PFISTERER M., VAN GILST W.H., LIE K.I.: Prevention of one year vein-graft occlusion after aortocoronary bypass surgery: a comparison of low-dose aspirin, low-dose aspirin plus dipyridamole, and oral anticoagulants. *Lancet* (1993); 342 (8866): S. 257-264.

VANE, J. R., BAKHLE, Y. S., BOTTING, R. M.: Cyclooxygenases 1 and 2. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* (1998), 38: S. 97-120.

VEJAR M., FRAGASSO G., HACKETT D., LIPKIN D.P., MASERI A., BORN G.V., CIABATTONI G., PATRONO C.: Dissociation of platelet activation and spontaneous myocardial ischemia in unstable angina. *Thromb Haemost* (1990), 63: S. 163-168.

WEBER A.A., ZIMMERMANN K.C., MEYER-KIRCHRATH J., SCHRÖR K.: Cyclooxygenase-2 in human platelets as a possible factor in aspirin resistance. *Lancet* (1999), 353: S. 900.

WEBER M. / v. SCHACKY C. / LORENZ R.: Niedrig dosierte Acetylsalicylsäure (100 mg/Tag) nach aortokoronarer Bypass-Operation. *Klin Wochenschrift* (1984), 62: S. 458-464.

WEBSTER J., DOUGLAS A.S.: Aspirin and other antiplatelet drugs in the prophylaxis of thrombosis. *Blood Rev.* 1 (1987): S. 9-20

WEINTRAUB W.S., JONES E.L., CRAVER J.M. et al.: Frequency of repeat coronary bypass or coronary angioplasty after coronary artery bypass surgery using saphenous vein grafts. *Am J Cardiol* (1994), 73: S 103-112.

WEERASINGHE A., KENNETH M.T.: The platelet in cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg* (1998), 66: S. 2145-2152.

WU K. K.: Platelet activation mechanisms and markers in arterial thrombosis. *J Intern Med* (1996), 239(1): S. 17-34.

XIE W., HERSCHMAN R.: Transcriptional regulation of Prostaglandin Synthase 2 gene expression by platelet-derived growth factor and serum. *Journal of Biological Chemistry* (1996), 271(49): S. 31742-31748.

YUSUF S., SLEIGHT P., POGUE J.: Effects on an angiotensin-converting-enzyme inhibitor, ramipril, on cardiovascular events in high-risk patients: the Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med* (2000), 342: S. 145-153.

ZIMMERMANN N., WINTER J., GAMS E.: Combined inhibition of thromboxane synthase and thromboxane receptors effectively inhibits aspirin-resistant platelets. *Circulation* (2001), 104.17 (suppl): II-125.

7 VERÖFFENTLICHUNGEN IM ZUSAMMENHANG MIT DIESER ARBEIT

Originalarbeiten

ZIMMERMANN N., KIENZLE P., WEBER A.-A., WINTER J., GAMS E., SCHRÖR K., HOHLFELD T. (2001) Aspirin resistance after coronary artery bypass grafting. J Thoracic Cardiovasc Surg 121:982-984.

ZIMMERMANN N., WENK A., KIM U., KIENZLE P., WEBER A.-A., GAMS E., SCHRÖR K., HOHLFELD T.: Functional and biochemical evaluation for platelet aspirin resistance after coronary artery bypass surgery. Review-Verfahren, Circulation (2003)

Vorträge mit publiziertem Abstract zum Thema ASS

European Society of Cardiology – Annual Meeting (Barcelona, Spanien, 1999)

ZIMMERMANN N, KIENZLE P, WEBER AA, WINTER J, SCHRÖR K, GAMS E, HOHLFELD T (1999) Persisting formation of thromboxane in patients under aspirin following coronary bypass grafting. Eur J Clin Pharmacol 55.3: A 28.

9th World Congress of The World Society of Cardio-Thoracic Surgeons (Lisbon, Portugal, 1999)

ZIMMERMANN N, KIENZLE P, WINTER J, MICEK M, GAMS E, SCHRÖR K, HOHLFELD TH (1999) Insufficient inhibition of platelets by aspirin after extracorporeal circulation. World Society of Cardio-Thoracic Surgeons. Congress abstract book 9: 41.

American Heart Association – 72th Scientific Sessions (Atlanta, USA, 1999)

ZIMMERMANN N., KIENZLE P., WEBER AA, GAMS E, HOHLFELD TH, SCHRÖR K (1999) Platelet aspirin resistance is associated with an increased platelet content of cyclooxygenase-2. Circulation 100.18 (suppl): I-327.

Deutsche Gesellschaft für Kardiologie – Herz- und Kreislaufforschung – 66. Jahrestagung (Mannheim, 2000):

HOHLFELD T, ZIMMERMAN N, KIENZLE P, GAMS E, SCHRÖR K (2000) Resistenz gegenüber Acetylsalicylsäure geht einher mit einer thrombozytären Induktion der Cyclooxygenase-2. *Z Kardiol* 89 (suppl 5): 176.

Deutsche Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie – 42. Frühjahrstagung (Mainz, 2001):

HOHLFELD T, ZIMMERMANN N, KIENZLE P, WEBER AA, SCHRÖR K (2001) Increased expression of cyclooxygenase-2 in platelets associated with aspirin resistance. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 363 (suppl): A 450.

8 DANKSAGUNG

Bei der Anfertigung dieser Doktorarbeit haben mir viele Menschen geholfen. Ich möchte mich daher an dieser Stelle bei folgenden Personen besonders bedanken:

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Karsten Schrör und Herrn Prof. Dr. Thomas Hohlfeld für die Bereitstellung des Themas, die hervorragende Betreuung und die kritische Durchsicht der Manuskripte.

Norbert Zimmermann möchte ich danken sowohl für die tolle Zusammenarbeit während der Versuche, als auch bei der Auswertung der Ergebnisse.

Dr. Artur-Aron Weber danke ich für die Einweisung in die Aggregationsversuche und die zuverlässige Unterstützung bei Schwierigkeiten im Laboralltag.

Irmhild Rüter danke ich sehr herzlich für die stets rasche Messung der Thromboxanwerte.

Erika Lohmann und Karin Montag danke ich für die Organisation des Institutslebens und die stets freundliche Atmosphäre.

Petra Kuger möchte ich für die hilfreiche Zusammenarbeit und Unterstützung bei den Western Blot Versuchen danken.

Jürgen Springer, für so manche Reparatur eines Aggregometers

Allen Kollegen und besonders den Doktoranden, danke ich für oft fröhlichen gemeinsamen Momente und die stets freundliche Atmosphäre. Jegliche Hilfe, sei es durch Gespräche, Tipps bei Versuchen oder aufmunternde Worte haben zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Danke Anke für die Unterstützung in den beiden vergangenen Jahren.

Mein letzter und größter Dank gilt meinen Eltern, die mir diese Ausbildung ermöglicht haben und mich während des gesamten Weges unterstützt und gefördert haben.

9 EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Ich versichere an Eides statt, dass ich die vorliegende Doktorschrift selbstständig und ohne fremde Hilfe angefertigt, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt, den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommene Stellen als solche kenntlich gemacht habe, und dass diese Doktorschrift an keiner anderen Fakultät eingereicht worden ist.

Berlin, den 17. Februar 2003

10 LEBENSLAUF

PETER KIENZLE

Geboren am 28.03.1973 in Ludwigsburg

Familienstand: ledig

SCHULAUSBILDUNG

Grundschule Oberriexingen

1979-1983

Friedrich Abel Gymnasium Vaihingen/Enz

1983-1992

19.05.1992 Abitur (Notendurchschnitt: 1,7)

ZIVILDIENTST

Städt. Krankenhaus Vaihingen/Enz

1.08.1992- 31.10.1993

STUDIUM

Albert-Ludwigs-Universität Freiburg

1993-1998 Studium des Faches Zahnmedizin

31.10.1994 Naturwissenschaftliche Vorprüfung (Note: 1)

22.04.1996 Zahnärztliche Vorprüfung (Note: 2)

15.12.1998 Zahnärztliche Prüfung (Note: 1)

29.12.1998 Approbation als Zahnarzt

BERUFSTÄTIGKEIT

Anstellung als Assistenz Zahnarzt

1.10.1999 Zahnarztpraxis Dr. Helmut Weider, Asperg

1.8.2000-31.01.2002 Zahnarztpraxis Wolfgang Hild, Vaihingen/Enz - Kleinglattbach

Beginn der Facharztausbildung für Oralchirurgie

1.02.2002 Schloßparkklinik Berlin, Chefarzt: Dr. Dr. Kindermann