

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

**Thrombozytäre Funktion und Thromboxansynthese nach koronarer  
Bypassoperation: Verzögerte Zeitkinetik der Cyclooxygenasehemmung  
durch Acetylsalicylsäure**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der  
Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität  
Düsseldorf

vorgelegt von  
Angela Christine Wenk

2006

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Bernd Nürnberg  
Dekan  
Referent: Prof. Dr. med. Thomas Hohlfeld  
Korreferent: PD Dr. med. Rainer Zotz

# Inhaltsverzeichnis

<b>1 Einleitung</b> .....	<b>- 1 -</b>
1.1 Bedeutung der Thrombozyten für die Hämostase .....	- 2 -
1.2 Arachidonsäuremetabolismus der Thrombozyten .....	- 4 -
1.3 ASS und Thrombozyten .....	- 6 -
1.4 ASS in der Prävention thromboembolischer Ereignisse .....	- 6 -
1.5 ASS-Nonresponse .....	- 7 -
1.6 Koronarchirurgie als Modell der ASS-Nonresponse .....	- 10 -
1.7 Fragestellungen .....	- 11 -
<b>2 Material und Methoden</b> .....	<b>- 12 -</b>
2.1 Untersuchungspläne .....	- 12 -
2.2 Material .....	- 13 -
2.2.1 Blutentnahme .....	- 13 -
2.2.2 Plasmagewinnung .....	- 13 -
2.2.3 Präparation von gewaschenen Thrombozytenpellets für die Western-Blot-Analyse .....	- 13 -
2.2.4 Substanzen und Lösungen .....	- 14 -
2.3 Methoden .....	- 16 -
2.3.1 Thrombozytenfunktionsmessungen .....	- 16 -
2.3.1.1 Aggregometrie .....	- 16 -
2.3.1.2 Thromboxansynthese .....	- 19 -
2.3.1.3 ATP-Sekretion .....	- 19 -
2.3.2 Thrombozytenzahlen .....	- 19 -
2.3.3 Western-Blot-Analyse .....	- 20 -
2.3.3.1 Probenherstellung .....	- 20 -
2.3.3.2 Quantitative Proteinbestimmung .....	- 20 -
2.3.3.3 Elektrophorese .....	- 20 -
2.3.3.4 COX-2 Immundetektion .....	- 20 -
2.3.4 Statistik .....	- 21 -
<b>3 Ergebnisse</b> .....	<b>- 22 -</b>
3.1 Thrombozytenzahlen .....	- 22 -
3.2 Arachidonsäure-induzierte thrombozytäre Aggregation .....	- 23 -
3.2.1 Untersuchungen an Patienten mit Herz-Lungen-Maschine .....	- 23 -
3.2.2 Untersuchungen an Patienten ohne Herz-Lungen-Maschine .....	- 24 -
3.2.3 Vergleich der Untersuchungen nach Operationen mit und ohne Herz-Lungen-Maschine .....	- 25 -
3.3 Thrombozytäre Thromboxansynthese .....	- 26 -
3.3.1 Untersuchungen an Patienten mit Herz-Lungen-Maschine .....	- 26 -
3.3.2 Untersuchungen an Patienten ohne Herz-Lungen-Maschine .....	- 27 -
3.3.3 Vergleich der Untersuchungen nach Operationen mit und ohne Herz-Lungen-Maschine .....	- 28 -
3.4 Thrombozytäre ATP-Sekretion .....	- 29 -
3.5 Beziehung zwischen thrombozytärer Thromboxansynthese und Aggregation .....	- 30 -
3.6 Nachweis der thrombozytären Cyclooxygenase-2 .....	- 31 -
3.7 Zeitkinetik der Hemmung thrombozytärer Funktionen durch ASS .....	- 32 -
3.7.1 Zeitabhängige Hemmung der Aggregation durch ASS .....	- 32 -
3.7.2 Zeitabhängige Hemmung der Thromboxansynthese durch ASS .....	- 34 -
3.7.3 Zeitabhängige Hemmung der ATP-Sekretion durch ASS .....	- 36 -

<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>- 38 -</b>
4.1	Bedeutung der ASS-Nonresponse für die kardiovaskuläre Prognose .....	- 38 -
4.2	Hypothesen zur Erklärung der ASS-Nonresponse .....	- 40 -
4.3	Einfluss der Operationsmethode auf ASS-Nonresponse .....	- 44 -
4.5	Cyclooxygenase-2 als möglicher Mechanismus für ASS-Nonresponse .....	- 45 -
4.5	Pharmakologische Konzepte zur Überwindung der ASS-Nonresponse .....	- 46 -
4.6	Alternative antithrombotische Therapie-Möglichkeiten bei ASS-Nonresponse .....	- 48 -
4.7	Konsequenzen für die antithrombotische Therapie bei ASS-Nonresponse .....	- 49 -
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>- 50 -</b>
<b>6</b>	<b>Publikationen im Zusammenhang mit der Arbeit.....</b>	<b>- 51 -</b>
6.1	Originalarbeiten.....	- 51 -
6.2	Kongressbeiträge .....	- 51 -
<b>7</b>	<b>Literatur .....</b>	<b>- 52 -</b>
<b>8</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>- 59 -</b>
<b>9</b>	<b>Curriculum vitae .....</b>	<b>- 60 -</b>

# Abkürzungen

A. dest.	destilliertes Wasser
AA	Arachidonsäure
ACB	aortokoronarer Bypass
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
AK	Antikörper
ASS	Acetylsalicylsäure; Aspirin®
ATP	Adenosintriphosphat
AUC	area under the curve (Fläche unter der Blutspiegelkurve)
CABG	coronary artery bypass grafting (aortokoronarer Bypass)
CK-MB	Kreatinkinase-MB
$c_{max}$	maximale Konzentration
COX	Cyclooxygenase
ED <sub>50</sub>	Dosis, die 50 % der maximalen Wirkung auslöst
EKZ	extrakorporale Zirkulation
EtOH	Ethanol
GP	Glykoprotein
12-HETE	12-Hydroxyeikosatetraensäure
HLM	Herz-Lungen-Maschine
HWZ	Halbwertszeit
IC <sub>50</sub>	Konzentration, bei der die Enzymaktivität zu 50 % gehemmt ist
IL	Interleukin
KHK	koronare Herzkrankheit
min	Minute
mRNA	messenger-RNA (Ribonukleinsäure)
n	Stichprobengröße
n.s.	nicht signifikant
„Off-Pump“	ACB-Operation, die ohne Einsatz der HLM durchgeführt wird
OP	Operation
OPCAB	„Off-Pump“ Coronary Artery Bypass (aortokoronare Bypass-operation, die ohne Herz-Lungen-Maschine durchgeführt wird)
PAP	plättchenarmes Plasma
PAVK	periphere arterielle Verschlusskrankheit
PG	Prostaglandin
PGF <sub>2<math>\alpha</math></sub>	Prostaglandin F <sub>2<math>\alpha</math></sub>
PGH <sub>2</sub>	Prostaglandin H <sub>2</sub>
PGG <sub>2</sub>	Prostaglandin G <sub>2</sub>
PGI <sub>2</sub>	Prostaglandin I <sub>2</sub> = Prostacyclin
p.o.	per os; orale Einnahme
PRP	plättchenreiches Plasma
PTCA	perkutane transluminale koronare Angioplastie
PVDF-Membran	Polyvinylidendifluorid-Membran
RIA	Radioimmunoassay
RT	Raumtemperatur
SNP	single-nucleotide Polymorphismen
TNF	Tumornekrosefaktor
TX	Thromboxan
TXA <sub>2</sub>	Thromboxan A <sub>2</sub>
TXB <sub>2</sub>	Thromboxan B <sub>2</sub>
vs.	versus
vWF	von-Willebrand-Faktor

# 1 Einleitung

Acetylsalicylsäure (ASS), besser bekannt unter dem Handelsnamen Aspirin®, wird seit über hundert Jahren erfolgreich zur Behandlung von Fieber und entzündlichen Schmerzzuständen eingesetzt. Allein in den USA werden täglich bis zu 35000 kg konsumiert [Jack, 1997]. Damit zählt ASS weltweit zu den am häufigsten verwendeten Arzneimitteln. Neben antiphlogistischen und antipyretischen Eigenschaften hemmt ASS die Thrombozytenfunktion durch irreversible Inaktivierung der thrombozytären Cyclooxygenase. Dieser zuerst als unerwünscht betrachtete Effekt legte den Grundstein für die antithrombotische Therapie mit ASS.

Die orale „low-dose“ ASS-Therapie (75-325 mg/d) gehört heute zur Standardtherapie in der Sekundärprophylaxe thromboembolischer Ereignisse. Sie reduziert nachweislich das Auftreten von Herzinfarkten, Schlaganfällen und verhindert den kardiovaskulär bedingten Tod bei Patienten mit erhöhtem Risiko.

Allerdings scheint dieser positive prognostische Effekt von ASS limitiert zu sein. Denn Metaanalysen umfangreicher Datensätze, wie z.B. die der „Antithrombotic Trialists' Collaboration“, lassen erkennen, dass definierte Patientenkollektive in unterschiedlichem Maße profitieren. So ist die präventive Wirksamkeit von ASS bei Patienten nach operativer Myokardrevaskularisation bei koronarer Herzerkrankung (KHK) deutlich geringer als beispielsweise bei Patienten nach Herzinfarkt [Antithrombotic Trialists' Collaboration, 2002]. Angesichts der Tatsache, dass ASS mit zu den am besten untersuchten antithrombozytären Substanzen zählt und detaillierte Erkenntnisse über Wirkweise und Interaktionen vorliegen, scheint dies verwunderlich. Weitere klinische Studien dokumentierten ebenfalls eine ungenügende bis aufgehobene ASS-Wirkung, die als „ASS-Resistenz“ bzw. ASS-Nonresponse bezeichnet wurde [Buchanan und Brister, 1995; Gum et al., 2001; Helgason et al., 1994; Poston et al., 2006].

Die vorliegende Arbeit widmet sich der „Resistenz“ gegenüber Acetylsalicylsäure bei Patienten nach aortokoronarer Bypassoperation (ACB-Operation), einem durch eine fortgeschrittene KHK definierten Patientenkollektiv. Besonderes Augenmerk wurde dabei auf die Gegenüberstellung von Patientengruppen gerichtet, die mit bzw. ohne den Einsatz der Herz-Lungen-Maschine (HLM) operiert wurden. Ergänzende *in vitro* Untersuchungen erfolgten mit dem Ziel, Konzepte zu entwickeln, die einen Wirkverlust von ASS erklären und Ansätze zu deren Überwindung liefern können.

## 1.1 Bedeutung der Thrombozyten für die Hämostase

Als Hämostase wird die Bildung eines Gefäßwandthrombus bezeichnet, der zur Stillung einer Blutung führt. Der zeitliche Ablauf dieses Vorgangs lässt eine Unterteilung in eine primäre und eine sekundäre Hämostase zu.

Durch eine Gefäßwandläsion ausgelöst beginnt die primäre Hämostase, indem sich Thrombozyten im Bereich des Gewebedefektes anlagern und weitere Reaktionen induzieren (Abb. 1). Dieser Vorgang wird Adhäsion genannt. Ursächlich für den Adhäsionsvorgang sind thrombozytäre Membranglykoproteine (GP), durch die der Thrombozyt Strukturen der extrazellulären Matrix wie kollagene oder elastische Fasern im Bereich des Subendothels erkennen kann. Über Interaktion des thrombozytären Rezeptors für von-Willebrand-Faktor (GPIb) mit matrixgebundenem von-Willebrand-Faktor (vWF) entsteht der erste Kontakt zwischen Läsion und zirkulierenden Thrombozyten (Abb. 1). Eine hohe Affinität des Rezeptors mit dem Substrat gewährleistet die Adhäsion selbst bei starker Scherkraft.

Die Bindung weiterer Rezeptoren an deren Liganden stabilisiert den Adhäsionsvorgang. Zu diesen Rezeptoren gehören der Kollagen- (GPVI), sowie der Fibronektin- und der Lamininrezeptor. Besonders die Bindung des thrombozytären Kollagenrezeptors GPVI an subendotheliales Kollagen führt im Thrombozyten zur Aktivierung und Formveränderung („shape change“) mit Bildung von Ausstülpungen der Plasmamembran (Pseudopodien), die zu einer vergrößerten Oberfläche führen und damit eine effektivere Abdichtung der Läsion schaffen [Nieswandt et al., 2001]. Eine begleitende Aktivierung intrazellulärer Signalmechanismen (vgl. 1.2) resultiert unter anderem in der Synthese von Thromboxan A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) aus Arachidonsäure, welches nach Freisetzung ebenfalls die Aktivierung von Thrombozyten fördert (Abb. 1).

Neben Rezeptor-Liganden-Interaktionen während des Adhäsionsvorganges können auch Substanzen, wie ADP (Adenosindiphosphat) oder Thrombin, eine Aktivierung des Thrombozyten bewirken und ruhende Thrombozyten rekrutieren. Des Weiteren kommt es im Rahmen der Adhäsion und „shape change“ zur Freisetzung weiterer Substanzen aus Speichergranula des Blutplättchens. Dichte Granula enthalten im Wesentlichen ADP, ATP (Adenosintriphosphat), Serotonin und Calcium. Daneben existieren noch  $\alpha$ -Granula, die vor allem Proteine enthalten, wie beispielsweise vWF, und lysosomale Granula, die hydrolytische Enzyme enthalten.

Durch diesen Sekretionsvorgang wird der Aktivierungsprozess zusätzlich verstärkt und ruhende Plättchen zur Aggregation mit bereits adhärennten Plättchen angeregt. Dabei werden zwei Phasen der Aggregation unterschieden: die primäre reversible und die sekundäre irreversible Aggregation. Die reversible Phase der Aggregation wird durch eine Bindung von GPIb-Rezeptoren zirkulierender Thrombozyten mit vWF auf der Oberfläche von bereits adhärennten Thrombozyten vermittelt [Kulkarni et al., 2000]. Die nachfolgende irreversible Aggregation wird über den membranständigen GPIIb/IIIa-Komplex vermittelt, der nach Aktivierung Fibrinogen in Anwesenheit von Calcium bindet und Fibrinogenbrücken zwischen Thrombozyten ausbildet (Abb. 1).

Da der so gebildete Thrombus jedoch noch relativ instabil ist, ist eine Verstärkung durch Fibrin nötig. Dies geschieht unter Einfluss der Gerinnungsfaktoren im Rahmen der sekundären Hämostase [Übersicht bei Gawaz, 1999].



## 1.2 Arachidonsäuremetabolismus der Thrombozyten

Während der Thrombozytenaktivierung laufen eine Vielzahl metabolischer und biochemischer Prozesse im Blutplättchen ab, die über Signaltransduktionswege unter Bildung von Signalfaktoren („second messenger“) vermittelt werden. Ein wichtiger Enzymkomplex ist dabei die Phospholipase A<sub>2</sub>, die aktiviert durch Calcium die Freisetzung von Arachidonsäure (AA) aus Membranphospholipiden katalysiert. Arachidonsäure ist der Vorläufer einer Reihe von Lipidmediatoren (Eikosanoiden), die auf dem Cyclooxygenase- oder dem Lipoxygenase-Weg entstehen.

Die Cyclooxygenase (COX), auch als Prostaglandin H (PGH)-Synthase bezeichnet, setzt Arachidonsäure zunächst durch Oxidation und Ringschluss zu dem Hydroxyendoperoxid PGG<sub>2</sub> um (Abb. 2). Anschließend erfolgt im selben Enzym eine peroxidase-katalysierte Reduktion zum Alkohol. Es entsteht PGH<sub>2</sub>, die gemeinsame Vorstufe aller Typ-2-Prostaglandine (mit zwei Doppelbindungen). Nachgeschaltete Enzyme katalysieren die Umwandlung von PGH<sub>2</sub> zu Prostacyclin (PGI<sub>2</sub>), Thromboxan A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>), PGD<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub>, und PGE<sub>2</sub> (Abb. 2). Welches Eikosanoid gebildet wird, hängt dabei von der Aktivität und Lokalisation der Enzyme ab, die PGH<sub>2</sub> umwandeln.

Die COX existiert als COX-1, COX-2 und als COX-3, einer modifizierten Form der COX-1 [Vane et al., 1998; Chandrasekharan et al., 2002]. Die „konstitutive“ Isoform COX-1 spielt eine wichtige Rolle in der Vermittlung von physiologischen Funktionen. So entsteht im Gefäßendothel durch die COX-1 das antithrombogene und vasodilatierende Prostacyclin (PGI<sub>2</sub>). Im Thrombozyten wird unter Einfluss der COX-1 und Thromboxansynthase aus PGH<sub>2</sub> hauptsächlich TXA<sub>2</sub> synthetisiert, welches rezeptorvermittelt thrombogene und aggregationsfördernde Eigenschaften besitzt [Vane et al., 1998]. Die „induzierbare“ Isoform ist die COX-2. Ihre Bildung kann durch entzündliche immunologische Mediatoren, wie inflammatorische Zytokine (IL-1, IL-2) und den Tumornekrosefaktor (TNF-α) angeregt werden. Es gibt aber auch Organe, wie beispielsweise das zentrale Nervensystem und die Nieren, in denen eine ständige Expression der COX-2 beobachtet werden konnte [Vane et al., 1998]. Darüber hinaus verfügt auch das Gefäßsystem über COX-2 (40 - 60 %) [Karim et al., 1996]. Neueren Studien zur Folge scheint die COX-2 im Gefäßendothel den größeren Anteil des antithrombogenen und vasodilatierenden Prostacyclins (PGI<sub>2</sub>) zu katalysieren [Inoue et al., 2002]. Weitere Isoformen, z.B. COX-3, sind zwar beschrieben, aber über ihre Expression und Funktion ist bislang wenig bekannt [Chandrasekharan et al., 2002].

Prostaglandine werden nicht gespeichert, sondern auf Stimulation hin neu synthetisiert und freigesetzt. Dabei ist die Halbwertszeit (HWZ) im Plasma sehr kurz (wenige Minuten) und sie werden rasch inaktiviert. TXA<sub>2</sub> wird innerhalb weniger Minuten zum stabileren, jedoch biologisch inaktiven, TXB<sub>2</sub> hydrolysiert und ist im Plasma nachweisbar [Schrör et al., 1988].



### 1.3 ASS und Thrombozyten

Acetylsalicylsäure blockiert den ersten Schritt des Arachidonsäuremetabolismus, die Cyclooxygenase (Abb. 2). Dieser Mechanismus ist im Gegensatz zu dem anderer nicht-steroidaler Antiphlogistika wie Indometazin oder Ibuprofen irreversibel. Die COX-1 stellt dabei den wesentlichen Angriffspunkt dar, weil ASS diese Isoform 150 bis 200-fach stärker hemmt als die induzierbare COX-2 [Mitchell et al., 1994]. In der eigenen Arbeitsgruppe gelang es in gewaschenen Thrombozyten neben der COX-1 auch mRNA und Protein der induzierbare Isoform, COX-2, nachzuweisen [Weber et al., 1999].

Angesichts der Tatsache, dass aktivierte Thrombozyten Thromboxan im Überschuss produzieren und eine residuale Thromboxan-Synthesekapazität von 10 % für eine Thromboxan-induzierte Thrombozytenaggregation ausreicht, würde eine im Vergleich zu COX-1 nur geringe Aktivität der COX-2 im Thrombozyten ausreichen, um die Wirkung von ASS erheblich zu reduzieren oder ganz aufzuheben [FitzGerald et al., 1985; Hohlfeld und Schrör, 1998].

1975 beschrieben Roth et al. erstmals die Acetylierung einer funktionell wichtigen Gruppe der COX als zugrunde liegenden Wirkmechanismus von ASS. In späteren molekularbiologischen Untersuchungen konnte bestätigt werden, dass ASS die Hydroxylgruppe der Aminosäure Serin<sub>530</sub> am N-terminalen Ende des Enzyms irreversibel acetyliert [Funk et al., 1991]. Dabei bleiben die Peroxidaseaktivität der PGH-Synthase und die katalytische Aktivität unverändert [Shimokawa und Smith, 1992]. Denn durch den Austausch von Serin<sub>530</sub> durch Alanin<sub>530</sub>, einer Aminosäure ohne potentielle Acetylierungsstelle, konnte zwar die inhibitorische Wirkung von ASS verhindert, nicht aber die katalytische Wirkung des Enzyms beeinflusst werden [DeWitt et al., 1990]. Die Inaktivierung des Enzyms durch ASS scheint daher vielmehr durch eine sterische Hinderung der Interaktion von Arachidonsäure mit der COX verursacht zu werden. Nach Aufklärung der Kristallstruktur der COX-1 konnte die Hypothese der sterischen Hinderung weiter gestützt werden. Demnach liegt die Cyclooxygenase-Aktivität der COX am Ende eines hydrophoben Kanals nahe der Aminosäure Tyr<sub>385</sub>, welche entscheidende Bedeutung für die katalytische Aktivität des Enzyms hat. Das Serin<sub>530</sub> liegt an der engsten Stelle in der Wand dieses Kanals unterhalb des katalytisch aktiven Tyr<sub>385</sub>. Die kovalente Bindung zwischen der Acetylgruppe und der Aminosäure Serin<sub>530</sub> führt damit durch sterische Hinderung zu einer Blockade des Kanals und verhindert so die Passage der Arachidonsäure [Picot et al., 1994; Loll et al., 1995].

Im Thrombozyten hemmt ASS die Synthese des proaggregatorischen TXA<sub>2</sub>. Diese Wirkung kann erst durch Synthese neuer Blutplättchen aufgehoben werden, denn den kernlosen Thrombozyten fehlt die Fähigkeit zur Proteinbiosynthese, so dass die irreversibel gehemmte Cyclooxygenase nicht ersetzt werden kann.

### 1.4 ASS in der Prävention thromboembolischer Ereignisse

Zahlreiche klinische Studien belegen den protektiven Effekt von ASS hinsichtlich thromboembolischer Durchblutungsstörungen bei Patienten mit erhöhtem vaskulären Risiko. Zu den Akut-Indikationen für ASS zählt dabei das akute Koronarsyndrom. Unter ASS traten bei dieser Patientenpopulation signifikant weniger Reinfarkte oder zerebrale Insulte auf. Zudem konnte die Letalität gegenüber Placebo-Gabe um mehr als 20 % gesenkt werden [Antithrombotic Trialists' Collaboration, 2002, ISIS-2 Group, 1988]. Analoge Ergebnisse wurden für Patienten nach apoplektischem Insult dokumentiert: ASS reduzierte in der Akutphase ebenfalls das Auftreten vaskulärer Folgeereignisse [Antithrombotic Trialists' Collaboration, 2002; CAST-Group, 1997]. In der Sekundärprävention thromboembolischer

Ereignisse bei Postmyokardinfarktpatienten wurde in mehreren klinischen Studien bei einer mittleren Behandlungsdauer von 2 Jahren eine signifikante Reduktion von Reinfarkten und Schlaganfällen durch ASS gezeigt. Ferner konnte nach ischämischen Hirninfarkt unter ASS eine Reduktion der Mortalität nachgewiesen werden [Antithrombotic Trialists' Collaboration, 2002; ESPS-Group, 1990]. Eine Primärprävention mit ASS wird bei Patienten mit einem erhöhten kardiovaskulären Risikoprofil empfohlen, wie fortgeschrittenes Patientenalter, positive Familienanamnese, arterieller Hypertonus, Diabetes mellitus oder langjähriger Nikotinkonsum [Hennekens, 2002]. ASS wird darüber hinaus in der postinterventionellen Prophylaxe von Bypassfrüh- und Spätverschlüssen als antithrombotische Substanz eingesetzt [Gavaghan et al., 1991; Fuster und Chesebro, 1986; Goldman et al., 1988]. Allerdings konnte in mehreren klinischen Studien ein Nutzen durch ASS hinsichtlich des späten Transplantatverschlusses nicht dokumentiert werden [Okrainec et al., 2005].

Die therapeutischen Dosierungen reichen von 100 bis 1200 mg ASS pro Tag. Metaanalysen von 17 klinischen Studien stellten Vorteile einer Therapie mit 100 bis 300 mg ASS („low-dose“) gegenüber höheren Dosierungen heraus [Fremes et al., 1993]. Vorteile niedrigerer Dosierungen liegen in der geringeren Ausprägung von Nebenwirkungen wie Toxizität für den Gastrointestinaltrakt. Ein zusätzlicher positiver Effekt von „low-dose“ ASS liegt darin, dass die Prostacyclinbildung durch geringe Dosierungen möglicherweise kaum beeinflusst wird. Dies ist wünschenswert, da Prostacyclin antiaggregatorisch und vasodilatierend wirkt [Antithrombotic Trialists' Collaboration, 2002; Tohgi et al., 1992]. Einer aktuellen Metaanalyse zufolge scheint bezüglich der ASS-Dosierung nach ACB-Operation eine Dosisabhängigkeit zu bestehen. Dabei wurde das relative Risiko für einen postoperativen Transplantatverschluss untersucht und eine Risikoreduktion von 45 % bei einer täglichen Gabe von 300-325 mg gegenüber 26 % bei 75-100 mg ASS dokumentiert [Lim et al., 2003].

Obgleich ASS in der Prävention thrombotischer Prozesse weit verbreitet eingesetzt wird, gibt es Studien, die über eine verminderte bis aufgehobene Wirksamkeit der Substanz berichten. So belegt die Antithrombotic Trialists' Collaboration in einer Metaanalyse von etwa 100.000 Patienten, dass CABG-Patienten (Patienten nach aortokoronarer Bypassoperation) weniger präventiven Nutzen aus der ASS-Therapie ziehen als Patienten nach Koronarangioplastie oder akutem Myokardinfarkt [Antithrombotic Trialists' Collaboration, 2002]. Auch für andere Patientenkollektive wurde eine unzureichende oder nicht vorhandene antithrombozytäre Wirkung von ASS beschrieben (vgl. 1.5).

### **1.5 ASS-Nonresponse**

Der Begriff „ASS-Resistenz“ wird in der Literatur vielfach verwendet, ohne jedoch genau definiert zu sein. Klinisch könnte die „ASS-Resistenz“ definiert werden als ein Versagen von ASS, Patienten vor thromboembolischen Gefäßverschlüssen zu schützen trotz regelmäßiger ASS-Einnahme in empfohlener Dosierung 75-325 mg/d [Braunwald et al., 2002; Patrono et al., 2004; Hankey und Eikelboom, 2006]. Im pharmakologischen Sinne ist der verwendete Ausdruck „ASS-Resistenz“ jedoch unglücklich gewählt. Denn es besteht keine Resistenz im eigentlichen Sinne wie z. B. für die Antibiotika-Therapie. Es handelt sich vielmehr um ein vermindertes Ansprechen der Thrombozyten auf die inhibierende Wirkung von ASS, dessen Mechanismus noch nicht geklärt ist. Korrekter wäre die Bezeichnung ASS-Nonresponse. Diesbezüglich schlug Patrono vor, ASS-Nonresponse durch den Ausdruck „Therapieversagen“ zu ersetzen [Patrono, 2003].

Atherothrombotische Ereignisse sind multifaktoriell und es ist nicht zu erwarten, dass eine Monotherapie, die der Prävention von vaskulären Komplikationen dient, diese vollständig

verhindert. Thrombozyten können auch Thromboxan-unabhängig aktiviert werden und diese Aktivierungswege sind durch ASS nicht zu beeinflussen.

1995 berichteten Buchanan und Brister in einer randomisierten Doppelblindstudie über die unzureichende Wirkung einer Einmaldosis ASS in verschiedenen Konzentrationen (80-1300 mg) auf die primäre Hämostase bei gesunden Probanden. Sie beobachteten nach Ingestion von 80 mg ASS in 40 % der Fälle eine unzureichende Verlängerung der Blutungszeit. Lediglich eine Dosissteigerung auf 1300 mg konnte die antithrombozytäre Wirkung bei weiteren 30 % der Probanden wieder herstellen [Buchanan und Brister, 1995]. In gleichnamiger Studie wurden auch die Effekte einer Langzeittherapie mit ASS (325 mg/d) an 40 KHK-Patienten vor einer geplanten ACB-Operation untersucht. ASS verlängerte lediglich bei 58 % der Patienten die Blutungszeit adäquat. Auch in anderen Patientenkollektiven konnten ASS-Nonresponder identifiziert werden. Gum et al. beschrieben bei 325 KHK-Patienten in Abhängigkeit der angewendeten Messmethodik eine ASS-Nonresponse in 5,5 bis 9,5 % der Fälle [Gum et al., 2001]. Des Weiteren wurde eine verminderte ASS-Wirkung bei Apoplexpatienten dokumentiert [Helgason et al., 1994; Grotemeyer et al., 1993; Grundmann et al., 2003]. In der nachfolgenden Tabelle sind publizierte Studien aufgeführt, die über eine verminderte antithrombotische Wirkung von ASS berichten.

Kollektiv	n	ASS [mg/d] oral	Definitionskriterien der ASS-Nonresponse	Inzidenz bzw. Prävalenz [%]	Autoren
Probanden	10	80-1300	Blutungszeit	40	Buchanan und Brister, 1995
ACB-Patienten	40	325	Blutungszeit	42	Buchanan und Brister, 1995
ACB-Patienten	34	100	TXB <sub>2</sub> Aggregation	67	Zimmermann et al., 2000
OPCAB-Patienten	225	325	Vollblutaggregometrie, 11-Dehydro-TXB <sub>2</sub> , Durchflusszytometrie, Thrombelastographie	30	Poston et al., 2006
KHK-Patienten	328	325	Aggregation	5,5	Gum et al., 2001
KHK-Patienten	325	325	PFA-Funktion (Scherkraft-induz. Adhäsion)	9,5	Gum et al., 2001
KHK-Patienten	326	325	Aggregation	5,2	Gum et al., 2003
KHK-Patienten	50	70-300	PFA-Funktion (Scherkraft-induz. Adhäsion)	20 % in Ruhe	Christians et al., 2002
				22 % nach Eingriff	
KHK-Patienten	151	80-325	Kommerzieller Test: Ultegra Rapid Platelet Function Assay-ASA	19,2	Chen et al., 2004
Periphere arterielle Verschlusskrankheit (PAVK)	100	100	Vollblutaggregometrie	59	Müller et al., 1997

Kollektiv	n	ASS [mg/d] oral	Definitionskriterien der ASS-Nonresponse	Inzidenz/ Prävalenz [%]	Autoren
Apoplexpatienten	306	325-1300	Aggregation	8,2	Helgason et al., 1994
Apoplexpatienten	180	3 x 500	Plättchenreaktivitätstest EDTA/Formaldehyd	33	Grottemeyer et al., 1993
Symptomatische Apoplexpatienten	35	100	PFA-Funktion (Scherkraft-induz. Adhäsion)	34	Grundmann et al., 2003

**Tabelle 1:** Übersicht in der Literatur verwendeter Definitionen und Inzidenzen der ASS-Resistenz bei unterschiedlichen Patientenkollektiven.

Allerdings variieren die Inzidenzen der ASS-Nonresponse erheblich. Dies verwundert kaum, wenn man sich die Unterschiede in den für die Definition der ASS-Nonresponse gewählten Kriterien vor Augen führt. Nahezu jeder Autor verwendete andere diagnostische Kriterien und Normierungen. Daher ist auch verständlich, dass die Ergebnisse kaum miteinander vergleichbar sind.

Eine in der eigenen Arbeitsgruppe entwickelte Definition der „ASS-Resistenz“ schlug eine differenzierte Typisierung anhand der Aggregation und thrombozytären Thromboxansynthese in PRP vor [Weber et al., 2002]. Nach dieser Definition wird die ASS-Nonresponse in drei Untergruppen unterteilt:

- **Typ I** (pharmakokinetischer Typ): 100 mg ASS p.o. (für mindestens 5 Tage) führt weder zur Hemmung der Aggregation noch zur Reduktion des TXA<sub>2</sub>-Synthese. 100 µM ASS *in vitro* hingegen hemmen die thrombozytäre Aggregation und TX-Synthese vollständig.
- **Typ II** (pharmakodynamischer Typ): 100 mg ASS p.o. (für mindestens 5 Tage) hemmen weder Aggregation noch Thromboxansynthese. Auch 100 µM ASS *in vitro* haben keinen signifikanten Effekt auf die Thrombozytenfunktionen und TX-Synthese.
- **Typ III** („Pseudo-Resistenz“): 100 mg ASS p.o. (für mindestens 5 Tage) führt zur Hemmung der TXA<sub>2</sub>-Synthese. Die Aggregation bleibt jedoch durch perorales sowie durch *in vitro* Gabe von ASS nahezu unbeeinflusst.

Diese Einteilung ist plausibel, da die irreversible Acetylierung der Thrombozytencycloxygenase durch ASS über vermindertes PGG<sub>2</sub> und PGH<sub>2</sub> zur Hemmung der TXA<sub>2</sub>-Synthese führt. Dies ist wahrscheinlich der entscheidende Mechanismus in der Erklärung der antithrombotischen Wirkung von ASS [Vane et al., 1998]. Es überrascht, dass nur wenige Autoren in der Vergangenheit die Thromboxansynthese zur Bewertung der ASS-Nonresponse heranzogen. Letztendlich ist eine einheitliche Interpretation der Literatur nicht möglich, da große Unterschiede hinsichtlich Definition, Messmethodik, ASS-Dosierung, Patientengut und Inzidenz der ASS-Nonresponse bestehen. Die molekularen Ursachen der ASS-Nonresponse sind noch unklar, da keine experimentellen Modelle zur Verfügung stehen.

## 1.6 Koronarchirurgie als „Modell“ der ASS-Nonresponse

Rund 70 % aller Herzoperationen entfallen auf die Chirurgie der Herzkranzgefäße, Tendenz steigend. Die häufigste Indikation für die Durchführung dieses Eingriffes ist die koronare Herzerkrankung mit dem Ziel der Verbesserung der Myokarddurchblutung. Mitte der fünfziger Jahre wurde es mit der Erfindung der Herz-Lungen-Maschine erstmals möglich, längere Operationen am offenen Herzen durchzuführen. Der Einfluss der extrakorporalen Zirkulation (EKZ) wirkt sich jedoch erheblich auf den gesamten Organismus aus und führt zu einer Entzündungsreaktion, einem erhöhten thrombozytären Umsatz und zur Beeinflussung der Thrombozytenfunktion [Lahat et al., 1992; Strüber et al., 1999; Schulze et al., 2000; Casati et al., 2001].

Angesichts der Bestrebungen der modernen Medizin, das Operationstrauma so gering wie möglich zu halten, entwickelte sich die „minimal invasive Chirurgie“. Auf diese Weise kann eine aortokoronare Bypassoperation auch ohne HLM durchgeführt werden. Für diesen so genannten „Off-Pump“-Eingriff wird ein Stabilisator-System zu Hilfe genommen, um das schlagende Herz „stillzuhalten“. Dieses Verfahren der operativen Intervention minimiert im Gegensatz zur konventionellen Methode den postoperativen Blutverlust [Nader et al., 1999] und die inflammatorische Gesamtkörperreaktion [Lahat et al., 1992; Strüber et al., 1999; Schulze et al., 2000].

Der Erfolg einer aortokoronaren Bypassoperation hängt im Wesentlichen von zwei Variablen ab: zum einen von der präoperativen linksventrikulären Funktion und zum anderen von der postoperativen Durchlässigkeit der transplantierten Gefäße. Trotz der Bemühungen, erneuten Verschlüssen vorzubeugen, steigt die Verschlussrate postoperativ an. So sind im ersten Jahr noch 80 %, nach 5 Jahren noch etwa 75 % und nach 10-15 Jahren nur noch schätzungsweise 50 % der Bypässe durchgängig. Dementsprechend hoch ist die Rate an erneuten aortokoronaren Eingriffen. So wird eine wiederholte Operationen bei etwa 10 % aller Bypasspatienten innerhalb der ersten 10 Jahre notwendig [Fitzgibbon et al., 1996; Weintraub et al., 1994].

Anhand pathophysiologischer Kriterien werden unterschiedliche Ursachen für Bypassverschlüsse nach ACB-Operation diskutiert. Dabei werden insbesondere thromboembolische Frühverschlüsse (innerhalb des ersten Monats) von atherosklerotisch bedingten Spätverschlüssen abgegrenzt. Die frühen thrombotischen Transplantatverschlüsse entstehen durch eine Kombination aus Veränderungen des Gefäßendothels, der Blutzusammensetzung und des -flusses (Virchow'sche Trias). Jede Gefäßpräparation verursacht lokale endotheliale und mediale Läsionen. Diese Schädigung hat eine Ablagerung von Blutplättchen und neutrophilen Granulozyten ebenso wie eine Aktivierung der extrinsischen Gerinnungskaskade durch freigesetzten Gewebefaktor zur Folge. Die Freisetzung des gerinnungsfördernden Gewebefaktors wird durch Ausschüttung inflammatorischer Zytokine zusätzlich gesteigert. Gleichzeitig sind fibrinolytische und gerinnungshemmende Mechanismen in ihrer Aktivität eingeschränkt [Motwani und Topol, 1998]. All diese Veränderungen haben eine Thrombozytenaktivierung zur Folge, die durch Scherstress des Blutes im Transplantat und die intraoperative Hypothermie noch verstärkt werden. Auch die Freisetzung von Katecholaminen und Zytokinen sowie eine Aktivierung des Komplementsystems bewirken eine gesteigerte Plättchenaktivierung [Moake et al., 1988; Wildhirt et al., 2001; Strüber et al., 1999; Wiedmer et al., 1991]. Ein zusätzlicher Faktor für die Entstehung eines thrombotischen Verschlusses ist die hohe Sensitivität der implantierten Gefäße gegenüber Vasokonstriktoren [Motwani und Topol, 1998].

Im Rahmen früher thromboembolischer Transplantatverschlüsse spielen die thrombozytären Aktivierungswege also eine entscheidende Rolle, wohingegen ihr Einfluss für spätere Verschlüsse noch nicht hinreichend geklärt ist. Spätere Verschlüsse beginnen durch intimale

Hyperplasien infolge einer Proliferation von glatten Muskelzellen. Dieser Gewebezugs, der vier bis sechs Wochen nach dem Eingriff beginnt, führt seinerseits zu einer Lumeneinengung von etwa 25 %. Im Verlauf von Jahren nach erfolgter Myokardrevaskularisation schließt sich der intimalen Hyperplasie eine atherosklerotische Wachstumsphase an. Die Ausbildung atherosklerotischer Plaques trägt maßgeblich zur erneuten Stenosenbildung bei und ist nur schwer zu beeinflussen [Motwani und Topol, 1998].

Um einem frühen Verschluss des Transplantates vorzubeugen, ist es daher von besonderer Bedeutung, die thrombozytären Funktionen weitgehend zu unterbinden. Aus diesem Grund wird eine ASS-Therapie bereits am ersten postoperativen Tag eingeleitet. Voruntersuchungen an Patienten nach ACB-Operation belegten jedoch, dass die Thrombozyten von Patienten nach Bypassoperation weniger sensitiv gegenüber ASS sind [Zimmermann et al., 2001]. Auch eine Metaanalyse der Antithrombotic Trialists' Collaboration zeigte, dass CABG-Patienten nicht signifikant von ASS im Hinblick auf eine Verbesserung der Prognose profitieren [Antithrombotic Trialists' Collaboration, 2002].

Durch die hohe Inzidenz an ASS-Nonrespondern in der Bypasschirurgie (Tabelle 1) scheint diese Patientenpopulation demnach sehr geeignet, um die ASS-Nonresponse näher zu untersuchen. Darüber hinaus erleichtert die hohe Anzahl von ACB-Operationen die Patientenrekrutierung. Die Entwicklung von Konzepten, die einen Wirkverlust von ASS erklären und Ansätze zu deren Überwindung liefern können, sind daher von besonderem Interesse, da ASS-Nonresponse mit einer weniger günstigen kardiovaskulären Prognose verbunden ist und gehäuft Komplikationen auftreten [Gum et al., 2003; Poston et al., 2006]. Daher dient die Bypasschirurgie in der vorliegenden Arbeit als „Modell“ für die Untersuchung der ASS-Nonresponse.

## 1.7 Fragestellungen

ASS wird routinemäßig in der Prävention thromboembolischer Ereignisse eingesetzt. Dennoch gibt es zahlreiche Studien, die über eine verminderte antithrombozytäre Wirksamkeit berichten. Diese eingeschränkte ASS-Wirkung hat jedoch nachteilige Folgen in Bezug auf die kardiovaskuläre Prognose [Gum et al., 2003; Poston et al., 2006].

In der vorliegenden Arbeit soll die nach Koronarbypass-Operation herabgesetzte Sensitivität von Thrombozyten gegenüber ASS als „Modell“ der ASS-Nonresponse verwendet werden um folgende Fragen zu klären:

- Ist bei ACB-Patienten eine ASS-Nonresponse für verschiedene Thrombozytenfunktionen (TX-Synthese, Aggregation, Sekretion) nachweisbar?
- Gibt es Unterschiede in der Hemmbarkeit der Thrombozyten durch ASS *in vivo* und *in vitro*?
- Könnte ein erhöhter Anteil der induzierbaren COX-Isoform (COX-2) an der COX-Aktivität von Thrombozyten Ursache für ein vermindertes Ansprechen auf ASS sein?
- Gibt es Unterschiede hinsichtlich der angewendeten Operationsmethode (mit bzw. ohne HLM) für das Auftreten einer ASS-Nonresponse?
- Besteht postoperativ eine erhöhte Sensitivität gegenüber dem endogen gebildeten Thromboxan?
- Könnte eine verlängerte Exposition ASS-„resistenter“ Thrombozyten mit ASS oder eine gesteigerte ASS-Konzentration die antithrombozytäre Wirkung wiederherstellen und zu einer ausreichenden Hemmung von TXA<sub>2</sub>-Synthese und Thrombozytenfunktion führen?

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Untersuchungspläne

#### Patienten

Die vorliegende Arbeit wurde in Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki durchgeführt und durch die Ethikkommission der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf positiv begutachtet. Alle Patienten wurden über Methoden und Fragestellung der Studie aufgeklärt und gaben ihr schriftliches Einverständnis zur Teilnahme.

An der Untersuchung nahmen insgesamt 52 Patienten mit einer stabilen koronaren Herzkrankheit teil, die sich einer elektiven aortokoronaren Bypassoperation unterzogen. Unter diesen 52 Untersuchungsteilnehmern befand sich lediglich eine Patientin. Das durchschnittliche Alter der Patienten lag bei  $63 \pm 8$  Jahren. Die Art der Bypassoperationen ließ eine weitere Unterteilung der Patientengruppe zu. 11 Operationen wurden „Off-Pump“, d.h. ohne Einsatz der Herz-Lungen-Maschine, durchgeführt. Die übrigen 41 Patienten wurden unter Anwendung extrakorporaler Zirkulation mittels HLM operiert.

#### Behandlung

Spätestens 7 Tage vor dem chirurgischen Eingriff wurde eine etwaige Vorbehandlung mit ASS pausiert und beginnend am ersten postoperativen Tag (ASS Protect®, Bayer, 100 mg per os) fortgeführt. Routinemäßig wurden Heparin (3 x 7500 IE) subcutan zur Thrombose-, Famotidin (40 mg) p.o. zur Ulkusprophylaxe und bei Bedarf Metamizol zur postoperativen Analgesie verabreicht. Nach Bedarf wurden Diuretika eingesetzt. Bei allen Patienten verlief der prä-, intra- und postoperative Verlauf komplikationslos. Kein Studienteilnehmer erhielt eine Transfusion von Blut oder Blutprodukten.

#### Versuchsprotokolle

Die vorliegende Arbeit ist in drei methodisch abgegrenzte Bereiche unterteilt:

1. *In vitro*-Messungen der Arachidonsäure- und Kollagen-induzierten thrombozytären Thromboxansynthese, Aggregation und ATP-Sekretion bei unterschiedlichen ASS Konzentrationen.
2. Nachweis der Cyclooxygenase-2 (COX-2) in gewaschenen Thrombozyten mittels Western-Blot.
3. Zeitkinetik der Hemmung von TXA<sub>2</sub>, Aggregation und ATP-Sekretion durch ASS in unterschiedlichen Konzentrationen.

## **2.2 Material**

### **2.2.1 Blutentnahme**

Die Blutentnahme wurde in der Chirurgischen Klinik und Poliklinik der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf vorgenommen. Den Patienten wurden nach Information und schriftlichem Einverständnis 20 ml venöses Vollblut, jeweils am morgen der Operation, des ersten und fünften postoperativen Tages entnommen. Die Blutentnahme erfolgte vor Einnahme der Medikamente. Das Vollblut wurde in Vacutainer® (BD Vacutainer® Systems, Plymouth, UK) aufgenommen, welche zur Antikoagulation eine (1:10) Zitratvorlage (Na-Zitrat 129 mM) enthielten. Sofort nach der Entnahme wurde das Blut in das Labor des Institutes für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf transportiert und weiterverarbeitet. Sofern eine Probenentnahme am 5. postoperativen Tag nicht möglich war, erlaubte das Versuchsprotokoll deren Entnahme am 4. bzw. 6. postoperativen Tag.

### **2.2.2 Plasmagewinnung**

Das Zitratblut wurde in Vacutainern für 10 Minuten bei Raumtemperatur (RT) und 1000 U/min zentrifugiert (Minifuge GL, Heraeus Christ, Osterode, Deutschland), das plättchenreiche Plasma (PRP) abgehoben und in ein Polystyrolröhrchen (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland) überführt. Aus dem verbleibenden Zitratvollblut wurde durch Zentrifugieren (5 Minuten bei 15000 U/min, Biofuge 15, Heraeus Christ, Osterode, Deutschland) plättchenarmes Plasma (PAP) hergestellt.

### **2.2.3 Präparation von gewaschenen Thrombozytenpellets für die Western-Blot-Analyse**

Für die Herstellung von Thrombozytenpellets wurde zunächst plättchenreiches Plasma in Portionen zu je 1,5 ml aufgeteilt, mit 20 % ACD (Zitronensäure-Zitrat-Dextrose) versetzt und für 35 Sekunden mit 6000 U/min bei RT (Biofuge 15, Heraeus Christ, Osterode, Deutschland) zentrifugiert. Das im Überstand verbliebene Plasma wurde abgenommen und verworfen. Ein Thrombozytenpellet wurde in 1 ml Thrombozytenwaschpuffer vorsichtig resuspendiert und je zwei zusammengeführt. Die Proben wurden erneut wie oben beschrieben zentrifugiert und der überstehende Waschpuffer abgehoben. Ein zweiter Waschgang folgte. Nach erneutem Abheben des Überstandes wurde das Thrombozytenpellet für die Western-Blot Untersuchungen mittels Flüssigstickstoff eingefroren.

## 2.2.4 Substanzen und Lösungen

### Substanzen und Bezugsquellen:

Aspisol® (Acetylsalicylsäure), Lysinsalz als Lyophilisat	Bayer, Leverkusen, Deutschland
Arachidonsäure (20:4, n-6)	Oxford Biomedical Research, Oxford, Michigan, USA
Anti-Rabbit IgG	Santa Cruz, Biotechnology, Heidelberg, Deutschland
Albumin, bovine	Sigma, Steinheim, Deutschland
APS (Ammonium Persulfat)	Sigma, Steinheim, Deutschland
ATP-Biolumineszenz Assay Kit CLS II	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
COX-2 (human) polyklonaler Antikörper	Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA
DC Protein Assay	Bio Rad, München, Deutschland
ECL +	Amersham Pharmacia Biotech, England
Entwickler	Kodak GBX developer and replenisher, New York, USA
Fixierer	Kodak GBX fixer and replenisher, New York, USA
Indometazin	Luitpolt, München, Deutschland
Kollagen	Horm, Nycomed, München, Deutschland
Precision Plus Protein™ Standards	Bio Rad, München, Deutschland
Rotiphorese Gel 30	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe, Deutschland
SDS (Sodium dodecyl sulfate)	Sigma, Steinheim, Deutschland
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine)	Sigma, Steinheim, Deutschland
Tris	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe, Deutschland
TXB <sub>2</sub> -Antikörper	laboreigener spezifischer AK (γ-Globulin, polyklonaler Kaninchen-AK) hergestellt nach Schrör und Seidel, 1988
[ <sup>3</sup> H] TXB <sub>2</sub> (radioaktiver Tracer)	Gesamtradioaktivität: 11,84 kBq; Amersham Bioscience, Freiburg
Tween 20	Sigma, Steinheim, Deutschland

Weitere, hier nicht aufgeführte Standardchemikalien wurden von Sigma (Steinheim, Deutschland), Merck (Darmstadt, Deutschland) oder Boehringer-Mannheim (Mannheim, Deutschland) bezogen.

### **Lösungen:**

ACD: 74,8 mM Trinatriumcitrat, 65 mM Zitronensäure x H<sub>2</sub>O, 111 mM Glukose x H<sub>2</sub>O ad 100 ml A. dest.

Alkoholische NaOH: 100 mM NaOH in Ethanol

Arachidonsäure: Stammlösung: 100 mM in Ethanol; Gebrauchslösung: 100 µl Stammlösung + 300 µl alkoholische NaOH, getrocknet unter N<sub>2</sub>. Am Versuchstag wurde die Gebrauchslösung in 200 µl Tris-Puffer aufgenommen.

Blot-Puffer: 25 mM Tris-HCl, 200 mM Glycin, 20 Vol. % Methanol

EDTA: 77 mM Na-EDTA

Elektrophorese-Puffer: 25 mM Tris-HCl, 250 mM Glycin, 0,1 % SDS

Indometazinlösung: 50 mM in EtOH abs.

4 x Laemmli: 0,25 M Na-PO<sub>4</sub>-Puffer, 10 % Glycerin, 2 % SDS, 0,002 % Bromphenolblau, 5 % Mercaptoethanol

RIA-Puffer (pH 7,4): 150 mM NaCl, 8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O, 1,5 mM Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O

RIPA: 150 mM NaCl, 1 % NP40 (IGEPAL CA-630, Sigma, Steinheim, Deutschland), 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 0,5 % DOC (Deoxycholin Säure, Natriumsalz), 0,1 % SDS

RIPA+: RIPA plus 10 µl Protease-Inhibitoren-Cocktail (Nr. P8340, Sigma, Steinheim, Deutschland, lösen in 1 ml DMSO) pro 1 ml RIPA und 10 µl einer gesättigten PMSF/ EtOH-Lösung

TBS (10 x; pH 8,0): 1 M Tris-HCl, 15 M NaCl

TBSM: 1 x TBS, 5 % Milchpulver

TBST: 1 x TBS, 0,05 % Tween 20

TBSTM: 1 x TBST, 5 % Milchpulver

Thrombozytenwaschpuffer: 113 mM NaCl, 4 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O, 24 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O, 4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

TM-Puffer (pH 7,4): 134 mM NaCl, 12 mM NaHCO<sub>3</sub>, 2,9 mM KCl, 0,36 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O, 1 mM MgCl<sub>2</sub> x 6H<sub>2</sub>O, 5 mM HEPES

Tris-Puffer (pH 7,4): 50 mM Tris-HCl

## 2.3 Methoden

### 2.3.1 Thrombozytenfunktionsmessungen

#### 2.3.1.1 Aggregometrie

##### Prinzip der Aggregometrie

Zur Messung der Thrombozytenfunktion diente die Bestimmung der Plättchenaggregation durch das turbidimetrische Verfahren nach Born. Das Prinzip dieser Methode beruht auf der Messung der Änderung der optischen Dichte einer Thrombozytensuspension. Verwendet wird plättchenreiches Zitratplasma, welches durch einen Magnetrührer bei 1000 U/min und 37°C in einer Küvette in Bewegung gehalten wird. Durch Zugabe eines Plättchenagonisten in die mit PRP gefüllte Küvette bilden sich Thrombozytenaggregate, die zu einer gesteigerten Lichttransmission führen. Dieser Vorgang wird fortlaufend photometrisch gemessen. Der Grad der Trübungsänderung als Funktion der Zeit dient als Maß der Aggregationsfähigkeit der Thrombozyten und wird in Form einer Aggregationskurve aufgezeichnet.

Zur Anwendung kam ein Zweikanalaggregometer (Labor APACT, Labor Biomedical Technologies, Ahrensburg, Deutschland) mit Mikroküvetten inklusive Mixer (Dispo-System Micro 1.5, Labor Biomedical Technologies, Ahrensburg, Deutschland), welches an einen Schreiber (Packard model 621, Zaventem, Belgien) angeschlossen wurde. Der Papiervorschub betrug 3 cm/min. Zu Anfang jeder Messreihe wurden die maximale und die basale Transmission als Referenzwert festgelegt. Dafür wurde das Aggregometer mit PRP für den Nullwert und mit PAP für den Wert der maximalen Transmission geeicht. Diese Normung des Gerätes wurde vor jeder Messreihe durchgeführt.

##### Arachidonsäure- und Kollagen-induzierte Aggregation

Die Aggregationsversuche wurden mit einem Probevolumen von 500 µl durchgeführt. Hierzu wurden 400 µl PRP mit 100 µl TM-Puffer oder ASS in den Endkonzentrationen von 30 und 100 µM versetzt, in einem Heizblock bei 37°C für 4 Minuten inkubiert und für weitere 2 Minuten im Lichtkanal des Aggregometers gerührt (1000 U/min, 37°C). *In vitro* wurde ASS als wasserlösliches Lysinsalz verwendet (Aspisol®, Bayer). Nach 6 Minuten wurde die Aggregation mittels 1 mM Arachidonsäure oder 10 µg/ml Kollagen (jeweils Endkonzentrationen) gestartet und über 4 Minuten aufgezeichnet. Die Aggregationsversuche mit Kollagen dienten als Positivkontrolle, um die Aggregationsfähigkeit der Thrombozyten unabhängig von der TX-Synthese zu verifizieren. Mit 0,4 mM Indometazinlösung und 4,5 mM EDTA (Endkonzentrationen) wurde die Aggregation gestoppt.

##### Messung der zeitabhängigen Hemmung der Plättchenfunktion durch ASS

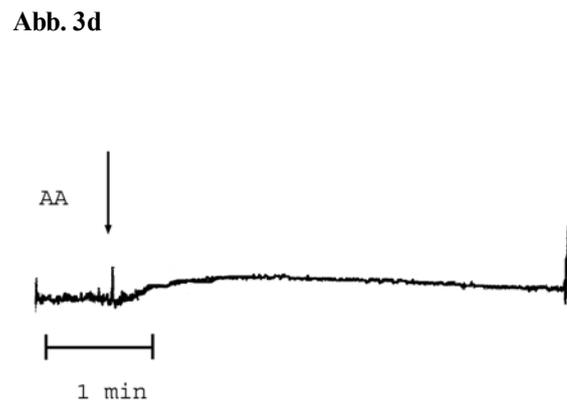
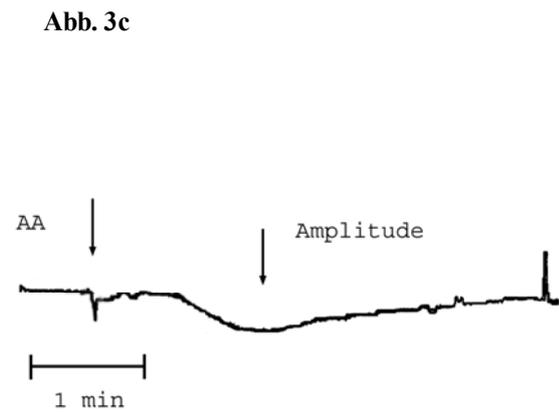
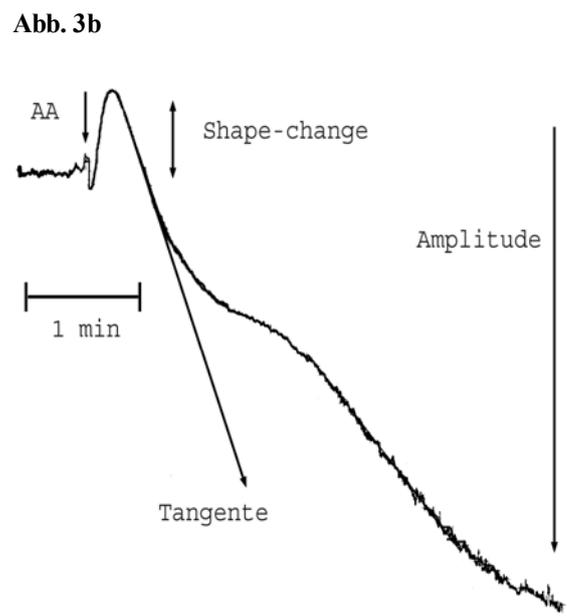
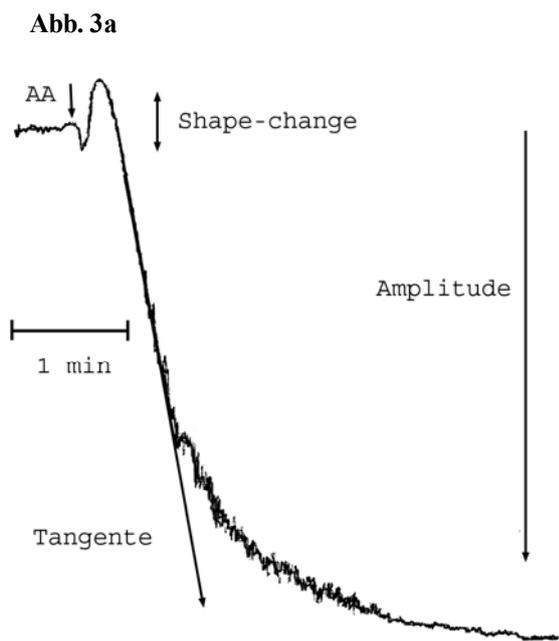
Für die Messung der zeitabhängigen Hemmung der Thrombozytenfunktion durch ASS wurden ebenfalls Probevolumina von 500 µl gewählt. 400 µl PRP wurden dabei mit 100 µl einer 5 bzw. 10 µM ASS-Lösung (jeweils Endkonzentrationen) versetzt und im Heizblock bei 37°C inkubiert. Diese Konzentrationen werden nach oraler ASS Einnahme im Plasma ( $c_{max}$ ) erreicht [Benedek et al., 1995]. Im Unterschied zu der oben beschriebenen Aggregationmessung wurden für die Bestimmung der zeitabhängigen Hemmung der Thrombozytenfunktion durch ASS die Inkubationszeiten der Ansätze verlängert. Die erste Messung der Plättchenaggregation in Gegenwart von 5 bzw. 10 µM ASS wurde nach einer

Inkubationszeit von 15 Minuten durchgeführt. Weitere Messungen folgten nach 30, 45 und 60 Minuten Inkubation. Nach der jeweiligen Inkubationszeit wurden die Proben im Lichtkanal des Aggregometers für 2 Minuten gerührt (1000 U/min, 37°C) und anschließend mit 1 mM Arachidonsäure (Endkonzentration) stimuliert. Die Aggregation wurde für 4 Minuten aufgezeichnet und mit 0,4 mM Indometazinlösung und 4,5 mM EDTA (jeweils Endkonzentrationen) beendet. Zusätzlich wurden die Thrombozyten in einem parallelen Ansatz mit TM-Puffer ohne ASS Zusatz inkubiert, um sicherzustellen, dass die Plättchen über den Zeitraum der Inkubation konstant aktivierbar blieben.

### Auswertung der Aggregationskurven

Die Auswertung der Aggregationskurven erfolgte durch Bestimmung der Tangentensteigung und Amplitude.

Nach Zusatz des Agonisten verändern die Plättchen zunächst ihre Form („shape change“). Diese Formveränderung führt durch Pseudopodienbildung zu einer Oberflächenzunahme der Thrombozyten und dadurch zu einer vorübergehenden Abnahme der Lichttransmission (Abb. 3a und b). Danach fällt die Aggregationskurve steil ab, da sich die Plättchen nun über Fibrinogenbrücken verbinden, was zur Transmissionszunahme führt (Abb. 3a und b). Die Messung der Tangentensteigung erfolgte in [cm/min] im Punkt der maximalen Steigung (Abb. 3). Bei biphasischen Aggregationen erfolgte die Messung der Tangentensteigung ebenfalls im Punkt maximaler Aggregation (Abb. 3b). Die Amplitude [cm] als maximale Transmission konnte bei einer irreversiblen oder biphasischen Aggregation am Ende des Versuches gemessen werden (Abb. 3a und b). Bei einer reversiblen Aggregation erfolgte die Bestimmung der Amplitude im Punkt der höchsten Transmission (Abb. 3c). Eine Aggregation wurde als nicht auslösbar eingestuft, wenn nach Stimulation keine Amplitude messbar war (Abb. 3d).



**Abbildung 3:** Originale Aggregationskurven:

- 3a irreversible Aggregation
- 3b biphasische Aggregation
- 3c reversible Aggregation
- 3d keine Aggregation

### **2.3.1.2 Thromboxansynthese**

Das Plasma wurde im Anschluss an jede durchgeführte Aggregation auf die Thromboxankonzentration untersucht. Dazu wurde das PRP bei 15000 U/min (Biofuge 15, Heraeus Christ, Osterode, Deutschland) und RT für 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand abgehoben und bis zur weiteren Verarbeitung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  verwahrt.

Infolge der kurzen HWZ von  $\text{TXA}_2$  (wenige Minuten) wurde dessen stabiler Metabolit,  $\text{TXB}_2$ , mittels Radioimmunoassay (RIA) bestimmt. Der RIA arbeitet nach dem Prinzip der kompetitiven Proteinbindungsanalyse, wobei ein spezieller Antikörper Proteine bindet. Die angewendete Methode [Schrör und Seidel, 1988] basiert darauf, dass eine bekannte Menge radioaktiv markierten Antigens mit dem zu messenden Antigen und einer bekannten Menge des laboreigenen Antikörpers (vgl. 2.2.4) inkubiert wird. Die Antigene konkurrieren um die freien Bindungsstellen des Antikörpers und es stellt sich entsprechend der Konzentrationsverhältnisse ein Gleichgewicht ein. Das freie markierte Antigen wird mittels Kohle-Extraktion aus der Probe entfernt, während die Antigen-Antikörper-Komplexe im Überstand verbleiben. Die Radioaktivität wird gemessen und anhand von Eichkurven mit bekannten Konzentrationen  $\text{TXB}_2$  die Konzentration in der Probe quantifiziert.

### **2.3.1.3 ATP-Sekretion**

Dichte Granula der Thrombozyten enthalten unter anderem Adenosintriphosphat (ATP), welches während einer Aktivierung und Aggregation freigesetzt wird (vgl. 1.1). Durch den Nachweis dieser Substanz kann die Freisetzungreaktion der Plättchen charakterisiert werden. Die ATP-Sekretion wird mittels Lumineszenz gemessen, die durch eine Reaktion von ATP mit einem Luciferin-Luciferase-Reagenz erzeugt wird. Dabei kommt es zur Emission von Photonen. Die Intensität des emittierten Lichtes ist proportional zur ATP-Konzentration und als Lichtsignal messbar. Um die freigesetzte Menge an ATP quantifizieren zu können, wurde eine Eichkurve mit ATP mitgeführt.

Zunächst wurde am Tag der Messung eine Lumineszenz-Kontrolle mit ATP durchgeführt. Dafür wurden 100  $\mu\text{l}$  ATP (ATP Bioluminescence Assay Kit CLS II) mit 100  $\mu\text{l}$  ATP in den Konzentrationen von 0,1 und 1,0  $\mu\text{M}$  versetzt und im vorgewärmten Messkanal des Luminometers (Luminometer-Analyser, Packard, Zaventem, Belgien) die Lichtsignale registriert. Danach wurde der Leerwert (blank) bestimmt. Hierzu wurden 100  $\mu\text{l}$  TM-Puffer mit 400  $\mu\text{l}$  PRP für 4 Minuten bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert und 3 Minuten gerührt. 100  $\mu\text{l}$  des PRP-Gemisches wurden anschließend mit 100  $\mu\text{l}$  Lumineszenz-Reagenz versetzt, kurz durchmischt und im Luminometer gemessen. Messungen mit Thrombozyten wurden in Anlehnung an das Protokoll für die Arachidonsäure- und Kollagen-induzierte Aggregation durchgeführt. Dazu wurden 100  $\mu\text{l}$  TM-Puffer bzw. ASS in den Endkonzentrationen von 30 und 100  $\mu\text{M}$  mit jeweils 400  $\mu\text{l}$  PRP für 4 Minuten bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert und 2 Minuten im Lichtkanal gerührt. Die Aggregation wurde mit Arachidonsäure (1 mM; Endkonzentration) gestartet. Nach einminütiger Aggregation wurden 100  $\mu\text{l}$  Überstand abgehoben, mit 100  $\mu\text{l}$  Lumineszenz-Reagenz vermischt und im Luminometer als Lichtemission registriert. Die ATP-Sekretion wurde ebenfalls im Rahmen der zeitkinetischen Messungen untersucht und die Inkubationszeiten entsprechend variiert (vgl. 2.3.1.1).

### **2.3.2 Thrombozytenzahlen**

Die Ermittlung der Thrombozytenzahlen wurde im klinischen Routinelabor mittels automatischer Zählung durchgeführt.

### **2.3.3 Western-Blot-Analyse**

#### **2.3.3.1 Probenherstellung**

Für den immunologischen Proteinnachweis mittels Western-Blot war bei 17 der untersuchten Patienten ausreichend Probenmaterial verfügbar. Die gewaschenen und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagerten Thrombozytenpellets wurden aufgetaut, in  $50\ \mu\text{l}$  RIPA+ resuspendiert und die Thrombozytenmembranen mit Ultraschall dispergiert (Branson Sonifier Cell Disruptor B15). Anschließend wurden die Proben 3 Minuten bei  $95^{\circ}\text{C}$  erhitzt und eine Minute bei  $4^{\circ}\text{C}$  und  $10000\ \text{U}/\text{min}$  (Hettich Zentrifuge, EBA 12, Tuttlingen, Deutschland) zentrifugiert. Aus dem Überstand wurden kleine Mengen für die Proteinbestimmung entnommen und der verbleibende Überstand bei  $-80^{\circ}\text{C}$  tiefgefroren. Zur elektrophoretischen Trennung (vgl. 2.3.3.3) wurden Aliquots ( $20\ \mu\text{g}$  Protein) des Überstandes mit  $3\ \mu\text{l}$  4x Laemmli Puffer und RIPA versetzt, bis  $95^{\circ}\text{C}$  erhitzt, anschließend mit Eis gekühlt und bei  $15000\ \text{U}/\text{min}$  (Biofuge 15, Heraeus Christ, Osterode, Deutschland) 5 Minuten zentrifugiert.

#### **2.3.3.2 Quantitative Proteinbestimmung**

Die Bestimmung der Proteinkonzentration für die Western-Blot-Analyse erfolgte nach der Methode von Lowry mit dem DC Protein Assay nach den Empfehlungen des Herstellers (Bio Rad, München, Deutschland). Als Eichstandard diente Rinderserumalbumin. Die Proben ebenso wie die Eichreihe wurden nach einer Inkubationszeit von 20 Minuten bei einer Wellenlänge von  $750\ \text{nm}$  photometrisch (LKB Biochrom, Ultraspec II) gemessen und die Proteinkonzentrationen anhand einer Eichgerade ermittelt.

#### **2.3.3.3 Elektrophorese**

Die Auftrennung der Proteine nach dem Molekulargewicht erfolgte mit einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE). Es wurde ein 10 %-iges Trenngel (Aqua dest., 10 % Acrylamid,  $1,5\ \text{M}$  Tris (pH 8.8), 0,1 % SDS, 0,1 % APS, 0,05 % TEMED) und ein 4 %-iges Sammelgel (Aqua dest., 4 % Acrylamid,  $1,0\ \text{M}$  Tris (pH 6.8), 0,1 % SDS, 0,1 % APS, 0,05 % TEMED) verwendet. In die Kammern wurden neben einem Marker (Precision Plus Protein™ Standards, All Blue, Bio-Rad, München, Deutschland) und einem Standard (COX-2 aus Fibroblasten) je  $20\ \mu\text{g}$  Protein aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte in Elektrophorese-Puffer bei  $200\ \text{V}$  und  $500\ \text{mA}$  in einer Elektrophoresekammer für 30 bis 60 Minuten (Bio-Rad, München, Deutschland).

#### **2.3.3.4 COX-2 Immundetektion**

Zum immunologischen Nachweis der COX-2 wurden die Proteine nach der Elektrophorese auf eine PVDF (Polyvinylidendifluorid)-Membran (Immobilon-P, Millipore Inc., Bedford, MA, USA) transferiert. Die mit Methanol aktivierte PVDF-Membran wurde zunächst in Blot-Puffer inkubiert. Der einstündige Transfer auf die PVDF-Membran wurde in einer Wetblotkammer (Transblot, Bio-Rad, München, Deutschland) mit Blot-Puffer bei  $100\ \text{V}$  und  $500\ \text{mA}$  durchgeführt. Nach erfolgtem Transfer auf die Membran wurden die unspezifischen Bindungsstellen der Membran mit TBSP geblockt. Danach wurde die Membran mit polyklonalen COX-2 Antikörpern ( $1/1000$ ; vgl. 2.2.4) über Nacht bei  $4^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Nach der Antikörperinkubation wurde die Membran mehrmals mit TBS ( $3 \times 10$  Sekunden,  $2 \times 5$  und

3 x10 Minuten) gewaschen und wiederum mit TBSTM die unspezifischen Bindungsstellen geblockt. Für die Detektion wurde die Membran mit einem Peroxidase-gekoppelten polyklonalen Zweitantikörper (Anti-Rabbit IgG, 1/10000 vgl. 2.2.4) inkubiert und anschließend erneut, wie oben beschrieben, gewaschen.

Die Proteinsignale wurden mit Chemilumineszenz (ECL +, Amersham Pharmacia Biotech, England) detektiert, indem die aus der peroxidasevermittelten Oxidation von Luminol resultierende Lichtemission dazu genutzt wurde, einen Röntgenfilm (Hyperfilm ECL, Amersham, Buckinghamshire, England) zu belichten. Die Identifizierung fand anhand des Vergleiches mit dem COX-2 Standard auf dem Röntgenfilm statt. Die Auswertung der COX-2 Expression erfolgte semiquantitativ anhand der Intensität bzw. Intensitätsänderungen der Signale bezüglich des präoperativen Ausgangssignals. Darüber hinaus erfolgte eine Zuordnung hinsichtlich der Hemmbarkeit der Thrombozyten durch ASS in ASS-Responder bzw. ASS-Nonresponder. Ein Patient wurde als ASS-Responder identifiziert, wenn die Inhibition der Thromboxansynthese  $> 90\%$  bei  $100\ \mu\text{M}$  ASS *in vitro* betrug. Umgekehrt wurde ein Patient als ASS-Nonresponder eingestuft, dessen thrombozytäre Thromboxansynthese durch  $100\ \mu\text{M}$  ASS *in vitro*  $< 90\%$  gehemmt wurde.

### 2.3.4 Statistik

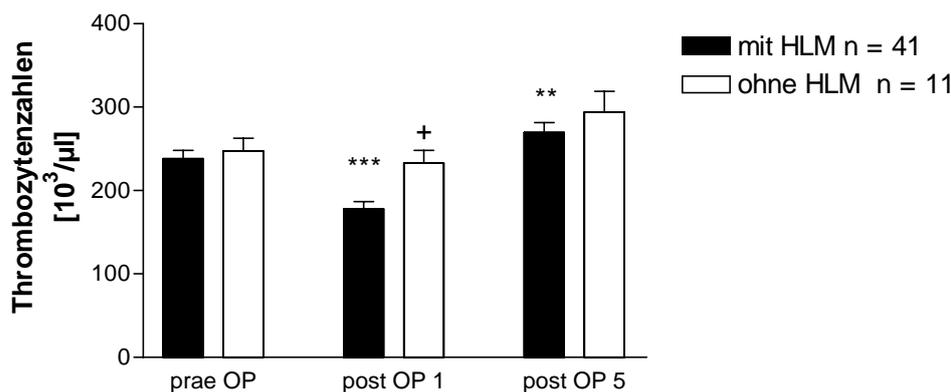
Die Daten wurden jeweils als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung des Mittelwertes (SEM) von n Versuchen angegeben. Prozentangaben beziehen sich immer auf dasselbe Individuum. Vergleiche zwischen mehreren Parametern wurden hinsichtlich ihrer statistischen Signifikanz mit der einfaktoriellen Varianzanalyse für gepaarte Messwerte (ANOVA), gefolgt von einem Tukey-post-hoc-Test, durchgeführt. Die Untersuchung zweier Parameter hinsichtlich statistischer Unterschiede wurde, falls nicht anders erwähnt, mit dem Student t-Test durchgeführt. Unterschiede zwischen Versuchsgruppen wurden als statistisch signifikant angesehen, wenn  $p < 0,05$  war.

### 3 Ergebnisse

Insgesamt erhielten 41 Patienten einen aortokoronaren Bypass mit und 11 weitere einen Bypass ohne Anwendung extrakorporaler Zirkulation. Kriterien für die Entscheidung, ob mit oder ohne HLM operiert wurde, waren die anatomische Lokalisation und die Anzahl der erforderlichen Anastomosen.

#### 3.1 Thrombozytenzahlen

Vor dem operativen Eingriff waren anhand der Plättchenzahlen erwartungsgemäß keine Unterschiede zwischen beiden Gruppen (mit oder ohne HLM) feststellbar. Am ersten postoperativen Tag nach OPCAB (ACB-Operation ohne HLM) blieben die Thrombozytenzahlen mit  $95 \pm 5 \%$  weitgehend konstant. Lediglich am fünften Tag zeigte sich tendenziell ein Anstieg der Thrombozytenzahlen ( $22 \pm 13 \%$ ), was sich statistisch jedoch als nicht signifikant erwies. Im Gegensatz hierzu wurden in der Gruppe mit HLM erhebliche Unterschiede, wie in Abbildung 4 dargestellt, deutlich. Vergleiche mit dem präoperativen Ausgangswert zeigten eine signifikante Abnahme der Thrombozytenzahlen um  $25 \pm 2 \%$  ( $p < 0,001$ ) am ersten und einen Anstieg bis zum fünften postoperativen Tag ( $p < 0,01$ ). Signifikante Unterschiede zwischen OPCAB und ACB-Operation mit HLM hinsichtlich der Thrombozytenzahlen konnten nur am ersten postoperativen Tag dokumentiert werden. Dabei lag die Plättchenzahl nach OPCAB signifikant über der nach aortokoronarem Bypass mit HLM (Abb. 4).



**Abbildung 4:** Thrombozytenzahlen bei Patienten, die mit Herz-Lungen-Maschine (HLM) operiert wurden im Vergleich zu den Patienten, die ohne HLM operiert wurden.

\*\*  $p < 0,01$  vs. prae OP

\*\*\*  $p < 0,001$  vs. prae OP

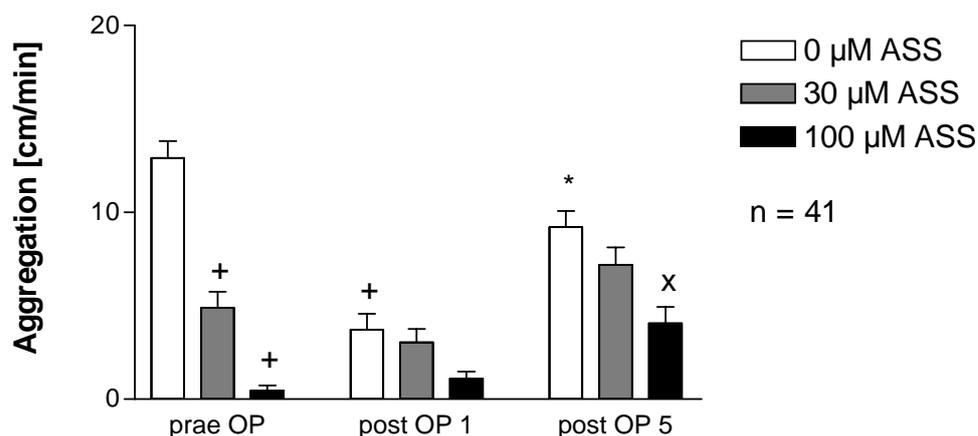
+  $p = 0,0055$  vs. post OP 1 mit HLM

### 3.2. Arachidonsäure-induzierte thrombozytäre Aggregation

#### 3.2.1 Untersuchungen an Patienten mit Herz-Lungen-Maschine

Ohne Zusatz von ASS führte die Zugabe von Arachidonsäure (1 mM) zum PRP aller Patienten präoperativ zu einer ausgeprägten Aggregation (Abb. 5). Am ersten postoperativen Tag war die thrombozytäre Aktivität deutlich vermindert und die Aggregationsfähigkeit sank gegenüber dem präoperativen Kontrollwert signifikant ( $p < 0,001$ ) auf  $31 \pm 7$  %. Die interindividuelle Variation war am ersten und fünften postoperativen Tag hoch, so dass in Einzelfällen auch eine Zunahme der Aggregation beobachtet werden konnte. Anders als erwartet, nahm die thrombozytäre Aggregation unter oraler ASS-Therapie zwischen Tag 1 und 5 postoperativ zu (Abb. 5). So erreichte sie am fünften postoperativen Tag  $71 \pm 13$  % des präoperativen Wertes (ohne ASS) und lag signifikant über der Aggregation des ersten postoperativen Tages ( $p < 0,001$ ), obwohl zu diesem Zeitpunkt die Medikation mit ASS (100 mg/d) bereits vier Tage bestand. Dennoch hemmte ASS die thrombozytäre Aggregation am fünften postoperativen Tag signifikant ( $p < 0,01$ ; Abb. 5).

Weitere Aggregationsmessungen wurden in Gegenwart von ASS (30  $\mu$ M bzw. 100  $\mu$ M) *in vitro* durchgeführt (Abb. 5). Vor dem operativen Eingriff führte die *in vitro* Zugabe von 30 bzw. 100  $\mu$ M ASS zu einer signifikanten Hemmung der Aggregation auf  $33 \pm 5$  % bzw.  $3 \pm 2$  % des präoperativen Kontrollwertes ( $p < 0,001$ ). Am ersten postoperativen Tag war die Hemmung der thrombozytären Aggregation durch ASS *in vitro* deutlich geringer als präoperativ. ASS reduzierte die Aggregation lediglich auf  $84 \pm 8$  % (30  $\mu$ M ASS) bzw.  $37 \pm 7$  % (100  $\mu$ M ASS). Am fünften postoperativen Tag hemmte ASS *in vitro* die Aggregation auf  $75 \pm 7$  % (30  $\mu$ M ASS) bzw.  $41 \pm 7$  % (100  $\mu$ M ASS). Dabei reduzierte 100  $\mu$ M ASS *in vitro* die Aggregation am fünften postoperativen Tag signifikant geringer als präoperativ (Abb. 5).



**Abbildung 5:** Arachidonsäure-induzierte (1mM) Thrombozytenaggregation in PRP von Patienten mit extrakorporaler Zirkulation (HLM) vor koronarer Bypassoperation und an den postoperativen Tagen 1 und 5 in Gegenwart von ASS (0, 30, 100  $\mu$ M) *in vitro*. Die Aggregation wurde aus der maximalen Steigung der Aggregationskurve ermittelt.

\*  $p < 0,01$  vs. 0  $\mu$ M ASS prae OP

x  $p < 0,001$  vs. 0  $\mu$ M ASS post OP 5

+  $p < 0,001$  vs. 0  $\mu$ M ASS prae OP

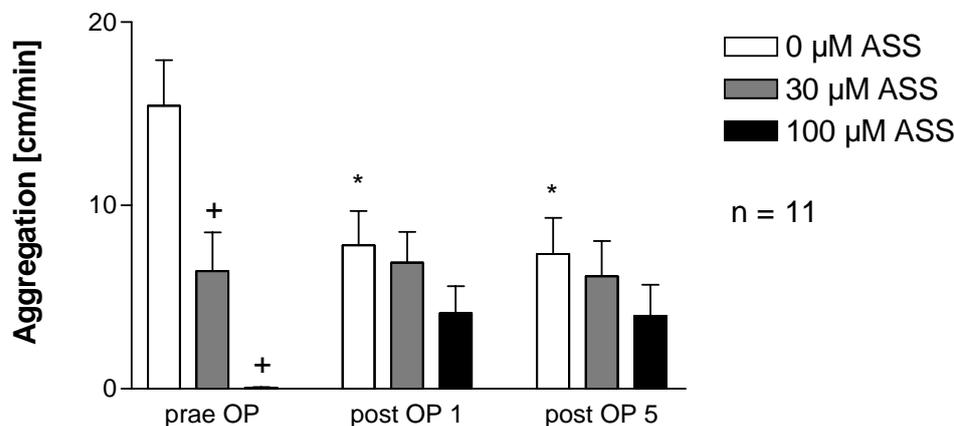
&  $p < 0,001$  vs. 0  $\mu$ M ASS post OP 1

&  $p < 0,01$  vs. 100  $\mu$ M ASS prae OP

### 3.2.2 Untersuchungen an Patienten ohne Herz-Lungen-Maschine

In Abbildung 6 ist die Aggregation nach Arachidonsäure-Stimulation (1 mM) bei Thrombozyten von OPCAB-Patienten dargestellt. Präoperativ war bei allen Patienten eine Thrombozytenaggregation ohne Zusatz von ASS auslösbar. Am ersten postoperativen Tag fiel – ähnlich der thrombozytären Aggregation bei ACB-Patienten mit HLM – eine insgesamt verminderte Aggregation auf. Gegenüber dem präoperativen Kontrollwert (ohne ASS) sank die Aggregation auf  $53 \pm 14 \%$  ( $p < 0,01$ ). Auch in dieser Patientengruppe bestanden interindividuelle Variationen. In einem Fall von 11 Patienten konnte am fünften postoperativen Tag eine deutlich stärkere Aggregation gemessen werden, wohingegen bei zwei der OPCAB-Patienten keine Aggregation messbar war. Anders als bei der ACB-Gruppe mit HLM nahm bei OPCAB die Aggregation am fünften postoperativen Tag gegenüber dem ersten postoperativen Tag nicht zu. Sie betrug am fünften postoperativen Tag, vergleichbar dem ersten postoperativen Tag,  $50 \pm 18 \%$  gegenüber dem präoperativen Kontrollwert ( $p < 0,01$ ), obwohl zu diesem Zeitpunkt die Medikation mit ASS (100 mg/d) bereits seit vier Tagen erfolgte. Die Aggregation wurde demnach auch in dieser Patientengruppe nicht adäquat durch die perorale Gabe von ASS gehemmt.

Weitere Aggregationsmessungen wurden ebenfalls in Gegenwart von ASS (30 bzw. 100  $\mu\text{M}$ ) *in vitro* durchgeführt. Vor dem operativen Eingriff führte die *in vitro* Zugabe von 30 bzw. 100  $\mu\text{M}$  ASS zu einer signifikanten Hemmung der Aggregation auf  $37 \pm 9 \%$  bzw.  $1 \pm 1 \%$  ( $p < 0,001$ ). An den Tagen 1 und 5 nach OPCAB führte die *in vitro* Exposition der Plättchen gegenüber ASS zu keiner signifikanten Hemmung der Aggregation mehr. Insgesamt war die Hemmung der thrombozytären Aggregation durch ASS *in vitro* deutlich geringer als präoperativ. ASS *in vitro* reduzierte die Aggregation auf  $88 \pm 4 \%$  bzw.  $54 \pm 13 \%$  am ersten und auf  $84 \pm 11 \%$  bzw.  $54 \pm 15 \%$  am fünften postoperativen Tag.



**Abbildung 6:** Arachidonsäure-induzierte (1mM) Thrombozytenaggregation in PRP von Patienten **ohne** extrakorporale Zirkulation (HLM) vor koronarer Bypassoperation und an den postoperativen Tagen 1 und 5 in Gegenwart von ASS (0, 30, 100  $\mu\text{M}$ ) *in vitro*. Die Aggregation wurde aus der maximalen Steigung der Aggregationskurve ermittelt.

+  $p < 0,001$  vs. 0  $\mu\text{M}$  ASS prae OP

&

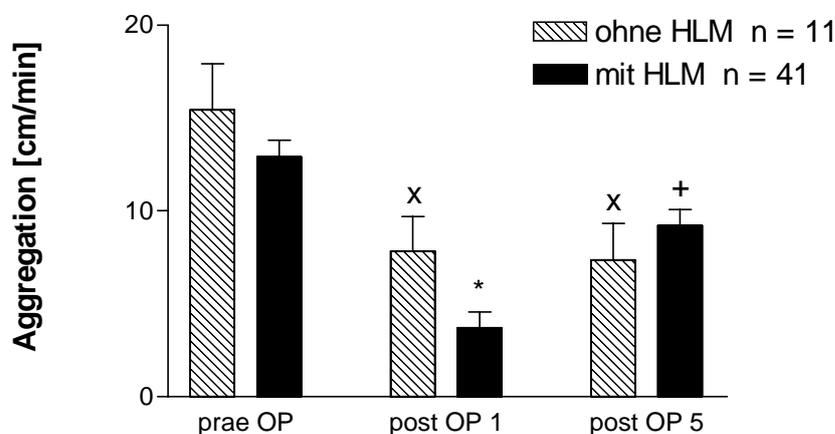
n.s. vs. 100  $\mu\text{M}$  ASS post OP 1 und 5

\*  $p < 0,01$  vs. 0  $\mu\text{M}$  ASS prae OP

### 3.2.3 Vergleich der Untersuchungen nach Operationen mit und ohne Herz-Lungen-Maschine

In beiden Operationsgruppen waren Aggregation und *in vitro* Hemmung durch ASS präoperativ vergleichbar. Unterschiede wurden erst postoperativ deutlich. Um dies zu veranschaulichen wurde in Abbildung 7 die Aggregation ohne Zusatz von ASS *in vitro* beider Gruppen gegenübergestellt. Am ersten postoperativen Tag fiel bei beiden Patientenkollektiven eine verminderte Aggregationsfähigkeit der Thrombozyten auf. Nach ACB mit HLM war die Aggregation am ersten postoperativen Tag zudem signifikant geringer als nach OPCAB ( $p = 0,037$ ). Trotz der viertägigen peroralen Medikation mit ASS zeichnete sich in der Gruppe mit HLM ein signifikanter Anstieg der Plättchenaktivität am fünften gegenüber dem ersten postoperativen Tag ab ( $p < 0,001$ ).

Der Zusatz von ASS *in vitro* (30  $\mu\text{M}$  bzw. 100  $\mu\text{M}$ ) reduzierte am ersten postoperativen Tag die thrombozytäre Aggregation in beiden Operationsgruppen deutlich geringer als präoperativ (Abb. 5 und 6). Am fünften postoperativen Tag hemmte ASS *in vitro* nach ACB mit HLM die thrombozytäre Aggregation tendenziell wieder stärker (Abb. 5). Im Vergleich zur präoperativen Kontrolle reduzierte 100  $\mu\text{M}$  ASS *in vitro* die Aggregation am fünften postoperativen Tag signifikant geringer ( $p < 0,01$ ) (Abb. 5). Dagegen blieb bei OPCAB die Aggregation nach *in vitro* ASS an den postoperativen Tagen 1 und 5 vergleichbar (Abb. 6). Zusammenfassend ist festzuhalten, dass beide Gruppen postoperativ vermindert oder gar nicht auf ASS per os ansprachen. Auch *in vitro* hemmte ASS postoperativ die Aggregation beider Patientengruppen im Vergleich zur präoperativen Aggregation nur noch partiell.



**Abbildung 7:** Vergleich der Arachidonsäure-induzierten (1mM) Thrombozytenaggregation in PRP von Patienten **mit** und **ohne** extrakorporale Zirkulation (HLM) vor koronarer Bypassoperation und an den postoperativen Tagen 1 und 5 ohne ASS *in vitro*. Die Aggregation wurde aus der maximalen Steigung der Aggregationskurve ermittelt.

\*  $p = 0,037$  vs. post OP 1 ohne HLM

+  $p < 0,001$  vs. 0  $\mu\text{M}$  ASS post OP1 mit HLM

x  $p < 0,01$  vs. 0  $\mu\text{M}$  ASS prae OP ohne HLM

&  $p < 0,001$  vs. 0  $\mu\text{M}$  ASS prae OP mit HLM

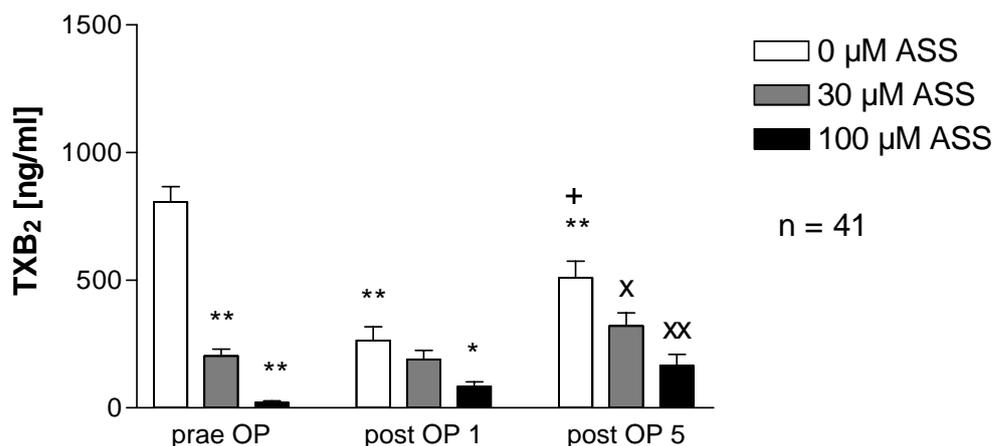
&  $p < 0,01$  vs. 0  $\mu\text{M}$  ASS prae OP mit HLM

### 3.3 Thrombozytäre Thromboxansynthese

#### 3.3.1 Untersuchungen an Patienten mit Herz-Lungen-Maschine

Die Thromboxansynthese wurde an allen Versuchstagen im PRP im Anschluss an die Aggregation mittels Radioimmunoassay bestimmt. Sie entsprach im Wesentlichen den Befunden der Aggregation (Abb. 8). Am ersten postoperativen Tag fiel die Thromboxankonzentration nach Stimulation mit Arachidonsäure (1 mM) gegenüber dem präoperativen Kontrollwert signifikant auf  $35 \pm 7 \%$  ( $p < 0,001$ ). Die interindividuelle Variation war jedoch hoch, so dass am ersten postoperativen Tag bei 3 von 41 und am fünften postoperativen Tag bei 9 von 41 Patienten eine gesteigerte TX-Synthese beobachtet werden konnte. Im weiteren Verlauf zeigte sich trotz oraler ASS-Therapie ein signifikanter Anstieg der Thromboxansynthese am fünften postoperativen Tag gegenüber dem ersten postoperativen Tag ( $p < 0,001$ ) auf  $66 \pm 11 \%$  (Abb. 8 und 10). Die Thromboxansynthese ohne ASS *in vitro* war am fünften Tag zwar signifikant ( $p < 0,001$ ) geringer als präoperativ, jedoch nicht weit genug herabgesetzt, um die Arachidonsäure-induzierte Aggregation relevant zu hemmen.

Unter *in vitro* Zugabe von ASS (30 bzw. 100  $\mu\text{M}$ ) zeigte sich vor der Operation eine signifikante Abnahme der Thromboxansynthese auf  $26 \pm 3 \%$  bzw.  $4 \pm 1 \%$  ( $p < 0,001$ ; Abb. 8). Am ersten postoperativen Tag war die inhibierende Wirkung von ASS *in vitro* deutlich reduziert. ASS hemmte die Thromboxansynthese lediglich auf  $73 \pm 4 \%$  bzw. auf  $32 \pm 7 \%$ . Anders als bei der Aggregation war an diesem Tag eine signifikante Abnahme der Thromboxansynthese unter *in vitro* Zugabe von 100  $\mu\text{M}$  ASS zu beobachten (Abb. 8). Am fünften postoperativen Tag reduzierte ASS *in vitro* (30 bzw. 100  $\mu\text{M}$ ) die thrombozytäre Thromboxanfreisetzung wieder signifikant ( $p < 0,05$  bzw.  $p < 0,001$ ) auf  $62 \pm 7 \%$  bzw.  $31 \pm 6 \%$ . 100  $\mu\text{M}$  ASS *in vitro* hemmte die Thromboxansynthese am fünften postoperativen Tag tendenziell jedoch deutlich weniger als präoperativ (Abb. 8).



**Abbildung 8:** Arachidonsäure-induzierte (1mM) thrombozytäre Thromboxansynthese in PRP von Patienten mit extrakorporaler Zirkulation (HLM) vor koronarer Bypassoperation und an den postoperativen Tagen 1 und 5 in Gegenwart von ASS (0, 30, 100  $\mu\text{M}$ ) *in vitro*. Die Thromboxansynthese wurde als TXB<sub>2</sub> mittels Radioimmunoassay gemessen und in [ng/ml] angegeben.

\*\*  $p < 0,001$  vs. 0  $\mu\text{M}$  ASS prae OP

+  $p < 0,001$  vs. 0  $\mu\text{M}$  ASS post OP 1

xx  $p < 0,001$  vs. 0  $\mu\text{M}$  ASS post OP 5 &

\*  $p < 0,05$  vs. 0  $\mu\text{M}$  ASS post OP 1

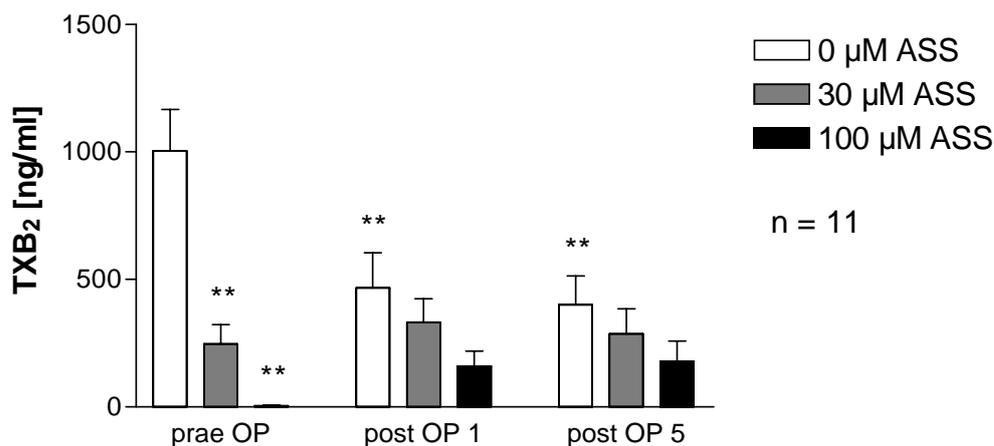
x  $p < 0,05$  vs. 0  $\mu\text{M}$  ASS post OP 5

n.s. vs. 100  $\mu\text{M}$  ASS prae OP

### 3.3.2 Untersuchungen an Patienten ohne Herz-Lungen-Maschine

In Abbildung 9 ist die thrombozytäre Thromboxansynthese bei OPCAB-Patienten dargestellt. Sie war präoperativ vergleichbar mit der TX-Synthese der Thrombozyten von Patienten nach ACB-Operation mit HLM. Thromboxan konnte bei allen Patienten im PRP nach Arachidonsäure-Stimulation (1 mM) gemessen werden. Analog der thrombozytären Thromboxansynthese der ACB-Patienten mit HLM nahm die Thromboxanfreisetzung am ersten postoperativen Tag ohne ASS signifikant ab ( $p < 0,001$ ). Sie betrug  $46 \pm 17$  % des präoperativen Ausgangswertes. Es bestanden bei den OPCAB-Patienten ebenfalls interindividuelle Unterschiede. So konnte bei 2 von 11 Patienten am ersten postoperativen Tag und bei 2 von 11 Patienten am fünften postoperativen Tag eine gesteigerte TX-Synthese beobachtet werden. Anders als bei der ACB-Gruppe mit HLM nahm bei OPCAB die TX-Synthese am fünften postoperativen Tag gegenüber dem ersten postoperativen Tag nicht zu. Sie betrug am fünften postoperativen Tag, vergleichbar dem ersten postoperativen Tag,  $40 \pm 12$  % gegenüber dem präoperativen Kontrollwert ( $p < 0,001$ ). Trotz der signifikanten Hemmung der TX-Synthese ohne ASS *in vitro* an den Tagen 1 und 5 konnte auch in dieser Gruppe die thrombozytäre Thromboxansynthese nicht ausreichend durch die perorale ASS Gabe reduziert werden, um die Arachidonsäure-induzierte Aggregation relevant zu hemmen.

Die Zugabe von ASS *in vitro* (30  $\mu$ M bzw. 100  $\mu$ M) reduzierte die thrombozytäre Thromboxansynthese präoperativ signifikant auf  $24 \pm 5$  % bzw. auf  $2 \pm 2$  % ( $p < 0,001$ ). An den postoperativen Tagen 1 und 5 führte die *in vitro* Exposition der Thrombozyten mit ASS (30  $\mu$ M bzw. 100  $\mu$ M) zu keiner signifikanten Hemmung der Thromboxanfreisetzung mehr (Abb. 9). ASS reduzierte die TX-Synthese am ersten postoperativen Tag lediglich tendenziell auf  $76 \pm 5$  % bzw.  $35 \pm 10$  % und am fünften postoperativen Tag auf  $71 \pm 22$  % bzw.  $40 \pm 10$  %. Die Messung der TX-Konzentration zeigt demnach, dass auch ohne den Einsatz extrakorporaler Zirkulation durch ASS *in vitro* (30 und 100  $\mu$ M) keine vollständige Hemmung der thrombozytären Thromboxansynthese erzielt werden kann (Abb. 9).



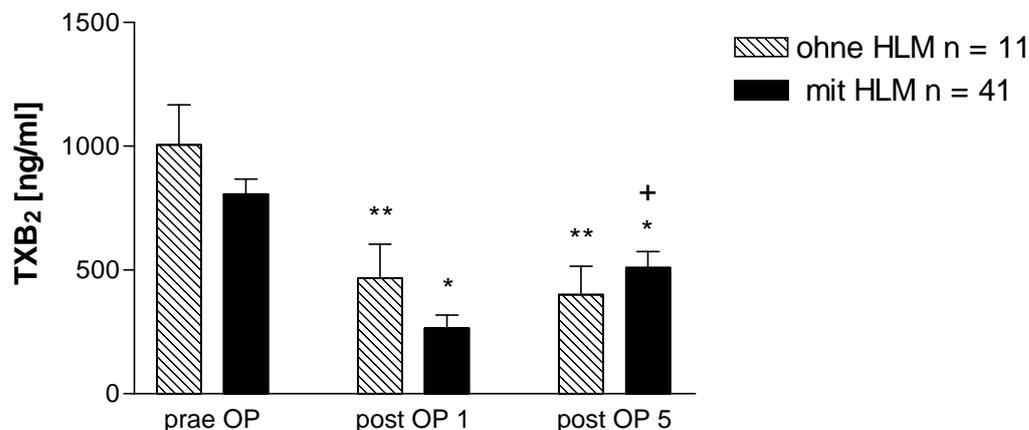
**Abbildung 9:** Arachidonsäure-induzierte (1mM) thrombozytäre Thromboxansynthese in PRP von Patienten ohne extrakorporale Zirkulation (HLM) vor koronarer Bypassoperation und an den postoperativen Tagen 1 und 5 in Gegenwart von ASS (0, 30, 100  $\mu$ M) *in vitro*. Die Thromboxansynthese wurde als TXB<sub>2</sub> mittels Radioimmunoassay gemessen und in [ng/ml] angegeben.

\*\*  $p < 0,001$  vs. 0  $\mu$ M ASS prae OP

### 3.3.3 Vergleich der Untersuchungen nach Operationen mit und ohne Herz-Lungen-Maschine

In beiden Operationsgruppen war präoperativ die Hemmung der thrombozytären Thromboxansynthese durch ASS *in vitro* (30  $\mu$ M bzw. 100  $\mu$ M) vergleichbar (Abb. 8 und 9). Unterschiede zeichneten sich erst postoperativ ab. Zur Veranschaulichung wurden die TX-Konzentrationen beider Gruppen ohne ASS *in vitro* in Abbildung 10 gegenübergestellt. Am ersten postoperativen Tag fiel bei beiden Gruppen eine signifikant verminderte Thromboxansynthese ohne ASS *in vitro* auf ( $p < 0,001$ ). Tendenziell bestand eine geringere Thromboxansynthese bei ACB-Patienten mit HLM als in der OPCAB-Gruppe. Am fünften postoperativen Tag zeigte sich in der Gruppe mit HLM ein signifikanter Anstieg der thrombozytären Thromboxansynthese gegenüber dem ersten postoperativen Tag ( $p < 0,001$ ), trotz oraler ASS Medikation.

Der Zusatz von ASS *in vitro* (30  $\mu$ M bzw. 100  $\mu$ M) reduzierte die Thromboxansynthese an den postoperativen Tagen 1 und 5 in beiden Untersuchungsgruppen deutlich geringer als präoperativ (Abb. 8 und 9). Signifikante gruppenspezifische Unterschiede in der thrombozytären Thromboxansynthese nach ASS *in vitro* gab es jedoch nicht. Analog der Aggregation lässt sich für die Thromboxansynthese festhalten, dass die Thrombozyten beider Gruppen postoperativ vermindert oder gar nicht auf die perorale ASS Medikation reagierten. Auch *in vitro* konnte ASS keine den präoperativen Ausgangswerten vergleichbare Inhibition der Thromboxansynthese erzielen.



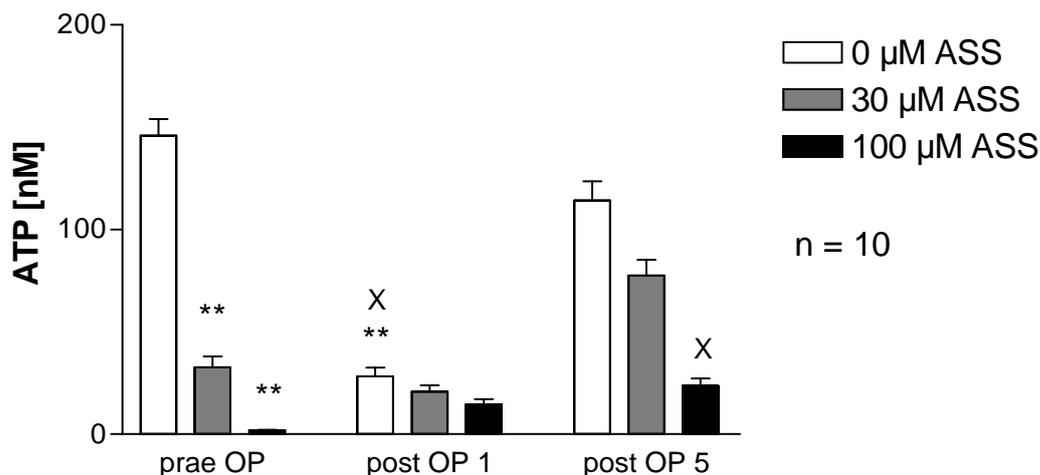
**Abbildung 10:** Vergleich der Arachidonsäure-induzierten (1mM) thrombozytären Thromboxansynthese in PRP von Patienten **mit** und **ohne** extrakorporale Zirkulation (HLM) vor koronarer Bypassoperation und an den postoperativen Tagen 1 und 5 ohne ASS *in vitro*. Die Thromboxansynthese wurde als TXB<sub>2</sub> mittels Radioimmunoassay gemessen und in [ng/ml] angegeben.

- \*  $p < 0,001$  vs. 0  $\mu$ M ASS prae OP mit HLM
- \*\*  $p < 0,001$  vs. 0  $\mu$ M ASS prae OP ohne HLM
- +  $p < 0,001$  vs. 0  $\mu$ M ASS post OP 1 mit HLM

### 3.4 Thrombozytäre ATP-Sekretion

Die thrombozytäre ATP-Sekretion entsprach im Wesentlichen den Befunden der Aggregation und Thromboxansynthese und ist in Abbildung 11 dargestellt. Präoperativ führte die Zugabe von Arachidonsäure (1 mM) zum PRP aller Patienten ohne Zusatz von ASS *in vitro* zu einer ausgeprägten ATP-Sekretion. Am ersten postoperativen Tag war die ATP-Freisetzung deutlich vermindert und nahm bezogen auf den präoperativen Kontrollwert signifikant ab ( $p < 0,001$ ). Fünf Tage nach dem operativen Eingriff nahm die ATP-Sekretion unter oraler ASS Gabe signifikant gegenüber dem ersten postoperativen Tag zu ( $p < 0,05$ ). Im präoperativen Vergleich war die ATP-Sekretion kaum vermindert, so dass die orale Medikation mit ASS auch hier weitgehend ineffektiv war.

Ähnlich der Aggregation und Thromboxansynthese konnte die ATP-Sekretion präoperativ durch ASS *in vitro* (30  $\mu\text{M}$  bzw. 100  $\mu\text{M}$ ) signifikant auf  $24 \pm 12\%$  bzw.  $2 \pm 1\%$  reduziert werden ( $p < 0,001$ ). Am ersten postoperativen Tag wurde durch den *in vitro* Zusatz von ASS keine signifikante Hemmung mehr erreicht (Abb. 11). Am fünften postoperativen Tag hemmte lediglich der Zusatz von 100  $\mu\text{M}$  ASS *in vitro* die ATP-Sekretion signifikant ( $p < 0,05$ ).



**Abbildung 11:** Arachidonsäure-induzierte (1mM) thrombozytäre ATP-Sekretion in PRP von Patienten mit extrakorporaler Zirkulation (HLM) vor koronarer Bypassoperation und an den postoperativen Tagen 1 und 5 in Gegenwart von ASS (0, 30, 100  $\mu\text{M}$ ) *in vitro*. Die ATP-Sekretion wurde mit einem Luciferin-Luciferase-Reagenz sichtbar gemacht, gemessen und in [nM] angegeben.

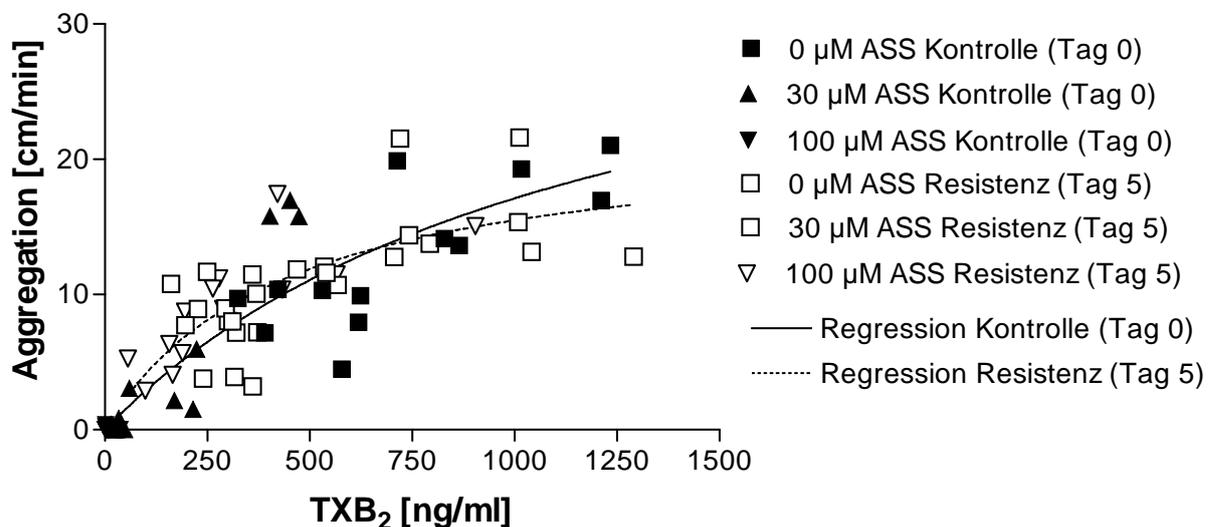
\*\*  $p < 0,001$  vs. 0  $\mu\text{M}$  ASS prae OP

x  $p < 0,05$  vs. 0  $\mu\text{M}$  ASS post OP 5

### 3.5 Beziehung zwischen thrombozytärer Thromboxansynthese und Aggregation

Die verminderte Sensitivität von Thrombozyten gegenüber ASS (vgl. 3.2 bis 3.4) kann durch eine verminderte Hemmwirkung auf die thrombozytäre COX erklärt werden. Alternativ ist auch möglich, dass die Sensitivität von Thrombozyten gegenüber Thromboxan erhöht ist (z.B. durch Rezeptor-Upregulation). Um dies zu prüfen, wurden die einzelnen TX-Konzentrationen und die Aggregationsdaten in Beziehung gesetzt. Eine potentiell erhöhte Sensitivität von Thrombozyten gegenüber Thromboxan würde in einer erhöhten Steigung der Regression bei Auftragen individueller Thromboxankonzentrationen und der simultan gemessenen Aggregation zum Ausdruck kommen.

Die individuellen TX-Konzentrationen und die entsprechenden Aggregationsdaten vor und fünf Tage nach aortokoronarer Bypassoperation sind in Abbildung 12 dargestellt. Die gewählten Patienten (n = 13) entwickelten binnen der fünf postoperativen Tage überwiegend eine ASS-Nonresponse, d.h. unter 100 µM ASS *in vitro* wurde am fünften postoperativen Tag bei der Mehrzahl der Patienten die Thromboxansynthese zu < 90 % gehemmt. Die Ergebnisse der Aggregation und der Thromboxansynthese ohne ASS sowie nach *in vitro* Zusatz von ASS (30 µM bzw. 100 µM) wurden zur Ermittlung von Regressionskurven herangezogen (Abb. 12). Der Vergleich vor und nach der operativen Myokardrevaskularisation macht deutlich, dass die Regressionskurven an beiden Tagen annähernd identisch waren. Offensichtlich ist die ASS-Nonresponse nicht durch eine gesteigerte Sensitivität der ASS-„resistenten“ Thrombozyten gegenüber dem gebildeten TXA<sub>2</sub> zu begründen.



**Abbildung 12:** Korrelation zwischen thrombozytärer Thromboxansynthese und Aggregation nach Stimulation mit Arachidonsäure (1 mM) bei ACB-Patienten vor (Kontrolle) und fünf Tage nach dem operativen Eingriff (ASS-Nonresponse). ASS wurde in den Konzentrationen von 0, 30 und 100 µM *in vitro* zugegeben. Die ausgewählten Patienten (n = 13) entwickelten binnen der fünf postoperativen Tage weitgehend eine ASS-Nonresponse. Aus den präoperativen Messwerten und denen am fünften postoperativen Tag wurden jeweils Regressionskurven erstellt. Jeder Datenpunkt entspricht hierbei einem individuellen Messergebnis.

### 3.6 Nachweis der thrombozytären Cyclooxygenase-2

In der vorliegenden Arbeit erfolgte der immunologische Nachweis der COX-2 als möglicher Erklärungsansatz für ASS-Nonresponse mittels Western-Blot. Die thrombozytäre COX-2 konnte in Thrombozyten-Sedimenten aller untersuchten Patienten (n = 17) nachgewiesen werden. Kontroll-Western ohne Primärantikörper ergaben erwartungsgemäß keine Signale. Bei 7 Patienten bestand am fünften postoperativen Tag eine Intensitätszunahme der COX-2 Expression bezüglich des präoperativen Ausgangssignals. Diese Gruppe wird im Folgenden COX-2 + bezeichnet. Bei den restlichen 10 Patienten war die COX-2 zwar zu detektieren, jedoch schwach und ohne Anstieg der Intensität des Signals zum fünften postoperativen Tag. Diese Gruppe wird COX-2 – genannt. Eine Übersicht hinsichtlich der Hemmbarkeit der Thrombozyten beider Gruppen durch ASS ist in Tabelle 2 dargestellt. In Einzelfällen wiesen die Plättchen jedoch auch eine verminderte Aktivität nach Arachidonsäure-Stimulation (1 mM) im präoperativen Vergleich auf.

	ASS-Responder	ASS-Nonresponder
COX 2 + (n = 7)	4	3
COX 2 – (n = 10)	4	6

**Tabelle 2:** Zuordnung der COX-2 Expression in Thrombozyten (COX-2 + bzw. COX-2 – ) hinsichtlich der Hemmbarkeit durch ASS (ASS-Nonresponder: Inhibition der Thromboxansynthese < 90 % bei 100 µM ASS *in vitro*; ASS-Responder: Inhibition der Thromboxansynthese > 90 % bei 100 µM ASS *in vitro*).

Um das Ausmaß der ASS-Nonresponse weiter zu charakterisieren, wurde die TX-Konzentration unter Zugabe von 100 µM ASS *in vitro* durch den jeweiligen Kontrollwert (0 µM ASS) dividiert und die Quotienten gemittelt. Je näher das Ergebnis dem Wert 1, desto „resistenter“ waren die Plättchen. Bei Vergleichen zwischen beiden Gruppen zeigten sich jedoch keine signifikanten Unterschiede im Ausmaß der *in vitro* Inhibition der Thrombozyten durch ASS (Tabelle 3).

	COX-2 + n = 7	COX-2 – n = 10
TX bei 100 µM ASS/ TX bei 0 µM ASS	0,20 ± 0,12 n.s.	0,29 ± 0,09

**Tabelle 3:** Verhältnis der thrombozytären Thromboxansynthese mit bzw. ohne 100 µM ASS *in vitro* am fünften postoperativen Tag in der COX-2 + bzw. der COX-2 – Gruppe.

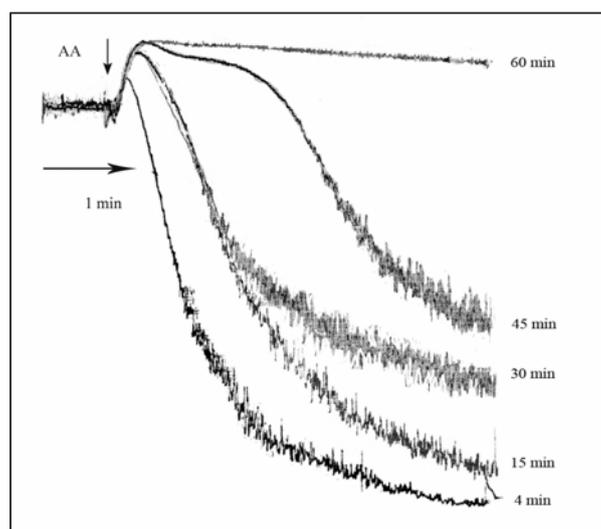
n.s. = nicht signifikant vs. COX-2 –

### 3.7 Zeitkinetik der Hemmung thrombozytärer Funktionen durch ASS

Zur weiteren Untersuchung der herabgesetzten thrombozytären Sensitivität gegenüber ASS wurde der zeitliche Verlauf der irreversiblen COX-Hemmung anhand der Arachidonsäure-induzierten (1 mM) thrombozytären Aggregation, Thromboxansynthese und ATP-Sekretion in PRP verfolgt. Die Messungen wurden in Gegenwart von 5 bzw. 10  $\mu\text{M}$  ASS *in vitro* über einen Zeitraum von 60 Minuten durchgeführt. Um auszuschließen, dass die Plättchen nach der langen Inkubationszeit an Aktivität verlieren, wurde der gleiche Ansatz unter Zugabe von TM-Puffer an Stelle von ASS registriert. Es konnte gezeigt werden, dass auch nach einstündiger Inkubation die Thrombozyten unverändert aktivierbar blieben (Abb. 14 bis 17). Im Folgenden wurde eine Kontrollgruppe einer ASS-Nonresponse Gruppe gegenübergestellt. Die Kontrollgruppe (n = 13) bestand aus Patienten vor ACB-Operation, deren Thrombozyten durch 100  $\mu\text{M}$  ASS *in vitro* gehemmt werden konnten (Thromboxansynthese > 90 % gehemmt). Die ASS-Nonresponse Gruppe (n = 10) hingegen umfasste Patienten am fünften postoperativen Tag, deren Thrombozyten postoperativ nicht durch 100  $\mu\text{M}$  ASS *in vitro* gehemmt werden konnten (Thromboxansynthese < 90 % gehemmt).

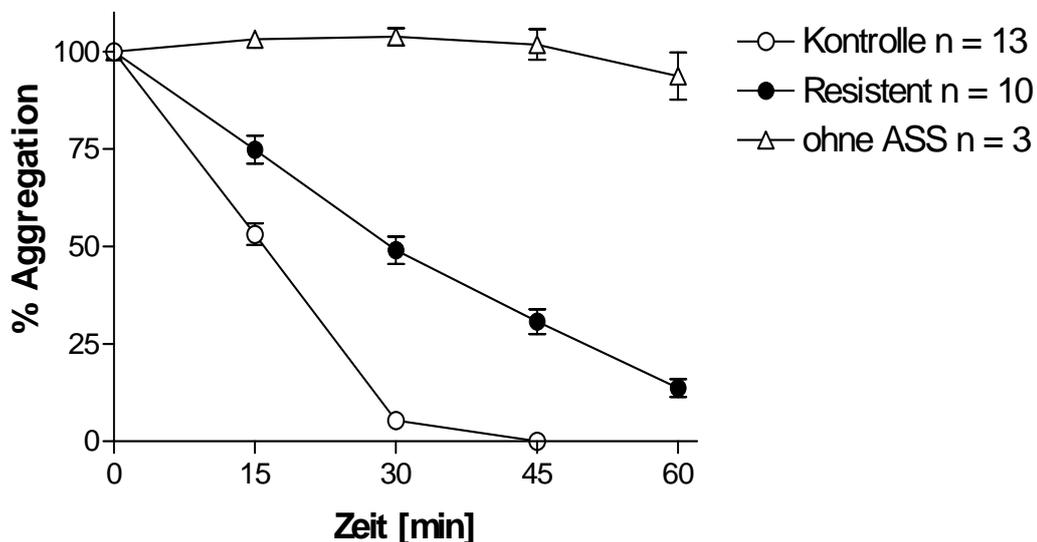
#### 3.7.1 Zeitabhängige Hemmung der Aggregation durch ASS

In allen Ansätzen war eine zeitabhängige Hemmung der Thrombozytenaggregation nachweisbar (Abb. 13). Der Zusatz von 5  $\mu\text{M}$  ASS *in vitro* führte in der Kontrollgruppe zu einer fortlaufenden Abschwächung der Aggregation über den gemessenen Zeitraum (Abb. 14). Eine vollständige Hemmung wurde nach  $33 \pm 2$  min erreicht. Unter gleichen Bedingungen konnte bei den ASS-Nonrespondern ebenfalls eine kontinuierliche Aggregationsabnahme registriert werden, jedoch keine vollständige Hemmung (Abb. 14). Eine vollständige Inhibition der Aggregation wäre bei Extrapolation erst nach ca. 66 min zu erwarten. Der Aktivitätsverlust zeichnete sich in der Nonresponse-Gruppe im Gegensatz zu der Kontrollgruppe signifikant verzögert ab (Abb. 14). Die Rate, mit der die Aggregation unter 5  $\mu\text{M}$  ASS *in vitro* abnahm, betrug in der Kontrollgruppe  $3 \pm 0,1$  %/min. Sie war signifikant höher als in der ASS-Nonresponse-Gruppe ( $2 \pm 0,3$  %/min;  $p = 0,002$ ).

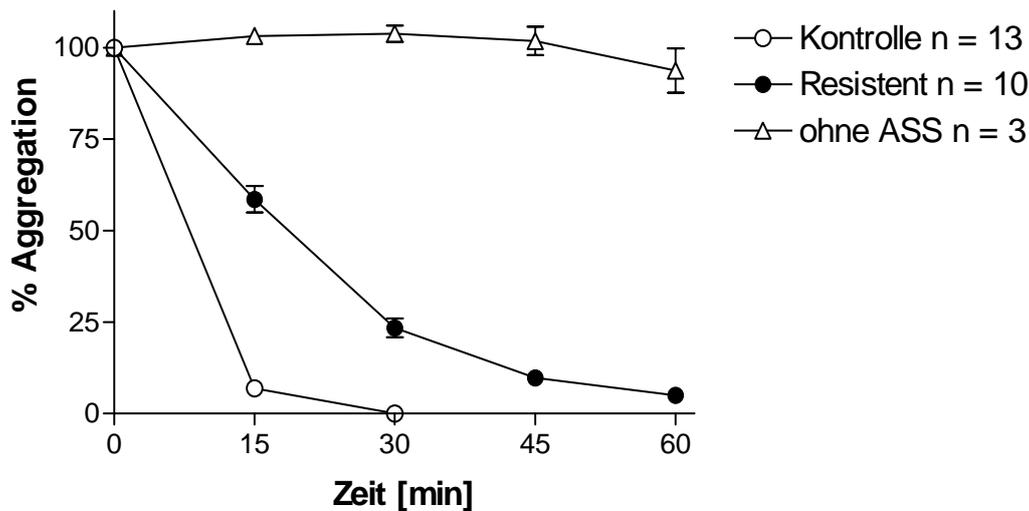


**Abbildung 13:** Repräsentative Originalregistrierungen Arachidonsäure-induzierter (1 mM) thrombozytärer Aggregationen in PRP eines Patienten am sechsten postoperativen Tag ohne Zugabe von ASS *in vitro* nach 4 Minuten Inkubation bzw. nach Zugabe von 10  $\mu\text{M}$  ASS *in vitro* nach 15, 30, 45 und 60 Minuten Inkubation.

Bei Exposition der Thrombozyten gegenüber 10  $\mu\text{M}$  ASS *in vitro* verloren diese, im Vergleich zu 5  $\mu\text{M}$  ASS *in vitro*, erwartungsgemäß schneller ihre Aktivität (Abb. 14 und 15). In der Kontrollgruppe war bereits nach 15 Minuten nahezu keine Aggregation bei 10  $\mu\text{M}$  ASS *in vitro* mehr messbar. In der Gruppe „resistenter“ Patienten war in Gegenwart von 10  $\mu\text{M}$  ASS *in vitro* die Hemmung der thrombozytären Aggregation deutlich verzögert (Abb. 15). Eine vollständige Hemmung der Plättchenaggregation wurde nach  $25 \pm 4$  min in der Kontroll- und nach  $48 \pm 6$  min in der Nonresponse-Gruppe erreicht. Die Abnahmerate betrug in der Kontrollgruppe  $4 \pm 1$  %/min und war damit etwa doppelt so schnell wie in der Gruppe der ASS-„resistenten“ Patienten ( $2 \pm 0,3$  %/min). Aus diesen Ergebnissen wird deutlich, dass mit erhöhter Konzentration (10  $\mu\text{M}$  ASS) selbst „resistente“ Plättchen innerhalb eines kürzeren Zeitintervalls ( $< 60$  min) gehemmt werden können.



**Abbildung 14:** Zeitabhängige Hemmung der Arachidonsäure-induzierten (1 mM) Thrombozytenaggregation in PRP von Kontrollpatienten vor ACB-Operation und ASS-Nonrespondern am fünften postoperativen Tag in Gegenwart von 5  $\mu\text{M}$  ASS *in vitro* nach Inkubationszeiten von 15, 30, 45 und 60 Minuten. Die Aggregation ohne ASS *in vitro* wurde parallel mitgeführt.

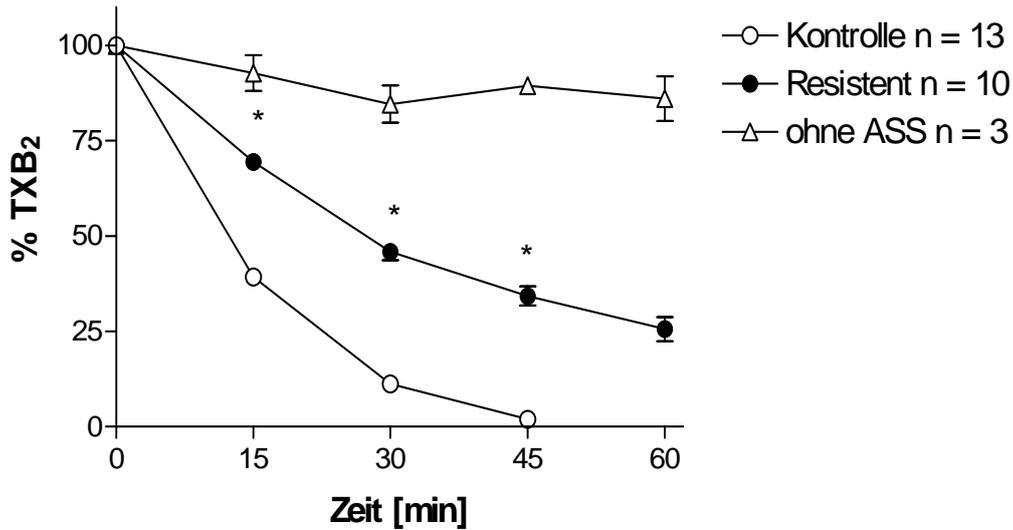


**Abbildung 15:** Zeitabhängige Hemmung der Arachidonsäure-induzierten (1 mM) Thrombozytenaggregation in PRP von Kontrollpatienten vor ACB-Operation und ASS-Nonrespondern am fünften postoperativen Tag in Gegenwart von 10  $\mu\text{M}$  ASS *in vitro* nach Inkubationszeiten von 15, 30, 45 und 60 Minuten. Die Aggregation ohne ASS *in vitro* wurde parallel mitgeführt.

### 3.7.2 Zeitabhängige Hemmung der Thromboxansynthese durch ASS

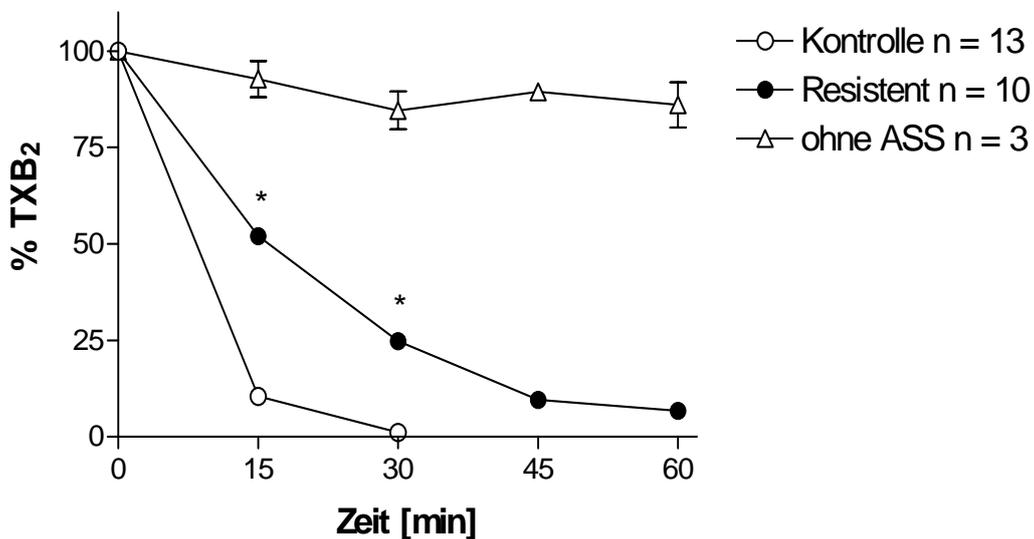
Ähnlich der Aggregation konnte eine zeitabhängige Hemmung der Thromboxansynthese in allen Proben nachgewiesen werden. Die Zugabe von 5  $\mu\text{M}$  ASS *in vitro* führte in der Kontrollgruppe zu einer 90 %-igen Hemmung der Thromboxansynthese nach  $31 \pm 3$  min (Abb. 16). Analog der Aggregation nahm die Thromboxansynthese bei 5  $\mu\text{M}$  ASS *in vitro* auch in der ASS-Nonresponse Gruppe beständig, jedoch nicht vollständig, ab (Abb. 16). Bei Extrapolation wäre eine Inhibition der Thromboxansynthese  $> 90\%$  erst nach ca. 74 min zu erwarten. Die Hemmung der TX-Synthese in der Nonresponse-Gruppe war gegenüber der Kontrolle signifikant verzögert (Abb. 16). Der Zusatz von 5  $\mu\text{M}$  ASS *in vitro* hemmte die TX-Synthese in der Kontrollgruppe mit einer Rate von  $4 \pm 0,5$  %/min. Demgegenüber zeigten ASS-„resistente“ Plättchen eine signifikant verzögerte Inhibitionskinetik mit  $1 \pm 0,2$  %/min ( $p < 0,0001$ ).

Der Zusatz von 10  $\mu\text{M}$  ASS *in vitro* führte erwartungsgemäß zu einer früheren Abnahme der TX-Synthese der Plättchen beider Gruppen (Abb. 16 und 17). In der Kontrollgruppe war die Thromboxansynthese unter 10  $\mu\text{M}$  ASS *in vitro* nach 15 Minuten bereits bei über der Hälfte der Patienten annähernd vollständig gehemmt. Demgegenüber war die Hemmung der Thromboxansynthese bei den „resistenten“ Plättchen signifikant verzögert (Abb. 17). Eine vollständige Hemmung der TX-Synthese wurde nach  $18 \pm 2$  min in der Kontrollgruppe und nach  $41 \pm 4$  min in der Nonresponse-Gruppe erreicht. In Gegenwart von 10  $\mu\text{M}$  ASS wurde die Thromboxansynthese von Kontroll-Thrombozyten signifikant mit einer Rate von  $6 \pm 0,4$  %/min gegenüber  $2,5 \pm 0,2$  %/min bei „resistenten“ Plättchen gehemmt ( $p < 0,0001$ ). Analog der Aggregation wird deutlich, dass eine erhöhte ASS Konzentration (10  $\mu\text{M}$ ) selbst bei ASS-„resistenten“ Plättchen eine Inhibition der Thromboxansynthese von 90 % innerhalb eines Zeitintervalls ( $< 60$  min) erzielen kann.



**Abbildung 16:** Zeitabhängige Hemmung der Arachidonsäure-induzierten (1 mM) thrombozytären Thromboxansynthese in PRP von Kontrollpatienten vor ACB-Operation und ASS-Nonrespondern am fünften postoperativen Tag in Gegenwart von 5 μM ASS *in vitro* nach Inkubationszeiten von 15, 30, 45 und 60 Minuten. Die Thromboxansynthese ohne ASS *in vitro* wurde parallel mitgeführt, um sicherzustellen, dass die Plättchen über den Zeitraum der Inkubation konstant aktivierbar blieben. Die Thromboxansynthese wurde als TXB<sub>2</sub> mittels Radioimmunoassay gemessen.

\* p < 0,001 vs. Kontrolle



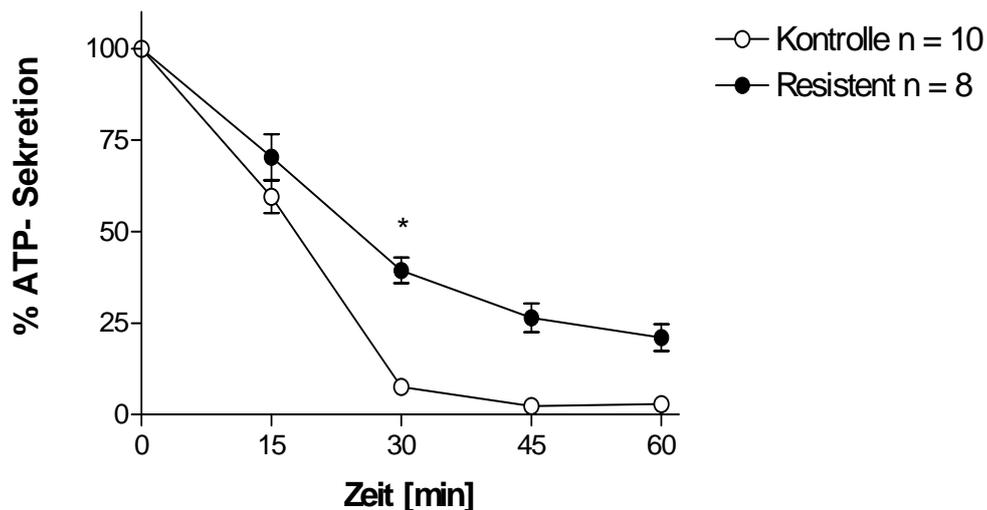
**Abbildung 17:** Zeitabhängige Hemmung der Arachidonsäure-induzierten (1 mM) thrombozytären Thromboxansynthese in PRP von Kontrollpatienten vor ACB-Operation und ASS-Nonrespondern am fünften postoperativen Tag in Gegenwart von 10 μM ASS *in vitro* nach Inkubationszeiten von 15, 30, 45 und 60 Minuten. Die Thromboxansynthese ohne ASS *in vitro* wurde parallel mitgeführt, um sicherzustellen, dass die Plättchen über den Zeitraum der Inkubation konstant aktivierbar blieben. Die Thromboxansynthese wurde als TXB<sub>2</sub> mittels Radioimmunoassay gemessen.

\* p < 0,001 vs. Kontrolle

### 3.7.3 Zeitabhängige Hemmung der ATP-Sekretion durch ASS

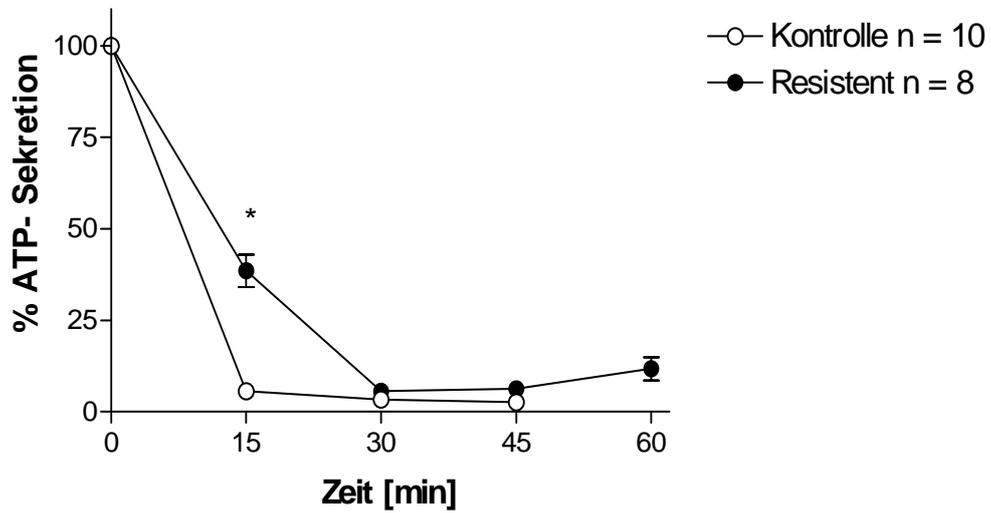
Die zeitabhängige Hemmung der thrombozytären ATP-Sekretion durch ASS *in vitro* (5 bzw. 10  $\mu\text{M}$ ) war vergleichbar mit den Befunden der Aggregation und der TX-Synthese. Die Exposition der Thrombozyten gegenüber 5  $\mu\text{M}$  ASS *in vitro* zeigte in der Kontrollgruppe einen schnelleren Zeitgang der Hemmung der ATP-Freisetzung als in der Nonresponse-Gruppe (Abb. 18). Nach 30 Minuten Inkubation mit 5  $\mu\text{M}$  ASS *in vitro* war die ATP-Sekretion bereits um > 90 % reduziert. Analog der Aggregation und TX-Synthese wurde nach 60 min Inkubation der Nonresponse-Plättchen mit 5  $\mu\text{M}$  ASS *in vitro* keine vollständige Hemmung der ATP-Sekretion erzielt (Abb. 18).

In Gegenwart von 10  $\mu\text{M}$  ASS *in vitro* wurde die ATP-Sekretion in beiden Gruppen erwartungsgemäß schneller gehemmt (Abb. 19). Die Inkubation der Thrombozyten mit 10  $\mu\text{M}$  ASS *in vitro* reduzierte die ATP-Sekretion ASS-„resistenter“ Thrombozyten nahezu vollständig innerhalb eines Zeitintervalls von 60 min (Abb. 19), wobei auch hier der Zeitverlauf bei Thrombozyten von Nonrespondern gegenüber Respondern verzögert war.



**Abbildung 18:** Zeitabhängige Hemmung der Arachidonsäure-induzierten (1 mM) thrombozytären ATP-Sekretion in PRP von Kontrollpatienten vor ACB-Operation und ASS-Nonrespondern am fünften postoperativen Tag in Gegenwart von 5  $\mu\text{M}$  ASS *in vitro* nach Inkubationszeiten von 15, 30, 45 und 60 Minuten. Die ATP-Sekretion wurde mit einem Luciferin-Luciferase-Reagenz sichtbar gemacht.

p= 0,01 vs. Kontrolle



**Abbildung 19:** Zeitabhängige Hemmung der Arachidonsäure-induzierten (1 mM) thrombozytären ATP-Sekretion in PRP von Kontrollpatienten vor ACB-Operation und ASS-Nonrespondern am fünften postoperativen Tag in Gegenwart von **10 µM ASS** *in vitro* nach Inkubationszeiten von 15, 30, 45 und 60 Minuten. Die ATP-Sekretion wurde mit einem Luciferin-Luciferase-Reagenz sichtbar gemacht.

\* p= 0,01 vs. Kontrolle

## 4 Diskussion

### 4.1 Bedeutung der ASS-Nonresponse für die kardiovaskuläre Prognose

Metaanalysen von 174 klinischen Studien mit etwa 100.000 Patienten haben gezeigt, dass ASS das Risiko eines kardiovaskulären Ereignisses um ca. 25 % reduziert [Antithrombotic Trialists' Collaboration, 2002]. 100 mg ASS erzielt bei einmaliger Gabe am Tag eine nahezu vollständige Hemmung der Aggregation und Thromboxansynthese bei Probanden und, wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, sprechen Thrombozyten von ACB-Patienten vor dem operativen Eingriff ebenfalls gut auf ASS *in vitro* an. Im Hinblick auf die postoperativ verminderte Sensitivität der Thrombozyten für ASS ist die klinische Evidenz im Rahmen der Prävention von Bypassverschlüssen von Bedeutung. Studien, die sich mit der antithrombotischen Therapie nach CABG beschäftigt haben, konnten teilweise Vorteile der ASS-Therapie im Bezug auf die aortokoronare Bypassverschlussrate hervorheben. Es existieren jedoch auch Studien, die keinen Vorteil der ASS Medikation hinsichtlich eines späten Transplantatverschlusses dokumentieren [Okraïneec et al., 2005].

Im Rahmen der HOPE Studie (Heart Outcomes Prevention Evaluation; [Yusuf et al., 2000]), untersuchten Eikelboom et al. 488 Patienten, die innerhalb eines fünfjährigen Beobachtungszeitraumes einen Myokardinfarkt, Schlaganfall oder den kardiovaskulären Tod erlitten und verglichen diese mit der gleichen Anzahl an Kontrollpersonen ohne ein derartiges Ereignis. Alle Studienteilnehmer und Kontrollpersonen erhielten eine antithrombotische Therapie mit ASS. Für diese Studie untersuchten die Autoren Urin auf den stabilen Metaboliten 11-Dehydro-TXB<sub>2</sub> als Marker für die thrombozytäre Thromboxansynthese *in vivo* [Eikelboom et al., 2002]. Die Autoren definierten hierbei ASS-Nonresponse als ein Versagen der Reduktion der Thromboxansynthese mit erhöhter Ausscheidung des Metaboliten. Die Ergebnisse zeigten bei Patienten mit kardiovaskulärem Ereignis eine signifikant höhere 11-Dehydro-TXB<sub>2</sub>-Ausscheidung im Urin. Am deutlichsten zeigte sich der Unterschied zwischen Patienten und Kontrollpersonen (ohne Ereignis) bezüglich myokardialen Infarkt und kardiovaskulärem Tod. Hier war das Risiko für die ASS-„resistenten“ Patienten, ein derartiges Ereignis zu erleiden, um den Faktor 2 bzw. 3,5 höher. Allerdings konnten die Autoren diesen Unterschied für Patienten nach Apoplex nicht dokumentieren. Ein Schwachpunkt in der Methodik dieser Untersuchung besteht im unterschiedlichen Risikoprofil beider Patientengruppen (höhere Inzidenz von arterieller Hypertonie, peripherer arterieller Verschlusskrankheit (PAVK) und Diabetes mellitus in der Ereignisgruppe). Zudem wäre, um die Korrelation zwischen der 11-Dehydro-TXB<sub>2</sub>-Ausscheidung im Urin und thrombozytärer TX-Synthese deutlich zu machen, die Thromboxanbestimmung im Patientenserum sinnvoll gewesen, denn 11-Dehydro-Thromboxan im Urin beinhaltet auch nicht durch Thrombozyten gebildetes Thromboxan (z.B. aus Makrophagen).

Ähnliche Befunde konnten Gum et al. zeigen. Die Autoren gaben für ASS-Nonresponder ein mehr als dreifach (3,1) erhöhtes Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse an [Gum et al., 2003]. Insgesamt 5,2 % der 326 untersuchten KHK-Patienten konnten durch Messung der thrombozytären Aggregation im PRP als ASS-Nonresponder identifiziert werden (vgl. Tabelle 1). Leider war in dieser Studie die Anzahl an Ereignissen mit 10 % vergleichsweise gering.

Grottemeyer et al. (Tabelle 1) untersuchten Patienten nach einem zurückliegenden ischämischen Insult über die Dauer von zwei Jahren und verglichen ASS-Responder mit Nonrespondern im Hinblick auf Unterschiede und Häufigkeiten von kardiovaskulären Folgeerkrankungen [Grottemeyer et al., 1993]. Die Autoren grenzten dabei ASS-Responder

von ASS-Nonrespondern durch einen nicht allgemein etablierten Plättchenfunktionsassay ab, der auf Thrombozytenzählung nach Aggregation beruhte. Hiermit konnten 33 % der Patienten, die nach dem Insult mit 3 x 500 mg ASS pro Tag behandelt wurden, als ASS-Nonresponder identifiziert werden. Von den Patienten, die ein kardiovaskuläres Folgeereignis erlitten, gehörten lediglich 4,4 % (5 von 114 Patienten) zu den ASS-Respondern und 40 % (24 von 60 Patienten), rund zehnmals mehr, zu den ASS-Nonrespondern. Mit hoher statistischer Signifikanz zeigte dieses Resultat, dass ASS-Nonresponder häufiger von Ereignissen betroffen waren als ASS-Responder.

Eine Studie von Chen et al. untersuchte ASS-„resistente“ Patienten nach perkutaner transluminaler koronarer Angioplastie (PTCA) auf das postinterventionelle Auftreten von Herzmuskelnekrosen [Chen et al., 2004]. Als Nekrose-Indikatoren wurden CK-MB und Troponin I gewählt. Insgesamt 29 (19,2 %) der teilnehmenden 151 Patienten konnten mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen Tests zum Nachweis der thrombozytären ASS-Sensitivität als ASS-Nonresponder identifiziert werden (Ultegra Rapid Platelet Function Assay-ASA). ASS (80 bis 325 mg/d) wurde über den Zeitraum von mindestens einer Woche verabreicht. Zusätzlich erhielten alle Versuchspersonen Clopidogrel zur Prävention thromboembolischer Komplikationen einige Stunden vor PTCA. Eine Erhöhung der CK-MB konnte bei 51,7 % der ASS-Nonresponder und lediglich bei 24,6 % der ASS-sensitiven Patienten ( $p = 0,006$ ) gezeigt werden. Troponin I stieg bei 65,5 % der ASS-„resistenten“ Patienten an (vs. 38,5 % ASS-sensitiv,  $p = 0,012$ ). Die Autoren schlussfolgerten daraus, dass ASS-Nonresponder gegenüber ASS-sensitiven Patienten ein 2,9-fach erhöhtes Risiko für Myokardnekrosen nach PTCA haben.

Müller et al. beobachteten über einen Zeitraum von 18 Monaten 100 Patienten mit PAVK nach perkutaner Ballon-Angioplastie auf einen Reverschluss der peripheren Gefäße trotz ASS-Therapie (100 mg/d) [Müller et al., 1997]. Die ASS-Wirkung wurde mittels Vollblutaggregometrie nach Stimulation mit Arachidonsäure, ADP bzw. Kollagen überprüft. Bei klinischer Verschlechterung (Beindurchblutung bzw. Doppler-Index) erfolgte eine Angiographie. Bei allen Patienten war die Arachidonsäure-induzierte Aggregation vollständig gehemmt. 41 Patienten zeigten eine Abnahme der Aggregation auf mindestens 20 % nach Stimulation mit ADP bzw. Kollagen. Während in dieser Patientengruppe keine Reokklusion im Beobachtungszeitraum zu verzeichnen war, trat in der Gruppe von 59 Patienten mit inadäquater ASS-Wirkung in acht Fällen ein Gefäßverschluss ein. Die Autoren errechneten hieraus eine signifikante Zunahme des Reokklusionsrisikos bei ASS-Nonrespondern um den Faktor 1,9.

Im Hinblick auf die in dieser Arbeit untersuchten Bypasspatienten stellt sich die Frage nach dem Okklusionsrisiko bei ASS-„resistenten“ ACB-Patienten. Poston et al. konnte diesbezüglich in einer aktuellen Studie erstmals zeigen, dass ASS-Nonresponse in der Bypasschirurgie gehäuft zu Komplikationen führt. Hierfür untersuchten die Autoren 225 OPCAB-Patienten auf das Vorliegen einer ASS-Nonresponse (325 mg ASS/d) mit verschiedenen Messmethoden (Tabelle 1) und das Risiko eines postoperativen Bypassverschlusses. Insgesamt konnte bei 30 % der untersuchten Patienten ASS-Nonresponse beobachtet werden. Die postoperative Durchlässigkeit der transplantierten Gefäße wurde mittels CT (Computertomographie)-Koronarangiographie gemessen. Die Autoren konnten zeigen, dass bei Patienten mit ASS-Nonresponse signifikant häufiger Transplantatfrühverschlüsse auftraten ( $p < 0,04$ ). Gleichzeitig wurden bei Gefäßverschlüssen häufiger präparationsbedingte Endothelläsionen ( $p < 0,01$ ) beschrieben [Poston et al., 2006].

Den Einfluss der ASS-Dosierung hinsichtlich des Risikos eines postoperativen Transplantatverschlusses nach ACB-Operation untersuchten die Autoren Lim et al. in einer Metaanalyse. Sie fanden, dass eine „medium-dose“ ASS-Therapie (300-325 mg) das Risiko eines Transplantatverschlusses um 45 % und eine „low-dose“ ASS-Therapie (75-150 mg) das Risiko lediglich um 26 % reduzierte [Lim et al., 2003]. Die Ergebnisse legen nahe, dass eine

erhöhte ASS-Dosierung in Form von wiederholter peroraler ASS-Einzelgabe, Dosissteigerung oder veränderter Galenik nach CABG möglicherweise effektiver einen Transplantatverschluss selbst bei ASS-Nonrespondern verhindern kann als die „low-dose“ ASS-Therapie.

Zusammenfassend machen diese Studien wahrscheinlich, dass ASS-Nonresponse mit einer weniger günstigen kardiovaskulären Prognose verbunden ist. Patienten, die vermindert auf die antithrombotische Wirkung von ASS ansprachen, zeigten ein 2- bis 10-fach erhöhtes Risiko für kardiovaskuläre Folgeerkrankungen bzw. Tod. Dennoch sollte man bei der Betrachtung der Resultate nicht außer Acht lassen, dass in einigen der Untersuchungen die Patienten mit ASS-Nonresponse tendenziell ein höheres Alter hatten und insofern möglicherweise eine höhere Morbidität aufwiesen [Grottemeyer et al., 1993; Eikelboom et al., 2002].

## 4.2 Hypothesen zur Erklärung der ASS-Nonresponse

Die Mechanismen der ASS-Nonresponse sind bisher nicht vollständig geklärt. Dennoch existieren in der Literatur verschiedene Erklärungsmodelle, die hier im Folgenden dargestellt werden:

- Individuelle Unterschiede in der Pharmakokinetik:

Insbesondere für die Typ I Resistenz (vgl. 1.5) scheinen individuelle Unterschiede in der Pharmakokinetik wichtig zu sein, denn hier wird die Aggregation und Thromboxansynthese durch ASS *in vitro* ausreichend gehemmt. So ergab eine systematische Untersuchung an gesunden männlichen Probanden, dass die maximale Plasmakonzentration ( $c_{\max}$ ) und Bioverfügbarkeit, gemessen an der AUC nach oraler ASS Gabe, erheblichen intra- und interindividuellen Schwankungen unterlagen [Benedek et al., 1995; Pappas et al., 1994]. Bemerkenswert war, dass ein vermindertes Ansprechen auf ASS, gemessen anhand der thrombozytären Aggregation, mit einer verminderten systemischen Verfügbarkeit (AUC) einherging. Offenbar kann ASS-Nonresponse zumindest teilweise auf eine pharmakokinetische Variabilität, z.B. präsystemische Biotransformation zurückgeführt werden. Dennoch konnte im Rahmen dieser Studie der umgekehrte Zusammenhang nicht bestätigt werden: eine verminderte systemische Verfügbarkeit bedeutete nicht, dass die Plättchen unzureichend gehemmt waren. Daher scheint die Bedeutung der pharmakokinetischen Variation fraglich. In diesem Zusammenhang sei angemerkt, dass auch eine unzuverlässige Compliance der Patienten zu Schwankungen der Plasmakonzentrationen führen kann.

Eine reduzierte Wirksamkeit von ASS im Sinne einer Typ I Resistenz könnte darüber hinaus auch auf der deutlich erhöhten Regenerationsrate (turnover) der Thrombozyten nach extrakorporaler Zirkulation in Kombination mit der kurzen Plasmahalbwertszeit von ASS (15-20 Minuten) beruhen. Unter der Annahme, dass Thrombozyten eine durchschnittliche Lebensdauer von etwa zehn Tagen haben, beträgt die tägliche Umsatzrate ungefähr 10 %. In den eigenen Untersuchungen war im Anschluss an die HLM-bedingte Thrombozytendepletion am ersten postoperativen Tag ein signifikanter Anstieg der Plättchenzahl am fünften postoperativen Tag zu beobachten (vgl. 3.1). Sofern die thrombozytäre Lebensdauer nach extrakorporaler Zirkulation nicht verkürzt ist, steigt somit die tägliche Regenerationsrate. Bei einer einmaligen ASS-Einnahme pro Tag ist es daher denkbar, dass ein beträchtlicher Anteil der neu synthetisierten Thrombozyten aufgrund der kurzen HWZ von ASS nicht mit ASS in Kontakt kommt und damit die Thrombozytenhemmung unvollständig wird, zumal der Anteil zirkulierender Thrombozyten mit nicht-acetylierter COX 10 % nicht überschreiten sollte, um eine ausreichende Aggregationshemmung zu gewährleisten [Di Minno et al., 1983]. Nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit wurde jedoch in Gegenwart von 30 bzw. 100  $\mu\text{M}$

ASS *in vitro* die TX-Synthese und Aggregation in nur geringem Maße gehemmt (vgl. 3.2 und 3.3). Daher kann die Ursache von ASS-Nonresponse nicht ausschließlich in einer herabgesetzten Bioverfügbarkeit und einer erhöhten Thrombozytenregeneration begründet sein, zumal auch nach OPCAB ASS-Nonresponse auftrat, sondern muss vielmehr auf thrombozytärer Ebene gesucht werden. Eine Typ I Resistenz kann bei den untersuchten CABG-Patienten ausgeschlossen werden.

- Polymorphismen oder Mutationen der COX-1 bzw. Modifikation auf Proteinebene:  
Halushka et al. identifizierten in einer Studie genetische Variationen der COX-1 und untersuchten ihre Hemmbarkeit durch ASS. Sie fanden, dass 2 SNPs (single-nucleotide Polymorphismen), A842G und C50T ein Bindungsungleichgewicht aufwiesen. Bei Untersuchungsteilnehmern, die heterozygot für den Haplotyp A842G/C50T waren, konnte ASS (30  $\mu$ M) einen größeren Hemmeffekt im Vergleich mit homozygoten Merkmalsträgern erzielen [Halushka et al., 2003]. Ob dieser Haplotyp mit einer veränderten Sensitivität gegenüber ASS einhergeht, bleibt jedoch offen, scheint aber wenig wahrscheinlich (vgl. 4.5). Nitrierung der thrombozytären COX auf Proteinebene wurde ebenfalls beschrieben. Sie ging mit Veränderungen der katalytischen Aktivität des Enzyms einher [Boulos et al., 2000]. Bislang ist jedoch nicht bekannt, ob hierdurch die Interaktion der COX mit ASS betroffen ist.
- Prostaglandin-unabhängige Aktivierungswege:  
Hierzu zählen die durch Katecholamine, ADP, Scherstress und Thrombin induzierte Aggregation, sowie die Erythrozyten-induzierte Plättchenaktivierung. Thrombozyten können z.B. über  $\alpha$ -adrenerge Rezeptoren ( $\alpha_{2A}$ ) Thromboxan-unabhängig aktiviert werden [Gawaz, 1999]. Larsson et al. zeigten bei gesunden Probanden, die 12 Stunden zuvor 500 mg ASS erhielten, dass Infusionen mit Noradrenalin die Plättchen trotz ASS Gabe aktivierten [Larsson et al., 1994]. Dieser Weg der Plättchenaktivierung ist bei CABG-Patienten infolge der endogenen Katecholaminfreisetzung während der Myokardrevaskularisation und durch ggf. exogen zugeführte Katecholamine postoperativ möglicherweise von Bedeutung [Zamparelli et al., 2000; Wildhirt et al., 2001]. Plättchen können ebenfalls Thromboxan-unabhängig durch Scherstress aktiviert werden [Moake et al., 1988]. Dieser Aktivierungsweg ist unabhängig von der ASS-vermittelten Thrombozytenhemmung [Maalej et al., 1996]. Erythrozyten können Thrombozyten trotz Medikation mit ASS über Zell-Zellkontakte aktivieren, wobei Serotonin und ADP als endogene Aktivatoren Bedeutung haben [Santos et al., 1991]. In einer Studie von Valles et al. wurde der Effekt von „low-dose“ ASS bei Patienten mit KHK bzw. Apoplex untersucht. Der Rekrutmentversuch (Untersuchung der aggregationsauslösenden Wirkung von proaggregatorischen Substanzen, die kurz nach Inkubation einer Zellsuspension mit dem Stimulus entstehen) zeigte, dass in Gegenwart von Erythrozyten ASS die Thrombozyten bei rund 60 % der Patienten nicht adäquat hemmen konnte [Valles et al., 1998]. Dabei scheint der Mechanismus der Thrombozytenaktivierung COX-unabhängig zu verlaufen, da ASS bei allen Versuchsteilnehmern die Thromboxansynthese suffizient unterbinden konnte. Bei gesunden Probanden konnte der prothrombotische Effekt der Erythrozyten durch ASS dosisabhängig verhindert werden [Santos et al., 1997]. Die Erythrozyten-induzierte Plättchenaktivierung kann jedoch in der eigenen Arbeit als Ursache für ASS-Nonresponse vernachlässigt werden, da auch bei den *in vitro* Versuchen, in denen generell PRP und kein Vollblut verwendet wurde, ASS-Nonresponse auftrat.

- Hyperreaktive Plättchen:

Ein weiterer möglicher Erklärungsansatz der ASS-Nonresponse ist die Hyperreaktion der Plättchen auf den gegebenen Stimulus. Kawasaki et al. gingen dieser Vermutung nach und untersuchten gesunde Probanden anhand der Blutungszeit auf eine erhöhte Sensitivität gegenüber dem Stimulus Kollagen. Die Autoren fanden, dass die ED<sub>50</sub> Werte für Kollagen niedriger bei den ASS-„resistenten“ Versuchsteilnehmern waren als bei den ASS-Respondern (0,91 µg/ml vs. 0,48 µg/ml). Sie schlussfolgerten, dass ASS-Nonresponse auf einer Hyperreaktivität der Thrombozyten beruhe [Kawasaki et al., 2000]. Andere Arbeiten konnten zudem eine Sensibilisierung des Kollagen-Rezeptors bei Patienten mit kardiovaskulären Grunderkrankungen nachweisen, welche zu einer Hyperreaktivität gegenüber Kollagen beitragen kann [Calverley et al., 2002].

Auch nach ACB-Operation wurde eine thrombozytäre Hyperreaktivität beobachtet. Hierfür untersuchte die Arbeitsgruppe um Golanski Plättchen von 32 CABG-Patienten mittels Kollagen (2 µg/ml)- und ADP (20 µM)-induzierter Vollblutaggregometrie sowie Scherkraft-induzierter Plättchenadhäsion (PFA) an einer Kollagen-beschichteten Membran. Zudem testeten sie auf genetischen Variationen der thrombozytären Glykoproteinstruktur mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Sie zeigten eine thrombozytäre Hyperreaktion bei 47 % der Patienten nach Stimulation mit Kollagen (Impedanz > 24 Ω) und bei 41 % der Patienten nach Stimulation mit ADP (Impedanz > 12 Ω). Die aktiveren Plättchen wiesen zudem häufiger einen Polymorphismus der Adhäsionsmoleküle GPIa (GPIa<sup>807</sup>C/T) und der IIIa-Untereinheit des GPIIb/IIIa-Rezeptors (GPIIIa PI<sup>A1/A2</sup>) auf als weniger aktive Thrombozyten [Golanski et al., 2001]. Die Autoren folgerten eine Verbindung zwischen Hyperreaktivität der Plättchen und der Glykoproteinstruktur. Offensichtlich existieren mehrere unterschiedliche Ansätze für eine thrombozytäre Hyperreaktivität.

In der vorliegenden Arbeit wurde als Stimulus Arachidonsäure verwendet. Um eine erhöhte Sensitivität der Thrombozyten gegenüber Thromboxan nachzuweisen, wurden die individuellen TX-Konzentrationen und die simultan gemessene Aggregation in Beziehung gesetzt (vgl. 3.5). Die Frage, ob die Sensitivität gegenüber endogen gebildetem Thromboxan erhöht ist, war insofern von besonderem Interesse, als bei akuter Myokardischämie eine Hochregulation der thrombozytären Thromboxanrezeptoren beschrieben wurde [Dorn et al., 1990]. Die Befunde der eigenen Arbeit belegen jedoch, dass in der Gruppe der ASS-Responder wie in der Gruppe der Nonresponder die Korrelation nahezu identisch war und somit keine gesteigerte Sensitivität gegenüber Thromboxan bei ASS-Nonresponse vorlag.

- Arzneimittelinteraktionen:

Für die hier beschriebenen CABG-Patienten wurden im Rahmen des operativen Eingriffes verschiedene Narkotika verwendet, die ebenfalls die Thrombozytenfunktion beeinflussen können. Zur Anwendung kamen Thiopental (Barbiturat) zur Einleitung und Enfluran (Inhalationsanästhetikum) zur Aufrechterhaltung der Narkose. Als zentrales Analgetikum wurde Fentanyl und zur Muskelrelaxation Pancuronium verwendet. In der Literatur lassen sich verschiedene und kontroverse Aussagen über den Einfluss einiger dieser Arzneistoffe auf die Plättchenfunktion finden. So wurde z.B. unter dem Einfluss von Thiopental eine gesteigerte sekundäre Plättchenaggregation beschrieben, und unter Einsatz von Enfluran konnte ein Anstieg der TX-Synthese beobachtet werden [Kitamura et al., 2001; Kaukinen et al., 1987]. Eine direkte Beeinflussung der Plättchenfunktion durch Anästhetika scheint daher möglich, jedoch besteht für eine Interferenz mit ASS kein unmittelbarer Anhaltspunkt.

- COX-unabhängige Bildung von Isoprostanen:  
Isoprostane sind biologisch aktive Prostaglandin (PG)-ähnliche Verbindungen, die auf nichtenzymatischem Weg aus Arachidonsäure durch Lipidperoxidation mit Sauerstoffradikalen entstehen [Morrow et al., 1990]. Es gibt Hinweise, dass Isoprostane auch durch die Aktivität der COX produziert werden [Pratico et al., 1995]. F<sub>2</sub> Isoprostane gehören zu der Familie der PGF<sub>2α</sub>-Isomere und können im Plasma und im Urin nachgewiesen werden [Awad et al., 1993]. Eines dieser Isomere, 8-iso-PGF<sub>2α</sub>, ist ein starker Vasokonstriktor, kann von aktivierten Thrombozyten gebildet werden und wirkt aggregationsfördernd. 8-iso-PGF<sub>2α</sub> führt dosisabhängig zu einer irreversiblen Plättchenaggregation in Anwesenheit von Plättchenagonisten wie Kollagen, ADP und Arachidonsäure. Isoprostane wurden auch im Plasma von Patienten nach CABG nachgewiesen [Delanty et al., 1997]. ASS in niedriger Dosierung konnte dabei die Isoprostanbildung nicht unterdrücken. Daher könnten Isoprostane und ihre Plättchenaktivierungswege zur ASS-Nonresponse beitragen [Wang et al., 1995; Csiszar et al., 2002]. Jedoch lassen die eigenen Ergebnisse eine Rolle der Isoprostane bei ASS-Nonresponse unwahrscheinlich erscheinen, denn in der vorliegenden Arbeit konnte in den zeitkinetischen Untersuchungen gezeigt werden, dass selbst ASS-„resistente“ Plättchen in einem definierten Zeitintervall adäquat durch ASS gehemmt werden konnten. Folglich kann eine Beteiligung von Isoprostanen bei ASS-Nonresponse ausgeschlossen werden.
- Interaktionen von Thrombozyten mit kernhaltigen Zellen:  
Kernhaltige Zellen, wie Endothelzellen oder Monozyten, sind in der Lage, PGH<sub>2</sub> für Thrombozyten transzellulär zur Verfügung zu stellen. Karim et al. inkubierten durch ASS gehemmte Thrombozyten mit unbehandelten Endothelzellen und konnten nach Stimulation mit Thrombin einen Anstieg der Thromboxansynthese messen. Bei gleichzeitiger Vorbehandlung der Thrombozyten und der Endothelzellen mit ASS *in vitro* (100 μM) verloren die Endothelzellen nicht nur die Fähigkeit, PGH<sub>2</sub> und PGI<sub>2</sub> zu bilden, sondern auch über den transzellulären Metabolismus Thromboxan zu synthetisieren. Erst eine Induktion der COX-2 in ASS-vorbehandelten Endothelzellen durch z.B. IL-1α konnte die PGH<sub>2</sub>-Synthese wiederherstellen. Das auf diese Weise gebildete PGH<sub>2</sub> konnte wiederum durch ASS gehemmte Thrombozyten transzellulär zu Thromboxan umgewandelt werden. Hierdurch besteht die Möglichkeit, die thrombozytäre COX-1 zu umgehen und aus dem transzellulär bereitgestellten PGH<sub>2</sub> mittels thrombozytärer Thromoxansynthese Thromboxan zu bilden [Karim et al., 1996]. Vor dem Hintergrund der eigenen Ergebnisse ist jedoch anzunehmen, dass bei ASS-Nonresponse die Interaktion der thrombozytären COX mit ASS gestört ist, denn auch ASS-„resistente“ Plättchen ließen sich bei erhöhter Konzentration oder verlängerter Expositionszeit adäquat durch ASS hemmen. Zudem kann durch das Versuchsprotokoll (Verwendung von PRP) ein Kontakt zu Endothelzellen ausgeschlossen werden. Ein transzellulärer Metabolismus kann daher die ASS-Nonresponse in der vorliegenden Arbeit nicht hinreichend erklären.
- Gesteigerte Synthese von 12-HETE:  
Buchanan et al. beschrieben eine Korrelation zwischen ASS-Nonresponse und dem Nachweis von 12-HETE (12-Hydroxyeikosatetraensäure). 12-HETE ist ein Metabolit der Arachidonsäure, welcher via 12-Lipoxygenase entsteht. ASS-„resistente“ Patienten und Probanden zeigten eine normale bis verkürzte Blutungszeit in Kombination mit einer deutlich erhöhten Adhäsion und 12-HETE-Synthese [Buchanan und Brister, 1995]. Dabei erhöhte 12-HETE die Adhäsionsfähigkeit der Plättchen vermutlich durch Sensitivitätssteigerung der Adhäsionsrezeptoren [Buchanan et al., 1986]. Die vermehrte 12-HETE-Produktion entsteht nach Meinung der Autoren durch Verlagerung des Arachidonsäuremetabolismus zu Gunsten des Lipoxygenase-Weges, da die COX durch

ASS irreversibel inhibiert wird. Vor dem Hintergrund der eigenen Ergebnisse ist die Bedeutung einer gesteigerten 12-HETE-Synthese für ASS-Nonresponse jedoch fraglich. Die zeitabhängige Hemmung selbst ASS-„resistenter“ Thrombozyten durch ASS spricht dafür, dass die COX der zentrale Punkt in der Entstehung einer ASS-Nonresponse ist, bzw. eine gestörte Interaktion des Enzyms mit ASS vorliegt. Somit kann die Vermutung, ASS-Nonresponse beruhe auf einer gesteigerten 12-HETE-Produktion, nicht bestätigt werden.

- Induktion der Cyclooxygenase-2 in Thrombozyten:  
Auf diesen Punkt wird in Kapitel 4.4 ausführlich eingegangen.

### 4.3 Einfluss der Operationsmethode auf ASS-Nonresponse

Die Myokardrevaskularisierung ohne den Einsatz der Herz-Lungen-Maschine ist eine interessante und neue Alternative zur konventionellen ACB-Operation mit extrakorporaler Zirkulation, unter anderem aufgrund der signifikanten Reduktion des postoperativen Blutverlustes infolge geringerer Depletion und mechanischer Schädigung der Thrombozyten [Nader et al., 1999]. Auch in der vorliegenden Arbeit wurden ca. 5 % der untersuchten Patienten mit dieser Methode operiert. Interessant erschien vor diesem Hintergrund die Frage, welchen Einfluss die Operationsmethode auf die postoperative Sensitivität der Thrombozyten gegenüber ASS hat.

Bei ACB-Patienten, die mit HLM operiert wurden, konnte eine signifikante Reduktion der Plättchenzahlen am ersten postoperativen Tag gegenüber dem präoperativen Kontrollwert und gegenüber den OPCAB-Patienten verzeichnet werden. Casati et al. kamen zu gleichen Ergebnissen. Sie zeigten eine Reduktion der Thrombozytenzahlen 24 h nach CABG mit HLM um 32 %, wo hingegen bei den OPCAB-Patienten die Plättchenzahlen lediglich um 14 % sanken. Die Abnahme der Thrombozytenzahlen bei den ACB-Patienten mit HLM war dabei um etwa 24 % größer als bei den Patienten ohne HLM ( $p = 0,001$ ) [Casati et al., 2001]. Ursächlich hierfür könnte im Rahmen der extrakorporalen Zirkulation eine verstärkte Hämodilution, darüber hinaus eine Destruktion bzw. Adhäsion von Thrombozyten in der Herz-Lungen-Maschine sein. Zudem führt die Verwendung der extrakorporalen Zirkulation zu einer Aktivierung und partiellen Depletion der Thrombozyten [Hyde et al., 1998; Weerasinghe und Kenneth, 1998]. Am fünften postoperativen Tag konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass es nur bei den CABG-Patienten mit HLM zu einem signifikanten Anstieg der Plättchenzahl im Vergleich zu den OPCAB-Patienten kam, offenbar infolge einer überschießenden Regeneration der Plättchen (vgl. 4.2).

Die erhöhte Regenerationsrate stellt dabei möglicherweise einen Grund für die verminderte Wirksamkeit von ASS dar. Diesbezüglich zeigten Di Minno et al. in einer *in vitro*-Studie, dass nur etwa 10 % unbehandelte Thrombozyten (mit nicht-acetylierter Cyclooxygenase) in einer sonst durch ASS gehemmten Thrombozytensuspension ausreichen, um nach Stimulation mit Arachidonsäure (1  $\mu\text{M}$ ) bzw. Kollagen (1  $\mu\text{g/ml}$ ) eine vollständige Aggregation und Sekretion auszulösen [Di Minno et al., 1983]. Da ASS infolge der raschen Deacetylierung im Blut eine kurze Halbwertszeit im Plasma aufweist (15-20 Minuten), verfügen die innerhalb des üblichen Dosierungsintervalls von 1 Tag neu gebildeten Thrombozyten bis zur nächsten Dosis zunächst über eine intakte Thromboxansynthese. Bei einer einmaligen ASS-Einnahme pro Tag ist es denkbar, dass ein beträchtlicher Anteil der neu synthetisierten Thrombozyten aufgrund der kurzen Halbwertszeit von ASS nicht mit ASS in Berührung kommt und damit die Plättchenhemmung unvollständig wird.

Dennoch konnte in beiden Patientenkollektiven (mit und ohne HLM) der vorliegenden Untersuchung nach fünftägiger oraler ASS-Therapie (100 mg/d) keine adäquate Hemmung

der Aggregation und TX-Synthese erzielt werden. Auch der Zusatz von ASS *in vitro* (30 bzw. 100 µM) hemmte postoperativ in beiden Operationsgruppen die thrombozytären Funktionen nicht suffizient. Tendenziell bestand eine geringere TX-Synthese und Aggregation bei ACB-Patienten mit HLM am ersten postoperativen Tag als in der Vergleichsgruppe. Am fünften postoperativen Tag zeigte sich in der Gruppe mit HLM ein signifikanter Anstieg der Thromboxansynthese und Aggregation gegenüber dem ersten postoperativen Tag trotz oraler ASS Medikation. Obgleich die OPCAB-Patienten keinen Anstieg der Thrombozytenzahl und thrombozytären Funktionen zeigten, konnte auch hier ASS-Nonresponse nachgewiesen werden. Demnach kann die verstärkte Plättchenregeneration infolge HLM die ASS-Nonresponse nicht erklären.

Wildhirt et al. zeigten in einer Untersuchung an jeweils 13 OPCAB- und CABG-Patienten mit HLM, dass die Revaskularisierung mittels HLM zu einer signifikant höheren Expression von P-Selektin und ICAM-1 führte. Zudem wurden vermehrt Katecholamine im Plasma der CABG-Patienten mit HLM nachgewiesen [Wildhirt et al., 2001]. P-Selektin und ICAM-1 sind vaskuläre Adhäsionsrezeptoren. P-Selektin spielt eine zentrale Rolle bei der sekundären Hämostase und Katecholamine aktivieren Thrombozyten TX-unabhängig (vgl. 4.2). Proinflammatorische Zytokine, wie Interleukin (IL) 1, 6 und 8, Tumornekrosefaktor (TNF-α) und C-reaktives Protein konnten ebenfalls im Plasma von CABG-Patienten mit HLM in signifikant höherem Ausmaß nachgewiesen werden als bei OPCAB-Patienten [Lahat et al., 1992; Strüber et al., 1999; Schulze et al., 2000].

Hinsichtlich der TX-Konzentration im Plasma von Patienten nach Bypassoperation mit HLM beschrieben Erez et al., dass nach Lungenreperfusion ein signifikanter Anstieg der TX-Konzentration messbar war. Nach Auffassung der Autoren ist dieser Thromboxananstieg dadurch zu begründen, dass auch in der Lunge während der Abklemmzeit Thromboxan gebildet wird, welches nach Reperfusion vermehrt im Plasma messbar ist [Erez et al., 1998]. Die genannten Faktoren in Verbindung mit intraoperativer Hypothermie führen ihrerseits zu einer thrombozytären Aktivierung.

Zusammenfassend konnte in beiden Operationsgruppen (mit und ohne HLM) ASS-Nonresponse nachgewiesen werden. Erhöhte Konzentrationen von Zytokinen, Chemokinen und Katecholaminen im Plasma und die Expression von Adhäsionsrezeptoren in der CABG-Gruppe mit HLM könnten ein Erklärungsmodell für den postoperativen Anstieg der thrombozytären Aggregation und TX-Synthese trotz ASS-Therapie darstellen. Der Einsatz der extrakorporalen Zirkulation scheint aber kein notwendiger Faktor für die Entstehung einer postoperativen ASS-Nonresponse zu sein.

#### **4.4 Cyclooxygenase-2 als möglicher Mechanismus für ASS-Nonresponse**

Die Cyclooxygenase existiert als ubiquitär vorkommende COX-1 und als COX-2 [Vane et al., 1998]. Die erst kürzlich beschriebene COX-3 ist dagegen lediglich eine modifizierte Form der COX-1 [Chandrasekharan et al., 2002]. Im Thrombozyten beruht die TX-Synthese im Wesentlichen auf der COX-1 und bietet den Hauptangriffspunkt für die Inhibition mit ASS, denn ASS hemmt diese Isoform 150 bis 200 -mal potenter als die COX-2 [Vane et al., 1998; Mitchell et al., 1994]. In der eigenen Arbeitsgruppe gelang es, in gewaschenen Thrombozyten neben der COX-1 auch mRNA und Protein der induzierbaren Isoform, COX-2, nachzuweisen [Weber et al., 1999]. In der Annahme, dass es einer 90 %-igen Hemmung der Thromboxansynthese bedarf um einen antithrombotischen Effekt durch ASS zu erzielen, da aktivierte Thrombozyten Thromboxan im Überschuss produzieren, würde eine im Vergleich zu COX-1 nur geringe Aktivität der COX-2 im Thrombozyten ausreichen, um die Wirkung von ASS erheblich zu reduzieren oder ganz aufzuheben [FitzGerald et al., 1985; Hohlfeld und Schrör, 1998].

Auch in der vorliegenden Arbeit gelang es, COX-2 in humanen Thrombozyten zu detektieren. Da Thrombozyten jedoch keinen Zellkern besitzen, sind sie nicht oder nur sehr begrenzt in der Lage, Proteine neu zu synthetisieren. Wahrscheinlicher ist es daher, dass die Induktion der COX-2 in der Vorläuferzelle, dem Megakaryozyten, geschieht. Diesen Nachweis erbrachten 2002 Rocca et al., indem sie Megakaryozyten aus humanen Knochenmarksbiopsien kultivierten. Die Autoren zeigten auch, dass der Anteil an COX-2 positiven Plättchen bei gesunden Probanden geringer als 10 % ist. Lag jedoch krankheitsbedingt ein erhöhter Plättchenumsatz vor, betrug der Anteil COX-2 positiver Thrombozyten bis zu 60 % [Rocca et al., 2002]. CABG-Patienten weisen aufgrund der Thrombozytendepletion nach EKZ zwischen Tag 1 und 5 eine beschleunigte Plättchenregeneration auf (Abb. 4). Eine verstärkte COX-2 Induktion in Megakaryozyten bei CABG-Patienten ist demnach plausibel. Zudem werden postoperativ vermehrt proinflammatorische Zytokine (Interleukin 1, 6 und 8 sowie TNF- $\alpha$ ) sezerniert, die wiederum COX-2 induzieren können [Lahat et al., 1992; Strüber et al., 1999; Schulze et al., 2000; Vane et al., 1998]. In der semiquantitativen Auswertung der COX-2 Immundetektion ließen sich in der vorliegenden Arbeit jedoch keine Unterschiede bei erheblicher interindividueller Variabilität zwischen ASS-„resistenten“ und ASS-sensitiven ACB-Patienten finden.

Die thrombozytäre TX-Synthese der von Rocca et al. untersuchten Patienten (mit erhöhtem Plättchenumsatz) konnte anders als bei gesunden Probanden mit dem relativ COX-2 selektiven Inhibitor NS-398 gehemmt werden. Aus diesem Ergebnis formulierten sie die Hypothese, dass die COX-2 abhängige TX-Synthese eine potentielle Ursache für ASS-Nonresponse darstellen könnte [Rocca et al., 2002]. Allerdings wurde die thrombozytäre TX-Synthese der Patienten auch durch 50  $\mu$ M ASS gehemmt, eine Konzentration, die bevorzugt die COX-1, nicht jedoch die COX-2 hemmt (s.o.). In Begleituntersuchungen zur vorliegenden Arbeit gelang es dementsprechend auch nicht, die thrombozytäre TX-Synthese bei CABG-Patienten mit dem COX-2 selektiven Inhibitor Celecoxib adäquat zu hemmen, obwohl die gewählte Konzentration mit 1  $\mu$ M die IC<sub>50</sub> von Celecoxib mehr als 100-fach übertraf [Zimmermann et al., 2003].

Ob die kürzlich beschriebene COX-3 am Resistenzmechanismus beteiligt ist, ist ebenfalls wenig wahrscheinlich. Die IC<sub>50</sub> Werte für die COX-1 und -3 für ASS sind mit 10 und 3  $\mu$ M nahezu identisch und weitaus niedriger als die für die COX-2 (> 1000  $\mu$ M) [Chandrasekharan et al., 2002]. Folglich wäre bei erhöhter COX-3 eine verminderte Sensitivität gegenüber ASS gar nicht zu erwarten. Zusammenfassend ist eine Bedeutung der thrombozytären COX-2 für die Nonresponse gegenüber ASS bei Patienten nach CABG nicht wahrscheinlich.

#### **4.5 Pharmakologische Konzepte zur Überwindung der ASS-Nonresponse**

Die Hemmung der Cyclooxygenase durch ASS erfolgt durch kovalente Bindung des Acetylrestes nahe dem aktiven Zentrum des Enzyms. Im Unterschied zu einer reversiblen Enzymhemmung nimmt bei einer irreversiblen Enzymhemmung, wie es bei ASS der Fall ist, die Enzymaktivität über die Zeit ab. Der hemmende Effekt von ASS hängt daher ganz entscheidend von der Expositionszeit von ASS gegenüber der COX ab. Aus diesem Grund ist als Ursache der ASS-Nonresponse ein „Ungleichgewicht“ zwischen der zeitabhängigen COX-Hemmung und der kurzen Plasmahalbwertszeit von ASS (15-20 Minuten) denkbar. Um dies zu klären, wurde der Zeitverlauf der ASS-Wirkung mit 5 bzw. 10  $\mu$ M ASS *in vitro* untersucht. Die gewählten ASS-Konzentrationen werden im humanen Plasma nach oraler ASS Aufnahme erreicht (80 mg ASS, c<sub>max</sub>: 5  $\mu$ M) [Benedek et al., 1995].

Bei *in vitro* Exposition der Thrombozyten gegenüber 5 bzw. 10  $\mu$ M ASS konnte eine kontinuierliche Abnahme der Aggregation, TX-Synthese und ATP-Sekretion registriert werden. Darüber hinaus ergaben die Untersuchungen, dass mit erhöhter Konzentration

(10  $\mu$ M ASS) selbst die „resistenten“ Plättchen hinsichtlich Aggregation, TX-Synthese und ATP-Sekretion innerhalb eines kürzeren Zeitintervalls (< 60 min) vollständig gehemmt werden konnten. Die ASS-Wirkung war demnach bei „resistenten“ Thrombozyten nicht aufgehoben, sondern lediglich zeitlich verzögert. Die HWZ von ASS, die nur ca. 15-20 Minuten beträgt, erscheint zu kurz, um die Thromboxansynthese und Aggregation bei ASS-Nonrespondern innerhalb des Dosierungsintervalls vollständig zu hemmen. Wenn die Exposition der Plättchen gegenüber ASS über einen längeren Zeitraum erfolgen oder die Konzentration gesteigert würde, wäre eine suffiziente Thrombozytenhemmung selbst bei ASS-Nonresponse möglich.

Eine weitere Möglichkeit, um ASS-„resistente“ Plättchen durch ASS zu hemmen, könnte eine individuelle Dosisanpassung sein. Diesbezüglich zeigten Helgason et al. in einer Studie mit Apoplexpatienten, dass der antiaggregatorische Effekt einer festgelegten ASS-Dosis nicht bei allen Patienten konstant war [Helgason et al., 1994]. Rund 30 % der Patienten mit initial suffizient gehemmter Thrombozytenfunktion konvertierten in eine ASS-Nonresponse mit unzureichender ASS-Wirkung. Dieser Wirkungsverlust konnte jedoch durch eine perorale ASS-Dosissteigerung kompensiert werden. Nur bei 8 % der ASS-„resistenten“ Patienten konnte auch eine Dosissteigerung auf 1300 mg ASS keine ausreichende Hemmung der thrombozytären Aggregation erzielen. Eine Dosisabhängigkeit wurde auch in anderen Arbeiten belegt. So zeigten Patrignani et al. eine log-lineare dosisabhängige Hemmung der TX-Synthese durch ASS (6-100 mg) bei gesunden Probanden [Patrignani et al., 1982]. Auch die Untersuchungen an Thrombozyten von ACB-Patienten in der vorliegenden Arbeit ergaben eine dosisabhängige ASS-Wirkung. Nur so war es möglich mit erhöhter ASS-Konzentration (10  $\mu$ M ASS) auch „resistente“ Plättchen innerhalb eines kürzeren Zeitintervalls (< 60 min) vollständig zu hemmen.

Neben der gezeigten Dosisabhängigkeit von ASS bezüglich der Hemmung der thrombozytären TX-Synthese, Aggregation und ATP-Sekretion ist jedoch auch die klinische Evidenz der Prävention von Bypassverschlüssen von Bedeutung. Die publizierten Studien hierzu sind jedoch kontrovers. So konnten z.B. Goldmann et al. [1988 und 1989] keinen Vorteil einer dreimaligen ASS-Gabe nach ACB-Operation gegenüber einer einmaligen Dosis von jeweils 325 mg nachweisen. Dennoch dokumentierten Lim et al., dass im Hinblick auf den postoperativen Transplantatverschluss nach ACB-Operation eine Dosisabhängigkeit besteht. Sie zeigten, dass eine „medium-dose“ ASS-Therapie (300-325 mg) das Risiko eines Transplantatverschlusses um 45 % und eine „low-dose“ ASS-Therapie (75-150 mg) das Risiko lediglich um 26 % reduzierte [Lim et al., 2003].

Die Befunde sprechen dafür, dass die COX-1 ein zentraler Punkt in der Entstehung der ASS-Nonresponse ist, bzw. die Interaktion zwischen dem Enzym und ASS beeinträchtigt ist. Dabei erscheinen Modifikationen der COX-1 (SNP), wie sie bereits von Halushka et al. beschrieben wurden (vgl. 4.2), vor dem Hintergrund der eigenen Ergebnisse als Ursache für ASS-Nonresponse unwahrscheinlich, denn die thrombozytären Funktionen (Aggregation, TX-Synthese und ATP-Sekretion) ließen sich selbst bei ASS-Nonrespondern in der zeitkinetischen Untersuchung adäquat durch ASS hemmen. Dies stellt generell die Bedeutung genetischer Variationen der COX-1 als Ursache für ASS-Nonresponse in Frage. Neben Modifikationen der thrombozytären COX-1 wurde auch Nitrierung, die mit Veränderungen der katalytischen Aktivität des Enzyms einherging, beschrieben [Boulos et al., 2000]. Bislang gibt es jedoch keinen Anhaltspunkt dafür, dass hierdurch die Interaktion der COX mit ASS betroffen oder gar gestört ist.

Infolge der raschen Deacetylierung von ASS im Blut (HWZ 15-20 min) verfügen die innerhalb des üblichen Dosierungsintervalls von einem Tag neu gebildeten Thrombozyten bis zur nächsten Dosis zunächst über eine intakte Thromboxansynthese. Die Wirksamkeit von ASS ist wahrscheinlich eingeschränkt, wenn die Regenerationsrate den Normalwert von 10 % des Thrombozytenpools pro Tag deutlich übersteigt [Di Minno et al., 1983; Schrör, 1992]. Da

ein erhöhter Plättchenumsatz vermutlich auch eine ASS-Nonresponse mit verursachen kann, erscheinen ein verkürztes Dosierungsintervall, eine Dosissteigerung oder eine veränderte Galenik mit verzögerter Freisetzungskinetik bei ASS-Nonresponse als denkbare Strategie, eine adäquate Hemmung der Thrombozytenfunktion zu erzielen [Clarke et al., 1991].

Anhand der gezeigten Ergebnisse ist eine gestörte Interaktion der COX-1 mit ASS als Ursache der ASS-Nonresponse wahrscheinlich. Ob ein verändertes Therapieprotokoll die Entstehung einer ASS-Nonresponse verhindern bzw. überwinden kann, muss noch im Rahmen prospektiver klinischer Studien gesichert werden.

#### **4.6 Alternative antithrombotische Therapie-Möglichkeiten bei ASS-Nonresponse**

ASS-Nonresponse besitzt relevante Auswirkungen auf die kardiovaskuläre Prognose im Sinne eines 2- bis 10-fach erhöhten Risikos für kardiovaskuläre Ereignisse (vgl. 4.1). Es stellt sich daher die Frage nach anderen geeigneten antithrombozytären Substanzen, die nach ACB-Operation optimal vor thrombotischen Ereignissen schützen können.

Im Arachidonsäuremetabolismus gibt es außer der Inhibition der COX z.B. durch ASS auch die Möglichkeit, das nachgeschaltete Enzym, die Thromboxansynthase, oder den TXA<sub>2</sub>-Rezeptor (TP-Rezeptor), zu hemmen. Dazoxiben ist ein Imidazolderivat und gehört zur Klasse der Thromboxansynthase-Inhibitoren. Durch die Hemmung der TX-Synthese entsteht neben Prostacyclin und PGD<sub>2</sub> (precursor-Austausch zwischen Thrombozyten und Endothel) auch vermehrt PGH<sub>2</sub>. PGH<sub>2</sub> ist ein starker Plättchenaktivator, welcher Thrombozyten über Thromboxanrezeptoren aktiviert [Mayeux et al., 1988; Patscheke et al., 1990]. Thromboxansynthase-Inhibitoren hemmen reversibel, daher ist eine vergleichsweise hohe Plasmakonzentration und lange -Halbwertszeit erforderlich, um eine kontinuierliche Suppression der TX-Synthese zu gewährleisten. Abgesehen von einem erhöhten Blutungsrisiko sind für diese Substanzgruppe zwar keine gravierenden Risiken bekannt, aber klinische Studien konnten auch keine Vorteile sichern [FitzGerald et al., 1985; Hohlfeld und Schrör, 1998].

Eine weitere Substanzgruppe für die antithrombotische Therapie sind Thromboxanrezeptorantagonisten. Kompetitive Antagonisten, wie Sulotroban und Vapiprost, hemmen selektiv die Wirkung von TXA<sub>2</sub> und PGH<sub>2</sub>. Dieser kann jedoch bei kompetitiver Rezeptorblockade mit sehr hohen Konzentrationen TXA<sub>2</sub> oder PGH<sub>2</sub> aufgehoben werden [Patscheke et al., 1990]. Sulotroban wurde in einer Placebo-kontrollierten Studie im Vergleich zu ASS nach PTCA auf das Auftreten von Restenosen, Myokardinfarkten oder den Tod untersucht. Dabei kam es bei 30 % der ASS-Gruppe, jedoch bei 44 % der Sulotroban-Gruppe und bei 41 % der Placebo-Gruppe zu einem Folgeereignis innerhalb der ersten 6 Monate nach Koronarangioplastie [Savage et al., 1995]. Anders als in Tierexperimenten, in denen TX-Rezeptorantagonisten gute antithrombotische und kardioprotektive Ergebnissen zeigten, konnten hier keine Vorteile gesichert werden [Nair et al., 2001].

Die kombinierte Hemmung von Thromboxansynthase und TX-Rezeptoren erscheint vor dem Hintergrund, dass das Substrat der Thromboxansynthase (PGH<sub>2</sub>) etwa äquipotent TX-Rezeptoren aktivieren kann, sehr sinnvoll. Die erste dieser Substanzen, die beide Wirkungen in sich vereinigt, war Ridogrel. In der RAPT-Studie wurde dieser Hemmstoff erstmals an Patienten mit akutem Herzinfarkt gegenüber ASS getestet. Die Autoren konnten keine signifikanten Unterschiede in der koronaren Reverschlußrate finden. Als einen Grund führten sie den im Vergleich zur Thromboxansynthasehemmung deutlich geringeren Thromboxan-Rezeptorantagonismus von Ridogrel an [RAPT Investigators, 1994].

Eine weitere Substanz dieser Gruppe ist das Terbogrel. Im Gegensatz zu Ridogrel ist Terbogrel die erste Substanz, die TX-Synthese und TX-Rezeptor in vergleichbarer Konzentration hemmt [Muck et al., 1998]. Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe

zeigten, dass Terbogrel die thrombozytäre Aggregation und TX-Synthese bei ASS-„resistenten“ Patienten erfolgreich hemmen konnte [Zimmermann et al., 2003]. Terbogrel ist für den klinischen Gebrauch nicht zugelassen, ein Patent für die Thrombozytenfunktionshemmung bei ASS-Nonrespondern wurde jedoch erteilt (Pat. Nr. EP 01 121 558.9).

Neben der Hemmung der TX-Synthese besteht auch die Möglichkeit, Einfluss auf andere Aktivierungsrezeptoren zu nehmen. Ticlopidin und Clopidogrel gehören zur Gruppe der Thienopyridine und blockieren spezifisch und irreversibel ADP-Rezeptoren ( $P_2Y_{12}$ ), nachdem sie in der Leber in einen aktiven Metaboliten umgewandelt wurden. Tatsächlich konnte Ticlopidin bei 15 gesunden Probanden mit nachgewiesener ASS-Nonresponse eine aggregationshemmende Wirkung erzielen [Kaplan et al., 2000]. Zudem traten im Rahmen klinischer Untersuchungen unter Ticlopidin thrombotische Bypassfrühverschlüsse seltener auf [Limet et al., 1987]. Dennoch können unter Ticlopidin schwerwiegende Nebenwirkungen wie Neutopenien (0,9 %) oder thrombotisch-thrombozytopenische Purpura auftreten [Hass et al., 1989], die unter Clopidogrel, ebenfalls aus der Gruppe der Thienopyridine, sehr viel seltener beobachtet wurden (0,05 %). Eine post-hoc-Analyse der CAPRIE-Studie (Clopidogrel Versus Aspirin in Patients at Risk of Ischemic Events), die bei thrombembolisch gefährdeten Patienten ASS und Clopidogrel in Hinblick auf die Reduktion ischämischer Ereignisse untersuchte, ergab, dass kardiovaskuläre Ereignisse bei Patienten nach CABG unter ASS häufiger auftraten als unter Clopidogrel-Gabe [CAPRIE Steering Committee, 1996]. Im Vergleich zur Therapie mit ASS reduzierte Clopidogrel das Risiko für die Studienendpunkte (gefäßbedingter Tod, Myokardinfarkt und ischämischer Schlaganfall) bei CABG-Patienten um 36,3 % [Bhatt et al., 2001].

Ein weiterer pharmakologischer Ansatz, die Thrombozytenaktivierung zu verhindern, ist die Blockierung des Fibrinogenrezeptors (GPIIb/IIIa). Zu diesen Pharmaka zählen Abciximab, Eptifibatid und Tirofiban. Intravenös verabreichte GPIIb/IIIa-Antagonisten verhindern die Ereignisse wie Herzinfarkt oder den Tod in der Frühphase nach PTCA oder bei akutem Koronarsyndrom [Kong et al., 1998]. Oral verabreichte GPIIb/IIIa-Antagonisten zeigten nicht den erhofften Erfolg, sondern eher gegenteilige Effekte. Hier wurde eine bis 33 % erhöhte Mortalität beobachtet. Zudem gab es gehäuft schwerwiegende Blutungskomplikationen [Topol et al., 2003]. Aufgrund der engen Indikationsstellung (transvasale Koronarinterventionen und akutes Koronarsyndrom) und des erhöhten Blutungsrisikos ist eine standardisierte Prophylaxetherapie im Rahmen der Bypasschirurgie aus heutiger Sicht jedoch nicht indiziert.

#### **4.7 Konsequenzen für die antithrombotische Therapie bei ASS-Nonresponse**

Zusammenfassend machen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit eine gestörte Interaktion der thrombozytären COX-1 mit dem Hemmstoff Acetylsalicylsäure wahrscheinlich, denn es konnte gezeigt werden, dass selbst ASS-„resistente“ Plättchen sehr wohl auf die hemmende Wirkung von ASS ansprechen, jedoch deutlich zeitverzögert. Daraus leitet sich die Überlegung ab, ASS in mehreren Einzeldosen über den Tag verteilt zu applizieren, die Dosis zu steigern oder eine veränderte Galenik mit protrahierter Wirkstofffreisetzung zu verwenden, um eine ausreichende Exposition der Thrombozyten mit ASS zu gewährleisten. Ob dieses veränderte Therapieprotokoll die Entstehung der ASS-Nonresponse nach CABG überwinden kann, bleibt im Rahmen klinischer Studien zu verifizieren.

Alternativ können auch andere antithrombozytäre Substanzen zum Einsatz kommen, wobei Pharmaka der Gruppe der Thienopyridine vorrangig von Interesse sind. Die kombinierte Hemmung von TX-Synthase und -Rezeptor, wie Terbogrel, erscheint ebenfalls erfolgsversprechend.

## 5 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Fragestellung, in wie weit eine thrombozytäre „Resistenz“ gegenüber Acetylsalicylsäure, die potentiell Ursache für thromboembolische Komplikationen im Rahmen einer ACB-Operation sein kann, anhand thrombozytärer Funktionen wie Aggregation, Thromboxansynthese und ATP-Sekretion nachweisbar ist. Einerseits belegen zahlreiche klinische Studien Vorteile von ASS gegenüber anderen pharmakologischen Substanzen in der antithrombotischen Therapie, andererseits konnte klinisch auch eine unzureichende Antiplättchenwirkung unter ASS bis hin zur ASS-Nonresponse beobachtet werden.

Plättchenreiches Plasma von insgesamt 52 ACB-Patienten wurde präoperativ und an den Tagen 1 und 5 postoperativ gewonnen und in Gegenwart von ASS (0-100  $\mu$ M) *in vitro* untersucht. Nach Stimulation mit Arachidonsäure (1 mM) und Kollagen (10  $\mu$ g/ml) wurden die turbidimetrisch gemessene Plättchenaggregation, die Thromboxansynthese mittels RIA und die ATP-Sekretion mittels Lumineszenz bestimmt. Da 11 der ACB-Operationen ohne HLM durchgeführt wurden, war es zudem möglich, den Effekt extrakorporaler Zirkulation auf die Thrombozyten zu untersuchen. Darüber hinaus wurde die Immunoreaktivität der COX-2 in gewaschenen Thrombozyten mittels Western-Blot nachgewiesen. Zeitkinetische Untersuchungen in Gegenwart von ASS (5 und 10  $\mu$ M) *in vitro* dienten der Beobachtung des zeitlichen Verlaufes der ASS-Wirkung.

Alle ACB-Patienten erhielten, beginnend am ersten postoperativen Tag, peroral 100 mg ASS täglich. Trotz der oralen ASS-Therapie zeigten rund 75 % aller Patienten nicht die erwartete Hemmung der untersuchten Thrombozytenfunktionen. Auch der *in vitro* Zusatz von ASS erzielte postoperativ keine vollständige Hemmung der Aggregation, TX-Synthese und ATP-Sekretion bei beiden Operationsgruppen (mit und ohne HLM). Die extrakorporale Zirkulation scheint demzufolge kein notwendiger Faktor für die Entstehung einer postoperativen ASS-Nonresponse zu sein.

Ein nahezu unverändertes Verhältnis von thrombozytärer Aggregation zu TX-Synthese von ASS-Respondern zu -Nonrespondern konnte keine gesteigerte Sensitivität gegenüber dem gebildeten TXA<sub>2</sub> aufdecken.

Die semiquantitative Auswertung der COX-2 Immundetektion (Western-Blot) stellte eine Intensitätszunahme der COX-2 Signale bei sieben Patienten am 5. postoperativen Tag fest. Eine Bedeutung der COX-2 für eine ASS-Nonresponse nach CABG ist jedoch nicht wahrscheinlich, da sich keine Unterschiede in der COX-2 Immunreaktivität bei erheblicher interindividueller Variabilität zwischen ASS-„resistenten“ und ASS-sensitiven ACB-Patienten fanden.

In den zeitkinetischen Untersuchungen mit ASS wurde deutlich, dass mit erhöhter Konzentration (10  $\mu$ M ASS) auch „resistente“ Plättchen innerhalb eines kürzeren Zeitintervalls (< 60 min) hinsichtlich Aggregation, Thromboxansynthese und ATP-Sekretion gehemmt werden konnten. Die Wirkung von ASS war bei den ASS-Nonrespondern nicht aufgehoben, sondern lediglich verzögert. Eine suffiziente Hemmung ASS-„resistenter“ Thrombozyten war durch eine verlängerte Exposition bzw. eine gesteigerte Konzentration möglich.

Die Ergebnisse sprechen dafür, dass ASS-Nonresponse auf eine beeinträchtigte Interaktion zwischen COX-1 und ASS beruht. Ein verändertes Therapieprotokoll mit mehrfacher ASS Gabe täglich, einer Dosissteigerung oder eine veränderte Galenik mit protrahierter Wirkstofffreisetzung könnte ein Ansatz sein, ASS-Nonresponse zu überwinden.

## 6 Publikationen im Zusammenhang mit der Arbeit

### 6.1 Originalarbeiten

Zimmermann N, Wenk A, Kim U, Kienzle P, Weber AA, Gams E, Schrör K, Hohlfeld T. Functional and biochemical evaluation of platelet aspirin resistance after coronary artery bypass surgery. *Circulation* 2003; 108: 542-547.

Zimmermann N, Kurt M, Wenk A, Winter J, Gams E, Hohlfeld T. Is cardiopulmonary bypass a reason for aspirin resistance after coronary artery bypass grafting? *Eur J Cardiothorac Surg* 2005; 27: 606-610.

### 6.2 Kongressbeiträge

Nottingham Platelet Conference – incorporating the 5th UK Meeting on Platelets and the 9th Erfurt Conference on Platelets (28th – 31st July 2002)

A. Wenk, E. Gams, N. Zimmermann, K. Schrör, T. Hohlfeld: Platelet resistance to aspirin can be overcome by a changed protocol of treatment **Poster**

Abstract: *Platelets* 2002; 13: 327-369.

70. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie - Herz- und Kreislaufforschung Mannheim, 15. bis 17. April 2004

T. Hohlfeld, A. Wenk, N. Zimmermann, K. Schrör: Thrombozytäre ASS-Nonresponse: Kinetik und Konzentrationsabhängigkeit der Cyclooxygenasehemmung. *Z Kardiol* 93: Suppl 3(2004)

## 7 Literatur

Antithrombotic Trialists' Collaboration. Collaborative meta-analysis of randomised trials of antiplatelet therapy for prevention of death, myocardial infarction, and stroke in high risk patients. *BMJ* 2002; 324: 71-86.

Awad JA, Morrow JD, Takahashi K, Roberts LJ 2nd. Identification of non-cyclooxygenase-derived prostanoid (F<sub>2</sub>-isoprostane) metabolites in human urine and plasma. *J Biol Chem* 1993; 268: 4161-4169.

Benedek IH, Joshi AS, Pieniaszek HJ, King SYP, Kornhauser DM. Variability in the pharmacokinetics and pharmacodynamics of low dose aspirin in healthy male volunteers. *J Clin Pharmacol* 1995; 35: 1181-1186.

Bhatt DL, Chew DP, Hirsch AT, Ringleb PA, Hacke W, Topol EJ. Superiority of clopidogrel versus aspirin in patients with prior cardiac surgery. *Circulation* 2001; 103: 363-368.

Boulos C, Jiang H, Balazy M. Diffusion of peroxynitrite into the human platelet inhibits cyclooxygenase via nitration of tyrosine residues. *J Pharmacol Exp Ther* 2000; 293: 222-229.

Braunwald E, Antman EM, Beasley JW, et al. ACC/AHA 2002 guideline update for the management of patients with unstable angina and non-ST-segment elevation myocardial infarction--summary article: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association task force on practice guidelines (Committee on the Management of Patients With Unstable Angina). *J Am Coll Cardiol* 2002; 40: 1366-1374.

Buchanan MR, Butt RW, Hirsh J, Markham BA, Nazir DJ. Role of lipoxygenase metabolism in platelet function: effect of aspirin and salicylate. *Prostaglandins Leukot Med* 1986; 21: 157-168.

Buchanan MR, Brister SJ. Individual variation in the effects of ASA on platelet function: Implications for the use of ASA clinically. *Can J Cardiol* 1995; 11: 221-227.

Calverley DC, Brass E, Hacker MR et al. Potential role of platelet Fcγ<sub>3</sub>RIIA in collagen-mediated platelet activation associated with atherothrombosis. *Atherosclerosis* 2002; 164: 261-267.

CAPRIE Steering Committee. A randomised, blinded, trial of clopidogrel versus aspirin in patients at risk of ischaemic events (CAPRI). *Lancet* 1996; 348: 1329-1339.

Casati V, Gerli C, Franco A, Della Valle P, Benussi S, Alfieri O, Torri G, D'Angelo A. Activation of coagulation and fibrinolysis during coronary surgery: on-pump versus off-pump techniques. *Anesthesiology* 2001; 95: 1103-1109.

CAST (Chinese Acute Stroke Trial) Collaborative Group. CAST: randomised placebo-controlled trial of early aspirin use in 20000 patients with acute ischaemic stroke. *Lancet* 1997; 349: 1641-1649.

Chandrasekharan NV, Dai H, Roos KLT, Evanson NK, Tomsik J, Elton TS, Simmons DL. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 13926-13931.

Chen WH, Lee PY, Ng W, Tse HF, Lau CP. Aspirin resistance is associated with a high incidence of myonecrosis after non-urgent percutaneous coronary intervention despite clopidogrel pretreatment. *J Am Coll Cardiol* 2004; 43: 1122-1226.

- Christians L, Macchi L, Herpin D, Coisne D, Duplantier C, Allal J, Mauco G, Brizard A. Resistance to aspirin in vitro at rest and during exercise in patients with angiographically proven coronary artery disease. *Thromb Res* 2002; 108: 115-119.
- Clarke RJ, Mayo G, Price P, FitzGerald GA: Suppression of thromboxane A<sub>2</sub> but not of systemic prostacyclin by controlled-release aspirin. *N Engl J Med* 1991; 325: 1137-1141.
- Csiszar A, Stef G, Pacher P, Ungvari Z. Oxidative stress-induced isoprostane formation may contribute to aspirin resistance in platelets. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2002; 66: 557-558.
- Delanty N, Reilly MP, Pratico D, Lawson JA, McCarthy JF, Wood AE, Ohnishi ST, Fitzgerald DJ, FitzGerald GA. 8-epi PGF<sub>2</sub> alpha generation during coronary reperfusion. A potential quantitative marker of oxidant stress in vivo. *Circulation* 1997; 95: 2492-2499.
- DeWitt DL, El-Harith EA, Kraemer SA, Andrews MJ, Yao EF, Armstrong RL, Smith WL. The aspirin and Heme-binding sites of ovine and murine prostaglandin endoperoxide synthases. *J Biol Chem* 1990; 265: 5192-5198.
- Di Minno G, Silver MJ, Murphy S. Monitoring the entry of new platelets into the circulation after ingestion of aspirin. *Blood* 1983; 61: 1081-1085.
- Dorn GW 2nd, Liel N, Trask JL, Mais DE, Assey ME, Halushka PV. Increased platelet thromboxane A<sub>2</sub>/prostaglandin H<sub>2</sub> receptors in patients with acute myocardial infarction. *Circulation* 1990; 81: 212-218.
- Eikelboom JW, Hirsh J, Weitz JI, 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: 1650-1655.
- Erez E, Erman A, Snir E, Raanani E, Abramov D, Sulkes J, Boner G, Vidne BA. Thromboxane production in human lung during cardiopulmonary bypass: beneficial effect of aspirin? *Ann Thorac Surg* 1998; 65:101-106.
- ESPS Group. European Stroke Prevention Study. *Stroke* 1990; 21: 1122-1130.
- FitzGerald GA, Reilly IAG, Pedersen AK. The biochemical pharmacology of thromboxane synthase inhibition in man. *Circulation* 1985; 72: 1194-1201.
- Fitzgibbon GM, Kafka HP, Leach AJ, Keon WJ, Hooper GD, Burton JR. Coronary bypass graft fate and patient outcome: angiographic follow-up of 5,065 grafts related to survival and reoperation in 1,388 patients during 25 years. *J Am Cardiol* 1996; 28: 616-626.
- Fremes SE, Levinton C, Naylor CD, Chen E, Christakis GT, Goldman BS. Optimal antithrombotic therapy following aortocoronary bypass: a meta-analysis. *Eur J Cardiothorac Surg* 1993; 7: 169-180.
- Funk CD, Funk LB, Kennedy ME, Pong AS, Fitzgerald GA. Human platelet/erythrocyte cell prostaglandin G/H synthase: cDNA cloning, expression, and gene chromosomal assignment. *FASEB J* 1991; 5: 2304-2312.
- Fuster V, Chesebro JH. Role of platelets and platelet inhibitors in aortocoronary artery vein-graft disease. *Circulation* 1986; 73: 227-232.
- Gavaghan TP, Gebski V, Baron DW. Immediate postoperative aspirin improves vein graft patency early and late after coronary artery bypass graft surgery. A placebo-controlled, randomized study. *Circulation* 1991; 83: 1526-1533.

Gawaz MP. Das Blutplättchen: Physiologie, Pathophysiologie, Membranrezeptoren, antithrombozytäre Wirkstoffe und antithrombozytäre Therapie bei koronarer Herzerkrankung. Stuttgart: Thieme, 1999.

Golanski J, Golanski R, Chizynski K, Iwaszkiewicz A, Rozalski M, Wieclawska B, Boncler M, Watala C. Platelet hyperreactivity after coronary artery bypass grafting: the possible relevance to glycoprotein polymorphisms. A preliminary report. *Platelets* 2001; 12: 241-247.

Goldman S, Copeland J, Moritz T, Henderson W, Zadina K, Ovitt T, Doherty J, Read R, Chesler E, Sako Y, et al. Improvement in early saphenous vein graft patency after coronary artery bypass surgery with antiplatelet therapy: results of a Veterans Administration Cooperative Study. *Circulation* 1988; 77: 1324-1332.

Goldman S, Copeland J, Moritz T, Henderson W, Zadina K, Ovitt T, Doherty J, Read R, Chesler E, Sako Y, et al. Saphenous vein graft patency 1 year after coronary artery bypass surgery and effects of antiplatelet therapy. Results of a Veterans Administration Cooperative Study. *Circulation* 1989; 80: 1190-1197.

Grotemeyer KH, Scharafinski HW, Husstedt IW. Two-year follow-up of aspirin responder and aspirin non responder. A pilot-study including 180 post-stroke patients. *Thromb Res* 1993; 71: 397-403.

Grundmann K, Jaschonek K, Kleine B, Dichgans J, Topka H. Aspirin non-responder status in patients with recurrent cerebral ischemic attacks. *J Neurol* 2003; 250: 63-66.

Gum PA, Kottke-Marchant K, Poggio ED, Gurm H, Welsh PA, Brooks L, Sapp SK, Topol EJ: Profile and prevalence of aspirin resistance in patients with cardiovascular disease. *Am J Cardiol* 2001; 88: 230-235.

Gum PA, Kottke-Marchant K, Poggio ED, Gurm H, Welsh PA, White J, Topol EJ. A prospective, blinded determination of the natural history of aspirin resistance among stable patients with cardiovascular disease. *J Am Coll Cardiol* 2003; 41: 961-965.

Halushka MK, Walker LP, Halushka PV. Genetic variation in cyclooxygenase 1: effects on response to aspirin. *Clin Pharmacol Ther* 2003; 73: 122-130.

Hankey GJ, Eikelboom JW. Aspirin resistance. *Lancet* 2006; 367: 606-617.

Hass WK, Easton JD, Adams HP Jr, Pryse-Phillips W, Molony BA, Anderson S, Kamm B. A randomized trial comparing ticlopidine hydrochloride with aspirin for the prevention of stroke in high-risk patients. Ticlopidine Aspirin Stroke Study Group. *N Engl J Med* 1989; 321: 501-507.

Helgason CM, Bolin KM, Hoff JA, Winkler SR, Mangat A, Tortorice KL, Brace LD. Development of aspirin resistance in persons with previous ischemic stroke. *Stroke* 1994; 25: 2331-2336.

Hennekens CH. Update on aspirin in the treatment and prevention of cardiovascular disease. *Am J Manag Care* 2002; 8 (Suppl): 691-700.

Hohlfeld T, Schrör K. Azetylsalizylsäure und Thromboxaninhibitoren. *Hämostaseologie* 1998; 18: 161-170.

Hyde JA, Chinn JA, Graham TR: Platelets and cardiopulmonary bypass. *Perfusion* 1998; 13: 389-407.

Inoue H, Taba Y, Miwa Y, Yokota C, Miyagi M, Sasaguri T. Transcriptional and posttranscriptional regulation of cyclooxygenase-2 expression by fluid shear stress in vascular endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22:1415-1420.

ISIS-2 (Second International Study of Infarct Survival) Collaborative Group. Randomized trial of intravenous streptokinase, oral aspirin, both, or neither among 17187 cases of suspected acute myocardial infarction: ISIS-2. *Lancet* 1988; 12 (suppl A): 3A-13A.

Jack DB. One hundred years of aspirin. *Lancet* 1997; 350: 437-439.

Kaplan S, Kaplan A, Marcoe K, Sauvage LR. 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: 222-225.

Karim S, Habib A, Levy-Toledano S, Maclouf J. Cyclooxygenase-1 and -2 of endothelial cells utilize exogenous or endogenous arachidonic acid for transcellular production of thromboxane. *J Biol Chem* 1996; 271: 12042-12048.

Kaukinen S, Seppala E, Kaukinen L, Ojanen R, Vapaatalo H. Effects of halothane and enflurane on prostanoid concentrations in operation patients. *Prostaglandins Leukot Med* 1987; 29: 85-94.

Kawasaki T, Ozeki Y, Igawa T, Kambayashi J. Increased platelet sensitivity to collagen in individuals resistant to low-dose aspirin. *Stroke* 2000; 31: 591-595.

Kitamura R, Hirakata H, Okuda H, Sato M, Toda H, Nakamura K, Hatano Y, Urabe N, Fukuda K. Thiopental enhances human platelet aggregation by increasing arachidonic acid release. *Can J Physiol Pharmacol* 2001; 79: 854-860.

Kong DF, Califf RM, Miller DP, Moliterno DJ, White HD, Harrington RA, Tchong JE, Lincoff AM, Hasselblad V, Topol EJ. Clinical outcomes of therapeutic agents that block the platelet glycoprotein IIb/IIIa integrin in ischemic heart disease. *Circulation* 1998; 98: 2829-2835.

Kulkarni S, Dopheide SM, Yap CL, Ravanat C, Freund M, Mangin P, Heel KA, Street A, Harper IS, Lanza F, Jackson SP. A revised model of platelet aggregation. *J Clin Invest* 2000; 105: 783-791.

Lahat N, Zlotnick AY, 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: 255-260.

Larsson PT, Wallen NH, Hjemdahl P. Norepinephrine-induced human platelet activation in vivo is only partly counteracted by aspirin. *Circulation* 1994; 89: 1951-1957.

Lim E, Ali Z, Ali A, Routledge T, Edmonds L, Altman DG, Large S. Indirect comparison meta-analysis of aspirin therapy after coronary surgery. *BMJ* 2003; 327: 1-5.

Limet R, David JL, Magotteaux P, Larock MP, Rigo P. Prevention of aorta-coronary bypass graft occlusion. Beneficial effect of ticlopidine on early and late patency rates of venous coronary bypass grafts: a double-blind study. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1987; 94: 773-783.

Loll PJ, Picot D, Garavito RM. The structural basis of aspirin activity inferred from the crystal structure of inactivated prostaglandin H2 synthase. *Nat Struct Biol* 1995; 2: 637-643.

Maalej N, Folts JD. Increased shear stress overcomes the antithrombotic platelet inhibitory effect of aspirin in stenosed dog coronary arteries. *Circulation* 1996; 93: 1201-1205.

- Mayeux PR, Morton HE, Gillard J, Lord A, Morinelli TA, Boehm A, Mais DE, Halushka PV. The affinities of prostaglandin H<sub>2</sub> and thromboxane A<sub>2</sub> for their receptor are similar in washed human platelets. *Biochem Biophys Res Commun* 1988; 157: 733-739.
- Mitchell JA, Akarasereenont P, Thiemermann C, Flower RJ, Vane JR. Selectivity of nonsteroidal antiinflammatory drugs as inhibitors of constitutive and inducible cyclooxygenase. *Proc Natl Acad Sci* 1994; 90: 11693-11697.
- Moake JL, Turner NA, Stathopoulos NA, Nolasco L, Hellums JD. Shear-induced platelet aggregation can be mediated by vWF released from platelets, as well as by exogenous large or unusually large vWF multimers, requires adenosine diphosphate, and is resistant to aspirin. *Blood* 1988; 71: 1366-1374.
- Morrow JD, Hill KE, Burk RF, Nammour TM, Badr KF, Roberts LJ 2nd. A series of prostaglandin F<sub>2</sub>-like compounds are produced in vivo in humans by a non-cyclooxygenase, free radical-catalyzed mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 9383-9387.
- Motwani JG, Topol EJ. Aortocoronary saphenous vein graft disease. Pathogenesis, predisposition, and prevention. *Circulation* 1998; 97: 916-931.
- Muck S, Weber AA, Schrör K. Effects of terbogrel on platelet function and prostaglandin endoperoxide transfer. *Eur J Pharmacol* 1998; 344: 45-48.
- Müller MR, Salat A, Stangl P, Murabito M, Pulaki S, Boehm D, Koppensteiner R, Ergun E, Mittlboeck M, Schreiner W, Losert U, Wolner E. Variable platelet response to low-dose ASA and the risk of limb deterioration in patients submitted to peripheral arterial angioplasty. *Thromb Haemost* 1997; 78: 1003-1007.
- Nader ND, Khadra WZ, Reich NT, Bacon DR, Salerno TA, Panos AL. Blood product use in cardiac revascularization: comparison of on- and off-pump techniques. *Ann Thorac Surg* 1999; 68: 1640-1643.
- Nair GV, Davis CJ, McKenzie ME, Lowry DR, Serebruany VL. Aspirin in patients with coronary artery disease: is it simply irresistible? *J Thrombosis and Thrombolysis* 2001; 11: 117-126.
- Nieswandt B, Brakebusch C, Bergmeier W, Schulte V, Bouvard D, Mokhtari-Nejad R, Lindhout T, Heemskerk JW, Zirngibl H, Fassler R. Glycoprotein VI but not alpha2beta1 integrin is essential for platelet interaction with collagen. *EMBO J* 2001; 20: 2120-2130.
- Okrainec K, Platt R, Pilote L, Eisenberg MJ. Cardiac medical therapy in patients after coronary artery bypass graft surgery: a review of randomized controlled trials. *J Am Coll Cardiol* 2005; 45: 177-184.
- Pappas JM, Westengard JC, Bull BS. Population variability in the effect of aspirin on platelet function. Implications for clinical trials and therapy. *Arch Pathol Lab Med* 1994; 118: 801-804.
- Patrignani P, Filabozzi P, Patrono C. Selective cumulative inhibition of platelet thromboxane production by low-dose aspirin in healthy subjects. *Clin Invest* 1982; 69: 1366-1372.
- Patrono C, FitzGerald GA. Isoprostanes: Potential markers of oxidant stress in atherothrombotic disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 2309-2315.
- Patrono C. Aspirin resistance: definition, mechanisms and clinical read-outs. *J Thromb Haemost* 2003; 1: 1710-1713.
- Patrono C, Bachmann F, Baigent C, et al. Expert consensus document on the use of antiplatelet agents. The task force on the use of antiplatelet agents in patients with atherosclerotic cardiovascular disease of the European society of cardiology. *Eur Heart J* 2004; 25: 166-181.

- Patscheke H, Hornberger W, Zehender H. Pathophysiological role of thromboxane A2 and pharmacological approaches to its inhibition. *Z Kardiol* 1990; 79: 151-154.
- Picot D, Loll PJ, Garavito RM. The X-ray crystal structure of the membrane protein prostaglandin H2 synthase-1. *Nature* 1994; 367: 243-249.
- Poston RS, Gu J, Brown JM, Gammie JS, White C, Nie L, Pierson RN 3rd, Griffith BP. Endothelial injury and acquired aspirin resistance as promoters of regional thrombin formation and early vein graft failure after coronary artery bypass grafting. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2006; 131: 122-130.
- Practico D, Lawson JA, FitzGerald GA. Cyclooxygenase-dependent formation of the isoprostane, 8-epi prostaglandin F2 alpha. *J Biol Chem* 1995; 270: 9800-9808.
- RAPT Investigators. Randomized trial of ridogrel, a combined thromboxane A2 synthase inhibitor and thromboxane A2/prostaglandin endoperoxide receptor antagonist, versus aspirin as adjunct to thrombolysis in patients with acute myocardial infarction. The ridogrel versus aspirin patency trial (RAPT). *Circulation* 1994; 89: 588-595.
- Rocca B, Secchiero P, Ciabattini G, Ranelletti FO, Catani L, Guidotti L, Melloni E, Maggiano N, Zauli G, Patrono C. Cyclooxygenase-2 expression is induced during human megakaryopoiesis and characterizes newly formed platelets. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 7634-7639.
- Roth GJ, Stanford N, Majerus PW: Acetylation of prostaglandin synthase by aspirin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1975; 72: 3073-3076.
- Santos MT, Valles J, Marcus AJ, Safier LB, Broekman MJ, Islam N, Ullman HL, Eiroa AM, Aznar J. Enhancement of platelet reactivity and modulation of eicosanoid production by intact erythrocytes – A new approach to platelet activation and recruitment. *J Clin Invest* 1991; 87: 571-580.
- Santos MT, Valles J, Aznar J, Marcus AJ, Broekman MJ, Safier LB. Prothrombotic effects of erythrocytes on platelet reactivity. Reduction by aspirin. *Circulation* 1997; 95: 63-68.
- Savage M, Goldberg S, Bove AA, et al. Effect of thromboxane A2 blockade on clinical outcome and restenosis after successful coronary angioplasty: Multi-Hospital Eastern Atlantic Restenosis Trial (M-HEART II). *Circulation* 1995; 92: 3194-3200.
- Schrör K, Seidel H. Blood-vessel wall arachidonate metabolism and its pharmacological modification in a new in vitro assay system. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1988; 337: 177-182.
- Schrör K. Acetylsalicylsäure. Stuttgart: *Thieme*, 1992.
- Schulze C, Conrad N, Schutz A, Egi K, Reichenspurner H, Reichart B, Wildhirt SM. Reduced expression of systemic proinflammatory cytokines after off-pump versus conventional coronary artery bypass grafting. *Thorac Cardiovasc Surg* 2000; 48: 364-369.
- Shimokawa T, Smith WL. Prostaglandin endoperoxide synthase: The aspirin acetylation region. *J Biol Chem* 1992; 267: 5192-5198.
- Strüber M, Cremer JT, Gohrbandt B, Hagl C, Jankowski M, Volker B, Ruckoldt H, Martin M, Haverich A. Human cytokine responses to coronary artery bypass grafting with and without cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg* 1999; 68: 1330-1335.
- 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: 1400-1403.

Topol EJ, Easton D, Harrington RA, Amarenco P, Califf RM, Graffagnino C, Davis S, Diener HC, Ferguson J, Fitzgerald D, Granett J, Shuaib A, Koudstaal PJ, Theroux P, Van de Werf F, Sigmon K, Pieper K, Vallee M, Willerson JT; Blockade of the Glycoprotein IIb/IIIa Receptor to Avoid Vascular Occlusion Trial Investigators. Randomized, double-blind, placebo-controlled, international trial of the oral IIb/IIIa antagonist lotrafiban in coronary and cerebrovascular disease. *Circulation* 2003; 108: 399-406.

Valles J, Santos MT, Aznar J, Osa A, Lago A, Cosin J, Sanchez E, Broekman MJ, Marcus AJ. Erythrocyte promotion of platelet reactivity decreases the effectiveness of aspirin as an antithrombotic therapeutic modality – The effect of low-dose aspirin is less than optimal in patients with vascular disease due to prothrombotic effects of erythrocytes on platelet reactivity. *Circulation* 1998; 97: 350-355.

Vane JR, Bakhle YS, Botting RM. Cyclooxygenases 1 and 2. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1998; 38: 97-120.

Wang Z, Ciabattini G, Creminon C, Lawson J, FitzGerald GA, Patrono C, Maclouf J. Immunological characterization of urinary 8-epi-prostaglandin F2 alpha excretion in man. *J Pharmacol Exp Ther* 1995; 275: 94-100.

Weber AA, Zimmermann K, Meyer-Kirchrath J, Schrör K. Cyclooxygenase-2 in human platelets as a possible factor in aspirin resistance. *Lancet* 1999; 353: 900.

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

Weerasinghe A, Kenneth MT: The platelet in cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg* 1998; 66: 2145-2152.

Weintraub WS, Jones EL, Craver JM, Guyton RA. Frequency of repeat coronary bypass or coronary angioplasty after coronary artery bypass surgery using saphenous vein grafts. *Am J Cardiol* 1994; 73: 103-112.

Wiedmer T, Sims PJ. Participation of protein kinases in complement C5b-9-induced shedding of platelet plasma membrane vesicles. *Blood* 1991; 78: 2880-2886.

Wildhirt SM, Schulze C, Schulz C, Egi K, Brenner P, Mair H, Schutz A, Reichart B. Reduction of systemic and cardiac adhesion molecule expression after off-pump versus conventional coronary artery bypass grafting. *Shock* 2001; 16 (suppl): 55-59.

Yusuf S, Sleight P, Pogue J, Bosch J, Davis R, Dagenais G. 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: 145-153.

Zamparelli R, De Paulis S, Martinelli L, Rossi M, Scapigliati A, Sciarra M, Meo F, Schiavello R. Pulsatile normothermic cardiopulmonary bypass and plasma catecholamine levels. *Perfusion* 2000; 15: 217-223.

Zimmermann N, Kienzle P, Weber AA, Winter J, Gams E, Schroer K, Hohlfeld T: Aspirin resistance after coronary artery bypass grafting. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2001; 121: 982-984.

Zimmermann N, Wenk A, Kim U, Kienzle P, Weber AA, Gams E, Schrör K, Hohlfeld T. Functional and biochemical evaluation of platelet aspirin resistance after coronary artery bypass surgery. *Circulation* 2003; 108: 542-547.

## 8 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei den vielen Menschen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein erster Dank gebührt 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.

Bei Herrn Privatdozenten Dr. Norbert Zimmermann möchte ich mich für die tolle Zusammenarbeit und die Durchführung der Blutentnahmen in der Chirurgischen Klinik und Poliklinik bedanken.

Besonderer Dank gilt auch den technischen Mitarbeiterinnen am Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie Frau Kirsten Bartkowski und Frau Susanne Hölzer für die vielen schönen Momente und die hilfreiche Zusammenarbeit. Die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre und die Gespräche in den Teepausen werde ich sehr vermissen. Es war eine tolle Zeit. Frau Irmhild Rüter danke ich sehr herzlich für die rasche Durchführung der Thromboxanbestimmungen.

Allen Kollegen, insbesondere den Doktoranden, danke ich für die stets nette und angenehme Zusammenarbeit, die fachlichen Anregungen und die unzähligen Gespräche.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern Helga und Herbert sowie meinem Bruder Joachim, die mir diese Ausbildung ermöglicht haben und mich während des gesamten Weges unterstützt und gefördert haben („WIR“ schaffen alles).

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meinem Freund Torsten bedanken, der mir immer ein liebevoller Ansporn war und mir während der Verwirklichung der Arbeit stets zur Seite stand.

## 9 Curriculum vitae

**Name:** Angela Christine Wenk  
**Geburtsdatum:** 20.07.1977  
**Staatsangehörigkeit:** deutsch  
**Familienstand:** ledig

### Schulbildung:

1984 – 1988 Städtische Gemeinschaftsgrundschule Düsseldorf-Kaiserswerth  
1988 – 1997 Theodor-Fliedner-Gymnasium, Düsseldorf-Kaiserswerth  
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

### Freiwilliges soziales Jahr:

September 1997 – April 1998 Evangelisches Altenheim Haus Abendfrieden gGmbH  
Essen-Kettwig

### Studium/ Berufsausbildung:

Sommersemester 1998 Humanmedizin an der Heinrich-Heine-Universität,  
Düsseldorf  
Oktober 2001 – März 2002 Freisemester für den experimentellen Teil meiner  
Promotionsarbeit am Institut für Pharmakologie und  
Klinische Pharmakologie der Heinrich-Heine-Universität  
Düsseldorf unter der Leitung von Prof. Dr. med. T.  
Hohlfeld  
Thema: Thrombozytäre Funktion und Thromboxan-  
synthese nach koronarer Bypassoperation: Verzögerte  
Zeitkinetik der Cyclooxygenasehemmung durch  
Acetylsalicylsäure

Ärztliche Vorprüfung: Herbst 2000  
1. Staatsexamen Herbst 2001  
2. Staatsexamen Frühjahr 2004  
3. Staatsexamen Frühjahr 2005  
Approbation als Ärztin 10.06.2005

### Berufstätigkeit:

1.10.2005 Anstellung als Assistenzärztin in den Elblandkliniken  
Meißen-Radebeul GmbH & Co. KG, Standort Radebeul,  
Innere Medizin unter der Leitung von Dr. med. H.  
Borgmann

# **Thrombozytäre Funktion und Thromboxansynthese nach koronarer Bypassoperation: Verzögerte Zeitkinetik der Cyclooxygenasehemmung durch Acetylsalicylsäure**

vorgelegt von

von Angela Wenk

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Fragestellung, in wie weit eine thrombozytäre „Resistenz“ gegenüber Acetylsalicylsäure (ASS), die potentiell Ursache für thromboembolische Komplikationen im Rahmen einer Bypassoperation (ACB) sein kann, anhand thrombozytärer Funktionen nachweisbar ist. Einerseits belegen zahlreiche klinische Studien Vorteile von ASS gegenüber anderen pharmakologischen Substanzen in der antithrombotischen Therapie, andererseits konnte klinisch auch eine unzureichende Antiplättchenwirkung unter ASS bis hin zur ASS-Nonresponse beobachtet werden.

Plättchenreiches Plasma von insgesamt 52 ACB-Patienten wurde präoperativ und an den Tagen 1 und 5 postoperativ gewonnen und in Gegenwart von ASS (0-100  $\mu\text{M}$ ) *in vitro* untersucht. Nach Stimulation mit Arachidonsäure (1 mM) und Kollagen (10  $\mu\text{g/ml}$ ) wurden die turbidimetrisch gemessene Aggregation, die Thromboxansynthese (TX) mittels RIA (Radioimmunoassay) und die ATP-Sekretion (Adenosintri-phosphat) mittels Lumineszenz bestimmt. Da 11 der ACB-Operationen ohne Herz-Lungen-Maschine (HLM) durchgeführt wurden, war es zudem möglich, den Effekt extrakorporaler Zirkulation auf die Thrombozyten zu untersuchen. Darüber hinaus wurde die Immunoreaktivität der Cyclooxygenase 2 (COX) in gewaschenen Thrombozyten mittels Western-Blot nachgewiesen. Zeitkinetische Untersuchungen in Gegenwart von ASS (5 und 10  $\mu\text{M}$ ) *in vitro* dienen der Beobachtung des zeitlichen Verlaufes der ASS-Wirkung.

Alle ACB-Patienten erhielten, beginnend am ersten postoperativen Tag, peroral 100 mg ASS täglich. Trotz der oralen ASS-Therapie zeigten rund 75 % aller Patienten nicht die erwartete Hemmung der untersuchten Thrombozytenfunktionen. Auch der *in vitro* Zusatz von ASS erzielte postoperativ keine vollständige Hemmung der Aggregation, TX-Synthese und ATP-Sekretion bei beiden Operationsgruppen (mit und ohne HLM). Die extrakorporale Zirkulation scheint demzufolge kein notwendiger Faktor für die Entstehung einer postoperativen ASS-Nonresponse zu sein.

Ein nahezu unverändertes Verhältnis von thrombozytärer Aggregation zu TX-Synthese von ASS-Respondern zu -Nonrespondern konnte keine gesteigerte Sensitivität gegenüber dem gebildeten  $\text{TXA}_2$  aufdecken.

Die semiquantitative Auswertung der COX-2 Immundetektion (Western-Blot) stellte eine Intensitätszunahme der COX-2 Signale bei sieben Patienten am 5. postoperativen Tag fest. Eine Bedeutung der COX-2 für eine ASS-Nonresponse nach CABG ist jedoch nicht wahrscheinlich, da sich keine Unterschiede in der COX-2 Immunreaktivität bei erheblicher interindividueller Variabilität zwischen ASS-„resistenten“ und ASS-sensitiven ACB-Patienten fanden.

In den zeitkinetischen Untersuchungen mit ASS wurde deutlich, dass mit erhöhter Konzentration (10  $\mu\text{M}$  ASS) auch „resistente“ Plättchen innerhalb eines kürzeren Zeitintervalls (< 60 min) hinsichtlich Aggregation, TX-Synthese und ATP-Sekretion gehemmt werden konnten. Die Wirkung von ASS war bei den ASS-Nonrespondern nicht aufgehoben, sondern lediglich verzögert. Eine suffiziente Hemmung ASS-„resistenter“ Thrombozyten war durch eine verlängerte Exposition bzw. eine gesteigerte Konzentration möglich.

Die Ergebnisse sprechen dafür, dass ASS-Nonresponse auf eine beeinträchtigte Interaktion zwischen COX-1 und ASS beruht. Ein verändertes Therapieprotokoll mit mehrfacher ASS Gabe täglich, einer Dosissteigerung oder eine veränderte Galenik mit protrahierter Wirkstofffreisetzung könnte ein Ansatz sein, ASS-Nonresponse zu überwinden.