

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

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. K. Schrör

**Hemmung von Funktion und Thromboxansynthese
„ASS-resistenter“ Thrombozyten
durch ausgewählte Cyclooxygenase-Inhibitoren**

Dissertation

**zur Erlangung des Grades eines Doktors der
Medizin**

**Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf**

**vorgelegt von
Un-Hie Kim**

2007

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: Prof. Dr. rer. nat. Jochen D. Schipke

INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung	1
1.1	Die koronare Herzerkrankung und ihre Therapiemöglichkeiten	1
1.2	Aortokoronare Bypass-Operation (ACB-Operation)	1
1.2.1	Restenosen als Komplikation nach ACB-Operation	2
1.2.2	Prophylaxe von Restenosen nach ACB-Operation mit ASS	2
1.3	Begriff der „ASS-Resistenz“	3
1.4	Klinische Relevanz der ASS-Resistenz	5
1.5	Pharmakologische Hemmung der Thrombozytenfunktion	7
1.6	Die Cyclooxygenase	9
1.6.1	Isoformen der Cyclooxygenase	10
1.6.2	Cyclooxygenase in Thrombozyten	10
1.7	Hemmstoffe der Cyclooxygenase: Unterschiede in der Isoform-Selektivität	11
1.8	Fragestellung	12
2	Material und Methoden	13
2.1	Patienten	13
2.2	Entnahme und Aufarbeitung der Blutproben	14
2.3	Aufbereitung der Arachidonsäure	15
2.4	Thrombozyten-Aggregation	15
2.4.1	Messung der Thrombozyten-Aggregation	18
2.4.2	Durchführung der Aggregationsversuche	18
2.4.3	Auswertung der Aggregationskurven	18
2.5	Messung der Thromboxan-Synthese (Radioimmunoassay)	19
2.6	Material	20
2.6.1	COX-Inhibitoren	20
2.6.2	Material für die Aggregationsversuche	20
2.6.3	Material für die TXB ₂ -Messung (Radioimmunoassay)	21
2.7	Statistische Auswertung	21

3	Ergebnisse	22
3.1	Thrombozytenfunktionshemmung durch ASS	22
3.1.1	Thrombozyten-Aggregation	22
3.1.2	Thromboxan-Synthese	25
3.1.3	Einteilung in ASS-Responder und ASS-Nonresponder	26
3.2	Thrombozytenfunktionshemmung durch reversible COX-Inhibitoren	29
3.2.1	Essigsäure-Derivate: Indometacin und Diclofenac	30
3.2.2	Propionsäure-Derivate: Naproxen und Flurbiprofen	34
3.2.3	Oxicam-Derivat: Piroxicam	38
3.2.4	Selektive COX-2-Inhibition: DFP	40
3.3	Tabellarischer Anhang mit numerischen Ergebnissen	41
4	Diskussion	42
4.1	Extrathrombozytäre Ursachen der ASS-Resistenz	45
4.2	Potentielle Ursachen auf Thrombozyten-Ebene	46
4.3	Potentielle Ursachen auf Ebene der thrombozytären COX (COX-1/COX-2)	48
4.3.1	COX-2 in Thrombozyten	48
4.3.2	Veränderungen der COX-1 in Thrombozyten	49
4.3.3	Arzneimittel-Wechselwirkungen von ASS mit anderen COX-Inhibitoren an der COX-1	54
4.4	Schlussfolgerungen	54
4.5	Pharmakologische Alternativen zur Hemmung der Thrombozyten- funktion bei ASS-Nonrespondern	55
5	Zusammenfassung	57
6	Literatur	58
7	Veröffentlichungen im Zusammenhang mit dieser Arbeit	64
7.1	Originalarbeit	64
7.2	Kongressbeitrag	64
	Eidesstattliche Erklärung	
	Danksagung	
	Lebenslauf	

Abkürzungsverzeichnis

ArA	Arachidonsäure
ACB-OP	Aortokoronare Bypass-Operation
ADP	Adenosindiphosphat
ASS	Acetylsalicylsäure (Aspirin [®] , Aspisol [®] u.a.)
COX	Cyclooxygenase
DMSO	Dimethylsulfoxid
DFP	[5,5-dimethyl-3-(2-isopropoxy)-4-(4-methanesulfonylphenyl)- 2(5H)-furanone]
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
GP	Glykoprotein
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazine-N'--(2-ethanesulfonic acid)
HLM	Herz-Lungen-Maschine
KHK	koronare Herzerkrankung
M	molar (mol/l)
MRP	multidrug resistance protein
NaOH	Natronlauge
NSAID	nichtsteroidale Antiphlogistika
OAT	organischer Anionentransporter
PAP	plättchenarmes Plasma
PG	Prostaglandin
p.o.	per os
Post-OP	postoperativ
Prä-OP	präoperativ
PRP	plättchenreiches Plasma
PTCA	perkutane transluminale koronare Angioplastie
RIA	Radioimmunoassay
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
TM	Thrombozytenmedium
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TXA ₂	Thromboxan A ₂
TXB ₂	Thromboxan B ₂
U/min	Umdrehungen pro Minute

1 Einleitung

1.1 Die koronare Herzerkrankung und ihre Therapiemöglichkeiten

Die koronare Herzerkrankung (KHK) kann sich klinisch als Angina pectoris, Herzinfarkt oder plötzlicher Herztod manifestieren. In den westlichen Industrienationen stellt sie die häufigste Todesursache dar, so dass der Prävention und der Therapie eine besondere Bedeutung zukommt. Je nach klinischer Manifestation stehen medikamentöse Therapiemöglichkeiten und interventionelle oder operative Revaskularisierungsmaßnahmen zur Verfügung.

Die stabile Angina pectoris kann prinzipiell medikamentös behandelt werden, bei der instabilen Angina pectoris dagegen sollte nach der Akuttherapie eine Koronarangiographie mit Erwägung von Revaskularisierungsmaßnahmen durchgeführt werden, aber auch Patienten mit stabiler Angina pectoris können von Revaskularisierungsmaßnahmen profitieren.

Die Nachbehandlung nach akutem Myokardinfarkt zur langfristigen Prävention arterieller Thrombosen wird sowohl nach perkutaner transluminaler koronarer Angioplastie (PTCA) als auch nach aortokoronarer Bypass-Operation (ACB-OP) mit Thrombozyten-Aggregationshemmern durchgeführt, in erster Linie mit Acetylsalicylsäure (ASS; 100 mg/d per os; p.o.) oder bei ASS-Unverträglichkeit mit Thienopyridinen, z.B. Clopidogrel 75 mg/d. Auch in der Sekundärprävention nach ischämischem Insult (und Ausschluss einer kardialen Emboliequelle) ist ASS das Mittel der Wahl. Therapeutisch wird ASS außerdem bei akutem Koronarsyndrom, transitorisch ischämischen Attacken und prolongierten ischämischen Defiziten standardmäßig eingesetzt.

1.2 Aortokoronare Bypass-Operation (ACB-Operation)

Bei einer signifikanten Hauptstammstenose (>50 %) der linken Koronararterie, einer symptomatischen 3-Gefäßerkrankung oder einer symptomatischen 2-Gefäßerkrankung mit Hauptstammäquivalent besteht eine Indikation zur operativen Koronarrevaskularisation. Dieser Eingriff zählt in der Kardiochirurgie zu den am häufigsten durch-

geführten Operationen. Durch den Einsatz von Koronar-Stents sind gegenüber alleiniger Ballon-Angioplastie wiederholte Revaskularisationen zwar seltener notwendig geworden, dennoch ist die Restenoserate höher als nach ACB-Operationen (SoS Investigators, 2002). Für Patienten mit einer koronaren 2- oder 3-Gefäßerkrankung ist eine ACB-OP auch mit einer höheren Langzeitüberlebensrate assoziiert als bei Durchführung einer PTCA mit Stent (Hannan et al., 2005).

1.2.1 Restenosen als Komplikation nach ACB-Operation

Trotz Vorteil der ACB-OP gegenüber der PTCA mit Stent bezüglich der Langzeitüberlebensrate bei bestimmten Patientengruppen stellt der Verschluss oder die Stenose eines Bypasses eine schwerwiegende Komplikation dar. In der Studie von Weintraub et al. (1994) wird eine 10-Jahresüberlebensrate von 78 % nach erster ACB-OP angegeben, bei 19 % der Patienten war 10 Jahre nach der ersten Operation eine erneute Revaskularisierungsmaßnahme nötig (10 % erneute OP, 7 % PTCA, 2 % PTCA und erneute ACB-OP). Als Ursachen für eine Stenose im aortokoronaren Venen-Transplantat sind die Verdickung der Intima, die fibromuskuläre Hyperplasie und atherosklerotische Veränderungen zu nennen (Butany et al., 1998). Neben dem beschriebenen Gefäßumbau gibt es jedoch noch weitere mögliche Ursachen für Stenosen im Gefäß-Transplantat, insbesondere die Aktivierung von Thrombozyten durch Scherstress im Anastomosenbereich oder durch intraoperative Aktivierung, z.B. infolge Anstiegs der Katecholamin-Konzentration. Die Thrombozyten-Aggregation durch Adrenalin wird über Alpha-2-adrenerge Rezeptoren induziert und kann durch den Alpha-Rezeptor-Antagonisten Nicergolin inhibiert werden (Lanza et al., 1986).

1.2.2 Prophylaxe von Restenosen nach ACB-Operation mit ASS

Zur Prophylaxe von thrombotisch bedingten Stenosen im Gefäß-Transplantat nach ACB-Operationen wird seit vielen Jahren ASS als Standardpräparat eingesetzt. In einer Metaanalyse wurden 17 Studien über die antithrombotische Therapie nach ACB-OP ausgewertet, darunter sieben Studien, in denen ASS im Vergleich zu Placebo untersucht wurde (Fremes et al., 1993). Diese zeigten, dass ASS gegenüber Placebo zu einer

Risikoreduktion eines postoperativen Verschlusses führt, was jedoch nur in zwei Studien statistisch signifikant war. Andererseits profitieren Patienten nach ACB-Operation deutlich weniger von ASS zur Verbesserung der kardiovaskulären Prognose als Patienten anderer kardiovaskulärer Risikogruppen (Angina pectoris, Myokardinfarkt und nach PTCA) (Antiplatelet Trialists' Collaboration, 1994; Antithrombotic Trialists' Collaboration, 2002). Darüber hinaus zeigen Untersuchungen in der frühpostoperativen Phase nach ACB-OP (Tag 1 bis 10), dass durch die postoperative orale ASS-Therapie mit 100 mg/d bei Patienten nach ACB-OP (im Vergleich zu gesunden Probanden, die dieselbe Dosis einnahmen) die Kollagen-induzierte Thrombozyten-Aggregation oder Thromboxan-Synthese nicht oder nur unvollständig gehemmt wird (Zimmermann et al., 2001). Wenn ASS den erwarteten pharmakologischen Effekt (Hemmung der Thromboxan-Synthese bzw. der Aggregation von Thrombozyten) nicht hervorruft, spricht man von der „ASS-Resistenz“ (vgl. Abschnitt 1.3).

Eine vorausgegangene ACB-OP kann als Risikofaktor für das Vorhandensein einer „ASS-Resistenz“ angesehen werden (Kuliczkowski et al., 2005). 41 von 205 KHK-Patienten, die seit mindestens einer Woche eine Therapie mit ASS erhielten, waren anhand einer Kollagen- und ADP-induzierten Thrombozyten-Aggregation >70 % ASS-resistent. Hierbei bestand eine signifikante Assoziation zwischen dem Vorhandensein einer ASS-Resistenz und einer vorausgegangenen ACB-OP, die bei den ASS-Nonrespondern 760 ± 518 Tage zurücklag. Interessanterweise traf dies auf andere untersuchte klinische Parameter, z.B. vorausgegangene perkutane Koronarintervention oder vorausgegangener Schlaganfall, nicht zu.

ASS scheint also insbesondere nach ACB-Operationen nicht den erwarteten oder gewünschten Effekt der Thrombozyten-Aggregationshemmung hervorzurufen.

1.3 Begriff der „ASS-Resistenz“

Der Begriff der ASS-Resistenz wird in der Literatur uneinheitlich verwendet und ist verschieden definiert. Grundsätzlich bezeichnet „Resistenz“ das Problem, dass ASS bei einigen Patientengruppen mit koronarer, zerebrovaskulärer oder peripherer Gefäß-erkrankung thrombotische Komplikationen nicht verhindert (klinische Definition) oder nicht den erwarteten pharmakologischen Effekt (Hemmung der Thromboxan-Synthese

oder der Aggregation von Thrombozyten) hervorruft (pharmakologische Definition). Letzteres wurde sowohl bei Patienten als auch bei gesunden Probanden beschrieben (Buchanan & Brister, 1995; Kawasaki et al., 2000).

Um ASS-resistente Patienten zu identifizieren, wurden verschiedene in vitro Tests eingesetzt und unterschiedliche Einteilungen verwendet. Beispielsweise existieren Funktionstests, um Parameter zu bestimmen wie die Länge der Blutungszeit (Buchanan & Brister, 1995), das Ausmaß der Thromboxan-Synthese (Zimmermann et al., 2001), die Thrombozytenfunktion (Adhäsion und Aggregation) -gemessen mit einem „Platelet function analyzer PFA-100“- (Gum et al., 2001; Pamukcu et al., 2005) oder das Ausmaß der Thrombozyten-Aggregation -gemessen mit der optischen Methode- (Gum et al., 2003; Kuliczowski et al., 2005). Hierbei werden verschiedene Agonisten verwendet, z.B. Kollagen/Adrenalin bei Messung am PFA-100-System (Gum et al., 2001) oder Arachidonsäure (ArA), Adenosindiphosphat (ADP) oder Kollagen zur Stimulation der Thrombozyten-Aggregation (Gum et al., 2003; Zimmermann et al., 2001). Entsprechend der Vielzahl an Methoden und verwendeten Parametern zur Definition der ASS-Resistenz bei unterschiedlichen Patientenkollektiven variieren auch die Angaben über die Häufigkeit, die zwischen 5 und 60 % lag (Review s. Martin & Talbert, 2005).

Neben den eben genannten methodischen Unterschieden bei der Definition der ASS-Resistenz, gibt es eine Einteilung, die die möglichen Ursachen der ASS-Resistenz berücksichtigt. Weber et al. (2002a) unterscheiden anhand der Kollagen (1µg/ml)-induzierten Thrombozyten-Aggregation und Thromboxan-Synthese (gemessen als Thromboxan B₂) in plättchenreichem Plasma (PRP) zwischen drei Typen der ASS-Resistenz: pharmakokinetische, pharmakodynamische und Pseudo-Resistenz. An der Studie nahmen gesunde Probanden und Patienten mit kardiovaskulärer oder zerebrovaskulärer Erkrankung teil.

Bei ASS-Respondern wird nach oraler ASS-Gabe (100 mg/d für fünf Tage) sowohl die Aggregation als auch die Thromboxan-Synthese vollständig (>95 %) inhibiert. Eine ASS-Resistenz unter ASS-Therapie (100 mg/d p.o. seit mindestens fünf Tagen) kann anhand folgender Kriterien in drei verschiedene Typen eingeteilt werden:

Bei der ASS-Resistenz **Typ I** (pharmakokinetischer Typ) wird nach oraler ASS-Gabe weder die Aggregation noch die Thromboxan-Synthese vollständig inhibiert, wohingegen die in vitro Zugabe von ASS (100 µM) die Thromboxan-Synthese (>95 %) und die Aggregation vollständig hemmt.

Bei der ASS-Resistenz **Typ II** (pharmakodynamischer Typ) kann weder durch die orale ASS-Gabe noch durch Zugabe von ASS (100 µM) in vitro die Thromboxan-Synthese und Aggregation vollständig gehemmt werden.

Bei der ASS-Resistenz **Typ III** („Pseudo-Resistenz“) kann sowohl durch ASS-Therapie als auch durch in vitro Zugabe von ASS die Thromboxan-Synthese gehemmt werden, die Aggregation jedoch nicht. Dieser Typ III wird als „Pseudo-Resistenz“ bezeichnet, da ASS bei diesen Patienten den erwarteten pharmakodynamischen Effekt, die Hemmung der thrombozytären Thromboxan-Synthese, bewirkt. Eine Aggregation kann dennoch induziert werden, da Thromboxan-unabhängige Mechanismen induziert werden. In der vorliegenden Arbeit wird insbesondere auf die ASS-Resistenz vom Typ II (pharmakodynamischer Typ) näher eingegangen.

1.4 Klinische Relevanz der ASS-Resistenz

Bei einer verminderten Wirksamkeit von ASS zur Thrombozytenfunktionshemmung konnte in einigen Studien, allerdings bei Verwendung verschiedener Messparameter, auch ein Zusammenhang mit der Klinik dargestellt werden:

Bei Patienten aus der HOPE-Studie (Heart Outcomes Prevention Evaluation; Yusuf et al., 2000) wurde die 11-Dehydro-TXB₂-Konzentration im Urin (in ng/mmol Kreatinin) als Maß für die thrombozytäre Thromboxan-Synthese über einen Zeitraum von 5 Jahren bestimmt (Eikelboom et al., 2002). Hierbei wurden 488 Patienten mit Myokardinfarkt, Schlaganfall oder gefäßbedingtem Tod und 488 Kontrollpersonen ohne derartige Ereignisse gegenübergestellt; beide Gruppen wurden mit ASS therapiert. Erhöhte Konzentrationen dieses Thromboxan-Metaboliten im Urin gingen mit einem signifikant höheren Risiko für Myokardinfarkt und gefäßbedingten Tod einher. Für das Schlaganfallrisiko war jedoch kein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe erkennbar.

Bei Thrombozyten-Aggregationsmessungen an 326 KHK-Patienten unter ASS-Therapie zeigten 17 Patienten eine ASS-Resistenz, die mit einem erhöhten Risiko für Myokardinfarkt, Tod oder zerebrovaskulärem Ereignis assoziiert war (Gum et al., 2003).

Yilmaz et al. (2005) bestimmten anhand von Thrombozytenfunktionsmessungen mit PFA-100 die Prävalenz der ASS-Resistenz bei 14 Patienten mit einer koronaren Bypass-Stenose in einer späten Kontrollangiographie nach ACB-OP. Bei dem Vergleich mit derselben Anzahl von Kontrollpersonen ohne Bypass-Stenose zeigte sich in der Patientengruppe mit Bypass-Stenose eine viel höhere Prävalenz (50 % vs. 7 %).

Bei deutlich mehr Bypass-Patienten wurde der Unterschied zwischen ASS-Respondern und ASS-Nonrespondern bezüglich der thrombotischen Ereignisrate in einem Zeitraum von zwei Jahren nach ACB-OP untersucht. Die insgesamt 289 Patienten hatten sich einer nicht-notfallmäßigen Bypass-OP unterzogen und wurden postoperativ mit 325 mg/d therapiert. 54,7 % der Patienten wurden anhand der unzureichenden Wirkung von ASS auf die Blutungszeit als ASS-Nonresponder eingestuft, von denen 9,5 % thrombotische Ereignisse hatten, verglichen mit 6,9 % bei den ASS-Respondern. Dieser Unterschied war nicht signifikant (Buchanan et al., 2000).

Bei Patienten besteht nach ACB-OP (off-pump) eine klare Assoziation zwischen dem Vorhandensein einer ASS-Resistenz und dem Auftreten von Bypass-Thrombosen (Poston et al., 2006). Insbesondere bei großen Endothelschäden hatten ASS-Nonresponder eine deutlich höhere Rate an Bypass-Thrombosen als ASS-Responder.

Die genannten Studien liefern also zahlreiche und überzeugende Anhaltspunkte dafür, dass bei ASS-resistenten Patienten, die anhand von Laborparametern als solche identifiziert wurden, negative Auswirkungen auf den klinischen Verlauf möglich sind. Die Ergebnisse sind jedoch nicht einheitlich. Das kann auch damit zusammenhängen, dass die verwendeten Methoden zur Messung einer unzureichenden ASS-Wirkung unterschiedlich sind (11-Dehydro-TXB₂ im Urin, Thrombozyten-Aggregationsmessung, PFA-100-System, Blutungszeit). Thrombozytenfunktionsmessungen wurden von Yilmaz et al. (2005) am PFA-100-System durchgeführt. Diese Methode ist zur Definition der ASS-Resistenz wenig mit Aggregationsmessungen vergleichbar. Bei Messungen mit PFA-100 und Aggregationsmessungen ergaben sich nicht dieselbe Anzahl an ASS-resistenten Patienten (9,5 % vs. 5,5 %), und nur 4 der 18 anhand der Aggregation als ASS-resistent definierten Patienten waren auch bei Messung mit PFA-100 ASS-resistent (Gum et al., 2001). Darüber hinaus lieferten Untersuchungen mit PFA-100 an

gesunden Probanden nach Einnahme von ASS, verglichen mit ASS-Zugabe in vitro, ebenfalls diskordante Ergebnisse (Golanski et al., 2004).

1.5 Pharmakologische Hemmung der Thrombozytenfunktion

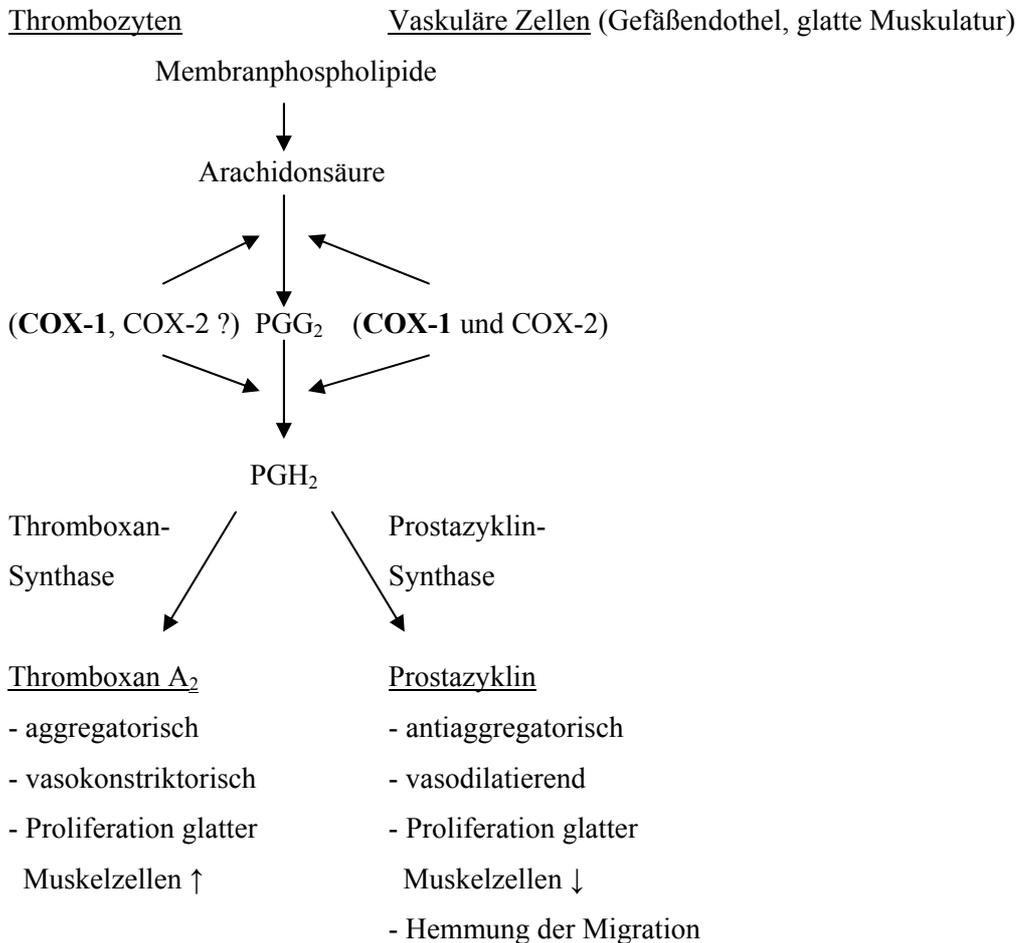
ASS ist der am häufigsten eingesetzte Inhibitor der Thrombozytenfunktion. Bei bestimmten Indikationen, z.B. bei ASS-Unverträglichkeit oder erhöhtem Thromboseisiko, werden zunehmend auch Thienopyridine (Clopidogrel oder Ticlopidin p.o.) eingesetzt. Bei speziellen Indikationen (Koronarinterventionen) werden Glykoprotein (GP)-IIb/IIIa-Rezeptorantagonisten (Abciximab, Eptifibatid oder Tirofiban i.v.) eingesetzt. Im Folgenden werden die verschiedenen Wirkmechanismen und einige Risiken der jeweiligen Antiplättchen-Therapie dargestellt.

ASS führt über eine irreversible Acetylierung der Cyclooxygenase (COX) zu einer Hemmung der thrombozytären Thromboxan A₂-Synthese, aber auch der vaskulären Prostazyklinsynthese (Abbildung 1). Während in kernhaltigen Endothelzellen die Cyclooxygenase durch Neusynthese innerhalb von Stunden ersetzt werden kann, bleibt die Thromboxan-Synthese in den kernlosen Thrombozyten ohne die Fähigkeit zur Proteinbiosynthese für die 7- bis 10-tägige thrombozytäre Lebensdauer gehemmt.

In niedrigen Dosierungen kann somit die unerwünschte Hemmung der vaskulären Prostazyklinsynthese gering gehalten werden, da nach Deacetylierung von ASS in der Leber im Sinne eines first-pass-Effektes nur der bioverfügbare Anteil (45-50 %) die Gefäße im systemischen Kreislauf erreicht, wohingegen die Thrombozyten im portalvenösen Blut der gesamten enteral resorbierten ASS-Dosis ausgesetzt sind (Review s. Hohlfeld, 1996). Daraus resultiert möglicherweise ein günstigeres Verhältnis der Synthesehemmung von aggregatorisch und vasokonstriktorisch wirkendem Thromboxan A₂ (TXA₂) zu dem antiaggregatorisch und vasodilatierend wirkendem Prostazyklin (PGI₂). Von den bekannten Risiken einer ASS-Therapie sind vor allem die magenschleimhautschädigende Wirkung und Blutungskomplikationen zu nennen.

Abbildung 1

Die Cyclooxygenase (COX) als Schlüsselenzym der Synthese von Prostaglandinen (PG) und Thromboxan A₂ aus Arachidonsäure, beispielhaft für Thrombozyten und vaskuläre Zellen dargestellt. Bei Hemmung der COX-1 durch ASS resultiert in Thrombozyten eine verminderte Thromboxan A₂-Synthese und in Endothelzellen eine verminderte Prostazyklinsynthese.



Thienopyridine (Clopidogrel oder Ticlopidin) führen nach hepatischer Metabolisierung zu einer irreversiblen Hemmung des thrombozytären ADP-Rezeptors P2Y₁₂ und blockieren auf diese Weise die ADP-induzierte Thrombozytenaktivierung, einen bedeutsamen Verstärkungsmechanismus der Thrombozyten-Aggregation (Hollopeter et al., 2001; Hechler et al., 2005). Die Ergebnisse der CAPRIE-Studie (CAPRIE Steering Committee, 1996) zeigten eine mindestens vergleichbare Wirksamkeit von Clopidogrel gegenüber ASS bezüglich der Reduktion ischämischer Ereignisse bei Patienten mit atherosklerotischer Gefäßerkrankung, wobei Patienten nach ACB-OP besonders profitierten (Bhatt et al., 2001). Dennoch wird gegenwärtig in der postoperativen Thromboseprophylaxe ASS bevorzugt eingesetzt, wobei vor allem die höheren Kosten von Clopidogrel den Einsatz limitieren.

Bekannte Nebenwirkungen der Thienopyridine sind Durchfälle und Hautausschläge. Die selten vorkommende schwere Neutropenie stellt eine schwerwiegende Komplikation in erster Linie unter Ticlopidin-Therapie dar und macht engmaschige Blutbildkontrollen in der ersten Behandlungszeit notwendig.

GPIIb/IIIa-Rezeptorantagonisten (Abciximab, Eptifibatid oder Tirofiban) hemmen die Fibrinogenbindung an den thrombozytären Fibrinogenrezeptor GPIIb/IIIa und somit einen zentralen Schritt der Thrombozyten-Aggregation. Unabhängig von der Art der Thrombozytenaktivierung kommt es durch Hemmung der Fibrinogenbindung an GPIIb/IIIa zu einer potenten Aggregationshemmung. Hauptnebenwirkungen sind unerwünschte Blutungen und Thrombozytopenien (Gawaz, 1999).

GPIIb/IIIa-Rezeptorantagonisten sind wegen des hohen Blutungsrisikos zur postoperativen Prophylaxe arterieller Thrombosen bei Patienten nach ACB-OP weniger geeignet. Ihre Anwendung ist auf das akute Koronarsyndrom, insbesondere mit Katheterintervention, beschränkt. Oral wirksame Substanzen, wie z.B. Sibrafiban, ergaben keinen Vorteil gegenüber ASS in der Sekundärprävention nach akutem Koronarsyndrom (SYMPHONY Investigators, 2000). In einer Metaanalyse zeigte sich bei Auswertung von vier klinischen Studien sogar ein leicht erhöhtes Mortalitätsrisiko unter Therapie mit oral wirksamen GPIIb/IIIa-Rezeptorantagonisten (Chew et al., 2001).

1.6 Die Cyclooxygenase

Die für die Thrombozytenfunktionshemmung durch ASS entscheidende Cyclooxygenase (COX-1) kommt ubiquitär im Organismus vor und ist das Schlüsselenzym der Synthese von Thromboxan und Prostaglandinen (PG) aus Arachidonsäure (ArA) (Abbildung 1). Die aus Membranphospholipiden freigesetzte Arachidonsäure wird dabei zunächst unter Einführung von Sauerstoff (Oxygenierung) und Ringschluss (Zyklisierung) in das Prostaglandin-Hydroendoperoxid PGG₂ überführt. In der anschließenden Peroxidasereaktion wird PGG₂ zu PGH₂ reduziert. Diese Endoperoxide sind chemisch labil. In Thrombozyten entsteht aus PGH₂ Thromboxan A₂ (TXA₂) unter katalytischer Mitwirkung der Thromboxan-Synthase. TXA₂ ist instabil, da es aufgrund einer hohen Ringspannung leicht hydrolysiert wird. Dabei entsteht das stabile, nicht mehr biologisch aktive Thromboxan B₂.

1.6.1 Isoformen der Cyclooxygenase

Die bekannten Isoenzyme COX-1 und COX-2 werden von unterschiedlichen Genen kodiert und weisen Unterschiede in ihren Funktionen und in ihrer Inhibitor-Selektivität auf, obwohl sie strukturell ähnlich sind. Die COX-1 ist konstitutiv in den meisten Zellen vorhanden und erfüllt physiologische Funktionen. Beispielsweise katalysiert sie die Synthese von protektiven Prostaglandinen in der Magenschleimhaut und in der Niere. In Thrombozyten und im Gefäßendothel katalysiert sie die Synthese von Thromboxan A₂ und Prostazyklin mit entgegengesetzten Wirkungen auf die Aggregation (Abbildung 1). Die COX-2 dagegen gilt als induzierbare Isoform, die bei pathophysiologischen Vorgängen eine wichtige Rolle spielt, vor allem bei der Bildung von Entzündungsmediatoren in Entzündungsprozessen und auch bei der Regulation des Zellwachstums. Zu den induzierenden Stimuli gehören entsprechend proinflammatorische Zytokine (z.B. Interleukin (IL)-1, IL-2) sowie Wachstumsfaktoren. Daneben kommt die COX-2 jedoch auch konstitutiv vor, z.B. im zentralen Nervensystem. Zudem wird den durch COX-2 synthetisierten Prostaglandinen eine Bedeutung bei der Ovulation und beim Geburtsvorgang zugesprochen (Vane et al., 1998).

Neben diesen beiden bekannten COX-Isoformen wurden noch weitere Isoformen beschrieben, darunter COX-3, die durch das COX-1 Gen kodiert wird, in der entsprechenden mRNA jedoch nicht das Intron 1 enthält und somit eine Variante der COX-1 ist. Bei Menschen wurde COX-3-mRNA im zerebralen Kortex und im Herz nachgewiesen (Chandrasekharan et al., 2002). Die Funktion des Enzyms ist nicht bekannt.

1.6.2 Cyclooxygenase in Thrombozyten

In Thrombozyten überwiegt bei weitem die COX-1. Weber et al. (1999) wiesen jedoch mittels Western Blot auch die Isoform COX-2 in humanen Thrombozyten nach und vermuteten, dass die COX-2-Expression in Thrombozyten eine Rolle bei der ASS-Resistenz spielt. In nachfolgenden durchflusszytometrischen Untersuchungen an Thrombozyten von Patienten, die sich einer ACB-OP unterzogen, zeigte sich ein signifikanter Anstieg der COX-2-Expression an Tag 5 im Vergleich zu den präoperativen Werten (Weber et al., 2002b; Zimmermann et al., 2003). Der selektive COX-2-Inhibitor Celecoxib senkte die Thromboxan-Synthese bei ASS-resistenten Thrombozyten

von Patienten nach ACB-OP nicht signifikant (Zimmermann et al., 2003), so dass fraglich ist, ob die COX-2 in Thrombozyten eine pathophysiologische Bedeutung hat.

Die Wirkung anderer COX-Inhibitoren unterschiedlicher Substanzklassen auf die Thrombozytenfunktion bei Patienten mit ASS-Resistenz nach ACB-OP soll in der vorliegenden Arbeit untersucht werden. Im Unterschied zu ASS hemmen reversible COX-Inhibitoren die COX-1 kompetitiv und konkurrieren mit Arachidonsäure um das aktive Zentrum der COX-1. Ebenso wie ASS sind die Essigsäurederivate Indometacin und Diclofenac Acetyl-substituiert und ähneln diesbezüglich der chemischen Struktur von ASS. Propionsäurederivate enthalten wie ASS und Essigsäurederivate eine Carboxylgruppe. Oxicame (z.B. Piroxicam) besitzen dagegen keine Carboxylgruppe.

1.7 Hemmstoffe der Cyclooxygenase: Unterschiede in der Isoform-Selektivität

Die Cyclooxygenase in Thrombozyten stellt den Angriffspunkt von ASS bei Hemmung der Thrombozyten-Aggregation dar. Andere nichtsteroidale Antiphlogistika (NSAID) können in Thrombozyten durch Inhibierung der Cyclooxygenase ebenfalls zu einer verminderten Thromboxan-Synthese und somit zu einer Aggregationshemmung führen, wobei Unterschiede in der Präferenz der COX-Isoform bestehen. Klinisch werden sie hauptsächlich zur antiinflammatorischen und analgetischen Therapie eingesetzt.

ASS hemmt durch Übertragung eines Acetylrestes auf die Aminosäure Serin-530 die Cyclooxygenase irreversibel mit einer ca. 100-fachen Präferenz für die COX-1. Diese Acetylierung findet jedoch nicht im katalytischen Zentrum des Enzyms statt, sondern führt zu einer sterischen Blockade eines hydrophoben Kanals im Cyclooxygenase-Molekül, den das Substrat Arachidonsäure passieren muss, um an das katalytische Zentrum zu gelangen. Bedeutend für die katalytische Funktion ist vor allem Tyrosin-385 (Roth & Majerus, 1975; Picot et al., 1994; Loll et al., 1995).

Im Gegensatz zu ASS, dessen Acetylrest kovalent an die COX gebunden wird, hemmen andere NSAIDs die COX kompetitiv und reversibel und binden unter anderem an Arginin-120. An diese Stelle im COX-Molekül bindet initial auch ASS (Rome et al., 1975; Patrono et al., 2001). **Indometacin** gehört zu den Essigsäure-Derivaten und zeigt eine 60-fache Präferenz für die COX-1. **Diclofenac** ist ebenfalls ein Vertreter der Essig-

säure-Derivate, hemmt aber beide Isoformen der COX in ähnlichem Ausmaß. **Naproxen** gehört zu den Propionsäure-Derivaten und hemmt wie Diclofenac die COX-1 und COX-2 ungefähr in gleichem Maße (Mitchell et al., 1993). **Flurbiprofen** ist strukturell verwandt mit Naproxen und gehört ebenfalls zu den Propionsäure-Derivaten. Nach Cryer & Feldman (1998) ist Flurbiprofen relativ COX-1-selektiv. **Piroxicam** weist eine Präferenz für die COX-1 auf und enthält als Oxicam-Derivat im Gegensatz zu den anderen genannten NSAIDs keine Carboxylgruppe.

Daneben gibt es COX-Inhibitoren, die selektiv die COX-2 hemmen, wie z.B. Celecoxib, Nimesulide oder Etodolac (Vane, 2000). **DFP** [5,5-dimethyl-3-(2-isopropoxy)-4-(4-methanesulfonylphenyl)-2(5H)-furanon] ist ein COX-2-Inhibitor, der eine besonders hohe COX-2-Selektivität aufweist (Leblanc et al., 1999). DFP hemmt die thrombozytäre COX-1 und die monozytäre COX-2 in einem COX-1/COX-2 IC₅₀-Verhältnis von 1918/1. Das ebenfalls als COX-2-selektiv geltende Celecoxib (zum Vergleich) ergab ein Verhältnis von nur 29,6/1 (Tacconelli et al., 2002).

1.8 Fragestellung

Der molekulare Mechanismus der „Resistenz“ von Thrombozyten gegenüber ASS ist bisher nicht bekannt. Da Voruntersuchungen dafür sprechen, dass eine „Resistenz“ auf der Ebene der thrombozytären COX vorliegt, stellt sich die Frage, ob dies nur die Acetylierung des Enzyms durch ASS betrifft oder auch auf die reversible Inhibition des Enzyms durch andere COX-Inhibitoren, wie Indometacin, Diclofenac, Naproxen, Flurbiprofen und Piroxicam zutrifft.

Sollten ASS-resistente Thrombozyten sich auch gegenüber anderen COX-Inhibitoren als weniger sensitiv erweisen, könnte eine Modifikation des aktiven Zentrums der COX-1 vorliegen, die nicht allein die Acetylierungsstelle (Serin 530) betrifft. Zusätzlich würde dieser Befund die Hypothese widerlegen, dass eine beschleunigte Inaktivierung von ASS in Thrombozyten von ASS-Nonrespondern zugrunde liegt.

Zur Bearbeitung dieser Fragestellung sollten Blutproben von KHK-Patienten vor und nach ACB-OP gewonnen und die Hemmbarkeit der Thrombozytenfunktion durch ASS im Vergleich zu den COX-Inhibitoren Indometacin, Diclofenac, Naproxen, Flurbiprofen oder Piroxicam in vitro untersucht werden. Bei allen Patientenproben wurden zur Beurteilung der Thrombozytenfunktion die Thrombozyten-Aggregation und die thrombozytäre Thromboxan-Synthese gemessen.

Wenn ASS-resistente Thrombozyten sich auch gegenüber anderen COX-Inhibitoren als weniger sensitiv erweisen, sind folgende weiterführende Fragen von Interesse:

- Gibt es Gemeinsamkeiten bei strukturell verwandten COX-Inhibitoren?
- Sind COX-Inhibitoren mit einer Präferenz zu der COX-1-Isoform in größerem Ausmaß von einer Resistenzentwicklung betroffen als COX-Inhibitoren, die beide Isoformen in gleichem Ausmaß hemmen?

Darüber hinaus sollte untersucht werden, ob durch den hochselektiven COX-2-Inhibitor DFP in einer Konzentration zur maximalen Hemmung der COX-2-Isoform (1 μ M) die Thromboxan-Synthese in Thrombozyten von ASS-resistenten Patienten gehemmt werden kann, was für eine Beteiligung der COX-2-Isoform an der Thromboxan-Synthese sprechen würde.

2 Material und Methoden

2.1 Patienten

In die Studie wurden 66 Patienten (1 weiblich, 65 männlich) mit stabiler Angina pectoris einbezogen, die sich wegen einer koronaren (2- oder 3-) Gefäßerkrankung in der Klinik für Thorax- und Kardiovaskuläre Chirurgie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf einer elektiven aortokoronaren Bypass-Operation unter Verwendung der extrakorporalen Zirkulation (Herz-Lungen-Maschine) unterzogen. Alle Patienten wurden über den Zweck der Studie aufgeklärt und gaben ihre schriftliche Zustimmung. Ein positives Votum wurde seitens der Ethikkommission der Heinrich-Heine-Universität erteilt. Das Alter der Patienten lag zwischen 45 und 89 Jahren mit einem Median von 66 Jahren. Wegen vorzeitiger Verlegung, Versterben oder messtechnischer Probleme konnten 7 Patienten nicht in die Auswertung einbezogen werden. Die Patienten wurden nach einer durchschnittlichen Verweildauer von 12 Tagen aus der chirurgischen Klinik entlassen oder verlegt.

Zu den Ausschlusskriterien gehörten: ASS-Unverträglichkeit, hämostaseologische Begleiterkrankungen, bekannte Hepatitis- oder HIV-Infektionen, terminale Niereninsuffizienz, Leberinsuffizienz sowie dekompensierte Herzinsuffizienz. Thrombozyten-

Aggregationshemmer (ASS, Clopidogrel) wurden mindestens 10 Tage vor dem geplanten Operationstermin abgesetzt. Ansonsten wurde die Pharmakotherapie der Patienten unverändert fortgeführt, mit Ausnahme organischer Nitrate, die postoperativ nicht mehr verabreicht wurden. Ab dem Morgen des ersten postoperativen Tages wurde Acetylsalicylsäure (Aspirin protect 100[®], Bayer, Leverkusen) in einer Dosis von 100 mg/d oral verabreicht. Darüber hinaus erhielten die Patienten standardmäßig Cefazolin (Gramaxin[®], 3 x 1 g/d i.v.) während der ersten beiden postoperativen Tage sowie Enoxaparin (Clexane[®], 40 mg/d s.c.), Omeprazol (Antra[®], 40 mg/d p.o.) und Acetylcystein (Fluimucil[®], 300 mg/d p.o.) bis zur Entlassung. Diuretika (Furosemid) und Kalium (Kalinor Brause[®]) wurden bedarfsorientiert gegeben.

2.2 Entnahme und Aufarbeitung der Blutproben

Unmittelbar vor Narkoseeinleitung und am fünften (vierten bis sechsten) postoperativen Tag wurde den Patienten kurz vor Einnahme der Morgenmedikation 20 ml venöses Blut entnommen. Es wurde das Vacutainer[®]-System (Becton Dickinson Vacutainer Systems, Plymouth, UK), welches 0,129 M Natrium-Citrat enthält, verwendet. Sofort nach der Entnahme erfolgte die Aufarbeitung der Blutproben im Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf mit anschließender Durchführung der Aggregationsexperimente.

Die Gewinnung des plättchenreichen Plasmas (PRP) erfolgte durch 10-minütige Zentrifugation des Blutes in den Vacutainer-Röhrchen bei 800 U/min und Raumtemperatur (Minifuge GL, Heraeus Christ). Nach der Zentrifugation wurde das PRP in ein 10 ml Polyäthylenröhrchen abpipettiert, wobei die Pipettenspitze nur minimal in das PRP eintauchte, um weitestgehend leukozyten- und erythrozytenfreies PRP aufzunehmen. Der Rest der Blutprobe wurde auf 2 ml Eppendorfcups verteilt, bei 14000 U/min für 6 min (Tischzentrifuge Eppendorf Centrifuge 5415c) zentrifugiert und das auf diese Weise gewonnene plättchenarme Plasma (PAP) in 2 ml Eppendorfhütchen abpipettiert und erneut bei 14000 U/min für 6 min zentrifugiert, um weitestgehend erythrozytenfreies PAP für die Eichung des Aggregometers zu erhalten.

2.3 Aufbereitung der Arachidonsäure

Als Stimulus der Thrombozyten-Aggregation und der thrombozytären Thromboxan-Synthese wurde 1 mM Arachidonsäure (ArA) verwendet, weil die ArA-stimulierte Thrombozyten-Aktivierung ausschließlich Thromboxan-abhängig verläuft und deshalb die Hemmung durch ASS (oder andere COX-Inhibitoren) besonders sensitiv anzeigt.

Aus einer 100 mM ethanolischen Arachidonsäure-Stammlösung (1 g ArA, Oxford Bio-medical Research, Oxford, MI, USA, gelöst in 32,8 ml Ethanol) wurden kleine Vorräte für die Versuche in Glasgefäßen in das Salz überführt. Dafür wurden 150 µl alkoholische Natronlauge (100 mM NaOH in Ethanol) in die Glasgefäße vorgelegt und anschließend mit 50 µl der Arachidonsäure-Stammlösung gemischt. Diese Arachidonsäure/NaOH-Lösung wurde unter N₂ langsam eingedampft. Während des Eindampf-Vorganges wurden die Gefäße vor Tageslicht geschützt. Das auf diese Weise entstandene Salz wurde unter N₂ bei -20 °C stehend und dunkel gelagert. Am jeweiligen Versuchstag wurde das Salz in 100 µl Tris-Puffer (50 mM, pH 7,4) gelöst und diese Arachidonsäure-Lösung als Stimulus für die Thrombozyten-Aggregation verwendet.

2.4 Thrombozyten-Aggregation

Die konzentrationsabhängige Hemmung der Thrombozyten-Aggregation durch ASS, Indometacin, Diclofenac, Naproxen, Flurbiprofen, Piroxicam und DFP wurde vor und an Tag 5 (± 1 Tag) nach ACB-Operation in vitro untersucht. Bei allen Blutproben wurden sowohl die Aggregation als auch die Thromboxan-Synthese gemessen.

Es wurden folgende Konzentrationen der Testsubstanzen in vitro eingesetzt:

ASS	30 µM, 100 µM (Lysinsalz, Aspisol [®])
Indometacin	0,3 µM, 1 µM, 3 µM, 10 µM, 30 µM (50 mM Stammlösung in Ethanol gelöst, Verdünnungen mit TM-Puffer)
Diclofenac	0,3 µM, 1 µM, 3 µM, 10 µM, 30 µM (10 mM Stammlösung in DMSO gelöst, Verdünnungen mit TM-Puffer)
Naproxen	1 µM, 3 µM, 10 µM, 30 µM, 100 µM, 300 µM
Flurbiprofen	0,1 µM, 0,3 µM, 1 µM, 3 µM, 10 µM, 30 µM (100 mM Stammlösung in DMSO gelöst, Verdünnungen mit TM-Puffer)

Piroxicam 3 μ M, 10 μ M, 30 μ M, 100 μ M, 300 μ M

DFP 1 μ M

(In Vorversuchen zeigte DFP in einer Konzentration von 1 μ M eine maximale Hemmung der COX-2.)

Alle Konzentrationen wurden auf der Basis von Vorversuchen mit PRP (gesunder) freiwilliger Spender ausgewählt. Weitere Vorversuche ergaben, dass die gewählten Lösungsmittel keinen Einfluss auf die Messungen der Aggregation und der Thromboxan-Synthese haben.

Versuchsprotokoll

PRP-Proben aller Patienten wurden prä- und postoperativ zunächst jeweils mit ASS in vitro getestet (ASS-Responderstatus) und einer Gruppe der anderen COX-Inhibitoren zugeordnet. Zuerst wurde orientierend PRP von fünf Patienten mit Indometacin geprüft. Nachdem sich eine erhöhte IC₅₀ für die postoperative Hemmung der Aggregation und Thromboxan-Synthese bei ASS-Resistenten ergab, wurde PRP von jeweils 12-14 Patienten mit Indometacin, Diclofenac, Naproxen, Flurbiprofen und/oder DFP in vitro untersucht. Die großen substanzspezifischen Unterschiede führten dazu, dass im Nachgang der Untersuchung PRP von acht weiteren Patienten mit Piroxicam in vitro untersucht wurde, da diese Substanz als Nicht-Carboxylat (Oxicam) in dieser Hinsicht besonders interessierte.

Tabelle 1

Anzahl der je Substanz untersuchten Patienten. In allen Proben wurde auch die Hemmung durch ASS geprüft, so dass die Zahlen nach postoperativem ASS-Responderstatus unterteilt sind.

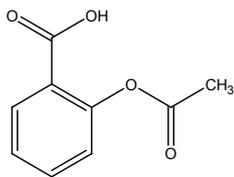
Testsubstanz	ASS-Responder (n)	ASS-Nonresponder (n)	Σ
Indometacin	7	11	18
Diclofenac	8	6	14
Naproxen	7	5	12
Flurbiprofen	6	6	12
Piroxicam	2	6	8
DFP	5	9	14

Tabelle 1 zeigt eine Zusammenstellung der untersuchten Substanzen und die Anzahl der ASS-Responder und ASS-Nonresponder (nach postoperativer Aufteilung) in der jeweiligen Patienten-Gruppe, die zusätzlich zu ASS mit der jeweiligen Substanz untersucht wurde. Die Kriterien der Definition von ASS-Nonrespondern sind in Abschnitt 3.1.3 erläutert. Die Strukturformeln sind in Abbildung 2 dargestellt.

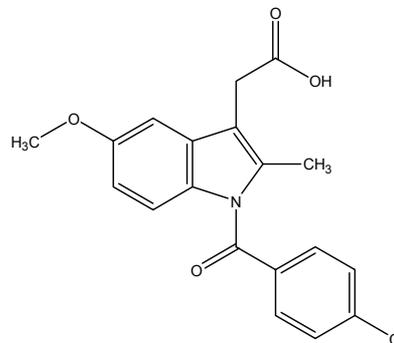
Abbildung 2

Strukturformeln der verwendeten Testsubstanzen. ASS, Indometacin und Diclofenac (Essigsäure-Derivate), Naproxen und Flurbiprofen (Propionsäure-Derivate), Piroxicam (Oxicam-Derivat), DFP (COX-2-Inhibitor).

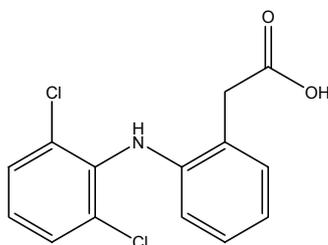
a) Acetylsalicylsäure



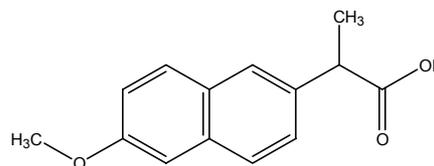
b) Indometacin



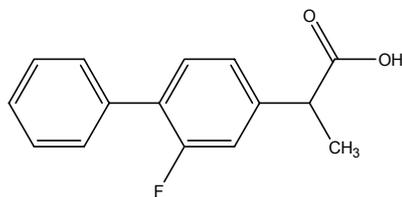
c) Diclofenac



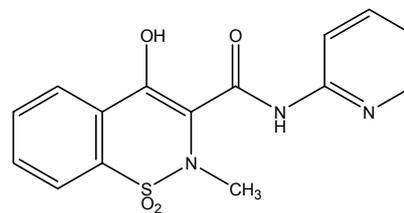
d) Naproxen



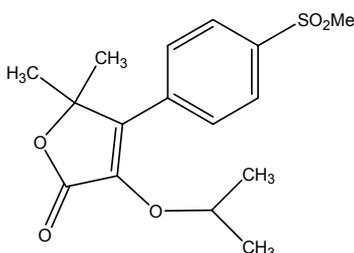
e) Flurbiprofen



f) Piroxicam



g) DFP [5,5-dimethyl-3-(2-isopropoxy)-4-(4-methanesulfonylphenyl)-2(5H)-furanon]



2.4.1 Messung der Thrombozyten-Aggregation

Die Messung der Thrombozyten-Aggregation im PRP erfolgte photometrisch (Turbidimetrie) in einem Zweikanalaggregometer (Labor Hamburg). Das Messprinzip beruht auf einer Änderung der Lichtdurchlässigkeit, welche durch Formwandel der Thrombozyten mit Ausbildung von Pseudopodien („shape change“) und anschließender Aggregation der Thrombozyten verursacht wird. Polychromatisches Licht, welches von einer Niederspannungsglühbirne emittiert wird, trifft auf das PRP. Die Bildung von Plättchenaggregaten führt zu einer Abnahme der Partikelzahl. Das transmittierte Licht wird von einer Photozelle in ein elektronisches Signal umgewandelt und verarbeitet (Abbildung 3). Das Gerät wurde für jede Patientenprobe mit PAP bzw. PRP des jeweiligen Patienten auf 100 % und auf 0 % Lichtdurchlässigkeit geeicht.

2.4.2 Durchführung der Aggregationsversuche

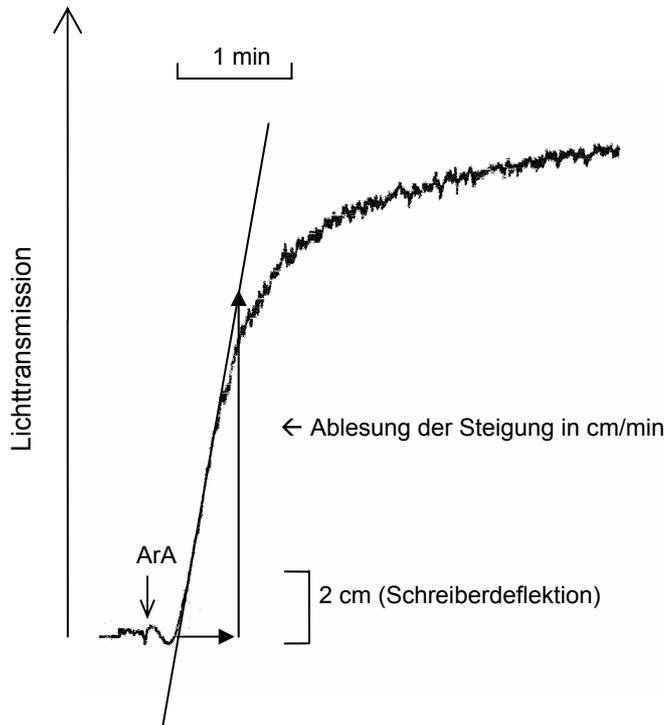
Es wurden 400 µl PRP mit 100 µl TM-Puffer oder 100 µl der jeweiligen Testsubstanz in einer Küvette mit Rührstab bei 37 °C im Wärmeblock über 4 min vorinkubiert. Anschließend wurde das PRP im Aggregometer mit 1200 U/min für 2 min vorstimuliert und danach mit 1 mM Arachidonsäure (ArA) die Thrombozyten-Aggregation gestartet. Nach weiteren 4 min wurde die Thromboxanbildung durch Zugabe von 50 mM Indometacin und 77 mM EDTA gestoppt. Zur späteren Messung der Synthese von Thromboxan in Form des Hydrolyseproduktes Thromboxan B₂ (TXB₂) wurden die Aggregate bei 15000 U/min (5 min) abzentrifugiert, der Überstand in Eppendorfhütchen bei -20 °C gelagert und die Pellets verworfen. Zu Beginn und am Ende der Aggregationsmessungen wurde jeweils eine Kontrollaggregation ohne ASS durchgeführt.

2.4.3 Auswertung der Aggregationskurven

Die Aggregationskurven wurden mit einem am Aggregometer angeschlossenen Schreiber mit einem Papiervorschub von 3 cm/min aufgezeichnet (Abbildung 3). Die maximale Steigung der Kurve ist ein Maß für die Thrombozyten-Aggregation. Sie wurde anhand der durch diesen Punkt gelegten Tangente mittels eingezeichneten Steigungsdreiecks manuell ausgemessen und in cm/min angegeben.

Abbildung 3

Auswertung einer Aggregationskurve (Originalregistrierung) durch Ermittlung der Tangente durch den Punkt der maximalen Steigung. Das Steigungsdreieck wurde manuell eingezeichnet und die maximale Steigung in cm/min ermittelt. Als Stimulus der Thrombozyten-Aggregation wurde Arachidonsäure (ArA, Pfeil) verwendet.



2.5 Messung der Thromboxan-Synthese (Radioimmunoassay)

Aus den Überständen der Thrombozyten-Aggregationsversuche wurde zur Bestimmung der Thromboxan-Synthese das Hydrolyseprodukt TXB₂ gemessen, da TXA₂ selbst instabil ist und aufgrund einer hohen Ringspannung leicht hydrolysiert wird. Dabei entsteht das nicht mehr biologisch aktive TXB₂, das im Gegensatz zu TXA₂ stabil ist. Die Messungen der TXB₂-Synthese wurden mittels Radioimmunoassay (RIA) (Schrör & Seidel, 1988) im Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf durchgeführt. Eine Probe mit dem zu messenden Antigen (TXB₂) wurde zusammen mit einer bekannten Menge radioaktiv markiertem Antigen (Tracer [³H]TXB₂) sowie einer definierten Menge eines spezifischen Antikörpers gegen TXB₂ inkubiert. Beide Antigene konkurrieren um die Antikörperbindungsstellen. Entsprechend der Konzentrationsverhältnisse stellt sich ein Dissoziationsgleichgewicht zwischen Tracer und dem zu messenden Antigen ein. Nach einer Inkubationszeit von 16-20 h erfolgte die Entfernung des ungebundenen markierten Antigens von den

markierten Antigen-Antikörper-Komplexen mittels Kohlepräzipitation und anschließend die Messung der gebundenen Radioaktivität im Überstand. Über Eichkurven mit bekannten Standardkonzentrationen wurde anhand der gemessenen Radioaktivität die Konzentration des Antigens in der Probe ermittelt. Die Standardkurve basierte auf Messungen mit nicht markiertem TXB₂. Die Nachweisgrenze lag bei 0,04 ng/ml.

2.6 Material

2.6.1 COX-Inhibitoren

Acetylsalicylsäure	Bayer, Leverkusen (Lysinsalz)
Indometacin	Luitpold Pharma, München
Diclofenac	Sigma, Steinheim
(S)- Naproxen	[-]- Naproxen- Natrium, Sigma, Steinheim
[±]- Flurbiprofen	Sigma, Steinheim
Piroxicam	ct-Arzneimittel GmbH, Berlin
DFP	Merck Frosst Canada & Co., Kirkland, Quebec

2.6.2 Material für die Aggregationsversuche

Lösungsmittel und Puffersubstanzen

Tris-Puffer	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan, Fluka BioChemika, Neu-Ulm
NaCl	Merck, Darmstadt
NaHCO ₃	Merck, Darmstadt
KCl	Merck, Darmstadt
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	Merck, Darmstadt
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	Merck, Darmstadt
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazine-N'-(2-ethanesulfonic acid) Sigma, Deisenhofen
EDTA (Titriplex III®)	Merck, Darmstadt
NaOH (in Ethanol)	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
DMSO	(Dimethylsulfoxid), Merck, Darmstadt

Zusammensetzungen und Konzentrationen

Tris-Puffer	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan, 50 mM, pH 7,4
TM-Puffer	134 mM NaCl; 12 mM NaHCO ₃ ; 2,9 mM KCl; 0,36 mM NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O; 1 mM MgCl ₂ x 6 H ₂ O; 5 mM HEPES; pH 7,4
EDTA	77 mM
NaOH (in Ethanol)	100 mM

Stimulus zur Thrombozytenaktivierung

Arachidonsäure	Oxford Biomedical Research, Oxford/MI, USA
Arachidonsäure	Konzentration 1 mM

2.6.3 Material für die TXB₂-Messung (Radioimmunoassay)

NaCl	Merck, Darmstadt
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	Merck, Darmstadt
NaH ₂ PO ₄ x 2 H ₂ O	Merck, Darmstadt
RIA-Puffer	150 mM NaCl; 1,66 mM Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O; 8,1 mM NaH ₂ PO ₄ x 2 H ₂ O; pH 7,4
Antikörper	spezifischer TXB ₂ -Antikörper vom Kaninchen (γ-Globulin, polyklonal) hergestellt im Labor des Institutes für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie (Schrör & Seidel, 1988)
radioaktiver Tracer	
[³ H]TXB ₂	Amersham Biosciences, Freiburg (Lot # TRK 620).

2.7 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung wurde mit Hilfe von GraphPad Prism 3.0 und Microsoft Excel 2000 durchgeführt. IC₅₀-Werte (log [M]) wurden mit GraphPad Prism 3.0 errechnet. Die Messdaten wurden als Mittelwerte ± Standardfehler des Mittelwertes (SEM)

aus n unabhängigen Experimenten angegeben. Statistische Vergleiche zwischen zwei Versuchsgruppen wurden unter Verwendung des Student t-Testes durchgeführt. Für Vergleiche zwischen prä- und postoperativen Werten wurde der verbundene t-Test angewandt. Vergleiche von mehr als zwei Gruppen wurden mit der ANOVA durchgeführt. Anschließend Einzelgruppenvergleiche wurden mit dem Bonferroni-post-Test überprüft. Unterschiede zwischen Versuchsgruppen wurden bei $p < 0,05$ als statistisch signifikant angesehen und in Abbildungen mit „*“ oder „+“ markiert.

3 Ergebnisse

Die Thrombozytenstimulation sämtlicher PRP-Proben erfolgte mit Arachidonsäure. Gemessen wurden die Aggregation in Gegenwart von ASS (0, 30 und 100 μM) in vitro und anschließend die Thromboxan-Synthese jeweils vor und nach ACB-Operation bei allen verfügbaren Proben der insgesamt 66 Patienten. Zusätzlich zu den Untersuchungen mit ASS wurden prä- und postoperative Messungen mit der jeweiligen Testsubstanz (Indometacin, Diclofenac, Naproxen, Flurbiprofen, Piroxicam oder DFP) durchgeführt.

3.1 Thrombozytenfunktionshemmung durch ASS

Die Hemmung der Thrombozytenfunktion durch ASS in vitro konnte bei 59 der 66 Blutproben sowohl prä- als auch postoperativ gemessen werden.

3.1.1 Thrombozyten-Aggregation

In Tabelle 2 (im tabellarischen Anhang, S. 45) sind prä- und postoperative Aggregationswerte von 59 Patienten ohne und in Gegenwart von ASS in vitro gegenüber gestellt. In Abbildung 4 sind die Ergebnisse grafisch dargestellt.

Abbildung 4 a zeigt, dass durch die postoperativ erfolgte orale Therapie mit ASS (100 mg/d) die Arachidonsäure-stimulierte Aggregation nur marginal gehemmt wurde. Eine nur 20 %ige Hemmung der Thrombozyten-Aggregation ist nicht ausreichend. Bei Arachidonsäure als Stimulus wäre eine nahezu vollständige Hemmung zu erwarten, da

die Aktivierung weitestgehend Thromboxan-abhängig ist. Die postoperative orale ASS-Therapie beeinflusst die Aggregation im Mittel also nur minimal. Die Aggregation konnte auch durch in vitro Zugabe von ASS nicht vollständig gehemmt werden (→ postoperative ASS-Resistenz).

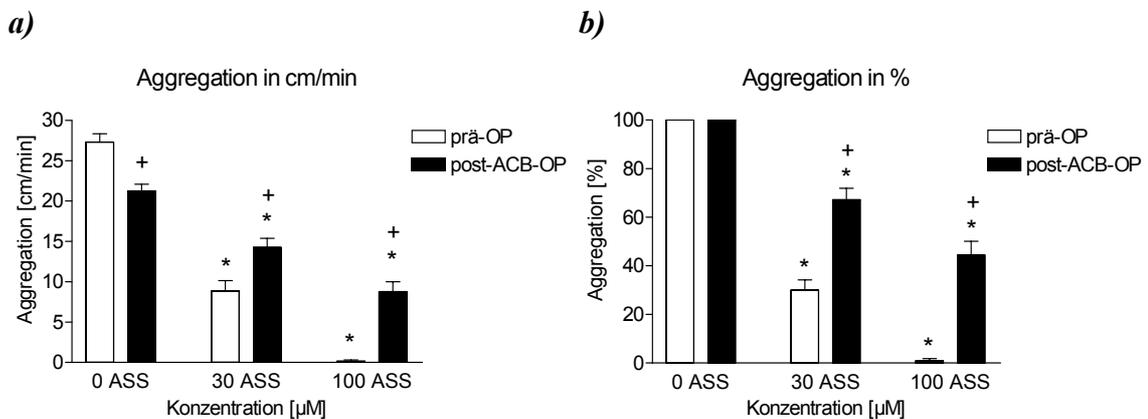
Abbildung 4

Arachidonsäure (1 mM)-stimulierte Thrombozyten-Aggregation in PRP vor und 5 Tage (± 1 Tag) nach ACB-Operation. Die Aggregation wurde jeweils ohne (0 μM ASS) und in Gegenwart von ASS (30 μM und 100 μM) in vitro durchgeführt.

a) Die Aggregation wurde aus der maximalen Steigung der Aggregationskurve manuell ermittelt und in cm/min angegeben.

b) Dargestellt sind die prozentualen Ergebnisse aus Abbildung a) bezogen auf die Steigung (cm/min) bei 0 μM ASS der jeweiligen Probe.

* $p < 0,05$ vs. ASS 0 μM ; + $p < 0,05$ vs. prä-OP Kontrolle; n= 59



Präoperativ konnte die Aggregation durch 30 μM ASS in vitro auf $30,1 \pm 4,1$ % bezogen auf den Kontrollwert (0 μM ASS) gehemmt werden (Abbildung 4 b). ASS in einer Konzentration von 100 μM in vitro führte präoperativ zu einer nahezu vollständigen Hemmung der Aggregation auf $0,9 \pm 0,85$ % des Kontrollwertes. Postoperativ dagegen wurde durch 30 μM ASS in vitro eine Hemmung der Aggregation auf nur $67,2 \pm 4,8$ % des Kontrollwertes erzielt, obwohl die Patienten zu diesem Zeitpunkt ASS zur postoperativen Thrombozyten-Aggregationshemmung einnahmen (100 mg/d p.o.). Auch bei ASS in höherer Konzentration (100 μM) in vitro konnte die Aggregation nur partiell auf $44,4 \pm 5,7$ % des Kontrollwertes gehemmt werden. Die Unterschiede zwischen den prä- und postoperativen Werten sind sowohl bei Zugabe von 30 μM ASS als auch bei 100 μM ASS statistisch signifikant.

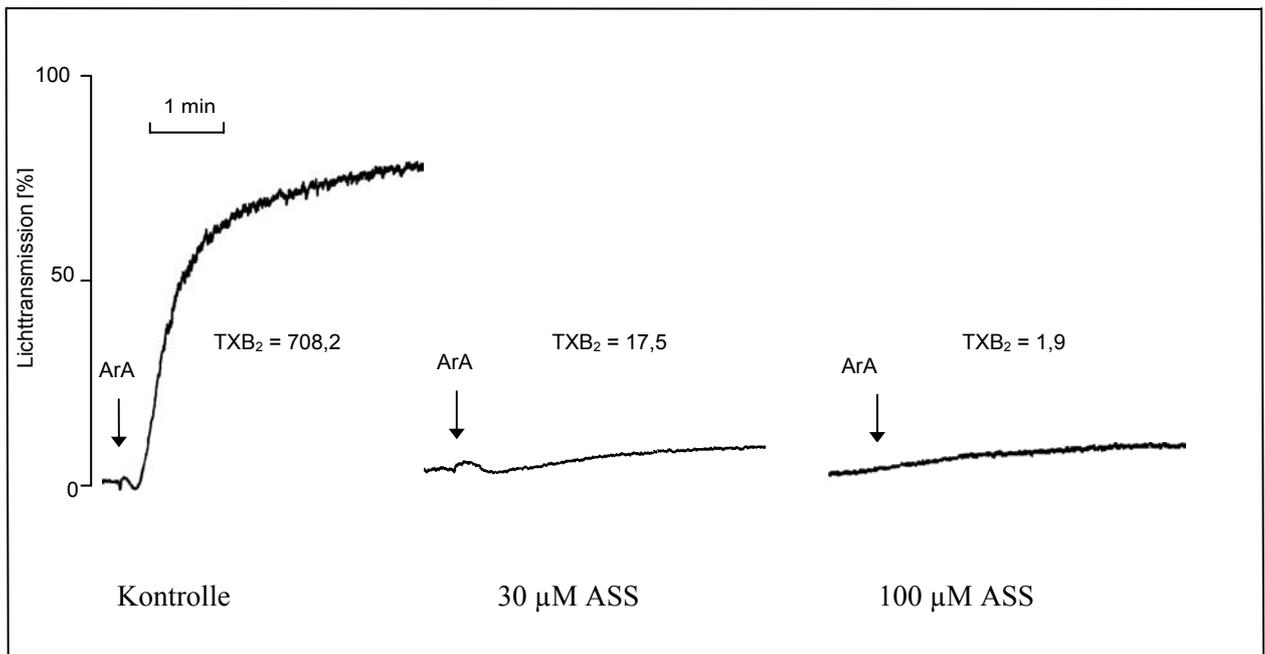
Abbildung 5 zeigt repräsentative Aggregationskurven eines Patienten, der postoperativ als ASS-Nonresponder eingestuft wurde. Präoperativ konnte die Thrombozyten-Aggregation durch Zugabe von 30 μM und 100 μM ASS gehemmt werden. Fünf Tage nach

ACB-OP dagegen konnte die Thrombozyten-Aggregation durch ASS in vitro (30 μ M und 100 μ M) nicht vollständig gehemmt werden, obwohl bereits seit fünf Tagen eine postoperative ASS-Therapie mit 100 mg/d p.o. erfolgt war.

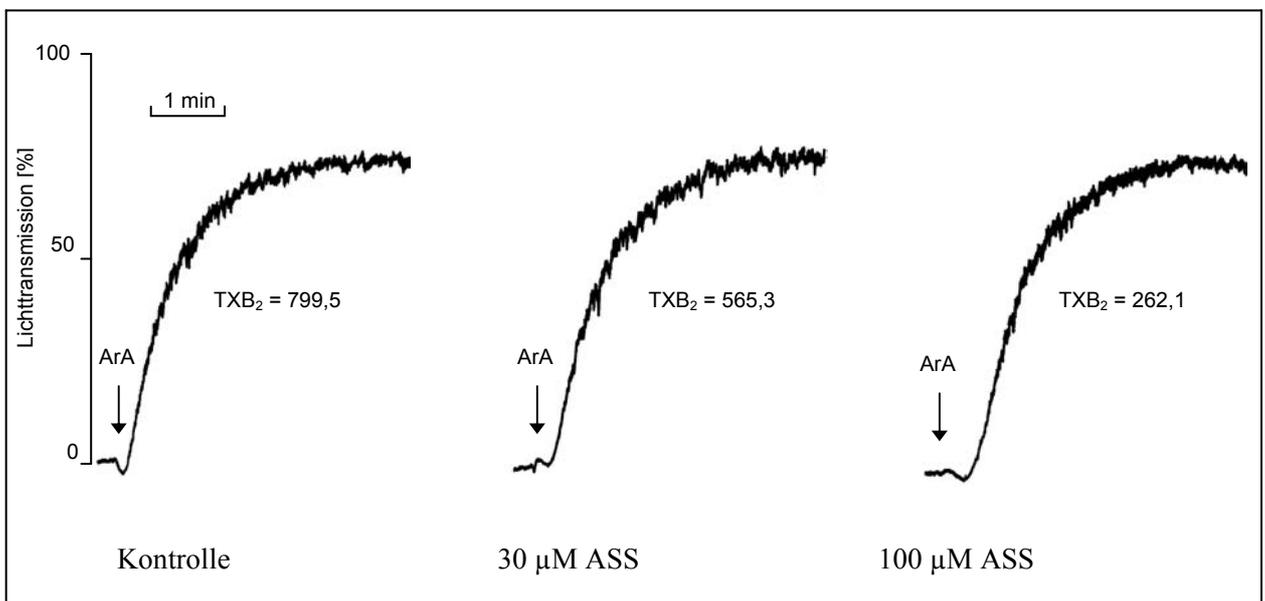
Abbildung 5

Repräsentative Aggregationskurven eines Patienten, der postoperativ eine ASS-Resistenz entwickelte. Als Aggregationsstimulus wurde 1 mM Arachidonsäure (ArA, Pfeil) verwendet. Die Thrombozyten-Aggregation wurde ohne (Kontrolle) und in Gegenwart von ASS (30 μ M und 100 μ M) in vitro durchgeführt. Die jeweils zugehörigen TXB₂-Werte sind in ng/ml angegeben.

a) Thrombozyten-Aggregation in PRP **vor** ACB-OP.



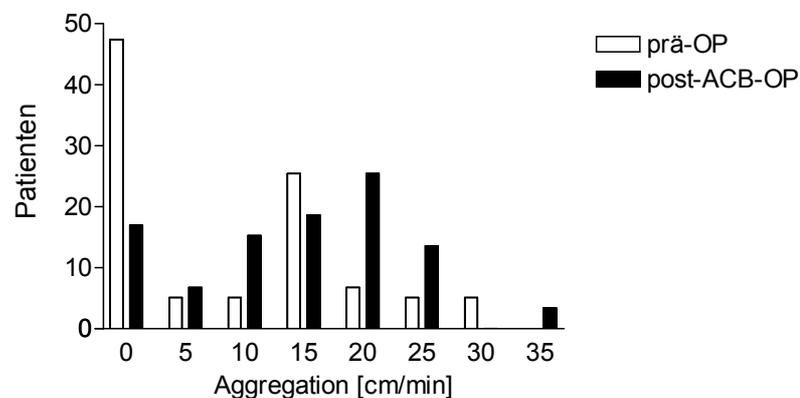
b) Thrombozyten-Aggregation desselben Patienten an Tag 5 **nach** ACB-Operation (nach postoperativer ASS-Therapie mit 100 mg/d per os)



In Abbildung 6 ist die Thrombozyten-Aggregation in Gegenwart von 30 μM ASS als Histogramm dargestellt. Insgesamt ist die Wirksamkeit von 30 μM ASS in vitro zur Aggregationshemmung prä- und postoperativ heterogen. Man erkennt, dass präoperativ in etwa 50 % der untersuchten PRP-Proben eine Aggregationshemmung auf unter 10 cm/min erzielt wurde. Postoperativ zeigten etwa die Hälfte der Proben eine Aggregation zwischen 20 und 30 cm/min. Bei Hemmung der Aggregation mit 30 μM ASS in vitro zeigt sich eine ausgeprägte interindividuelle Variabilität, da bei den Messungen in Gegenwart von 30 μM ASS sehr unterschiedliche Aggregationswerte zwischen 0 und 40 cm/min vorkamen. Andererseits bestand außerdem eine intraindividuelle Variabilität, da sich die Häufigkeitsverteilung innerhalb derselben Patienten an verschiedenen Untersuchungstagen (prä- und postoperativ) unterschied. Offenbar variiert die Thrombozyten-Aggregation innerhalb eines Individuums bei Messungen zu unterschiedlichen Zeitpunkten, nämlich vor allem bei den Patienten, die eine ASS-Resistenz entwickeln. Daher ergab sich postoperativ eine „nach rechts verschobene“ Häufigkeitsverteilung.

Abbildung 6

Darstellung der Arachidonsäure (1 mM)-stimulierten Thrombozyten-Aggregation (cm/min) in PRP vor und 5 Tage (± 1 Tag) nach ACB-Operation in Gegenwart von 30 μM ASS in vitro (n=59) als Histogramm.



3.1.2 Thromboxan-Synthese

Die Thromboxan-Synthese wurde anhand des bei der Aggregationsmessung erhaltenen Überstands (PAP) durch Radioimmunoassay ermittelt. Die Thromboxan-Konzentration (Tabelle 3 im Anhang, Abbildung 7) verhielt sich erwartungsgemäß analog den Ergebnissen aus der Auswertung der Aggregationskurven (Tabelle 2 im Anhang und

Abbildung 4), da bei Hemmung der Arachidonsäure-induzierten Aggregation entsprechend eine Hemmung der Thromboxan-Synthese erfolgt sein muss.

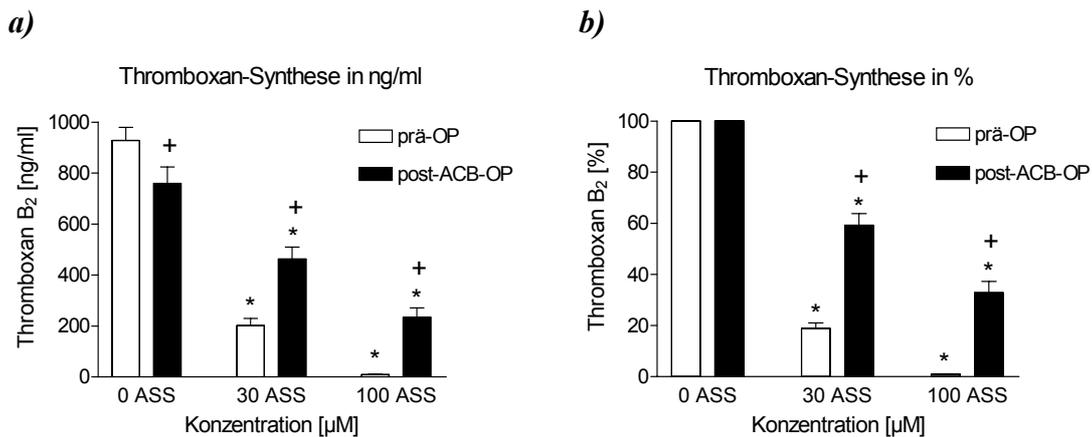
Abbildung 7

Arachidonsäure (1 mM)-stimulierte Thromboxan-Synthese in PRP ohne (0 μ M ASS) und mit ASS (30 μ M und 100 μ M) in vitro vor und 5 Tage (\pm 1 Tag) nach ACB-Operation.

a) Die Thromboxan-Synthese wurde aus den Überständen der Thrombozyten-Aggregationsversuche mittels Radioimmunoassay ermittelt und ist als Konzentration (ng/ml) angegeben.

b) Dargestellt sind die prozentualen Ergebnisse aus Abbildung a) bezogen auf die Thromboxan-Synthese (ng/ml) bei 0 μ M ASS der jeweiligen Probe.

* $p < 0,05$ vs. ASS 0 μ M; + $p < 0,05$ vs. prä-OP Kontrolle; n= 59



Die Thromboxan-Synthese wurde präoperativ durch 30 μ M ASS in vitro auf $18,9 \pm 2,1$ % und durch ASS in einer Konzentration von 100 μ M in vitro nahezu vollständig auf $0,9 \pm 0,2$ % des Kontrollwertes (bei 0 μ M ASS) gehemmt (Abbildung 7). Dagegen wurde postoperativ trotz ASS-Therapie (100 mg/d p.o.) die Thromboxan-Synthese nur minimal gehemmt und konnte auch durch Zugabe von 30 μ M oder 100 μ M ASS in vitro nur auf $59,2 \pm 4,6$ % bzw. auf $32,8 \pm 4,4$ % des Kontrollwertes gehemmt werden.

Die Thromboxan-Bestimmungen zeigen also, dass (trotz Einnahme von ASS) die Wirksamkeit von ASS in vitro zur Hemmung der Thromboxan-Synthese postoperativ gegenüber den präoperativen Werten signifikant abnimmt und somit auch die Aggregation postoperativ nicht vollständig gehemmt werden kann.

3.1.3 Einteilung in ASS-Responder und ASS-Nonresponder

Die Thromboxan-Synthese ohne ASS in vitro wurde als Kontrollwert des jeweiligen Patienten und Untersuchungstages auf 100 % gesetzt und anschließend die prozentuale

Hemmung der Thromboxan-Synthese in Gegenwart von 30 oder 100 μM ASS ermittelt. Anhand der Thromboxan-Synthese in Gegenwart von 100 μM ASS wurden die Patienten in ASS-Responder (Thromboxan-Synthese $<10\%$) und ASS-Nonresponder (Thromboxan-Synthese $>10\%$) eingeteilt. Diese Vorgehensweise beruht auf der Annahme, dass oberhalb einer Thromboxan-Synthese von 10% eine Thromboxan-vermittelte Aggregation induziert werden kann (Reilly & FitzGerald, 1987; Di Minno et al., 1983). Mit dieser Einteilung kamen unter den 59 Patienten präoperativ keine ASS-Nonresponder vor. Postoperativ dagegen waren 31 der 59 Patienten ASS-Nonresponder (53 %) und nur 28 der 59 Patienten blieben weiterhin ASS-Responder (47 %).

Abbildung 8

Vergleich von ASS-Respondern ($n=28$) gegenüber ASS-Nonrespondern ($n=31$). Arachidonsäure (1 mM)-stimulierte Thromboxan-Synthese vor und 5 Tage (± 1 Tag) nach ACB-Operation in Gegenwart von ASS (0, 30, 100 μM) in vitro. Vergleich der postoperativen Thromboxan-Konzentration mit der präoperativen (% Kontrolle bei 0 μM ASS). Die 100 % entsprechenden Absolutwerte bei 0 μM ASS unterscheiden sich an dem jeweiligen Untersuchungstag nicht signifikant zwischen ASS-Respondern und ASS-Nonrespondern und sind über den Säulen in ng/ml angegeben (Mittelwert \pm SEM).

a) Postoperative Thromboxan-Synthese (%) bei ASS-Respondern und ASS-Nonrespondern

b) Präoperative Thromboxan-Synthese (%). Gleiche Patienten wie in a)

+ $p < 0,05$ vs. ASS-Responder

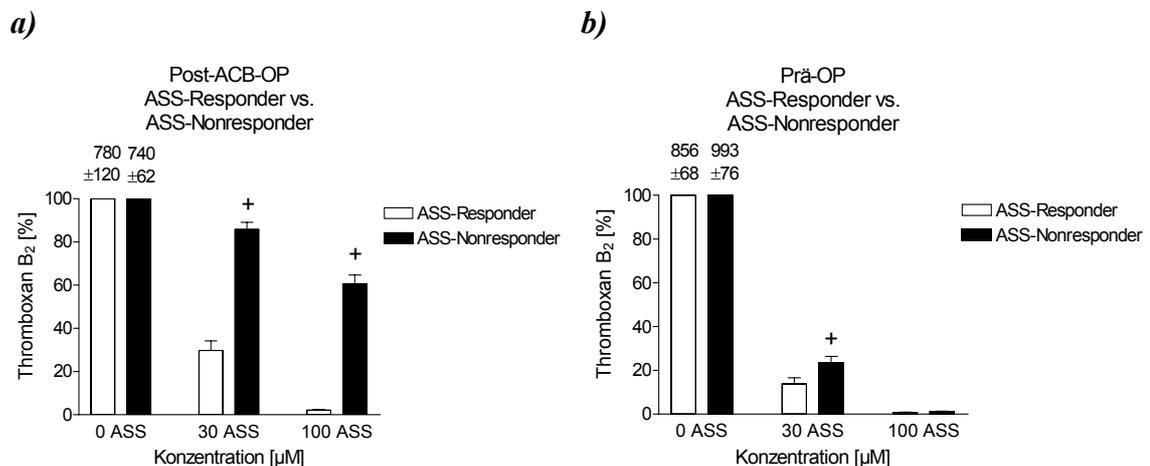


Abbildung 8 zeigt die aufgrund der vorgenommenen Einteilung zu erwartenden postoperativen Unterschiede zwischen ASS-Respondern und ASS-Nonrespondern bezüglich der Hemmung der Thromboxan-Synthese in Gegenwart von 30 und 100 μM ASS (Abbildung 8 a). Die entsprechende präoperative Hemmung der Thromboxan-Synthese bei denjenigen Patienten, die postoperativ als ASS-Responder und ASS-Nonresponder eingestuft wurden, ist zum Vergleich in Abbildung 8 b dargestellt. Die postoperative Hemmung der Thromboxan-Synthese durch 30 μM oder 100 μM ASS in vitro

unterscheidet sich erwartungsgemäß deutlich (um den Faktor 2,9 bzw. Faktor 28) zwischen ASS-Respondern (n= 28) und ASS-Nonrespondern (n= 31). Bei Betrachtung der präoperativen Thromboxan-Synthese ist ebenfalls ein Unterschied zwischen den beiden Gruppen erkennbar (Tabelle 4 im Anhang, Abbildung 8 b): Die Hemmung der Thromboxan-Synthese durch 30 μM ASS unterscheidet sich schon präoperativ statistisch signifikant für ASS-Responder und ASS-Nonresponder. Bei den postoperativ als ASS-Responder eingestuften Patienten war bei 30 μM ASS ein Trend für ein postoperativ vermindert wirksames ASS erkennbar. Dieser Unterschied war nur bei den prozentualen Werten statistisch signifikant. Bei 100 μM ASS bestand kein signifikanter Unterschied der präoperativen TXB_2 -Werte zwischen ASS-Respondern und ASS-Nonrespondern. Analoge Ergebnisse fanden sich auch bei den Aggregationsmessungen (Tabelle 5 im Anhang, Abbildung 9).

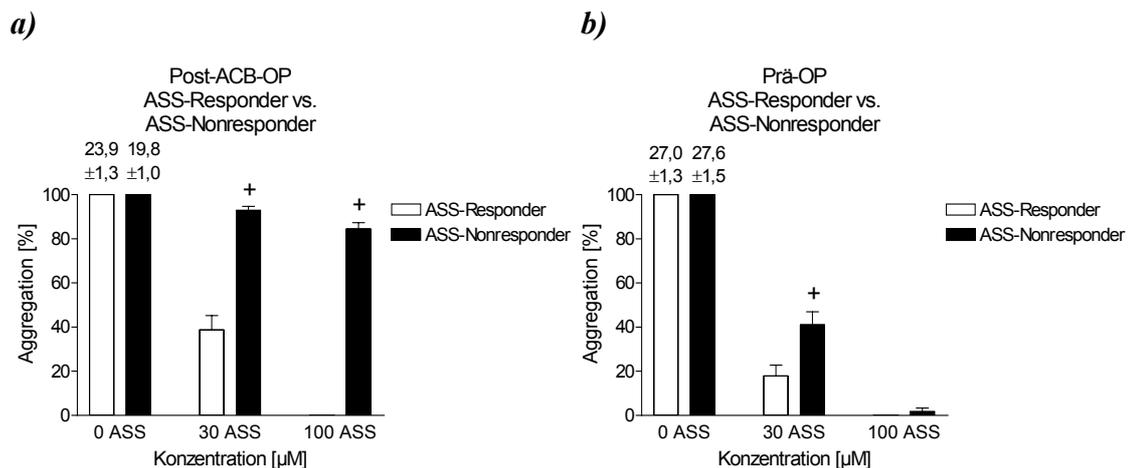
Abbildung 9

Vergleich von ASS-Respondern (n= 28) gegenüber ASS-Nonrespondern (n= 31). Arachidonsäure (1 mM)-stimulierte Thrombozyten-Aggregation in PRP von Patienten vor und 5 Tage (± 1 Tag) nach ACB-Operation in Gegenwart von ASS (0, 30, 100 μM) in vitro. Vergleich der postoperativen Aggregation mit der präoperativen (% Kontrolle bei 0 μM ASS). Die 100 % entsprechenden Absolutwerte bei 0 μM ASS unterscheiden sich an dem jeweiligen Untersuchungstag nicht signifikant zwischen ASS-Respondern und ASS-Nonrespondern und sind über den Säulen in cm/min angegeben (Mittelwert \pm SEM).

a) Postoperative Aggregation (%) bei ASS-Respondern und ASS-Nonrespondern

b) Präoperative Aggregation (%). Gleiche Patienten wie in a)

+ $p < 0,05$ vs. ASS-Responder



Bei den postoperativ als ASS-Nonresponder eingestuften Patienten ist nur präoperativ eine nahezu vollständige Hemmung der Aggregation durch 100 μM ASS möglich, postoperativ kam es jedoch, wie aufgrund der vorgenommenen Einteilung zu erwarten ist, zu einer signifikant geringeren Hemmung der Thrombozyten-Aggregation, da oberhalb einer Thromboxan-Synthese von 10 % eine Thromboxan-vermittelte Aggregation indu-

ziert werden kann (Reilly & FitzGerald, 1987; DiMinno et al., 1983). Dagegen ist bei den ASS-Respondern, die in Gegenwart von 100 μM ASS nach der vorgenommenen Einteilung eine Thromboxan-Synthese von weniger als 10 % hatten, auch die Aggregation prä- und postoperativ erwartungsgemäß vollständig gehemmt. Die Ergebnisse unterstützen also die Annahme, dass oberhalb einer Thromboxan-Synthese von 10 % eine Thromboxan-vermittelte Aggregation induziert werden kann.

Postoperativ ist der Unterschied zwischen ASS-Respondern (n= 28) und ASS-Nonrespondern (n= 31) bezüglich der Hemmung der Thrombozyten-Aggregation durch 30 und 100 μM ASS in vitro statistisch signifikant. Bei einer Konzentration von 30 μM ASS ist jedoch präoperativ ebenfalls ein Unterschied zwischen ASS-Respondern und ASS-Nonrespondern erkennbar (Abbildung 9): Die Hemmung der Thrombozyten-Aggregation durch 30 μM ASS unterscheidet sich schon präoperativ statistisch signifikant zwischen den beiden Gruppen. In Gegenwart von 100 μM ASS in vitro besteht präoperativ kein signifikanter Unterschied zwischen ASS-Respondern und ASS-Nonrespondern.

3.2 Thrombozytenfunktionshemmung durch reversible COX-Inhibitoren

Bisher wurde dargestellt, dass nach ACB-Operation die Sensitivität der Thrombozyten gegenüber ASS bezüglich der Thrombozyten-Aggregation und der Thromboxan-Synthese abnimmt. Im Folgenden wird nun gezeigt, wie sich die Sensitivität der Thrombozyten gegenüber anderen COX-Inhibitoren nach ACB-Operation ändert. Aus den Aggregationsmessungen und der Thromboxan-Bestimmung wurden Konzentrations-Wirkungskurven erstellt und die IC_{50} -Werte ermittelt. Hierbei wurden jeweils zunächst die prä- und postoperativen IC_{50} -Werte aller Patienten gegenübergestellt, die mit der jeweiligen Substanz untersucht wurden. Besonderes Augenmerk wurde jedoch auf die postoperativen Unterschiede zwischen ASS-Responder und ASS-Nonresponder gelegt. Postoperativ erfolgte daher, wie unter Abschnitt 3.1.3 beschrieben, eine Einteilung in ASS-Responder und ASS-Nonresponder. Die Unterschiede zwischen ASS-Respondern und ASS-Nonrespondern an Tag 5 (± 1 Tag) nach ACB-OP bezüglich der Hemmung der Thromboxan-Synthese und der Thrombozyten-Aggregation durch den jeweiligen COX-Inhibitor in vitro sind jeweils anhand der IC_{50} -Werte als Säulendiagramme verdeutlicht.

Für die Hemmung der Thromboxan-Synthese sind jeweils zusätzlich die Konzentrations-Wirkungskurven dargestellt.

3.2.1 Essigsäure-Derivate: Indometacin und Diclofenac

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Untersuchungen mit den Essigsäure-Derivaten Indometacin und Diclofenac dargestellt.

Indometacin

Indometacin wurde in den Konzentrationen 0,3 μM bis 30 μM eingesetzt (Vorversuche). In Abbildung 10 wird deutlich, dass die IC_{50} -Werte sowohl für die Hemmung der Aggregation als auch für die Hemmung der Thromboxan-Synthese durch Indometacin postoperativ etwa um das 4-fache des präoperativen Kontrollwertes ansteigen.

Abbildung 10

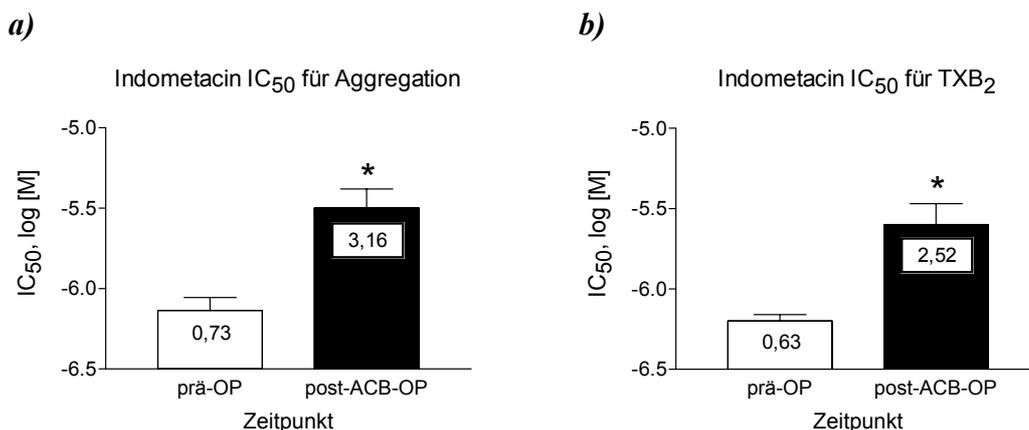
IC_{50} -Werte von Indometacin vor und 5 Tage (± 1 Tag) nach ACB-Operation ($n=18$).

a) IC_{50} -Werte für die Hemmung der Aggregation durch Indometacin.

b) IC_{50} -Werte für die Hemmung der Thromboxan-Synthese durch Indometacin.

Der jeweilige entlogarithmierte Mittelwert ist als Zahlenwert (μM) in der Säule angegeben.

* $p < 0,05$ vs. prä-OP Kontrolle



Unterteilt man die postoperativen IC_{50} -Werte für die Thromboxan-Synthesehemmung durch Indometacin in IC_{50} -Werte von ASS-Respondern und ASS-Nonrespondern, dann erkennt man, dass bei ASS-Nonrespondern eine etwa 9-fach höhere Indometacin-Konzentration notwendig ist, um eine halbmaximale Hemmung der Thromboxan-Synthese zu erreichen (Abbildung 11). Für eine halbmaximale Hemmung der Aggregation war bei ASS-Nonrespondern eine fast 7-fach höhere Konzentration nötig

($p < 0,05$). Die IC_{50} -Werte für die Hemmung der Thromboxan-Synthese sind jeweils etwas niedriger als für die Hemmung der Aggregation, denn um eine Hemmung der Aggregation zu erreichen, ist eine halbmaximale Hemmung der Thromboxan-Synthese nicht ausreichend. Vermutlich ist eine Hemmung der Thromboxan-Synthese unter 10 % erforderlich.

Abbildung 11

IC_{50} -Werte von Indometacin bei ASS-Respondern ($n = 7$) versus ASS-Nonrespondern ($n = 11$) an Tag 5 (± 1 Tag) nach ACB-Operation.

a) IC_{50} -Werte für die Hemmung der Aggregation.

b) IC_{50} -Werte für die Hemmung der Thromboxan-Synthese.

Der jeweilige entlogarithmierte Mittelwert ist als Zahlenwert (μM) in der Säule angegeben.

* $p < 0,05$ vs. ASS-Responder

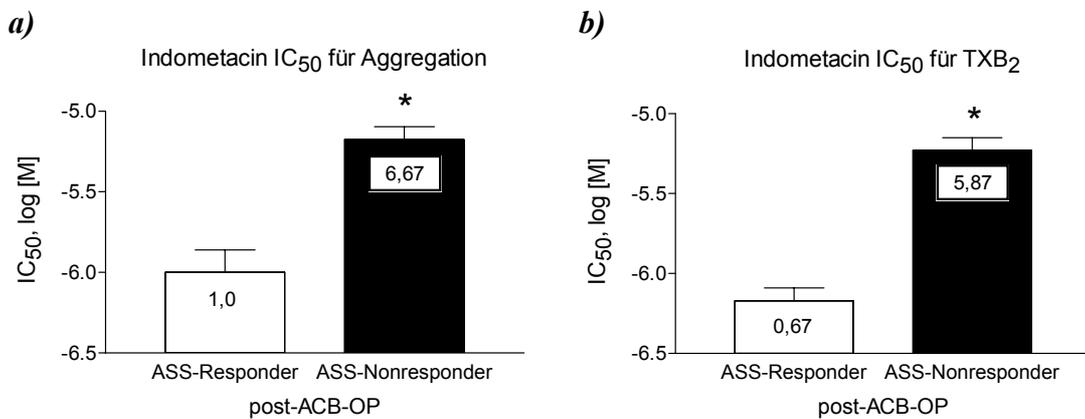


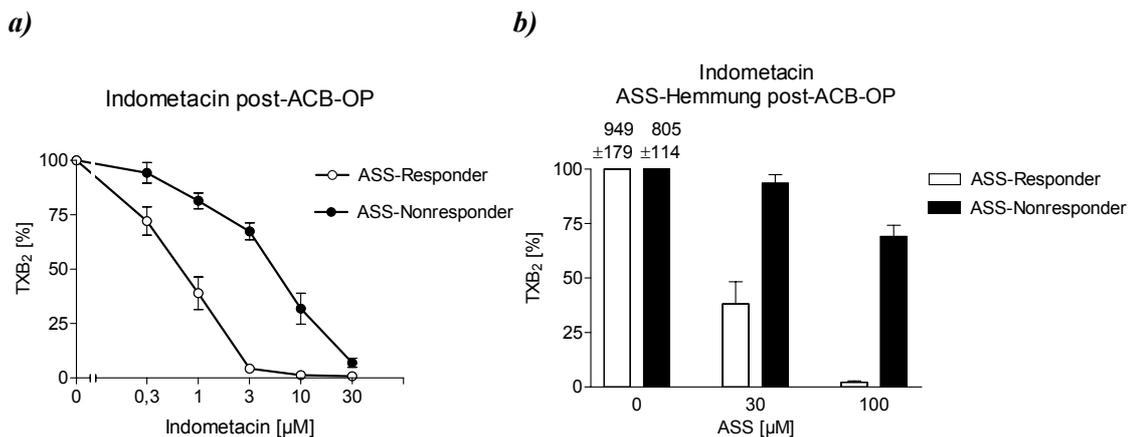
Abbildung 12

Thromboxan-Synthese (in % bezogen auf den Kontrollwert bei 0 μM) an Tag 5 (± 1 Tag) nach ACB-Operation.

a) Hemmung der Thromboxan-Synthese durch Indometacin (Konzentrationen 0,3 bis 30 μM) bei ASS-Respondern ($n = 7$) versus ASS-Nonrespondern ($n = 11$).

b) Hemmung der Thromboxan-Synthese durch ASS (Konzentrationen 0, 30, 100 μM). Gleiche Patienten wie in a).

Die 100 % entsprechenden Absolutwerte bei 0 μM ASS sind über den Säulen in ng/ml angegeben (Mittelwert \pm SEM).



Die relative postoperative Hemmung der Thromboxan-Synthese durch Indometacin bei ASS-Respondern und ASS-Nonrespondern (dargestellt als Konzentrations-Wirkungskurven) zeigt, dass die Kurve der ASS-Nonresponder deutlich (ca. eine 10er-Potenz) nach rechts verschoben ist (Abbildung 12 a). Daneben sind die dazugehörigen Thromboxan-Werte dieser Patientengruppe bei Hemmung durch ASS dargestellt. Es wird deutlich, dass ASS-Nonresponder nicht nur gegenüber ASS, sondern auch gegenüber Indometacin postoperativ eine verminderte Sensitivität aufweisen.

Diclofenac

Diclofenac wurde in den Konzentrationen 0,3 μM bis 30 μM eingesetzt. In Abbildung 13 erkennt man, dass für Diclofenac die IC_{50} -Werte für die Hemmung der Thromboxan-Synthese und der Aggregation postoperativ 2,2- bis 2,6-fach höher sind als der jeweilige präoperative Kontrollwert. Dieser Unterschied erreichte aufgrund der postoperativ relativ geringen Anzahl an ASS-Nonrespondern keine statistische Signifikanz.

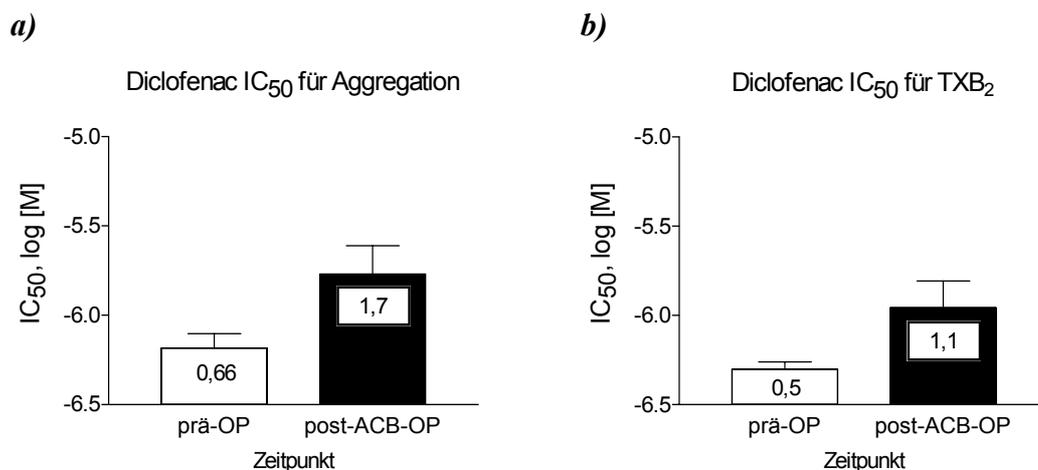
Abbildung 13

IC_{50} -Werte von Diclofenac vor und 5 Tage (± 1 Tag) nach ACB-Operation (n= 12-14).

a) IC_{50} -Werte für die Hemmung der Aggregation durch Diclofenac.

b) IC_{50} -Werte für die Hemmung der Thromboxan-Synthese durch Diclofenac.

Der jeweilige entlogarithmierte Mittelwert ist als Zahlenwert (μM) in der Säule angegeben.



Die postoperativen IC_{50} -Werte von ASS-Respondern und ASS-Nonrespondern in Abbildung 14 zeigen jedoch, dass die Sensitivität der Thrombozyten in PRP von ASS-Nonrespondern gegenüber Diclofenac deutlich vermindert ist, so dass hier eine etwa

8,5- bis 11-fach höhere Diclofenac-Konzentration als bei den ASS-Respondern notwendig ist, um eine halbmaximale Hemmung der Thromboxan-Synthese und der Aggregation zu erreichen ($p < 0,05$). Wie bei den Untersuchungen mit Indometacin ist die Konzentrations-Wirkungskurve der ASS-Nonresponder bei Hemmung der Thromboxan-Synthese mit Diclofenac deutlich nach rechts verschoben (Abbildung 15). Vergleichbare Ergebnisse fanden sich bei den Aggregationsmessungen.

ASS-Responder und ASS-Nonresponder unterschieden sich auch schon präoperativ bei Hemmung durch Indometacin und Diclofenac (nicht signifikant). Es ergibt sich nur ein Trend, dass ASS-Nonresponder schon präoperativ geringer durch Indometacin oder Diclofenac hemmbar sind (nicht gezeigt).

Abbildung 14

IC₅₀-Werte von Diclofenac bei ASS-Respondern (n= 8) versus ASS-Nonrespondern (n= 6) an Tag 5 (± 1 Tag) nach ACB-Operation.

a) IC₅₀-Werte für die Hemmung der Aggregation.

b) IC₅₀-Werte für die Hemmung der Thromboxan-Synthese.

Der jeweilige entlogarithmierte Mittelwert ist als Zahlenwert (μM) in der Säule angegeben.

* $p < 0,05$ vs. ASS-Responder

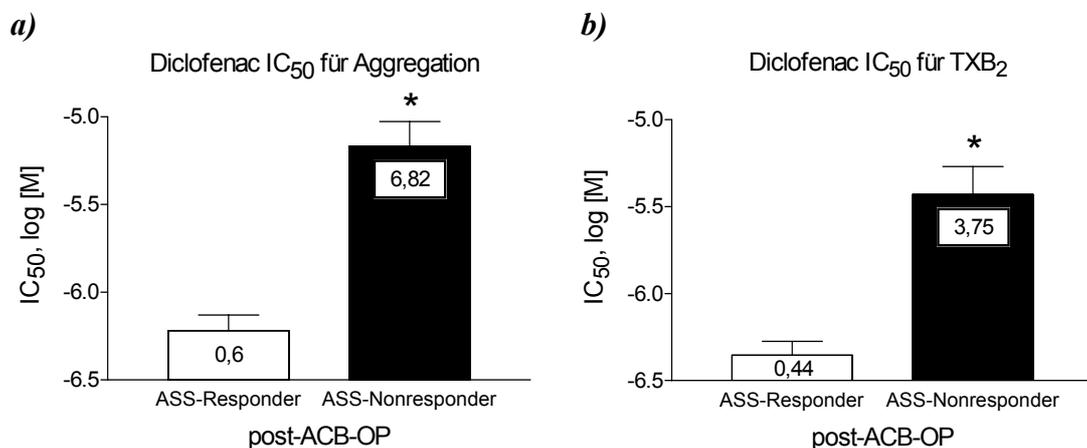


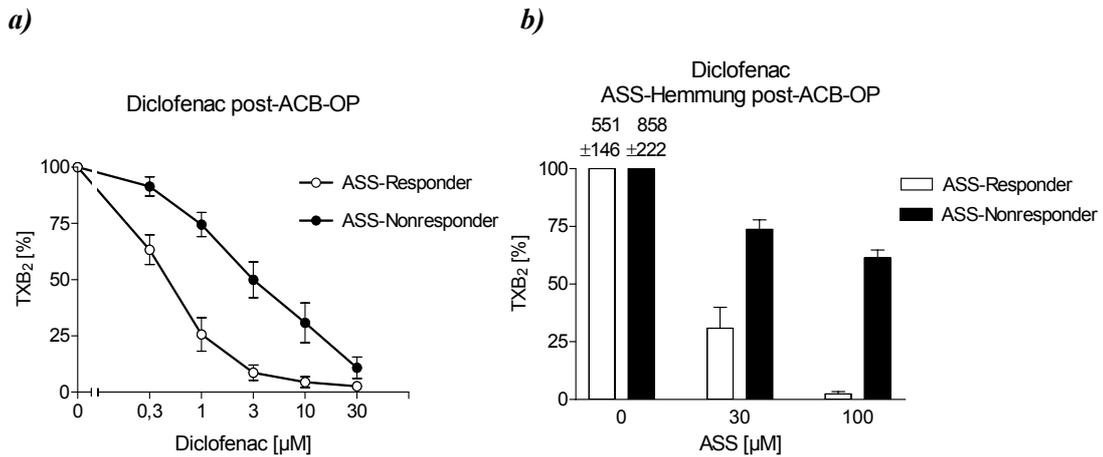
Abbildung 15

Thromboxan-Synthese (in % bezogen auf den Kontrollwert bei 0 μM) an Tag 5 (± 1 Tag) nach ACB-Operation.

a) Hemmung der Thromboxan-Synthese durch Diclofenac (Konzentrationen 0,3 bis 30 μM) bei ASS-Respondern ($n=8$) versus ASS-Nonrespondern ($n=6$).

b) Hemmung der Thromboxan-Synthese durch ASS (Konzentrationen 0, 30, 100 μM). Gleiche Patienten wie in a).

Die 100 % entsprechenden Absolutwerte bei 0 μM ASS sind über den Säulen in ng/ml angegeben (Mittelwert \pm SEM).



3.2.2 Propionsäure-Derivate: Naproxen und Flurbiprofen

Von den Propionsäure-Derivaten wurden Naproxen und Flurbiprofen zur Untersuchung der Thrombozytenfunktionshemmung in vitro verwendet.

Naproxen

Naproxen wurde in Konzentrationen von 1 μM bis 300 μM eingesetzt. Die IC_{50} -Werte für die Hemmung der Aggregation und der Thromboxan-Synthese durch Naproxen sind prä- und postoperativ annähernd gleich (Abbildung 16). Die postoperativen IC_{50} -Werte von ASS-Nonrespondern sind gegenüber den ASS-Respondern in den vorliegenden Untersuchungen etwa 2-fach erhöht (nicht signifikant; Abbildung 17). Entsprechend ist die Konzentrations-Wirkungskurve für die postoperative Hemmung der Thromboxan-Synthese durch Naproxen bei ASS-Nonrespondern gegenüber der Kurve der ASS-Responder nur geringfügig nach rechts verschoben (Abbildung 18 a), obwohl nachweislich bei diesen Patienten die Hemmung durch ASS erheblich vermindert war (Abbildung 18 b). Vergleichbare Ergebnisse fanden sich bei den Aggregationsmessungen. ASS-Responder und ASS-Nonresponder unterschieden sich präoperativ ebenfalls nicht signifikant (nicht gezeigt).

Abbildung 16

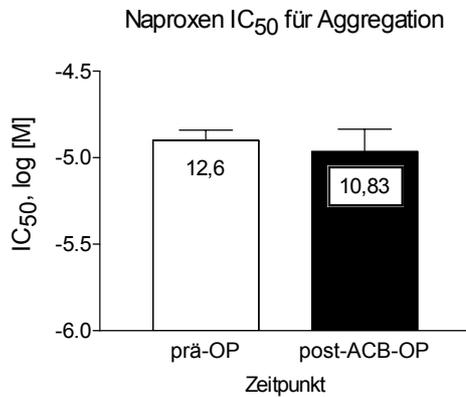
IC₅₀-Werte von Naproxen vor und 5 Tage (±1 Tag) nach ACB-Operation (n= 10-12).

a) IC₅₀-Werte für die Hemmung der Aggregation durch Naproxen.

b) IC₅₀-Werte für die Hemmung der Thromboxan-Synthese durch Naproxen.

Der jeweilige entlogarithmierte Mittelwert ist als Zahlenwert (µM) in der Säule angegeben.

a)



b)

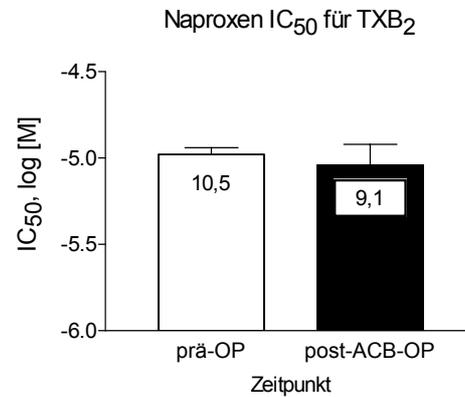


Abbildung 17

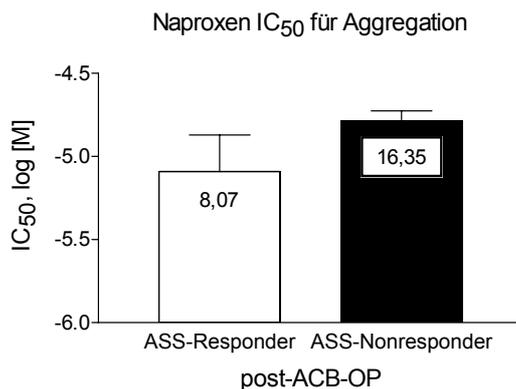
IC₅₀-Werte von Naproxen bei ASS-Respondern (n= 7) versus ASS-Nonrespondern (n= 5) an Tag 5 (±1 Tag) nach ACB-Operation.

a) IC₅₀-Werte für die Hemmung der Aggregation.

b) IC₅₀-Werte für die Hemmung der Thromboxan-Synthese.

Der jeweilige entlogarithmierte Mittelwert ist als Zahlenwert (µM) in der Säule angegeben.

a)



b)

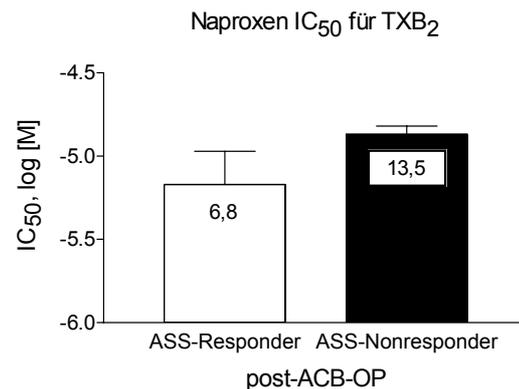


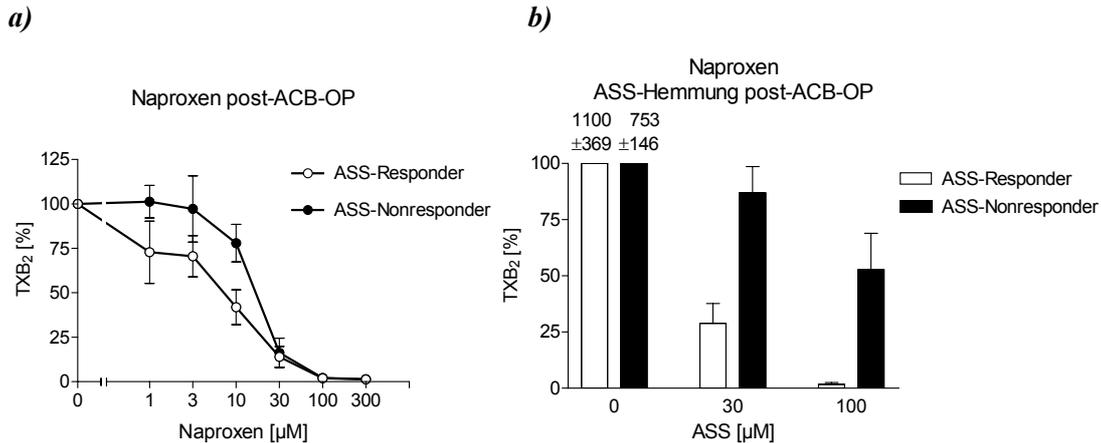
Abbildung 18

Thromboxan-Synthese (in % bezogen auf den Kontrollwert bei 0 μM) an Tag 5 (± 1 Tag) nach ACB-Operation.

a) Hemmung der Thromboxan-Synthese durch Naproxen (Konzentrationen 1 bis 300 μM) bei ASS-Respondern ($n=7$) versus ASS-Nonrespondern ($n=5$) (bei 1 μM $n=3-4$).

b) Hemmung der Thromboxan-Synthese durch ASS (Konzentrationen 0, 30, 100 μM). Gleiche Patienten wie in a).

Die 100 % entsprechenden Absolutwerte bei 0 μM ASS sind über den Säulen in ng/ml angegeben (Mittelwert \pm SEM).



Flurbiprofen

Flurbiprofen wurde in Konzentrationen von 0,1 μM bis 30 μM eingesetzt. Die postoperativen IC_{50} -Werte für die Hemmung der Aggregation und der Thromboxan-Synthese unterscheiden sich nicht signifikant von den präoperativen IC_{50} -Werten (Abbildung 19). Die Unterschiede der postoperativen IC_{50} -Werte von ASS-Nonrespondern und ASS-Respondern sind jedoch statistisch signifikant (Abbildung 20). Für eine halbmaximale Hemmung der Thromboxan-Synthese und der Aggregation wird bei ASS-Nonrespondern eine etwa 3,5- bis 4,5-fach höhere Flurbiprofen-Konzentration benötigt als bei ASS-Respondern.

Ähnlich wie Indometacin und Diclofenac ist die Konzentrations-Wirkungskurve für die Hemmung der Thromboxan-Synthese durch Flurbiprofen bei ASS-Nonrespondern nach rechts verschoben (Abbildung 21 a), jedoch in etwas geringerem Maße, wie auch schon bei Vergleich der IC_{50} -Werte deutlich wurde. ASS-Nonresponder zeigen folglich auch gegenüber Flurbiprofen eine verminderte Sensitivität. ASS-Responder und ASS-Nonresponder unterschieden sich präoperativ nicht signifikant (nicht gezeigt).

Abbildung 19

IC₅₀-Werte von Flurbiprofen vor und 5 Tage (±1 Tag) nach ACB-Operation (n= 12).

a) IC₅₀-Werte für die Hemmung der Aggregation durch Flurbiprofen.

b) IC₅₀-Werte für die Hemmung der Thromboxan-Synthese durch Flurbiprofen.

Der jeweilige entlogarithmierte Mittelwert ist als Zahlenwert (µM) in der Säule angegeben.

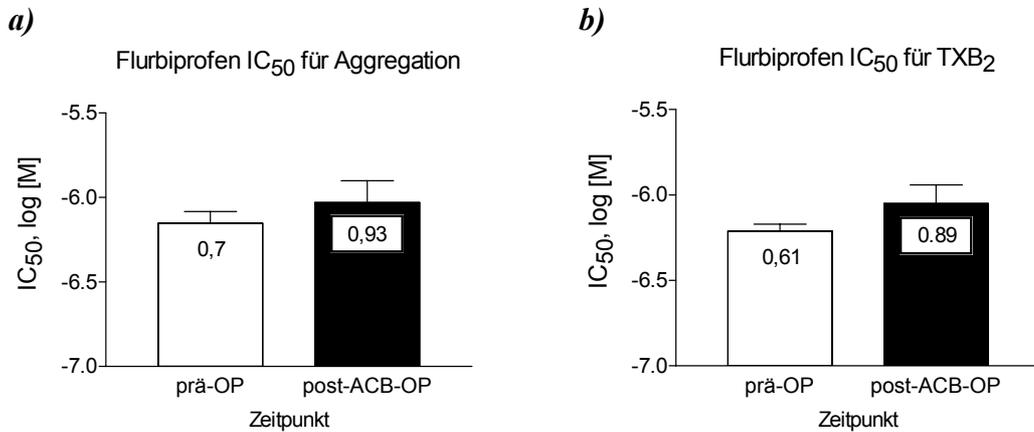


Abbildung 20

IC₅₀-Werte von Flurbiprofen bei ASS-Respondern (n= 6) versus ASS-Nonrespondern (n= 6) an Tag 5 (±1 Tag) nach ACB-Operation.

a) IC₅₀-Werte für die Hemmung der Aggregation.

b) IC₅₀-Werte für die Hemmung der Thromboxan-Synthese.

Der jeweilige entlogarithmierte Mittelwert ist als Zahlenwert (µM) in der Säule angegeben.

* p<0,05 vs. ASS-Responder

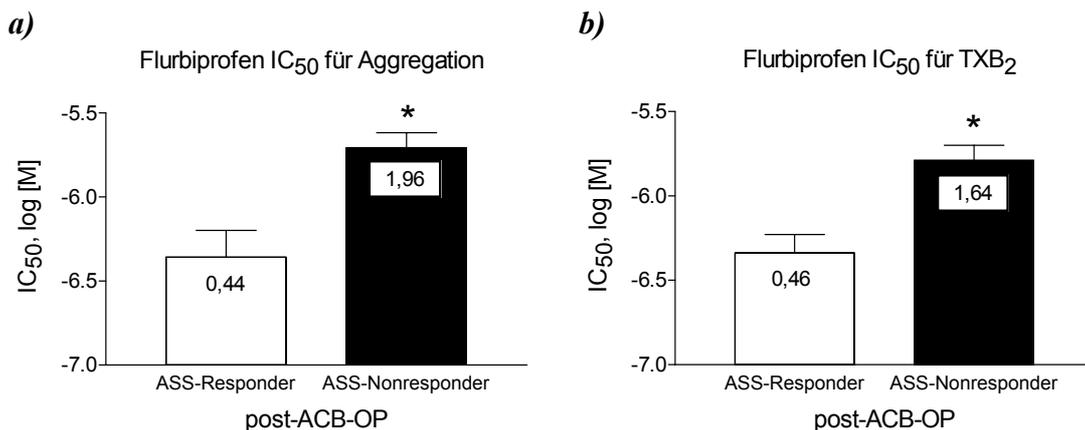


Abbildung 21

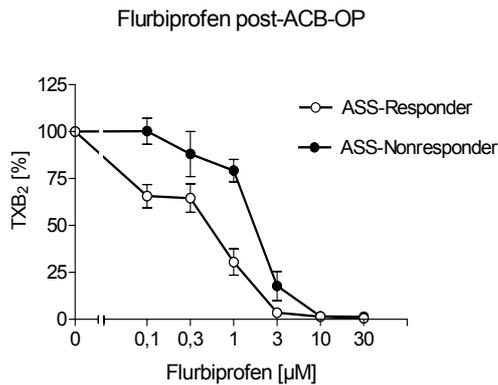
Thromboxan-Synthese (in % bezogen auf den Kontrollwert bei 0 μM) an Tag 5 (± 1 Tag) nach ACB-Operation.

a) Hemmung der Thromboxan-Synthese durch Flurbiprofen (Konzentrationen 0,1 bis 30 μM) bei ASS-Respondern (n= 6) versus ASS-Nonrespondern (n= 6) (bei 0,1 μM n= 2-5).

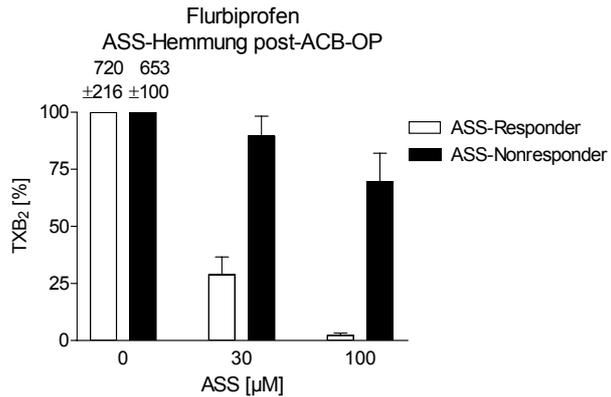
b) Hemmung der Thromboxan-Synthese durch ASS (Konzentrationen 0, 30, 100 μM). Gleiche Patienten wie in a).

Die 100 % entsprechenden Absolutwerte bei 0 μM ASS sind über den Säulen in ng/ml angegeben (Mittelwert \pm SEM).

a)



b)



3.2.3 Oxicam-Derivat: Piroxicam

Als ein Vertreter der Oxicam-Derivate wurden Untersuchungen mit Piroxicam in vitro durchgeführt.

Piroxicam

Piroxicam wurde in Endkonzentrationen zwischen 3 μM und 300 μM eingesetzt. Nach Hemmung der Aggregation und der Thromboxan-Synthese durch Piroxicam unterscheiden sich die postoperativen IC_{50} -Werte nicht signifikant von den präoperativen IC_{50} -Werten (Abbildung 22). Auch die IC_{50} -Werte von ASS-Respondern und ASS-Nonrespondern an Tag 5 (± 1 Tag) nach ACB-OP lassen keinen signifikanten Unterschied erkennen (Abbildung 23). Es deutet sich lediglich ein Trend an, dass die postoperativen IC_{50} -Werte von ASS-Nonrespondern gegenüber ASS-Respondern erhöht sind. Die Konzentrations-Wirkungskurve der ASS-Nonresponder ist gegenüber der von ASS-Respondern entsprechend nur wenig nach rechts verschoben (Abbildung 24). ASS-Responder und ASS-Nonresponder unterschieden sich präoperativ nicht signifikant (nicht gezeigt).

Abbildung 22

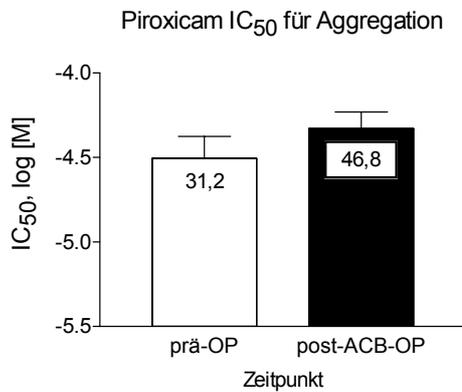
IC₅₀-Werte von Piroxicam vor und 5 Tage (±1 Tag) nach ACB-Operation (n= 7-8).

a) IC₅₀-Werte für die Hemmung der Aggregation durch Piroxicam.

b) IC₅₀-Werte für die Hemmung der Thromboxan-Synthese durch Piroxicam.

Der jeweilige entlogarithmierte Mittelwert ist als Zahlenwert (µM) in der Säule angegeben.

a)



b)

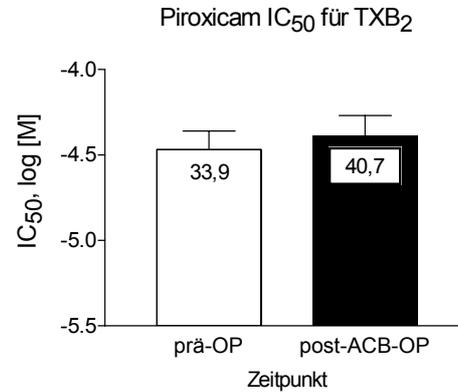


Abbildung 23

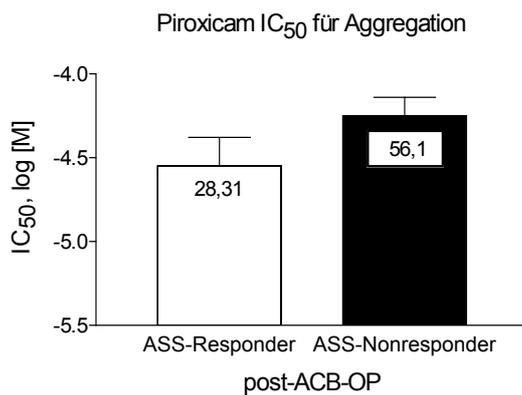
IC₅₀-Werte von Piroxicam bei ASS-Respondern (n= 2) versus ASS-Nonrespondern (n= 6) an Tag 5 (±1 Tag) nach ACB-Operation.

a) IC₅₀-Werte für die Hemmung der Aggregation.

b) IC₅₀-Werte für die Hemmung der Thromboxan-Synthese.

Der jeweilige entlogarithmierte Mittelwert ist als Zahlenwert (µM) in der Säule angegeben.

a)



b)

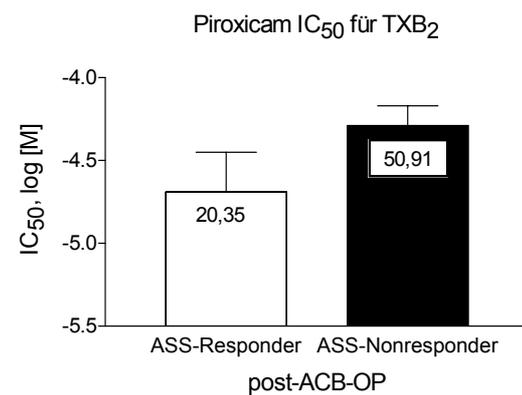


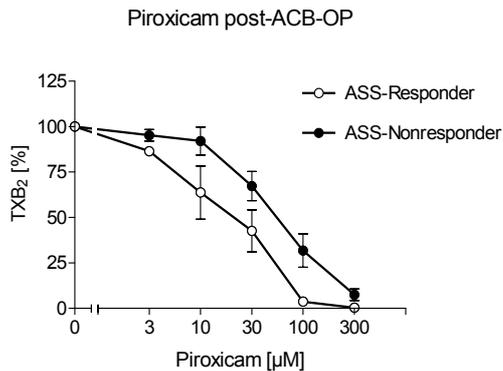
Abbildung 24

Thromboxan-Synthese (in % bezogen auf Kontrolle bei 0 μM) an Tag 5 (± 1 Tag) nach ACB-Operation.

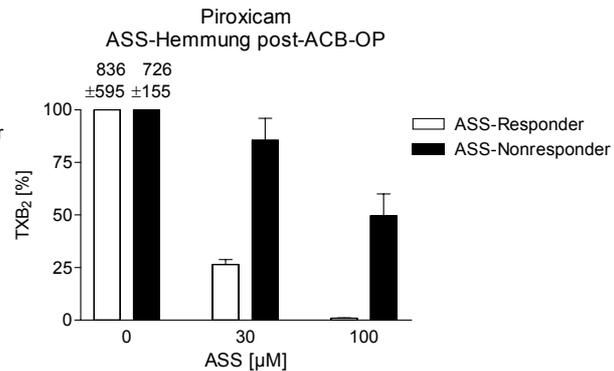
a) Hemmung der Thromboxan-Synthese durch Piroxicam (Konzentrationen 3 bis 300 μM) bei ASS-Respondern ($n=2$) versus ASS-Nonrespondern ($n=6$).

b) Hemmung der Thromboxan-Synthese durch ASS (Konzentrationen 0, 30, 100 μM). Gleiche Patienten wie in a). Die 100 % entsprechenden Absolutwerte bei 0 μM ASS sind über den Säulen in ng/ml angegeben (Mittelwert \pm SEM).

a)



b)



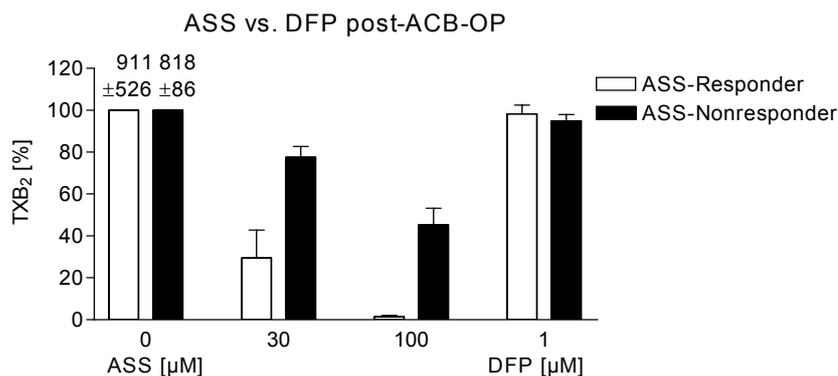
3.2.4 Selektive COX-2-Inhibition: DFP

DFP wurde in einer Konzentration von 1 μM zur Hemmung der COX-2 eingesetzt, um zu prüfen, ob die induzierbare Isoform der Cyclooxygenase (COX-2) an der thrombozytären Thromboxan-Synthese beteiligt ist. Die thrombozytäre Thromboxan-Synthese wird durch Hemmung der COX-2 nicht signifikant reduziert (Abbildung 25). Dies gilt sowohl für ASS-Responder als auch für ASS-Nonresponder. Vergleichbare Ergebnisse fanden sich bei den Aggregationsmessungen (nicht gezeigt).

Abbildung 25

Hemmung der Thromboxan-Synthese (in % bezogen auf den Kontrollwert bei 0 μM) durch ASS (Konzentrationen 0, 30, 100 μM) und durch DFP (1 μM) bei ASS-Respondern ($n=5$) versus ASS-Nonrespondern ($n=9$) an Tag 5 (± 1 Tag) nach ACB-Operation.

Die 100 % entsprechenden Absolutwerte bei 0 μM ASS sind über den Säulen in ng/ml angegeben (Mittelwert \pm SEM).



3.3 Tabellarischer Anhang mit numerischen Ergebnissen

Tabelle 2

Arachidonsäure (1 mM)-stimulierte Thrombozyten-Aggregation in PRP vor und 5 Tage (± 1 Tag) nach ACB-Operation (cm/min und %) als Mittelwert \pm SEM (n= 59). Die Aggregation wurde jeweils ohne (0 μ M ASS) und in Gegenwart von ASS (30 μ M und 100 μ M) in vitro durchgeführt. Die prozentualen Werte beziehen sich auf die Steigung (cm/min) bei 0 μ M ASS der jeweiligen Probe. * p<0,05 vs. ASS 0 μ M; + p<0,05 vs. prä-OP Kontrolle; n= 59

ASS-Konzentration [μ M]	Aggregation [cm/min]		Aggregation [%]	
	Prä-OP	Post-OP	Prä-OP	Post-OP
0	27,3 \pm 1,0	21,3 \pm 0,8 +	100	100
30	8,9 \pm 1,3 *	14,3 \pm 1,2 * +	30,1 \pm 4,1 * +	67,2 \pm 4,8 * +
100	0,2 \pm 0,15 *	8,8 \pm 1,2 * +	0,9 \pm 0,85 * +	44,4 \pm 5,7 * +

Tabelle 3

Arachidonsäure (1 mM)-stimulierte Thromboxan-Synthese in PRP vor und 5 Tage (± 1 Tag) nach ACB-Operation (ng/ml und %) als Mittelwert \pm SEM (n= 59). Die Aggregation wurde jeweils ohne (0 μ M ASS) und mit ASS (30 μ M und 100 μ M) in vitro durchgeführt und anschließend im Überstand die Thromboxan-Synthese gemessen. Die prozentualen Werte beziehen sich auf die Thromboxan-Synthese (ng/ml) bei 0 μ M ASS der jeweiligen Probe.

* p<0,05 vs. ASS 0 μ M; + p<0,05 vs. prä-OP Kontrolle; n= 59

ASS-Konzentration [μ M]	TXB ₂ -Synthese [ng/ml]		TXB ₂ -Synthese [%]	
	Prä-OP	Post-OP	Prä-OP	Post-OP
0	928,3 \pm 51,6	759,7 \pm 64,8 +	100	100
30	201,6 \pm 27,5 *	462,4 \pm 47,2 * +	18,9 \pm 2,1 * +	59,2 \pm 4,6 * +
100	9,1 \pm 2,2 *	234,2 \pm 36,8 * +	0,9 \pm 0,2 * +	32,8 \pm 4,4 * +

Tabelle 4

Arachidonsäure (1 mM)-stimulierte Thromboxan-Synthese (%), ermittelt aus den Überständen der Thrombozyten-Aggregationsversuche, ohne (0 μ M ASS) und mit ASS (30 μ M und 100 μ M) in vitro bei ASS-Respondern (n= 28) versus ASS-Nonrespondern (n= 31) vor und 5 Tage (± 1 Tag) nach ACB-Operation als Mittelwert \pm SEM. Die prozentualen Werte beziehen sich auf die Thromboxan-Konzentration (ng/ml) bei 0 μ M ASS der jeweiligen Probe.

+ p<0,05 vs. ASS-Responder, * p<0,05 vs. prä-OP

ASS-Konzentration [μ M]	ASS-Responder TXB ₂ [%]		ASS-Nonresponder TXB ₂ [%]	
	Prä-OP	Post-OP	Prä-OP	Post-OP
0	100	100	100	100
30	13,8 \pm 2,9	29,8 \pm 4,4 *	23,5 \pm 2,8 +	85,8 \pm 3,4 * +
100	0,7 \pm 0,1	2,2 \pm 0,4	1,1 \pm 0,3	60,5 \pm 4,2 * +

Tabelle 5

Arachidonsäure (1 mM)-stimulierte Thrombozyten-Aggregation (%) in PRP in Gegenwart von ASS (0, 30 und 100 μM) in vitro als Mittelwert \pm SEM bei ASS-Respondern (n= 28) versus ASS-Nonrespondern (n= 31) vor und 5 Tage (\pm 1 Tag) nach ACB-Operation. Die prozentualen Werte beziehen sich auf die Aggregation (cm/min) bei 0 μM ASS des jeweiligen Untersuchungstages. + p<0,05 vs. ASS-Responder, * p<0,05 vs. prä-OP

ASS-Konzentration [μM]	ASS-Responder Aggregation [%]		ASS-Nonresponder Aggregation [%]	
	Prä-OP	Post-OP	Prä-OP	Post-OP
0	100	100	100	100
30	17,9 \pm 4,9	38,7 \pm 6,5 *	41,0 \pm 5,9 +	92,9 \pm 1,8 * +
100	0 \pm 0	0 \pm 0	1,7 \pm 1,6	84,4 \pm 2,8 * +

4 Diskussion

ASS ist gegenwärtig das Standardpräparat zur Prophylaxe arterieller Thrombosen. In zahlreichen Studien wurde die Wirksamkeit von ASS zur Prognoseverbesserung bei bestimmten Risikogruppen belegt (Antithrombotic Trialists' Collaboration, 2002). In den vergangenen Jahren zeigten jedoch auch viele Studien, dass ASS bei bestimmten Patientengruppen und auch bei gesunden Probanden die Thrombozytenfunktion nur unzureichend hemmt (Buchanan & Brister, 1995; Gum et al., 2001; Gum et al., 2001; Helgason et al., 1993). Besonders eindrucksvoll wurde dies bei KHK-Patienten nach ACB-OP beobachtet (Zimmermann et al., 2001; Zimmermann et al., 2003; Kuliczowski et al., 2005; Poston et al., 2006). Diese Patientengruppe eignete sich daher gut, um Unterschiede zwischen ASS-Respondern und ASS-Nonrespondern zu untersuchen.

In der vorliegenden Arbeit konnten etwa 53 % der Patienten postoperativ nach ACB-Operation anhand der Thromboxan-Synthese (> 10 % bei Hemmung durch 100 μM ASS in vitro) als ASS-Nonresponder eingestuft werden. Bereits präoperativ war bei den als ASS-Nonresponder und ASS-Responder eingestuften Patienten bei Hemmung mit 30 μM ASS ein signifikanter Unterschied vorhanden. Dies liefert einen Anhaltspunkt dafür, dass bei ASS-Nonrespondern bereits präoperativ ein prädisponierender Faktor vorliegt, der dazu führt, dass postoperativ ASS-Resistenz auftritt.

Der zentrale und neue Befund der vorliegenden Arbeit besteht darin, dass ASS-Responder und ASS-Nonresponder sich nicht nur in der Wirksamkeit von ASS unterscheiden, sondern dass bei ASS-Nonrespondern nach ACB-Operation auch andere COX-Inhibitoren eine verminderte Wirksamkeit zur Hemmung der Thromboxan-Synthese und Thrombozyten-Aggregation aufweisen. Bemerkenswert ist darüber hinaus, dass für verschiedene Substanzgruppen quantitative Unterschiede in dieser Hinsicht bestehen. Für die untersuchten COX-Inhibitoren wurden Konzentrations-Wirkungskurven erstellt und IC_{50} -Werte ermittelt, die zu einer halbmaximalen Hemmung der Thromboxan-Synthese und der Aggregation führten. Bei den Essigsäure-Derivaten Indometacin und Diclofenac war der Unterschied der IC_{50} -Werte zwischen ASS-Respondern und ASS-Nonrespondern besonders ausgeprägt. Gegenüber den ASS-Respondern war hier bei ASS-Nonrespondern eine etwa 9- bzw. 8,5-fach höhere Konzentration der COX-Inhibitoren nötig, um eine halbmaximale Hemmung der Thromboxan-Synthese zu erreichen. (Die IC_{50} -Werte für die Aggregationshemmung waren 7- bzw. 11-fach erhöht.) Bei dem Propionsäure-Derivat Flurbiprofen waren die IC_{50} -Werte für die Hemmung der Thromboxan-Synthese bzw. der Aggregation bei ASS-Nonrespondern nur um den Faktor 3,5 bzw. 4,5 höher als bei ASS-Respondern. Für das strukturell verwandte Naproxen war der Unterschied zwischen den beiden Gruppen nur gering (2-fach) und nicht signifikant. Die IC_{50} -Werte für Piroxicam waren bei ASS-Nonrespondern 2- bis 2,5-fach erhöht, dieser Unterschied war ebenfalls nicht signifikant.

Dies spricht dafür, dass eine strukturelle Veränderung des Cyclooxygenase-Moleküls an der postoperativen Resistenzentwicklung beteiligt ist, die zu einer beeinträchtigten Interaktion zwischen Enzym und Inhibitoren führt, wobei insbesondere die Acetyl-substituierten COX-Inhibitoren ASS, Indometacin und Diclofenac betroffen sind. Demgegenüber zeigte sich gegenüber den Propionsäure-substituierten Substanzen Naproxen und Flurbiprofen eine vergleichsweise geringere „Resistenz“-Entwicklung, die bei Naproxen nicht signifikant war. Für Piroxicam, das keine Carboxylgruppe enthält, ergab sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied zwischen ASS-Respondern und ASS-Nonrespondern.

Prinzipielle Möglichkeiten zur Erklärung der ASS-Resistenz

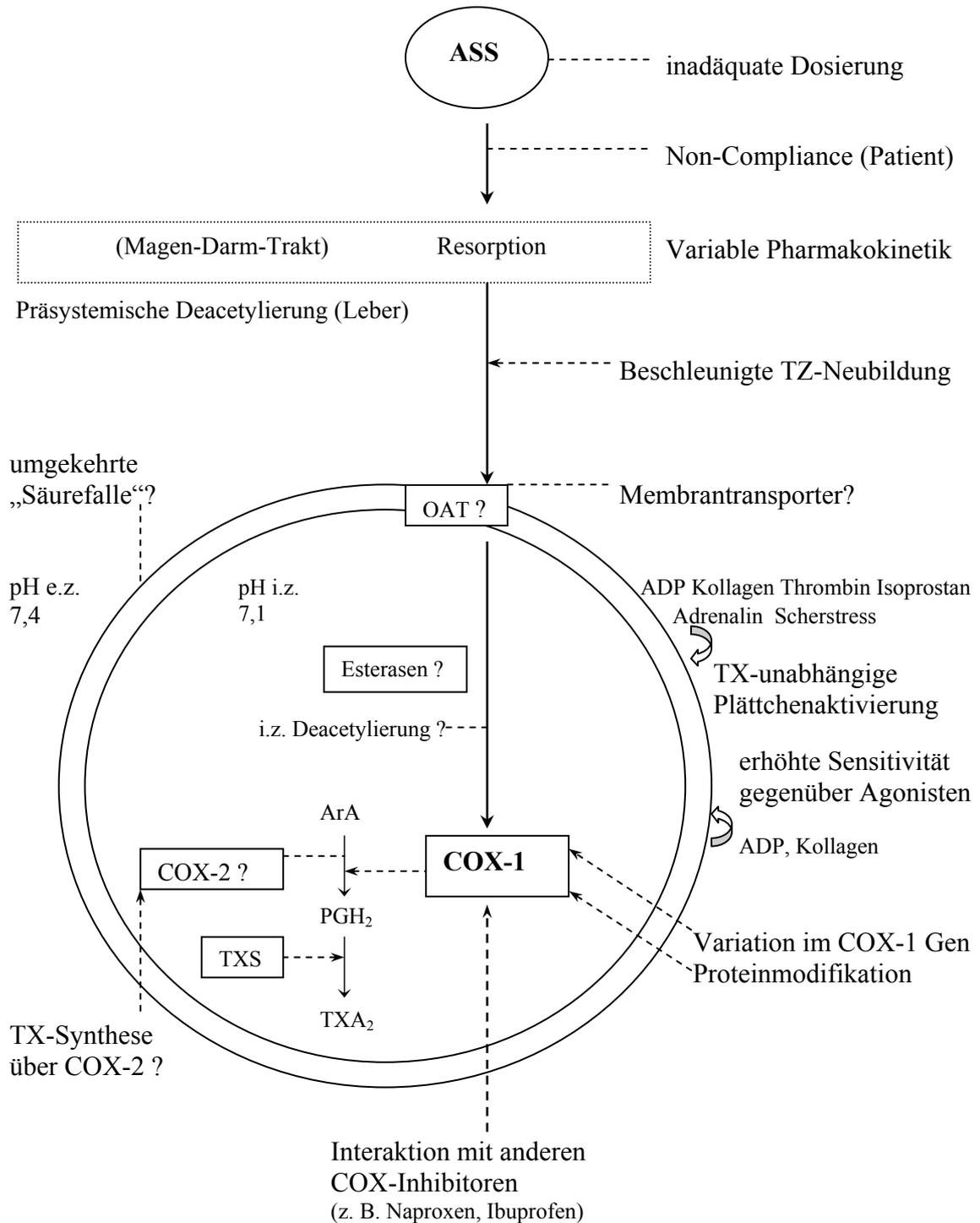
Bisher wurden zahlreiche Ursachen für „ASS-Resistenz“ diskutiert, die auf verschiedenen Ansätzen beruhen, von denen nachfolgend die wesentlichen Aspekte im

Zusammenhang mit den vorliegenden Untersuchungen erläutert werden. In Abbildung 26 sind die potentiellen Ursachen für ASS-Resistenz schematisch zusammengestellt.

Abbildung 26

Schematische Darstellung potentieller Ursachen für ASS-Resistenz.

Abkürzungen: ArA (Arachidonsäure), ASS (Acetylsalicylsäure), COX (Cyclooxygenase), e.z. (extrazellulär), i.z. (intrazellulär), OAT (organischer Anionen-Transporter), PG (Prostaglandin), TZ (Thrombozyt), TX (Thromboxan), TXS (Thromboxan-Synthase)



4.1 Extrathrombozytäre Ursachen der ASS-Resistenz

- Non-Compliance

Eine potentielle Ursache für das Auftreten einer „ASS-Resistenz“ ist die Non-Compliance von Patienten bei der Einnahme von ASS. In der vorliegenden Arbeit erfolgte die postoperative ASS-Therapie jedoch unter stationären Bedingungen, so dass die Compliance wahrscheinlich sehr hoch ist.

- Veränderte Pharmakokinetik

Die systemische Bioverfügbarkeit nach Deacetylierung von ASS in der Leber beträgt etwa 45-50 % (vgl. Kapitel 1.4). Die Pharmakokinetik von ASS unterliegt außerdem einer ausgeprägten interindividuellen Variabilität (Benedek et al., 1995). Dies könnte erklären, weshalb bei einigen Patienten erst durch Steigerung der ASS-Dosis eine ausreichende Plättchenaggregationshemmung erreicht werden konnte (Helgason et al., 1993). Diese Form der ASS-Resistenz ist vergleichbar mit dem pharmakokinetischen Typ I (Weber et al., 2002a).

- Erhöhte Thrombozytenregeneration nach ACB-OP

Bei Patienten nach ACB-OP, die mit Herz-Lungen-Maschine (HLM) operiert worden waren, kommt es nach einem initialen Abfall der Thrombozytenzahl um etwa 25 % am ersten postoperativen Tag zu einem bemerkenswerten Anstieg der Thrombozytenzahl bis zum Tag 10 auf das 2-fache des präoperativen Ausgangswertes (Zimmermann et al., 2001). Die Kollagen-stimulierte Thrombozyten-Aggregation und die Thromboxan-Synthese waren in diesem Zeitraum trotz oraler ASS-Therapie mit 100 mg/d nicht adäquat gehemmt. Die gleiche ASS-Dosierung konnte bei gesunden Probanden eine ausreichende Thrombozytenfunktionshemmung bewirken. Die Autoren schlossen daraus, dass die erhöhte Thrombozytenregeneration zur ASS-Resistenz beiträgt, da aufgrund der kurzen Plasmahalbwertszeit (< 30 min) von ASS bei einer einmaligen Dosis pro Tag vermehrt neu synthetisierte Thrombozyten ohne acetylierte Cyclooxygenase vorliegen können. Folgeuntersuchungen von Zimmermann et al. (2005) an Patienten, die eine ACB-OP ohne Verwendung einer HLM erhielten, unterstützten diese Hypothese, da bei diesen kein signifikanter Anstieg der Thrombozytenzahlen zu erkennen war und sowohl die Aggregation als auch die Thromboxan-Synthese nach 5 Tagen oraler ASS-Therapie signifikant gehemmt war.

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Arbeit könnten eine verminderte Resorption oder Bioverfügbarkeit und auch eine erhöhte Thrombozytenregeneration dazu beigetragen haben, dass nach postoperativer oraler ASS-Therapie mit 100 mg/d die Thrombozytenfunktion nur gering gehemmt war. Dies kann jedoch nicht die Hauptursache sein, denn eine verminderte Wirksamkeit von ASS auf Thrombozyten trotz in vitro Zugabe hoher Konzentrationen (bis 100 μM) kann durch eine veränderte Pharmakokinetik oder erhöhte Thrombozytenregeneration nicht erklärt werden. Hierfür sind Veränderungen auf Thrombozyten-Ebene Voraussetzung, z.B. an Rezeptoren der Thrombozytenmembran oder an der Cyclooxygenase, die den Angriffspunkt von ASS zur Hemmung der Thromboxan-Synthese darstellt.

4.2 Potentielle Ursachen auf Thrombozyten-Ebene

- Zellmembrantransporter/ „Säurefalle“ (Ionenfallenprinzip)

Eine andere potentielle Ursache für das Auftreten von „ASS-Resistenz“ kann ein gestörter Transport von ASS in den Thrombozyten darstellen, z.B. über organische Anionen-Transporter (OATs), also Transportmoleküle oder Membranproteine, die organische Säuren durch die Plasmamembran transportieren. Im Tubulussystem der Niere sind OATs vorhanden, über die NSAIDs transportiert werden (Anzai et al., 2006). Andere Substrate der OATs sind beispielsweise Antibiotika und Prostaglandine. MRP4 (multidrug resistance protein) ist ein organischer Anionentransporter, der in Thrombozyten-Granula vorkommt (Ritter et al., 2005). Es ist bisher nicht bekannt, ob dieser Transporter eine Rolle bei dem (transmembranösen) Transport von ASS in den Thrombozyten spielt. Möglich ist ein verminderter Transport nach intrazellulär oder ein beschleunigter Transport nach extrazellulär, der zu einer verminderten intrazellulären ASS-Konzentration führt.

Denkbar wäre auch ein gestörter Transport von ASS über die Thrombozyten-Zellmembran aufgrund einer sogenannten „Säurefalle“ (Ionenfallenprinzip), da ASS sich in dissoziierter Form eher in basischem Milieu anreichert und dann schlecht über Membranen in ein saures Milieu diffundieren kann. Blut hat einen pH-Wert von 7,35-7,45 und ist somit nur gering alkalischer als der pH in Thrombozyten, der bei $7,27 \pm 0,03$ liegt (Tang et al., 2006). Da der transmembranöse pH-Gradient nur gering ist, trägt eine umgekehrte „Säurefalle“ wahrscheinlich nicht wesentlich zur ASS-Resistenz bei.

- Intrazelluläre Deacetylierung von ASS durch Esterasen

In eigenen Vorversuchen wurde die Esterase-Aktivität in Thrombozyten nach koronarer Bypass-OP untersucht. Diese könnten prinzipiell zu einer intrazellulären Deacetylierung von ASS vor Erreichen der COX-1 führen. Es konnte jedoch keine Veränderung bei ASS-resistenten Thrombozyten gefunden werden (unveröffentlichte Befunde).

- Veränderte Sensitivität von Thrombozyten gegenüber Aggregationsstimuli und Thromboxan-unabhängige Thrombozytenaktivierung

Wenn Thrombozyten über Thromboxan-unabhängige Mechanismen aktiviert werden, kann ASS die Thrombozyten-Aggregation nicht hemmen. Eine veränderte Sensitivität von ASS-resistenten Thrombozyten gegenüber Aggregationsstimuli, vergleichbar mit dem Typ III (Weber et al., 2002a) wurde von Kawasaki et al. (2000) beschrieben: Diese Autoren stuften drei von insgesamt acht Probanden aufgrund unzureichend verlängerter Blutungszeit trotz vorheriger ASS-Einnahme als ASS-Nonresponder ein. Bei diesen war im Gegensatz zu ASS-Respondern eine niedrigere mittlere Kollagen-Konzentration nötig, um eine halbmaximale Aggregation zu induzieren (ED_{50} 0,48 $\mu\text{g/ml}$ vs. 0,91 $\mu\text{g/ml}$). Bei den IC_{50} -Werten für ASS war dagegen kein Unterschied zu ASS-Respondern zu erkennen. Die Autoren folgerten daraus, dass die ASS-Resistenz durch eine erhöhte Sensitivität gegenüber Kollagen verursacht sein könnte. Macchi et al. (2002) konnten mittels durchflusszytometrischen Messungen eine verstärkte Thrombozytenaktivierung durch ADP bei ASS-Resistenz feststellen und folgerten, dass die Hypersensitivität gegenüber dem Aggregationsstimulus ADP eine mögliche Erklärung für die ASS-Resistenz liefert. Bei den vorliegenden Untersuchungen wurde jedoch ausschließlich Arachidonsäure als Aggregationsstimulus verwendet, weshalb eine Hypersensitivität gegenüber Kollagen oder ADP die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit kaum erklären kann.

Untersuchungen von Cipollone et al. (2000) sprechen dagegen für einen Zusammenhang zwischen oxidativem Stress und ASS-insensitiver Thromboxan-Synthese. Oxidativer Stress führt über eine nicht-enzymatische Lipidperoxidation zu einer vermehrten COX-unabhängigen Bildung von Isoprostanen, die als Thromboxan-Rezeptorantagonisten wirksam sind. Es konnte eine statistisch signifikante Korrelation zwischen erhöhter 8-iso-PGF_{2 α} -Synthese (ein Isoprostan, das auch als Marker für oxidativen Stress eingesetzt wird) und ASS-insensitiver TX-Synthese bei Patienten mit instabiler

Angina pectoris gefunden werden. 8-iso-PGF_{2α} verstärkt die Response von humanen Thrombozyten gegenüber anderen Agonisten.

In der vorliegenden Arbeit wurden Blutproben von Patienten mit stabiler KHK untersucht, die sich einer ACB-OP unterzogen und hier möglicherweise oxidativem Stress ausgesetzt waren, so dass eine ASS-insensitive Thrombozyten-Aktivierung durch nicht-enzymatisch synthetisierte Isoprostan-Metaboliten grundsätzlich denkbar ist. Dagegen spricht jedoch, dass in Voruntersuchungen durch Steigerung der ASS-Konzentration eine Hemmung von ASS-resistenten Thrombozyten erreicht werden konnte, und eine zeitabhängig verzögerte Kinetik für die ASS-Wirkung nachgewiesen wurde (Zimmermann et al., 2003). Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten COX-Inhibitoren zeigten ebenfalls in hoher Konzentration eine vollständige Hemmung der Thrombozyten-Aggregation und Thromboxan-Synthese.

4.3 Potentielle Ursachen auf Ebene der thrombozytären COX (COX-1/COX-2)

4.3.1 COX-2 in Thrombozyten

Die thrombozytäre Thromboxan-Synthese beruht prinzipiell auf der katalytischen Funktion der COX-1, die in Thrombozyten konstitutiv vorkommt (vgl. Abschnitt 1.5). Weber et al. (1999) konnten jedoch auch die induzierbare Isoform COX-2 in humanen Thrombozyten mittels Western Blot nachweisen. Die Autoren vermuteten, dass die COX-2 Expression in Thrombozyten eine Rolle bei der ASS-Resistenz spielt. Da ASS die COX-1 mit einer über 100-fachen Präferenz gegenüber der COX-2 hemmt (Vane et al., 1998; Mitchell et al., 1993), könnte eine durch die COX-2 katalysierte Thromboxan-Synthese die inhibitorische Wirkung von ASS auf die Thrombozytenfunktion einschränken. In nachfolgenden durchflusszytometrischen Untersuchungen an Thrombozyten von ACB-OP-Patienten, zeigte sich ein signifikanter Anstieg der COX-2 Expression an Tag 5 im Vergleich zu den präoperativen Werten (Weber et al., 2002b; Zimmermann et al., 2003).

COX-2 wurde ebenfalls in Thrombozyten von Patienten mit erhöhter Plättchenregeneration nachgewiesen (Rocca et al., 2002). Bei diesen konnte durch einen überwiegend COX-2 wirksamen Inhibitor die Thromboxan-Synthese in Thrombozyten signifikant stärker gehemmt werden als bei gesunden Probanden. Daraus schlossen die Autoren, dass eine durch COX-2 katalysierte Thromboxan-Synthese eine Rolle in der Hämostase spielen könnte. Wenn eine durch COX-2 katalysierte Thromboxan-Synthese für das

Auftreten einer ASS-Resistenz nach ACB-OP ausschlaggebend wäre, müsste die Thromboxan-Synthese bei ASS-Nonrespondern durch eine selektive COX-2-Inhibition gehemmt werden können. Der COX-2-Inhibitor Celecoxib konnte jedoch die Thromboxan-Synthese bei ASS-resistenten Thrombozyten von ACB-OP-Patienten nicht signifikant senken (Zimmermann et al., 2003), was gegen eine Beteiligung der COX-2 bei der ASS-Resistenz spricht. Auch die Untersuchungen mit dem COX-2 Inhibitor NS-398 sprachen gegen eine Beteiligung der COX-2 bei der Thromboxan-Synthese in aktivierten Thrombozyten (Patrignani et al., 1999).

Dies ist mit den vorliegenden Ergebnissen vereinbar. Würde nämlich die COX-2 eine bedeutende Rolle bei der Thromboxan-Synthese ASS-resistenter Thrombozyten spielen, müssten NSAIDs, die im Gegensatz zu ASS, beide Isoformen in gleichem Ausmaß hemmen (z.B. Diclofenac, Naproxen), die Thromboxan-Synthese stärker beeinträchtigen als NSAIDs mit Präferenz zur COX-1 (z.B. Indometacin, Piroxicam). Die Ergebnisse waren jedoch für Diclofenac und Naproxen divergent, obwohl beide Substanzen neben der COX-1 auch die COX-2 in annähernd gleichem Ausmaß hemmen. Während die inhibitorische Wirkung von Diclofenac zur Thrombozytenfunktionshemmung bei ASS-Nonrespondern erheblich abgeschwächt war, wurde bei Naproxen nur ein geringer Unterschied zwischen ASS-Respondern und ASS-Nonrespondern festgestellt. Darüber hinaus zeigt die vorliegende Arbeit, dass der neue hochselektive COX-2-Inhibitor DFP in einer Konzentration, welche zur maximalen Hemmung der COX-2 führt, die Thromboxan-Synthese weder bei ASS-Respondern noch bei ASS-Nonrespondern signifikant senkt. Eine Bedeutung der COX-2 an der ASS-Resistenz nach ACB-OP ist damit äußerst unwahrscheinlich.

4.3.2 Veränderungen der COX-1 in Thrombozyten

- Variationen im COX-1 Gen

Polymorphismen oder Mutationen des COX-1 Gens könnten eine potentielle Bedeutung für die ASS-Resistenz darstellen (Patrono et al., 2001). Diese Form der ASS-Resistenz wäre dem Typ II (pharmakodynamischer Typ) zuzuordnen (Weber et al., 2002a). Die vorliegenden Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass bei ASS-Resistenz Veränderungen an der Cyclooxygenase eine Rolle spielen, da Thrombozyten ASS-resistenter Patienten auch gegenüber anderen COX-Inhibitoren als ASS in vitro eine ver-

minderte Sensitivität aufweisen. Dies trifft jedoch nicht auf alle getesteten COX-Inhibitoren in gleichem Maße zu.

Neben Serin-530, der Acetylierungsstelle von ASS, könnte Arginin-120 von einer Mutation des COX-1 Gens betroffen sein, da diese Stelle im COX-1-Molekül bedeutend für die Interaktion mit NSAIDs ist, die eine freie Carboxylgruppe enthalten. Die Mutation von Arginin-120 zu Glutamin in COS-7-Zellen führte zu einer fehlenden oder abgeschwächten inhibitorischen Aktivität von NSAIDs gegen die COX-1 (Mancini et al., 1995). Untersuchungen der Röntgenkristallstruktur der COX-1 durch Picot et al. (1994) sprechen dafür, dass neben Arginin-120 auch Tyrosin-355 und Glutamat-524 eine bedeutende Rolle bei der Positionierung von Substrat oder Inhibitor im aktiven Zentrum der COX-1 spielen. Die Carboxylat-Gruppe der Arachidonsäure (und analog die Carboxylat-Gruppe von NSAIDs) bildet eine Salzbrücke zu Arginin-120 und eine Wasserstoffbrückenbindung zu Tyrosin-355. Zudem bildet Arginin-120 eine Salzbrücke mit Glutamat-524 (Bhattacharyya et al., 1996, Thuresson et al., 2001). Weitere Wasserstoffbrückenbindungen verbinden Glutamat-524 mit Tyrosin-355 und bilden ein Netzwerk, das für die Positionierung des Substrates oder des Inhibitors im aktiven Zentrum von Bedeutung ist.

Auch Serin-530 (zumindest an der COX-2) spielt eine wichtige Rolle für die inhibitorische Funktion von NSAIDs, insbesondere für Diclofenac (>650-fach erhöhte IC_{50} bei Mutation von Serin-530 zu Alanin) (Rowlinson et al., 2003). Dies lässt vermuten, dass eine Veränderung von Serin-530 oder in der unmittelbaren Umgebung dieser Aminosäure in der COX-1 bei der Resistenzentwicklung beteiligt sein könnte, da die IC_{50} -Werte für die Hemmung der Thromboxan-Synthese und der Aggregation durch Diclofenac bei ASS-Nonrespondern im Vergleich zu ASS-Respondern in den vorliegenden Untersuchungen besonders erhöht waren. In derselben Untersuchung von Rowlinson et al. (2003) war Serin-530 jedoch auch für die Bindung von Piroxicam bedeutend (>109-fach erhöhte IC_{50}), für Indometacin dagegen weniger (>1,1-fach erhöhte IC_{50}). Allerdings sind diese Ergebnisse an der COX-2 Isoform erhoben worden und nicht ohne weiteres auf die COX-1 übertragbar.

Veränderungen an der COX-1 auf der Grundlage genetischer Variationen im COX-1-Gen wurden in einer Untersuchung an 38 gesunden Probanden beschrieben (Halushka et

al., 2003). Es konnten 9 Einzel-Nukleotid-Polymorphismen identifiziert werden, wobei für zwei davon, nämlich A842G und C50T, ein interessanter Befund erhoben wurde: Bei Probanden, die heterozygot für den A842G/C50T Haplotyp waren, wurde die PGH₂-Synthese (gemessen als PGF₂ alpha nach Stimulation mit Arachidonsäure) durch ASS (30 µM) signifikant stärker gehemmt als bei Homozygoten. Eine genetische Variation kann also mit einer veränderten Funktionalität einhergehen, hier allerdings mit einer erhöhten Sensitivität der COX-1 gegenüber ASS.

Maree et al. (2005) untersuchten die Häufigkeit und Auswirkung von fünf Einzel-nukleotid-Polymorphismen des COX-1-Genotyps (A842G, C22T, G128A, C644A und C714A) bei 144 Patienten mit stabiler KHK, die seit mindestens 2 Wochen ASS einnahmen (75-300 mg/d) und verwendeten als Maß für die ASS-Response die Arachidonsäure-induzierte Thrombozyten-Aggregation und die TXB₂-Serum-Konzentration. Die Frage war, ob diese Parameter durch den COX-1-Genotyp beeinflusst werden. Für beide Parameter konnte eine signifikante Assoziation zu COX-1-Genotypen gefunden werden, wobei insbesondere der Haplotyp GCGCC mit einer erhöhten Aggregation einherging. Die Autoren schlussfolgerten, dass die genetische Variabilität der COX-1 sowohl zu einer Beeinflussung der Arachidonsäure-induzierten Thrombozyten-Aggregation als auch der Thromboxan-Synthese zu führen scheint und zumindest teilweise neben anderen Faktoren die Heterogenität der Sensitivität gegenüber ASS reflektiert. Die Anzahl der Patienten mit erhöhter Aggregation ($\geq 20\%$) war jedoch gering, und zu den Ausschlusskriterien dieser Studie gehörte unter anderem eine zurückliegende ACB-OP innerhalb der letzten 6 Wochen, so dass diese Ergebnisse keine eindeutigen Rückschlüsse auf die ASS-Resistenz nach ACB-OP zulassen.

Bei 68 Patienten mit wiederholtem ischämischen Schlaganfall trotz ASS-Einnahme (hier als ASS-Nonresponder eingestuft) wurden im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen 14 Variationen des COX-1-Gens identifiziert, wovon sieben zu einer Aminosäure-Substitution im COX-1-Molekül führten (Hillarp et al. 2003). Keine dieser Mutationen war in der Nähe des katalytischen Zentrums lokalisiert. Bei Aggregationsmessungen mit Kollagen, ADP und Arachidonsäure als Agonisten verhielten sich Träger von einer der Mutationen ähnlich zu Personen ohne diese Mutation. Diese Autoren konnten daher nicht bestätigen, dass Varianten des COX-1-Gens bei ASS-Nonrespondern zugrunde liegen. Im Unterschied zu der vorliegenden Arbeit handelte es sich

jedoch um ein anderes Patientenkollektiv, und die Einstufung als ASS-Nonresponder erfolgte anhand des klinischen Verlaufes. Außerdem betrafen die Mutationen keine Aminosäure im Bereich des katalytischen Zentrums. Bei den in der vorliegenden Arbeit untersuchten KHK-Patienten ist dagegen eine Variation der COX-1 denkbar, die zu einer verminderten ASS-Wirkung an der COX-1 in vitro führt.

Bei Hemmung der Thrombozytenfunktion mit 30 μ M ASS in vitro war bereits präoperativ bei den als ASS-Nonresponder und ASS-Responder eingestuften Patienten ein signifikanter Unterschied vorhanden. Daher könnte bei ASS-Nonrespondern bereits präoperativ ein prädisponierender Faktor vorliegen, der dazu führt, dass eine postoperative ASS-Resistenz auftritt. Es wäre also denkbar, dass bei Vorhandensein von Polymorphismen des COX-1-Gens, die Auswirkungen sich schon präoperativ gering bemerkbar machen, und dass diese Polymorphismen dazu prädisponieren, dass es postoperativ zu einer posttranslationalen Modifikation an der COX-1 kommt, die zu einer verstärkt beeinträchtigten Interaktion zwischen der COX-1 und COX-Inhibitoren führt. Auch bei den postoperativ als ASS-Responder eingestuften Patienten ist bei 30 μ M ASS in vitro ein Trend erkennbar, dass ASS postoperativ vermindert wirksam ist. Dieser Unterschied war nur bei prozentualer Angabe statistisch signifikant und sehr viel geringer ausgeprägt als bei ASS-Nonrespondern. Im Zusammenhang mit der oben beschriebenen Hypothese wäre es möglich, dass ASS-Responder, die keine genetische Veränderung des COX-1-Gens aufweisen, postoperativ nur in geringerem Maße von einer posttranslationalen Modifikation betroffen sind als ASS-Nonresponder.

- Posttranslationale Modifikation der COX-1

Neben einer Mutation des COX-1-Gens könnte eine posttranslationale Modifikation am COX-Molekül zu einer strukturellen und funktionellen Veränderung führen, die in einer beeinträchtigten Interaktion zwischen dem Enzym und den Inhibitoren resultiert. Beispiele für posttranslationale Modifikationen sind die Nitrierung (Gow et al., 2004), Phosphorylierung oder Glykosylierung von Proteinen, z.B. O-linked beta-N-acetylglucosamin (O-GlcNAc), eine posttranslationale Modifikation, die an Serin- und Threonin-Resten von zytosolischen und nuklearen Proteinen vorkommt (Whelan & Hart, 2003). Posttranslationale Modifikationen können transient oder permanent sein. Eine große Klasse der Protein-Modifikationen stellt die Glykosylierung dar, z.B. „N-linked, O-linked oder Glykosylphosphatidylinositol(GPI)-linked“ (Nalivaeva & Turner, 2001).

Bekannt ist die Glykierung von Proteinen, die bei Diabetes mellitus und im Alterungsprozess vorkommt (Bousova et al., 2005). Die Bildung von sogenannten „advanced glycation end products“ beruht auf einer nicht-enzymatischen Reaktion von reduzierenden Zuckermolekülen mit biologischen Proteinen (Zieman & Kass, 2004). Eine bekannte Proteinglykierung im Rahmen des Diabetes mellitus stellt der HbA1c-Wert dar, der als Maß für die Hämoglobin-Glykierung in Erythrozyten den mittleren Glukosespiegel reflektiert (Saudek et al., 2005). Thrombozyten von Patienten mit Diabetes mellitus zeigen bemerkenswerterweise eine reduzierte Sensitivität gegenüber ASS, die mit einem höheren HbA1c-Spiegel assoziiert ist (Watala et al., 2004). In einer anderen Untersuchung von Watala et al. (2005) führte die Inkubation von Thrombozyten mit steigenden Konzentrationen von Glukose und ASS unter in vitro Bedingungen zu einer nicht-enzymatischen Modifikation von Protein-Aminogruppen (Glykosylierung oder Acetylierung). Bei hohen ASS-Konzentrationen konnte die Glykierung verzögert werden. Umgekehrt führten hohe Glukose-Konzentrationen zu einer weniger effizienten Acetylierung. Die Autoren schlossen daraus, dass eine vermehrte Plättchen-Proteinglykierung bei diabetischen Patienten mit hohen Glukosepegeln mit einer verminderten Sensitivität von Plättchen gegenüber ASS einhergeht. Welche Aminosäuren im Einzelnen glykiert oder acetyliert werden, wurde hier leider nicht untersucht.

Denkbar wäre demnach eine Glykierung der thrombozytären COX-1 an einem Aminosäurerest, der für die Bindung von COX-Inhibitoren an das Enzym bedeutend ist oder eine Glykierung an einer Stelle, die den ungehinderten Zugang der Substanz zu ihrem molekularen Wirkort beeinträchtigt. Ob bei ASS-resistenten Thrombozyten eine Glykierung der COX-1 vorliegt, welche die Interaktion zwischen dem Enzym und den untersuchten Substanzen beeinträchtigt, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht überprüft.

Eine andere Form der posttranslationalen Modifikation stellt die Nitrierung dar. Eine Nitrierung der COX-1 an Tyrosinresten durch Peroxynitrit (ONOO⁻) wurde von Boulos et al. (2000) beschrieben. Je nachdem, ob die Zugabe von Peroxynitrit vor oder gleichzeitig mit der Zugabe von Arachidonsäure erfolgte, kam es zu einer Hemmung oder Stimulierung der katalytischen COX-1-Kapazität. Eine verminderte Hemmbarkeit der COX-1 durch COX-Inhibitoren wäre im Rahmen einer solchen Nitrierung von Tyrosinresten denkbar. So hat beispielsweise Tyrosin-385 im aktiven Zentrum der COX-1 entscheidende Bedeutung für die Hemmung durch ASS und andere COX-Inhibitoren.

4.3.3 Arzneimittel-Wechselwirkungen von ASS mit anderen COX-Inhibitoren an der COX-1

Catella-Lawson et al. (2001) untersuchten die Wechselwirkung von ASS mit anderen COX-Inhibitoren bei ASS-Gabe 2 h vor oder nach Einnahme anderer COX-Inhibitoren. Als Maß für die Thrombozyten-Hemmung wurden die Thrombozyten-Aggregation und das Serum-TXB₂ verwendet. Bei Einnahme von ASS vor einem anderen COX-Inhibitor wurde die Hemmung der Thrombozytenfunktion durch ASS nicht beeinträchtigt. Wurde ASS nach Ibuprofen appliziert, war dagegen die Thrombozyten-Hemmung durch ASS aufgehoben. Bei Rofecoxib oder Diclofenac bestand diese Interferenz jedoch nicht. Damit könnte Ibuprofen auch den kardioprotektiven Effekt von ASS limitieren. Bei gleichzeitiger oraler Gabe von ASS und Naproxen war die ASS-Wirkung ebenfalls vermindert: sowohl TXA₂-Synthese als auch Thrombozyten-Aggregation waren unter gleichzeitiger Gabe von Naproxen nicht gehemmt (Capone et al., 2005). Wurde Naproxen 2 h vor oder nach ASS-Gabe eingenommen, kam es zu keiner signifikanten Änderung der ASS-Wirkung auf die TXA₂-Synthese und die Thrombozyten-Aggregation.

4.4 Schlussfolgerungen

Für die in der vorliegenden Arbeit nachgewiesene „Resistenz“ gegenüber ASS in vitro kann eine erhöhte Thrombozytenregeneration oder eine pharmakokinetische Variabilität nicht die Hauptursache sein, da die in vitro Zugabe von ASS sicherstellt, dass die untersuchten Thrombozyten mit ASS in Kontakt kommen. Es ist allerdings nicht auszuschließen, dass diese Faktoren dazu beitragen, dass durch die postoperative orale ASS-Therapie (ohne in vitro Zugabe von ASS) die erwartete Hemmung der Thrombozytenfunktion nicht erreicht werden konnte. Auch Sensitivitätsänderungen von Thrombozyten gegenüber Kollagen oder ADP sind hier als Ursache unwahrscheinlich, da als Stimulus der Thrombozyten-Aggregation ausschließlich Arachidonsäure verwendet wurde. Eine durch die COX-2-Isoform katalysierte Thromboxan-Synthese als Ursache für die hier beobachtete „ASS-Resistenz“ kann ebenfalls ausgeschlossen werden, da der hochselektive COX-2-Inhibitor DFP die Thromboxan-Synthese nicht signifikant reduzierte. In den vorliegenden Untersuchungen trat bei etwa der Hälfte der ACB-OP-Patienten eine ASS-Resistenz in vitro auf. Darüber hinaus zeigten diese als ASS-Nonresponder (Thromboxan-Synthese >10 % in Gegenwart von 100 µM ASS in vitro) eingestuft

Patienten eine verminderte Sensitivität der thrombozytären COX-1 gegenüber anderen COX-Inhibitoren. Hierbei scheint die Isoform-Selektivität weniger bedeutend zu sein als die Substanzklasse. So war bei den Essigsäure-Derivaten (die wie ASS Acetyl-substituiert sind) der Unterschied zwischen ASS-Respondern und ASS-Nonrespondern besonders groß und statistisch signifikant. Bei dem Propionsäure-Derivat Flurbiprofen war der Unterschied geringer ausgeprägt. Bei Naproxen und Piroxicam (letzteres ohne Carboxylgruppe) ließ sich nur ein Trend dahingehend erkennen, dass die IC_{50} -Werte für die Hemmung der Thrombozyten-Aggregation und der Thromboxan-Synthese bei ASS-Nonrespondern gering erhöht sind. Daher ist die „ASS-Resistenz“ bei ASS-Nonrespondern nach ACB-OP am ehesten durch eine strukturelle Veränderung auf Ebene der thrombozytären COX-1 zu erklären, die zu einer beeinträchtigten Interaktion zwischen COX-1 und Inhibitor führt, wobei Acetyl-substituierte Substanzen besonders betroffen sind. Denkbare Veränderungen auf Ebene der COX-1 sind genetische Mutationen oder posttranslationale Modifikationen (wie eine Nitrierung oder Glykierung des Cyclooxygenase-Moleküls), die die Wirkung von COX-Inhibitoren an der thrombozytären COX-1 beeinträchtigen. Arzneimittel-Interaktionen mit anderen COX-Inhibitoren (z.B. Naproxen, Ibuprofen) können zu einer abgeschwächten Wirkung von ASS führen. In der vorliegenden Untersuchung wurde nicht in die Medikation der Patienten während des postoperativen stationären Aufenthaltes eingegriffen, so dass eine Einnahme solcher Medikamente nicht ausgeschlossen werden kann.

4.5 Pharmakologische Alternativen zur Hemmung der Thrombozytenfunktion bei ASS-Nonrespondern

Bei Nachweis einer verminderten Wirksamkeit von ASS könnten andere Substanzen eingesetzt werden, die nicht über eine Hemmung der COX-1 wirken. Da die vorliegenden Untersuchungen für eine beeinträchtigte Interaktion zwischen der COX-1 und COX-Inhibitoren sprechen, wäre an eine Hemmung der Thromboxan-Synthese auf der Ebene der Thromboxan-Synthese zu denken, die der COX-1 bei der thrombozytären Thromboxan-Synthese nachgeschaltet ist. In den Untersuchungen von Zimmermann et al. (2003) konnte in der Tat durch Terbogrel, einem Inhibitor der Thromboxan-Synthase und des Thromboxan-Rezeptors, die thrombozytäre Thromboxan-Synthese vor und

auch nach ACB-OP gehemmt werden. Daneben gibt es Substanzen, die selektiv entweder nur die Thromboxan-Synthase oder nur den Thromboxan-Rezeptor hemmen.

Andere Angriffspunkte zur Hemmung der Thrombozytenfunktion stellen beispielsweise Inhibitoren des ADP-Rezeptors, wie Clopidogrel und Ticlopidin dar. Wie in Abschnitt 1.5 beschrieben zeigte Clopidogrel einen Vorteil gegenüber ASS bezüglich der Reduktion ischämischer Ereignisse bei Patienten mit atherosklerotischer Gefäßerkrankung, wobei Patienten nach ACB-OP besonders profitierten (CAPRIE Steering Committee, 1996; Bhatt et al., 2001). Daher könnte Clopidogrel eine gute Alternative zur Thrombozytenaggregationshemmung bei ASS-Resistenz darstellen, jedoch stehen gezielte Untersuchungen hierzu aus.

5 Zusammenfassung

Ein hoher Anteil der Patienten, die sich einer aortokoronaren Bypass-Operation (ACB-OP) unterziehen, weist in den ersten Tagen nach der Operation eine verminderte Sensitivität der Thrombozyten gegenüber Acetylsalicylsäure (ASS) auf. Der pharmakologische Mechanismus dieser „Resistenz“ ist nicht bekannt.

Die vorliegende Dissertation bearbeitet die Fragestellung, ob KHK-Patienten, bei denen nach ACB-OP eine derartige „Resistenz“ gegenüber ASS besteht, auch eine verminderte Sensitivität der Thrombozyten gegenüber anderen Analgetika/Antiphlogistika (NSAID) aufweisen, die ebenfalls Cyclooxygenasehemmer sind.

Zur Bearbeitung des Themas wurden Blutproben von Patienten der Klinik für Thorax- und Kardiovaskuläre Chirurgie vor und an Tag 5 (± 1 Tag) nach ACB-OP gewonnen und die Hemmung der Thrombozytenfunktion durch ASS im Vergleich zu ausgewählten Substanzen (Indometacin, Diclofenac, Naproxen, Flurbiprofen und Piroxicam) an plättchenreichem Plasma untersucht. Zur Beurteilung der Thrombozytenfunktion wurden die Thrombozyten-Aggregation und die thrombozytäre Thromboxan-Synthese gemessen. Zusätzlich wurde untersucht, ob durch selektive Hemmung der COX-2 die Thrombozytenfunktion ASS-resistenter Patienten inhibiert werden kann, da eine erhöhte COX-2-Aktivität von Thrombozyten als Ursache für ASS-Resistenz diskutiert wird.

Die postoperative Prophylaxe arterieller Thrombosen wurde ab dem ersten Tag nach ACB-OP routinemäßig mit ASS (100 mg/d) durchgeführt. Die Thrombozytenfunktion war postoperativ (Tag 5) trotz dieser ASS-Behandlung nicht inhibiert. Auch durch in vitro Zugabe von ASS in Konzentrationen bis zu 100 μM wurde die Thrombozytenfunktion bei mehr als der Hälfte der Patienten nicht vollständig gehemmt.

Bei diesen ASS-Nonrespondern bestand insgesamt ebenfalls eine verminderte Hemmbarkeit durch die untersuchten NSAID, wobei jedoch Unterschiede bestanden: Bei Indometacin und Diclofenac, beides Acetyl-substituierte Verbindungen, ergab sich ein besonders deutlicher und signifikanter Unterschied zwischen den IC_{50} -Werten von ASS-Nonrespondern und ASS-Respondern. Etwas weniger, aber ebenfalls noch statistisch signifikant, war die Hemmung durch das Propionsäurederivat Flurbiprofen bei den ASS-Nonrespondern vermindert. Demgegenüber ergab sich bei Naproxen und Piroxicam (letzteres ohne Carboxylgruppe) nur ein tendenzieller Unterschied in der Thrombozytenaggregations- und Thromboxansynthesehemmung. Die Möglichkeit, dass die beobachtete „Resistenz“ gegenüber ASS und den vorgenannten Inhibitoren durch eine Hochregulation der ASS-insensitiven, induzierbaren Cyclooxygenase-Isoform COX-2 verursacht wurde, konnte mit einem hochselektiven COX-2 Inhibitor (DFP) sicher ausgeschlossen werden.

Die in dieser Dissertation nachgewiesene, verminderte Hemmbarkeit der thrombozytären Cyclooxygenase (COX-1) durch ASS und andere, reversibel wirkende Inhibitoren, spricht für das Vorliegen einer Veränderung auf der Ebene der thrombozytären COX-1 (z.B. Interaktionen mit anderen Pharmaka, Mutation oder posttranslationale Modifikation), welche die Interaktion zwischen der thrombozytären Cyclooxygenase und den untersuchten Inhibitoren beeinträchtigt.

6 Literatur

Antiplatelet Trialists' Collaboration: Collaborative overview of randomised trials of antiplatelet therapy-I: Prevention of death, myocardial infarction, and stroke by prolonged antiplatelet therapy in various categories of patients. *Br Med J* (1994) 308: 81-106.

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

Anzai N, Kanai Y, Endou H: Organic anion transporter family: current knowledge. *J Pharmacol Sci* (2006) 100: 411-426.

Benedek IH, Joshi AS, Pieniaszek HJ, King SY, 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.

Bhattacharyya DK, Lecomte M, Rieke CJ, Garavito M, Smith WL: Involvement of arginine 120, glutamate 524, and tyrosine 355 in the binding of arachidonate and 2-phenylpropionic acid inhibitors to the cyclooxygenase active site of ovine prostaglandin endoperoxide H synthase-1. *J Biol Chem* (1996) 271: 2179-2184.

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.

Bousova I, Bakala H, Chudacek R, Palicka V, Drsata J: Glycation-induced inactivation of aspartate aminotransferase, effect of uric acid. *Mol Cell Biochem* (2005) 278: 85-92.

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.

Buchanan MR, Schwartz L, Bourassa M, Brister SJ, Peniston CM; BRAT Investigators: Results of the BRAT study - a pilot study investigating the possible significance of ASA on thrombosis in patients undergoing coronary artery bypass surgery. *Can J Cardiol* (2000) 16: 1385-1390.

Butany JW, David TE, Ojha M: Histological and morphometric analyses of early and late aortocoronary vein grafts and distal anastomoses. *Can J Cardiol* (1998) 14: 671-677.

Capone ML, Sciulli MG, Tacconelli S, Grana M, Ricciotti E, Renda G, Di Gregorio P, Merciaro G, Patrignani P: Pharmacodynamic interaction of naproxen with low-dose aspirin in healthy subjects. *J Am Coll Cardiol* (2005) 45: 1295-1301.

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

Catella-Lawson F, Reilly MP, Kapoor SC, Cucchiara AJ, DeMarco S, Tournier B, Vyas SN, FitzGerald GA: Cyclooxygenase inhibitors and the antiplatelet effects of aspirin. *N Engl J Med* (2001) 345: 1809-1817.

Chandrasekharan NV, Dai H, Roos KL, 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.

Chew DP, Bhatt DL, Sapp S, Topol EJ: Increased mortality with oral platelet glycoprotein IIb/IIIa antagonists: a meta-analysis of phase III multicenter randomized trials. *Circulation* (2001) 103: 201-206.

Cipollone F, Ciabattini G, Patrignani P, Pasquale M, Di Gregorio D, Bucciarelli T, Davi G, Cuccurullo F, Patrono C: Oxidant stress and aspirin-insensitive thromboxane biosynthesis in severe unstable angina. *Circulation* (2000) 102: 1007-1013.

Cryer B, Feldmann M: Cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 selectivity of widely used nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Am J Med* (1998) 104: 413-421.

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.

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.

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.

Gawaz MP: Das Blutplättchen: Physiologie, Pathophysiologie, Membranrezeptoren, antithrombozytäre Wirkstoffe und antithrombozytäre Therapie bei koronärer Herzerkrankung. Thieme (1999) pp. 54-79.

Golanski J, Nocun M, Rozalski M, Drygas W, Watala C: An in vitro model for the detection of reduced platelet sensitivity to acetylsalicylic acid. *Blood Coagul Fibrinolysis* (2004) 15: 187-195.

Gow AJ, Farkouh CR, Munson DA, Posencheg MA, Ischiropoulos H: Biological significance of nitric oxide-mediated protein modifications. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* (2004) 287: 262-268.

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, 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.
- Hannan EL, Racz MJ, Walford G, Jones RH, Ryan TJ, Bennett E, Culliford AT, Isom OW, Gold JP, Rose EA: Long-term outcomes of coronary-artery bypass grafting versus stent implantation. *N Engl J Med* (2005) 352: 2174-2183.
- Hechler B, Cattaneo M, Gachet C: The P2 receptors in platelet function. *Semin Thromb Hemost* (2005) 31: 150-161.
- Helgason CM, Tortorice KL, Winkler SR, Penney DW, Schuler JJ, McClelland TJ, Brace LD: Aspirin response and failure in cerebral infarction. *Stroke* (1993) 24: 345-350.
- Hillarp A, Palmqvist B, Lethagen S, Villoutreix BO, Mattiasson I: Mutations within the cyclooxygenase-1 gene in aspirin non-responders with recurrence of stroke. *Thromb Res* (2003) 112: 275-283.
- Hohlfeld Th: Pharmakokinetik von Acetylsalicylsäure in: Acetylsalicylsäure im kardiovaskulären System (Schrör K, Bredin HK Hrsg.), Birkhäuser Verlag, Basel/Switzerland (1996) pp. 12-32.
- Hollopeter G, Jantzen HM, Vincent D, Li G, England L, Ramakrishnan V, Yang RB, Nurden P, Nurden A, Julius D, Conley PB: Identification of the platelet ADP receptor targeted by antithrombotic drugs. *Nature* (2001) 409: 202-207.
- 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.
- Kuliczkowski W, Halawa B, Korolko B, Mazurek W: Aspirin resistance in ischaemic heart disease. *Kardiol Pol* (2005) 62: 14-25.
- Lanza F, Cazenave JP, Beretz A, Sutter-Bay A, Kretz JG, Kiény R: Potentiation by adrenaline of human platelet activation and the inhibition by the alpha-adrenergic antagonist nicergoline of platelet adhesion, secretion and aggregation. *Agents Actions* (1986) 18: 586-595.
- Leblanc Y, Roy P, Boyce S, Brideau C, Chan CC, Charleson S, Gordon R, Grimm E, Guay J, Leger S, Li CS, Riendeau D, Visco D, Wang Z, Webb J, Xu LJ, Prasit P: SAR in the alkoxy lactone series: the discovery of DFP, a potent and orally active COX-2 inhibitor. *Bioorg Med Chem Lett* (1999) 9: 2207-2212.
- Loll PL, 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.

- Macchi L, Christiaens L, Brabant S, Sorel N, Allal J, Mauco G, Brizard A: Resistance to aspirin in vitro is associated with increased platelet sensitivity to adenosine diphosphate. *Thromb Res* (2002) 107: 45-49.
- Mancini JA, Riendeau D, Falgout JP, Vickers PJ, O'Neill GP: Arginine 120 of prostaglandin G/H synthase-1 is required for the inhibition by nonsteroidal anti-inflammatory drugs containing a carboxylic acid moiety. *J Biol Chem* (1995) 270: 29372-29377.
- Maree AO, Curtin RJ, Chubb A, Dolan C, Cox D, O'Brien J, Crean P, Shields DC, Fitzgerald DJ: Cyclooxygenase-1 haplotype modulates platelet response to aspirin. *J Thromb Haemost* (2005) 3: 2340-2345.
- Martin CP, Talbert RL: Aspirin resistance: an evaluation of current evidence and measurement methods. *Pharmacotherapy* (2005) 25: 942-953.
- 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 USA* (1993) 90: 11693-11697.
- Nalivaeva NN, Turner AJ: Post-translational modifications of proteins: acetylcholinesterase as a model system. *Proteomics* (2001) 1: 735-747.
- Pamukcu B, Oflaz H, Acar RD, Umman S, Koylan N, Umman B, Nisanci Y: The role of exercise on platelet aggregation in patients with stable coronary artery disease: exercise induces aspirin resistant platelet activation. *J Thromb Thrombolysis* (2005) 20: 17-22.
- Patrignani P, Sciulli MG, Manarini S, Santini G, Cerletti C, Evangelista V: COX-2 is not involved in thromboxane biosynthesis by activated human platelets. *J Physiol Pharmacol* (1999) 50: 661-667.
- Patrono C, Collier B, Dalen JE, FitzGerald GA, Fuster V, Gent M, Hirsh J, Roth G: Platelet-active drugs: The relationships among dose, effectiveness, and side effects. *Chest* (2001) 119: 39-63.
- 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.
- Reilly IA, FitzGerald GA: Inhibition of thromboxane formation in vivo and ex vivo: implications for therapy with platelet inhibitory drugs. *Blood* (1987) 69: 180-186.
- Ritter CA, Jedlitschky G, Meyer zu Schwabedissen H, Grube M, Kock K, Kroemer HK: Cellular export of drugs and signalling molecules by the ATP-binding cassette transporters MRP4 (ABCC4) and MRP5 (ABCC5). *Drug Metab Rev.* (2005) 37: 253-278.

Rome LH, Lands WE: Structural requirements for time-dependent inhibition of prostaglandin biosynthesis by anti-inflammatory drugs. *Proc Natl Acad Sci USA* (1975) 72: 4863-4865.

Rocca B, Secchiero P, Ciabattoni 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, Majerus PW: The mechanism of the effect of aspirin on human platelets. I. Acetylation of a particulate fraction protein. *J Clin Invest* (1975) 56: 624-632.

Rowlinson SW, Kiefer JR, Prusakiewicz JJ, Pawlitz JL, Kozak KR, Kalgutgar AS, Stallings WC, Kurumbail RG, Marnett LJ: A novel mechanism of cyclooxygenase-2 inhibition involving interactions with Ser-530 and Tyr-385. *J Biol Chem* (2003) 278: 45763-45769.

Saudek CD, Kalyani RR, Derr RL: Assessment of glycemia in diabetes mellitus: hemoglobin A1c. *J Assoc Physicians India* (2005) 53: 299-305.

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.

SoS Investigators: Coronary artery bypass surgery versus percutaneous coronary intervention with stent implantation in patients with multivessel coronary artery disease (the Stent or Surgery trial): a randomised controlled trial. *Lancet* (2002) 360: 965-970.

SYMPHONY-Investigators: Comparison of sibrifiban with aspirin for prevention of cardiovascular events after acute coronary syndromes: a randomised trial. The SYMPHONY Investigators. Sibrifiban v Aspirin to Yield Maximum Protection from Ischemic Heart Events Post-acute Coronary Syndromes. *Lancet* (2000) 355: 337-345.

Tacconelli S, Capone ML, Sciulli MG, Ricciotti E, Patrignani P: The biochemical selectivity of novel COX-2 inhibitors in whole blood assays of COX-isozyme activity. *Curr Med Res Opin* (2002) 18: 503-511.

Tang M, Wolkers WF, Crowe JH, Tablin F: Freeze-dried rehydrated human blood platelets regulate intracellular pH. *Transfusion* (2006) 46: 1029-1037.

Thuresson ED, Lakkides KM, Rieke CJ, Sun Y, Wingerd BA, Micielli R, Mulichak AM, Malkowski MG, Garavito RM, Smith WL: Prostaglandin endoperoxide H synthase-1: the functions of cyclooxygenase active site residues in the binding, positioning, and oxygenation of arachidonic acid. *J Biol Chem* (2001) 276: 10347-10357.

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

Vane SJ: Aspirin and other anti-inflammatory drugs. *Thorax* (2000) 55: 3-9.

Watala C, Golanski J, Pluta J, Boncler M, Rozalski M, Luzak B, Kropiwnicka A, Drzewoski J: Reduced sensitivity of platelets from type 2 diabetic patients to acetylsalicylic acid (aspirin)- its relation to metabolic control. *Thromb Res* (2004) 113: 101-113.

Watala C, Pluta J, Golanski J, Rozalski M, Czyz M, Trojanowski Z, Drzewoski J: Increased protein glycation in diabetes mellitus is associated with decreased aspirin-mediated protein acetylation and reduced sensitivity of blood platelets to aspirin. *J Mol Med* (2005) 83: 148-158.

Weber AA, Zimmermann K, Meyer-Kirchrath J, Schrör K: Cyclooxygenase-2 in human platelets as a possible factor in aspirin resistance. *Lancet* (1999) 353: 900-901.

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

Weber AA, Przytulski B, Schumacher M, Zimmermann N, Gams E, Hohlfeld T, Schrör K: Flow cytometry analysis of platelet cyclooxygenase-2 expression: induction of platelet cyclooxygenase-2 in patients undergoing coronary artery bypass grafting. *Br J Haematol* (2002b) 117: 424-426.

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

Whelan SA, Hart GW: Proteomic approaches to analyze the dynamic relationships between nucleocytoplasmatic protein glycosylation and phosphorylation. *Circ Res* (2003) 93: 1047-1058.

Yilmaz MB, Balbay Y, Caldir V, Ayaz S, Guray Y, Guray U, Korkmaz S: Late saphenous vein graft occlusion in patients with coronary bypass: possible role of aspirin resistance. *Thromb Res* (2005) 115: 25-29.

Yusuf S, Sleight P, Pogue J, Bosch J, Davies R, Dagenais G: Effects of 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.

Zieman S, Kass D: Advanced glycation end product cross-linking: pathophysiologic role and therapeutic target in cardiovascular disease. *Congest Heart Fail* (2004) 10: 144-149.

Zimmermann N, Kienzle P, Weber AA, Winter J, Gams E, Schrör 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.

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.

7 Veröffentlichungen im Zusammenhang mit dieser Arbeit

7.1 Originalarbeit

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.

7.2 Kongressbeitrag

U.-H. Kim, M. Kurt, A.-A. Weber, N. Zimmermann, K. Schrör, T. Hohlfeld:
ASS-Nonresponse nach koronarer Bypasschirurgie: sind auch andere COX-Hemmer betroffen? *Clin Res Cardiol* (2006) 95 (Suppl 5): V1565 (Abstract)

Vortrag auf der 72. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie – Herz- und Kreislaufforschung Mannheim (22.4.2006).

U.-H. Kim, M. Kurt, A.-A. Weber, N. Zimmermann, K. Schrör, T. Hohlfeld:
ASS-Nonresponse nach koronarer Bypasschirurgie: sind auch andere COX-Hemmer betroffen?

Eidesstattliche Erklärung

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

Düsseldorf, im Juni 2007

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Hohlfeld und Herrn Prof. Dr. Schrör für die Bereitstellung des Themas und die Ermöglichung der Durchführung der experimentellen Arbeit im Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie sowie für die Durchsicht der Dissertationsschrift und Unterstützung in allen Phasen meiner Promotion.

Herrn PD Dr. Zimmermann aus der Klinik für Thorax- und Kardiovaskuläre Chirurgie danke ich für die Bereitstellung der Blutproben und seine stets hilfreiche Beratung.

Frau Kirsten Bartkowski und Frau Susanne Hölzer danke ich recht herzlich für die Einweisung am Arbeitsplatz und viele wertvolle Ratschläge im Laboralltag.

Frau Irmhild Rüter danke ich besonders für die Messung der Thromboxanwerte.

Herrn Dr. Hafner danke ich sehr für seine freundliche Hilfestellung bei statistischen Auswertungen und für seine Beratung beim Umgang mit dem Programm PRISM.

Außerdem danke ich meiner Familie und meinen Freunden für ihre Unterstützung.

LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Name: Un-Hie Kim
Geburtsdatum/-ort: 28.06.1979 in Düsseldorf
Familienstand: ledig

Schulbildung

06/1985 – 06/1998 Grundschole und Gymnasium in Düsseldorf
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Hochschulausbildung

10/1998 – 06/2005 Studium der Humanmedizin
an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
30/08/2000 Ärztliche Vorprüfung
28/08/2001 1. Staatsexamen
06/04/2004 2. Staatsexamen
02/06/2005 3. Staatsexamen
24/06/2005 Approbation als Ärztin

Praktisches Jahr am Universitätsklinikum Düsseldorf 26/04/2004 bis 25/03/2005

Erstes Tertial Chirurgie
Prof. Dr. Knoefel, Klinik für Allgemein- u.
Viszeralchirurgie
Zweites Tertial Prof. Dr. Willnow, Klinik für Kinderchirurgie
Innere Medizin
Prof. Dr. Haas, Klinik für Hämatologie und
Onkologie
Prof. Dr. Scherbaum, Klinik für Endokrinologie u.
Diabetologie
Drittes Tertial Radiologie
Prof. Dr. Mödder, Institut für Diagnostische
Radiologie

Berufstätigkeit

11/2005 – 10/2006 Assistenzärztin/ Wissenschaftliche Mitarbeiterin
im Institut für Diagnostische und Interventionelle
Radiologie und Neuroradiologie,
Prof. Dr. Forsting, Universitätsklinikum Essen
Seit 11/2006 Assistenzärztin/ Wissenschaftliche Mitarbeiterin
in der Klinik für Nuklearmedizin,
Prof. Dr. Dr. Bockisch, Universitätsklinikum Essen

Hemmung von Funktion und Thromboxansynthese „ASS-resistenter“ Thrombozyten durch ausgewählte Cyclooxygenase-Inhibitoren

vorgelegt von
Un-Hie Kim

Ein hoher Anteil der Patienten, die sich einer aortokoronaren Bypass-Operation (ACB-OP) unterziehen, weist in den ersten Tagen nach der Operation eine verminderte Sensitivität der Thrombozyten gegenüber Acetylsalicylsäure (ASS) auf. Der pharmakologische Mechanismus dieser „Resistenz“ ist nicht bekannt.

Die vorliegende Dissertation bearbeitet die Fragestellung, ob KHK-Patienten, bei denen nach ACB-OP eine derartige „Resistenz“ gegenüber ASS besteht, auch eine verminderte Sensitivität der Thrombozyten gegenüber anderen Analgetika/Antiphlogistika (NSAID) aufweisen, die ebenfalls Cyclooxygenasehemmer sind.

Zur Bearbeitung des Themas wurden Blutproben von Patienten der Klinik für Thorax- und Kardiovaskuläre Chirurgie vor und an Tag 5 (± 1 Tag) nach ACB-OP gewonnen und die Hemmung der Thrombozytenfunktion durch ASS im Vergleich zu ausgewählten Substanzen (Indometacin, Diclofenac, Naproxen, Flurbiprofen und Piroxicam) an plättchenreichem Plasma untersucht. Zur Beurteilung der Thrombozytenfunktion wurden die Thrombozyten-Aggregation und die thrombozytäre Thromboxan-Synthese gemessen. Zusätzlich wurde untersucht, ob durch selektive Hemmung der COX-2 die Thrombozytenfunktion ASS-resistenter Patienten inhibiert werden kann, da eine erhöhte COX-2-Aktivität von Thrombozyten als Ursache für ASS-Resistenz diskutiert wird.

Die postoperative Prophylaxe arterieller Thrombosen wurde ab dem ersten Tag nach ACB-OP routinemäßig mit ASS (100 mg/d) durchgeführt. Die Thrombozytenfunktion war postoperativ (Tag 5) trotz dieser ASS-Behandlung nicht inhibiert. Auch durch in vitro Zugabe von ASS in Konzentrationen bis zu 100 μ M wurde die Thrombozytenfunktion bei mehr als der Hälfte der Patienten nicht vollständig gehemmt.

Bei diesen ASS-Nonrespondern bestand insgesamt ebenfalls eine verminderte Hemmbarkeit durch die untersuchten NSAID, wobei jedoch Unterschiede bestanden: Bei Indometacin und Diclofenac, beides Acetyl-substituierte Verbindungen, ergab sich ein besonders deutlicher und signifikanter Unterschied zwischen den IC_{50} -Werten von ASS-Nonrespondern und ASS-Respondern. Etwas weniger, aber ebenfalls noch statistisch signifikant, war die Hemmung durch das Propionsäurederivat Flurbiprofen bei den ASS-Nonrespondern vermindert. Demgegenüber ergab sich bei Naproxen und Piroxicam (letzteres ohne Carboxylgruppe) nur ein tendenzieller Unterschied in der Thrombozytenaggregations- und Thromboxansynthesehemmung. Die Möglichkeit, dass die beobachtete „Resistenz“ gegenüber ASS und den vorgenannten Inhibitoren durch eine Hochregulation der ASS-insensitiven, induzierbaren Cyclooxygenase-Isoform COX-2 verursacht wurde, konnte mit einem hochselektiven COX-2 Inhibitor (DFP) sicher ausgeschlossen werden.

Die in dieser Dissertation nachgewiesene, verminderte Hemmbarkeit der thrombozytären Cyclooxygenase (COX-1) durch ASS und andere, reversibel wirkende Inhibitoren, spricht für das Vorliegen einer Veränderung auf der Ebene der thrombozytären COX-1 (z.B. Interaktionen mit anderen Pharmaka, Mutation oder posttranslationale Modifikation), welche die Interaktion zwischen der thrombozytären Cyclooxygenase und den untersuchten Inhibitoren beeinträchtigt.