



Universitätsklinikum
Hamburg-Eppendorf

Department
Chemie



Aus dem Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie
des Zentrums für Experimentelle Medizin des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf,
Arbeitsgruppe für Klinische Pharmakologie

Direktor: Prof. Dr. med. Thomas Eschenhagen

„ASS-Resistenz“ bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften
im Department Chemie der Universität Hamburg

vorgelegt von
Anneke Bierend

Hamburg 2008

1. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Hans-Jürgen Duchstein

2. Gutachter: Prof. Dr. med. Rainer H. Böger

Tag der Disputation: 12. September 2008

meinen lieben Eltern

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung.....	1
1.1.	Rolle der Thrombozyten in der Pathogenese der koronaren Herzerkrankung..	1
1.2.	Die Acetylsalicylsäure (ASS) als Hemmer der Thrombozytenaggregation	2
1.2.1.	Wirkungsmechanismus	2
1.2.2.	Pharmakokinetik.....	4
1.2.3.	Cyclooxygenase (COX)-Selektivität.....	6
1.2.4.	„Selektive“ Hemmung der Thromboxan A ₂ -Bildung	8
1.2.5.	Klinische Pharmakologie der thrombozytären COX-Hemmung	9
1.2.6.	Die optimale Dosierung	10
1.3.	Stellenwert der ASS-Therapie bei Patienten mit erhöhtem kardiovaskulären Risiko.....	12
1.4.	„ASS-Resistenz“	13
1.4.1.	Definition	13
1.4.2.	Die ersten Studien	13
1.4.3.	Häufigkeit.....	14
1.4.4.	Klinische Bedeutung	16
1.4.5.	Typologie nach Weber et al.	17
1.5.	Aktuelle Problematik	19
1.6.	Zielsetzung	20
1.7.	Hypothesen zur Ursache der „ASS-Resistenz“	21
1.7.1.	Beteiligung der COX-2 an der Thromboxan-Synthese	21
1.7.2.	COX-unabhängige Bildung von Isoprostanen	23
1.7.3.	Polymorphismen des ADP-Rezeptors P2Y ₁₂	26
2.	Methoden	29
2.1.	Studienkollektiv	29

2.1.1.	Rekrutierung der Patienten.....	29
2.1.2.	Ein- und Ausschlusskriterien	29
2.1.3.	Patientenbefragung.....	30
2.1.4.	Bestimmung allgemeiner Laborparameter	31
2.2.	Probengewinnung.....	34
2.2.1.	Blutentnahme	34
2.2.2.	Präparation der Urinproben.....	35
2.3.	Bestimmung der Thrombozytenaggregation	35
2.3.1.	Herstellung von plättchenreichem und plättchenarmen Plasma	35
2.3.2.	Aggregationsinduktoren	36
2.3.3.	Durchführung der Aggregationsversuche	37
2.3.4.	Testsubstanzen	38
2.3.5.	Auswertung der Aggregationskurven.....	40
2.4.	Bestimmung der Kollagen-induzierten Thromboxan B₂-Bildung.....	42
2.5.	Bestimmung der ASS-Metabolite im Urin mittels HPLC	44
2.5.1.	Extraktion von Salicylsäure und Salicylursäure.....	44
2.5.2.	HPLC-Analytik von Salicylsäure und Salicylursäure.....	45
2.5.3.	Berechnung der Salicylsäure- und Salicylursäure-Exkretion.....	47
2.6.	Untersuchung der COX-1- und COX-2-Aktivität im Vollblut	47
2.6.1.	In vitro COX-1-Aktivitätsassay	47
2.6.2.	In vitro COX-2-Aktivitätsassay	48
2.7.	Quantifizierung von 2,3-dinor-Thromboxan B₂ und 2,3-dinor-6-keto-Prostaglandin F_{1α} im Urin mittels GC-tandem MS	50
2.8.	Untersuchung der COX-1- und COX-2-Proteinexpression in Thrombozyten....	51
2.8.1.	Gewinnung von Thrombozytenprotein aus plättchenreichem Plasma	51
2.8.1.1.	Reinheitsprüfung des plättchenreichen Plasmas	51
2.8.1.2.	Quantitativer Proteinnachweis	52
2.8.1.3.	Thrombozytenprotein-Standardpräparation	53

2.8.2.	Proteinauftrennung mit Hilfe der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	53
2.8.3.	Proteintransfer durch Western Blotting.....	53
2.8.4.	Immundetektion nach Blotting.....	54
2.8.4.1.	Untersuchungen zur Spezifität der COX-Antikörper.....	55
2.8.5.	Quantifizierung des COX-2-Proteins in Thrombozyten	56
2.9.	Bestimmung der 8-iso-Prostaglandin F_{2α}-Urinexkretion mittels GC-MS.....	59
2.9.1.	8-iso-Prostaglandin F _{2α} -Extraktion mit Hilfe der Immunaффinitätschromatographie	59
2.9.2.	Derivatisierung von 8-iso-Prostaglandin F _{2α}	60
2.9.2.1.	Silanisieren von Glasgefäßen	61
2.9.3.	GC-MS-Analytik des 8-iso-Prostaglandin F _{2α}	61
2.9.4.	Berechnung der 8-iso-Prostaglandin F _{2α} -Exkretion	63
2.10.	P2Y₁₂-Genotypisierung	64
2.10.1.	DNA-Extraktion	64
2.10.2.	Differenzierung der P2Y ₁₂ -Genotypen mittels forced mutation PCR-RFLP-Analyse	64
2.10.2.1.	PCR-Amplifizierung	65
2.10.2.2.	Restriktionsverdau.....	67
2.11.	Statistische Auswertung.....	70
3.	Ergebnisse.....	72
3.1.	Allgemeine Charakterisierung des Studienkollektivs.....	72
3.1.1.	Kardiovaskuläre Risikofaktoren.....	72
3.1.2.	Atherosklerotische Ereignisse, Interventionen und Angina pectoris	73
3.1.3.	Medikation	74
3.1.3.1.	Acetylsalicylsäure (ASS)	74
3.1.3.2.	Weitere Arzneistoffe der Dauermedikation	75
3.1.3.3.	Weitere Cyclooxygenase-hemmende Arzneistoffe.....	76
3.1.3.4.	Antioxidantien.....	77
3.1.4.	Allgemeine Laborparameter.....	77

3.2. Identifizierung „ASS-resistenter“ Patienten	80
3.2.1. Bestimmung einer „ASS-Resistenz“ vom Typ I nach Weber	80
3.2.1.1. Beeinflussung der Kollagen-induzierten Thrombozytenaggregation durch Zusatz von ASS in vitro	81
3.2.1.2. Beeinflussung der Kollagen-induzierten Thromboxan-Bildung durch Zusatz von ASS in vitro	82
3.2.2. Einteilung des Studienkollektivs in ASS-Responder (High- und Medium-Responder) und ASS-Low-Responder	84
3.2.3. Ermittlung einer „ASS-Resistenz“ vom Typ III nach Weber („ASS-Pseudoresistenz“).....	87
3.3. Untersuchungen zur ASS-Metabolit-Exkretion	93
3.4. Wirkung verschiedener Agonisten auf die Thrombozytenaggregation bei Patienten mit und ohne „ASS-Resistenz“	94
3.4.1. Kollagen-induzierte Thrombozytenaggregation	94
3.4.2. Arachidonsäure-induzierte Thrombozytenaggregation.....	96
3.4.3. ADP-induzierte Thrombozytenaggregation	99
3.5. Untersuchungen zur COX-1-Aktivität bei Patienten mit und ohne „ASS Resistenz“	101
3.6. Exkretion des Thromboxan-Metaboliten 2,3-dinor-Thromboxan B₂ und des Prostacyclin-Metaboliten 2,3-dinor-6-keto-Prostaglandin F_{1α} bei „ASS-resistenten“ und „nicht-resistenten“ Patienten	104
3.6.1. 2,3-dinor-Thromboxan B ₂ -Exkretion	104
3.6.2. 2,3-dinor-6-keto-Prostaglandin F _{1α} -Exkretion	107
3.6.3. Zusammenhang zwischen der Thromboxan B ₂ -Metabolit-Exkretion und der Prostacyclin-Metabolit-Exkretion	109
3.7. Bedeutung kardiovaskulärer Risikofaktoren im Zusammenhang mit einer „ASS-Resistenz“	110
3.7.1. „ASS-Resistenz“ und Alter	112
3.7.2. „ASS-Resistenz“ und Hypercholesterinämie	114
3.8. Atherosklerotische Ereignisse und kardiologische Interventionen – eine retrospektive Analyse.....	115

3.8.1.	Retrospektive Analyse für die Patienten, die vor der ASS-Therapie bereits einen Myokardinfarkt erlitten hatten.....	117
3.8.2.	Retrospektive Analyse für die Patienten, die vor der ASS-Therapie keinen Myokardinfarkt erlitten hatten.....	119
3.9.	Untersuchungen zur ASS-Behandlungsdauer bei Patienten mit und ohne „ASS-Resistenz“	120
3.10.	Auswirkungen des Einnahmezeitpunkts der ASS-Dosis	121
3.10.1.	ASS-Einnahmezeitpunkt und Aggregation	121
3.10.2.	ASS-Einnahmezeitpunkt und Thromboxan-Bildung	123
3.10.3.	ASS-Einnahmezeitpunkt und COX-1-Vollblut-Aktivität	124
3.10.4.	ASS-Einnahmezeitpunkt und 2,3-dinor-Thromboxan B ₂ -Exkretion	127
3.10.5.	ASS-Einnahmezeitpunkt und Nachweisbarkeit der ASS-Metabolite Salicylursäure und Salicylsäure.....	128
3.11.	Einnahme des Original-Präparats oder Einnahme eines Generikums – Überprüfung der Thrombozytenaggregation.....	130
3.12.	Untersuchungen zum Einfluss der weiteren Medikation auf die ASS-Response	132
3.12.1.	Gleichzeitige Einnahme von ASS und Ibuprofen – Ursache einer „ASS-Resistenz“ vom Typ I.....	132
3.13.	Allgemeine Laborparameter im Zusammenhang mit einer „ASS-Resistenz“	134
3.14	Impfung und „ASS-Resistenz“.....	139
3.15.	COX-2 als mögliche Ursache einer „ASS-Resistenz“	145
3.15.1.	Untersuchungen zur COX-2 in Thrombozyten	145
3.15.1.1.	COX-2-Expression in Thrombozyten	145
3.15.1.2.	Einfluss eines selektiven COX-2-Inhibitors auf die Thrombozytenaggregation	153
3.15.1.3.	Einfluss eines selektiven COX-2-Inhibitors auf die Kollagen-induzierte Thromboxan-Bildung.....	156
3.15.2.	Untersuchungen zur COX-2 im Vollblut	159

3.15.2.1.	Untersuchungen zur COX-2-vermittelten Thromboxan-Synthese.....	159
3.15.2.2.	Ergebnisse des COX-2-Vollblut-Aktivitätsassays	161
3.16.	COX-unabhängige Bildung von Isoprostanen als mögliche Ursache einer „ASS-Resistenz“	163
3.17.	Polymorphismen des ADP-Rezeptors P2Y₁₂ als mögliche Ursache einer „ASS-Resistenz“	172
3.18.	Versuche zur Überwindung einer „ASS-Resistenz“ (Fallbeispiele)	176
3.18.1.	Therapie mit 300 mg ASS	176
3.18.2.	Therapie mit 75 mg Clopidogrel	177
3.18.3.	Kombinationstherapie aus 100 mg ASS und 75 mg Clopidogrel	177
3.18.3.1.	Isoprostan-Exkretion unter der Kombinationstherapie	179
4.	Diskussion	180
4.1.	Methodik der „ASS-Resistenz“-Bestimmung	180
4.2.	„ASS-Resistenz“ vom Typ I	184
4.2.1.	Mangelnde Compliance.....	185
4.2.2.	Pharmakodynamische Interaktionen	186
4.2.3.	Pharmakokinetische Ursachen	187
4.2.3.1.	Pharmakokinetische Interaktionen	188
4.2.3.2.	Magensaftresistente ASS-Formulierungen	189
4.2.4.	Sonstige mögliche Ursachen einer „Typ I-Resistenz“	191
4.3.	„ASS-Resistenz“ vom Typ II	192
4.3.1.	Ein selten auftretendes Phänomen bei stabilen KHK-Patienten	192
4.3.2.	COX-2-Expression in Thrombozyten	193
4.3.3.	Sonstige mögliche Ursachen einer „Typ II-Resistenz“	195
4.4.	„ASS-Resistenz“ vom Typ III	197
4.4.1.	Charakterisierung der Patienten mit „Typ III-Resistenz“	198
4.4.1.1.	Assoziation mit dem Alter und einer Hypercholesterinämie	199
4.4.1.2.	Assoziation mit Entzündungsparametern, oxidativem Stress und Impfung	200

4.4.1.3.	Weitere Risikofaktoren im Zusammenhang mit einer „Typ III-Resistenz“	204
4.4.2.	Klinische Bedeutung einer „Typ III-Resistenz“	207
4.4.3.	Die ASS-Wirkung in Abhängigkeit von der Behandlungsdauer	209
4.4.4.	Potentielle Mechanismen der „ASS-Resistenz“ vom Typ III	211
4.4.4.1.	Extrathrombozytäre Mechanismen	211
4.4.4.2.	Hypersensitivität gegenüber Kollagen	213
4.4.4.3.	Hypersensitivität gegenüber ADP	214
4.4.4.4.	Verstärkte Arachidonsäure-induzierte Aggregation trotz COX-Hemmung	216
4.4.4.5.	C-reaktives Protein – ein Verstärker der Thrombozytenaggregation?	217
4.4.4.6.	Umwandlung von Arachidonsäure zu Hydroxyeicosatetraensäuren (HETE-Verbindungen)	218
4.4.4.7.	Vermehrte Entstehung von Isoprostanen	220
4.4.4.8.	Genetische Ursachen	225
4.4.5.	Therapeutische Möglichkeiten zur Überwindung einer „ASS-Resistenz“ vom Typ III	228
4.5.	Schlussfolgerungen	233
5.	Zusammenfassung – Summary	235
6.	Abkürzungen	239
7.	Literatur	244
8.	Material	280
8.1.	Substanzen	280
8.2.	Gase	282
8.3.	Kits	282
8.4.	Chemikalien mit R- und S-Sätzen	282
8.5.	Lösungen und Puffer	283
8.6.	Gele	286
8.7.	Verbrauchsmaterialien	287

8.8. Laborgeräte.....	288
9. Lebenslauf.....	290
10. Publikationen	291
11. Erklärung	293
12. Danksagung	294

1. Einleitung

Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems sind mit Abstand die häufigste Todesursache in den westlichen Industrienationen. Dabei führen die koronare Herzerkrankung (KHK) und ihre Manifestationen die Todesstatistik an. Im Jahr 2006 verstarben in Deutschland 144.189 Personen (17,6% aller registrierten Todesfälle) an einer KHK, darunter erlag fast jeder zweite einem akuten oder rezidivierenden Myokardinfarkt (Statistisches Bundesamt Deutschland).

1.1. Rolle der Thrombozyten in der Pathogenese der koronaren Herz-erkrankung

Hauptursache der KHK ist die Atherosklerose der Koronargefäße. Die Atherosklerose ist eine chronische Gefäßerkrankung, die nach der „Response-to-injury“-Hypothese durch eine Schädigung des Gefäßendothels entsteht (Ross 1999). Die Schädigung kann mechanischer Art sein (z.B. durch Ballonangioplastie) oder durch biochemische Faktoren (Nikotin, LDL-Cholesterin, Homocystein, etc.) hervorgerufen werden (Böger et al. 1997). Ein dysfunktionales Endothel reagiert mit einer Reduktion der Bildung bzw. biologischen Wirkung vasodilatierender endothelialer Mediatorsubstanzen wie Prostacyclin und Stickstoffmonoxid (Böger et al. 1997). Die Folgen einer reduzierten biologischen Aktivität sind zum einen eine gesteigerte Leukozytenadhäsion an das Endothel und Migration von Leukozyten in die Gefäßwand, zum anderen eine Abnahme der thrombozytenadhäsions- und aggregationshemmenden Eigenschaften des Endothels. In der Folge lagern sich Thrombozyten an die Gefäßinnenwand an, wodurch der komplexe thrombozytäre Aktivierungsvorgang in Gang gesetzt wird (Gawaz 2001) und sich die glatten, scheibenförmigen Thrombozyten in kugelige Gebilde mit langen Fortsätzen (Pseudopodien) umwandeln. Während der Phase der Aktivierung kommt es in den Thrombozyten zur Sekretion zahlreicher Granula-Inhaltsstoffe (z.B. Ca^{2+} , ADP, Serotonin) sowie u.a. zur Synthese von Thromboxan A_2 . Diese Substanzen verstärken zum einen autokrin den Aktivierungsvorgang, zum anderen rekrutieren sie durch Stimulation noch ruhender Thrombozyten (parakrin) diese aus der Zirkulation und regen diese zur Aggregation mit schon adhärennten Thrombozyten an. Die resultierende Verengung der Koronargefäße wird weiterhin durch die vasokonstriktischen Eigenschaften der sezernierten Thrombozyteninhaltsstoffe verstärkt. Die Folge ist ein verlangsamter Blutstrom, der die Bildung von Thromben begünstigt. Darüberhinaus geben aktivierte Thrombozyten eine Vielzahl weiterer

Verbindungen in ihre Umgebung ab (Wachstumsfaktoren, proinflammatorische Faktoren, Koagulationsfaktoren, hydrolytische Enzyme), die entscheidend an der Entstehung atherosklerotischer Plaques beteiligt sind (Ruggeri 2002, Gawaz et al. 2005). Durch eine Plaqueruptur kommt es zu einer raschen Anlagerung, Aktivierung und Aggregation zahlreicher Thrombozyten. Die Thrombozyten üben ihre Funktion wie bei der Blutstillung einer ganz „normalen“ Wunde aus, nur dass in den Koronargefäßen keine Notwendigkeit zur Blutstillung besteht. Durch Aktivierung des Gerinnungssystems bildet sich ein Thrombus, der einen partiellen (instabile Angina pectoris) oder kompletten Koronarverschluss (Myokardinfarkt) zur Folge haben kann.

Damit eine bestehende KHK nach Möglichkeit nicht diesen Verlauf nimmt, ist eine effektive antithrombozytäre Sekundärprophylaxe unerlässlich. In zahlreichen klinischen Studien konnte belegt werden, dass die Rate koronarthrombotischer Ereignisse unter einer Therapie mit dem Thrombozytenaggregationshemmer Acetylsalicylsäure (ASS) deutlich gesenkt werden kann (siehe Abschnitt 1.3.). Aus diesem Grund gilt ASS heute als „Goldstandard“ in der Sekundärprophylaxe der KHK. Allerdings scheint ASS bei bestimmten Patienten nicht ausreichend antithrombozytär wirksam zu sein (siehe Abschnitt 1.4.).

1.2. Die Acetylsalicylsäure (ASS) als Hemmer der Thrombozytenaggregation

1.2.1. Wirkungsmechanismus

ASS hemmt die Biosynthese der Prostaglandine (Vane 1971). Ausgangsverbindung der Prostaglandin (PG)-Biosynthese ist die Arachidonsäure (AA), die zunächst aus Zellmembran-Phospholipiden freigesetzt werden muss. Dies geschieht durch die Phospholipase A₂ (PLA₂), die z.B. durch Ca²⁺ aktiviert wird (Leslie 2004). Die freie Arachidonsäure wird mit Hilfe der Cyclooxygenase (COX)-Aktivität der Prostaglandin-Endoperoxid-Synthase in das cyclische Endoperoxid Prostaglandin G₂ (PGG₂) überführt. Die PG-Endoperoxid-Synthase besitzt eine zweite Aktivität, mit dessen Hilfe sie PGG₂ zum entsprechenden Alkohol Prostaglandin H₂ (PGH₂) reduziert (Marnett et al. 1999). PGH₂ wird durch gewebespezifische Isomerasen (Thromboxan A₂-Synthase, Prostacyclin-Synthase, etc.) zu den verschiedenen Prostaglandinen umgewandelt, so z.B. zu Thromboxan A₂ (TxA₂) und Prostacyclin (Prostaglandin I₂, PGI₂), die über Aktivierung spezifischer Zellmembran-Rezeptoren (Thromboxan-Rezeptor,

Prostacyclin-Rezeptor, etc.) ihre unterschiedlichen biologischen Wirkungen entfalten (Hamberg et al. 1975, Moncada und Vane 1979), siehe auch Abb. 1.

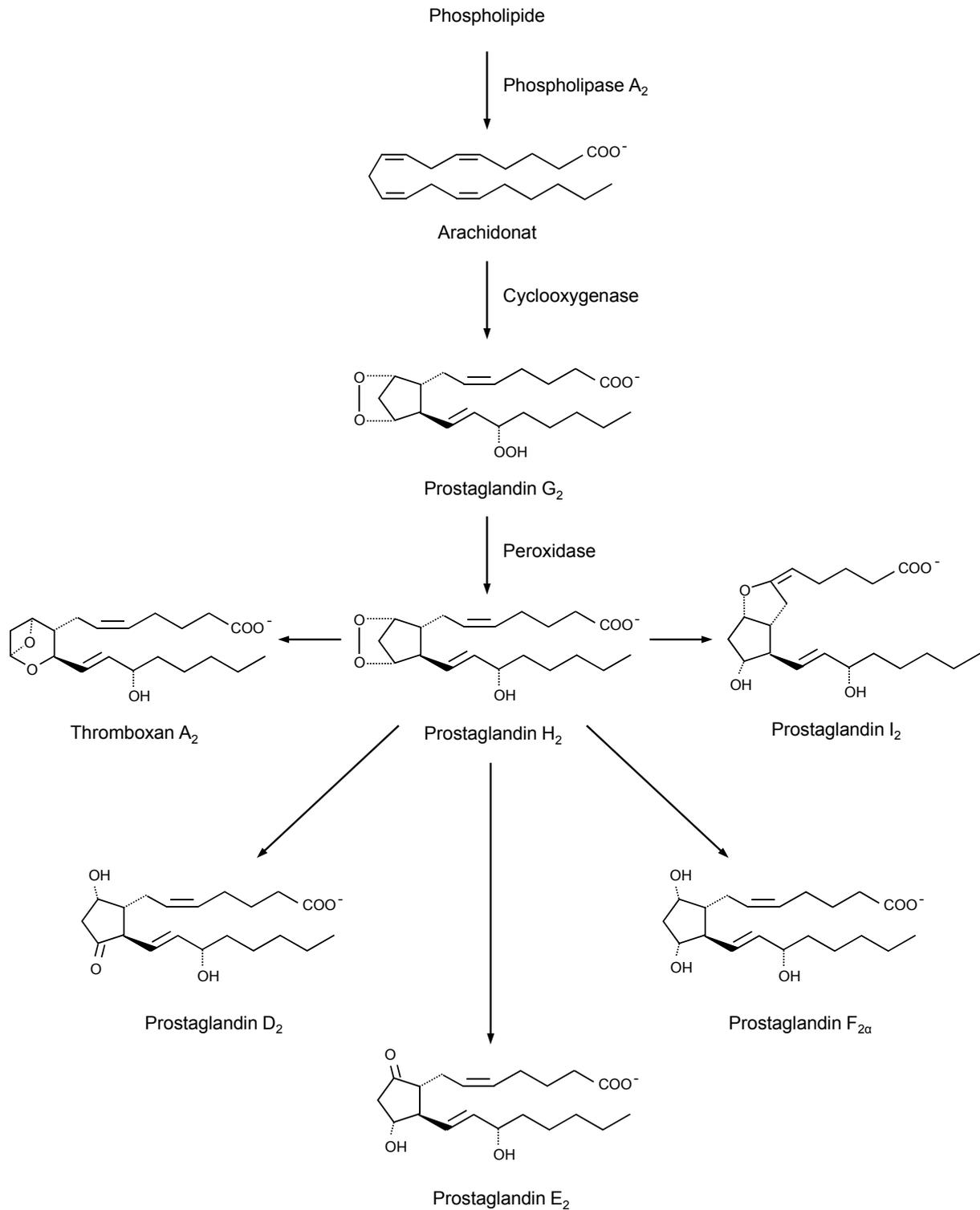


Abb. 1: Biosynthese der Prostaglandine

ASS blockiert die COX-Aktivität der PG-Endoperoxid-Synthase (Smith und Lands 1971), in der Regel wird vereinfacht von einer Hemmung der COX gesprochen. Die Peroxidase-Aktivität bleibt durch ASS unbeeinflusst (Van Der Ouderaa et al. 1980, Mizuno et al. 1982).

Die COX tritt als membranassoziertes Dimer auf und zeichnet sich durch einen langen engen hydrophoben Kanal aus, in welchen das Substrat, die Arachidonsäure, aufgenommen werden kann. Auf der linken Seite der Abb. 2 ist dargestellt, wie Arachidonsäure unter physiologischen Bedingungen mit dem katalytischen Zentrum der COX in Kontakt treten kann. Die rechte Seite in Abb. 2 zeigt, wie durch Übertragung der Acetylgruppe von ASS auf den Serin-Rest in Position 529 (Roth und Majerus 1975) der Zugang zum katalytischen Zentrum für die Arachidonsäure versperrt wird (DeWitt et al. 1990, Loll et al. 1995).

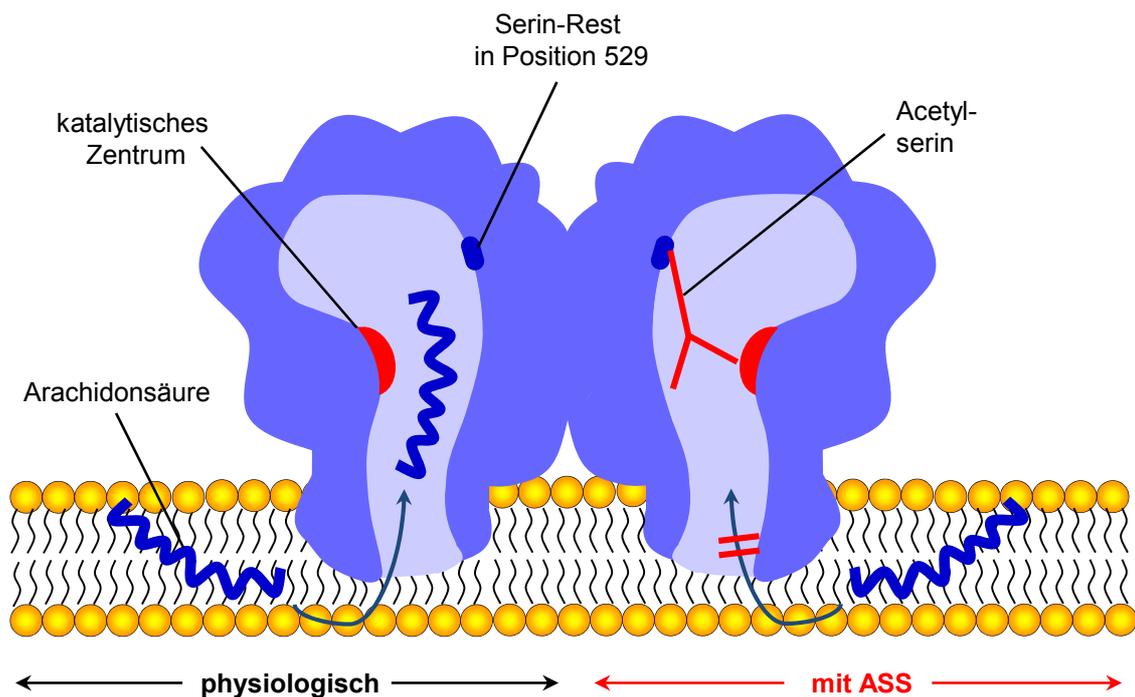


Abb. 2: Hemmung der Cyclooxygenase (COX) durch ASS

1.2.2. Pharmakokinetik

Eine oral verabreichte ASS-Dosis gelangt nach Resorption im Magen bzw. überwiegend im oberen Dünndarm zu ca. 80% in den Portalkreislauf. ASS unterliegt einer ausgeprägten präsystemischen Metabolisierung, so dass der systemische Kreislauf nur noch von weniger als 50% der ursprünglichen ASS-Dosis erreicht wird (siehe Abb. 3). Bereits beim Durchtritt durch die Mukosa, im Blut und in der Leber findet eine Abspaltung der Acetylgruppe durch Esterasen statt, wodurch Salicylsäure als primärer Metabolit entsteht (Pedersen und FitzGerald 1984). Im Plasma besitzt ASS eine Halbwertszeit von lediglich 15 bis 20 Minuten. Die Biotransformation der Salicylsäure erfolgt in der Leber: Durch Konjugation mit Glycin

entsteht die Salicylsäure, durch Konjugation mit Glucuronsäure das Ether- und Esterglucuronid, und durch Oxidation wird die Gentsinsäure gebildet (siehe Abb. 4). Alle Metabolite werden überwiegend renal ausgeschieden.

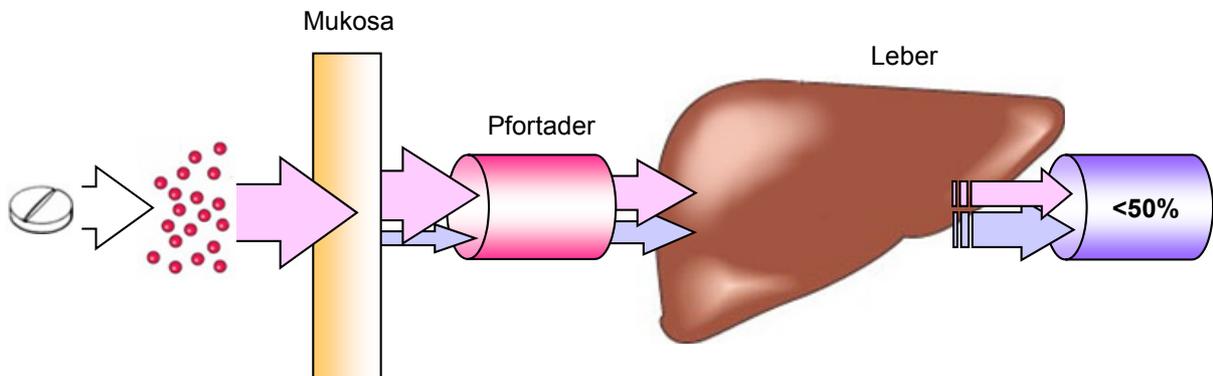


Abb. 3: ASS auf dem Weg in den systemischen Blutkreislauf. Die rosa markierten Pfeile stellen entsprechend ihrer abnehmenden Breite die während der Passage des präsystemischen Kreislaufs sinkende ASS-Konzentration dar, die blau markierten Pfeile symbolisieren die Zunahme der Metabolit-Konzentration. Aufgrund der hohen präsystemischen Metabolisierungsrate besitzt ASS eine geringe systemische Bioverfügbarkeit von unter 50% (Pedersen und FitzGerald 1984).

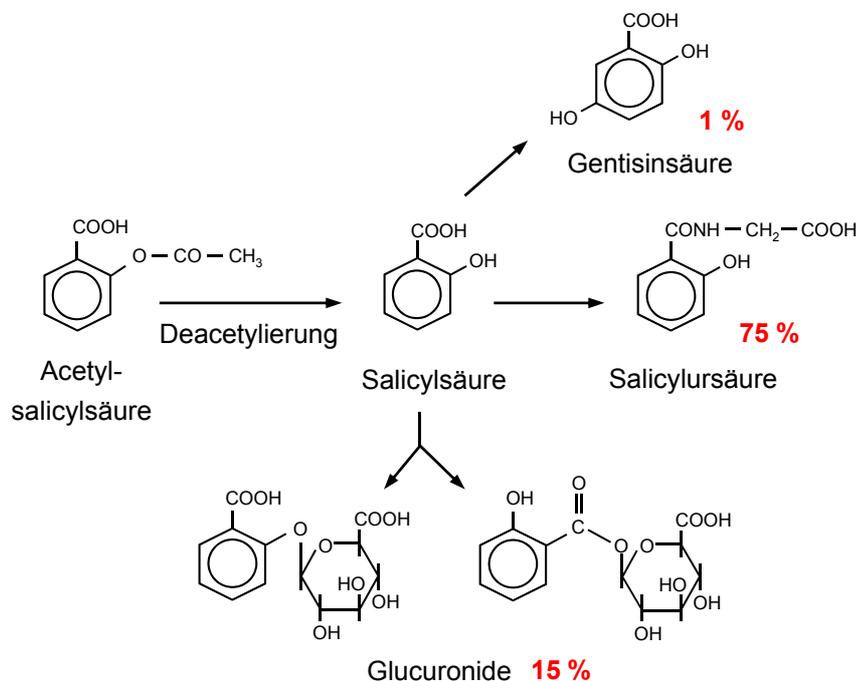


Abb. 4: ASS-Metabolismus. Die angegebenen Prozentzahlen beziehen sich auf einen pH des Urins < 6. Der Rest wird im Wesentlichen als Salicylsäure ausgeschieden, wobei der Anteil renal eliminiertes Salicylsäure stark pH-abhängig ist. Er schwankt zwischen 5% im sauren und 85% im alkalischen Urin.

1.2.3. Cyclooxygenase (COX)-Selektivität

Anfang der 90er Jahre wurden zwei Isoformen der Cyclooxygenase identifiziert, die COX-1 und die COX-2 (Fu et al. 1990, Masferrer et al. 1990, Kujubu et al. 1991, O'Banion et al. 1991, Xie et al. 1991, Sirois und Richards 1992). Strukturanalysen ergaben, dass die beiden Isoformen eine Homologie von ca. 60% in ihrer Aminosäuresequenz aufweisen. Die von unterschiedlichen Genen kodierten Isoenzyme unterscheiden sich erheblich hinsichtlich Gewebeverteilung und Expressionsregulation. Die COX-1 bewirkt als konstitutiv exprimiertes Enzym die physiologische Synthese von Prostaglandinen, z.B. im Magen, in den Thrombozyten oder in der Niere. Die COX-2 ist dagegen durch verschiedene Faktoren (z.B. Zytokine oder Wachstumsfaktoren) schnell induzierbar und wird im Rahmen von Entzündungs- und Schmerzprozessen sowie anderen Gewebeschädigungen verstärkt exprimiert (Smith et al. 1996). Allerdings gibt es auch eine konstitutive Expression der COX-2, z.B. im ZNS (Yamagata et al. 1993) oder in der Niere (Harris et al. 1994). Auch in Gefäßendothelzellen existiert neben einer COX-1-Expression eine COX-2-Expression, die erheblich von der physiologischen Hämodynamik beeinflusst wird (Topper et al. 1996).

ASS hemmt beide Isoformen. Während die COX-1, wie in Abb. 2 dargestellt, am Serin-Rest 529 acetyliert wird, erfolgt die Acetylierung der COX-2 am Serin-Rest in Position 516 (Lecomte et al. 1994, Mancini et al. 1994).

Mit der Frage zur COX-1-/COX-2-Selektivität von ASS haben sich in der Vergangenheit zahlreiche Arbeitsgruppen beschäftigt. Bei der Beurteilung der Selektivität ergibt sich jedoch das Problem, dass je nach Testsystem (isoliertes Enzym, Zellhomogenate, Zelllinien, isolierte Zellen) und Versuchsbedingungen (Inkubationszeit, eingesetzte Stimuli) ganz erheblich voneinander abweichende Zahlenwerte in der Literatur zu finden sind. So haben zum Beispiel Untersuchungen von Mitchell et al. ergeben, dass ASS die COX-1 im Vergleich zur COX-2 wesentlich stärker hemmt: Zur Hemmung der COX-2 mussten ca. 150-fach höhere ASS-Konzentrationen eingesetzt werden als zur Hemmung der COX-1 (IC_{50} (COX-1) = 1,66 μ M; IC_{50} (COX-2) = 278 μ M; Mitchell et al. 1994). Diese Experimente wurden mit Endothelzellen aus der Rinder-Aorta bzw. mit einer Mäuse-Makrophagen-Zelllinie durchgeführt. Zum Vergleich zeigt Tab. 1 die IC_{50} -Werte für einige NSAIDs, die verschiedene Arbeitsgruppen in einem humanen Vollblut-Assay ermittelt haben. Hier wird deutlich, dass ASS im Vergleich zu den anderen COX-Inhibitoren auch in humanen Blutzellen die COX-1 in einem stärkeren Ausmaß hemmt als die COX-2. Allerdings erreicht hier der Quotient $\{IC_{50}$ (COX-2) /

IC_{50} (COX-1)} lediglich Werte zwischen 3 und 4. Es kann von einer präferentiellen Hemmung der COX-1 gesprochen werden.

COX-Hemmer	IC_{50} [μ mol/l]		IC_{50} (COX-2)	Referenz
	COX-1	COX-2	IC_{50} (COX-1)	
ASS	1,7	7,5	4,41	Warner et al. 1999
	4,45	13,88	3,12	Cryer und Feldmann 1998
Indometazin	0,013	0,13	10,0	Warner et al. 1999
	0,19	0,44	2,32	Chan et al. 1999
	0,21	0,37	1,76	Cryer und Feldmann 1998
	0,53	0,28	0,53	Patrignani et al. 1997
Naproxen	9,3	35	3,76	Warner et al. 1999
	15,6	28	1,80	Patrignani et al. 1997
	32,01	28,19	0,88	Cryer und Feldmann 1998
Ibuprofen	7,6	20	2,63	Warner et al. 1999
	9,2	18,3	1,99	Patrignani et al. 1997
	5,90	9,90	1,68	Cryer und Feldmann 1998
Piroxicam	2,68	2,11	0,79	Cryer und Feldmann 1998
	2,9	0,93	0,32	Patrignani et al. 1997
	2,4	0,17	0,07	Warner et al. 1999
Diclofenac	0,15	0,05	0,33	Chan et al. 1999
	0,075	0,020	0,27	Warner et al. 1999
	0,34	0,018	0,05	Patrignani et al. 1997
	0,26	0,01	0,04	Cryer und Feldmann 1998
Meloxicam	1,4	0,70	0,50	Chan et al. 1999
	4,8	0,43	0,09	Patrignani et al. 1997
	5,93	0,33	0,06	Patrono 2001
	5,7	0,23	0,04	Warner et al. 1999
Celecoxib	1,2	0,34	0,28	Warner et al. 1999
	6,3	0,96	0,15	Chan et al. 1999
	16	0,54	0,03	Patrono 2001
Rofecoxib (a.H.)	18,8	0,53	0,03	Chan et al. 1999
	63	0,31	0,005	Warner et al. 1999
	73	0,2	0,003	Patrono 2001

Tab. 1: IC_{50} -Werte einiger COX-Inhibitoren, bestimmt im humanen Vollblut-Assay. Nimmt der Quotient $\{IC_{50} (COX-2) / IC_{50} (COX-1)\}$ einen Wert an, der größer als 1 ist, so hemmt die Substanz präferentiell die COX-1. Ein Verhältnis kleiner 1 kennzeichnet eine Substanz, die eine vergleichsweise stärkere COX-2-Hemmung hervorruft.

1.2.4. „Selektive“ Hemmung der Thromboxan A₂-Bildung

Während das Endoperoxid PGH₂ in aktivierten Thrombozyten hauptsächlich in TxA₂ umgewandelt wird, welches zum einen die Thrombozytenaggregation fördert (Hamberg et al. 1975, FitzGerald 1991) und zum anderen vasokonstriktorisch wirkt (Moncada und Vane 1979), entsteht in den Zellen des Gefäßendothels hauptsächlich Prostacyclin, welches entgegengesetzte Eigenschaften besitzt – thrombozytenaggregationshemmende und vasodilatierende (Moncada und Vane 1979). Demnach führt die Unterbindung der PG-Biosynthese durch ASS sowohl zur Hemmung pro- als auch antiaggregatorischer Mechanismen (sog. „ASS-Dilemma“).

In niedriger Dosierung (z.B. 100 mg pro Tag) bewirkt ASS dennoch eine relativ „selektive Hemmung“ der TxA₂-Bildung in den Thrombozyten, ohne die erwünschte endotheliale Prostacyclin-Synthese wesentlich zu beeinträchtigen (Patrignani et al. 1982, Pedersen und FitzGerald 1984, Clarke et al. 1991, Tohgi et al. 1992). Dies beruht zum einen darauf, dass Thrombozyten aufgrund des fehlenden Zellkerns nicht zur Proteinbiosynthese befähigt sind und somit nach einer durch ASS hervorgerufenen irreversiblen Hemmung der COX nicht in der Lage sind, neue COX zu synthetisieren. Das bedeutet, dass die TxA₂-Synthese für die gesamte Lebensdauer des Thrombozyten, d.h. für ca. 10 Tage (Dale 1997), blockiert bleibt. Hingegen können die kernhaltigen Endothelzellen die durch ASS gehemmte COX innerhalb weniger Stunden durch Neusynthese ersetzen und somit ihre Prostacyclin-Synthese nach kurzer Unterbrechung fortführen (Jaffe und Weksler 1979, Patrono et al. 1985, Vesterqvist 1986).

Darüberhinaus ist die „Selektivität der Hemmung“ der TxA₂-Bildung auch in der Pharmakokinetik niedriger ASS-Dosen begründet. Die stark ausgeprägte präsystemische Metabolisierung von ASS (siehe Abschnitt 1.2.2.) hat zur Folge, dass die Thrombozyten während der Passage des Portalkreislaufs wesentlich höheren ASS-Konzentrationen ausgesetzt sind als die Endothelzellen des systemischen Kreislaufs (Pedersen und FitzGerald 1984). Die thrombozytäre COX wird somit bereits im Pfortaderblut irreversibel gehemmt, der inhibitorische Effekt auf die endotheliale COX fällt hingegen sehr viel schwächer aus.

Hinzu kommt, dass die vaskuläre Prostacyclin-Synthese zu einem großen Teil COX-2-vermittelt abläuft (Cullen et al. 1998, McAdam et al. 1999, Belton et al. 2000). Die thrombozytäre TxA₂-Synthese wird im Wesentlichen der COX-1 zugeschrieben (vgl. Abschnitt 1.7.1.). Da die COX-1 empfindlicher auf ASS reagiert als die COX-2 (Cipollone et

al. 1997, siehe auch Abschnitt 1.2.3.), könnte dies eine zusätzliche Erklärung sein, weshalb niedrig dosiertes ASS eine stärkere Hemmwirkung auf die TxA_2 -Bildung und Thrombozytenaggregation ausübt als auf die aggregationshemmende Prostacyclin-Synthese (Schrör und Hohlfeld 2005).

1.2.5. Klinische Pharmakologie der thrombozytären COX-Hemmung

Die maximale Kapazität, mit der Thrombozyten TxA_2 bzw. TxB_2 (TxB_2 ist das stabilere und somit messbare Abbauprodukt von TxA_2 , siehe auch Abschnitt 2.4. sowie Abb. 21) synthetisieren können (siehe Abb. 5, linke Graphik), ist mehrere Tausend Mal so hoch wie die basale TxA_2 -Syntheserate in Gesunden (Patrono et al. 1986). Daher ist die Beziehung zwischen der Hemmung der thrombozytären COX-Aktivität und der Thromboxan-Synthese in vivo, welche anhand der Urinexkretion des Tx-Metaboliten 2,3-dinor- TxB_2 bestimmt wird (siehe auch Abschnitt 2.7. Abb. 29), nicht-linear (Abb. 5, rechte Graphik). Aus Abb. 5 ist ersichtlich, dass eine COX-Hemmung in Thrombozyten erst dann eine funktionelle Relevanz erlangt, wenn die maximale Kapazität, Thromboxan zu synthetisieren, um mindestens 95% reduziert wird (Reilly und FitzGerald 1987).

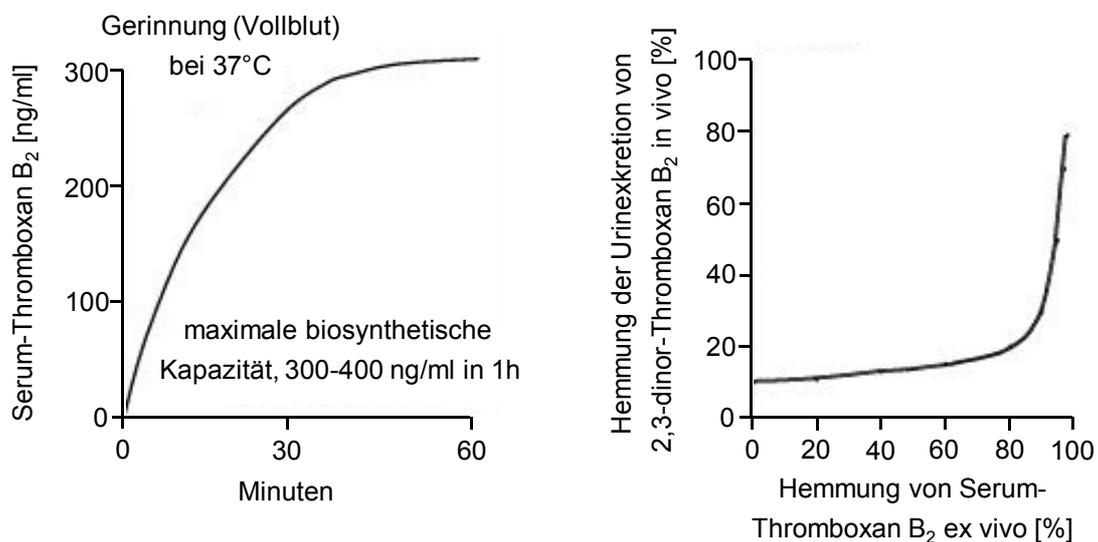


Abb. 5: Thromboxan B_2 -Bildung ex vivo (linke Seite): Dargestellt ist die durch endogenes Thrombin induzierte Thromboxan B_2 -Synthese in Vollblut während einer einstündigen Gerinnung bei 37°C (Patrono et al. 1980). Vergleich der pharmakologischen Hemmung ex vivo und in vivo (rechte Seite): Zwischen der Hemmung der Thromboxan B_2 -Synthese ex vivo, welche ein Maß für die Hemmung der thrombozytären COX-Aktivität darstellt, und der Thromboxan B_2 -Biosynthese in vivo besteht eine nicht-lineare Beziehung (Reilly und FitzGerald 1987).

1.2.6. Die optimale Dosierung

Durch eine einmalige Gabe einer niedrigen ASS-Dosis werden längst nicht alle Thrombozyten des Blutkreislaufs erreicht. Hinzu kommt, dass täglich 10% des gesamten Thrombozyten-Pools durch neue Thrombozyten aus dem Knochenmark ersetzt werden (O'Brien 1968, Cerskus et al. 1980); das sind bei einem Erwachsenen etwa 240 Milliarden neu gebildete Thrombozyten pro Tag. Um die angestrebte mindestens 95%ige Hemmung der TxA_2 -Synthese zu erreichen, ist die wiederholte tägliche Gabe niedriger ASS-Dosen erforderlich. Diese bewirkt über einen kumulativen Prozess eine fraktionelle Acetylierung der jeweils noch unacetylierten thrombozytären COX (Patrono et al. 1985, Küster und Frölich 1986). Bei gesunden Probanden konnte z.B. gezeigt werden, dass nach einer Woche eine komplette Suppression der TxA_2 -Bildung zu beobachten war, wenn täglich nur 30 mg ASS eingenommen wurden (Patrignani et al. 1982). Somit wird die minimale effektive Dosis, um einen kompletten pharmakodynamischen Effekt zu erzielen, mit 30 mg ASS pro Tag angegeben (Patrono et al. 2005).

Allerdings ließ sich nicht in allen Studien eine ausreichende Unterdrückung der TxA_2 -Synthese durch niedrige ASS-Dosen nachweisen. So zeigte z.B. eine Studie von Bode-Böger et al., dass nach einer einwöchigen Behandlung gesunder Probanden mit täglich 40 mg ASS lediglich eine Hemmung der TxA_2 -Synthese von 55% resultierte, einhergehend mit einer unbefriedigenden Hemmung der Kollagen-induzierten Thrombozytenaggregation von nur 24%. Hingegen konnte bei denjenigen Probanden, die mit 100 mg ASS pro Tag behandelt wurden, eine Reduktion der Kollagen-induzierten Aggregation um 69% beobachtet werden sowie eine Unterdrückung der TxA_2 -Bildung um 90%. Hinsichtlich der Hemmung der renalen Exkretion von 2,3-dinor- TxB_2 war die Behandlung mit 100 mg ASS pro Tag der Behandlung mit 40 mg pro Tag deutlich überlegen (Bode-Böger et al. 1998). Studien wie diese belegen, dass in Bezug auf die Wirkung niedriger ASS-Dosen starke interindividuelle Unterschiede bestehen. Hinzu kommt, dass bei Patienten mit Atherosklerose eine Hyperaktivität der zirkulierenden Thrombozyten vorliegt, so dass die minimale effektive ASS-Dosis, die an gesunden Probanden ermittelt wurde, nicht unmittelbar für gefäßkranke Patienten übernommen werden kann (Knapp et al. 1988). In mehreren klinischen Studien mit vaskulären Hochrisiko-Patienten konnte ASS in einer minimalen effektiven täglichen Dosis von 75 mg das Risiko atherothrombotischer Ereignisse signifikant reduzieren (RISC-Group 1990, SALT Collaborative Group 1991, Juul-Möller et al. 1992).

Darüberhinaus gibt es zahlreiche klinische Studien, die überprüft haben, ob höhere ASS-Dosierungen auch eine höhere antithrombotische Wirksamkeit zur Folge haben. Als Beispiel seien Studien genannt, die die Effektivität einer ASS-Behandlung nach aortokoronarer Bypass-Operation untersucht haben: Die Reokklusionsrate wurde in jeder dieser Studien in ähnlichem Ausmaß reduziert, unabhängig davon, ob täglich 100 mg (Lorenz et al. 1984), 325 mg (Goldman et al. 1988), 975 mg (Goldman et al. 1988) oder 1.200 mg ASS (Brown et al. 1985) eingenommen wurden. Die Schlussfolgerung dieser und vieler weiterer Studien ist, dass höhere ASS-Dosierungen nicht effektiver sind als niedrige (75 – 100 mg/Tag). Im Gegenteil, es gibt Hinweise, dass es unter höheren Dosierungen aufgrund der zunehmenden Hemmung der vaskulären Prostacyclin-Synthese zu einer Abschwächung des anti-thrombotischen Effekts kommt (Taylor et al. 1999, Antithrombotic Trialists' Collaboration 2002).

Außerdem steigt mit zunehmender Dosis die Nebenwirkungsrate erheblich an. So verursachen z.B. Dosierungen von 300 mg ASS/Tag weniger gastrointestinale Nebenwirkungen als 1.200 mg/Tag (Farrel et al. 1991) oder 30 mg ASS/Tag weniger Nebenwirkungen als 283 mg/Tag (Dutch TIA Trial Study Group 1991). Auch die Rate schwerer und lebensbedrohlicher Blutungen nimmt mit steigender ASS-Dosis zu. So konnte in der CURE (Clopidogrel in Unstable angina to prevent Recurrent Events)-Studie gezeigt werden, dass unter der Therapie mit ASS \leq 100 mg/Tag die wenigsten schwerwiegenden Blutungskomplikationen aufgetreten waren, ganz gleich ob ASS in Kombination mit Clopidogrel gegeben worden war oder alleine (Peters et al. 2003).

Aufgrund der Dosisabhängigkeit der Nebenwirkungsrate wird als optimale Dosierung die niedrigste tägliche Dosis angegeben, für die ein Wirksamkeitsnachweis in Bezug auf die jeweilige Indikation erbracht werden konnte (Patrono et al. 2004a). Für die Langzeitprophylaxe zur Reduktion der vaskulären Ereignisrate bei Hochrisiko-Patienten liegt der optimale Dosierungsbereich zwischen 75 mg und 100 mg ASS/Tag (Patrono et al. 2004a).

Dabei ist die regelmäßige tägliche Einnahme aufgrund der interindividuellen Variabilität des Thrombozytenumsatzes (Hamsten et al. 1985, Tschoepe 1995) der Einnahme der doppelten Dosis an nur jedem zweiten Tag vorzuziehen (Patrono et al. 2005), damit eine mindestens 95%ige Hemmung der TxA₂-Synthese erreicht werden kann (Patrono et al. 1985).

1.3. Stellenwert der ASS-Therapie bei Patienten mit erhöhtem kardiovaskulären Risiko

Zur Wirksamkeit von ASS in der Verhütung atherothrombotischer Ereignisse bei Patienten mit erhöhtem kardiovaskulären Risiko liegen zahlreiche kontrollierte klinische Studien vor. Die Metaanalyse der Antithrombotic Trialists' Collaboration (ATC) 2002 (Zusammenfassung von 195 Studien mit über 144.000 Patienten) zeigte, dass eine längerfristige regelmäßige Behandlung mit ASS das Risiko eines nichttödlichen Myokardinfarkts um ein Drittel reduziert, das Risiko einen nichttödlichen Schlaganfalls um ein Viertel und das Risiko eines vaskulärbedingten Todes um ein Sechstel. Die Zahl der anderen Todesfälle blieb unter den mit ASS behandelten und nichtbehandelten Patienten gleich.

Während bei 1000 gefäßkranken Patienten, die ein Jahr lang mit ASS behandelt werden, mindestens 10 bis 20 vaskuläre Ereignisse verhindert werden können, treten bei ca. 1 bis 2 Patienten schwere Blutungskomplikationen auf (García Rodríguez et al. 2001, ATC 2002, Patrono et al. 2004b) und bei 1 bis 2 Patienten von 10.000 Patienten ein hämorrhagischer Schlaganfall (ATC 2002). Diese Komplikationsrate gilt für niedrig dosiertes ASS, für Personen mittleren Lebensalters sowie für Patienten ohne Geschwür in der Vorgeschichte. Unter diesen Voraussetzungen überwiegt der Nutzen einer ASS-Therapie eindeutig die Blutungsrisiken, so dass niedrig dosiertes ASS für die langfristige Behandlung von Patienten mit koronarer Herzerkrankung von der Europäischen Gesellschaft für Kardiologie (ESC, Patrono et al. 2004a) und zahlreichen weiteren internationalen Fachverbänden empfohlen wird.

Die Metaanalyse der Antithrombotic Trialists' Collaboration (2002) verdeutlicht allerdings auch, dass trotz einer ASS-Behandlung eine erhebliche Anzahl von Patienten (ein Patient von acht Patienten [12,9%]) ein wiederholtes vaskuläres Ereignis innerhalb eines mittleren Beobachtungszeitraumes von zwei Jahren erleidet. Auch, wenn nur die Studien betrachtet werden, in denen ASS im optimalen Dosierungsbereich eingesetzt wurde, zeigt sich nach wie vor eine hohe vaskuläre Ereignisrate: In 12 Studien mit insgesamt 3.370 Patienten erlitten unter laufender ASS-Behandlung 366 Patienten (10,9%) ein vaskuläres Ereignis innerhalb von zwei Jahren (ATC 2002).

Deshalb stellt sich die Frage, ob diese Ereignisse zum Teil das Resultat einer fehlenden oder verminderten Wirkung von ASS sind.

1.4. „ASS-Resistenz“

1.4.1. Definition

Der Begriff „ASS-Resistenz“ beschreibt eine Vielzahl unterschiedlicher Phänomene. Im Wesentlichen handelt es sich um das Unvermögen von ASS,

- Patienten vor atherothrombotischen Ereignissen zu schützen,
- die Blutungszeit zu verlängern,
- die TxA₂-Biosynthese zu hemmen und/oder
- eine erwartete Wirkung in einem oder mehreren in vitro Thrombozytenfunktionstests zu zeigen (Patrono et al. 2003).

Da eine „ASS-Resistenz“ kein pharmakologisch definiertes Phänomen darstellt, ist der Begriff „Resistenz“ in diesem Zusammenhang irreführend. Korrekter wäre der Ausdruck „Non-Responsiveness“ bzw. „Low-Responsiveness“, doch fehlt hier eine passende Entsprechung in der deutschen Sprache. Darüberhinaus sollte die Tatsache, dass ein Teil der Patienten trotz einer ASS-Langzeittherapie ein vasculäres Ereignis erleidet, eher als „Behandlungsversagen“ bezeichnet werden, ein Phänomen, dass im Prinzip alle Arzneimittel betrifft (z.B. Antihypertensiva, Lipidsenker). Jedoch hat sich der Begriff „ASS-Resistenz“ trotz der zahlreichen Diskussionen in der Literatur geradezu eingebürgert.

1.4.2. Die ersten Studien

Im Jahr 1983 gab es wahrscheinlich die erste Beschreibung einer „ASS-Resistenz“. FitzGerald et al. stellten an gesunden Probanden fest, dass die einwöchige Einnahme von ASS in Dosierungen zwischen 40 mg und 80 mg/Tag zu einer maximalen Hemmung der ADP-induzierten Thrombozytenaggregation führte. Während einer anschließenden schrittweisen Dosiserhöhung (bis auf 2.600 mg/Tag) über acht Wochen, kam es kontinuierlich zu einer Abnahme des Hemmeffekts auf die ADP-induzierte Aggregation; die TxA₂-Biosynthese blieb hingegen während des gesamten Zeitraums unverändert unterdrückt. In den letzten zwei Wochen erlangte die Aggregation sogar wieder das Ausmaß, das zu Beginn der Studie ohne die Einnahme von ASS bestimmt worden war (FitzGerald et al. 1983a).

Anfang der 90er Jahre beobachteten mehrere Arbeitsgruppen eine unzureichende antithrombozytäre Wirkung von ASS bei Patienten mit zerebralen Durchblutungsstörungen.

Helgason et al. berichteten in verschiedenen Arbeiten, dass bis zu 25% der Patienten, die zur Verhinderung eines erneuten Schlaganfalls mit 325 mg ASS/Tag therapiert wurden, nur eine partiell gehemmte Thrombozytenaggregation aufwiesen (Helgason et al. 1993a, Helgason et al. 1993b, Helgason et al. 1994).

Grotemeyer et al. teilten eine Gruppe von 180 Patienten, die wegen eines zurückliegenden ischämischen Insults 1.500 mg ASS/Tag verteilt auf drei Tagesdosen erhielten, anhand eines Plättchenreaktivitätstests in ASS-Responder (67%) und ASS-Non-Responder (33%) ein. Mit diesen Patienten führten Grotemeyer et al. eine Pilot-Studie zur Untersuchung eines möglichen Zusammenhangs einer „ASS-Non-Response“ und dem Auftreten klinischer Ereignisse durch. Während eines Beobachtungszeitraums von zwei Jahren war die Häufigkeit vaskulärbedingter Ereignisse bei Non-Respondern mit 40% (24 von 60 Patienten) fast zehnmal höher als bei Respondern (4,4%, d.h. 5 von 114 Patienten). 10.8% der Patienten, 4 Responder und 15 Non-Responder, verstarben aufgrund vaskulärer Ursachen (Grotemeyer et al. 1993).

1.4.3. Häufigkeit

Es folgten zahlreiche Publikationen zu dem Phänomen der „ASS-Resistenz“, bis heute sind es bereits über 200 Artikel, die von einer unzureichenden ASS-Wirkung sowohl bei gesunden Probanden (Kawasaki et al. 2000, Peters et al. 2001) als auch bei gefäßkranken Patienten berichten. Das Vorhandensein einer „ASS-Resistenz“ bei zerebrovaskulär erkrankten Patienten (vgl. Abschnitt 1.4.2.) wurde durch etliche Arbeiten bestätigt (Bornstein et al. 1994, Chamorro et al. 1999, Grundmann et al. 2003, Alberts et al. 2004, Macchi et al. 2004, McCabe et al. 2005, Berrouschot et al. 2006). Auch Patienten mit peripherer arterieller Verschlusskrankheit (pAVK) sind betroffen (Müller et al. 1997, Ziegler et al. 2002). Die meisten „ASS-Resistenz“-Studien existieren zu Patienten mit koronarer Herzerkrankung. Tab. 2 zeigt eine Übersicht zu den ermittelten Häufigkeiten der „ASS-Resistenz“ bei KHK-Patienten. Die Häufigkeiten variieren von Studie zu Studie erheblich. So wurden zum Beispiel in der Studie von Gum und Mitarbeitern lediglich neun Patienten von 326 KHK-Patienten (3%) als ASS-Non-Responder eingestuft (Gum et al. 2003). Tantry et al. konnten sogar nur für einen Patienten aus 223 KHK-Patienten eine unzureichende Aggregationshemmung unter ASS-Therapie nachweisen (Tantry et al. 2005). In beiden Studien wurde die Thrombozytenaggregation mittels optischer Aggregometrie gemessen (turbidimetrisches Verfahren nach Born und Cross 1963).

Im Gegensatz zu diesen Studien existieren jedoch auch Untersuchungen, in denen mehr als die Hälfte der Patienten als Non-Responder identifiziert wurden. Buchanan et al. bestimmten die Blutungszeit von 289 mit ASS behandelten Patienten vor geplanter aortokoronarer Bypass-Operation. Lediglich bei 45% der Patienten war die Blutungszeit durch ASS adäquat verlängert (Buchanan et al. 2000). Peters et al. verwendeten zur Überprüfung der ASS-Wirkung einen „Platelet Function Analyzer“ (PFA), ein Gerät, welches die Blutungszeit automatisiert ex vivo nach der Methode von Kratzer und Born (1985) bestimmt. Von den seit mindestens drei Monaten mit 100 mg ASS/Tag behandelten KHK-Patienten (n = 19) zeigten 63% entweder keinen Unterschied hinsichtlich der ex vivo-Blutungszeit im Vergleich zu gesunden Probanden, die kein ASS eingenommen hatten oder sogar eine Verkürzung der ex vivo-Blutungszeit (Peters et al. 2001).

„ASS-Resistenz“-Studien mit KHK-Patienten	Anzahl Patienten	ASS-Dosis [mg/Tag]	Methode zur „ASS-Resistenz“-Bestimmung	„ASS-resistente“ Patienten, n (%)
Buchanan und Brister 1995	40	325	Blutungszeit	17 (43)
Buchanan et al. 2000	289	325	Blutungszeit	159 (55)
Peters et al. 2001	19	100	PFA-100	12 (63)
Héazard et al. 2002	47	75 – 300	optische Aggregometrie	9 (19)
	50	75 – 300	PFA-100	26 (52)
Andersen et al. 2003	58	75	PFA-100	23 (40)
	71	160	PFA-100	25 (35)
Friend et al. 2003	56	325	Vollblutaggregometrie	14 (25)
Gum et al. 2003	326	325	optische Aggregometrie	9 (3)
Macchi et al. 2003	98	160	PFA-100	29 (30)
Chen et al. 2004	151	80 – 325	RPFA	29 (19)
Tantry et al. 2005	223	325	optische Aggregometrie/TEG	1 (0,5)
Yilmaz et al. 2005	28	100 – 325	PFA-100	8 (29)
Lev et al. 2006	150	81 – 325	optische Aggregometrie/RPFA	19 (13)
Poston et al. 2006	225	325	TEG/Vollblutaggregometrie/ 11-dehydro-TxB ₂	10 (4)
Chen et al. 2007	468	80 – 325	RPFA	128 (27)
Pamukcu et al. 2007	234	100 – 300	PFA-100	52 (22)

Tab. 2 Klinische Studien zur Häufigkeit der „ASS-Resistenz“ bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung. PFA-100: Platelet Function Analyzer 100; RPFA: Rapid Platelet Function Assay; TEG: Thrombelastographie

Eine kürzlich veröffentlichte Metaanalyse von Hovens et al. zur Häufigkeit der „ASS-Resistenz“ umfasst 42 Studien, die bis zum Jahr 2005 erschienen waren. Die Autoren errechneten eine mittlere Prävalenz einer „ASS-Resistenz“ von 24% (Hovens et al. 2007).

1.4.4. Klinische Bedeutung

Patienten mit einer ungenügenden ASS-Wirkung scheinen eine ungünstigere Prognose aufzuweisen als Patienten mit deutlicher ASS-abhängiger Thrombozytenfunktionshemmung.

In einer Post-hoc-Analyse der HOPE (Hear Outcomes Prevention Evaluation)-Studie (Yusuf et al. 2000) verglichen Eikelboom et al. über einen Zeitraum von fünf Jahren 488 Patienten mit Myokardinfarkt, Schlaganfall oder kardiovaskulärem Tod mit derselben Anzahl von Kontrollpersonen ohne entsprechende Ereignisse. Beide Untersuchungsgruppen wurden mit ASS therapiert. Die Autoren bestimmten die Konzentration des Thromboxan-Metaboliten 11-dehydro-TxB₂ im Urin, ein Marker für die Thromboxan-Bildung in vivo. Es zeigte sich, dass unter vier Patientengruppen (Quartilen) mit zunehmender Ausscheidung des Tx-Metaboliten eine signifikante Zunahme der kardiovaskulären Ereignisrate (Myokardinfarkt, kardiovaskulärer Tod, Schlaganfall) bestand. Für die Quartile mit der höchsten Tx-Bildung, d.h. der anscheinend geringsten Effektivität der antithrombozytären ASS-Therapie, war das kardiovaskuläre Gesamtrisiko um den Faktor 1,8, das Risiko für einen MI um den Faktor 2 und für einen kardiovaskulären Tod sogar um das 3,5-fache erhöht (Eikelboom et al. 2002).

In einer prospektiven Studie von Chen et al. wurde bei 468 Patienten mit stabiler KHK und laufender ASS-Behandlung das Ansprechen auf ASS mit Hilfe des „Rapid Platelet Function Assay“ (RPFA bzw. VerifyNow[®] Aspirin) untersucht, eine automatisierte turbidimetrische Vollblutmethode (siehe auch Kapitel 4. Abschnitt 4.1.). Bei 27% der Patienten (n = 128) wurde eine „ASS-Resistenz“ diagnostiziert. Im Follow-up von im Mittel 379 Tagen ergab sich für die „resistenten“ Patienten ein signifikant erhöhtes Risiko für vaskulärbedingte Ereignisse (instabile Angina pectoris, MI, kardiovaskulärer Tod, Schlaganfall und TIA) verglichen mit den „nicht-resistenten“ Patienten (15,6% versus 5,3%, p < 0,001; Chen et al. 2007).

Poston et al. konnten zeigen, dass eine „ASS-Resistenz“ zu Komplikationen in der Bypass-Chirurgie führen kann. Die Autoren untersuchten 225 Patienten, die sich einer „Off-Pump“-Bypass-Operation, d.h. einer Operation ohne den Einsatz einer Herz-Lungen-Maschine,

unterzogen. In der Studie wurde als einzige thrombozytenaggregationshemmende Substanz ASS (325 mg/Tag) eingenommen. Die ASS-Wirkung wurde mittels verschiedener Testmethoden überprüft (siehe Tab. 2). Während vor der OP 4% der Patienten als „ASS-resistent“ eingestuft wurden, waren postoperativ 30% der Patienten betroffen. Die Autoren konnten einen signifikanten Zusammenhang zwischen der postoperativen „ASS-Resistenz“ und frühzeitigen Verschlüssen der transplantierten Gefäße nachweisen (Poston et al. 2006).

Auch das Auftreten später Reokklusionen nach Bypass-OP wurde in einer Fall-Kontroll-Studie von Yilmaz et al. mit einer „ASS-Resistenz“ in Zusammenhang gebracht. Es wurden 14 Patienten, die in einer späteren Kontroll-Koronarangiographie (im Mittel 7,5 Jahre nach der OP) mindestens eine Bypass-Stenose aufwiesen, mit 14 Kontrollpatienten ohne Stenose verglichen. Die Prävalenz einer „ASS-Resistenz“ (bestimmt mittels PFA) lag in der Gruppe mit Bypass-Stenose bei 50%, in der Kontrollgruppe lediglich bei 7% (Yilmaz et al. 2005).

Drei Metaanalysen aus diesem und vergangenem Jahr bestätigen die klinische Relevanz der „ASS-Resistenz“ (Auswertung von 16, 20 bzw. 11 Studien). Snoep et al., Krasopoulos et al. und Sofi et al. kommen zu dem Schluss, dass sich eine laborchemisch diagnostizierte „Resistenz“ gegenüber ASS bei kardiovaskulären Patienten klinisch in einem 3,8-fach bzw. 3,1-fach erhöhten Risiko für wiederkehrende kardiovaskuläre Ereignisse manifestiert (Snoep et al. 2007, Krasopoulos et al. 2008, Sofi et al. 2008).

1.4.5. Typologie nach Weber et al.

Da bislang keine standardisierte Definition der „ASS-Resistenz“ existiert (vgl. Abschnitt 1.4.1.) und dementsprechend die in den verschiedenen Studien ermittelten Inzidenzraten der „ASS-Resistenz“ zum Teil erheblich voneinander abweichen (vgl. Abschnitt 1.4.3.), schlugen Weber et al. eine Klassifizierung der „ASS-Resistenz“ vor. Mit Hilfe dieser Einteilung kann nicht nur das Vergleichen von Studienergebnissen erleichtert werden, es kann bereits eine Eingrenzung der möglichen Mechanismen, die einer „ASS-Resistenz“ zugrunde liegen könnten, vorgenommen werden (Weber et al. 2002).

Die Klassifizierung erfolgt, indem in plättchenreichem Citrat-Plasma die Kollagen (1 mg/l)-induzierte Thrombozytenaggregation und TxB₂-Synthese sowohl in An- als auch in Abwesenheit von 100 µM ASS in vitro bestimmt wird. Auf diese Weise können drei unterschiedliche Typen der „ASS-Resistenz“ ermittelt werden.

Bei einer „ASS-Resistenz“ vom Typ I führt die Einnahme von 100 mg ASS/Tag (seit mindestens fünf Tagen) weder zu einer Hemmung der Aggregation noch zu einer Hemmung der Tx-Bildung. Jedoch kommt es durch Zugabe von ASS in vitro (100 µmol/l) zu einer kompletten Hemmung sowohl der Aggregation als auch der Tx-Synthese (siehe Abb. 6, rechts oben). Hinter dieser Form der „Resistenz“ könnte sich z.B. eine Non-Compliance verbergen.

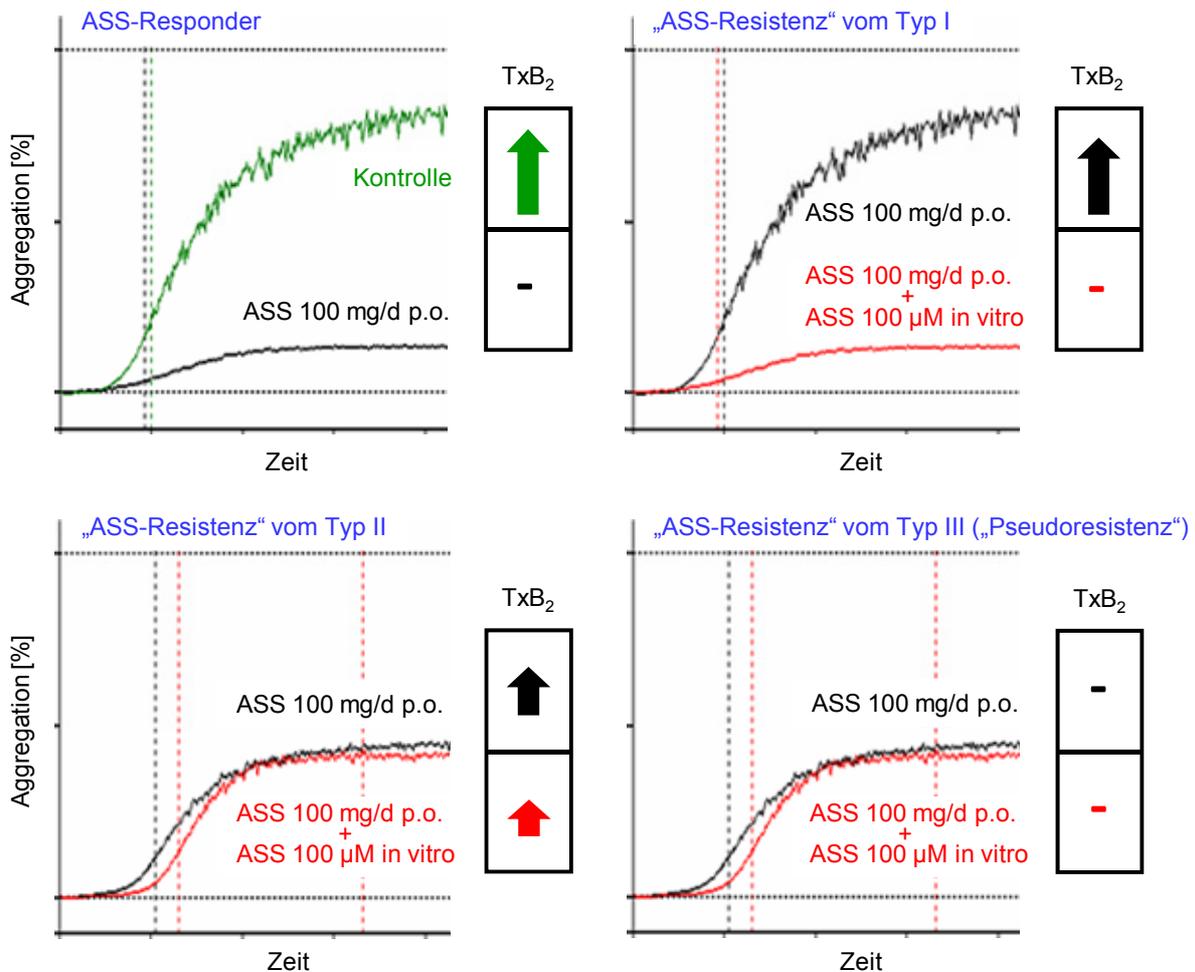


Abb. 6: Typologie der „ASS-Resistenz“ (nach Weber et al. 2002). Die Aggregationen wurden jeweils mit 1 mg/l Kollagen ausgelöst. Die in der oberen linken Abbildung dargestellte Kontrollmessung (grün) repräsentiert die Aggregation bzw. Thromboxan-Bildung eines Probanden, der seit mindestens einer Woche kein ASS eingenommen hat. Die schwarz dargestellten Messungen zeigen zum einen, wie die Aggregation und Tx-Synthese im Falle eines ASS-Responders supprimiert werden, wenn seit mindestens fünf Tagen 100 mg ASS/Tag eingenommen wurde, zum anderen, wie sich Aggregation und Tx-Bildung bei Vorliegen einer „ASS-Resistenz“ verhalten können. In rot sind die Messungen markiert, bei denen ASS in vitro hinzugesetzt wurde.

Eine „ASS-Resistenz“ vom Typ II ist dadurch gekennzeichnet, dass ebenfalls eine unzureichende Aggregationshemmung einhergehend mit einer deutlichen Tx-Bildung besteht,

dass aber der Zusatz von ASS in vitro keine wesentliche Reduzierung bewirkt (siehe Abb. 6, links unten). Dieser „Resistenz“-Typ ist die „ASS-Resistenz“ im engeren Sinne.

Davon abzutrennen ist die „ASS-Resistenz“ vom Typ III. Auch hier liegt eine mangelnde Aggregationshemmung vor, aber – im Unterschied zur „Typ II-Resistenz“ – ist eine effektive Blockierung der Tx-Synthese zu beobachten. Der ASS-Zusatz in vitro bringt keine weiteren Veränderungen (siehe Abb. 6, rechts unten). Da in diesem Fall die primäre Wirkung von ASS, die Hemmung der thrombozytären COX, erhalten ist, wird die „Typ III-Resistenz“ auch als „ASS-Pseudoresistenz“ bezeichnet.

1.5. Aktuelle Problematik

Eine „ASS-Resistenz“ ist ein ernst zu nehmendes Problem. Insbesondere in den letzten Jahren haben sich die Beobachtungen gehäuft, dass eine erhebliche Anzahl von Patienten nicht in gewünschter Weise von ASS als Thrombozytenaggregationshemmer profitiert. Da eine effektive antithrombozytäre Therapie in der Sekundärprophylaxe kardiovaskulärer Ereignisse unerlässlich ist, gilt es, den bestmöglichen Weg zu finden, um „resistente“ Patienten zu identifizieren. Zum jetzigen Zeitpunkt ist nicht geklärt, welche Methode die zuverlässigsten Ergebnisse liefert, die optimal mit dem Auftreten klinischer Ereignisse korrelieren. Nach wie vor ist auch die Frage nach der Prävalenz offen, insbesondere, wenn die unterschiedlichen Formen, mit der eine „ASS-Resistenz“ auftreten kann (siehe Abschnitt 1.4.5.), zugrunde gelegt werden. Die einzelnen „Resistenz“-Typen wurden in bisherigen Studien nur unzureichend auseinander gehalten. Wie häufig tritt welcher Typ auf, und besteht für jede Form der „Resistenz“ die gleiche klinische Relevanz?

Von herausragender Bedeutung ist die Erforschung der Ursachen. Jedem der drei Resistenz-Typen liegen andere Ursachen zugrunde. Es existieren zahlreiche Theorien, aber bislang ist über die tatsächlichen Mechanismen nur wenig bekannt. Erst wenn die Mechanismen und die Faktoren, die eine „ASS-Resistenz“ auslösen können, geklärt sind, kann effektiv nach Auswegen gesucht werden. Dann könnten in klinischen Studien zielgerichtet therapeutische Alternativen getestet werden.

1.6. Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit war, das Phänomen „ASS-Resistenz“ bei Patienten mit stabiler koronarer Herzerkrankung zu untersuchen, die zur Sekundärprophylaxe atherothrombotischer Ereignisse mit täglich 100 mg ASS therapiert wurden. Dabei sollten folgende Fragestellungen bearbeitet werden:

1. Wie häufig tritt die „ASS-Resistenz“ im Studienkollektiv auf? Anhand der Bestimmung der Thrombozytenaggregation, der Thromboxan-Bildung und des Einflusses von ASS in vitro sollte eine Klassifizierung der „ASS-resistenten“ Patienten nach Weber et al. (siehe Abschnitt 1.4.5.) vorgenommen werden, so dass die Prävalenz jedes einzelnen „Resistenz“-Typs ermittelt werden kann.
2. Es sollte eine nähere Charakterisierung der individuellen ASS-Wirkung erfolgen, zum einen hinsichtlich der mit verschiedenen Thrombozytenagonisten (Kollagen in verschiedenen Konzentrationen, Arachidonsäure und ADP) induzierten Aggregation, zum anderen hinsichtlich der verbliebenen COX-Aktivität sowie der Thromboxan- und Prostacyclin-Synthese in vivo.
3. Welche Faktoren können mit einer „ASS-Resistenz“ in Zusammenhang gebracht werden? Hierzu sollte eine ausführliche Befragung der Patienten zu kardiovaskulären Risikofaktoren, zur Krankengeschichte und zur aktuellen Medikation Aufschluss geben. Zusätzlich sollten diverse routinemäßig erhobene Laborparameter zur Auswertung mit herangezogen werden.
4. Sind kardiovaskuläre Ereignisse in der Patientenvorgeschichte möglicherweise häufiger bei den „resistenten“ Patienten aufgetreten? Dies sollte anhand einer retrospektiven Analyse überprüft werden.
5. Welche Mechanismen liegen der „ASS-Resistenz“ zugrunde?
 - Wie compliant sind die Patienten dieser Studie? Die Compliance der Patienten sollte sichergestellt werden, indem zum einen bei unzureichender ex vivo beobachteter Aggregationshemmung versucht werden sollte, eine komplette Hemmung durch ASS-Zusatz in vitro zu erreichen und indem zum anderen nach den ASS-Metaboliten Salicylsäure und Salicylursäure (siehe Abschnitt 1.2.2.) im Urin der Patienten gesucht werden sollte.

- Gibt es im Studienkollektiv Interaktionen mit anderen COX-Inhibitoren wie z.B. Ibuprofen oder Naproxen?
 - Könnte eine Expression von COX-2 in Thrombozyten eine Erklärung liefern oder könnte eine verstärkte COX-2-Vollblut-Aktivität Ursache für eine gegenüber ASS unempfindliche Thromboxan-Synthese sein (siehe Abschnitt 1.7.1.)?
 - Spielt die COX-unabhängige Bildung von Isoprostanen eine Rolle (siehe Abschnitt 1.7.2.)?
 - Könnten Polymorphismen des ADP-Rezeptor-Gens P2Y₁₂ für eine verminderte ASS-Wirkung verantwortlich sein (siehe Abschnitt 1.7.3.)?
6. Zur Überwindung einer „ASS-Resistenz“ sollte in Einzelfällen geprüft werden, ob eine höhere ASS-Dosis, die alleinige oder zusätzliche Einnahme von Clopidogrel Vorteile für die Thrombozytenaggregationshemmung bringt.

1.7. Hypothesen zur Ursache der „ASS-Resistenz“

Im Folgenden werden drei Hypothesen zur Ursache einer „ASS-Resistenz“ vorgestellt, mit welchen sich die vorliegende Arbeit eingehend beschäftigt.

1.7.1. Beteiligung der COX-2 an der Thromboxan-Synthese

Die thrombozytäre Thromboxan-Synthese beruht prinzipiell auf der katalytischen Funktion der COX-1, die in Thrombozyten konstitutiv exprimiert wird (siehe Abschnitt 1.2.3.). Mit der Frage, inwieweit auch die COX-2 in Thrombozyten vertreten ist, haben sich in der Vergangenheit mehrere Arbeitsgruppen auseinandergesetzt und zum Teil unterschiedliche Beobachtungen gemacht. Zahlreiche Untersucher konnten kein COX-2-Protein in Thrombozyten gesunder Probanden nachweisen (Patrignani et al. 1999, Reiter et al. 2001, Takahashi et al. 2008). Hingegen gelang es Weber und Mitarbeitern sowohl COX-2-mRNA (mit Hilfe der RT-PCR) als auch COX-2-Protein (mittels Western Blot) in Thrombozyten von 20 Probanden zu identifizieren (Weber et al. 1999). In der Annahme, dass für die Hemmung der COX-2 deutlich höhere ASS-Konzentrationen erforderlich sind als für die Hemmung der

COX-1 (Mitchell et al. 1994, vgl. auch Abschnitt 1.2.3.), wurde die Hypothese entwickelt, dass eine COX-2-Aktivität in Thrombozyten zu einer TxA₂-Synthese führt, die durch ASS nicht unterdrückt werden kann. Angesichts der Tatsache, dass für eine vollständige Aggregationshemmung durch ASS eine Reduzierung der TxA₂-Synthese von mindestens 95% notwendig ist (siehe Abschnitt 1.2.5.), könnte bereits eine geringe COX-2-Aktivität ausreichen, um die ASS-Wirkung erheblich zu reduzieren oder sogar aufzuheben (Hohlfeld und Schrör 1998, Weber et al. 1999).

Auch die Arbeitsgruppe um Rocca et al. berichtete von einer COX-2-Expression in Thrombozyten. Die Autoren stellten mittels immunhistochemischer Färbungen fest, dass 3 bis 8% der Thrombozyten gesunder Probanden COX-2 exprimierten. Der Anteil COX-2-positiver Thrombozyten betrug sogar 30 bis 60%, wenn krankheitsbedingt ein gesteigerter Thrombozytenumsatz vorlag (Rocca et al. 2002). Für diese Beobachtung fanden Rocca et al. folgende Erklärung: Im Gegensatz zu „alten“ Thrombozyten enthalten „junge“ (soeben aus dem Knochenmark gebildete) Thrombozyten noch mRNA, „Restbestände“ der megakaryozytären mRNA. Da Megakaryozyten sowohl COX-1 als auch COX-2 exprimieren, wird bei „jungen“ Thrombozyten die Expression beider Isoformen beobachtet (Rocca et al. 2002). Die mRNA wird in den Thrombozyten allerdings recht schnell abgebaut und aufgrund des fehlenden Zellkerns auch nicht ersetzt. Das COX-2-Protein verschwindet im Gegensatz zum COX-1-Protein relativ kurz nach der Entstehung eines Thrombozyten, vermutlich aufgrund der für die COX-2 beschriebenen translationalen Inhibierung (Dixon et al. 2000). Für Patienten mit gesteigertem Plättchenumsatz ist der Anteil mRNA-haltiger „junger“ Thrombozyten erheblich erhöht, in der Folge zeigen diese Patienten eine deutliche thrombozytäre COX-2-Expression (Rocca et al. 2002).

Von einer beschleunigten Thrombozytenregeneration sind auch Patienten nach einer Bypass-Operation betroffen, bei welchen eine extrakorporale Zirkulation während der OP zu Thrombozytenverlusten geführt hat. Zimmermann et al. zeigten, dass sich bei diesen Patienten häufig eine postoperative „ASS-Resistenz“ entwickelt. Für die von Zimmermann et al. untersuchten Patienten (n = 24) war das Maximum der „Resistenz“ fünf Tage nach der OP erreicht – die Einnahme von ASS bewirkte nur eine unvollständige Hemmung der TxA₂-Synthese, die Kollagen-induzierte Thrombozytenaggregation blieb komplett unbeeinflusst (Zimmermann et al. 2001). Diese Beobachtung legte die Vermutung nahe, dass Bypass-operierte Patienten aufgrund einer gesteigerten Plättchenbildung eine zum Teil COX-2-vermittelte thrombozytäre TxA₂-Synthese aufweisen könnten, die durch ASS nur

unzureichend zu unterdrücken wäre. In der Tat konnte die Arbeitsgruppe um Zimmermann et al. für den fünften Tag nach der OP eine Steigerung der COX-2-Expression in Thrombozyten um den Faktor 16 nachweisen verglichen mit Kontrollwerten vor der OP. Der selektive COX-2-Hemmer Celecoxib war allerdings nicht in der Lage, die erhöhte TxA₂-Bildung zu unterdrücken bzw. die Aggregation zu hemmen (Zimmermann et al. 2003). Dies stand im Gegensatz zu den Ergebnissen von Rocca et al., die zeigten, dass die thrombozytäre TxA₂-Synthese signifikant durch den hochselektiven COX-2-Hemmer NS-398 inhibiert werden konnte (Rocca et al. 2002).

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Frage, inwieweit eine eingeschränkte ASS-Wirkung bei stabilen KHK-Patienten mit einer Expression der COX-2 in Thrombozyten zusammenhängt. Untersuchungen zum Einfluss eines selektiven COX-2-Hemmers (Rofecoxib) auf die thrombozytäre TxA₂-Synthese und die Thrombozytenaggregation sind ebenfalls Gegenstand dieser Arbeit.

Darüberhinaus existiert die Hypothese, dass bei „ASS-resistenten“ Patienten alternative Wege der TxA₂-Synthese außerhalb des Thrombozyten eine Rolle spielen, die gegenüber ASS unempfindlich sind. So könnte es z.B. durch entzündliche Prozesse im Bereich einer atherosklerotisch veränderten Gefäßwand zu einer COX-2-Induktion in Gefäßendothelzellen, glatten Muskelzellen oder Makrophagen kommen. In der Folge würde COX-2-vermittelt PGH₂ synthetisiert, welches mit Hilfe der Thromboxan-Synthase (TxS) derselben Zelle zu TxA₂ umgewandelt werden könnte. Denkbar wäre auch eine transzelluläre TxA₂-Synthese (Karim et al. 1996) – PGH₂ wird z.B. von Makrophagen bereitgestellt und anschließend mit Hilfe der TxS der Thrombozyten zu TxA₂ umgesetzt. Diese Hypothese zur „ASS-Resistenz“ wurde erstmals von Cipollone et al. formuliert. Die Autoren stellten fest, dass sich die TxA₂-Synthese bei Patienten mit instabiler Angina pectoris effektiver durch den COX-1-/COX-2-Hemmer Indobufen reduzieren ließ als durch niedrig dosiertes ASS (Cipollone et al. 1997). Die vorliegende Arbeit prüft diese Hypothese durch Bestimmung der in vivo-TxA₂-Synthese und der COX-2-Vollblut-Aktivität.

1.7.2. COX-unabhängige Bildung von Isoprostanen

Isoprostane sind Prostaglandin-ähnliche Verbindungen, die auf nichtenzymatischem Weg durch Peroxidation der Arachidonsäure gebildet werden (Morrow et al. 1990). Die Reaktion wird durch freie Radikale katalysiert. Im Unterschied zur Prostaglandin-Bildung wird die

Arachidonsäure im veresterten Zustand umgewandelt (Morrow et al. 1992), d.h. die Isoprostane liegen zunächst in gebundener Form als Phospholipid-Ester in Zellmembranen und Lipoproteinen (Lynch et al. 1994) vor und werden erst durch Hydrolyse mit Hilfe von Phospholipasen freigesetzt. Die freien Isoprostane zirkulieren im Blutplasma bis sie in metabolisierter oder zum großen Teil auch in unveränderter Form mit dem Urin ausgeschieden werden (Awad et al. 1993, Wang et al. 1995). Die Isoprostane unterscheiden sich in ihrer Stereochemie von den Prostaglandinen (siehe Abb. 7). Sie lassen sich wie diese in unterschiedliche Serien einteilen, z.B. in Isoprostane der D-, E- und F-Serie. Eine besondere Bedeutung kommt dem 8-iso-Prostaglandin $F_{2\alpha}$ (8-iso-PGF $_{2\alpha}$) zu. Es wurde als eines der ersten Isoprostane in biologischen Proben identifiziert (Morrow et al. 1990) und stellt bis heute das am besten untersuchte Isoprostan dar.

Der sog. „oxidative Stress“, die unkontrollierte Oxidation von Biomolekülen wie z.B. von Lipiden, wurde als ein Schlüsselmechanismus in der Entwicklung der Atherosklerose bzw. KHK identifiziert (Dhalla et al. 2000, Harrison et al. 2003). Entsprechend wurden Isoprostane, die auch als in vivo Marker des „oxidativen Stresses“ bezeichnet werden können (Lawson et al. 1999, Morrow 2000, Cracowski et al. 2002), in erhöhten Konzentrationen im Urin von KHK-Patienten im Vergleich zu Patienten ohne KHK nachgewiesen (Schwedhelm et al. 2004). Isoprostane werden aber keineswegs nur als Marker des „oxidativen Stresses“ angesehen. Es handelt sich um biologisch aktive Verbindungen. So konnte für 8-iso-PGF $_{2\alpha}$ eine starke vasokonstriktorische Wirkung (Takahashi et al. 1992) sowie eine Verstärkung der Thrombozytenadhäsion und Thrombozytenaktivierung nachgewiesen werden (Minuz et al. 1998, Gallet et al. 1999, Minuz et al. 2002). Darüberhinaus zeigt 8-iso-PGF $_{2\alpha}$ u.a. proliferative (Yura et al. 1999), proinflammatorische (Leitinger et al. 2001) sowie proatherogene Effekte (Tang et al. 2005).

Die meisten biologischen Effekte der Isoprostane scheinen über die Rezeptoren der Prostaglandine vermittelt zu werden. Audoly et al. stellten beim Vergleich von Thromboxan-Rezeptor-Knock-out- und Wildtyp-Mäusen fest, dass die aggregationsfördernde Wirkung von 8-iso-PGF $_{2\alpha}$ und 8-iso-PGE $_2$ an das Vorhandensein von Thromboxan-Rezeptoren gebunden ist (Audoly et al. 2000).

In mehreren Arbeiten von Davì et al. wurde eine positive Korrelation zwischen der Urinexkretion von 8-iso-PGF $_{2\alpha}$ und 11-dehydro-TxB $_2$ nachgewiesen, sowohl für Patienten mit Hypercholesterinämie (Davì et al. 1997), Diabetes (Davì et al. 1999) als auch für Patienten

mit Adipositas (Davi et al. 2002). Die Autoren vermuteten eine vom „oxidativen Stress“ abhängige Thrombozytenaktivierung.

Cipollone et al. untersuchten die 8-iso-PGF_{2α}- und 11-dehydro-TxB₂-Exkretion bei ASS-behandelten Patienten mit instabiler Angina pectoris und stellten fest, dass diese Patienten – trotz der Behandlung mit ASS – signifikant höhere 11-dehydro-TxB₂-Konzentrationen aufwiesen im Vergleich zu Patienten mit stabiler Angina pectoris. Außerdem zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen der 11-dehydro-TxB₂-Exkretion und der Isoprostan-Exkretion. Die Ergebnisse legten eine Verbindung zwischen der COX-unabhängigen Bildung von Isoprostanen und einer unzureichenden ASS-Wirkung auf die Thrombozyten nahe (Cipollone et al. 2000).

In der vorliegenden Arbeit wird untersucht, ob es einen Zusammenhang zwischen einer „ASS-Resistenz“ bei Patienten mit stabiler KHK und der durch freie Radikale katalysierten Umwandlung von Arachidonsäure zu Isoprostanen gibt (siehe auch Abb. 7).

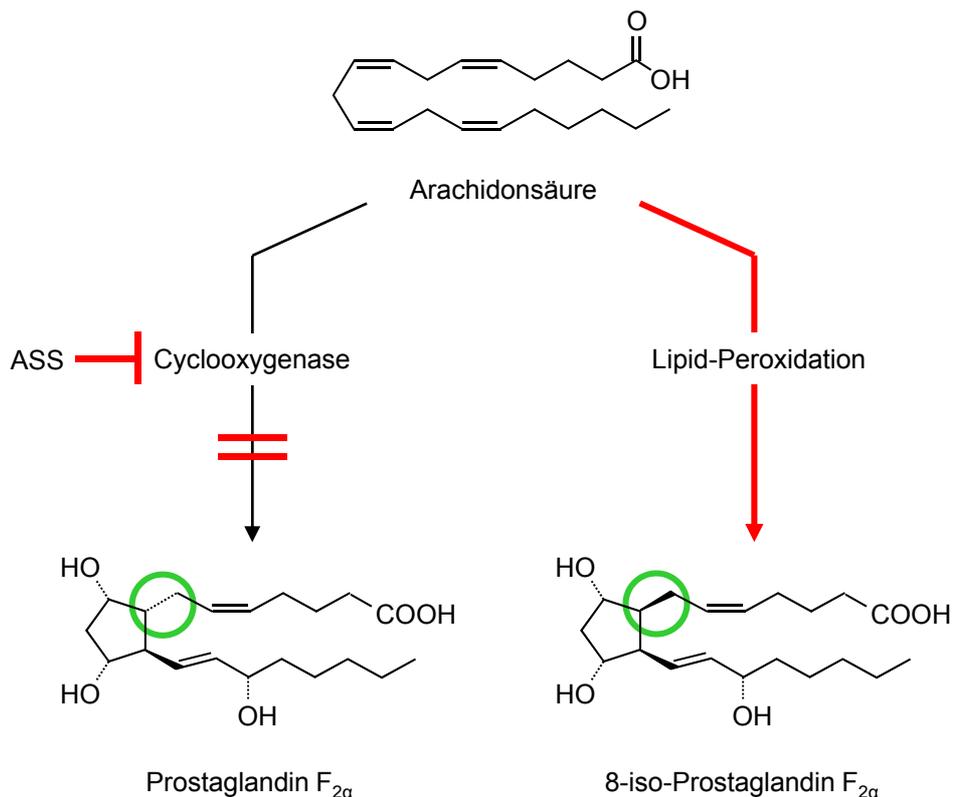


Abb. 7: Hypothese zur „ASS-Resistenz“. ASS ist durch Hemmung der COX in der Lage, die Prostaglandin-Synthese zu unterbinden, aber nicht die Bildung von Isoprostanen, die durch Lipid-Peroxidation der Arachidonsäure entstehen. In der Folge kommt es bei Patienten mit verstärkter Lipid-Peroxidation, die entsprechend eine gesteigerte Synthese proaggregatorischer wirksamer Isoprostane aufweisen, zu einer abgeschwächten antithrombozytären Wirkung von ASS.

1.7.3. Polymorphismen des ADP-Rezeptors P2Y₁₂

Adenosindiphosphat (ADP) gehört zu den wichtigsten Mediatoren der Thrombozytenaggregation. Die Thrombozytenoberfläche weist eine Reihe von ADP-Bindungsstellen auf, von denen bisher drei purinerge Rezeptoren näher charakterisiert wurden: der P2X₁-Rezeptor, ein Liganden-gesteuerter Ionenkanal und die G-Protein gekoppelten Rezeptoren P2Y₁ und P2Y₁₂ (Daniel et al. 1998). Der P2Y₁₂-Rezeptor wurde als Angriffspunkt der Thrombozytenaggregationshemmer Clopidogrel und Ticlopidin identifiziert (Hollopeter et al. 2001).

Gegenwärtig wird der Einfluss genetischer Faktoren auf die Thrombozytenaggregation nur teilweise verstanden (O'Donnell et al. 2001). Genetische Polymorphismen des ADP-Rezeptors P2Y₁₂ wurden im Zusammenhang mit einer veränderten Thrombozytenaktivierung und einer veränderten Wirksamkeit von Thrombozyteninhibitoren beschrieben. So konnte für bestimmte seltene Polymorphismen des P2Y₁₂-Gens eine gesteigerte Blutungsneigung festgestellt werden (Cattaneo et al. 2003, Shiraga et al. 2005). Hingegen wurden wesentlich häufiger vorkommende P2Y₁₂-Polymorphismen mit einem erhöhten atherothrombotischen Risiko assoziiert (Fontana et al. 2003a, Fontana et al. 2003b, Ziegler et al. 2005, Cavallari et al. 2007, Rudez et al. 2008).

Das P2Y₁₂-Gen umfasst 47 kb und besteht aus drei Exons (National Center for Biotechnology Information 2008). Häufig vorkommende Polymorphismen sind in Abb. 8 dargestellt.

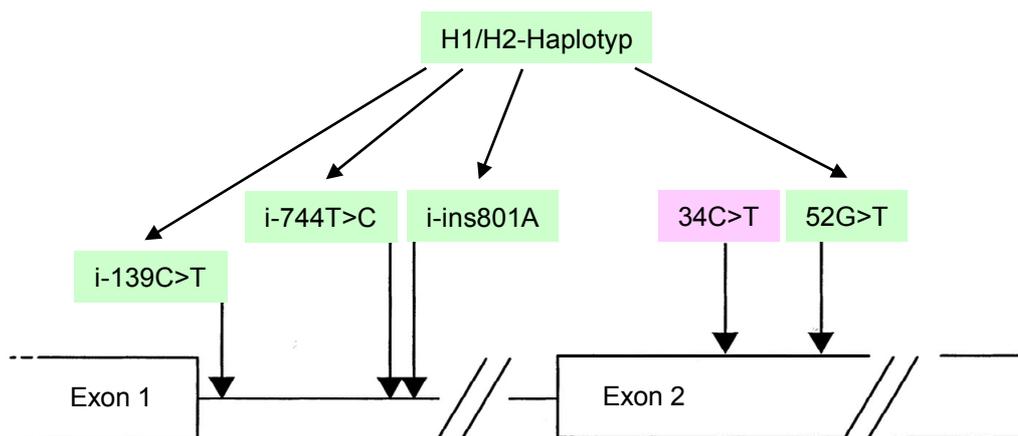


Abb. 8: Polymorphismen des ADP-Rezeptor-Gens P2Y₁₂ (nach Fontana et al. 2003a)

Der H1/H2-Haplotyp besteht aus mehreren miteinander gekoppelten Polymorphismen, wobei H2 für den seltener auftretenden Haplotyp steht und H1 für den Wildtyp-Haplotyp (Fontana et

al. 2003a). Der 34C>T-Polymorphismus tritt ebenfalls häufig auf und wurde mit einer reduzierten klinischen Wirksamkeit von Clopidogrel assoziiert (Ziegler et al. 2005).

In einer Studie von Fontana et al. wurde der H2-Haplotyp bei gesunden Probanden signifikant mit einer erhöhten ADP-induzierten Thrombozytenaggregation assoziiert. Dies galt sowohl für homozygote als auch für heterozygote Träger des H2-Allels, wobei homozygote Träger eine besonders hohe Aggregation zeigten (Fontana et al. 2003a).

Darüberhinaus stellten Fontana et al. in einer Fall-Kontroll-Studie fest, dass der H2-Haplotyp zahlenmäßig häufiger in einer Gruppe von 184 pAVK-Patienten vertreten war im Vergleich zu 330 Kontrollen ohne pAVK (Fontana et al. 2003b). In einer aktuellen Fall-Kontroll-Studie von Cavallari et al. wurde ein ähnliches Ergebnis für KHK-Patienten erzielt. Cavallari et al. führten bei 1.945 Patienten eine Koronarangiographie durch; bei 991 Patienten war mindestens ein Koronargefäß um mehr als 50% verengt (KHK-Gruppe), 387 Patienten hatten keine Anzeichen einer KHK (Patienten mit leichten Verengungen wurden von den weiteren Untersuchungen ausgeschlossen). Eine Genotypisierung beider Gruppen ergab, dass der H2-Haplotyp des ADP-Rezeptors P2Y₁₂ signifikant häufiger in der KHK-Gruppe identifiziert wurde (Cavallari et al. 2007).

Diese Ergebnisse führten zu der Vermutung, dass Träger des H2-Haplotyps möglicherweise ein erhöhtes Risiko für atherothrombotische Komplikationen aufweisen, und dass antithrombozytäre Substanzen in ihrer Wirkung abgeschwächt sein könnten. In diesem Zusammenhang sind nicht nur die Thienopyridine Clopidogrel und Ticlopidin gemeint, für die aufgrund ihrer lediglich partiellen Hemmung der P2Y₁₂-Rezeptoren (Storey et al. 2002, Aleil et al. 2005) eine reduzierte Wirksamkeit infolge einer verstärkten Aktivität der P2Y₁₂-Rezeptoren vorstellbar wäre. Die Vermutung betrifft auch ASS. Da ASS primär die TxA₂-abhängige Signalkaskade der Thrombozytenaktivierung hemmt und den ADP-vermittelten Signalweg weitgehend unbeeinflusst lässt, könnte ein übermäßig stark ADP-abhängiger Aggregationsmechanismus insgesamt auch die ASS-Wirkung schmälern. In diesem Fall läge einer „ASS-Pseudoresistenz“ vor (siehe Abschnitt 1.4.5.).

Somit lautet eine Hypothese der vorliegenden Arbeit: Kann eine „ASS-Resistenz“ bei KHK-Patienten mit Polymorphismen des ADP-Rezeptor-Gens P2Y₁₂ in Zusammenhang gebracht werden (siehe auch Abb. 9)? Augenmerk wird sowohl auf den H2-Haplotyp als auch auf den 34C>T-Polymorphismus gerichtet.

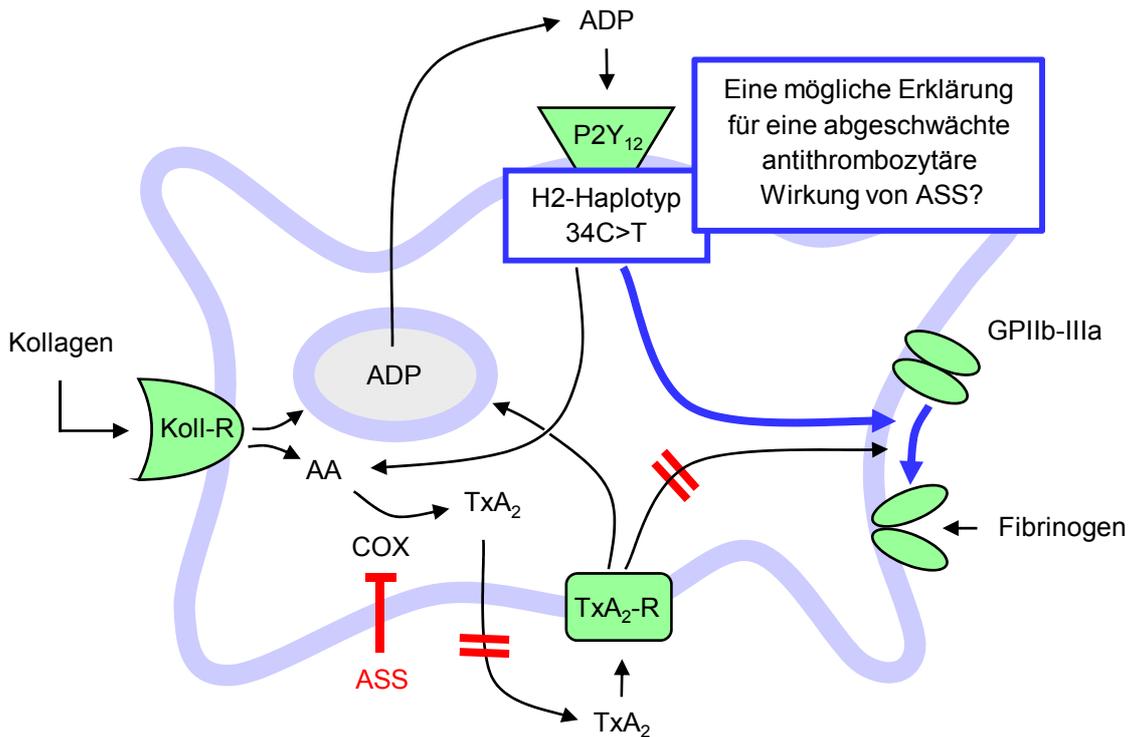


Abb. 9: Hypothese zur „ASS-Resistenz“. Dargestellt ist ein Thrombozyt in seiner Aktivierungsphase. Die Aggregation von Thrombozyten wird über zahlreiche Wege vermittelt. Zu den wichtigsten Mechanismen zählen die COX-abhängige Synthese von TxA₂, welches nach Freisetzung die Thromboxan-Rezeptoren (TxA₂-R) aktiviert und die Granula-Sekretion von ADP, welches an ADP-Rezeptoren (z.B. P2Y₁₂) bindet. Beide Wege führen zu einer Aktivierung der Glykoprotein IIb-IIIa-Rezeptoren (Fibrinogen-Rezeptoren) mit nachfolgender Aggregation der Thrombozyten über „Fibrinogen-Brücken“. Während es unter einer ASS-Therapie zu einer Blockade des TxA₂-vermittelten Signalweges kommt, bleibt der ADP-Signalweg weitgehend unbeeinflusst. In der Anwesenheit von P2Y₁₂-Rezeptor-Polymorphismen (H2-Haplotyp und/oder 34C>T), welche in der Vergangenheit mit einer verstärkten Thrombozytenaggregation assoziiert wurden, könnte eine Therapie mit ASS möglicherweise aufgrund des Überwiegens des ADP-vermittelten Signalweges unzureichend sein.

2. Methoden

Vor Beginn der Untersuchungen wurde das zustimmende Votum der Ethik-Kommission der Ärztekammer Hamburg eingeholt.

2.1. Studienkollektiv

2.1.1. Rekrutierung der Patienten

Die Rekrutierung der Patienten erfolgte in Zusammenarbeit mit Herz InForm e.V., der Vereinigung der Hamburger Herzsportgruppen. Die Herzsportgruppen erhielten ein Informationsblatt, in dem auf die Durchführung und Zielsetzung der Studie hingewiesen wurde. Bei Interesse wurden die Teilnehmer der Herzsportgruppen gebeten, sich einen Termin zur ausführlichen Information und Untersuchung geben zu lassen.

Insgesamt konnten 140 Patienten rekrutiert werden.

Alle Patienten wurden über das Wesen und die Bedeutung der Studie aufgeklärt und gaben ihr schriftliches Einverständnis.

2.1.2. Ein- und Ausschlusskriterien

Voraussetzung für die Teilnahme an der Studie war das Vorliegen einer stabilen koronaren Herzerkrankung, die entweder durch eine koronarangiographische Dokumentation oder durch einen Myokardinfarkt in der Vorgeschichte gesichert sein musste. Ein weiteres Einschlusskriterium war die regelmäßige Einnahme von 100 mg ASS pro Tag seit mindestens einer Woche.

Ausschlusskriterien waren:

- ein Myokardinfarkt innerhalb der letzten zwei Wochen vor Studienbeginn,
- größere Operationen innerhalb der letzten 12 Wochen vor Studienbeginn,
- die Einnahme einer von 100 mg/d abweichenden ASS-Dosis,
- die Einnahme anderer Thrombozytenaggregationshemmer als ASS: Thienopyridine (Clopidogrel, Ticlopidin), Dipyridamol,
- die Behandlung mit Glykoprotein IIb-IIIa-Rezeptor-Antagonisten (z.B. Abciximab),

- eine Therapie mit oralen Antikoagulantien (Phenprocoumon),
- die Anwendung von Heparinen und Heparinoiden,
- eine Behandlung mit COX-2-Inhibitoren (z.B. Celecoxib),
- eine Niereninsuffizienz mit einem Serum-Kreatinin-Wert von über 2,0 mg/dl,
- Leberfunktionsstörungen bzw. eine Leberinsuffizienz,
- Schwangerschaft und Stillzeit,
- ein kardiogener Schock innerhalb der letzten 12 Monate,
- eine dekompensierte oder klinisch signifikante Herzinsuffizienz,
- eine Prinzmetalangina,
- eine unbehandelte Hyperthyreose und Hypothyreose,
- das Vorliegen eines weiteren, die Lebenserwartung einschränkenden Leidens,
- Alkohol-, Medikamenten- und Drogenmissbrauch.

Von den 140 rekrutierten Patienten mussten zehn Patienten von der Studie ausgeschlossen werden:

Ein Patient hatte fünf Tage vor Studienbeginn einen Myokardinfarkt erlitten. Bei zwei weiteren Patienten lag weder eine angiographische Dokumentation einer KHK vor, noch ein Myokardinfarkt in der Vorgeschichte. In einem Fall bestand der Verdacht auf Alkoholmissbrauch. Die übrigen Patienten mussten ausgeschlossen werden, da eine andere Dosis als 100 mg ASS pro Tag eingenommen wurde oder eine Kombinationsbehandlung mit ASS und Clopidogrel vorlag.

2.1.3. Patientenbefragung

Für jeden Patienten wurde ein Patientenerhebungsbogen ausgefüllt. Dieser beinhaltete neben allgemeinen Patienteninformationen (Geschlecht, Größe, Anschrift, Hausarzt) Fragen zu bestehenden kardiovaskulären Risikofaktoren, wie Alter, Familienanamnese, Hypercholesterinämie, Hypertonie, Diabetes mellitus, Adipositas und Rauchen. Darüberhinaus wurde nach atherothrombotischen Ereignissen in der Vorgeschichte gefragt, wie Myokardinfarkt, Schlaganfall und TIA, sowie nach bisherigen Koronarinterventionen (Koronarangiographie, PTCA, Stentimplantation, Bypass-Operation). Neben Angaben zu weiteren Erkrankungen wurde überprüft, ob innerhalb der letzten drei Monate Impfungen vorgenommen wurden. Außerdem wurde die aktuelle Medikation erfasst. Es wurde hierbei sowohl nach den verschreibungspflichtigen als auch nach rezeptfreien Medikamenten und

Nahrungsergänzungsmitteln gefragt. Besonderes Augenmerk wurde auf die Einnahmegewohnheiten von ASS und anderen Cyclooxygenase-Hemmern gerichtet. Darüberhinaus war das aktuelle Beschwerdebild von Interesse, insbesondere der Schweregrad einer bestehenden Angina pectoris. Der detaillierte Patientenerhebungsbogen ist in Abb. 10 und Abb. 11 dargestellt.

2.1.4. Bestimmung allgemeiner Laborparameter

Für jeden Patienten wurden die in Tab. 3 aufgeführten allgemeinen Laborparameter im Labor Prof. Arndt & Partner (Hamburg) bestimmt.

Kleines Blutbild		Klinische Chemie	
Parameter	Einheit	Parameter	Einheit
Erythrozyten	Anzahl/pl	Harnsäure	mg/dl
Hypochrome Erythrozyten	%	Serum-Kreatinin	mg/dl
Hämoglobin	g/dl	Gesamt-Cholesterin	mg/dl
Hämatokrit	Vol%	HDL-Cholesterin	mg/dl
MCV	fl	Risikofaktor Cholesterin/HDL	-
MCH	pg	LDL-Cholesterin	mg/dl
MCHC	g/dl	LDL/HDL	-
Thrombozyten	Anzahl/nl	Triglyceride	mg/dl
Leukozyten	Anzahl/nl	Glucose	mg/dl
-	-	CRP (supersensitiv)	mg/l

Tab. 3: Übersicht über die im Studienkollektiv bestimmten allg. Laborparameter

Darüberhinaus wurden der Blutdruck und die Herzfrequenz mittels eines vollautomatischen Blutdruckmessgerätes mit Oberarmmanschette bestimmt.

Patientenerhebungsbogen - Teil 1 -

Patienten-Nummer: Anschrift des Patienten: _____
 Telefonnummer: _____ _____

Geschlecht: männlich
 weiblich, in der Menopause? _____

Geburtsdatum: / / Anschrift des Hausarztes: _____
 Alter: Jahre _____
 Größe: cm _____
 Gewicht: kg _____

Kardiovaskuläre Risikofaktoren

Alter ≥ 60: ja nein
 positive Familienanamnese: ja nein , wenn ja: _____

Hypercholesterinämie: ja nein
 Hypertonie: ja nein
 Diabetes mellitus: ja nein , wenn ja: Typ I Typ II
 Adipositas: ja nein

Raucheranamnese: niemals Raucher derzeit Raucher:
 Nichtraucher seit _____ seit _____
 Zig. / Tag
 Pfeife / Zigarre

Diagnosekriterien

	nein	ja		Jahr
Myokardinfarkt in der Vorgeschichte:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>
vorherige Koronarintervention:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> Koronarangiographie *	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>
			<input type="checkbox"/> PTCA *	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>
			<input type="checkbox"/> Stent *	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>
			<input type="checkbox"/> Bypass-OP **	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>
Schlaganfall in der Vorgeschichte:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>
TIA in der Vorgeschichte:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>

* inkl. Anzahl mit Jahreszahl
 ** inkl. Anzahl der Bypässe

Weitere Erkrankungen

Impfung in den letzten 3 Monaten? ja nein , wenn ja: _____

Abb. 10: Patientenerhebungsbogen, Teil 1

Patientenerhebungsbogen - Teil 2 -

Dauermedikation

	nein	ja	→	Präparat	Dosis (z.B.: 1-0-0)
Aggregationshemmer *	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		_____	_____
Statine	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		_____	_____
β-Blocker	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		_____	_____
Diuretika	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		_____	_____
ACE -Hemmer	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		_____	_____
ATII -Rezeptorblocker	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		_____	_____
Nitrate	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		_____	_____
Ca-Kanal-Blocker	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		_____	_____

* Einnahme seit: _____ ; heute bereits eingenommen: ja nein

Weitere Medikamente

(auch pflanzliche Präparate, etc.)

Nahrungsergänzung

(Vitamine, Mineralstoffe, etc.)

Anwendung wirkstoffhaltiger Salben? _____

Analgetika-Einnahme? (z.B. Ibuprofen, Paracetamol, Propyphenazon, Naproxen, Diclofenac, Piroxicam, Indometacin, etc.):

Präparat(e)/Dosis: _____

Wie häufig? _____

Wann war die letzte Einnahme? _____

Essensgewohnheiten

Vegetarier ja nein

Aktuelle Beschwerden

Angina pectoris Beschwerden ja nein

wenn ja: seit _____

- bei starker Belastung
- bei normaler Belastung
- bei geringster Belastung
- in Ruhe

sonstige Beschwerden: _____

regelmäßige sportliche Betätigung: ja nein

wenn ja, was und wie häufig: _____

Abb. 11: Patientenerhebungsbogen, Teil 2

2.2. Probengewinnung

Alle Patienten hatten vor Blutentnahme bzw. Urinabgabe (morgens) eine mindestens achtstündige Nüchternperiode eingehalten. Lediglich das Trinken von Wasser war erlaubt.

2.2.1. Blutentnahme

Insgesamt wurden jedem Patienten 99,7 ml Blut durch Punktion der Kubitalvene mit einer Kanüle der Größe 21G entnommen. Der Innendurchmesser der Nadel entsprach 0,8 mm.

Es wurden pro Patient 11,7 ml EDTA-Blut benötigt. Kalium-EDTA war in den Monovetten vorgelegt, so dass bei vollständiger Befüllung eine Endkonzentration von 5,43 mM K₂-EDTA resultierte. Das EDTA-Blut wurde für die Bestimmung der allgemeinen Laborparameter, für die COX-1-Aktivitätsexperimente und für die DNA-Untersuchungen verwendet.

Ebenfalls für die Bestimmung der allgemeinen Laborparameter wurden 9 ml Blut in eine Monovette zur Serumgewinnung abgenommen.

Darüberhinaus wurden 9 ml heparinisertes Blut für die Durchführung der COX-2-Aktivitätsversuche gewonnen. In den entsprechenden Monovetten war Lithium-Heparin in einem Konzentrationsbereich von 10 bis 30 I.E. pro ml Blut auf ein Kunststoffgranulat aufgebracht.

Für die Herstellung von plättchenreichem und plättchenarmen Plasma, zum einen zur Untersuchung der Thrombozytenaggregation und zum anderen zur Gewinnung von Thrombozyten für Protein-Untersuchungen, wurden 70 ml Citrat-Blut entnommen. Es wurde eine 0,106 molare Citrat-Lösung in den Monovetten vorgelegt, so dass ein Mischungsverhältnis von 1:10 (1 Teil Citrat-Lösung + 9 Teile Blut) resultierte. Es wurde darauf geachtet, dass es weder bei der Blutentnahme noch beim anschließenden Vermischen von Blut und Antikoagulans zur Bildung von Schaum kam, um eine vorzeitige Thrombozytenaktivierung zu vermeiden. Außerdem wurde das Blut nach Möglichkeit nur aus leicht gestauter Vene abgenommen, da eine zu starke Stauung eine lokale Hyperfibrinolyse auslösen kann. Des Weiteren wurde auf die Reihenfolge der Befüllung der Monovetten geachtet: Die Citrat-Monovetten wurden nicht als erstes abgenommen, um Störfaktoren, die zu Beginn einer Blutentnahme auftreten können, wie z.B. die Beimengung von Gewebsflüssigkeit und damit Gewebsthromboplastin, zu umgehen.

2.2.2. Präparation der Urinproben

Jeder Patient gab am Morgen des Untersuchungstages eine Urinprobe ab. Die Urinbehältnisse waren mit einem antioxidativen Gemisch aus einem Teil 4-Hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxyl (freies Radikal) und einem Teil EDTA vorpräpariert. Der Urin wurde in 4 Aliquots à 10 ml in Polypropylen-Röhrchen bei -20°C und bei -80°C bis zur späteren Aufarbeitung eingefroren.

2.3. Bestimmung der Thrombozytenaggregation

Die quantitative Bestimmung der Thrombozytenaggregation erfolgte turbidimetrisch mit Hilfe der von Born entwickelten Methode (Born und Cross 1963). Sie beruht auf der Eigenschaft, dass die optische Dichte einer Partikelsuspension von der Partikelzahl und nicht von der Partikelgröße abhängig ist. Plättchenreiches Plasma (PRP) weist eine sehr geringe Durchlässigkeit für langwelliges Licht auf. Nach Zusatz von Thrombozytenagonisten zum PRP setzt die Aggregation, d.h. die Bildung großer Thrombozytenaggregate ein, die sich durch eine Zunahme der Lichttransmission äußert. Dabei wird das PRP mit Hilfe eines kleinen Magnetrührers in Bewegung gehalten, um eine Sedimentation nicht aggregierter Thrombozyten zu verhindern. Die Lichttransmission wird fortlaufend photometrisch registriert und in Form einer Aggregationskurve kontinuierlich aufgezeichnet. Die prozentuale Lichttransmission dient als Maß für die Aggregabilität der Thrombozyten. Vor Beginn der Messung wird das zu untersuchende PRP auf einen Wert von 0% Transmission und das dazugehörige plättchenarme Plasma (PPP) auf einen Wert von 100% Transmission eingestellt. Da diese Einstellungen bei der Untersuchung verschiedener Plasmaproben stets erneut für das jeweilige PRP und PPP vorgenommen werden, ist es auf diese Weise möglich, die Transmissionsunterschiede der verschiedenen Plasmen, z.B. die Färbung, auszugleichen. Die Messungen wurden in einem AFACT Zwei-Kanal-Aggregometer (LABOR Fibrinometer® Ahrensburg) durchgeführt. Das Messprinzip ist schematisch in Abb. 12 dargestellt.

2.3.1. Herstellung von plättchenreichem und plättchenarmen Plasma

Unmittelbar nach Blutentnahme wurde durch Zentrifugation des Citrat-Vollblutes für 15 Minuten bei 200 g und 25°C plättchenreiches Plasma gewonnen. Dieses wurde vorsichtig

mit Hilfe einer Pipette abgehoben und bis zur Bestimmung der Aggregation bei Raumtemperatur aufbewahrt. Um plättchenarmes Plasma zu gewinnen, wurde das Sediment erneut zentrifugiert, diesmal jedoch bei 2000 g für 10 Minuten (siehe Abb. 13).

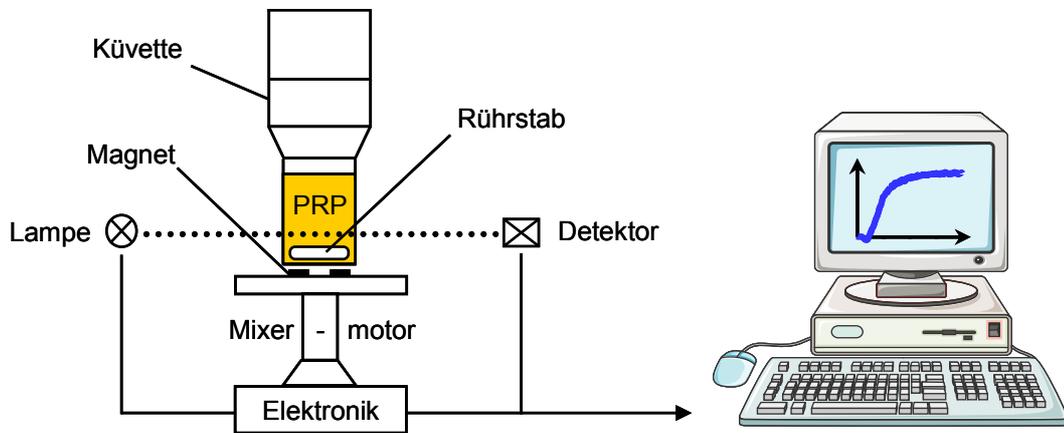


Abb. 12: Schematische Darstellung des Messprinzips eines Aggregometers

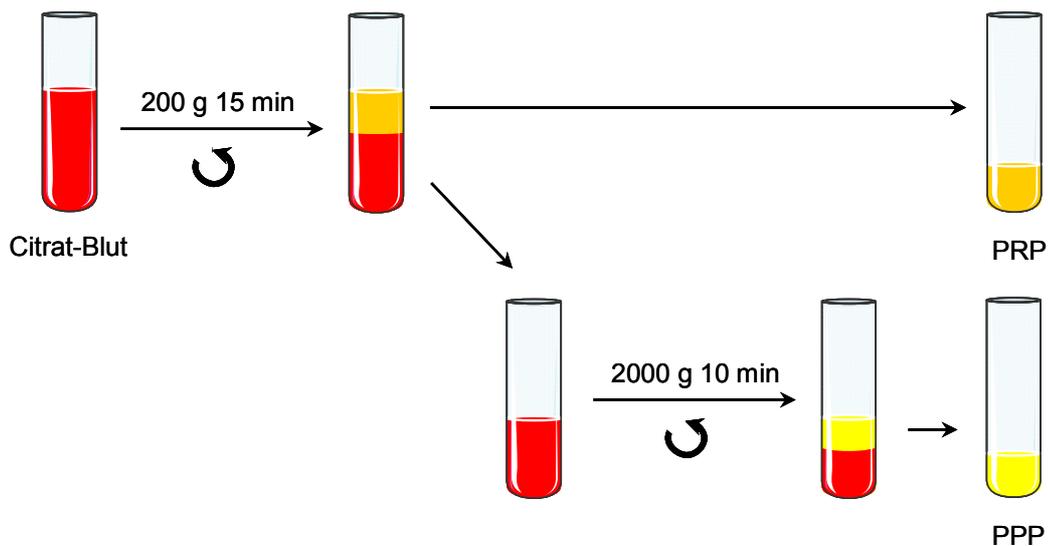


Abb. 13: Gewinnung von plättchenreichem und plättchenarmem Plasma

2.3.2. Aggregationsinduktoren

Als Thrombozytenagonisten wurden drei verschiedene Substanzen verwendet: Kollagen, Arachidonsäure und Adenosin-5'-diphosphat (siehe Abb. 14).

Das verwendete Kollagen-Reagenz Horm[®] besteht aus 1 mg nativen Kollagenfibrillen equiner Sehnen, die in 1 ml einer isotonen Glucoselösung (pH 2,7 – 2,9) suspendiert vorliegen. Die

Verdünnungen dieser Kollagen-Suspension wurden an jedem Versuchstag frisch hergestellt. Als Verdünnungsmedium wurde ein isotoner Aggregationspuffer (Horm[®] Puffer) verwendet, so dass im PRP Endkonzentrationen von 0,5, 1, 2, 5 und 10 mg/l resultierten.

Im Laufe der Studie musste einmal die Kollagen-Charge gewechselt werden. Da mit der ersten Charge kontinuierlich niedrigere Aggregationswerte gemessen wurden, wurden diese Werte durch die Einrechnung eines Faktors korrigiert.

Aufgrund der extrem starken Oxidationsempfindlichkeit der Arachidonsäure wurde diese als Lyophilisat zunächst in Eis gekühltem, hochreinem Wasser (Ultrapur[®]) gelöst. Anschließend wurden – ebenfalls auf Eis – Aliquots für die einzelnen Versuchstage hergestellt, sofort mit Argon überschichtet und unverzüglich bei -80°C eingefroren. Die Konzentration der Lösung wurde so berechnet, dass sich eine Endkonzentration von 1 mmol/l Arachidonsäure im PRP ergab.

Adenosin-5'-diphosphat (ADP) wurde in physiologischer Kochsalz-Lösung gelöst und in einer Endkonzentration von 2 µmol/l eingesetzt. Diese Lösung wurde am Versuchstag stets frisch hergestellt.



Abb. 14: Thrombozytenagonisten

2.3.3. Durchführung der Aggregationsversuche

Da das Ausmaß der Thrombozytenaggregation deutlich vom Zeitpunkt der Durchführung abhängig ist, wurde für jeden Patienten ein Zeitplan mit festgelegter Reihenfolge der einzelnen Untersuchungen eingehalten (siehe Abb. 15). Außerdem wurde berücksichtigt, dass die Messungen mit einer Testsubstanz (ASS bzw. Rofecoxib) und der dazugehörigen Kontrolle stets aufeinander folgend durchgeführt wurden. In der Regel konnte der Zeitplan innerhalb von zwei Stunden nach Gewinnung des PRP abgearbeitet werden. Um eine

Kontrolle über die Konstanz der Aggregationsmesswerte im Untersuchungszeitraum zu erhalten, wurde zu Beginn, in der Mitte und am Ende der Messreihe eine Kontrollbestimmung der Aggregation mit jeweils 1 mg/l Kollagen vorgenommen. Eine Abweichung der drei Kontrollwerte von bis zu 10% wurde akzeptiert.

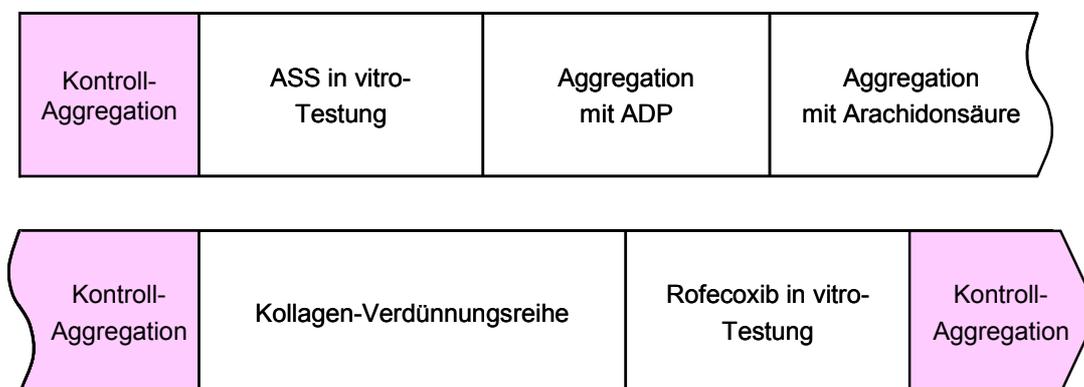


Abb. 15: Zeitplan zur Durchführung der Aggregationsmessungen

Jede Messung wurde als Doppelbestimmung durchgeführt. Pro Testansatz wurden 250 µl PRP in eine Küvette pipettiert und für 15 Minuten bei 37°C vorgewärmt. Anschließend wurde die Küvette in den Strahlengang des auf 37°C beheizten Aggregometers platziert und unter konstanter Rührung (1000 Umdrehungen pro Minute) 10 µl Thrombozytenagonist hinzugefügt. Unmittelbar nach Zusatz des Agonisten wurde die Messung gestartet und über vier Minuten aufgezeichnet. Die Aggregationsreaktion wurde nach Messende gestoppt, indem der Aggregationsüberstand sofort abpipettiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren wurde. Nach Fertigstellung einer gesamten Messreihe wurden die Aggregationsüberstände nach Arachidonsäure-Induktion bei -80°C gelagert (aufgrund der starken Oxidationsempfindlichkeit der Arachidonsäure) und alle anderen Überstände bei -20°C. Später wurde in den Überständen die Konzentration an Thromboxan B₂ ermittelt (siehe Kapitel 2.4.).

2.3.4. Testsubstanzen

Es wurde bei jedem Patienten der Einfluss von ASS und Rofecoxib in vitro auf die Thrombozytenaggregation untersucht (siehe Abb. 16).

1000 µl PRP wurden mit 10 µl einer wässrigen ASS-Lösung (10 mM) versetzt, so dass eine Endkonzentration von 100 µM resultierte. Es handelt sich hierbei um eine

Standardkonzentration, die zur Einteilung der Patienten in die unterschiedlichen „ASS-Resistenz“-Typen verwendet wird (Weber et al. 2002). ASS wurde in Aqua ad iniectabilia gelöst und zwar stets direkt vor Versuchsbeginn, da ASS in Wasser einer relativ schnellen Esterhydrolyse unterliegt. Pro Testansatz wurden 250 µl des mit ASS versetzten PRP 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Es folgte die Aggregationsmessung, wie in Abschnitt 2.3.3. beschrieben, direkt im Anschluss an eine Kontrollbestimmung ohne ASS-Zusatz in vitro. Als Thrombozytenagonist wurde Kollagen in einer Endkonzentration von 1 mg/l eingesetzt.

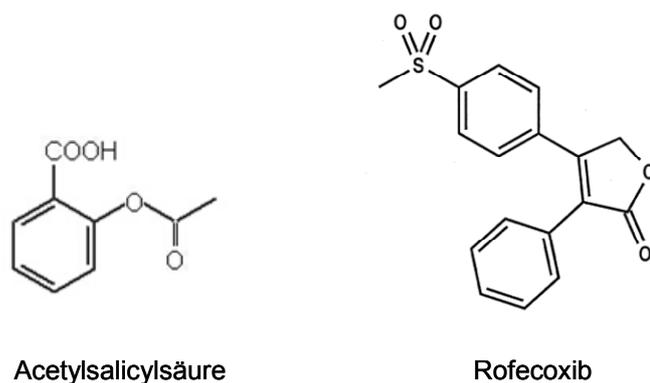


Abb. 16: Substanzen für die in vitro Testung

Für die Untersuchungen mit Rofecoxib wurde eine Endkonzentration von 10 µM gewählt, da die COX-2 bei dieser Konzentration nahezu vollständig inhibiert wird, während es kaum zu einer COX-1-Hemmung kommt (siehe Abb. 17).

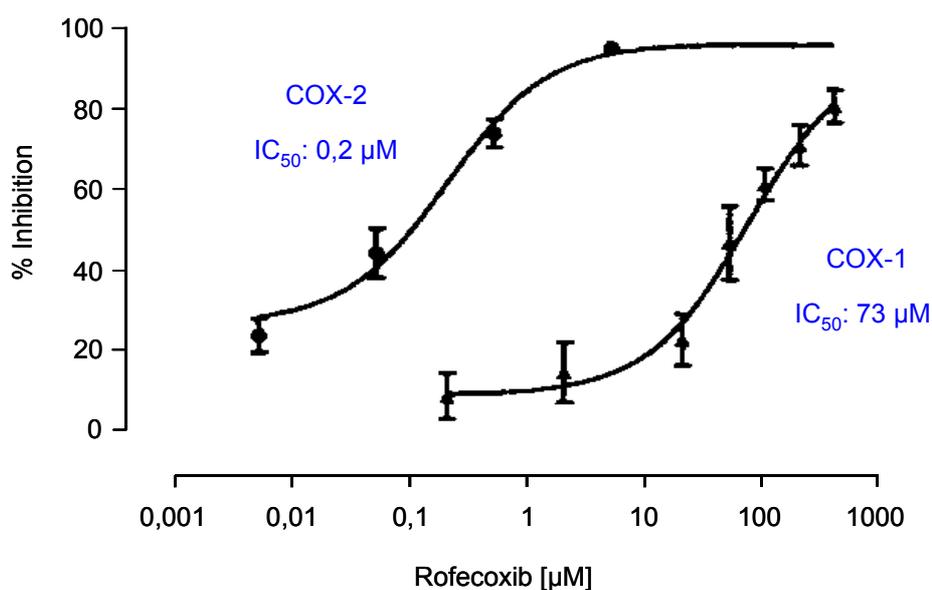


Abb. 17: Konzentrationsabhängige Hemmung der COX-1 und COX-2 durch Rofecoxib (nach Patrono 2001)

Da Rofecoxib in alkoholischen Lösungsmitteln sehr schlecht löslich und in Wasser praktisch unlöslich ist, musste Rofecoxib in DMSO gelöst werden. In Vorversuchen konnte jedoch festgestellt werden, dass sich DMSO bereits in niedrigen Konzentrationen negativ auf die Thrombozytenaggregation auswirkt. Je höher der Anteil an DMSO, desto stärker wurde die Aggregation vermindert (siehe Abb. 18).

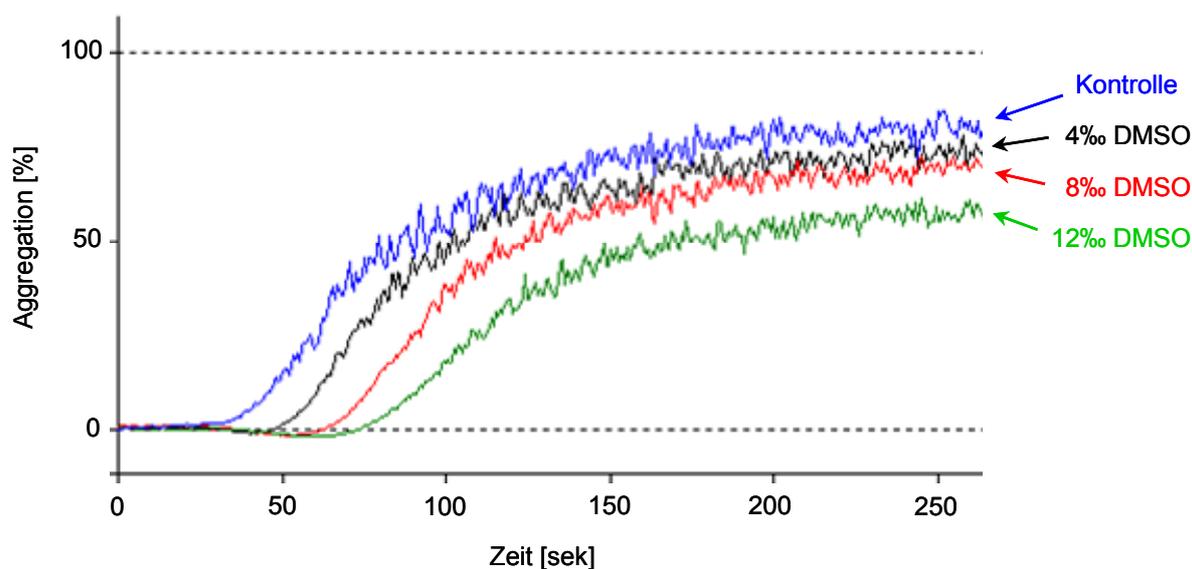


Abb. 18: Einfluss des Lösungsmittels DMSO auf die Thrombozytenaggregation

Aus diesem Grund wurde ein Versuchsansatz gewählt, in dem nur 1‰ DMSO als Endkonzentration im PRP vorlag, da es mit dieser Konzentration zu keiner bzw. allenfalls nur zu einer geringfügigen Beeinflussung der Aggregation kommt. D.h. es wurde 1 µl einer 10 mM Rofecoxib-Lösung in 1000 µl PRP pipettiert (Endkonzentration für Rofecoxib: 10 µM). Hiervon wurden pro Testansatz 250 µl für 15 Minuten bei 37°C inkubiert und anschließend die Aggregation mit 1 mg/l Kollagen bestimmt. Ein Kontrollansatz, bei dem nur mit dem Lösungsmittel DMSO inkubiert wurde, wurde gleich im Anschluss an die Rofecoxib-Messung durchgeführt.

2.3.5. Auswertung der Aggregationskurven

Die Aggregationsmesskurven wurden mit Hilfe der AFACT-Software 1.4 dargestellt und ausgewertet.

In Abb. 19 ist eine typische Aggregationskurve dargestellt, wie sie nach Stimulation mit z.B. Kollagen aussehen kann. Nach einer kurzen Verzögerungsphase ist zunächst häufig eine

Abnahme der Lichttransmission zu beobachten, die auf die Formveränderung (sog. „shape change“) der Thrombozyten zurückgeführt wird. Im weiteren Verlauf steigt die Aggregationskurve an und nähert sich nach kurzer Zeit asymptotisch dem Wert für die maximale Aggregation.

Zur Auswertung der Aggregationskurven wurden vier Parameter herangezogen:

1. die maximale Aggregation in Prozent,
2. die maximale Steigung in Prozent pro Minute,
3. die lag time in Sekunden, d.h. die Zeit bis zum Erreichen der maximalen Steigung,
4. die Fläche unter der Kurve (AUC) in Prozent x Minuten.

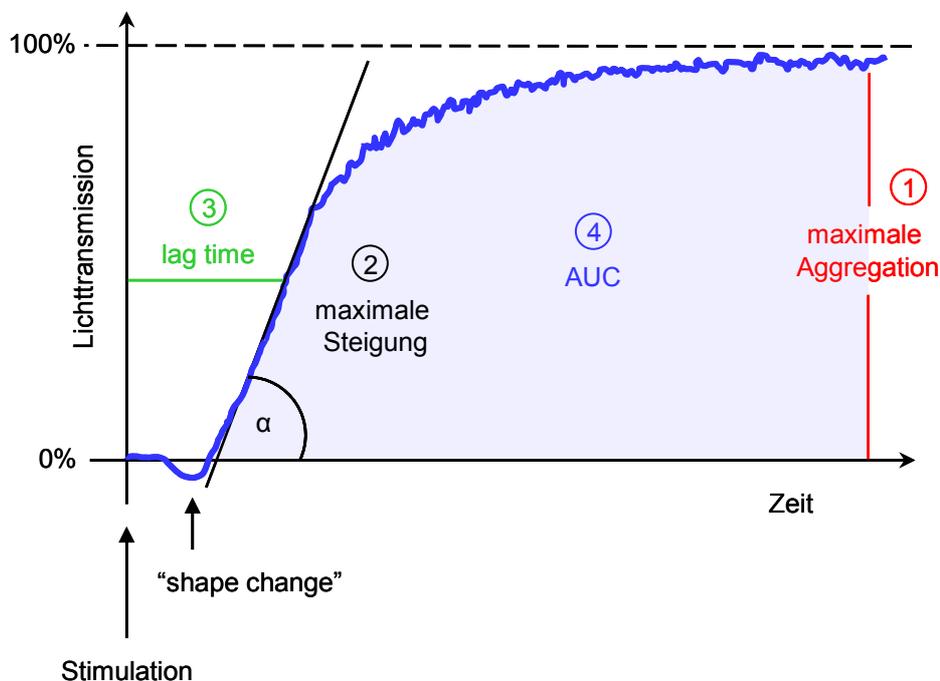


Abb. 19: Messparameter zur Auswertung der Aggregationskurven

Bei der Verwendung von ADP als Thrombozytenagonist ist in der Regel ein biphasischer Verlauf der Aggregationskurven zu beobachten (siehe Abb. 20, blaue Kurve). Die erste Phase, die durch den exogenen Aggregationsinduktor ausgelöst wird, führt zunächst zur reversiblen Zusammenlagerung von Thrombozyten (primäre Aggregation). Nach vorübergehendem Erreichen eines Plateaus schließt sich die zweite Phase an, die durch die Freisetzung der aggregationsfördernden Substanzen aus den thrombozytären Speichergranula gekennzeichnet ist (sekundäre, irreversible Aggregation).

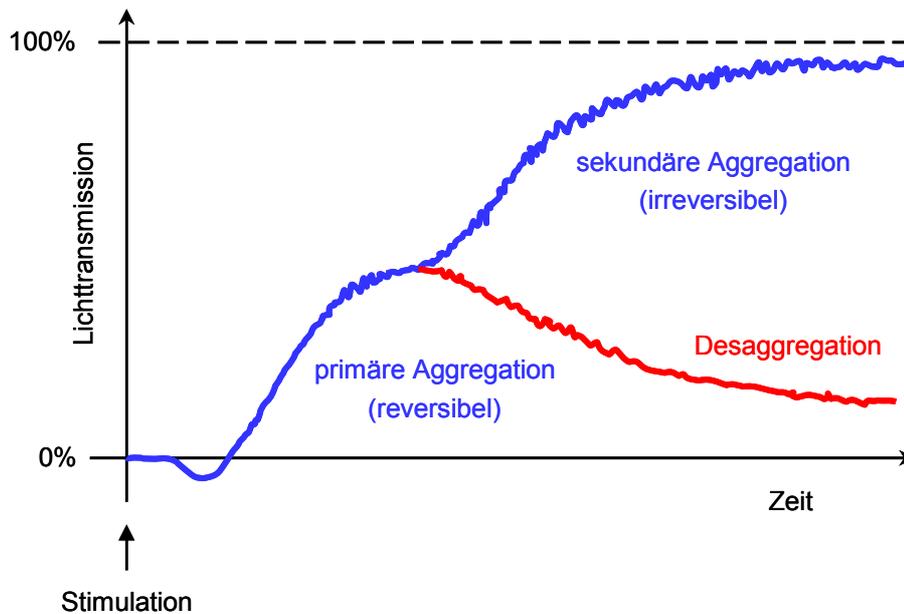


Abb. 20: Aggregationskurve mit biphasischem Verlauf (blau) bzw. Desaggregation (rot)

Ist diese Freisetzungsreaktion gehemmt, d.h. entfällt die sekundäre Aggregation, so desaggregieren die in der primären Aggregationsphase gebildeten lockeren Thrombozytenaggregate unter Einwirkung der Scherkräfte des Rührers (siehe Abb. 20, rote Kurve). Die dadurch resultierende Abnahme der Lichttransmission, die unter Umständen wieder den Ausgangswert des PRP annehmen kann, wurde ebenfalls bei der Auswertung berücksichtigt.

2.4. Bestimmung der Kollagen-induzierten Thromboxan B₂-Bildung

Zur Charakterisierung der Kollagen-induzierten Thrombozytenaggregation wurde neben der Auswertung der Aggregationskurven (siehe Abschnitt 2.3.5.) das während der Aggregationsreaktion gebildete Thromboxan A₂ (TxA₂) bestimmt. Da Thromboxan A₂ sehr schnell ($t_{1/2}$ ca. 32 sek bei 37°C, pH 7,4) zum wirkungslosen, aber stabileren Thromboxan B₂ (TxB₂) gespalten wird (siehe Abb. 21), wurde letzteres quantifiziert.

Zunächst wurden die gewonnenen Aggregationsüberstände (siehe Abschnitt 2.3.3.) aufgereinigt. Hierzu wurden, nach vollständiger Abtrennung der Thrombozytenaggregate durch Zentrifugation (12.000 g, 5 min), jeweils 100 µl Überstand in 400 µl kaltes Methanol pipettiert. Die gefällten Serumproteine wurden abzentrifugiert (12.000 g, 5 min, 4°C) und

verworfen. Da bei der TxB_2 -Bestimmung organische Lösungsmittel stören, wurden die methanolischen Überstände im Rotations-Vakuum-Konzentrator zur Trockne eingengt (40°C, 2 h) und bis zur weiteren Bearbeitung bei -20°C eingefroren.

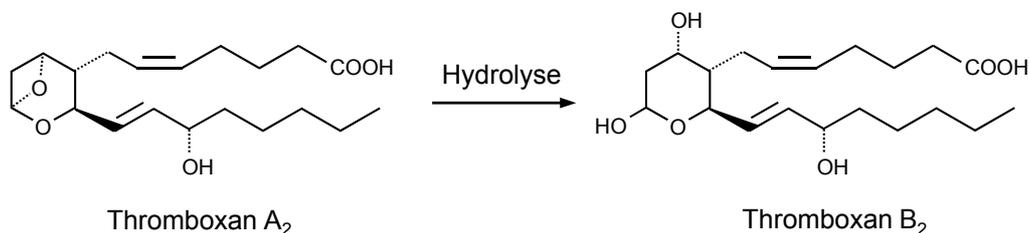


Abb. 21: Abbau von Thromboxan A_2 zum stabileren Thromboxan B_2

Die TxB_2 -Quantifizierung erfolgte mit Hilfe eines kompetitiven Enzymimmunoassays (Pradelles et al. 1985). Das Prinzip beruht auf der Konkurrenz des zu bestimmenden TxB_2 und eines TxB_2 -Acetylcholinesterase (AChE)-Konjugats („ TxB_2 -Tracer“) um eine begrenzte Anzahl TxB_2 -spezifischer Antikörper. Da die Konzentration des TxB_2 -Tracers konstant gehalten wird, während die des TxB_2 variiert, ist die Konzentration des an die Antikörper gebundenen TxB_2 -Tracers invers proportional zu der gesuchten TxB_2 -Konzentration. Nach Bindung der Antikörper- TxB_2 -Komplexe bzw. der Antikörper- TxB_2 -Tracer-Komplexe an einen immobilisierten primären Antikörper, und nach Abwaschen aller ungebundenen Substanzen wird mit Ellman's Reagenz, bestehend aus Acetylthiocholin (Substrat der AChE) und 5,5'-Dithio-bis-(2-Nitrobenzoesäure), inkubiert. Das durch die enzymatische Reaktion der AChE gebildete Thiocholin reagiert mit der 5,5'-Dithio-bis-(2-Nitrobenzoesäure) zu einem gelben Farbstoff, der 5-Thio-2-Nitrobenzoesäure, welche ihr Absorptionsmaximum bei 412 nm hat. Die Farbintensität wird spektrophotometrisch bestimmt und verhält sich proportional zur Menge des gebundenen TxB_2 -Tracers bzw. invers proportional zur Menge des freien TxB_2 .

Die von den Serumproteinen befreiten und zur Trockne eingengten Aggregationsüberstände wurden in EIA-Puffer aufgenommen. Anschließend erfolgte die Durchführung des Enzymimmunoassays nach den Vorgaben des Herstellers (Cayman). Alle Proben wurden doppelt bestimmt. Es wurden auf jeder Mikrotiterplatte Qualitätskontrollen mitgeführt. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Software Magellan 4.0. Anhand einer Standardkurve wurden die TxB_2 -Konzentrationen in pg/ml ermittelt. Die untere Detektionsgrenze lag durchschnittlich bei 50 pg TxB_2 pro ml Aggregationsüberstand. In Abb. 22 ist eine TxB_2 -Standardkurve exemplarisch dargestellt.

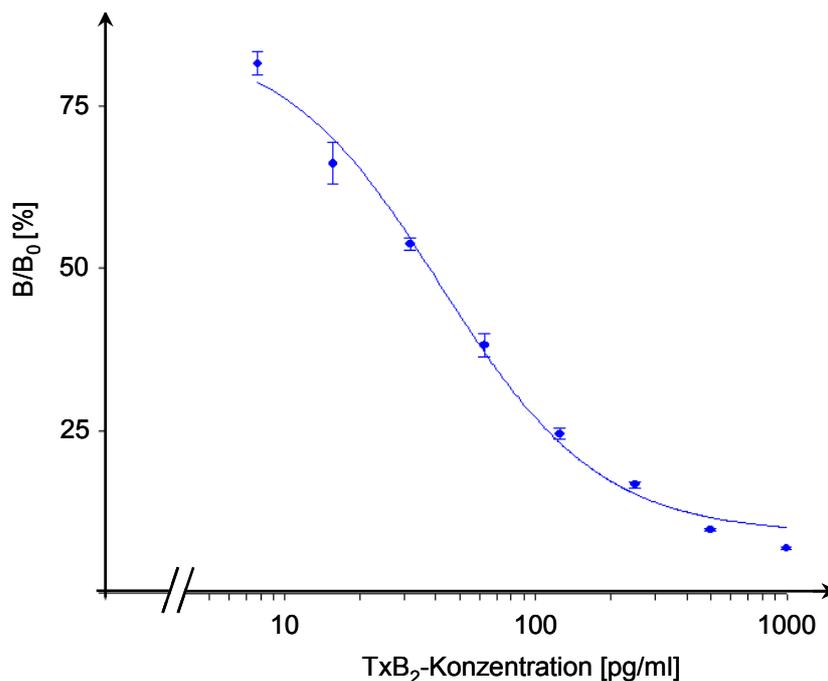


Abb. 22: Thromboxan B₂-Standardkurve. B₀ = maximale Menge des gebundenen TxB₂-Tracers in Abwesenheit des zu bestimmenden freien TxB₂; B = Menge des gebundenen TxB₂-Tracers in Anwesenheit des zu bestimmenden freien TxB₂.

2.5. Bestimmung der ASS-Metabolite im Urin mittels HPLC

Die ASS-Metabolite Salicylsäure und Salicylursäure (o-Hydroxyhippursäure) wurden im Urin mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) bestimmt. Es wurde eine Methode entwickelt, die drei in der Vergangenheit bereits beschriebene Methoden miteinander verbindet (Bakar und Niazi 1983, Krivosíková et al. 1996, Siegmund et al. 1998).

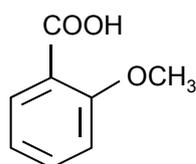
2.5.1. Extraktion von Salicylsäure und Salicylursäure

Nach dem Auftauen der bei -20°C gelagerten Urinproben wurden jeweils 500 µl mit einer 6 N HCl auf einen pH-Wert von 2 eingestellt. Anschließend wurde jede Probe mit 20 µl einer 10 mmolaren ethanolischen o-Anissäure-Lösung versetzt, so dass eine Endkonzentration von 400 µmol/l resultierte. o-Anissäure diente als interner Standard (siehe Abb. 23).

Zur Extraktion wurden die Proben mit jeweils 3 ml Diethylether versetzt und gründlich gevortext. Die Etherphase wurde jeweils vorsichtig abpipettiert und unter Stickstoff

eingengt. Die Rückstände wurden in je 200 µl des HPLC-Laufmittels aufgenommen und in Autosamplergefäße überführt.

Es wurden grundsätzlich Kontrollen nach dem gleichen Schema mit aufgearbeitet. Bei diesen handelte es sich um Urin einer Charge, der vor dem Einfrieren Salicylsäure und Salicylursäure jeweils in einer Endkonzentration von 100 µmol/l zugesetzt worden war.



o-Anissäure (2-Methoxybenzoesäure)

Abb. 23: o-Anissäure als interner Standard zur Quantifizierung von Salicylsäure und Salicylursäure

2.5.2. HPLC-Analytik von Salicylsäure und Salicylursäure

Der Nachweis der Salicylsäure bzw. Salicylursäure wurde mit einem HPLC-Gerät der Firma Dionex durchgeführt. Die Auftrennung erfolgte mittels einer C₁₈-Säule (Macherey-Nagel) der Dimension 250 mm x 4,6 mm ID sowie einer Korngröße von 5 µm und einer Porenweite von 100 Å. Die Temperatur des Säulenofens wurde auf 35°C konstant gehalten. Die Autosampler-Temperatur betrug 20°C. Es wurden pro Probe 10 µl autoinjiziert. Die Substanzen wurden isokratisch mit einem Laufmittel (35% Methanol, 65% Aqua purificata, pH 2,5) bei einem Fluss von 1 ml/min aufgetrennt und anschließend mit Hilfe eines Diodenarray-Systems bei 230 nm und 305 nm detektiert. Die Laufzeit betrug pro Probe 40 min.

Zur Etablierung der Methode wurde zunächst ein Gemisch der Reinsubstanzen gelöst in Aqua ad iniectabilia aufgetrennt. Ein Beispiel-Chromatogramm, das bei einer Wellenlänge von 305 nm aufgenommen wurde, ist in Abb. 24 dargestellt.

Zur Ermittlung der Retentionszeiten (t_r) der einzelnen Substanzen in der Matrix Urin, wurden die drei Substanzen einer Kontroll-Urinprobe zugesetzt (Salicylsäure und Salicylursäure jeweils 100 µmol/l, *o*-Anissäure 400 µmol/l). Das Chromatogramm ist in Abb. 25 für $\lambda = 305$ nm dargestellt: Für Salicylursäure wurde eine Retentionszeit von 8,8 min festgestellt, für *o*-Anissäure eine t_r von 11,7 min. Salicylsäure wurde am längsten zurückgehalten mit einer t_r von 20,5 min.

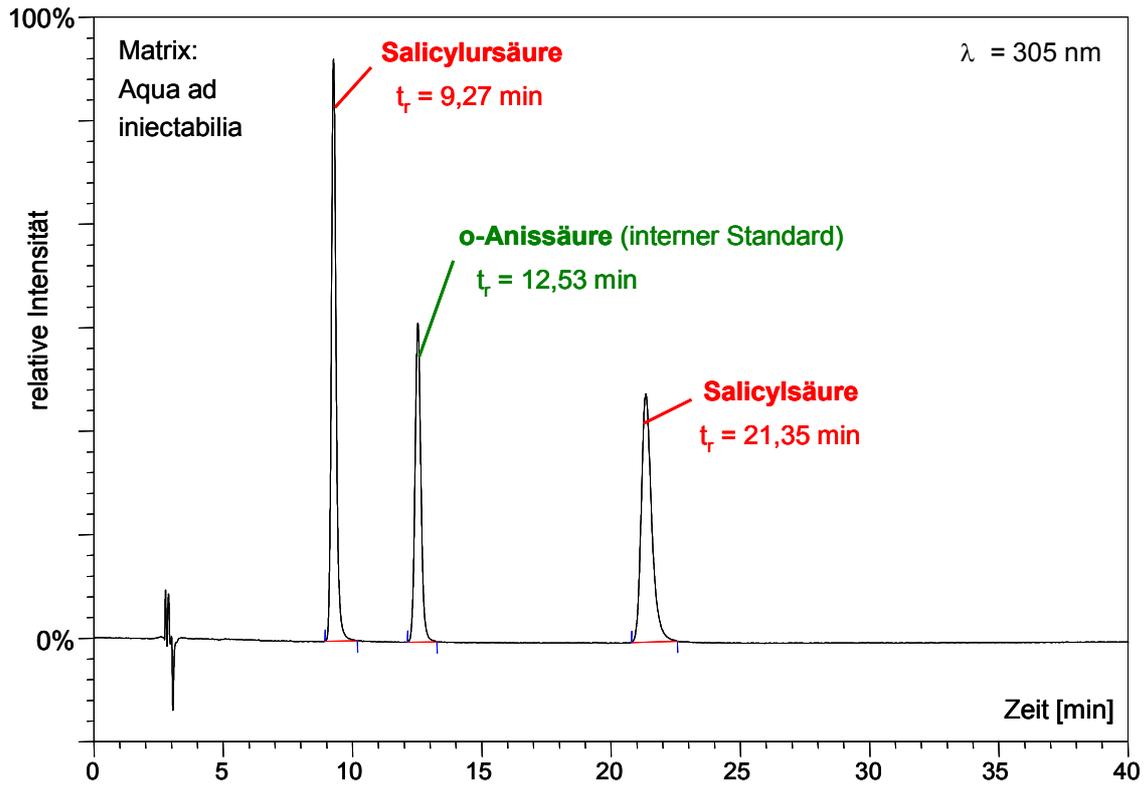


Abb. 24: HPLC-Chromatogramm der Reinsubstanzen Salicylursäure, o-Anissäure und Salicylsäure gelöst in Aqua ad iniectabilia

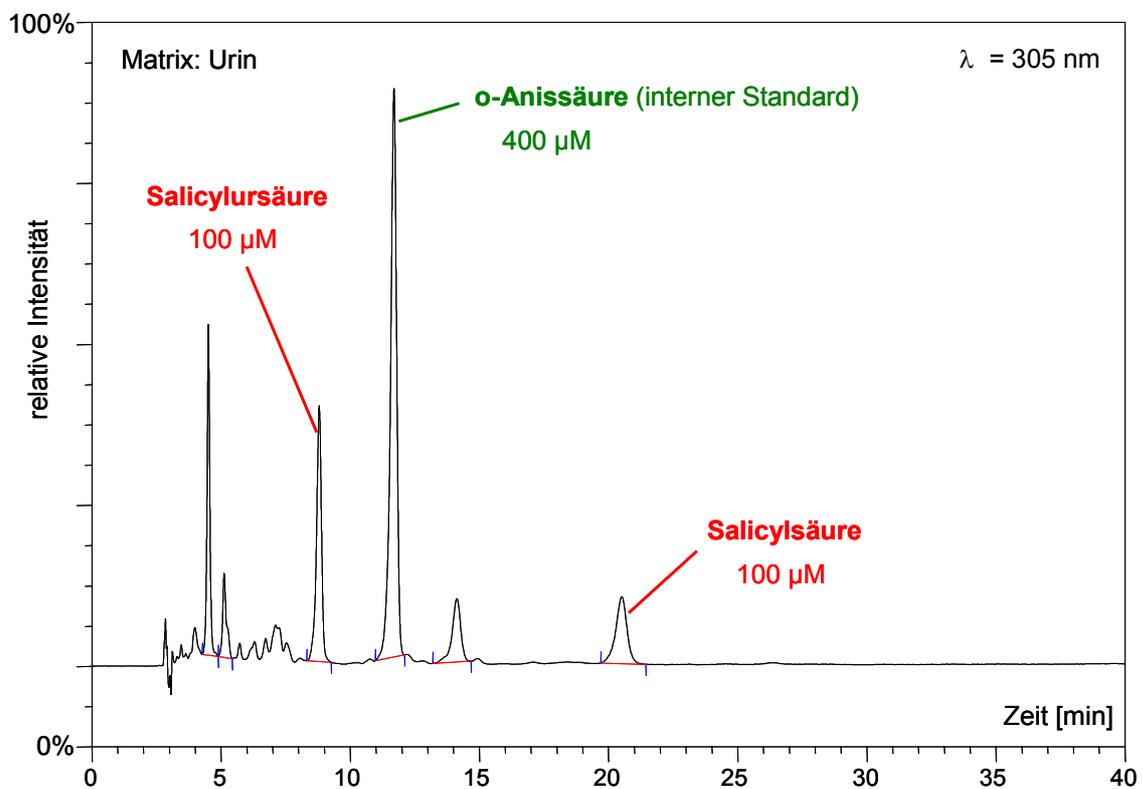


Abb. 25: HPLC-Chromatogramm einer Kontroll-Urinprobe, die vor der Etherextraktion mit $100 \mu\text{M}$ Salicylursäure, $400 \mu\text{M}$ o-Anissäure und $100 \mu\text{M}$ Salicylsäure versetzt wurde.

2.5.3. Berechnung der Salicylsäure- und Salicylursäure-Exkretion

Die Auswertung der HPLC-Chromatogramme erfolgte mit Hilfe der Software Chromeleon Version 6.6 (Dionex).

Die Konzentrationen der ASS-Metabolite Salicylsäure und Salicylursäure in den Urinproben der Patienten wurden mit Hilfe der bekannten Konzentration des internen Standards berechnet, indem jeweils die Peakfläche des Metaboliten mit der Peakfläche des internen Standards ins Verhältnis gesetzt wurde (siehe Abb. 26).

$$\text{ASS-Metabolit-Konz. } [\mu\text{mol/l}] = \frac{\text{ASS-Metabolit-Peakfläche}}{\text{o-Anissäure-Peakfläche}} \times \text{o-Anissäure-Konz. } [\mu\text{mol/l}]$$

Abb. 26: Formel zur Berechnung der ASS-Metabolit-Konzentrationen im Urin

Im Labor Prof. Arndt & Partner (Hamburg) wurde für jede Urinprobe die Kreatinin-Konzentration in g/l bestimmt. Anhand dieser wurde die Exkretion der Salicylsäure bzw. Salicylursäure errechnet. Diese wurde in nmol/mg Kreatinin angegeben.

2.6. Untersuchung der COX-1- und COX-2-Aktivität im Vollblut

Zur Bestimmung der COX-1- bzw. COX-2-Enzymaktivität im Vollblut wurde die Methode nach Brideau modifiziert eingesetzt (Brideau et al. 1996).

2.6.1. In vitro COX-1-Aktivitätsassay

Für den COX-1-Aktivitätsassay wurde frisches EDTA-Vollblut benötigt. Es wurden pro Patient vier Aliquots à 1000 µl in silikonisierte Gefäße der Firma Costing (New York, USA) überführt. Im Folgenden wurde eines dieser Aliquots mit einer ASS-Lösung versetzt, ein weiteres mit einer Rofecoxib-Lösung; die übrigen zwei Aliquots wurden mit den entsprechenden Lösungsmitteln (Wasser bzw. DMSO) zur Kontrolle behandelt. Die eingesetzten Konzentrationen und Volumina sind in Tab. 4 angegeben. Nach vorsichtigem Vermischen erfolgte eine 15-minütige Inkubation bei 37°C. Anschließend wurde die blutgerinnungshemmende Wirkung des Kalium-EDTA (5,43 mM K₂-EDTA) durch Zusatz

von jeweils 20 µl einer äquimolaren Calciumchlorid-Lösung (entsprechend 271,5 mM CaCl₂) aufgehoben. Die Sera wurden nach einer Gerinnungszeit von einer Stunde bei 37°C und anschließender Zentrifugation (12.000 g für 5 min) abgetrennt. Zur Fällung der Proteine wurden jeweils 300 µl Serum mit je 1200 µl Methanol (eiskalt) versetzt und gevortext. Nach Entfernen der Serumproteine durch Zentrifugation (12.000 g, 5 min, 4°C) wurden die methanolischen Überstände in mehreren Aliquots bei -20°C eingefroren.

Aliquot (COX-1-Assay)	Aliquot (COX-2-Assay)	Substanz	Konzentration der Arbeitslösung	Volumen	Endkonzentration
1	-	ASS	10 mM	10 µl	100 µM
2	-	Wasser	-	10 µl	-
3	1	Rofecoxib	10 mM	1 µl	10 µM
4	2 und 3	DMSO	-	1 µl	1 ‰

Tab. 4: Konzentrationen und Volumina der im COX-1- bzw. COX-2-Aktivitätsassay eingesetzten Substanzen ASS und Rofecoxib. Die Lösungen wurden täglich frisch hergestellt. Aqua ad iniectabilia diente als Lösungsmittelkontrolle für den Ansatz mit ASS, DMSO für den Rofecoxib-Ansatz.

Der Ablauf eines COX-1-Aktivitätsassays ist in Abb. 27 schematisch dargestellt. Das bei der Gerinnungsreaktion entstandene Thromboxan B₂ (TxB₂) dient als Maß für die Aktivität der COX-1. Die Quantifizierung des TxB₂ erfolgte aus den methanolischen Überständen mit Hilfe eines Enzymimmunoassays (EIA) wie bereits in Kapitel 2.4. beschrieben.

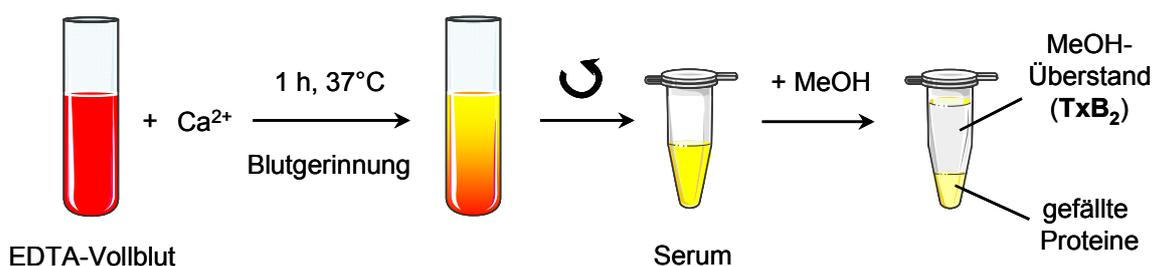


Abb. 27: Schematische Darstellung des COX-1-Aktivitätsassays

2.6.2. In vitro COX-2-Aktivitätsassay

Zur Bestimmung der COX-2-Aktivität im Vollblut wurde pro Patient ein Röhrchen heparinisertes Blut benötigt. Es wurde ein 1000 µl-Aliquot mit Rofecoxib (Ansatz 1), zwei

weitere Aliquots mit DMSO (Ansatz 2 und 3) versetzt und anschließend 15 min bei 37°C inkubiert. Die eingesetzten Volumina und Konzentrationen entsprechen denjenigen des COX-1-Assays (siehe Tab. 4). Den Ansätzen 1 und 2 wurde eine hochkonzentrierte Lipopolysaccharid (LPS)-Lösung (von *E. coli*, Serotyp 0111: B4, 500.000 EU/mg, verdünnt in PBS) zugesetzt, so dass jeweils eine Endkonzentration von 100 µg LPS/ml resultierte. Es schloss sich eine 24-stündige Inkubation bei 37°C an, während der es infolge des LPS-Zusatzes zu einer Induktion der COX-2 kam. Um die COX-2-Basalaktivität ohne LPS zu ermitteln, wurde der Ansatz 3 ausschließlich mit PBS behandelt. Zur Plasma-Gewinnung wurden die Proben am nächsten Tag bei 12.000 g für 5 min zentrifugiert. Die Fällung der Plasma-Proteine erfolgte, indem jeweils 300 µl Plasma mit 1200 µl kaltem Methanol vermischt wurden. Die Proteine wurden durch Zentrifugation (12.000 g, 5 min, 4°C) abgetrennt und die methanolischen Überstände in mehreren Aliquots bei -80°C eingefroren.

Das Prinzip des COX-2-Aktivitätsassays ist in Abb. 28 zusammengefasst. Das durch die COX-2 gebildete Prostaglandin E₂ (PGE₂) dient als Maß für die COX-2-Aktivität. PGE₂ wurde mit Hilfe eines Enzymimmunoassays quantifiziert (Prostaglandin E₂ EIA Kit – Monoclonal, Firma Cayman). Voraussetzung für den Einsatz im EIA war, wie bei der TxB₂-Bestimmung, zunächst das Entfernen des Methanols im Rotations-Vakuum-Konzentrator sowie das Wiederaufnehmen der Rückstände in EIA-Puffer. Das Prinzip der PGE₂-Bestimmung entspricht dem des TxB₂-EIA (siehe Kapitel 2.4.). Die Durchführung erfolgte nach den Vorgaben des Herstellers. Auf jeder Mikrotiterplatte wurden Qualitätskontrollen mitgeführt. Die PGE₂-Konzentrationen wurden in pg/ml errechnet.

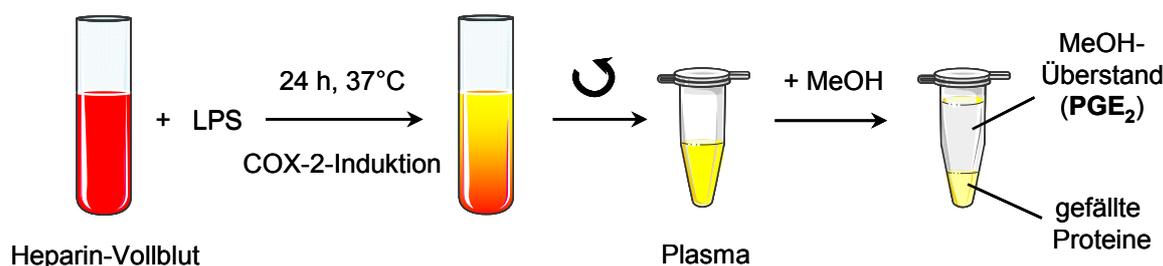


Abb. 28: Schematische Darstellung des COX-2-Aktivitätsassays

2.7. Quantifizierung von 2,3-dinor-Thromboxan B₂ und 2,3-dinor-6-keto-Prostaglandin F_{1α} im Urin mittels GC-tandem MS

Die Bestimmung des Thromboxan B₂-Metaboliten 2,3-dinor-Thromboxan B₂ (2,3-dn-TxB₂) und des Prostacyclin-Metaboliten 2,3-dinor-6-keto-Prostaglandin F_{1α} (2,3-dn-6-keto-PGF_{1α}) erfolgte in Kooperation mit Herrn PD Dr. Dimitrios Tsikas des Instituts für Klinische Pharmakologie der Medizinischen Hochschule Hannover.

Es wurden für die Untersuchung beider Metabolite pro Patient 5 ml Urin benötigt, der mit einem antioxidativen Gemisch vorbehandelt worden war (siehe Abschnitt 2.2.2.). Die Extraktion und Aufreinigung der Metabolite umfasste mehrere Schritte der Fest- bzw. Flüssigphasenextraktion (SPE und LPE) sowie verschiedene Derivatisierungsreaktionen. Die Quantifizierung erfolgte mittels GC-tandem MS im NICI-Modus. Eine detaillierte Beschreibung der Methode zur Quantifizierung des 2,3-dn-TxB₂ ist im *Journal of Chromatography A* (Tsikas et al. 2000) veröffentlicht. Ebenfalls ist hier beschrieben, wie die Analyse beider Metabolite aus derselben Urinprobe möglich ist. Die Quantifizierung des 2,3-dn-6-keto-PGF_{1α} wurde in Anlehnung an die Methoden von Falardeau et al. (1981) bzw. Daniel et al. (1994) durchgeführt, wobei der Schritt der dünnschichtchromatographischen Auftrennung aufgrund des Einsatzes der GC-tandem MS- anstelle der GC-MS-Methode weggelassen werden konnte (Tsikas 1998).

Die ermittelten Metabolit-Konzentrationen wurden auf den entsprechenden im Urin bestimmten Kreatinin-Wert bezogen. Die 2,3-dn-TxB₂- bzw. 2,3-dn-6-keto-PGF_{1α}-Exkretion wurde in pg/mg Kreatinin angegeben.

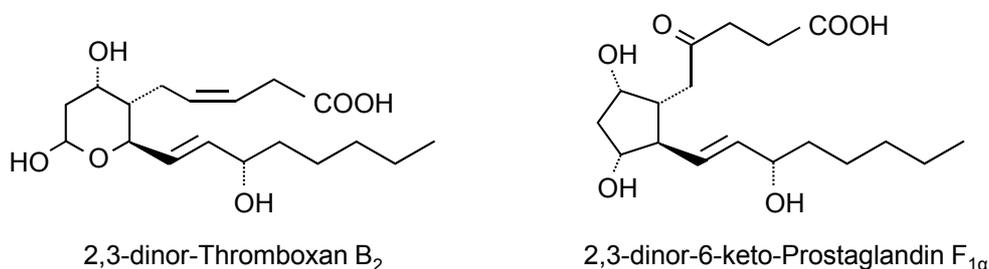


Abb. 29: Strukturformeln des Thromboxan B₂-Metaboliten 2,3-dinor-Thromboxan B₂ und des Prostacyclin-Metaboliten 2,3-dinor-6-keto-Prostaglandin F_{1α}

2.8. Untersuchung der COX-1- und COX-2-Proteinexpression in Thrombozyten

2.8.1. Gewinnung von Thrombozytenprotein aus plättchenreichem Plasma

Zunächst wurde wie in Abschnitt 2.3.1. beschrieben, plättchenreiches Plasma (PRP) hergestellt. Dabei wurde unbedingt darauf geachtet, dass es durch die leukozytenreiche Intermediärphase zu keiner Verunreinigung des PRP kam. Zwei verschiedene Methoden wurden zur Überprüfung der Reinheit des PRP eingesetzt (siehe Abschnitt 2.8.1.1.).

Pro Patient wurden ca. 6 ml PRP mit 9 ml einer 0,106 molaren tri-Natriumcitrat-Lösung (pH 7,4) vorsichtig vermischt. Die dadurch resultierende starke Antikoagulation bewirkte, dass die Thrombozyten im anschließenden Zentrifugationsschritt kaum aggregierten. Dadurch wurde der Einschluss von Plasma-Proteinen in Thrombozytenaggregate verhindert. Durch Zentrifugieren bei 2000 g für 10 min bei 4°C wurden die Thrombozyten pelletiert. Der Überstand wurde verworfen, das Thrombozytenpellet wurde in 600 µl Lysis-Puffer aufgenommen, welchem kurz vor der Verwendung ein Protease-Inhibitor-Cocktail zugesetzt wurde (1 Teil Cocktail auf 1000 Teile Puffer). Mit Hilfe einer Spritze und feiner Kanüle wurde das Thrombozyten-Lysat homogenisiert und anschließend für 30 Minuten auf Eis gelagert, um eine möglichst hohe Proteinausbeute zu erhalten. Nach Abzentrifugieren und Verwerfen des Rückstands wurde der Überstand (das Lysat) in mehreren Aliquots bei -80°C bis zur weiteren Bearbeitung eingefroren.

2.8.1.1. Reinheitsprüfung des plättchenreichen Plasmas

Die Reinheit des PRP wurde überprüft, indem entweder ein Ausstrich angefertigt und unter dem Lichtmikroskop begutachtet wurde (siehe Abb. 30) oder, indem mit Hilfe eines vollautomatischen Teilchenzählers (CASY[®] Cell Counter) ein Größenspektrum aller in der jeweiligen Probe vorliegenden Zellen aufgenommen wurde. Für diese Messung wurde das PRP in einer Verdünnung von in der Regel 1:8000 durch eine Kapillare mit einem Durchmesser von 60 µm gesogen. Bei einer reinen PRP-Probe ergab sich ein monophasisches Spektrum mit einem mittleren Teilchendurchmesser von ungefähr 2,5 µm, entsprechend dem Durchmesser von Thrombozyten. Eine durch Erythrozyten bzw. Leukozyten verunreinigte Probe konnte dadurch identifiziert werden, dass zum einen ein erhöhter mittlerer Teilchendurchmesser bestimmt und zum anderen kein monophasisches Spektrum angezeigt wurde.

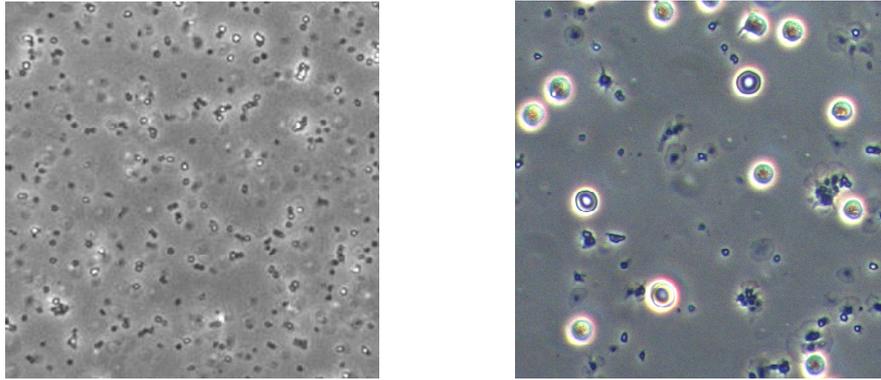


Abb. 30: Lichtmikroskopische Aufnahme eines reinen PRPs (linkes Foto) sowie einer Intermediärphase bestehend aus Leukozyten, Erythrozyten und nur wenigen Thrombozyten (rechtes Foto)

2.8.1.2. Quantifizierung des Thrombozytenproteins

Die quantitative Proteinanalyse der Thrombozyten-Lysate erfolgte nach der Methode von Bradford (Bradford 1976). Diese Methode beruht auf der Bindung eines blauen Säurefarbstoffs (Coomassie Brilliant-Blau G-250) an Proteine in saurer Lösung. Das sog. Bradford-Reagenz besteht zum einen aus diesem in Methanol gelösten Farbstoff und zum anderen aus hochprozentiger Phosphorsäure. Durch den Protein-Farbstoff-Komplex kommt es zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 nm (ohne Protein) zu 595 nm (mit Protein). Die Zunahme der Absorption bei 595 nm ist ein Maß für die Proteinkonzentration. Zur Erstellung der Kalibrierkurven wurde als Referenzprotein bovines γ -Globulin verwendet. Hierzu wurden vier verschiedene Verdünnungen mit folgenden Konzentrationen hergestellt: 3,45 μg , 6,9 μg , 10,35 μg bzw. 13,8 μg γ -Globulin in jeweils 800 μl Wasser. Die Thrombozyten-Lysate wurden entweder 1:10 oder 1:20 mit Wasser verdünnt. Anschließend wurden jeweils 10 μl des verdünnten Lysats mit Wasser auf ein Volumen von 800 μl aufgefüllt. Sowohl die Verdünnungsreihe des Referenzproteins als auch die zu messenden Proben wurden direkt in den Kunststoffküvetten für das Photometer hergestellt und grundsätzlich doppelt angesetzt.

Alle Referenzprotein- und Thrombozytenprotein-Verdünnungen wurden jeweils mit 200 μl Bradford-Reagenz gründlich mit Einwegspateln vermischt. Nach einer Inkubationszeit von 15 min bei Raumtemperatur wurden die Extinktionen im Photometer bei einer Wellenlänge von 595 nm gegen einen entsprechenden Blindwert bestimmt. Die Proben sind innerhalb eines Zeitfensters von maximal einer Stunde vermessen worden.

Anhand der durch lineare Regression erhaltenen Kalibrierkurve, der für die Thrombozyten-Proben gemessenen Extinktionen und unter Berücksichtigung der Verdünnungsfaktoren, wurden die Proteinkonzentrationen der Thrombozyten-Lysate berechnet.

2.8.1.3. Thrombozytenprotein-Standardpräparation

Um die Proteinexpression im Western Blot quantitativ auswerten zu können, wurde eine Thrombozytenprotein-Standardpräparation hergestellt.

Hierzu wurde von einem mit ASS behandelten Probanden eine große Menge Citrat-Blut (100 ml) entnommen und daraus wie in Abschnitt 2.3.1. beschrieben 40 ml PRP hergestellt. Die Gewinnung des Thrombozytenproteins erfolgte wie in Abschnitt 2.8.1. erläutert. Allerdings wurden entsprechend 60 ml tri-Natriumcitrat-Lösung eingesetzt, und das nach Zentrifugation erhaltene Thrombozytenpellet, welches ein Gewicht von 286 mg aufwies, wurde in 11,5 ml Lysis-Puffer (inkl. Protease-Inhibitor-Cocktail) homogenisiert. Zur vollständigen Lyse wurde ein Ultraschallbad verwendet. Mit Hilfe der Bradford-Methode (siehe Abschnitt 2.8.1.2.) wurde ein Proteingehalt von 5,5 µg/µl Thrombozyten-Lysat ermittelt. Insgesamt wurden 100 Aliquots à 100 µl bei -80°C eingefroren.

2.8.2. Proteinauftrennung mit Hilfe der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für die Auftrennung der Thrombozytenproteine wurden Trenngele mit einer Acrylamidmenge von 10% hergestellt; die Sammelgele enthielten 4% Acrylamid. Pro Geltasche wurden entweder 37,5 µg, 50 µg oder 75 µg Gesamtprotein eingesetzt. Kurz vor der Beladung des Gels wurden die Proteinproben mit Lämmli-Puffer versetzt (Endkonzentration 1x). Eine anschließende Erhitzung der Proben auf 95°C für 5 min sorgte in Gegenwart der im Lämmli-Puffer enthaltenen Detergenzien SDS und β-Mercaptoethanol für eine vollständige Denaturierung der Proteine. Pro Gel wurde grundsätzlich mindestens ein Molekulargewichts-Standard mit aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 150 V für mind. 1,5 Stunden.

2.8.3. Proteintransfer durch Western Blotting

Die im SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennten Thrombozytenproteine wurden durch Elektroblothing auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert (Tank-Blotting). Da mit einer

hohen Stromstärke (250 mA) gearbeitet wurde, musste der Transferpuffer stark gekühlt werden. Eine Transferzeit von einer Stunde wurde nicht überschritten.

Die Proteinbanden-Muster wurden durch Anfärben der Membran mit Ponceau S sichtbar gemacht. Nichtgebundener Farbstoff wurde mit Hilfe von Wasser entfernt. Die Anfärbung diente zur Überprüfung der gleichmäßigen Proteinbeladung der einzelnen Geltaschen. Nachdem das Proteinbanden-Muster durch Einscannen dokumentiert worden war, erfolgte die Entfärbung durch fünfminütiges Waschen in TBS.

2.8.4. Immundetektion nach Blotting

Vor der Immundetektion wurden die unspezifisch adsorbierenden Stellen auf der Oberfläche der Membran blockiert, indem die Membran mit 5% Milchpulver in TBST unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur für ca. eine Stunde inkubiert und danach mindestens dreimal für 5 min mit TBST gewaschen wurde.

Nach Entfernen der Waschlösung wurde die Membran mit dem primären Antikörper über Nacht bei 4°C auf einer Schüttelapparatur inkubiert. Tab. 5 enthält eine Beschreibung der verwendeten primären Antikörper, ihrer Verdünnungen sowie des eingesetzten Verdünnungsmediums.

primäre Antikörper					
Antikörper	Firma	erzeugt in	Präparation	Verdünnung	Verdünnungsmedium
anti-COX-1	Santa Cruz	Ziege	polyklonal	1:500	1% Milchpulver in TBST
anti-COX-2	Santa Cruz	Ziege	polyklonal	1:500	1% Milchpulver in TBST
anti-GAPDH	Abcam	Maus	monoklonal	1:4000	1% Milchpulver in TBST

Tab. 5: Beschreibung der bei der Immundetektion verwendeten primären Antikörper

Am folgenden Tag wurde der nichtgebundene Antikörper durch mindestens dreimaliges Waschen für jeweils 5 min mit TBST entfernt. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem entsprechenden sekundären Antikörper für 1,5 Stunden bei Raumtemperatur und leichtem Schütteln (siehe Tab. 6). Die Membran wurde zum wiederholten Male – wie oben beschrieben – mehrfach gewaschen. Die Entwicklung erfolgte mit Hilfe des Enhanced

Chemiluminescence (ECL) Kits nach den Vorgaben des Herstellers (Amersham). Dabei katalysiert die an den sekundären Antikörper gebundene Meerrettich-Peroxidase (HRP) in Gegenwart von Wasserstoffperoxid die Oxidation von Luminol. Durch diese Reaktion wird Luminol in einen angeregten Zustand überführt. Beim Zurückkehren in den Grundzustand kommt es zur Lichtemission und damit zu einer lokalen Schwärzung eines auf die Membran aufgelegten Röntgenfilms. Die Filmentwicklung erfolgte in der Dunkelkammer mit herkömmlichen Fotoentwicklerlösungen.

sekundäre Antikörper					
Antikörper	Firma	erzeugt in	konjugiert mit	Verdünnung	Verdünnungsmedium
anti-Ziege IgG	Santa Cruz	Esel	HRP	1:2000	TBST
anti-Maus IgG	Sigma	Ziege	HRP	1:2000	TBST

Tab. 6: Beschreibung der bei der Immundetektion verwendeten sekundären Antikörper

2.8.4.1. Untersuchungen zur Spezifität der COX-Antikörper

Da die COX-1 und die COX-2 ein ähnliches Molekulargewicht aufweisen (72 kDa für die COX-1, 72 und 74 kDa für die COX-2), musste eine Kreuzreaktivität der verwendeten COX-1- bzw. COX-2-Antikörper ausgeschlossen werden. Untersuchungen zur Spezifität der COX-Antikörper sind in Abb. 31 dargestellt.

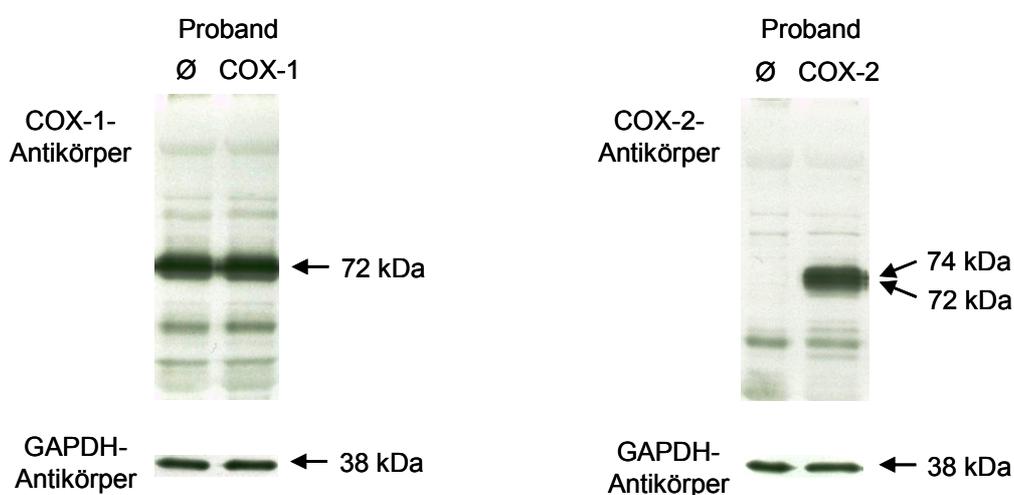


Abb. 31: Untersuchungen zur Spezifität der polyklonalen Antikörper gegen die COX-1 bzw. COX-2 in humanen Thrombozyten. Im rechten Teil der Abbildung ist zu erkennen, dass der

COX-2-Antikörper nicht mit dem Thrombozyten-Homogenat eines Normalprobanden, wohl aber nach Zugabe rekombinanten COX-2-Proteins reagiert. Der linke Teil der Abbildung zeigt die gleichen Thrombozyten-Homogenate, diesmal in der rechten Spur unter Zusatz von COX-1-Protein. Der COX-1-Antikörper reagiert in beiden Spuren positiv. GAPDH diente als Ladungskontrolle.

2.8.5. Quantifizierung des COX-2-Proteins in Thrombozyten

Zur Quantifizierung der thrombozytären COX-2 wurde humanes rekombinantes COX-2-Protein herangezogen, welches in verschiedenen Konzentrationen in jeweils 9 µl der Thrombozytenprotein-Standardpräparation (entsprechend 50 µg Gesamtprotein, siehe Abschnitt 2.8.1.3.) hineinpipettiert wurde. Das Hinzupipettieren des rekombinanten COX-2-Standardproteins in ein Thrombozyten-Lysat spiegelt die natürliche Umgebung der COX-2 besser wider als das bloße Auftragen ohne Einbettung in die gesamten Thrombozytenproteine. Wie der Western Blot in Abb. 32 verdeutlicht, erscheint bei gleicher Konzentration die COX-2 allein aufgetragen wesentlich schwächer als hinzugefügt. Aus diesem Grund wurde für die quantitative Auswertung das Hinzufügen der COX-2 zur Thrombozytenprotein-Standardpräparation gewählt.

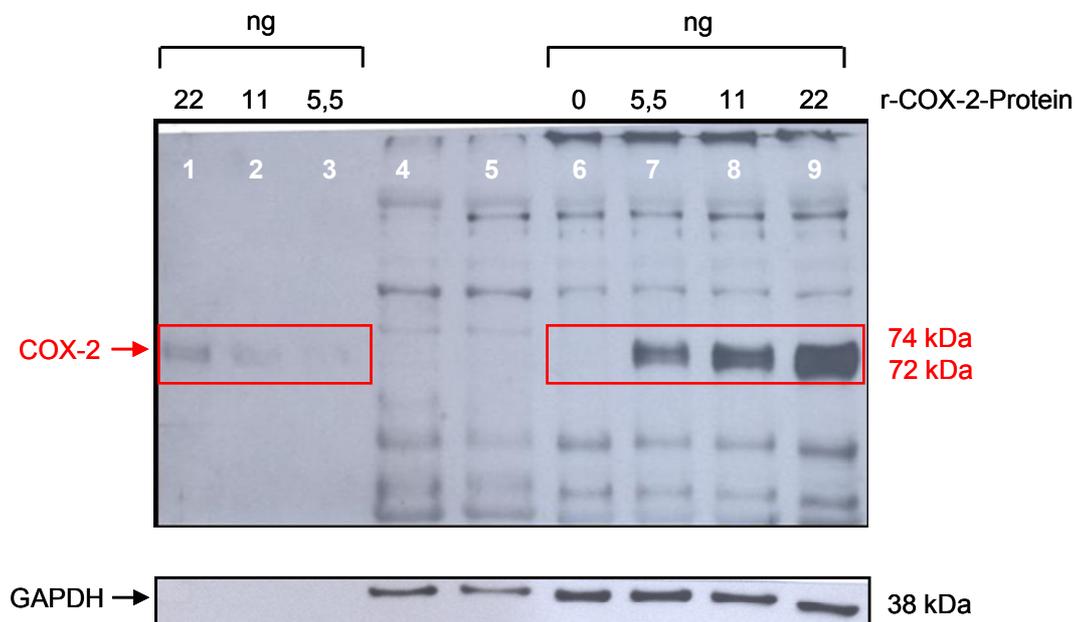


Abb. 32: COX-2-Western Blot. In den Spuren 1 bis 3 wurde humanes rekombinantes COX-2-Protein (r-COX-2) in den angegebenen Konzentrationen aufgetragen. In den Spuren 7, 8 und 9 wurden die gleichen Konzentrationen an r-COX-2 aufgetragen, diesmal jedoch zugesetzt zu je 50 µg der Thrombozytenprotein-Standardpräparation (siehe Abschnitt 2.8.1.3.). Spur 6 zeigt, dass die verwendete Standardpräparation keine bzw. allenfalls nur eine sehr geringe Menge an natürlich vorkommender COX-2 aufweist. GAPDH diente als Ladungskontrolle.

Abb. 33 zeigt exemplarisch den Western Blot einer COX-2-Verdünnungsreihe. Bei genügend langer Elektrophoresezeit ist sehr deutlich zu erkennen, dass das COX-2-Protein als Doppelbande in Erscheinung tritt. Dies lässt sich durch zwei verschiedene Glykosylierungsstadien der COX-2 erklären (Otto et al. 1993).

Für die Auswertung wurden die Filme zunächst im „ChemiGenius Bio Imaging System“ (Syngene, Cambridge, UK) mit Hilfe der „GeneSnap“ Software (Syngene) fotografiert. Anschließend wurde mittels der „GeneTools“ Software (Syngene) die Intensität der Proteinbanden ermittelt, indem für jede Bande sowohl eine Peakhöhe als auch eine Peakfläche errechnet wurde. In Abb. 34 ist dies für den Western Blot aus Abb. 33 demonstriert.

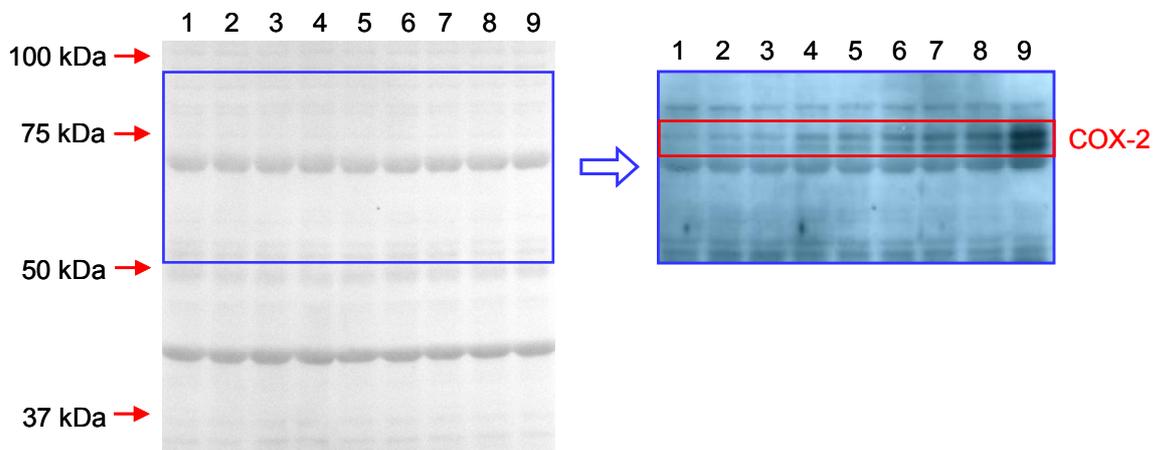


Abb. 33: Western Blot einer COX-2-Verdünnungsreihe. Der linke Teil der Abbildung zeigt den mit Ponceau S angefärbten Blot zur Ladungskontrolle (Aufnahme in schwarz-weiß). Im rechten Teil der Abbildung ist der Ausschnitt dargestellt, der mit dem COX-2-Antikörper behandelt und entwickelt wurde. In den Spuren 1 bis 9 wurde humanes rekombinantes COX-2-Protein in folgenden Konzentrationen aufgetragen (jeweils eingebettet in 50 µg der Thrombozytenprotein-Standardpräparation): 250 pg (Spur 1), 500 pg (Spur 2), 750 pg (Spur 3), 1000 pg (Spur 4), 1250 pg (Spur 5), 1500 pg (Spur 6), 2000 pg (Spur 7), 2500 pg (Spur 8) und 5000 pg (Spur 9).

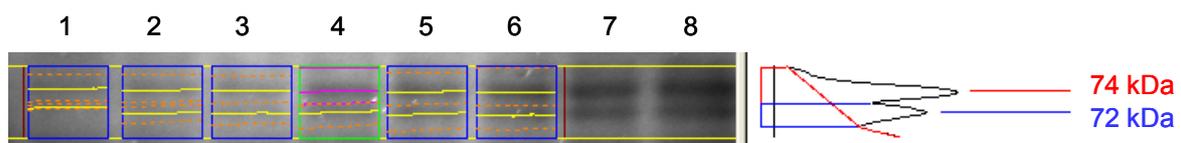


Abb. 34: Bestimmung der Bandenintensitäten des COX-2-Proteins mit Hilfe der „GeneTools“ Software (Syngene)

Es konnte eine lineare Beziehung zwischen der COX-2-Konzentration und der errechneten Peakhöhe bzw. Peakfläche für beide COX-2-Banden bis zu einer Obergrenze von 1500 pg COX-2-Protein nachgewiesen werden (siehe Abb. 35).

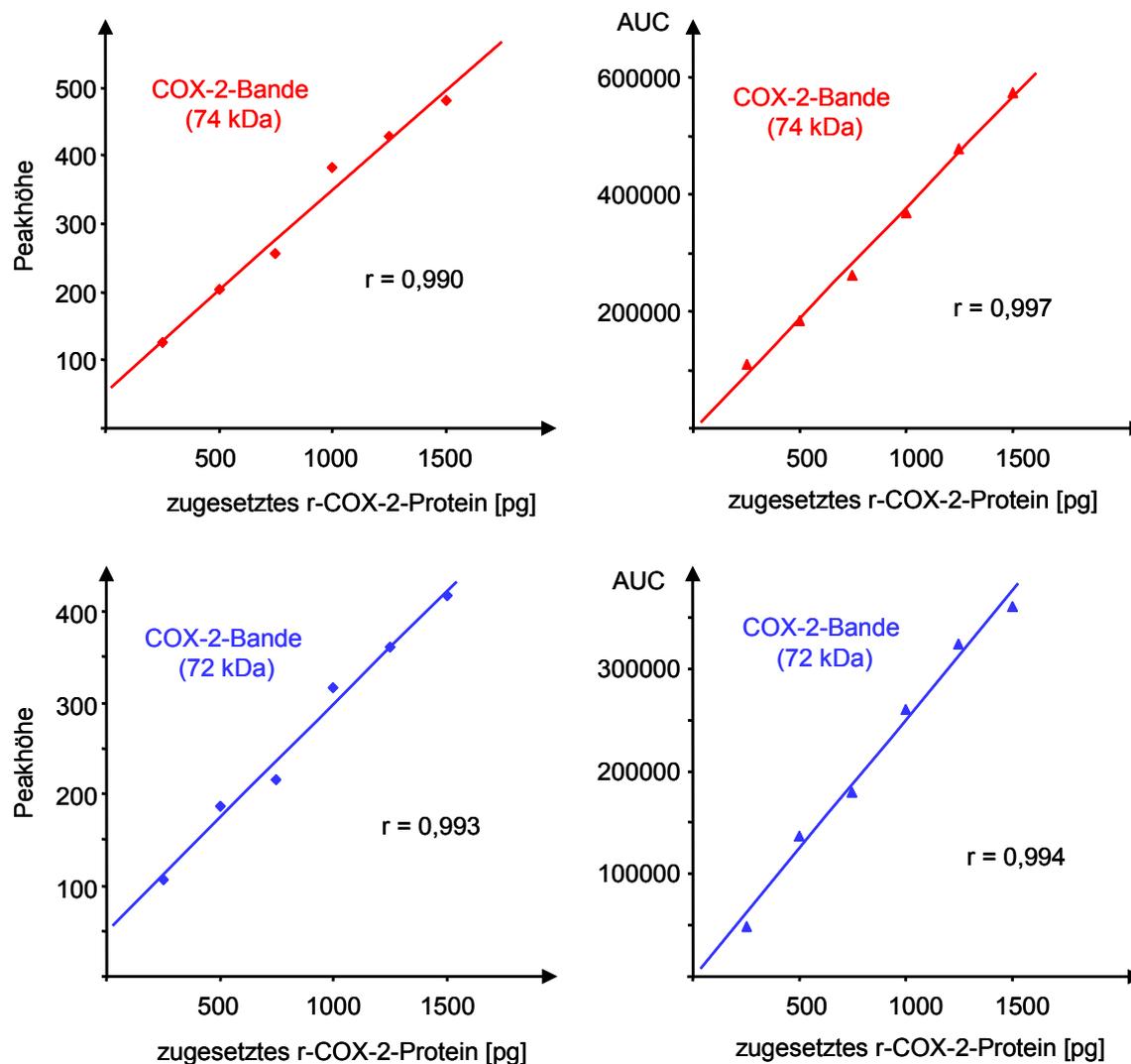


Abb. 35: Linearitätsnachweis zwischen der COX-2-Konzentration und der Bandenintensität

Für die Ermittlung der COX-2-Konzentration in den Thrombozyten-Lysaten der Patienten wurde pro Gel eine COX-2-Verdünnungsreihe mit drei Konzentrationen aufgetragen (187,5 pg, 375 pg und 750 pg). Bei gegebener Linearität wurde für jeden Western Blot eine Geradengleichung ermittelt, die sich auf die Summe der Peakhöhen beider COX-2-Banden bzw. auf die Summe der Peakflächen bezog. Anhand dieser Gleichung und der für jede Patientenprobe errechneten Peakhöhen- bzw. Peakflächen-Summe konnte die thrombozytäre COX-2-Konzentration quantifiziert werden (Einheit: pg/mg Gesamtprotein). Der in der Thrombozytenprotein-Standardpräparation endogen vorkommende COX-2-Protein-Gehalt

wurde ebenfalls errechnet und bei der Auswertung der einzelnen Patientenproben berücksichtigt. Darüberhinaus wurden für jede Patientenprobe die Bandenintensitäten beider COX-2-Glykosylierungsformen gesondert analysiert, indem pro Western Blot sowohl für die oberen als auch für die unteren COX-2-Banden der Verdünnungsreihe jeweils eine Geradengleichung ermittelt wurde. Der Molekulargewichtsunterschied der beiden COX-2-Glykosylierungsformen wurde bei dieser Berechnung vernachlässigt.

2.9. Bestimmung der 8-iso-Prostaglandin $F_{2\alpha}$ -Urinexkretion mittels GC-MS

Die Methode zur massenspektrometrischen Quantifizierung von 8-iso-Prostaglandin $F_{2\alpha}$ (8-iso-PGF $_{2\alpha}$) im Urin der Patienten beinhaltet zunächst eine Aufreinigung mittels Immunaffinitätschromatographie sowie eine anschließende Derivatisierung des extrahierten 8-iso-PGF $_{2\alpha}$ in zwei Schritten.

Als interner Standard wurde [$^2\text{H}_4$]-15(S)-8-iso-Prostaglandin $F_{2\alpha}$ verwendet (siehe Abb. 36). Bei jeder Aufarbeitung wurden Qualitätskontrollen mitgeführt.

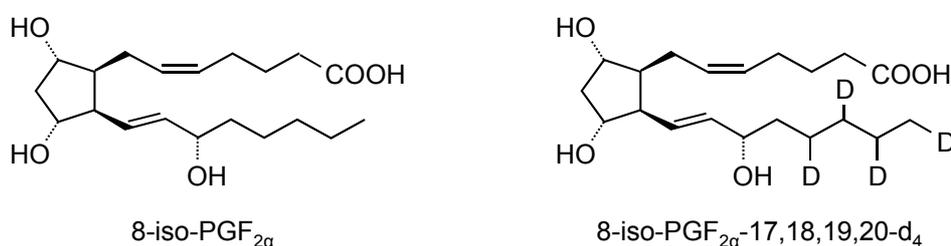


Abb. 36: 8-iso-Prostaglandin $F_{2\alpha}$ und der deuterierte interne Standard für die Quantifizierung des 8-iso-Prostaglandin $F_{2\alpha}$ mittels GC-MS

2.9.1. 8-iso-Prostaglandin $F_{2\alpha}$ -Extraktion mit Hilfe der Immunaffinitätschromatographie

Es wurden jeweils 4 ml des mit einem antioxidativen Gemisch vorbehandelten Urins (siehe Abschnitt 2.2.2.) mit jeweils 16 μl des internen Standards (0,25 ng in 1 μl absolutem Ethanol gelöst) versetzt, so dass eine Endkonzentration von 1 ng/ml resultierte. Durch Zentrifugation bei 2000 rpm für 5 Minuten wurde das Urin-Sediment abgetrennt. Die Urinproben wurden jeweils direkt auf eine mit einem 8-iso-PGF $_{2\alpha}$ -Antikörper beschichtete Säule gegeben. Anschließend wurden die Säulen zweimal mit je 10 ml Säulenpuffer gewaschen, gefolgt von

10 ml Aqua purificata. Mit jeweils 3 ml Elutionslösung wurde eluiert. Die Säulen wurden regeneriert, indem sie zuerst mit 10 ml Aqua purificata und anschließend mit 10 ml Säulenpuffer gewaschen wurden. Bis zur erneuten Verwendung wurden sie bei 4°C gelagert, wobei das Säulenmaterial mit 10 ml des Säulenpuffers bedeckt war.

2.9.2. Derivatisierung von 8-iso-Prostaglandin $F_{2\alpha}$

Die Eluate wurden im Rotations-Vakuum-Konzentrator bei 60°C bis zur Trockne eingengt. Die Rückstände wurden anschließend in jeweils 300 µl Ethanol aufgenommen. Nach gründlichem Vortexen und Überführen in silanisierte Glasgefäße (siehe Abschnitt 2.9.2.1.) wurden die Proben erneut bis zur Trockne eingengt, diesmal mit Hilfe von Stickstoff bei Raumtemperatur. Es folgte der erste Schritt der Derivatisierung, bei der 8-iso-PGF $_{2\alpha}$ in ein Pentafluorobenzyl-Derivat (PFB-Derivat) umgesetzt wurde (siehe Abb. 37). In Tab. 7 sind die Reagenzien aufgeführt, die zu jeder Probe hinzugefügt wurden. Nach kurzem Vortexen wurde bei 30°C für eine Stunde inkubiert.

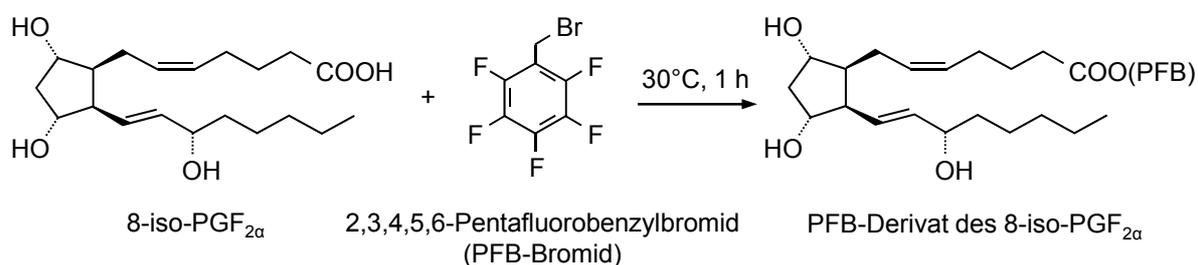


Abb. 37: Erste Derivatisierungsreaktion von 8-iso-Prostaglandin $F_{2\alpha}$

Erste Derivatisierung	
Substanz	Menge
Methanol (auf Molekularsieb gelagert)	10 µl
Acetonitril (auf Molekularsieb gelagert)	100 µl
N,N-Diisopropylethylamin (Hünig's Base)	10 µl
2,3,4,5,6-Pentafluorobenzylbromid (PFB-Bromid), 33% (v/v) in Acetonitril	10 µl

Tab. 7: Pipettierschema der Substanzen für die erste Derivatisierung

Anschließend wurden die Proben unter Stickstoff bei Raumtemperatur bis zur Kristallisation eingengt.

Das gebildete PFB-Derivat des 8-iso-PGF_{2α} wurde in einer zweiten Derivatisierungsreaktion mit N,O-bis(Trimethylsilyl)trifluoroacetamid (BSTFA) zu einem PFB-Trimethylsilyl-Derivat (PFB-TMS-Derivat) umgewandelt (siehe Abb. 38). Hierzu wurden die eingegangenen Proben mit jeweils 100 µl BSTFA versetzt, gevortext und anschließend eine Stunde bei 60°C inkubiert. Nach dem Abkühlen wurden die Proben in spezielle GC-MS-Gefäße mit 100 µl-Einsätzen überführt, wobei darauf geachtet wurde, dass die gebildeten Kristalle nicht in die Gefäße gelangten.

Bis zur Quantifizierung mittels GC-MS wurden die aufbereiteten Proben bei 4°C gelagert.

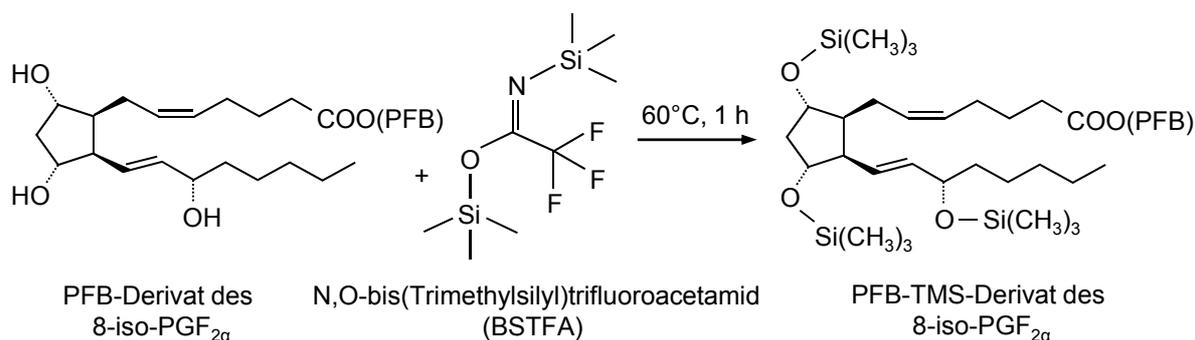


Abb. 38: Zweite Derivatisierungsreaktion von 8-iso-Prostaglandin F_{2α}

2.9.2.1. Silanisieren von Glasgefäßen

Um die Anhaftung des Analyten an die Glasoberfläche zu verhindern, wurden die Glasgefäße vor der Verwendung silanisiert. Hierzu wurden die Gläser eine Stunde mit einer 6%igen Dichlordimethylsilan-Lösung behandelt. Anschließend wurden die Gefäße im Vakuumofen bei 150°C für eine Stunde von den Lösungsmittelresten befreit. Die Gläser wurden nach Abkühlen über Nacht zweimal für jeweils eine Stunde mit Ethylacetat gespült. Um die Gefäße von den restlichen Ethylacetat-Resten zu befreien, wurden diese erneut im Vakuumofen getrocknet (bei 100°C für eine Stunde). Nach Abkühlen über Nacht konnten die nun silanisierten Glasgefäße verwendet werden.

2.9.3. GC-MS-Analytik des 8-iso-Prostaglandin F_{2α}

Die Quantifizierung des 8-iso-PGF_{2α} wurde mit einem Quadrupol Massenspektrometer 1200 (Varian, Walnut Creek, USA) verbunden mit einem Gaschromatographen CP-3800 (Varian) durchgeführt.

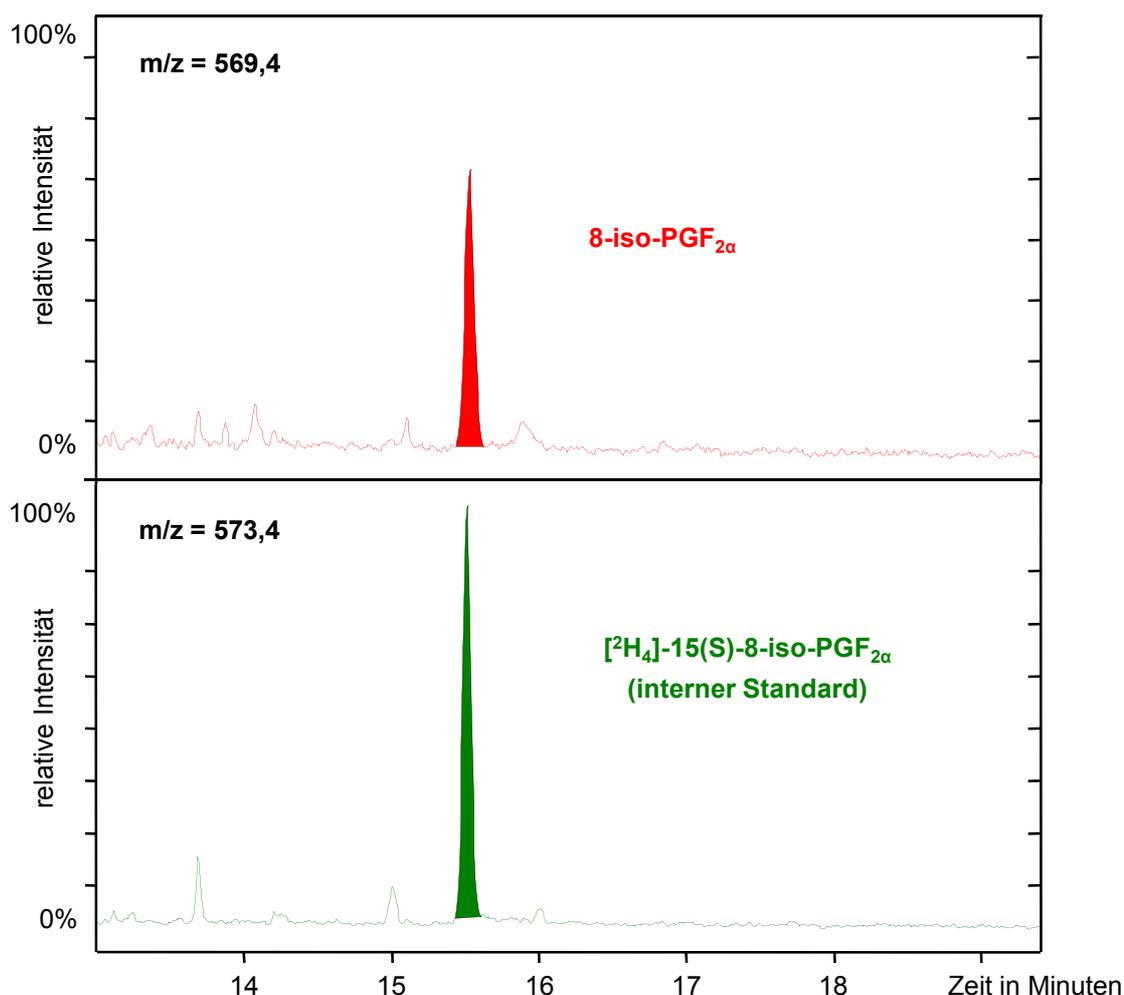


Abb. 40: GC-MS-Analytik von 8-iso-Prostaglandin $F_{2\alpha}$ in Urin. SIM der Ionen der PFB-TMS-Derivate mit $m/z = 569,4$ für 8-iso-PGF $_{2\alpha}$ und $m/z = 573,4$ für den internen Standard $[^2H_4]$ -15(S)-8-iso-PGF $_{2\alpha}$.

2.9.4. Berechnung der 8-iso-Prostaglandin $F_{2\alpha}$ -Exkretion

Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Software MSWS Version 6.3 (Varian).

Es wurden jeweils die Peakflächen des Analyten sowie des internen Standards berechnet.

Nach der Formel in Abb. 41 wurde die Konzentration an 8-iso-PGF $_{2\alpha}$ im Urin ermittelt.

$$\text{8-iso-PGF}_{2\alpha}\text{-Konz. [ng/ml]} = \frac{\text{8-iso-PGF}_{2\alpha}\text{-Peakfläche}}{[^2H_4]\text{-15(S)-8-iso-PGF}_{2\alpha}\text{-Peakfläche}} \times [^2H_4]\text{-15(S)-8-iso-PGF}_{2\alpha}\text{-Konz. [ng/ml]}$$

Abb. 41: Formel zur Berechnung der 8-iso-Prostaglandin $F_{2\alpha}$ -Konzentration im Urin

Das Labor Prof. Arndt & Partner (Hamburg) bestimmte für jede Urinprobe die Kreatinin-Konzentration in g/l. Die 8-iso-PGF $_{2\alpha}$ -Exkretion wurde in pg/mg Kreatinin angegeben.

2.10. P2Y₁₂-Genotypisierung

2.10.1. DNA-Extraktion

Die genomische DNA wurde aus EDTA-Vollblut mit Hilfe des QIAamp DNA Blood Mini Kit isoliert. Das Prinzip der Aufreinigung beruht auf einer Anionenaustausch-Chromatographie. Negativ geladene Phosphatgruppen der Nucleinsäuren binden an positiv geladene Oberflächenmoleküle des Trägermaterials.

Am Untersuchungstag des Patienten wurde das entnommene EDTA-Blut bei 2000 g für 10 Minuten zentrifugiert und der gewonnene Blutkuchen bei -80°C bis zur DNA-Extraktion eingefroren. Nach dem Auftauen wurden 100 µl Blutkuchen mit 100 µl PBS vermischt. Anschließend erfolgte die Isolierung der DNA nach den Vorgaben des Herstellers (Qiagen). Dem verdünnten Blutkuchen wurden 20 µl QIAGEN Protease und 200 µl Lysis-Puffer („Buffer AL“) zugesetzt. Nach gründlichem Vermischen und Inkubation für 10 Minuten bei 56°C wurden 200 µl Ethanol (absolut) zugefügt. Diese Mischung wurde auf eine QIAamp Mini Säule pipettiert. Das Filtrat wurde nach einer einminütigen Zentrifugation bei 6000 g verworfen. Die Säule, an welche die DNA gebunden hat, wurde zweimal gewaschen, zunächst mit 500 µl „Buffer AW1“, anschließend mit 500 µl „Buffer AW2“. Die DNA wurde durch Zugabe von 200 µl „Buffer AE“ auf die Trägermatrix mit nachfolgender fünfminütiger Inkubation bei Raumtemperatur und anschließender Zentrifugation (6000 g, 1 min) eluiert. Bis zur weiteren Analyse wurde die eluierte DNA bei -20°C gelagert.

2.10.2. Differenzierung der P2Y₁₂-Genotypen mittels forced mutation PCR-RFLP-Analyse

Für die Differenzierung der P2Y₁₂-Genotypen wurde eine forced mutation PCR-basierte Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus (RFLP)-Analyse entwickelt. Das Prinzip dieser Methode beruht zunächst auf der Amplifizierung des auf den Polymorphismus hin zu untersuchenden DNA-Abschnitts mit anschließender Hydrolyse des DNA-Abschnitts mit Hilfe von Restriktionsendonucleasen. Im Falle des Vorhandenseins eines Polymorphismus ergeben sich zwei mögliche Konsequenzen: Entweder ist die Erkennungssequenz für eine bestimmte Restriktionsendonuclease zerstört, oder es ist eine neue Erkennungsstelle entstanden. Beide Möglichkeiten führen zu einer Veränderung des Restriktionsfragment-Musters des untersuchten DNA-Abschnitts. Durch eine gelelektrophoretische Auftrennung

der erzeugten DNA-Restriktionsfragmente in einer Ethidiumbromid-haltigen Agarosematrix werden diese Veränderungen sichtbar gemacht und das Erkennen eines bestimmten Polymorphismus ermöglicht.

Im P2Y₁₂-Gen wurden zwei verschiedene Polymorphismen untersucht:

- der 34C>T-Polymorphismus und
- der H2-Haplotyp. Da der H2-Haplotyp aus mehreren miteinander gekoppelten Polymorphismen besteht, die alle mit der gleichen Häufigkeit auftreten (Fontana et al. 2003a, Hetherington et al. 2005), wurde nur einer dieser Polymorphismen, der 52G>T-Polymorphismus, als sog. „tag-SNP“ bestimmt.

2.10.2.1. PCR-Amplifizierung

Es wurden zwei Abschnitte der zuvor isolierten DNA mittels PCR amplifiziert, so dass in einem der 34C>T- und in dem anderen der 52G>T-Polymorphismus erfasst werden konnte. Die verwendeten Primer wurden mit Hilfe der Software Primer3 (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) entworfen und von der MWG-Biotech AG (Ebersberg) synthetisiert. Die Primer-Sequenzen sind in Tab. 8 aufgeführt.

Polymorphismus	Primer	Sequenz
34C>T	forward	5'-TTT AGA GGA GGC TGT GTC CAA-3'
	reverse	5'-aat aat GTT ACC AGG CGC AGA GGT GAA-3'
52G>T	forward	5'-aat aat aat TCA CCT CTG CGC CCG G-3'
	reverse	5'-CCG GAT TTG AAA GAA AAT CCT CA-3'

Tab. 8: Primer-Sequenzen. Unterstrichene Basen weichen von der natürlichen DNA-Sequenz ab („forced mutations“). Kleingeschriebene Buchstaben zeigen die Basen zur künstlichen Verlängerung des Primers an. (Erläuterungen siehe Abschnitt 2.10.2.2.)

Die Reaktionsansätze für die PCR sind in Tab. 9 aufgeführt. Die Angaben beziehen sich auf eine DNA-Probe. Für eine höhere Probenanzahl n wurde ein n-facher Ansatz berechnet.

Substanz	Endkonzentration	Menge
DNA	-	1,00 μl
Taq-DNA-Polymerase (5 U/ μl)	1,25 U	0,25 μl
dNTP-Mix (jeweils 2,5 mM)	250 μM	2,50 μl
forward-Primer (10 μM)	1 μM	2,50 μl
reverse-Primer (10 μM)	1 μM	2,50 μl
Reaktionspuffer Y (10 x)	1 x	2,50 μl
Aqua ad iniectabilia	-	13,75 μl
Gesamtvolumen	-	25,00 μl

Tab. 9: PCR-Reaktionsansatz

Um eventuelle Kontaminationen des PCR-Reaktionsansatzes ausschließen zu können, wurde grundsätzlich eine Negativkontrolle durchgeführt. Hierfür wurde anstelle der DNA Aqua ad iniectabilia eingesetzt. Die Reaktionsbedingungen der PCR sind in Abb. 42 dargestellt.

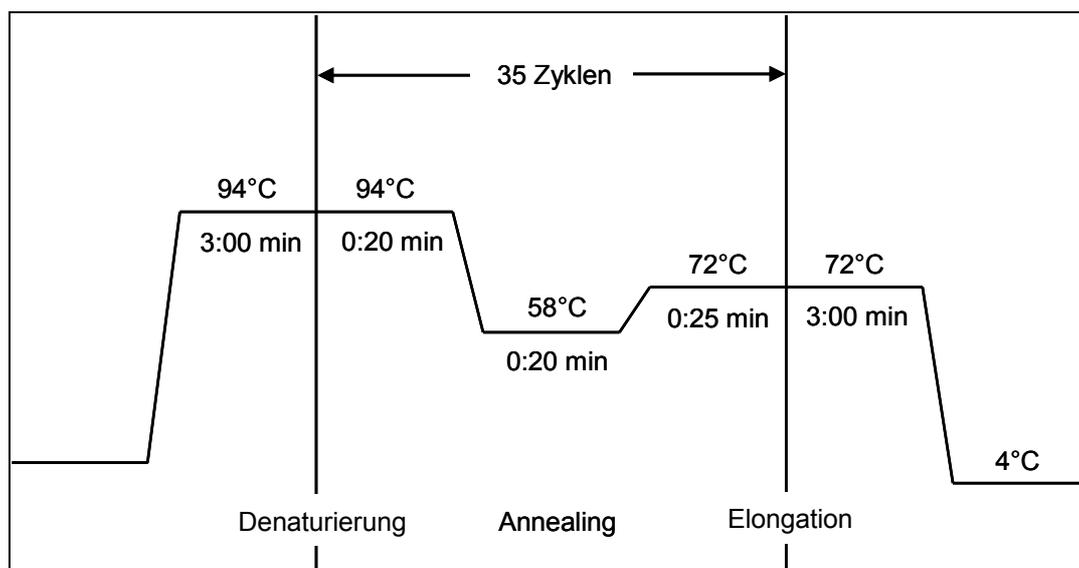


Abb. 42: Reaktionsbedingungen der PCR

Um den Erfolg der PCR zu überprüfen, wurden jeweils 5 μl PCR-Produkt mit 5 μl Aqua ad iniectabilia und 2 μl Probenauftragspuffer vermischt und auf ein Ethidiumbromid-haltiges 3%iges Small-DNA-Agarosegel aufgetragen. Nach der Elektrophorese erfolgte die photographische Dokumentation mittels UV-Transillumination. Abb. 43 zeigt beispielhaft sowohl die DNA-Amplifikate, die die Base in Position 52 einschließen, als auch die DNA-Amplifikate, die die Base in Position 34 einschließen.

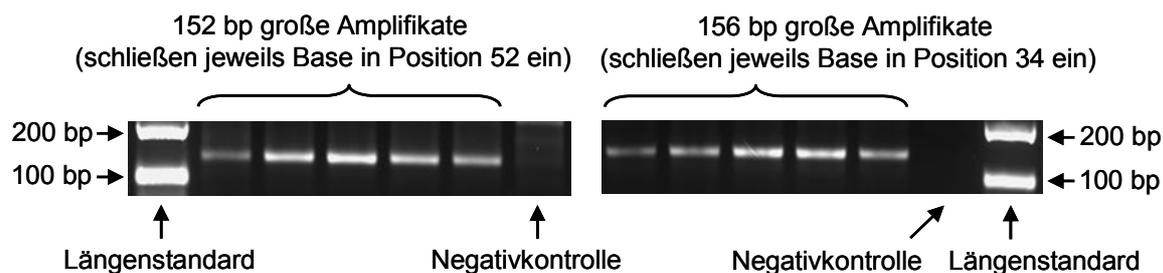


Abb. 43: Kontroll-PCR. Im linken Bild sind die DNA-Amplifikate zur späteren Identifizierung des 52G>T-Polymorphismus von beispielhaft fünf Patienten aufgetragen, im rechten Bild die DNA-Amplifikate zum anschließenden Nachweis des 34C>T-Polymorphismus.

2.10.2.2. Restriktionsverdau

Das 156 bp lange DNA-Amplifikat zur Bestimmung des 34C>T-Polymorphismus wurde mit der Restriktionsendonuclease Tsp 509 I geschnitten. Die Schnittstelle wurde zuvor durch eine sog. „forced mutation“ erzeugt: Im reversen Primer (siehe Tab. 8) wurde durch den Austausch einer Base die natürliche Basensequenz verändert. Diese Modifikation war erforderlich, da weder für die Sequenz des Wildtyps noch für die Sequenz der Mutation passende Restriktionsenzyme existieren.

Des Weiteren ist es notwendig, dass der Mutagenese-Primer unmittelbar vor der Position der Base endet, die genetisch polymorph ist.

Die durch den Primer in die DNA-Sequenz eingeführte Mutation ergab im Fall der 34T-Variante die Basenabfolge AATT₁, welche die Erkennungssequenz für Tsp 509 I darstellt. In der 34C-Variante ergab sich die Basenabfolge AACT₁, welche durch Tsp 509 I nicht erkannt wird. (Die „forced mutations“ sind unterstrichen.) Infolgedessen wurde durch Tsp 509 I von der 34T-Variante ein kleines DNA-Fragment (30 bp) abgespalten, während die Wildtyp-DNA unverändert blieb (siehe Tab. 10 und Tab. 11).

Darüberhinaus wurde der reverse Primer am 5'-Ende um sechs Nucleotide verlängert. Auf diese Weise kann leichter zwischen geschnittener und ungeschnittener DNA unterschieden werden, da der Fragmentlängenunterschied vergrößert wird.

Das 152 bp lange DNA-Amplifikat zur Bestimmung des 52G>T-Polymorphismus wurde mit der Restriktionsendonuclease Sma I geschnitten. Auch in diesem Fall wurde die Schnittstelle künstlich mit Hilfe einer „forced mutation“ erzeugt. Die durch den forward Primer in die DNA-Sequenz eingeführte Mutation ergab im Fall der Wildtyp-Variante (52G) die Basenabfolge CCCGGG, im Fall der 52T-Variante die Abfolge CCCGGT. Da CCCGGG die

Erkennungssequenz für Sma I darstellt, wurde nur die Wildtyp-Variante geschnitten (siehe Tab. 10 und Tab. 11).

Zur Vergrößerung des Fragmentlängenunterschiedes wurden an das 5'-Ende des forward Primers neun Nucleotide angehängt (siehe Tab. 8).

Polymorphismus	Größe des PCR-Produktes	Restriktionsenzym	Restriktionsmuster	
			Wildtyp	Mutation
34C>T	156 bp	Tsp 509 I	156 bp	126 bp + 30 bp
52G>T	152 bp	Sma I	129 bp + 23 bp	152 bp

Tab. 10: Größe der amplifizierten PCR-Produkte und Restriktionsmuster

34C>T-Polymorphismus		
C-Variante (Wildtyp)	...GACAAC <u>I</u> T <u>C</u> CACCT...	Tsp 509 I schneidet nicht
T-Variante (Mutation)	...GACA <u>A</u> <u>T</u> <u>I</u> T <u>C</u> CACCT...	Tsp 509 I schneidet

52G>T-Polymorphismus		
G-Variante (Wildtyp)	...GCGCC <u>C</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>G</u> AACA...	Sma I schneidet
T-Variante (Mutation)	...GCGCC <u>C</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>T</u> AACA...	Sma I schneidet nicht

Tab. 11: Darstellung der durch die Mutagenese-Primer induzierten Sequenzen und der dazugehörigen Restriktionssequenzen. Kursiv geschriebene Basen entstammen den verwendeten Primern. Unterstrichene Basen im Primer sind „forced mutations“. Die genetisch polymorphe Base ist rot markiert. Die Restriktionsschnittstellen sind fett hervorgehoben.

Die Reaktionsansätze für den Verdau mit Tsp 509 I bzw. Sma I sind in Tab. 12 aufgeführt. Der Tsp 509 I-Ansatz wurde zwei Stunden bei 65°C, der Sma I-Ansatz über Nacht bei 25°C inkubiert.

Anschließend wurden die Restriktionsprodukte mit jeweils 5 µl Probenauftragspuffer vermischt, auf einem Ethidiumbromid-haltigen 3%igen Small-DNA-Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und die Ergebnisse der enzymatischen Spaltung unter UV-Transillumination photographisch dokumentiert. Die Größe der Restriktionsfragmente wurde durch Vergleich mit einem 100 bp-Längenstandard ermittelt.

Restriktionsverdau mit Tsp 509 I		
Substanz	Endkonzentration	Menge
PCR-Produkt	-	10,0 µl
NEB-Puffer 1 (10 x)	1 x	2,5 µl
Tsp 509 I (10 U/µl)	5 U	0,5 µl
Aqua ad iniectabilia	-	12,0 µl
Gesamtvolumen	-	25,0 µl

Restriktionsverdau mit Sma I		
Substanz	Endkonzentration	Menge
PCR-Produkt	-	5,0 µl
NEB-Puffer 4 (10 x)	1 x	2,5 µl
Sma I (20 U/µl)	20 U	2,0 µl
Aqua ad iniectabilia	-	15,5 µl
Gesamtvolumen	-	25,0 µl

Tab. 12: Restriktionsverdau mit Tsp 509 I bzw. Sma I

In Abb. 44 und Abb. 45 sind beispielhaft die Elektrophoresemuster der beiden RFLP-Reaktionen dargestellt. Anhand dieser Muster wurde die Homo- bzw. Heterozygotie der Patienten hinsichtlich der beiden untersuchten Polymorphismen ermittelt.

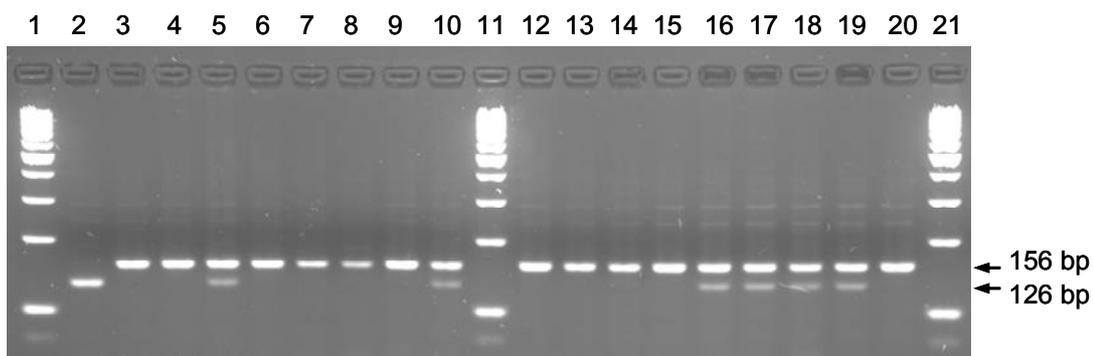


Abb. 44: Elektrophoresemuster des Tsp 509 I-Verdaus. Spur 1, 11 und 21: 100 bp-Längenstandard; Spur 2: 34T-Homozygotie; Spur 3, 4, 6-9, 12-15 und 20: 34C-Homozygotie; Spur 5, 10 und 16-19: 34C/34T-Heterozygotie.

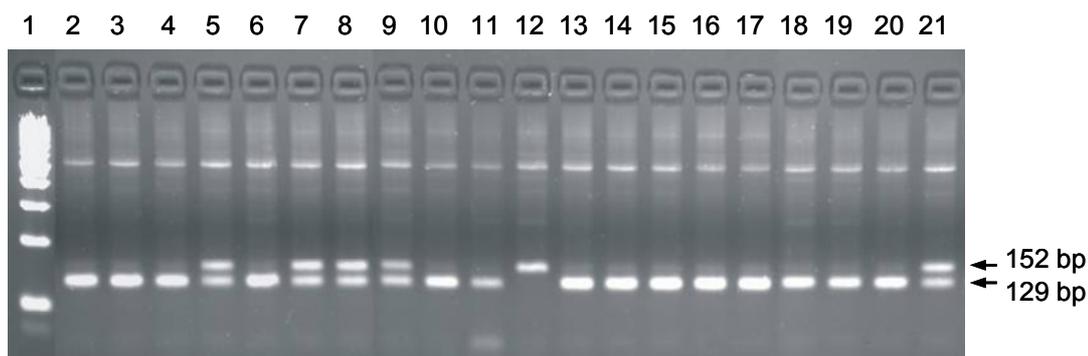


Abb. 45: Elektrophoresemuster des *Sma I*-Verdaus. Spur 1: 100 bp-Längenstandard; Spur 2-4, 6, 10, 11 und 13-20: 52G-Homozygotie; Spur 5, 7-9 und 21: 52G/52T-Heterozygotie; Spur 12: 52T-Homozygotie.

2.11. Statistische Auswertung

Die statistischen Berechnungen erfolgten, mit Ausnahme der EC_{50} -Wert-Berechnungen und der ROC-Analyse (siehe unten), mit Hilfe des Statistik-Programms StatView Version 5.0 (SAS Institute Inc., Cary, North Carolina, USA).

Für normalverteilte kontinuierliche Variablen wurden der Mittelwert und die Standardabweichung (SD) berechnet. Gruppenunterschiede normalverteilter kontinuierlicher Variablen wurden mittels des ungepaarten t-Tests analysiert.

Zur Überprüfung eines linearen Zusammenhangs zweier Variablen wurden eine lineare Regression mit Berechnung des Korrelationskoeffizienten r nach Pearson sowie eine Varianzanalyse (ANOVA) durchgeführt.

Für nicht-normalverteilte kontinuierliche Variablen wird der Median und der Interquartilenabstand, d.h. die Differenz zwischen 75. und 25. Perzentile, angegeben. Die Ergebnisse sind graphisch als Box-and-whiskers-Plots dargestellt. Zum Gruppenvergleich nicht-normalverteilter Variablen wurde der nichtparametrische Mann-Whitney-U-Test verwendet bzw. zum Vergleich verbundener Stichproben der Wilcoxon-Vorzeichen-Test. Für den Vergleich von mehr als zwei Gruppen nicht-normalverteilter Variablen wurde eine nichtparametrische einfaktorielles Varianzanalyse durchgeführt, der Kruskal-Wallis-Test.

Mit Hilfe der Spearman-Korrelation wurden nicht-lineare Zusammenhänge zweier Variablen untersucht, wobei der Rang-Korrelationskoeffizient ρ (rho) berechnet wurde.

Häufigkeitsunterschiede im Auftreten diskontinuierlicher Variablen wurden mit Hilfe von Kontingenztafeln ausgewertet. Zur Testung auf signifikante Unterschiede wurde der Chi-Quadrat-Test eingesetzt.

Sowohl die Berechnung der EC₅₀-Werte als auch die graphische Darstellung der Konzentrations-Wirkungskurven erfolgte mit Hilfe des Programms GraphPad Prism Version 4.00 (San Diego, California, USA). Die einzelnen Punkte der Konzentrations-Wirkungskurven stellen jeweils den Mittelwert sowie den Standardfehler (SEM) dar.

Die Receiver-Operating-Characteristics (ROC)-Analyse wurde mit Hilfe des Programms SPSS Version 11.5 (Chicago, USA) durchgeführt.

Ein Wert von $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen.

3. Ergebnisse

3.1. Allgemeine Charakterisierung des Studienkollektivs

Die 130 in die Studie eingeschlossenen Patienten waren überwiegend männlichen Geschlechts. Es haben nur 22 Frauen (16,9%) an der Studie teilgenommen. Das mittlere Alter lag insgesamt bei 66 Jahren, wobei der jüngste Patient 43, der älteste 81 Jahre alt war. Da sich das Patientenkollektiv zum größten Teil aus sehr gesundheitsbewussten, bewegungsaktiven Menschen zusammensetzte, war der BMI in den meisten Fällen nur leicht erhöht. Die demographischen Daten sind in Tab. 13 zusammengefasst.

Allgemeine Patienteninformationen	
männliches Geschlecht, n (%)	108 (83,1)
Alter, Jahre	66 ± 8
Größe, m	1,73 ± 0,08
Gewicht, kg	79,9 ± 12,9
BMI, kg/m ²	26,6 ± 3,7

Tab. 13: Demographische Daten des Patientenkollektivs ($n = 130$). Alter, Größe, Gewicht und Body Mass Index (BMI) sind als Mittelwert und Standardabweichung angegeben.

3.1.1. Kardiovaskuläre Risikofaktoren

Da das Vorliegen einer stabilen koronaren Herzerkrankung Voraussetzung für die Teilnahme an dieser Studie war, wiesen alle Patienten ein erhöhtes Risiko hinsichtlich des Auftretens koronarer Ereignisse auf. Neben wenigen Ausnahmen lagen bei den Studienteilnehmern multiple kardiovaskuläre Risikofaktoren vor. Wie bereits erwähnt, war die Mehrzahl der Patienten über 60 Jahre alt und männlich. Von den Frauen befanden sich die meisten in der Postmenopause. 80% aller teilnehmenden Patienten litten an einer Hypercholesterinämie und über 80% an einer Hypertonie. (Über die am Untersuchungstag bestimmten HDL- und LDL-Cholesterin-Werte sowie über die aktuell gemessenen Blutdruck-Werte informiert Abschnitt 3.1.4.) Bei gut einem Viertel der Patienten konnte eine positive Familienanamnese hinsichtlich einer KHK oder anderer arterieller Gefäßerkrankungen in jüngerem Alter (Männer < 55 Jahre, Frauen < 65 Jahre) festgestellt werden. Ein Diabetes mellitus vom Typ II fand sich bei 10,8% der Teilnehmer, eine Adipositas (BMI ≥ 30) bei 13,1%. Bemerkenswert

ist, dass zum Studienzeitpunkt lediglich 4,6% der Patienten Raucher waren. Weitere 4,6% waren seit kurzer Zeit Nichtraucher (seit ≤ 1 Jahr). Die Mehrzahl der Patienten hatte das Rauchen mit Eintreten des ersten koronaren Ereignisses eingestellt. 33 Patienten (25,4%) gaben an, niemals Raucher gewesen zu sein. Tab. 14 zeigt eine Übersicht zur Häufigkeit der Risikofaktoren im untersuchten Kollektiv.

Kardiovaskuläre Risikofaktoren	n (%)
Alter ≥ 60	113 (86,9)
positive Familienanamnese	34 (26,2)
Hypercholesterinämie	104 (80,0)
Hypertonie	113 (86,9)
Diabetes mellitus	14 (10,8)
Übergewicht	86 (66,2)
Adipositas	17 (13,1)
Raucher (aktuell)	6 (4,6)
Nichtraucher seit ≤ 1 Jahr	6 (4,6)
Nichtraucher seit > 1 Jahr	85 (65,4)

Tab. 14: Kardiovaskuläre Risikofaktoren des Patientenkollektivs ($n = 130$)

3.1.2. Atherosklerotische Ereignisse, Interventionen und Angina pectoris

Knapp 70% der Patienten ($n = 90$) hatten in der Vergangenheit einen Myokardinfarkt (MI) erlitten. Von diesen Patienten hatten wiederum 20% einen Reinfarkt bekommen ($n = 18$). Der Schlaganfall und die transitorische ischämische Attacke (TIA) spielten im untersuchten Patientenkollektiv zahlenmäßig gesehen eine untergeordnete Rolle (siehe Tab. 15), ebenso das Bauchortenaneurysma.

Bei nahezu allen Patienten ($n = 127$) wurde die Diagnose einer koronaren Herzerkrankung aufgrund einer Koronarangiographie gestellt, bei den verbliebenen drei Patienten allein aufgrund des MI. Eine Ballondilatation (PTCA) wurde bei ca. der Hälfte der Patienten ($n = 68$), in der Regel mit Stentimplantation, vorgenommen. Darüberhinaus musste sich ebenfalls die Hälfte der Patienten ($n = 67$) in der Vergangenheit einer Bypass-Operation unterziehen (siehe auch Tab. 15).

Atherosklerotische Ereignisse in der Vorgeschichte	n (%)
Myokardinfarkt	90 (69,2)
mehr als einen Myokardinfarkt	18 (13,8)
Schlaganfall	1 (0,8)
TIA	8 (6,2)

Interventionen in der Vorgeschichte	n (%)
Koronarangiographie	127 (97,7)
PTCA	68 (52,3)
Stentimplantation	59 (45,4)
Bypass-Operation	67 (51,5)

Aktuelle Beschwerden	n (%)
Angina pectoris	26 (20,0)

Tab. 15: Häufigkeit der atherosklerotischen Ereignisse und Interventionen in der Vorgeschichte sowie der aktuellen Angina pectoris-Beschwerden im Studienkollektiv (n = 130)

Jeder fünfte Patient gab an, aktuell an Angina pectoris-Beschwerden zu leiden (siehe Tab. 15). Der Großteil dieser Patienten bekam die Beschwerden bei starker Belastung (65,4%, n = 17), ca. ein Viertel bereits bei normaler Belastung (23,1%, n = 6) und 3 Patienten (11,5%) sogar bei geringster Belastung. Außerdem klagten weitere 17 Patienten (13,1%) über eine belastungsabhängige Dyspnoe.

3.1.3. Medikation

3.1.3.1. Acetylsalicylsäure (ASS)

Entsprechend den Einschlusskriterien (siehe Abschnitt 2.1.2.) nahm jeder Patient regelmäßig einmal pro Tag 100 mg ASS ein. Die ASS-Behandlungsdauer war innerhalb des Studienkollektivs sehr unterschiedlich (siehe Abb. 46). Die mediane Einnahmedauer betrug 7 Jahre (3 – 11 Jahre). Die kürzeste Einnahmedauer lag bei 5 Monaten und die längste bei 23 Jahren.

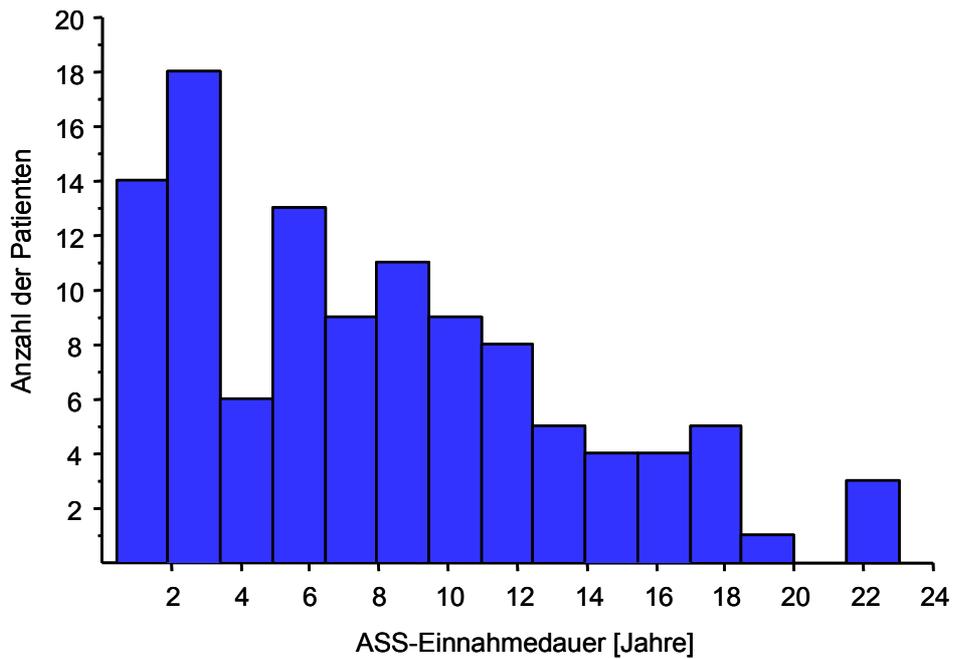


Abb. 46: ASS-Behandlungszeiträume der einzelnen Patienten

Es war den Patienten freigestellt, die ASS-Tablette am Morgen des Untersuchungstages einzunehmen. Hieraus ergab sich, dass 45 Patienten ASS morgens bereits eingenommen hatten und 65 Patienten ihre letzte ASS-Einnahme am Vortag hatten (bei 20 Patienten Information fehlend).

Die Mehrheit der Patienten nahm ein ASS-Präparat eines Generika-Herstellers ein. Nur von einem geringen Prozentsatz (11,5%) wurde das Original-Präparat der Firma Bayer eingenommen (siehe Tab. 16).

ASS-Handelsname	Firma	n (%)
Aspirin® bzw. Aspirin® protect	Bayer (Leverkusen)	15 (11,5)
HerzASS-ratiopharm®	Ratiopharm (Ulm)	16 (12,3)
ASS-Präparate sonstiger Generika-Hersteller		99 (76,2)

Tab. 16: Übersicht der vom Studienkollektiv eingenommenen ASS-Präparate

3.1.3.2. Weitere Arzneistoffe der Dauermedikation

Neben 100 mg ASS wurde eine Vielzahl weiterer Medikamente eingenommen. Rund Dreiviertel aller Patienten nahmen regelmäßig ein Statin sowie einen β -Blocker ein. Fast jeder

zweite Patient wurde mit einem ACE-Hemmer behandelt, und jeder dritte Patient erhielt ein Diuretikum. Ein Fünftel des Studienkollektivs befand sich in einer Dauerbehandlung mit Nitrovasodilatoren. Tab. 17 listet die im Studienkollektiv am meisten eingenommenen Arzneistoffgruppen der Dauermedikation auf. Bei einigen Patienten wurden zur Cholesterinsenkung auch Fibrate, Cholesterin-Resorptionshemmer sowie Anionenaustauschharze eingesetzt.

Medikation	n (%)
Thrombozytenaggregationshemmer (ASS)	130 (100,0)
Statin	102 (78,5)
β-Blocker	95 (73,0)
Diuretikum	43 (33,1)
ACE-Inhibitor	60 (46,2)
ATII-Rezeptor-Antagonist	17 (13,1)
Nitrovasodilatator	27 (20,8)
Calciumkanalblocker	20 (15,4)
Insulin und/oder orales Antidiabetikum	13 (10,0)

Tab. 17: Dauermedikation der Studienteilnehmer (n = 130)

3.1.3.3. Weitere Cyclooxygenase-hemmende Arzneistoffe

Innerhalb einer Woche vor der Untersuchung hatten 13,9% der Patienten (n = 18) mindestens einmal – neben der Dauermedikation mit 100 mg ASS – einen weiteren die Cyclooxygenase hemmenden Arzneistoff eingenommen. Zu diesen Arzneistoffen zählten hauptsächlich Diclofenac (n = 7) und Ibuprofen (n = 4). Diclofenac wurde von keinem der Patienten mit der vor der Untersuchung letzten ASS-Dosis zusammen oder zeitnah eingenommen. Hingegen hatte ein Patient, der seit zehn Tagen mit zweimal täglich 600 mg Ibuprofen aufgrund von Rückenproblemen behandelt wurde, angegeben, am Morgen vor dem Untersuchungstag seine letzte ASS-Dosis zusammen mit einer Ibuprofen 600 mg-Tablette eingenommen zu haben.

Eine weitere Patientin wurde aufgrund eines Weichteilrheumatismus zweimal wöchentlich mit je 15 mg Meloxicam behandelt. Am Studientag lag die letzte Meloxicam-Einnahme zwei Tage zurück, d.h. aufgrund der recht langen Halbwertszeit des Meloxicams (20 h), wird sich zum Untersuchungszeitpunkt noch Meloxicam im Körper der Patientin befunden haben.

Paracetamol und Metamizol, die vermutlich auch über eine COX-Hemmung wirken, gehören ebenfalls zu den eingenommenen Arzneistoffen. Allerdings lagen die Einnahmezeitpunkte mindestens zwei Tage zurück.

3.1.3.4. Antioxidantien

Knapp die Hälfte aller Studienteilnehmer gab an, regelmäßig Nahrungsergänzungsmittel zu sich zu nehmen. Insgesamt waren es 24 Patienten (18,5%), die täglich mindestens ein antioxidativ wirkendes Nahrungsergänzungsmittel einnahmen. Hierzu zählten: Vitamin C, Vitamin E, Coenzym Q10 sowie α -Liponsäure.

3.1.4. Allgemeine Laborparameter

Die Werte für das am Untersuchungstag erhobene kleine Blutbild waren bei fast allen Patienten im Normbereich (vergleiche Tab. 18). Nur vereinzelt waren leicht erniedrigte Erythrozytenzahlen, Hämoglobin-Konzentrationen und Hämatokrit-Werte zu beobachten sowie geringfügig erhöhte MCH-Werte. Drei Patienten wiesen eine knapp unterhalb der Normgrenze liegende Thrombozytenzahl auf.

Kleines Blutbild		Referenzbereich
Erythrozyten, Anzahl/pl	4,7 ± 0,4	4,2 – 5,7
hypochrome Erythrozyten, %	0,4 ± 1,3	< 5,0
Hämoglobin, g/dl	14,6 ± 1,2	13,1 – 17,3
Hämatokrit, Vol%	42,3 ± 3,4	39,0 – 50,0
MCV, fl	90,4 ± 4,4	80,0 – 101,0
MCH, pg	31,1 ± 1,6	27,0 – 32,0
MCHC, g/dl	34,5 ± 1,3	32,0 – 37,0
Thrombozyten, Anzahl/nl	239 ± 61	142 – 424
Leukozyten, Anzahl/nl	6,4 ± 1,5	4,0 – 10,0

Tab. 18: Kleines Blutbild des Studienkollektivs (n = 130). Die Werte sind als Mittelwert und Standardabweichung angegeben.

Bei 26,2% der Patienten (n = 34) war das Gesamt-Cholesterin am Untersuchungstag oberhalb des Grenzwertes von 200 mg/dl. Bei der Einzelbestimmung des HDL- und LDL-Cholesterins zeigte sich jedoch nur in einem Fall ein erhöhtes LDL/HDL-Verhältnis. Die Triglyceride waren bei 11,5% (n = 15) der Studienteilnehmer über 200 mg/dl.

Der Blutzucker, der nur in einer Subgruppe des Studienkollektivs von n = 63 bestimmt wurde, war in 13 Fällen oberhalb des Referenzbereiches. Hierzu zählten acht der Patienten, die sich aufgrund eines diagnostizierten Typ II-Diabetes in Behandlung befanden.

Die Werte für das C-reaktive Protein (CRP) erbrachten für 11 Patienten den Hinweis auf einen akut entzündlichen Prozess. Da die CRP-Werte dieser Studie mit Hilfe einer hochsensitiven Messmethode bestimmt wurden, konnte auch innerhalb des Normalbereiches (< 5,0 mg/l) für jeden Patienten ein Wert ermittelt werden. Das bedeutet, dass die Patienten auch hinsichtlich des Vorhandenseins lokaler Entzündungen (z.B. in atherosklerotisch veränderten Gefäßwänden), die von einer geringgradigen systemischen inflammatorischen Antwort begleitet sind, charakterisiert werden konnten. Abb. 47 zeigt die anhand der unterschiedlichen CRP-Werte gebildeten Gruppen mit den jeweils dazugehörigen Patientenzahlen.

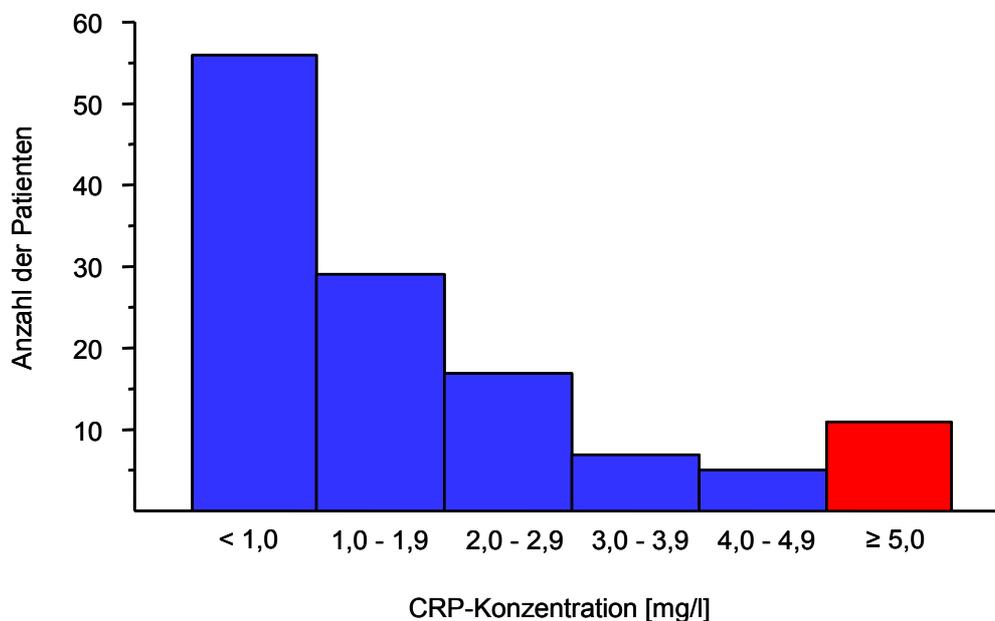


Abb. 47: Einteilung des Studienkollektivs anhand der CRP-Konzentrationen.

Die mediane CRP-Konzentration sowie die Mittelwerte aller in der Studie bestimmten klinisch-chemischen Laborparameter sind der Tab. 19 zu entnehmen.

Der unmittelbar vor der Blutuntersuchung bestimmte systolische Blutdruck befand sich bei nur 48,8% der Patienten unter dem Grenzwert von 140 mmHg. Bei 16,0% der Patienten wurden sogar Werte über 160 mmHg gemessen, und drei Patienten zeigten einen Wert von über 180 mmHg.

Der diastolische Blutdruck lag bei 28,0% der Patienten über dem Grenzwert von 90 mmHg. Ein diastolischer Blutdruckwert von über 100 mmHg wurde bei 5,6% des Studienkollektivs festgestellt.

Die mittleren Blutdruckwerte sowie die mittlere Herzfrequenz der Studienteilnehmer sind in Tab. 20 angegeben.

Klinische Chemie		Referenzbereich
Gesamt-Cholesterin, mg/dl	179 ± 35	< 200
HDL-Cholesterin, mg/dl	54 ± 14	> 35
Risikofaktor Cholesterin/HDL	3,5 ± 0,9	< 5,0
LDL-Cholesterin, mg/dl	102 ± 30	< 150
LDL/HDL	2,0 ± 0,8	< 4,0
Triglyceride, mg/dl	116 ± 64	< 200
Glucose im Serum, mg/dl	99 ± 19	60 – 110
CRP (supersensitiv), mg/l	1,1 (0,7 – 2,6)	< 5,0
Kreatinin in Serum, mg/dl	1,0 ± 0,2	0,5 – 1,2
Harnsäure, mg/dl	6,0 ± 1,4	3,6 – 8,2

Tab. 19: Klinisch-chemische Laborparameter des Studienkollektivs. Mit Ausnahme des CRP sind alle Werte als Mittelwert und Standardabweichung angegeben. Für das CRP wurde der Median mit Interquartilenabstand berechnet.

systolischer Blutdruck, mmHg	139 ± 19
diastolischer Blutdruck, mmHg	83 ± 10
Herzfrequenz, 1/min	65 ± 9

Tab. 20: Blutdruck und Herzfrequenz der Studienteilnehmer. Die Werte sind als Mittelwert und Standardabweichung angegeben.

3.2. Identifizierung „ASS-resistenter“ Patienten

Innerhalb des Patientenkollektivs wurde eine erhebliche interindividuelle Variabilität der Thrombozytenaggregation festgestellt. Abb. 48 stellt diese exemplarisch anhand einer Häufigkeitsverteilung der Werte für die maximale Aggregation dar, die nach Induktion mit 1 mg/l Kollagen bestimmt wurden. Es handelt sich um eine nicht-symmetrische Verteilung mit einer medianen maximalen Aggregation von 31,5% (21,3 – 42,1%).

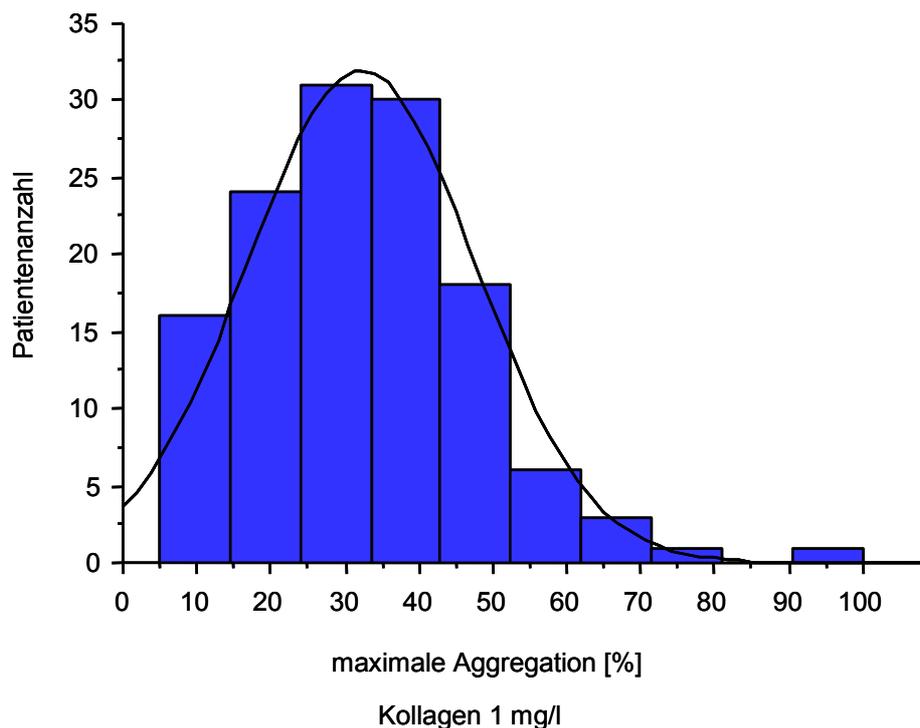


Abb. 48: Histogramm zu der im gesamten Studienkollektiv ($n = 130$) bestimmten Kollagen-induzierten Thrombozytenaggregation. Das Ausmaß der mit 1 mg/l Kollagen ausgelösten Aggregation wird durch die maximale Aggregation in Prozent beschrieben.

3.2.1. Bestimmung einer „ASS-Resistenz“ vom Typ I nach Weber

Zunächst wurden die Patienten mit einer „ASS-Resistenz“ vom Typ I (Weber et al. 2002, siehe auch Abschnitt 1.4.5.) ausfindig gemacht. Hierzu wurde überprüft, ob der Zusatz von ASS in vitro zum plättchenreichen Plasma eine Reduktion sowohl der Kollagen-induzierten Aggregation als auch der Thromboxan-Bildung bewirken konnte.

3.2.1.1. Beeinflussung der Kollagen-induzierten Thrombozytenaggregation durch Zusatz von ASS in vitro

Bei vier Patienten kam es durch den Zusatz von 100 μ M ASS in vitro zu einer deutlichen Senkung der Kollagen (1 mg/l)-induzierten Aggregation. Die Werte für die maximale Aggregation konnten bei diesen Patienten durchschnittlich um die Hälfte reduziert werden, von 66,8% (55,4 – 83,6%) auf 33,7% (30,3 – 35,8%). Statistischen Berechnungen zufolge ist die Reduktion nicht signifikant ($p = 0,0679$). Dennoch können die vier Patienten hinsichtlich dieses Kriteriums als „Typ I-resistent“ eingestuft werden, da die Aggregation ohne ASS-Zusatz in vitro verglichen mit allen anderen Patienten ($n = 126$) signifikant höher ausfiel ($p = 0,0024$), dieser Unterschied jedoch nach Zusatz von ASS in vitro verloren ging ($p = 0,7058$). Bei den 126 Patienten blieb die Aggregation durch ASS-Zusatz unbeeinflusst (30,8% (21,2 – 40,2%) versus 31,3% (21,7 – 40,6%), $p = 0,5156$). Abb. 49 stellt die beschriebenen Ergebnisse als Box-Diagramm dar.

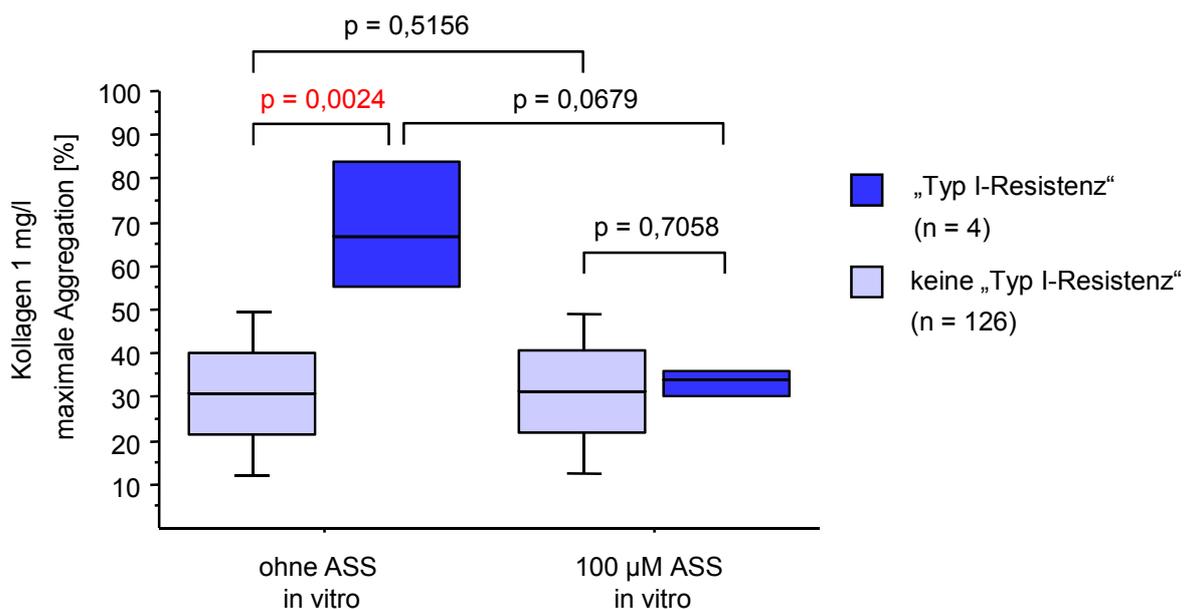


Abb. 49: Einfluss von ASS in vitro auf die Kollagen-induzierte Thrombozytenaggregation zur Ermittlung der Patienten mit einer „ASS-Resistenz“ vom Typ I nach Weber

Zur Veranschaulichung der starken Variabilität der Aggregation innerhalb der Patientengruppe, bei der ASS in vitro zu einer Reduktion der Aggregation führte, sind für diese Patienten in Abb. 50 die Einzelwerte jeweils für die maximale Aggregation dargestellt.

Abb. 51 zeigt beispielhaft die Original-Aggregationskurven eines Patienten, dessen Thrombozytenaggregation durch ASS-Zusatz in vitro gesenkt werden konnte.

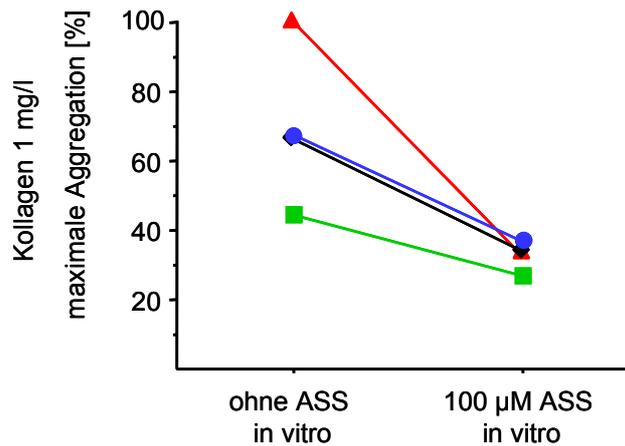


Abb. 50: Maximale Kollagen-induzierte Aggregationen der Patienten, bei denen ASS-Zusatz *in vitro* eine Reduktion der Aggregation zur Folge hatte

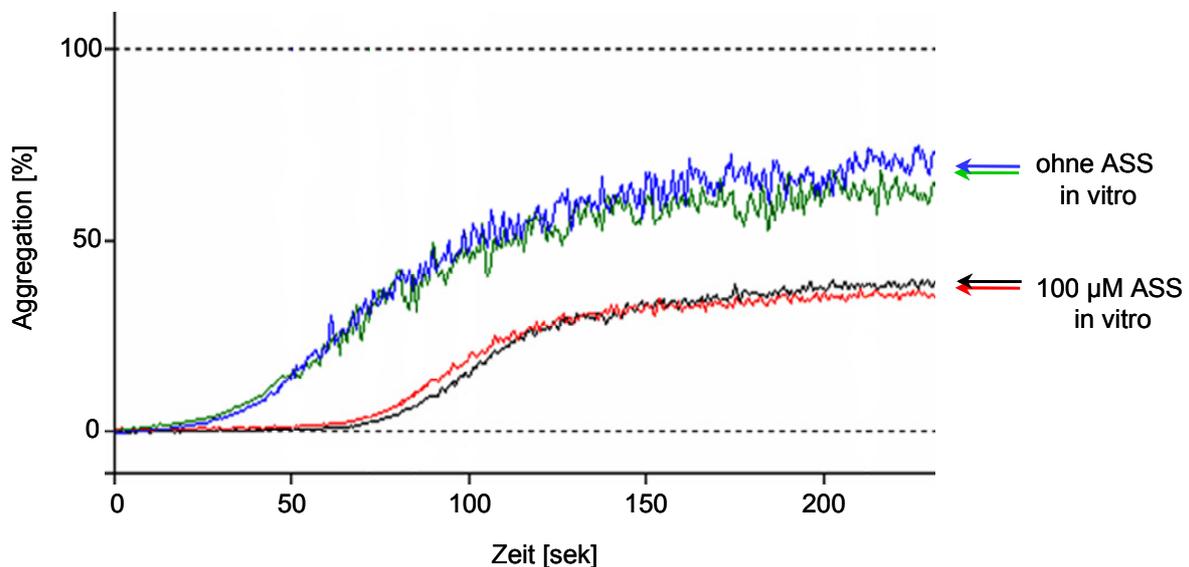


Abb. 51: Aggregationskurven eines Patienten mit „Typ I-Resistenz“. Die Aggregationen wurden jeweils als Doppelbestimmung mit 1 mg/l Kollagen ausgelöst.

3.2.1.2. Beeinflussung der Kollagen-induzierten Thromboxan-Bildung durch Zusatz von ASS *in vitro*

Die Reduktion der Aggregation durch den Zusatz von ASS *in vitro*, welche bei vier Patienten nachgewiesen wurde (siehe Abschnitt 3.2.1.1.), ging mit einer Hemmung der Thromboxan-Bildung von nahezu 100% einher ($97,6\% \pm 1,7\%$). Während die in den Aggregationsüberständen bestimmten TxB_2 -Werte ohne ASS-Zusatz *in vitro* bei 3.224 pg/ml (1.659 – 19.829 pg/ml) lagen, konnten nach ASS-Zusatz nur noch TxB_2 -Konzentrationen von 57 pg/ml (50 – 234 pg/ml) festgestellt werden (siehe Abb. 52). Diese Abnahme ist – wie die der

Aggregation – nicht signifikant ($p = 0,0679$). Allerdings unterscheiden sich die TxB_2 -Konzentrationen der Aggregationsüberstände, die in Abwesenheit von ASS *in vitro* gewonnen wurden, signifikant, wenn die Gruppe der vorbenannten vier Patienten mit der Gruppe der übrigen Patienten verglichen wird ($p = 0,0008$). Da diese Signifikanz in Anwesenheit von ASS *in vitro* verloren geht ($p = 0,4015$), kann auch hinsichtlich des Kriteriums „Reduktion der Thromboxan-Bildung“ im Falle dieser vier Patienten von einer „Typ I-Resistenz“ gesprochen werden (siehe ebenfalls Abb. 52).

Somit wurden insgesamt 3,1% ($n = 4$) des Studienkollektivs als Patienten mit einer „ASS-Resistenz“ vom Typ I nach Weber identifiziert, da beide Kriterien – sowohl die Senkung der Kollagen-induzierten Aggregation als auch die Hemmung der Kollagen-induzierten TxB_2 -Bildung durch Zusatz von ASS *in vitro* – erfüllt wurden.

Bei den Patienten ohne „Typ I-Resistenz“ konnten sowohl in An- als auch in Abwesenheit von ASS *in vitro* nur niedrige TxB_2 -Konzentrationen in den Aggregationsüberständen nachgewiesen werden. Dennoch wurde bei diesen Patienten die bereits stark unterdrückte TxB_2 -Synthese durch den Zusatz von ASS *in vitro* noch weiter gehemmt, so dass alle TxB_2 -Werte unterhalb der Nachweisgrenze lagen (75 pg/ml (50 – 83 pg/ml) in Abwesenheit von ASS *in vitro* versus 52 pg/ml (47 – 75 pg/ml) in Anwesenheit von ASS *in vitro*, $p < 0,0001$; Abb. 52). Hierzu sind weitere Untersuchungsergebnisse in Abschnitt 3.10.2. beschrieben.

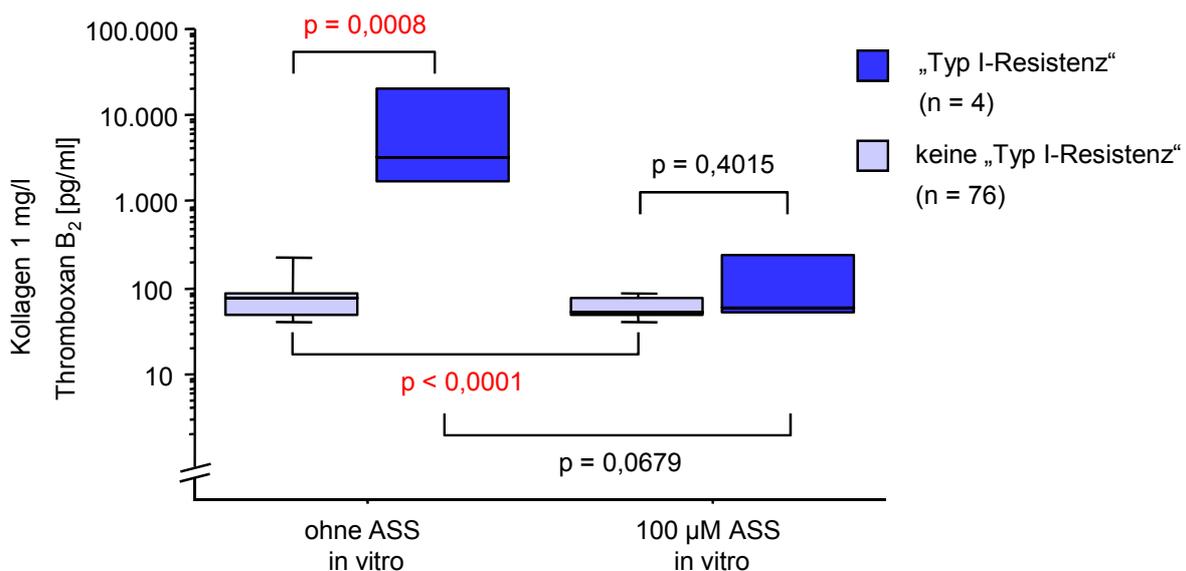


Abb. 52: Kollagen-induzierte Thromboxan B₂-Bildung in An- bzw. Abwesenheit von ASS *in vitro* zur Identifizierung „ASS-resistenter“ Patienten vom Typ I nach Weber

So wie die Patienten innerhalb der „Typ I-Resistenz“-Gruppe hinsichtlich ihrer Werte für die Aggregation starke Unterschiede zeigten (siehe Abschnitt 3.2.1.1. sowie Abb. 50), waren auch ihre TxB_2 -Konzentrationen in den Aggregationsüberständen interindividuell recht unterschiedlich (siehe Abb. 53).

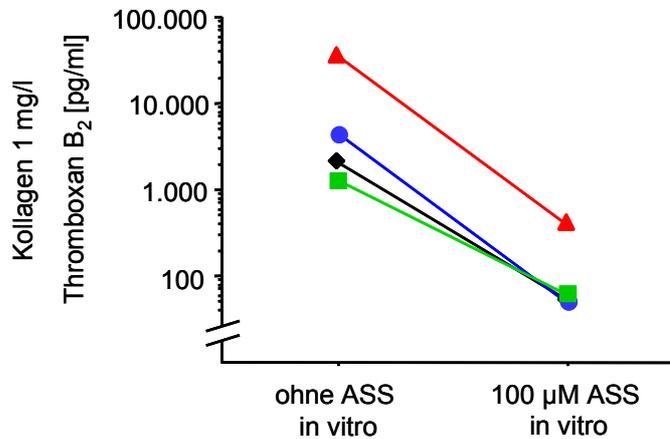


Abb. 53: Thromboxan B_2 -Konzentrationen in den Aggregationsüberständen der Patienten mit einer „ASS-Resistenz“ vom Typ I ($n = 4$) vor bzw. nach ASS-Zusatz in vitro

3.2.2. Einteilung des Studienkollektivs in ASS-Responder (High- und Medium-Responder) und ASS-Low-Responder

Die „Typ I-resistenten“ Patienten ($n = 4$) werden als eigenständige Gruppe betrachtet, so dass sie bei der Einteilung des Studienkollektivs in ASS-Responder und ASS-Low-Responder nicht berücksichtigt werden, wenngleich es sich bei dieser Patientengruppe selbstverständlich auch um eine Form der ASS-Low- bzw. ASS-Non-Response handelt.

Die verbleibenden 126 Patienten werden hinsichtlich der maximalen Thrombozytenaggregation, die nach Induktion mit 1 mg/l Kollagen bestimmt wurde, in Terzile unterteilt. Hierbei werden die Patienten des unteren Terzils, d.h. des Terzils mit den niedrigsten Werten für die maximale Aggregation, als ASS-High-Responder bezeichnet, die des mittleren als ASS-Medium-Responder und die des oberen Terzils als ASS-Low-Responder. Jedes Terzil umfasst 42 Patienten. Für eine Vielzahl von Betrachtungen werden die High- und Medium-Responder auch als ASS-Responder ($n = 84$) zusammengefasst.

In Abb. 54 ist die Einteilung des Patientenkollektivs anhand der maximalen Aggregation als Box-Diagramm dargestellt. Tab. 21 gibt für die einzelnen Gruppen die dazugehörigen Mediane mit Interquartilenabstand, die minimalen und die maximalen Werte an.

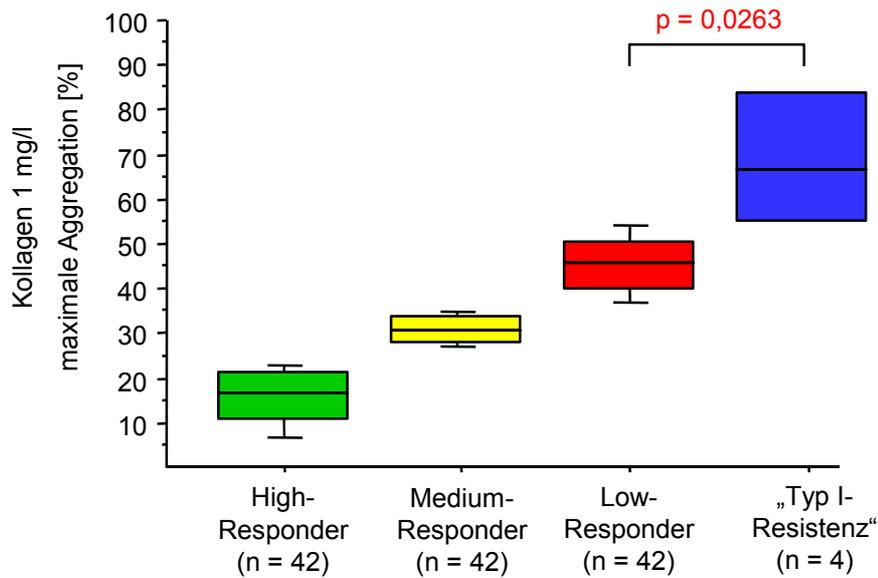


Abb. 54: Einteilung des Studienkollektivs in ASS-High-Responder, ASS-Medium-Responder, ASS-Low-Responder und Patienten mit „Typ I-Resistenz“

	Maximale Aggregation [%], Induktor: Kollagen 1 mg/l			
	Median	Interquartilenabstand	Minimum	Maximum
High-Responder (n = 42)	16,7	10,7 – 21,2	4,9	24,6
Medium-Responder (n = 42)	30,8	28,2 – 33,7	25,2	36,3
Low-Responder (n = 42)	46,0	40,2 – 50,5	36,3	72,6
Patienten mit „Typ I-Resistenz“ (n = 4)	66,8	55,4 – 83,6	44,3	100,0

Tab. 21: Werte für die maximale Aggregation [%] der einzelnen Patientengruppen. Die Aggregation wurde mit 1 mg/l Kollagen ausgelöst.

Durch Zusammenfassen der High- und Medium-Responder zur ASS-Responder-Gruppe errechnet sich eine mediane maximale Aggregation von 24,9% (16,7 – 30,8%).

Die Patienten mit einer „ASS-Resistenz“ vom Typ I weisen nicht nur im Vergleich mit allen anderen Patienten ohne „Typ I-Resistenz“ eine signifikant höhere Kollagen-induzierte Thrombozytenaggregation auf (siehe Abschnitt 3.2.1.1. Abb. 49), die Signifikanz bleibt sogar noch bestehen, wenn ein Vergleich mit der ASS-Low-Responder-Gruppe vorgenommen wird ($p = 0,0263$, siehe Abb. 54).

Für die Einteilung des Studienkollektivs wurde jeweils die mit 1 mg/l Kollagen ausgelöste Thrombozytenaggregation hinsichtlich der maximalen Aggregation ausgewertet. Wie in Abschnitt 2.3.5. erläutert wurden die Aggregationskurven ebenfalls bezüglich der maximalen

Steigung, der Fläche unter der Kurve (AUC) sowie der Zeit bis zum Erreichen der maximalen Steigung (lag time) analysiert. Diese zusätzlichen drei Parameter stehen alle in einem engen Zusammenhang mit den Werten für die maximale Aggregation. So zeigt Abb. 55, dass sich die Werte der einzelnen Patientengruppen sowohl für die maximale Steigung als auch die AUC analog zu den maximalen Aggregationswerten verhalten, denn für beide Parameter bleibt jeweils ein signifikanter Anstieg über die Gruppen – in der Reihenfolge High-, Medium-, Low-Responder, „Typ I-Resistenz“ – erhalten (jeweils $p < 0,0001$). Je stärker eine Aggregationsreaktion ausfällt, desto geringer der Wert für die lag time; auch dieser Zusammenhang wird durch eine signifikante Abnahme der lag time über die einzelnen Gruppen hinweg deutlich ($p = 0,0024$, siehe Abb. 56). Diese signifikanten Zusammenhänge erlauben zwecks einer besseren Übersichtlichkeit, für alle weiteren Ergebnisse stets die Werte für die maximale Aggregation anzugeben.

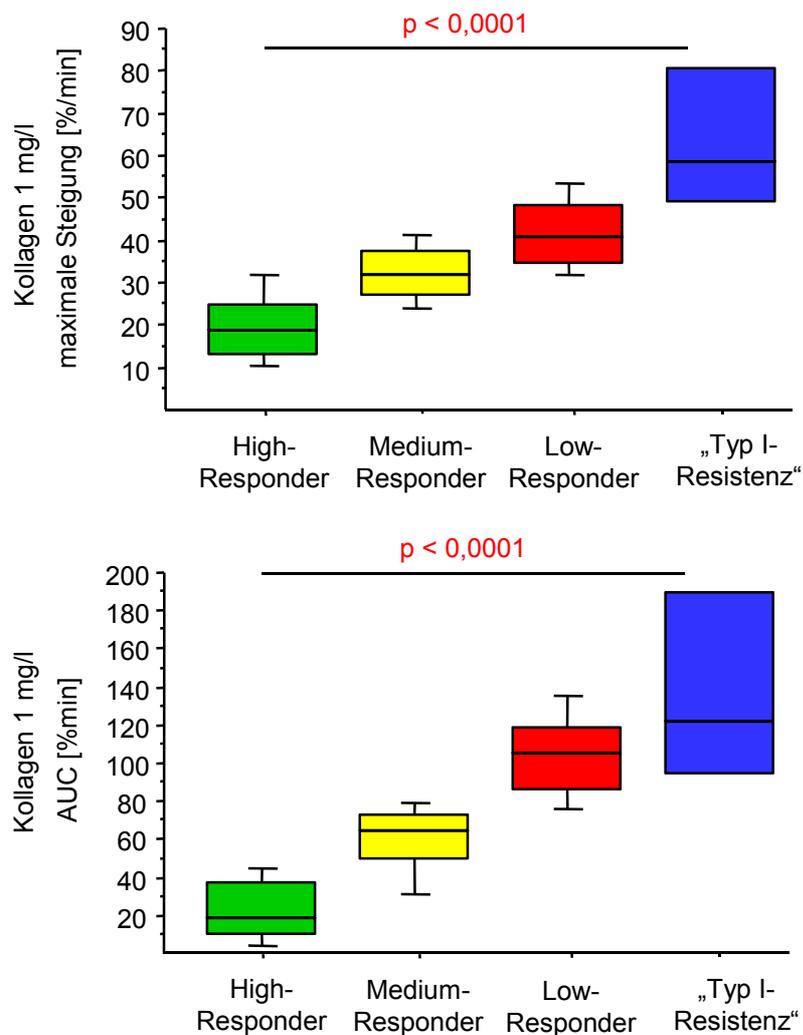


Abb. 55: Maximale Steigung [%/min] und AUC [%min] der Kollagen (1 mg/l)-induzierten Aggregationskurven der einzelnen Patientengruppen (High-, Medium- und Low-Responder jeweils $n = 42$, „Typ I-Resistenz“ $n = 4$)

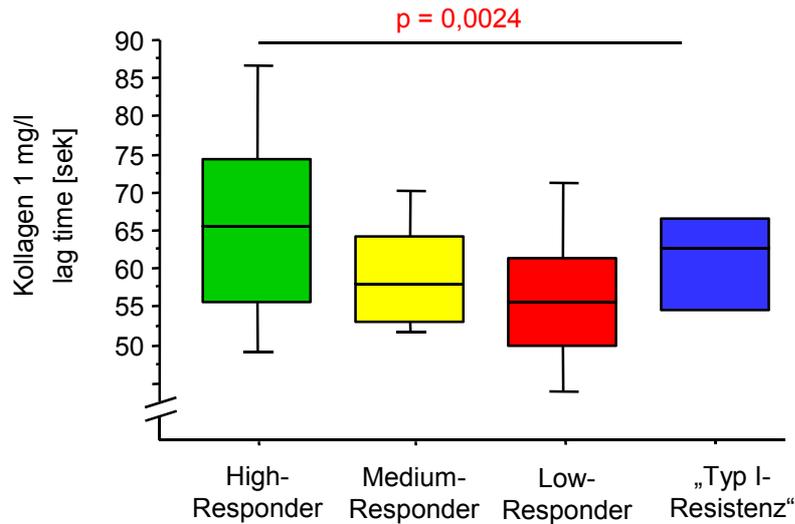


Abb. 56: Lag time [sek] der Kollagen (1 mg/l)-induzierten Aggregationskurven der einzelnen Patientengruppen (High-, Medium- und Low-Responder jeweils $n = 42$, „Typ I-Resistenz“ $n = 4$)

3.2.3. Ermittlung einer „ASS-Resistenz“ vom Typ III nach Weber („ASS-Pseudoresistenz“)

Es wurde bereits in Abschnitt 3.2.1. gezeigt, dass die Kollagen-induzierte Thrombozytenaggregation und Thromboxan-Bildung durch den Zusatz von 100 μM ASS in vitro lediglich bei den vier „Typ I-resistenten“ Patienten deutlich reduziert werden konnte, verglichen mit dem übrigen Patientenkollektiv, welches zunächst als eine Einheit betrachtet worden war. In diesem Abschnitt wird untersucht, ob auch nach der Einteilung des Studienkollektivs, wie in Abschnitt 3.2.2. beschrieben, sowohl die Aggregation als auch die TxB_2 -Bildung durch den ASS-Zusatz – insbesondere in der ASS-Low-Responder-Gruppe – unbeeinflusst bleibt.

Wie aus Abb. 57 ersichtlich ist, konnte der Zusatz von 100 μM ASS zum plättchenreichen Plasma weder die maximale Aggregation der ASS-Responder noch die der ASS-Low-Responder reduzieren. Somit ergibt sich auch in Anwesenheit von ASS in vitro ein hoch signifikanter Unterschied zwischen der High-, Medium- und Low-Responder-Gruppe hinsichtlich der Kollagen-induzierten Thrombozytenaggregation ($p < 0,0001$).

Während die Aggregation ohne ASS-Zusatz in vitro bei den „Typ I-resistenten“ Patienten im Vergleich zur Low-Responder-Gruppe signifikant höher war ($p = 0,0263$), zeigt sich nach dem ASS-Zusatz eine umgekehrte Signifikanz: Die Low-Responder weisen nun die höheren maximalen Aggregationswerte auf (44,6% (40,0 – 50,0%) versus 33,7% (30,3 – 35,8%),

$p = 0,0056$). Die „Typ I-resistenten“ Patienten haben durch den ASS-Zusatz Werte erreicht, die zwar noch signifikant höher liegen als die der High-Responder ($p = 0,0014$), sich aber dennoch deutlich reduziert im Medium-Responder-Bereich ansiedeln.

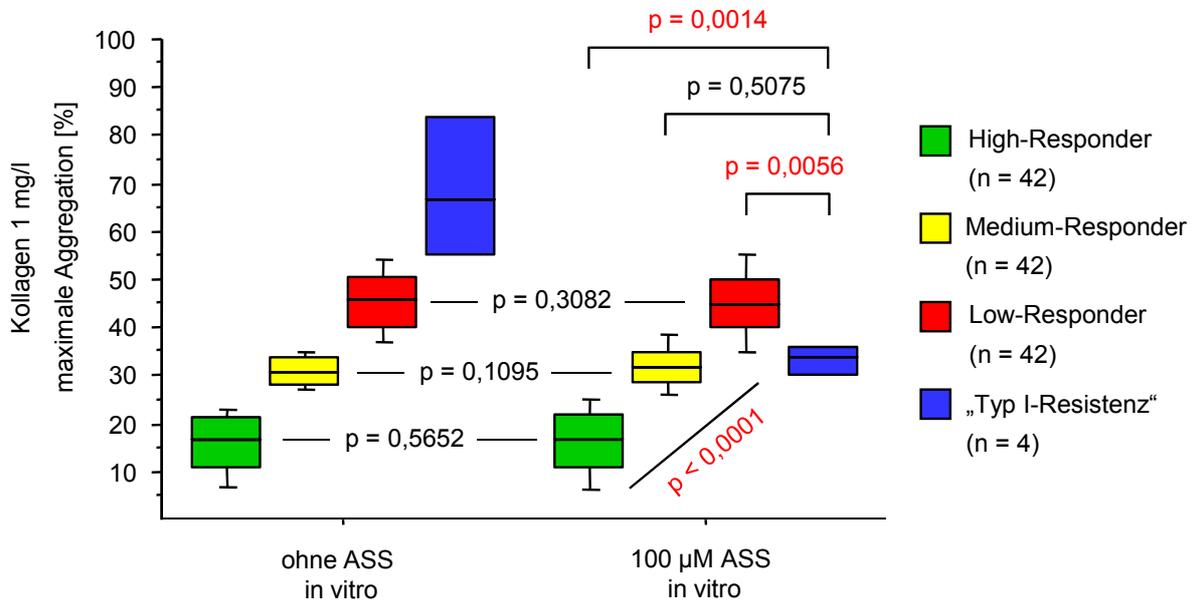


Abb. 57: Effekt von 100 µM ASS in vitro auf die Kollagen-induzierte Thrombozytenaggregation des Studienkollektivs, unterteilt in ASS-High-, ASS-Medium- und ASS-Low-Responder. Zum Vergleich sind zusätzlich die maximalen Aggregationswerte der „Typ I-Resistenz“-Gruppe dargestellt.

Die Original-Aggregationskurven eines ASS-Low-Responders zeigt Abb. 58. Die maximale Aggregation bleibt nach ASS-Zusatz in vitro unverändert. Es ist allerdings ein kleiner Einfluss von ASS in vitro auf die lag time und die maximale Steigung zu erkennen. Es handelt sich hierbei keineswegs um eine Einzelbeobachtung. Bei zahlreichen Patienten und in gleichem Maße bei den Responder- und den Low-Responder-Patienten, konnte dieser Effekt bestätigt werden, so dass sich für beide Patientengruppen durch den ASS-Zusatz in vitro eine signifikante Verlängerung der lag time errechnete (61 sek (55 – 70 sek) versus 79 sek (68 – 88 sek) für die Responder-Gruppe, $p < 0,0001$; 56 sek (50 – 61 sek) versus 68 sek (61 – 74 sek) für die Low-Responder-Gruppe, $p < 0,0001$; siehe Abb. 59 oben) sowie eine signifikante Zunahme der maximalen Steigung (26 %/min (19 – 33 %/min) versus 33 %/min (23 – 39 %/min) für die Responder-Gruppe, $p < 0,0001$; 41 %/min (35 – 49 %/min) versus 45 %/min (40 – 53 %/min) für die Low-Responder-Gruppe, $p < 0,0001$; siehe Abb. 59 unten).

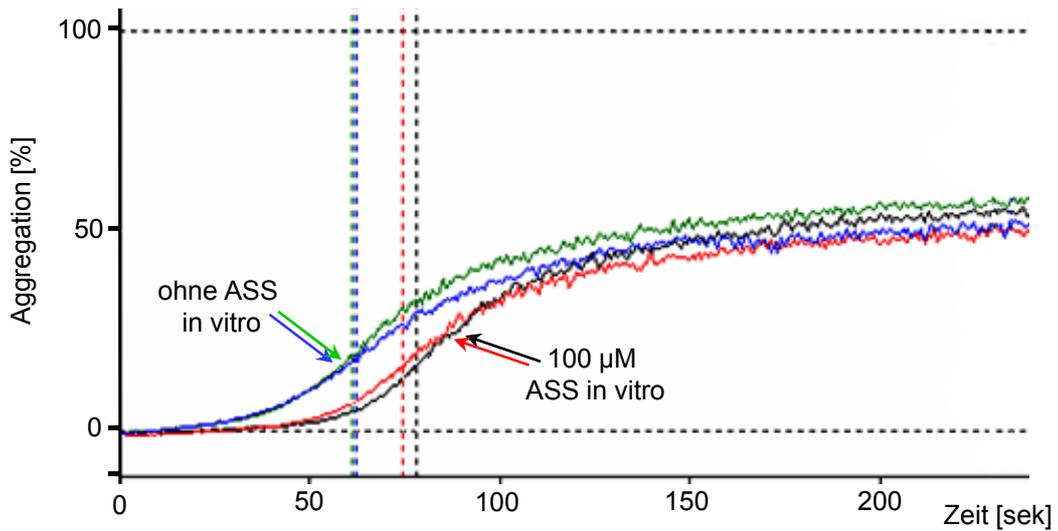


Abb. 58: Typische Aggregationskurven eines ASS-Low-Responders. Die Aggregationen wurden jeweils als Doppelbestimmung mit 1 mg/l Kollagen ausgelöst.

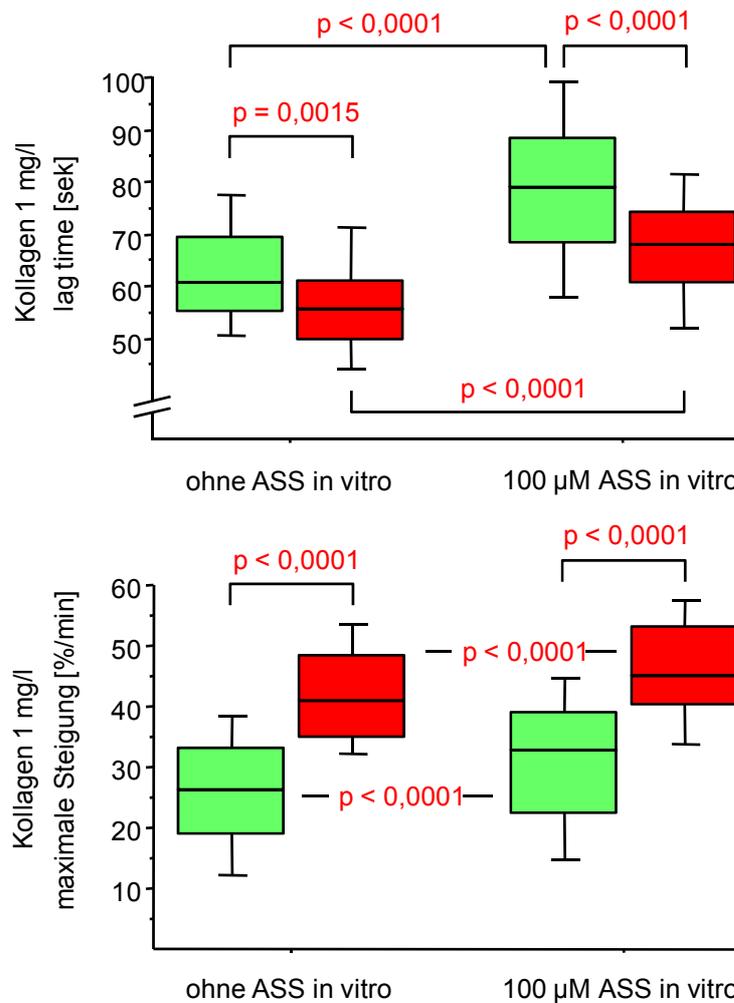


Abb. 59: Einfluss von 100 µM ASS in vitro auf die lag time und die maximale Steigung der Kollagen-induzierten Aggregationskurven der Responder (■, n = 84) und Low-Responder (■, n = 42)

Da eine durch ASS in vitro verursachte Verlängerung der lag time stets mit einem Anstieg der maximalen Steigung einherging, und es sich darüberhinaus trotz der Signifikanz nur um kleine Effekte handelte, kam es durch den ASS-Zusatz insgesamt gesehen zu keiner signifikanten Beeinflussung der AUC (43 %min (19 – 65 %min) versus 44 %min (16 – 62 %min) für die Responder-Gruppe, $p = 0,2028$; 105 %min (87 – 119 %min) versus 99 %min (75 – 113 %min) für die Low-Responder-Gruppe, $p = 0,0651$; siehe Abb. 60).

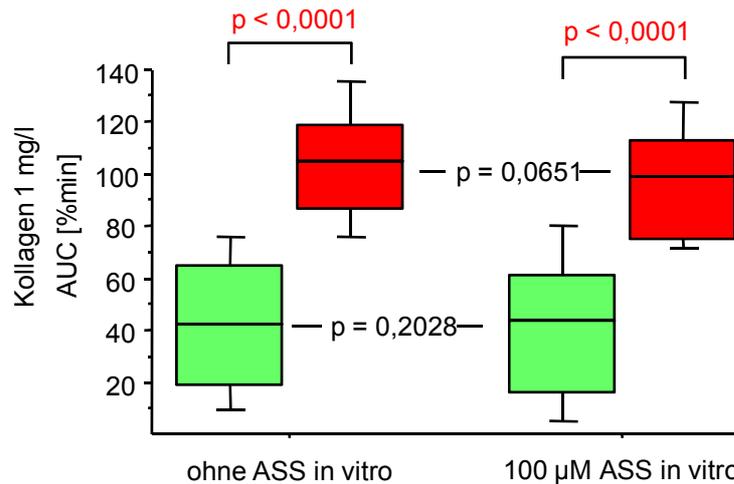


Abb. 60: Einfluss von 100 µM ASS in vitro auf die AUC der Kollagen-induzierten Aggregationskurven der Responder (■, $n = 84$) und Low-Responder (■, $n = 42$)

Hinsichtlich der TxB_2 -Konzentrationen in den Aggregationsüberständen nach Kollagen-Induktion konnte weder ohne noch mit ASS-Zusatz in vitro ein Unterschied zwischen der ASS-Responder-Gruppe und der ASS-Low-Responder-Gruppe ausgemacht werden (75 pg/ml (50 – 83 pg/ml) versus 54 pg/ml (51 – 83 pg/ml) ohne ASS-Zusatz, $p = 0,7933$; 52 pg/ml (47 – 77 pg/ml) versus 52 pg/ml (47 – 59 pg/ml) mit ASS-Zusatz, $p = 0,9915$; siehe Abb. 61).

In beiden Gruppen, der Responder- und der Low-Responder-Gruppe, wird die TxB_2 -Bildung durch die orale ASS-Gabe zu 98% inhibiert, werden zum Vergleich die Thromboxan-Werte der „Typ I-resistenten“ Patienten herangezogen (z.B. 54 pg/ml (51 – 83 pg/ml) für die Low-Responder-Gruppe versus 3.224 pg/ml (1.659 – 19.829 pg/ml) für die „Typ I-resistenten“ Patienten, $p = 0,0014$). Nach ASS-Zusatz ist dieser signifikante Unterschied verschwunden (z.B. 52 pg/ml (47 – 59 pg/ml) für die Low-Responder-Gruppe versus 57 pg/ml (50 – 234 pg/ml) für die „Typ I-resistenten“ Patienten, $p = 0,4733$; siehe ebenfalls Abb. 61).

Wie bereits für die Gesamtgruppe der Patienten ohne „Typ I-Resistenz“ beschrieben wurde (siehe Abschnitt 3.2.1.2. und Abb. 52), gilt auch nach der Einteilung der Patienten für die

Responder- und die Low-Responder-Gruppe in gleichem Maße, dass es, trotz der schon stark gehemmten TxB_2 -Synthese, durch den Zusatz von ASS in vitro zu einer weiteren signifikanten Reduzierung der TxB_2 -Konzentrationen kam (für die Responder-Gruppe: 75 pg/ml (50 – 83 pg/ml) in Abwesenheit von ASS in vitro versus 52 pg/ml (47 – 77 pg/ml) in Anwesenheit von ASS in vitro, $p = 0,0018$ und für die Low-Responder-Gruppe: 54 pg/ml (51 – 83 pg/ml) in Abwesenheit von ASS in vitro versus 52 pg/ml (47 – 59 pg/ml) in Anwesenheit von ASS in vitro, $p = 0,0173$; siehe Abb. 61). In Abschnitt 3.10.2. wird auf diese Beobachtung näher eingegangen.

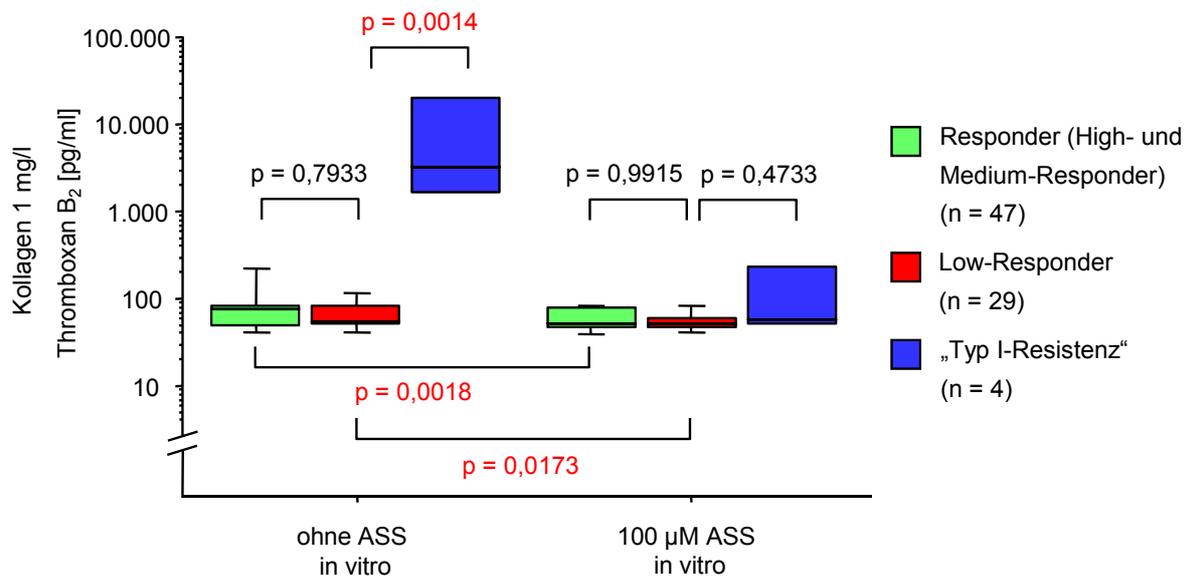


Abb. 61: Thromboxan B_2 -Konzentrationen in An- bzw. Abwesenheit von ASS in vitro nach Induktion mit 1 mg/l Kollagen, bestimmt in den Aggregationsüberständen der ASS-Responder, ASS-Low-Responder und „Typ I-resistenten“ Patienten

Zusammengefasst handelt es sich bei der ASS-Low-Responder-Gruppe um Patienten mit einer „ASS-Resistenz“ vom Typ III („ASS-Pseudoresistenz“), da erstens das Ausmaß der Aggregation durch ASS-Zusatz in vitro nicht beeinflusst werden konnte, und zweitens allein die Wirkung der oralen ASS-Einnahme zu einer kompletten Inhibierung der Thromboxan-Synthese geführt hatte (vgl. Abschnitt 1.4.5.).

Das Regressionsdiagramm in Abb. 62 untermauert das Phänomen der vorliegenden „Typ III-Resistenz“: Die Werte für die Kollagen-induzierte Thrombozytenaggregation verhalten sich unabhängig von den in den entsprechenden Aggregationsüberständen bestimmten sehr niedrigen TxB_2 -Konzentrationen ($\rho = -0,025$, $p = 0,8273$).

Zum Vergleich sei an dieser Stelle auf den Zusammenhang der Aggregation und Tx-Synthese der „Typ I-resistenten“ Patienten hingewiesen ($\rho = 1,000$, $p = 0,0833$; siehe Abb. 63).

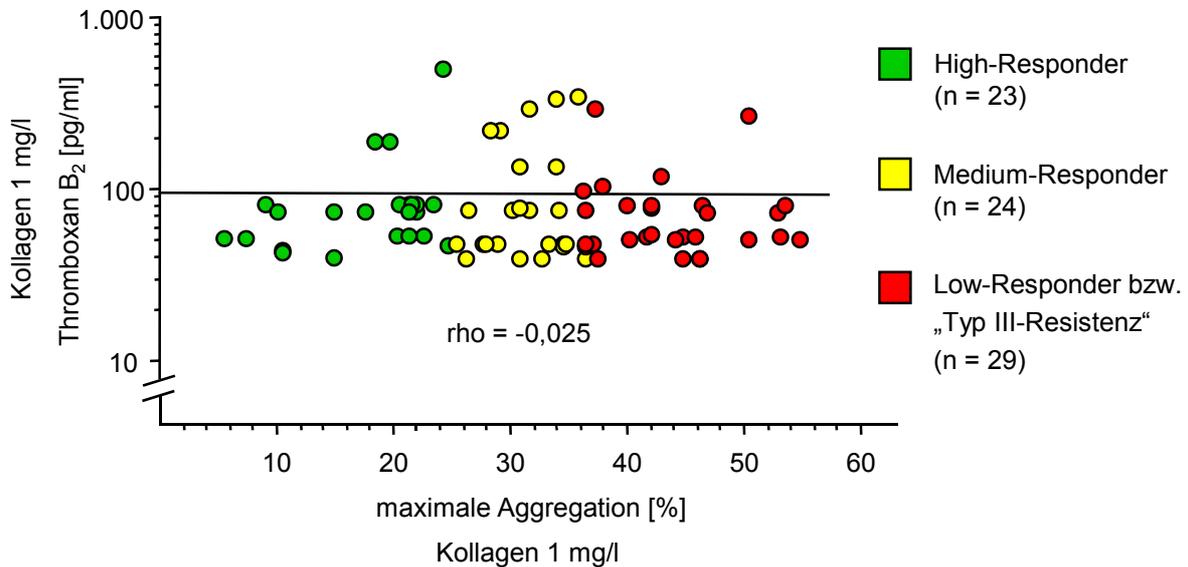


Abb. 62: Regressionsdiagramm der maximalen Aggregation und der Thromboxan B_2 -Bildung nach Kollagen-Induktion. Die (High-, Medium-) Responder und die Low-Responder zeichnen sich gleichermaßen durch eine stark inhibierte TxB_2 -Synthese aus (siehe im Vergleich Abb. 63). Die verbliebenen minimalen TxB_2 -Konzentrationen spielten für das Ausmaß der Aggregation keine Rolle.

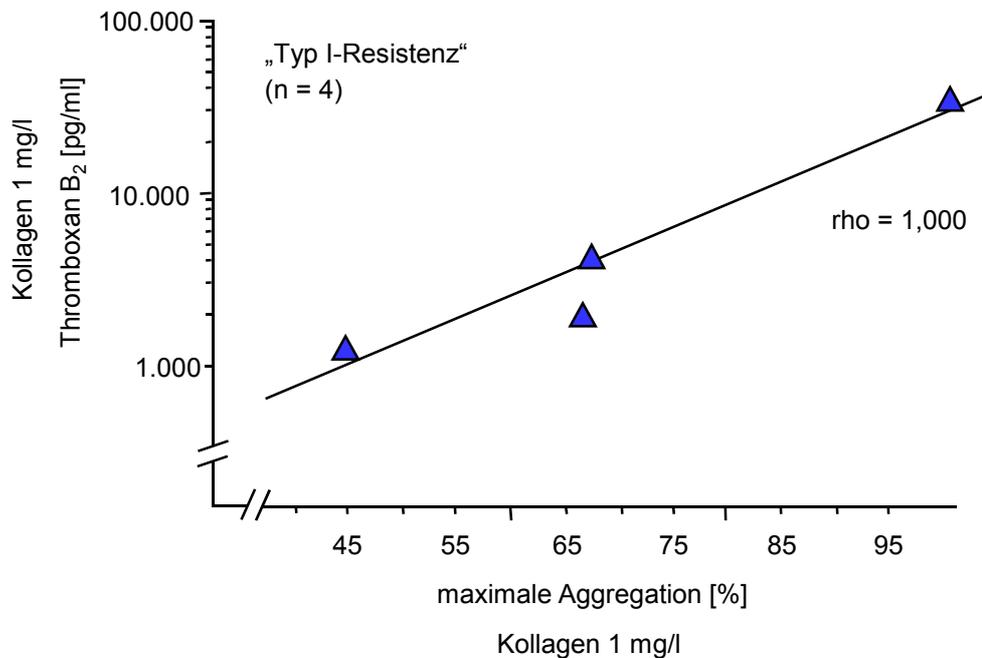


Abb. 63: Zusammenhang der Kollagen-induzierten Aggregation und Thromboxan-Bildung bei den Patienten mit einer „ASS-Resistenz“ vom Typ I

3.3. Untersuchungen zur ASS-Metabolit-Exkretion

Die ASS-Metabolite Salicylursäure und Salicylsäure wurden für 20 High-Responder, 20 Low-Responder und für die vier „Typ I-resistenten“ Patienten bestimmt.

Für die Salicylursäure-Exkretion war zwischen den High- und Low-Responder-Patienten kein Unterschied festzustellen (149 nmol/mg Kreatinin (21 – 1114 nmol/mg) versus 285 nmol/mg Kreatinin (24 – 1131 nmol/mg), $p = 0,9138$, siehe Abb. 64, linker Teil). Die maximal auslösbare Kollagen-induzierte Thrombozytenaggregation korrelierte nicht mit der Salicylursäure-Konzentration im Urin ($\rho = 0,085$, $p = 0,5968$, graphisch nicht dargestellt). Anhand der Perzentil-Diagramme im rechten Teil der Abb. 64 ist zu erkennen, dass bei etlichen Patienten – ganz gleich zu welcher Gruppe gehörend – nur sehr geringe Salicylursäure-Konzentrationen im Urin nachweisbar waren. Bei jeweils zwei Patienten wurde dieser ASS-Metabolit sogar überhaupt nicht gefunden.

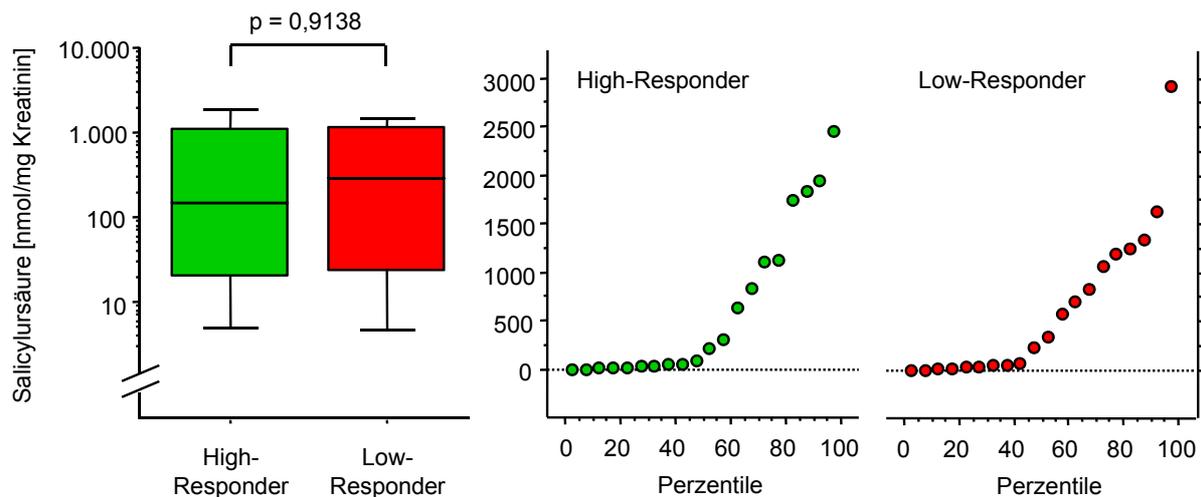


Abb. 64: Exkretion des ASS-Metaboliten Salicylursäure bei High-Responder-Patienten ($n = 20$) im Vergleich zu Patienten mit einer „ASS-Resistenz“ vom Typ III (Low-Responder, $n = 20$)

Auch hinsichtlich der Salicylsäure-Exkretion unterschieden sich die High- und Low-Responder-Patienten nicht (0 nmol/mg Kreatinin (0 – 34 nmol/mg) versus 0 nmol/mg Kreatinin (0 – 30 nmol/mg), $p = 0,9138$, siehe Abb. 65, linker Teil). Zwischen Kollagen-induzierter Aggregation und Salicylsäure-Exkretion bestand ebenfalls keine Korrelation ($\rho = 0,093$, $p = 0,5604$, graphisch nicht dargestellt). Darüberhinaus zeigen die Perzentil-Diagramme im rechten Teil der Abb. 65, dass bei über 50% sowohl der High-Responder als auch der Low-Responder keine Salicylsäure im Urin identifizierbar war.

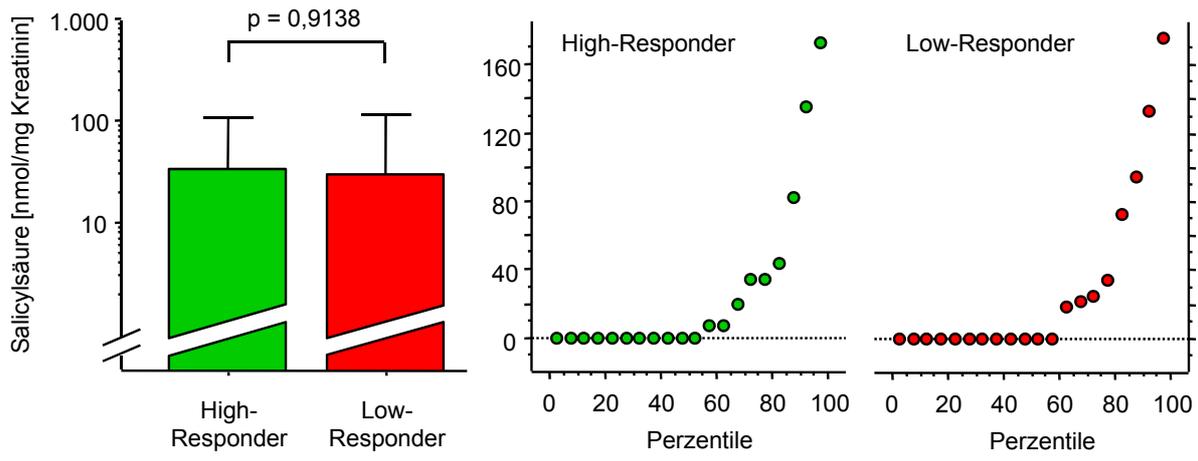


Abb. 65: Salicylsäure-Exkretion bei High-Responder-Patienten ($n = 20$) im Vergleich zu Patienten mit einer „ASS-Resistenz“ vom Typ III (Low-Responder, $n = 20$). Die linke Abbildung zeigt ein Box-Diagramm, d.h. die obere Begrenzung der Box entspricht dem 75%-Quantil, der Median entspricht jeweils der Null-Linie.

Für drei der Patienten mit einer „ASS-Resistenz“ vom Typ I konnte weder Salicylsäure noch Salicylsäure im Urin nachgewiesen werden. Bei einem „Typ I-resistenten“ wurde ebenfalls keine Salicylsäure gefunden, allerdings eine geringe Konzentration des Metaboliten Salicylsäure (16 nmol/mg Kreatinin).

In Abb. 66 ist beispielhaft das Chromatogramm eines ASS-Responder-Patienten dargestellt, bei dem beide ASS-Metabolite nachgewiesen wurden (oberes Chromatogramm), sowie das Chromatogramm eines Patienten mit „Typ I-Resistenz“, bei dem kein ASS-Metabolit gefunden wurde (unteres Chromatogramm). Weitere Analysen zur ASS-Metabolit-Exkretion sind in Kapitel 3.10. (Abschnitt 3.10.5) zu finden. In diesem Abschnitt wird der Einnahmezeitpunkt der ASS-Tablette berücksichtigt.

3.4. Wirkung verschiedener Agonisten auf die Thrombozytenaggregation bei Patienten mit und ohne „ASS-Resistenz“

3.4.1. Kollagen-induzierte Thrombozytenaggregation

Wie in Abschnitt 3.2.2. beschrieben, wurde das Patientenkollektiv anhand der Kollagen-induzierten Thrombozytenaggregation in ASS-Responder (High- und Medium-Responder) und ASS-Low-Responder eingeteilt. Hierbei wurde Kollagen in einer Endkonzentration von

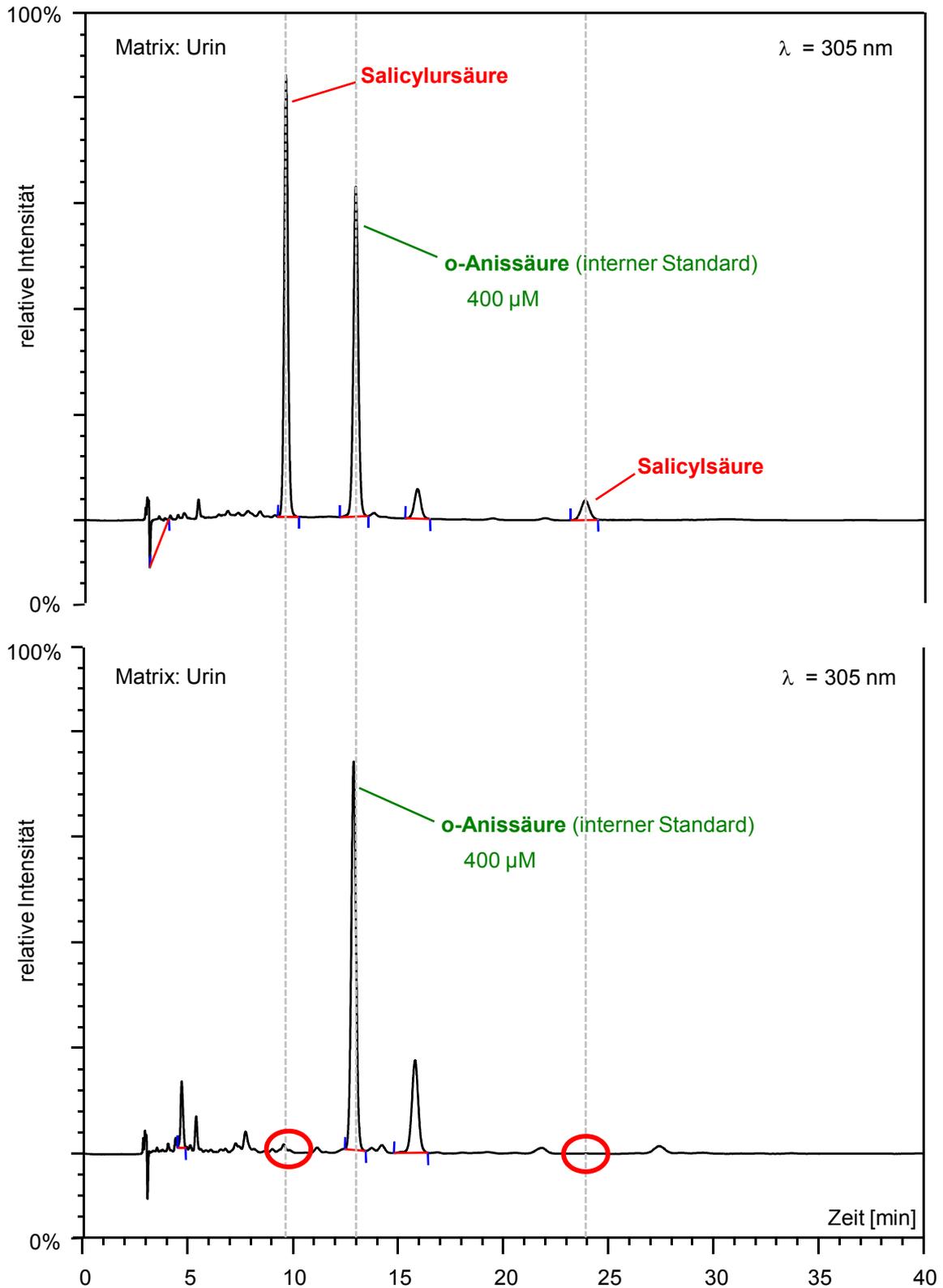


Abb. 66: HPLC-Chromatogramme zum Nachweis der ASS-Metabolite Salicylursäure und Salicylsäure im Urin. Das obere Chromatogramm wurde von einem ASS-Responder-Patienten aufgenommen, das untere von einem „Typ I-resistenten“ Patienten, bei dem keine Metabolite nachweisbar waren (rote Kreise).

1 mg/l PRP eingesetzt. Darüberhinaus wurde die Thrombozytenaggregation mit weiteren vier Kollagen-Konzentrationen untersucht (0,5, 2, 5 und 10 mg/l). Die Konzentrations-Wirkungskurven der einzelnen Patientengruppen sind in Abb. 67 dargestellt. Die Kurve der Low-Responder unterscheidet sich signifikant von der der Medium-Responder ($p < 0,0001$), und die Kurve der Medium-Responder liegt signifikant höher als die der High-Responder ($p < 0,0001$). Um die halbmaximale Wirkung zu erzielen, war bei einem High-Responder-Patienten eine Kollagen-Konzentration von ca. 2 mg/l notwendig, während bei einem Low-Responder-Patienten für den gleichen Effekt bereits geringste Konzentrationen ausreichen. Die EC_{50} -Werte sind ebenfalls der Abb. 67 zu entnehmen.

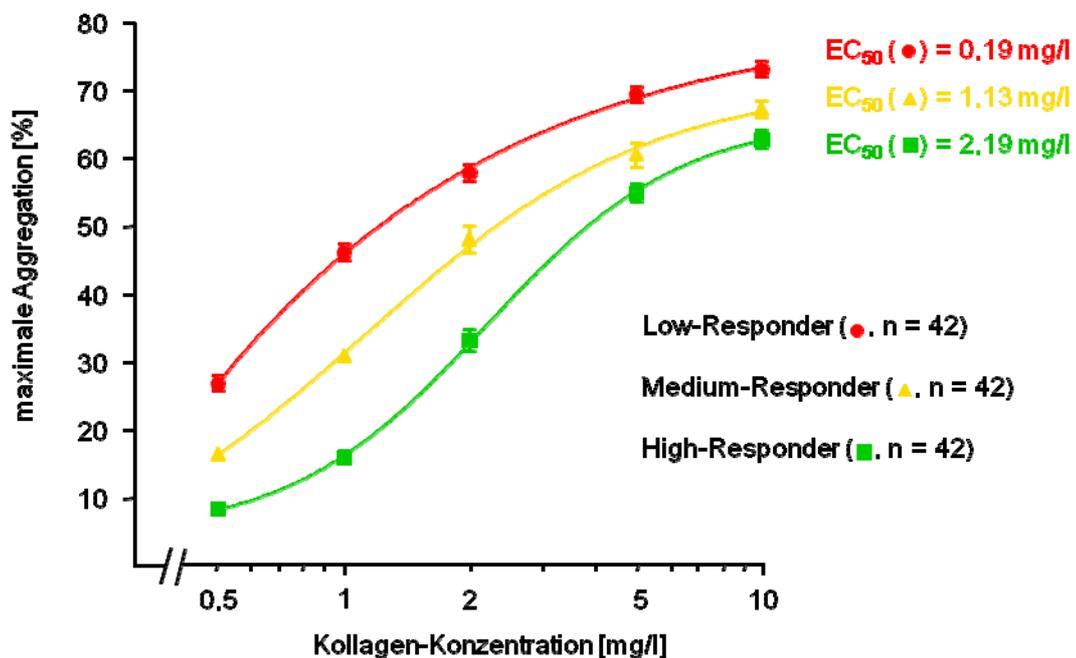


Abb. 67: Thrombozytenaggregation der High-, Medium- und Low-Responder, ausgelöst mit verschiedenen Kollagen-Konzentrationen. Die Werte für die maximale Aggregation sind als Mittelwerte mit Standardfehler angegeben.

Nach Zusammenfassen der Aggregationswerte der High- und Medium-Responder ergibt sich insgesamt für die Responder-Gruppe ein EC_{50} -Wert von 1,71 mg/l Kollagen.

3.4.2. Arachidonsäure-induzierte Thrombozytenaggregation

Die Thrombozytenaggregation, die durch 1 mmol/l Arachidonsäure ausgelöst worden war, erwies sich bei allen Patienten – die „Typ I-resistenten“ ausgenommen – als deutlich gehemmt (alle Werte für die maximale Aggregation lagen unter 20%). Bei den Patienten mit

„Typ I-Resistenz“ zeigte sich hingegen eine starke Variabilität innerhalb der Gruppe – es wurden maximale Aggregationswerte von bis zu 70% bestimmt.

Trotz der Hemmung der Arachidonsäure-induzierten Aggregation bei allen Patienten ohne „Typ I-Resistenz“, konnten signifikante Unterschiede zwischen der High-, Medium- und Low-Responder-Gruppe hinsichtlich der maximalen Aggregation festgestellt werden ($p < 0,0001$, siehe Abb. 68).

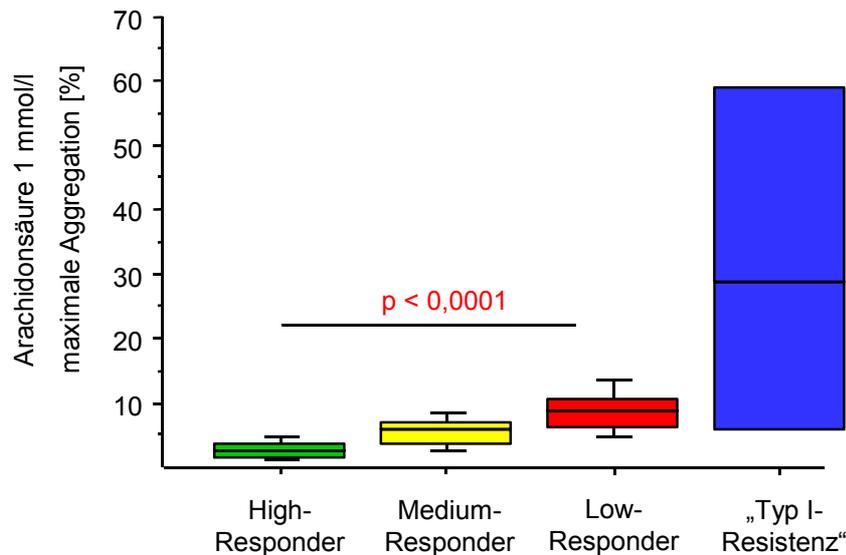


Abb. 68: Thrombozytenaggregation, ausgelöst mit 1 mmol/l Arachidonsäure, der ASS-Responder (High- und Medium-Responder, jeweils $n = 42$) und der Patienten mit einer „ASS-Resistenz“ vom Typ III (Low-Responder, $n = 42$) sowie vom Typ I ($n = 4$)

Tab. 22 gibt für die einzelnen Gruppen die dazugehörigen Mediane mit Interquartilenabstand, die minimalen und die maximalen Werte an.

	Maximale Aggregation [%] Induktor: Arachidonsäure 1 mmol/l			
	Median	Interquartilenabstand	Minimum	Maximum
High-Responder ($n = 42$)	2,6	1,6 – 3,7	0,5	7,6
Medium-Responder ($n = 42$)	5,7	3,6 – 7,0	1,2	14,0
Low-Responder ($n = 42$)	8,6	6,1 – 10,8	2,2	17,8
Patienten mit „Typ I-Resistenz“ ($n = 4$)	28,6	6,0 – 59,1	4,1	68,9

Tab. 22: Werte für die maximale Arachidonsäure-induzierte Aggregation [%] der einzelnen Patientengruppen

Durch Zusammenfassen der High- und Medium-Responder zur Responder-Gruppe errechnet sich eine mediane maximale Aggregation von 3,7% (2,1 – 5,9%).

Abb. 69 veranschaulicht anhand eines Regressionsdiagramms, dass zwischen der Kollagen-induzierten und der Arachidonsäure-induzierten Thrombozytenaggregation ein signifikanter Zusammenhang nachgewiesen werden konnte ($\rho = 0,733$, $p < 0,0001$).

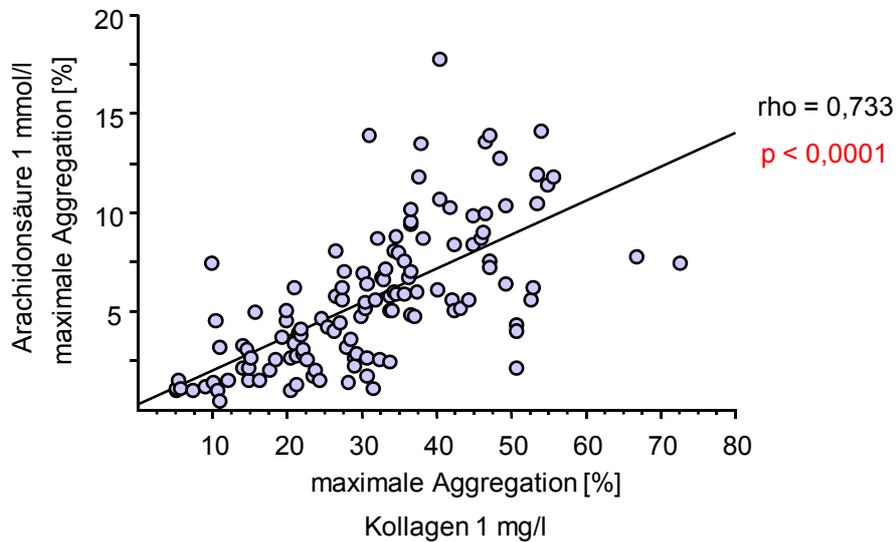


Abb. 69: Korrelation der Kollagen- und Arachidonsäure-induzierten Thrombozytenaggregation aller Patienten ohne „Typ I-Resistenz“ ($n = 126$)

Während die Arachidonsäure-induzierte Aggregation der „Typ I-resistenten“ Patienten mit der Thromboxan-Bildung (nach Kollagen-Induktion) korreliert ($\rho = 1,000$, $p = 0,0833$; siehe Abb. 70 rechter Teil), findet sich dieser Zusammenhang nicht bei der Patientengruppe ohne „Typ I-Resistenz“ ($\rho = -0,156$, $p = 0,1764$; siehe Abb. 70 linker Teil).

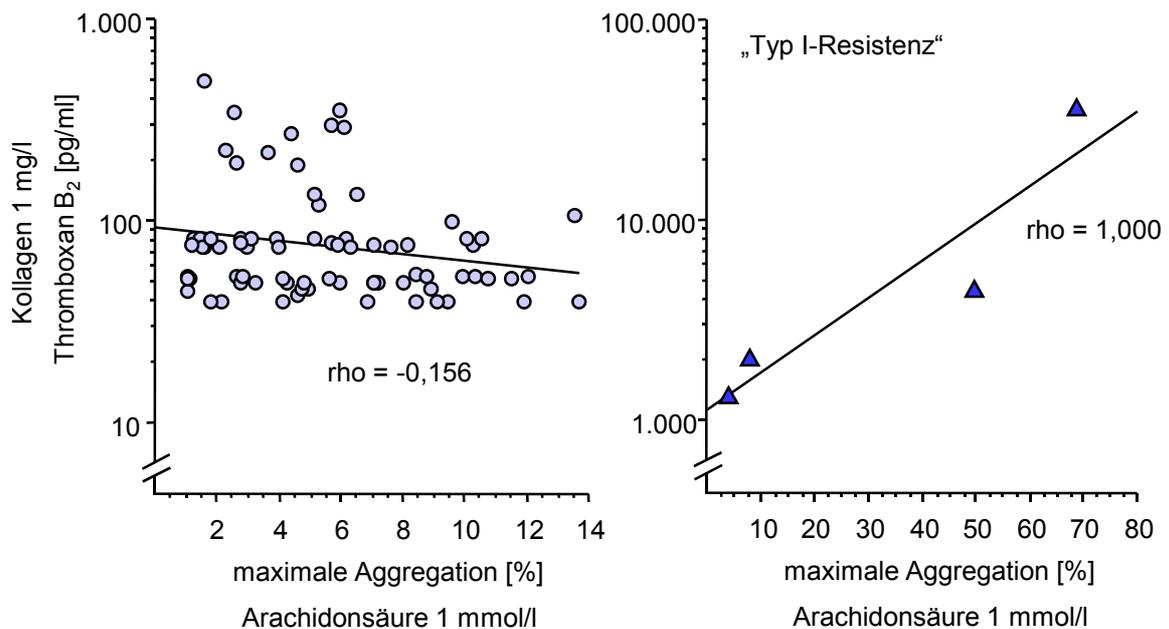


Abb. 70: Abhängigkeit der Arachidonsäure (1 mM)-induzierten Aggregation von der Thromboxan B_2 -Bildung (nach Kollagen-Induktion), dargestellt im linken Teil der Abbildung

für alle Patienten ohne eine „ASS-Resistenz“ vom Typ I, im rechten Teil für die Patienten mit einer „Typ I-Resistenz“

3.4.3. ADP-induzierte Thrombozytenaggregation

Die Aggregationsbestimmung mit Adenosindiphosphat (ADP) wurde in einer Subgruppe von 75 Patienten vorgenommen. Hierbei zeigte sich, dass die ADP-induzierte Aggregation umso stärker ausfiel, je höher die Werte lagen, die nach Kollagen-Induktion gemessen wurden ($\rho = 0,632$, $p < 0,0001$). Das dazugehörige Regressionsdiagramm zeigt Abb. 71.

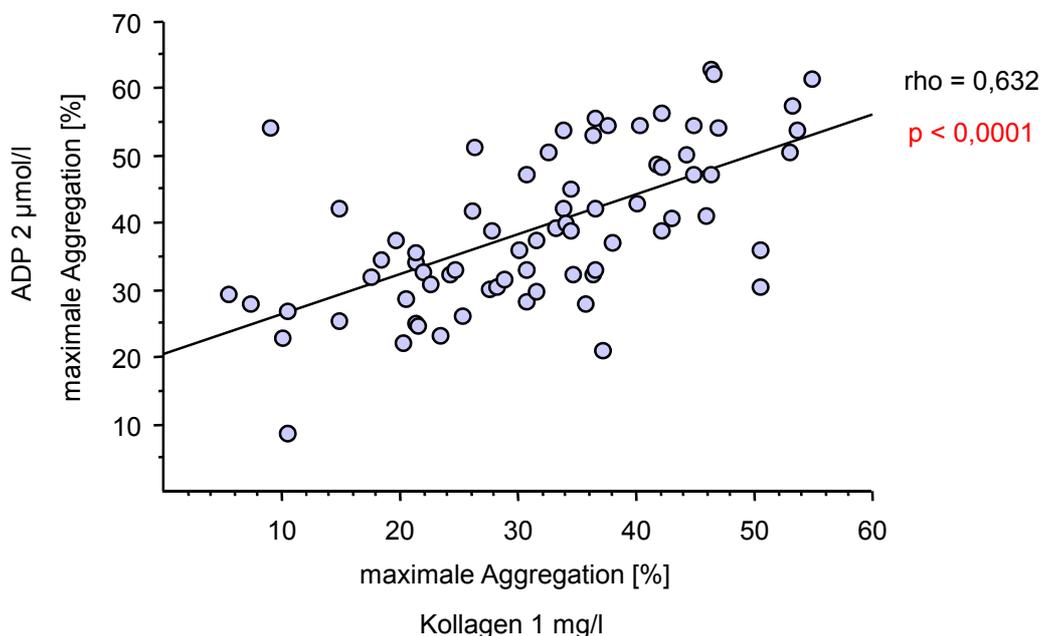


Abb. 71: Korrelation der Kollagen- und ADP-induzierten Thrombozytenaggregation. Es sind die Werte für die maximale Aggregation [%] der Patienten ohne „Typ I-Resistenz“ dargestellt ($n = 73$)

Somit unterscheiden sich die High-, Medium- und Low-Responder-Gruppe auch hinsichtlich der ADP-induzierten Thrombozytenaggregation jeweils signifikant voneinander ($p < 0,0001$, siehe Abb. 72). Die entsprechenden Werte für die maximale ADP-induzierte Aggregation sind der Tab. 23 zu entnehmen.

Wird die ADP-induzierte Aggregation mit der Arachidonsäure-induzierten verglichen, so ist ebenfalls eine Korrelation festzustellen ($\rho = 0,678$, $p < 0,0001$; siehe Abb. 73).

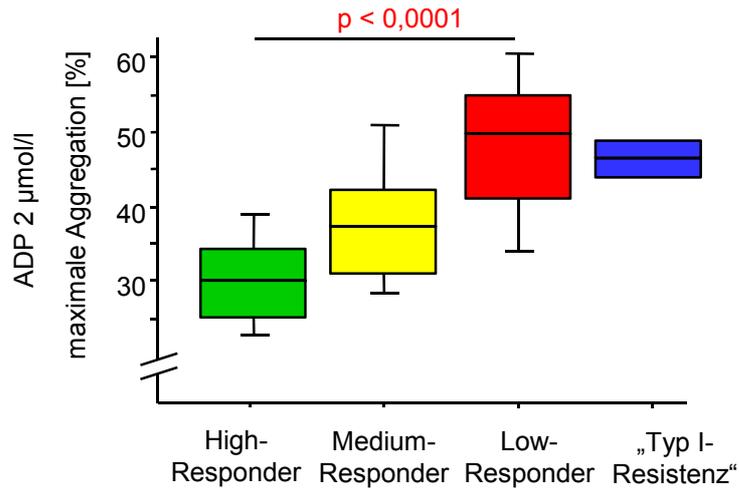


Abb. 72: Thrombozytenaggregation, ausgelöst mit 2 µM ADP, der High-Responder (n = 22), der Medium-Responder (n = 23) und der Patienten mit einer „ASS-Resistenz“ vom Typ III (Low-Responder, n = 28) sowie vom Typ I (n = 2)

	Maximale Aggregation [%], Induktor: ADP 2 µmol/l			
	Median	Interquartilenabstand	Minimum	Maximum
High-Responder (n = 22)	30,1	25,1 – 34,2	8,7	54,4
Medium-Responder (n = 23)	37,4	31,1 – 42,3	26,2	53,9
Low-Responder (n = 28)	49,7	41,1 – 54,8	21,2	63,1
Patienten mit „Typ I-Resistenz“ (n = 2)	46,4	44,0 – 48,9	44,0	48,9

Tab. 23: Werte für die maximale ADP-induzierte Aggregation [%] der einzelnen Patientengruppen. Für die ASS-Responder-Gruppe (n = 45) ergibt sich insgesamt eine mediane maximale Aggregation von 32,6% (28,5 – 39,2%).

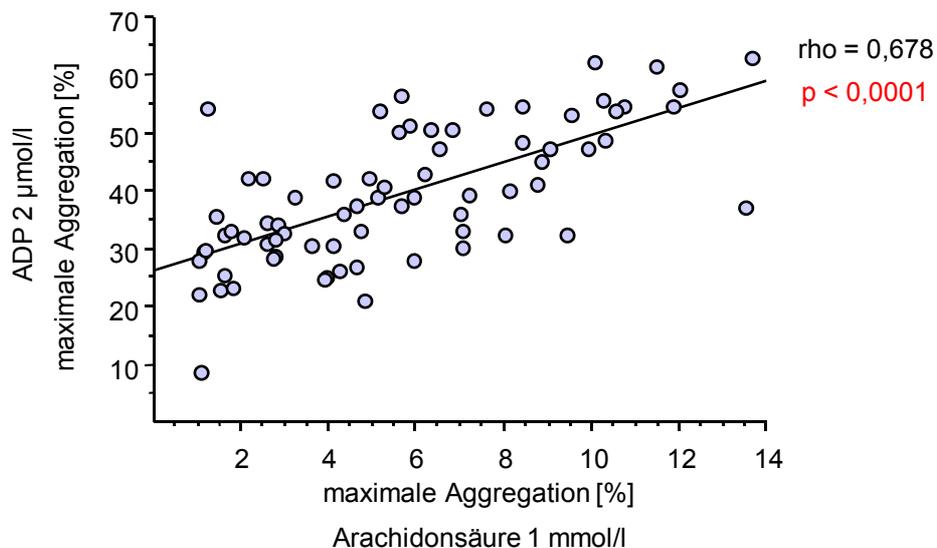


Abb. 73: Regressionsdiagramm der Thrombozytenaggregation, ausgelöst zum einen mit 2 µM ADP, zum anderen mit 1 mM Arachidonsäure (n = 73). Die Werte der „Typ I-resistenten“ Patienten sind ausgenommen.

3.5. Untersuchungen zur COX-1-Aktivität bei Patienten mit und ohne „ASS-Resistenz“

Die im Vollblut vorherrschende Enzymaktivität der Cyclooxygenase-1 wurde bei einer Subgruppe von 83 Patienten bestimmt. Wie aus Abb. 74 ersichtlich ist, verhielt sich die Gruppe der ASS-Responder und die der Low-Responder („ASS-Resistenz“ vom Typ III) hinsichtlich der COX-1-Aktivität sowohl ohne als auch mit Zusatz von ASS in vitro gleich: In Abwesenheit von ASS in vitro wurde eine mediane TxB_2 -Konzentration von 2.303 pg/ml (866 – 4.167 pg/ml) für die Responder und von 1.436 pg/ml (961 – 3.842 pg/ml) für die Low-Responder gemessen ($p = 0,4743$), in Anwesenheit von 100 μM ASS in vitro 74 pg/ml (52 – 148 pg/ml) für die Responder und 93 pg/ml (46 – 169 pg/ml) für die Low-Responder ($p = 0,3711$). Auch innerhalb der Responder-Gruppe gab es zwischen den High-Responder- und Medium-Responder-Patienten keinen Unterschied (ohne ASS-Zusatz $p = 0,2903$, mit ASS-Zusatz $p = 0,5032$; graphisch nicht dargestellt).

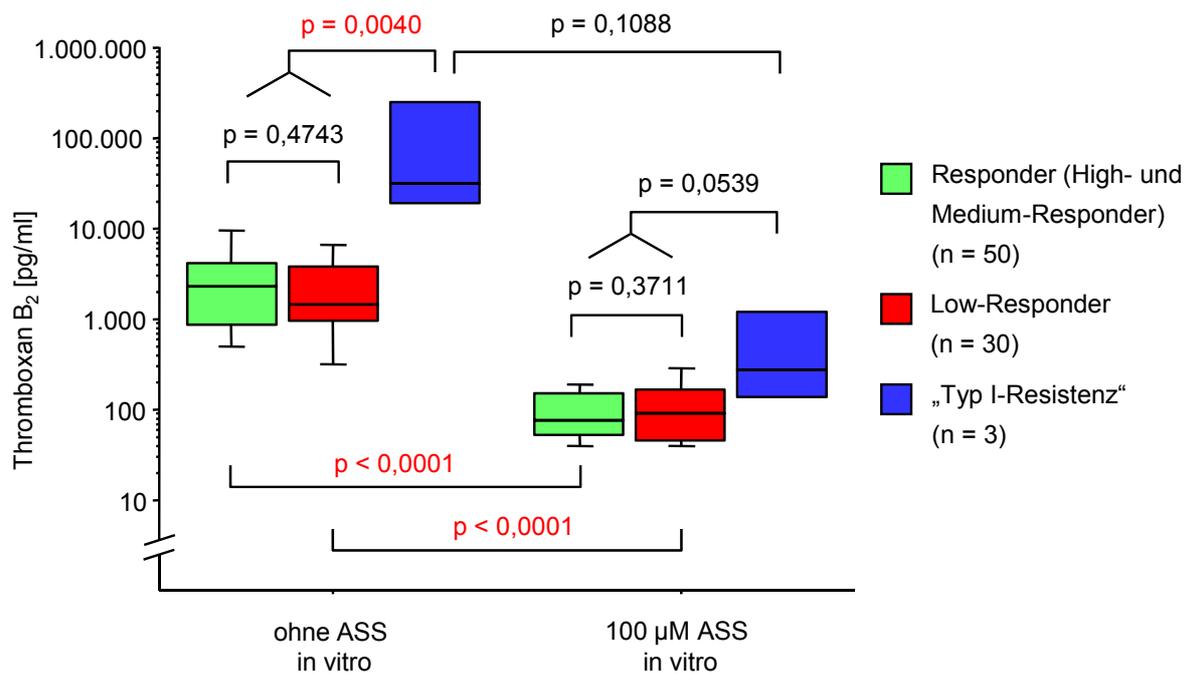


Abb. 74: Thromboxan B_2 -Konzentrationen [pg/ml], gemessen im COX-1-Aktivitäts-Vollblut-Assay, der ASS-Responder und der „ASS-resistenten“ Patienten vom Typ III (Low-Responder) sowie vom Typ I

Bei den Patienten mit einer „ASS-Resistenz“ vom Typ I wurde eine hohe COX-1-Aktivität mit einem medianen TxB_2 -Wert von 31.993 pg/ml (18.812 – 247.376 pg/ml) ermittelt. Wenn dieser Wert als 100% gesetzt wird, so weisen alle Patienten ohne „Typ I-Resistenz“ eine um ca. 93% niedrigere COX-1-Aktivität auf ($p = 0,0040$, siehe Abb. 74).

Der ASS-Zusatz in vitro bewirkte bei den „Typ I-resistenten“ Patienten eine deutliche Reduktion der COX-1-Aktivität auf 275 pg/ml (137 – 1.167 pg/ml) TxB₂ (p = 0,1088), so dass zwischen den Patienten ohne und den Patienten mit „Typ I-Resistenz“ kein signifikanter Unterschied mehr bestand (p = 0,0539, siehe Abb. 74).

Trotz der bereits stark gehemmten COX-1-Aktivität der Responder- und Low-Responder-Gruppe, war das in vitro zugesetzte ASS in der Lage, diese Aktivität in beiden Gruppen noch weiter zu reduzieren: für die Responder von 2.303 pg/ml auf 74 pg/ml TxB₂ (p < 0,0001), für die Low-Responder von 1.436 pg/ml auf 93 pg/ml (p < 0,0001, siehe ebenfalls Abb. 74). Zu dieser Beobachtung finden sich weitere Untersuchungsergebnisse in Abschnitt 3.10.3.

Das Regressionsdiagramm in Abb. 75 veranschaulicht, dass bei den Patienten ohne „Typ I-Resistenz“ kein Zusammenhang zwischen der COX-1-Aktivität im Vollblut und der im plättchenreichen Plasma bestimmten Kollagen-induzierten Thrombozytenaggregation nachweisbar war (rho = -0,041, p = 0,7151).

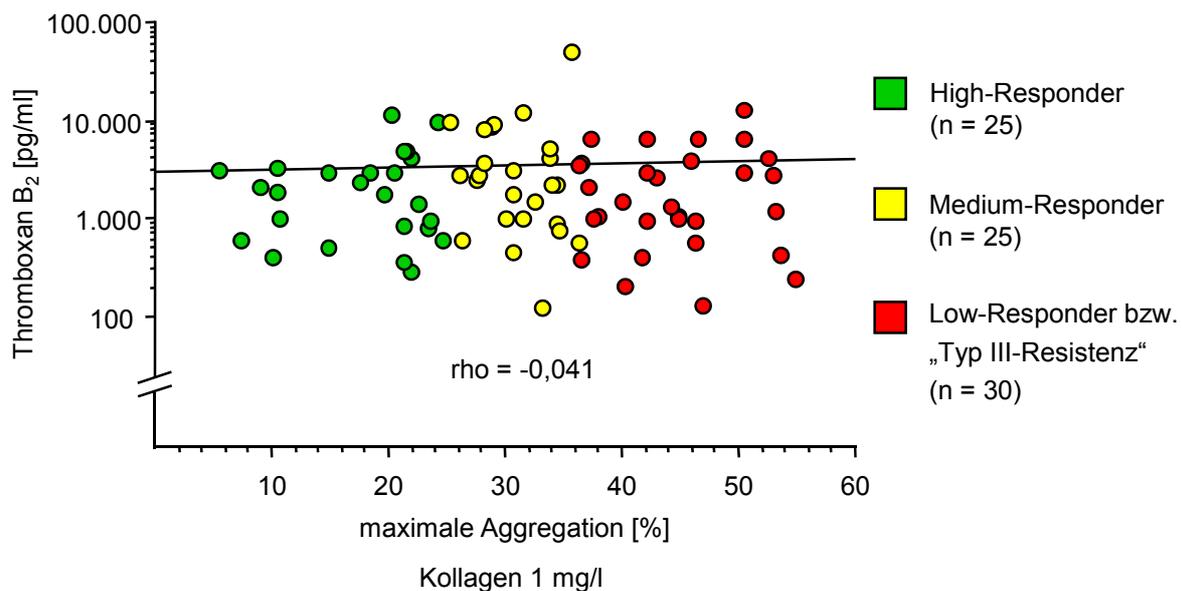


Abb. 75: Abhängigkeitsdiagramm der maximalen Aggregation (bestimmt nach Kollagen-Induktion im PRP) und der Thromboxan B₂-Konzentration (im COX-1-Vollblut-Assay)

Zum Vergleich besteht bei den „Typ I-resistenten“ Patienten eine deutliche Korrelation zwischen der COX-1-Aktivität und der Kollagen-induzierten Thrombozytenaggregation (rho = 1,000, p = 0,1573; graphisch nicht dargestellt).

Auch, wenn die durch Arachidonsäure ausgelöste Thrombozytenaggregation der Responder und Low-Responder mit der entsprechenden COX-1-Aktivität verglichen wird, korreliert ein

für die maximale Aggregation bestimmter hoher Wert nicht mit einer erhöhten COX-1-Aktivität ($\rho = -0,279$, $p = 0,0131$; siehe Abb. 76, linke Graphik). Dem gegenüber stehen wiederum die Patienten mit einer „ASS-Resistenz“ vom Typ I: Eine hohe COX-1-Aktivität hatte auch eine verstärkte Arachidonsäure-induzierte Thrombozytenaggregation zur Folge ($\rho = 1,000$, $p = 0,1573$; graphisch nicht dargestellt).

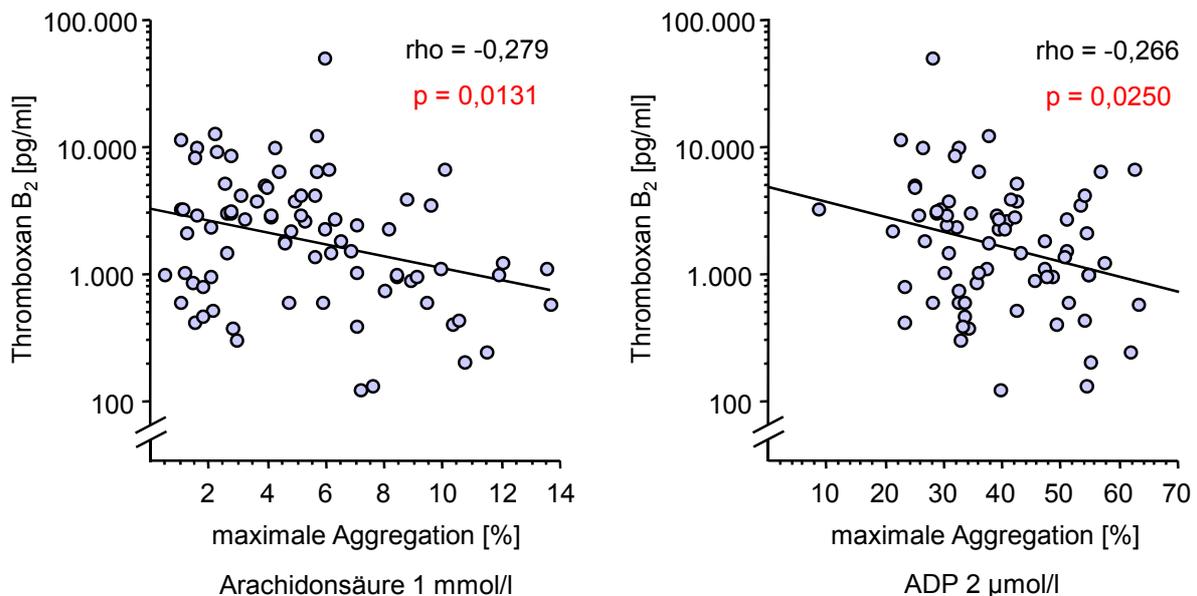


Abb. 76: Vergleich der maximalen Aggregation nach Induktion mit Arachidonsäure (linkes Diagramm, $n = 83$) bzw. ADP (rechtes Diagramm, $n = 73$) mit der im Vollblut-Assay bestimmten Thromboxan B_2 -Konzentration, die ein Maß für die Aktivität der COX-1 darstellt. Die Werte der „Typ I-resistenten“ Patienten sind nicht mit abgebildet.

Für die ADP-induzierte Aggregation zeigt sich hinsichtlich der COX-1-Aktivität ein ähnlicher Zusammenhang wie für die Arachidonsäure-induzierte Aggregation: Es besteht eine schwache, allerdings signifikante Korrelation: je niedriger die COX-1-Aktivität, desto höher die durch ADP ausgelöste Aggregation ($\rho = -0,266$, $p = 0,0250$; siehe Abb. 76, rechte Graphik).

Während eine erhöhte COX-1-Aktivität bei den Patienten ohne „Typ I-Resistenz“ keine verstärkte Aggregationsreaktion zur Folge hatte, zeigte sich für die in den Aggregationsüberständen bestimmte Thromboxan-Konzentration ein entgegen gesetzter Zusammenhang: je stärker die im Vollblut-Assay ermittelte COX-1-Aktivität, desto höher die TxB_2 -Konzentration im Aggregationsüberstand ($\rho = 0,446$, $p < 0,0001$; siehe Abb. 77, linke Graphik). Die Korrelation für die „Typ I-resistenten“ Patienten ist ebenfalls abgebildet ($\rho = 1,000$, $p = 0,1573$; Abb. 77, rechte Graphik).

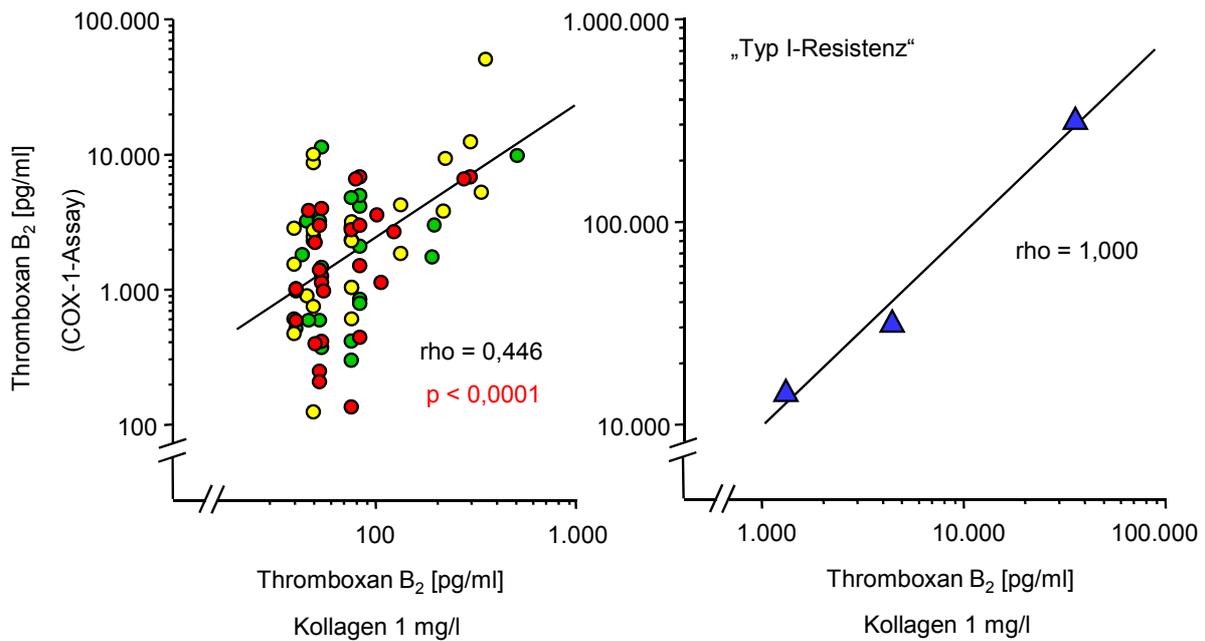


Abb. 77: Zusammenhang zwischen der im Vollblut bestimmten COX-1-Aktivität und der nach Kollagen-Induktion in den Aggregationsüberständen gemessenen Thromboxan B₂-Konzentration; im linken Diagramm dargestellt für die High-Responder (●), Medium-Responder (●) und Low-Responder (●), im rechten für die Patienten mit einer „ASS-Resistenz“ vom Typ I. Es sei darauf hingewiesen, dass die Nachweisgrenzen der Thromboxan-ELAs zwischen 40 und 83 pg TxB₂/ml lagen.

3.6. Exkretion des Thromboxan-Metaboliten 2,3-dinor-Thromboxan B₂ und des Prostacyclin-Metaboliten 2,3-dinor-6-keto-Prostaglandin F_{1α} bei „ASS-resistenten“ und „nicht-resistenten“ Patienten

3.6.1. 2,3-dinor-Thromboxan B₂-Exkretion

Hinsichtlich der Ausscheidung des Thromboxan-Metaboliten 2,3-dinor-Thromboxan B₂ (2,3-dn-TxB₂) ergab sich zwischen der ASS-Responder- und der ASS-Low-Responder-Gruppe kein Unterschied. Im Urin der Responder-Patienten wurde eine mediane 2,3-dn-TxB₂-Konzentration von 96 pg/mg Kreatinin (64 – 145 pg/mg) ermittelt, bei den Low-Responder-Patienten von 79 pg/mg Kreatinin (57 – 123 pg/mg), $p = 0,2384$ (siehe Abb. 78). Der Median für die „Typ I-resistenten“ Patienten lag im Vergleich zur Responder- und Low-Responder-Gruppe mit 241 pg/mg Kreatinin (83 – 491 pg/mg) deutlich höher; es errechneten sich jedoch keine signifikanten Unterschiede aufgrund der starken interindividuellen Schwankung der

2,3-dn-TxB₂-Konzentration innerhalb der „Typ I-Resistenz“-Gruppe ($p = 0,2089$ bzw. $p = 0,1751$, siehe ebenfalls Abb. 78).

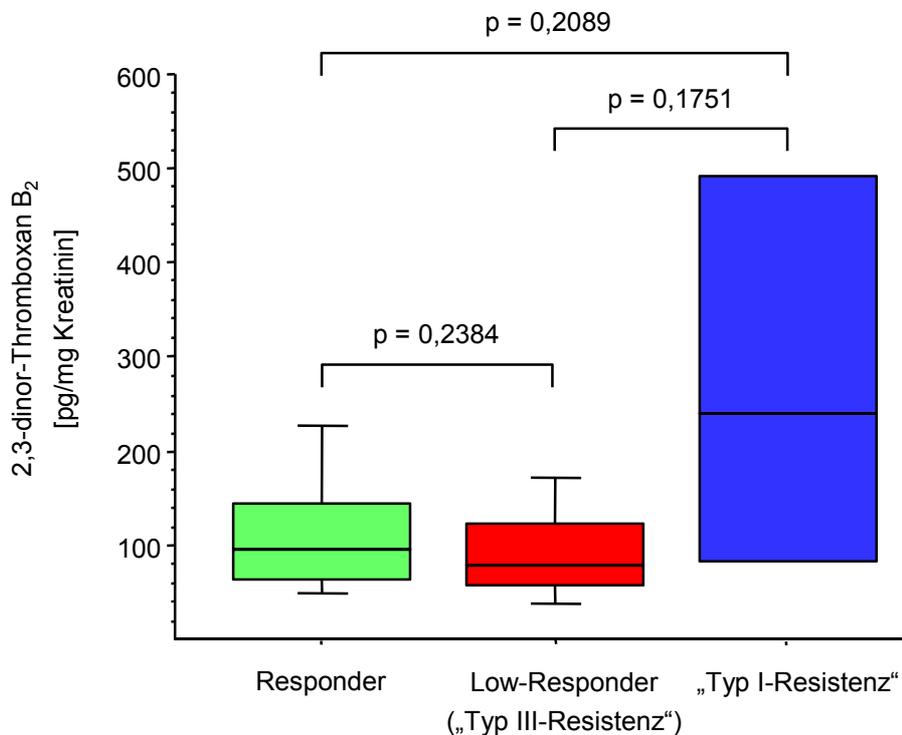


Abb. 78: Konzentrationen des Thromboxan-Metaboliten 2,3-dinor-Thromboxan B₂ im Urin der ASS-Responder ($n = 83$) und der Patienten mit einer „ASS-Resistenz“ vom Typ III ($n = 41$) sowie vom Typ I ($n = 4$).

Aus Abb. 79 wird deutlich, dass bei allen Patienten – die „Typ I-resistenten“ ausgenommen – zwischen der Exkretion des Thromboxan-Metaboliten 2,3-dn-TxB₂ und der ex vivo bestimmten Kollagen-induzierten Thrombozytenaggregation kein Zusammenhang besteht ($\rho = -0,001$, $p = 0,9924$). Für die „Typ I-resistenten“ Patienten ($n = 4$) wurde ein Korrelationskoeffizient (ρ) von 0,400 berechnet und ein p-Wert von 0,4884 (graphisch nicht dargestellt).

Unter Ausschluss der „Typ I-resistenten“ Patienten zeigte sich auch die Aggregation, die mit Arachidonsäure oder ADP induziert wurde, von der 2,3-dinor-TxB₂-Exkretion unabhängig ($\rho = -0,072$, $p = 0,4236$ bzw. $\rho = -0,229$, $p = 0,0524$; siehe Abb. 80).

Für die Patienten mit „Typ I-Resistenz“ ($n = 4$) wurde für die Arachidonsäure-ausgelöste Aggregation ein ρ -Wert von 0,400 und ein p-Wert von 0,4884 ermittelt. Die Bestimmung der ADP-induzierten Thrombozytenaggregation wurde nur bei zwei der „Typ I-resistenten“ Patienten vorgenommen, so dass in diesem Fall eine statistische Berechnung entfällt.

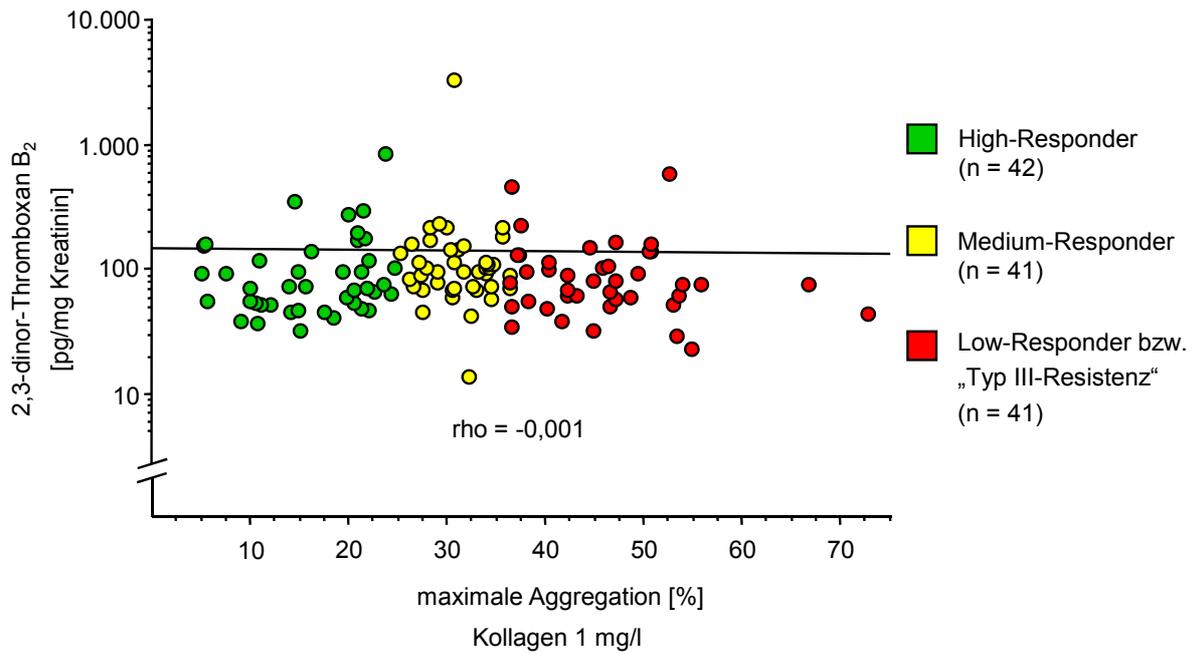


Abb. 79: Regressionsdiagramm zur 2,3-dinor-Thromboxan B₂-Konzentration im Urin der Patienten (n = 124) und zur Thrombozytenaggregation, ausgelöst durch 1 mg/l Kollagen im plättchenreichen Plasma. Die Werte der Patienten mit einer „ASS-Resistenz“ vom Typ I sind ausgenommen.

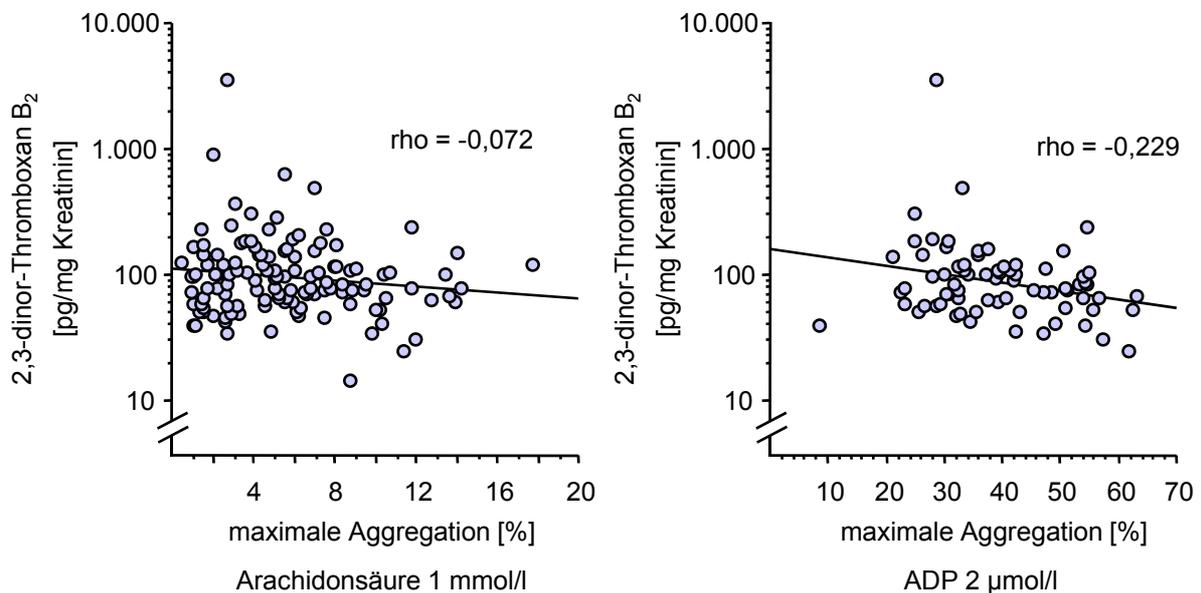


Abb. 80: Regressionsdiagramme zur Exkretion von 2,3-dinor-Thromboxan B₂ und zur Thrombozytenaggregation, welche zum einen mit 1 mmol/l Arachidonsäure (n = 124, linker Teil der Abbildung) und zum anderen mit 2 μmol/l ADP (n = 73, rechter Teil der Abbildung) induziert wurde. Die Patienten mit einer „ASS-Resistenz“ vom Typ I sind in dieser Analyse ausgeschlossen.

Während die nach Kollagen-Induktion in den Aggregationsüberständen bestimmten Thromboxan-Konzentrationen signifikant mit den entsprechenden COX-1-Aktivitäten im Vollblut korrelierten (siehe Abschnitt 3.5. Abb. 77, linke Graphik), verhielt sich die 2,3-dn-TxB₂-Ausscheidung bei allen Patienten ohne „Typ I-Resistenz“ unabhängig von der COX-1-Vollblut-Aktivität ($\rho = 0,194$, $p = 0,0846$; siehe Abb. 81, linkes Diagramm) bzw. unabhängig von der TxB₂-Bildung nach Aggregationsinduktion ($\rho = 0,020$, $p = 0,8656$; siehe Abb. 81, rechtes Diagramm).

Für die Exkretion von 2,3-dn-TxB₂ der „Typ I-resistenten“ Patienten errechnete sich in Bezug auf die COX-1-Vollblut-Aktivität ein Korrelationskoeffizient (ρ) von 0,500 ($p = 0,4795$) sowie in Bezug auf die TxB₂-Konzentration im Aggregationsüberstand ein ρ -Wert von 0,400 ($p = 0,4884$).

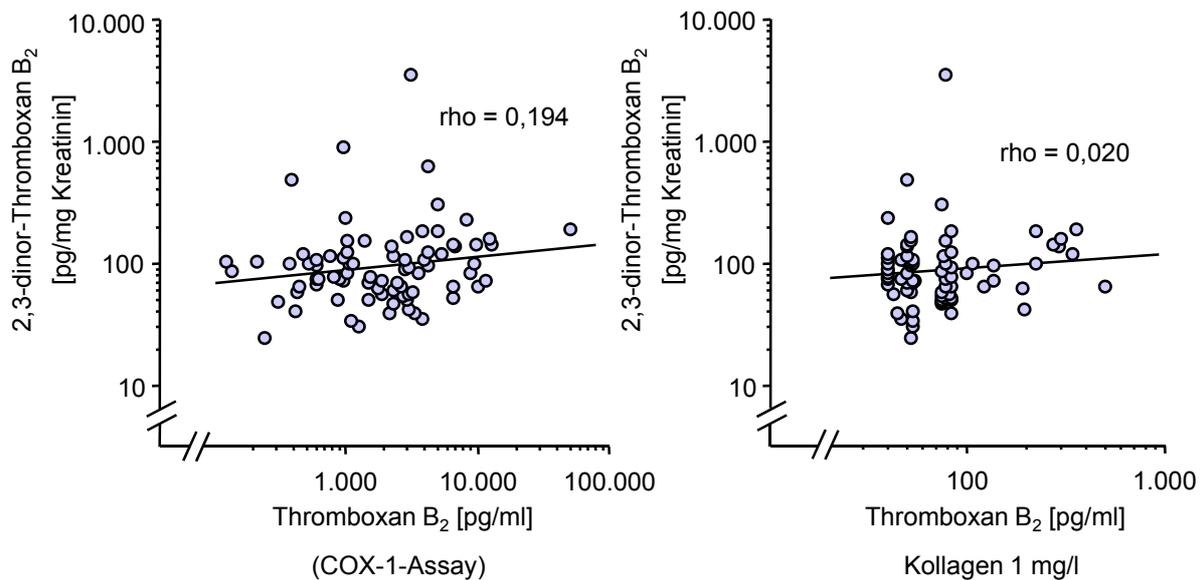


Abb. 81: Regressionsanalyse der 2,3-dinor-Thromboxan B₂-Exkretion bei Patienten ohne „Typ I-Resistenz“ und der im Vollblut ermittelten COX-1-Aktivität ($n = 80$, linker Teil der Abbildung) sowie der nach Kollagen-Induktion im plättchenreichen Plasma bestimmten Thromboxan B₂-Konzentration ($n = 76$, rechter Teil der Abbildung)

3.6.2. 2,3-dinor-6-keto-Prostaglandin F_{1 α} -Exkretion

Die Untersuchungen zur Ausscheidung des Prostacyclin-Metaboliten 2,3-dinor-6-keto-Prostaglandin F_{1 α} (2,3-dn-6-keto-PGF_{1 α}) ergaben zwischen den Responder-Patienten und den Patienten mit einer „ASS-Resistenz“ sowohl vom Typ I als auch vom Typ III keine Unterschiede. Der Median für die 2,3-dn-6-keto-PGF_{1 α} -Konzentration im Urin der Responder lag bei 78 pg/mg Kreatinin (58 – 138 pg/mg), der Median für die „Typ III-resistenten“

Patienten bei 98 pg/mg Kreatinin (56 – 145 pg/mg) und der für die Patienten mit einer „Typ I-Resistenz“ bei 138 pg/mg Kreatinin (57 – 225 pg/mg). Mit Hilfe des Kruskal-Wallis-Tests wurde ein p-Wert von 0,7455 errechnet. Die p-Werte zwischen den einzelnen Patientengruppen sind in Abb. 82 zu finden.

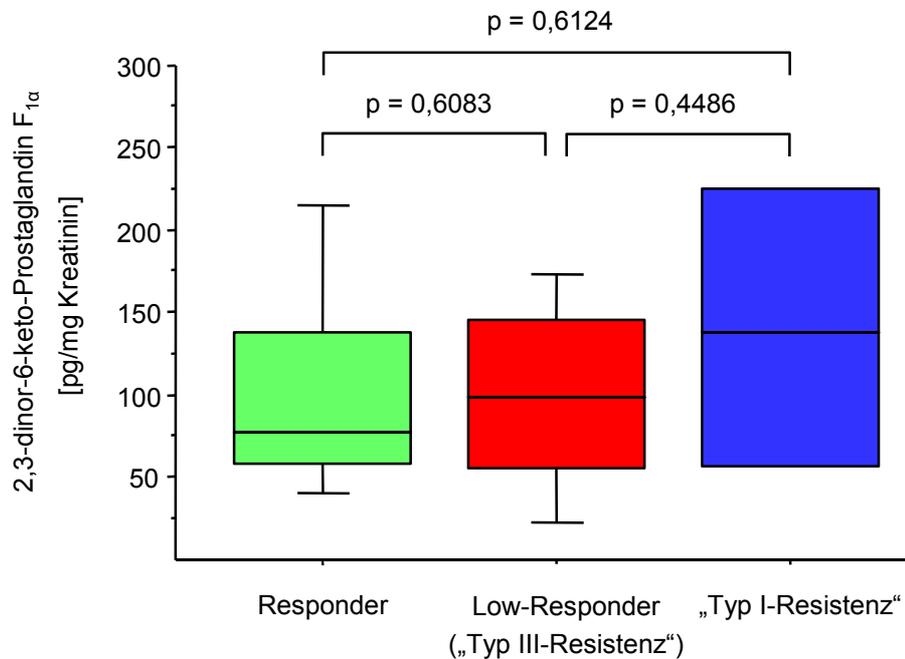


Abb. 82: Ausscheidung des Prostacyclin-Metaboliten 2,3-dinor-6-keto-Prostaglandin $F_{1\alpha}$ der Responder-Patienten ($n = 83$), der Low-Responder-Patienten ($n = 41$) und der Patienten mit einer „ASS-Resistenz“ vom Typ I ($n = 4$)

Aus Abb. 83 ist ersichtlich, dass das Ausmaß der Kollagen-induzierten Thrombozytenaggregation und die 2,3-dn-6-keto-PGF $_{1\alpha}$ -Exkretion voneinander unabhängig sind ($\rho = 0,101$, $p = 0,2608$). Auch bei den Patienten mit einer „ASS-Resistenz“ vom Typ I konnte keine Korrelation nachgewiesen werden ($\rho = 0,200$, $p = 0,7290$; graphisch nicht dargestellt).

Auch zwischen der 2,3-dn-6-keto-PGF $_{1\alpha}$ -Ausscheidung und sowohl der Arachidonsäure- als auch der ADP-induzierten Aggregation ließ sich kein Zusammenhang nachweisen, weder für die Patienten ohne „Typ I-Resistenz“ ($\rho = 0,032$, $p = 0,7247$, $n = 124$ für die AA-induzierte maximale Aggregation und $\rho = -0,186$, $p = 0,1153$, $n = 73$ für die ADP-induzierte maximale Aggregation; Regressionsdiagramme nicht abgebildet) noch für die Patienten mit „Typ I-Resistenz“ ($\rho = 0,200$, $p = 0,7290$, $n = 4$ für die AA-induzierte maximale Aggregation; für die ADP-induzierte Aggregation keine statistische Berechnung wegen $n = 2$).

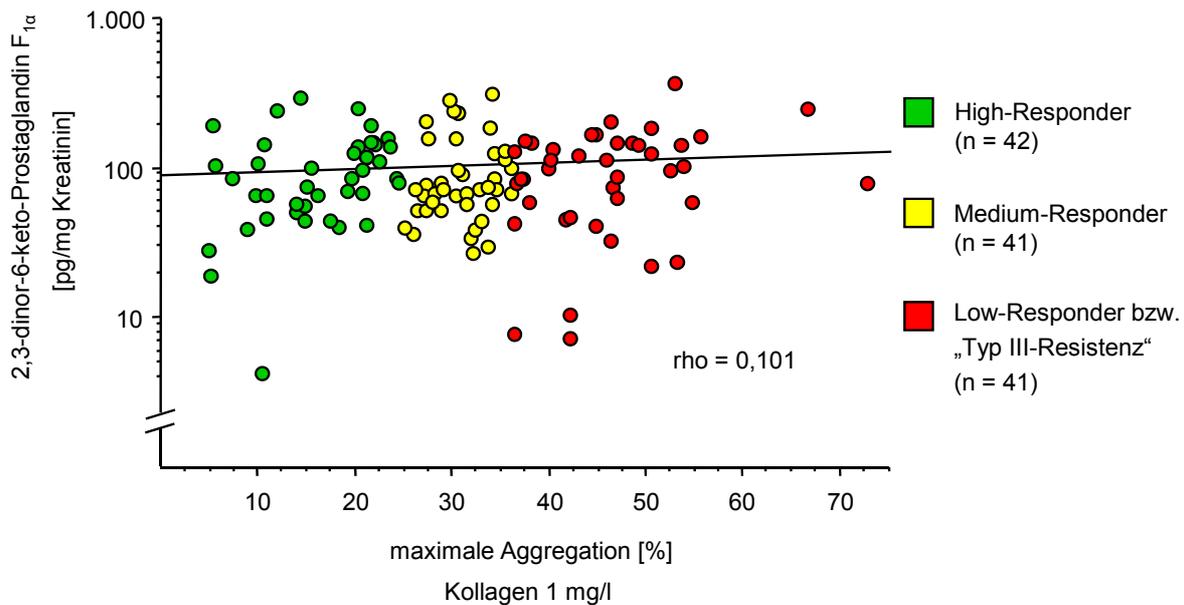


Abb. 83: Regressionsanalyse zur 2,3-dinor-6-keto-Prostaglandin $F_{1\alpha}$ -Exkretion und Kollagen-induzierten Thrombozytenaggregation für die Patienten ohne „Typ I-Resistenz“

3.6.3. Zusammenhang zwischen der Thromboxan B_2 -Metabolit-Exkretion und der Prostacyclin-Metabolit-Exkretion

Zwischen der Ausscheidung des Thromboxan-Metaboliten 2,3-dn-TxB₂ und des Prostacyclin-Metaboliten 2,3-dn-6-keto-PGF_{1 α} konnte ein schwacher, aber signifikanter Zusammenhang nachgewiesen werden: je höher die 2,3-dn-TxB₂-Exkretion desto höher auch die 2,3-dn-6-keto-PGF_{1 α} -Exkretion (rho = 0,216, p = 0,0165; siehe Abb. 84 linkes Diagramm). Wird die Regressionsanalyse für die Responder- und Low-Responder separat durchgeführt, so ergibt sich für die Responder-Gruppe nach wie vor eine signifikante Korrelation (rho = 0,228, p = 0,0392), für die Low-Responder-Gruppe hingegen nicht (rho = 0,225, p = 0,1543).

Bei den „Typ I-resistenten“ Patienten wurde ein rho-Wert von 0,800 und ein p-Wert von 0,1659 ermittelt (graphisch nicht dargestellt).

Hinsichtlich der Analyse des Quotienten {2,3-dn-TxB₂-Exkretion/2,3-dn-6-keto-PGF_{1 α} -Exkretion} ergeben sich zwischen der Responder-, Low-Responder- und „Typ I-Resistenz“-Gruppe keine Unterschiede. Der Quotient der Responder-Gruppe liegt bei 1,2 (0,6 – 1,9) und der der Low-Responder-Gruppe bei 0,8 (0,5 – 1,7); p = 0,2331.

Für die Patienten mit „Typ I-Resistenz“ errechnete sich ein Quotient von 2,0 (1,3 – 2,5); p = 0,1020 im Vergleich zur Low-Responder-Gruppe.

Das Ausmaß der Thrombozytenaggregation verhielt sich sowohl für die Responder als auch für die Low-Responder vom Exkretions-Quotienten $\{2,3\text{-dn-TxB}_2/2,3\text{-dn-6-keto-PGF}_{1\alpha}\}$ unabhängig. Dies galt sowohl für die Kollagen-induzierte Aggregation ($\rho = -0,105$, $p = 0,2435$; Abb. 84 rechtes Diagramm) als auch für die Arachidonsäure-induzierte ($\rho = -0,093$, $p = 0,3023$) und ADP-induzierte Aggregation ($\rho = -0,017$, $p = 0,8879$). Im Vergleich zeigten sich für die „Typ I-resistenten“ Patienten ($n = 4$) ein ρ -Wert von $0,800$ sowie ein p -Wert von $0,1659$.

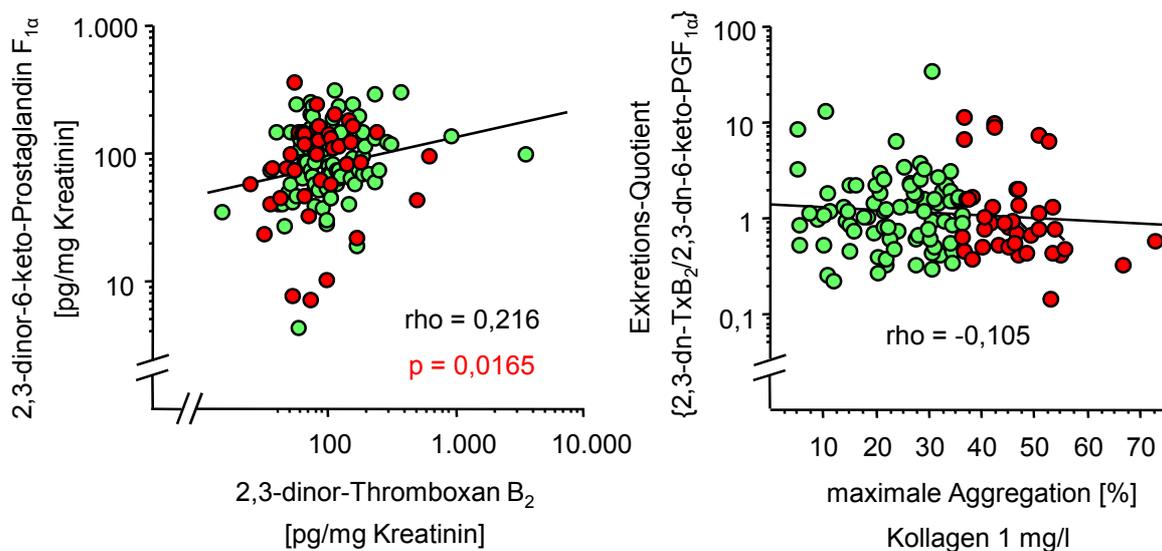


Abb. 84: Zusammenhang zwischen der 2,3-dinor-Thromboxan B_2 - und 2,3-dinor-6-keto-Prostaglandin $F_{1\alpha}$ -Exkretion in Verbindung mit der maximalen Aggregation nach Kollagen-Induktion; $n = 83$ Responder (●), $n = 41$ Low-Responder (●)

3.7. Bedeutung kardiovaskulärer Risikofaktoren im Zusammenhang mit einer „ASS-Resistenz“

In diesem Kapitel werden die ASS-Responder- mit den ASS-Low-Responder-Patienten, d.h. den Patienten mit einer „ASS-Resistenz“ vom Typ III, hinsichtlich ihrer kardiovaskulären Risikofaktoren verglichen.

Es wurde im Studienkollektiv für zwei der untersuchten Risikofaktoren ein Zusammenhang mit dem Vorliegen einer „ASS-Resistenz“ nachgewiesen. Hierbei handelt es sich zum einen um ein erhöhtes Lebensalter, zum anderen um die Hypercholesterinämie. Abschnitt 3.7.1. bzw. Abschnitt 3.7.2. beschreiben diese Ergebnisse detailliert.

Für alle weiteren Risikofaktoren konnte im Patientenkollektiv keine Verbindung zu einer „ASS-Resistenz“ festgestellt werden. Im Einzelnen handelt es sich hierbei um das Geschlecht, eine positive Familienanamnese und eine Hypertonie, aber auch ein Diabetes, ein erhöhter Body Mass Index (BMI) oder ein Zigarettenkonsum wurde nicht häufiger bei „ASS-resistenten“ Patienten beobachtet. Tab. 24 vergleicht die Häufigkeiten der Risikofaktoren bzw. im Falle des Alters und des BMI die Mittelwerte, welche für die High-Responder- bzw. Responder- und Low-Responder-Gruppe ermittelt wurden.

	High-Responder	Responder (High- und Medium-Responder)	Low-Responder	p ₁ -Wert	p ₂ -Wert
	n = 42	n = 84	n = 42	High-Responder vs. Low-Responder	Responder vs. Low-Responder
männliches Geschlecht, n (%)	33 (78,6)	70 (83,3)	34 (81,0)	0,7860	0,7400
Alter, Jahre	63 ± 10	65 ± 8	68 ± 7	0,0074	0,0582
Alter ≥ 60, n (%)	29 (69,1)	68 (81,0)	41 (97,6)	0,0004	0,0098
pos. Familienanamnese, n (%)	11 (26,2)	24 (28,6)	9 (21,4)	0,6070	0,4091
Hypercholesterinämie, n (%)	29 (69,1)	64 (76,2)	37 (88,1)	0,0334	0,1142
Hypertonie, n (%)	35 (83,3)	73 (86,9)	35 (83,3)	0,7989	0,4768
Diabetes mellitus, n (%)	4 (9,5)	7 (8,3)	7 (16,7)	0,3319	0,1606
BMI, kg/m ²	26,9 ± 4,3	26,9 ± 4,0	25,7 ± 3,1	0,1685	0,0923
Übergewicht, n (%)	27 (64,3)	57 (67,9)	26 (61,9)	0,8211	0,5065
Adipositas, n (%)	5 (11,9)	13 (15,5)	3 (7,1)	0,4572	0,1854
Raucher (aktuell), n (%)	4 (9,5)	4 (4,8)	1 (2,4)	0,1665	0,5187
Nichtraucher (≤ 1 Jahr), n (%)	2 (4,8)	4 (4,8)	2 (4,8)	> 0,9999	> 0,9999
Nichtraucher (> 1 Jahr), n (%)	29 (69,1)	55 (65,5)	27 (64,3)	0,6434	0,8949

Tab. 24: Kardiovaskuläre Risikofaktoren und die Häufigkeit ihres Auftretens in der Gruppe der High-Responder, der Responder (High- und Medium-Responder zusammengefasst) und der Low-Responder. Für das Alter und den Body Mass Index (BMI) sind jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung angegeben. Signifikante Unterschiede sind rot markiert.

Darüberhinaus gehörten auch die Patienten, die über Angina pectoris-Beschwerden berichteten, nicht häufiger der „ASS-Resistenz“-Gruppe an: 16,9% der Responder und 26,2% der Low-Responder waren aktuell betroffen (p = 0,2181); in der High-Responder-Gruppe waren es 19,0% (p = 0,4340 im Vergleich mit der Low-Responder-Gruppe).

3.7.1. „ASS-Resistenz“ und Alter

Die ASS-Low-Responder waren im Mittel 68 ± 7 Jahre alt und damit drei Jahre älter als die Responder (65 ± 8 Jahre) und fünf Jahre älter als die High-Responder (63 ± 10 Jahre). Der Altersunterschied zwischen den High- und Low-Responder-Patienten ist signifikant ($p = 0,0074$).

Während in der Low-Responder-Gruppe bis auf einen Patienten alle weiteren 41 Patienten über 60 Jahre alt waren (97,6%), setzte sich die Responder-Gruppe lediglich zu 81,0% ($n = 68$) aus Patienten über 60 zusammen ($p = 0,0098$). In der High-Responder-Gruppe wiesen sogar nur 69,1% ($n = 29$) das „Alter über 60“ als Risikofaktor auf, so dass sich im Vergleich zur Low-Responder-Gruppe ein hochsignifikanter Unterschied errechnete ($p = 0,0004$).

Werden allerdings für jeden einzelnen Patienten die Werte der maximalen Kollagen-induzierten Aggregation dem jeweiligen Alter gegenübergestellt, so ergibt sich nur eine schwache, aber dennoch signifikante Korrelation ($\rho = 0,225$, $p = 0,0118$; siehe Abb. 85). Auffallend ist jedoch, dass von allen Patienten, die jünger als 60 waren, nur ein einziger Patient (von 17 Patienten) der Low-Responder-Gruppe angehört und lediglich drei weitere Patienten der Medium-Responder-Gruppe. Damit sind mehr als Dreiviertel der „Unter-60-Jährigen“ High-Responder.

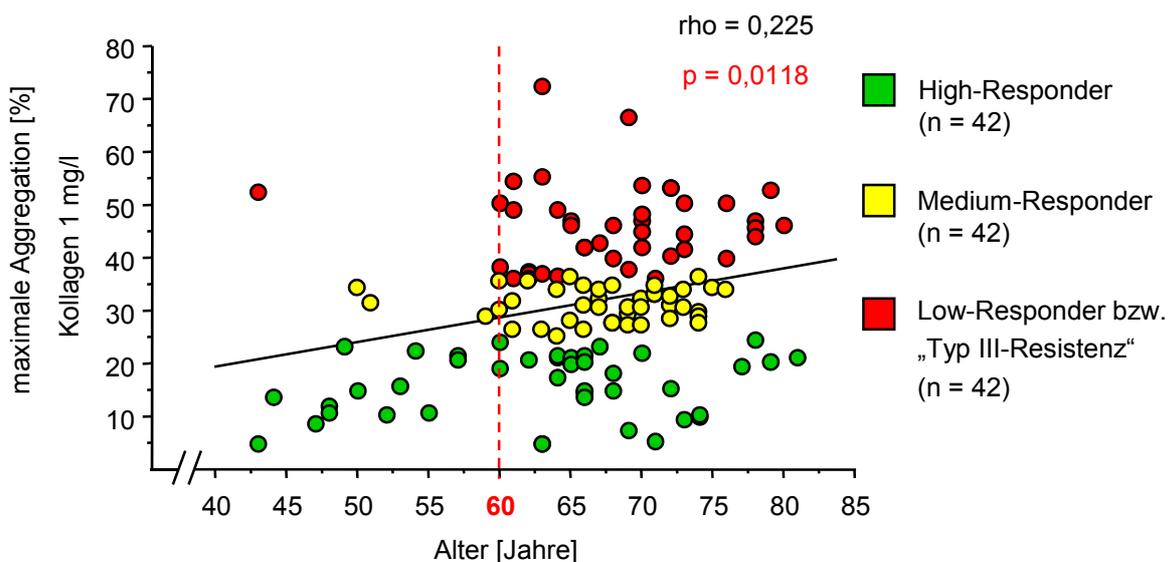


Abb. 85: Korrelation zwischen maximaler Thrombozytenaggregation (induziert mit 1 mg/l Kollagen) und Patientenalter. Ein Alter ≥ 60 Jahre gilt als kardiovaskulärer Risikofaktor; deshalb ist in der Abbildung für das Alter „60“ eine rote gestrichelte Linie eingezeichnet.

Die mediane durch Kollagen ausgelöste maximale Thrombozytenaggregation liegt für die Patienten unter 60 bei 16,0% (10,8 – 24,9%), für die Patienten über 60 bei 32,8% (24,0 – 42,1%). Der Unterschied ist signifikant ($p = 0,0002$, siehe Abb. 86).

Auch die Kollagen-Konzentrationskurven der beiden Altersklassen unterscheiden sich signifikant voneinander ($p = 0,0018$, siehe Abb. 87); der EC_{50} -Wert für Kollagen liegt für die Patienten über 60 mit 1,25 mg/l deutlich niedriger als der EC_{50} -Wert für die Patienten unter 60 (1,92 mg/l).

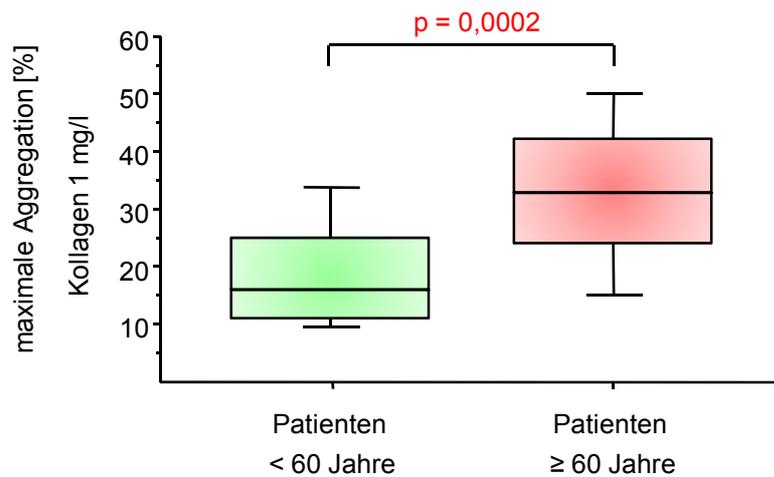


Abb. 86: Maximale Kollagen-induzierte Aggregation der „Unter- und Über-60-Jährigen“ ($n = 17$ und $n = 109$)

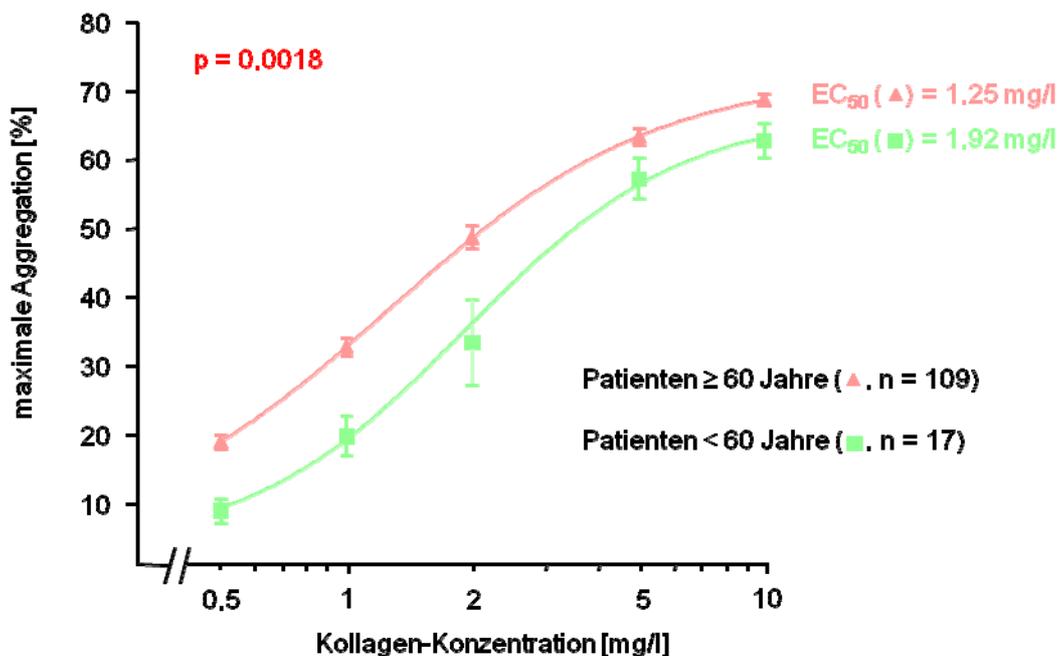


Abb. 87: Thrombozytenaggregation der Patienten unter und über 60, ausgelöst mit verschiedenen Kollagen-Konzentrationen. Die Werte für die maximale Aggregation sind als Mittelwerte mit Standardfehler angegeben.

Beim Vergleich der Arachidonsäure-induzierten Aggregation der Patienten über und unter 60 zeigte sich ebenfalls eine signifikant höhere maximale Aggregation für die „Über-60-Jährigen“ (5,7% (3,3 – 8,2%) versus 2,1% (1,2 – 3,4%), $p < 0,0001$; siehe Abb. 88 linkes Box-Diagramm).

Der Median für die ADP-induzierte maximale Thrombozytenaggregation der Patientengruppe über 60 lag zwar auch mit 39,1% (32,2 – 50,1%) höher als der Median für die Patientengruppe unter 60 (30,4% (25,5 – 31,9%)), eine Signifikanz errechnete sich für diese Differenz jedoch nicht ($p = 0,0618$); hierzu sei angemerkt, dass die ADP-Messung nur bei 6 unter 60 Jahre alten Patienten durchgeführt worden war. Das dazugehörige Box-Diagramm ist in Abb. 88 (rechts) dargestellt.

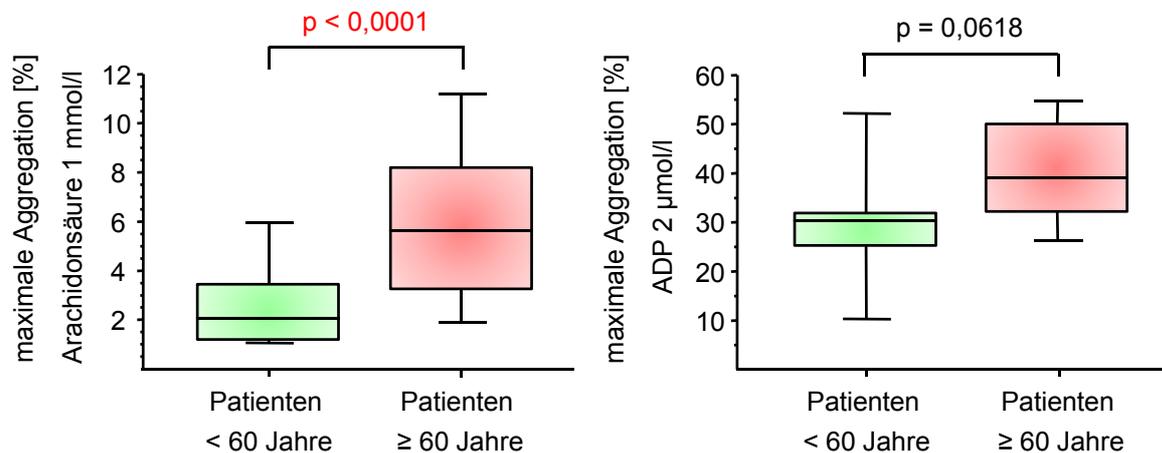


Abb. 88: Maximale Thrombozytenaggregation, ausgelöst mit Arachidonsäure (linker Teil der Abbildung) und ADP (rechter Teil der Abbildung), der Patienten unter 60 ($n = 17$ für die AA-Messung, $n = 6$ für die ADP-Messung) und der Patienten über 60 ($n = 109$ für die AA-Messung und $n = 67$ für die ADP-Messung)

3.7.2. „ASS-Resistenz“ und Hypercholesterinämie

In der Gruppe der ASS-Low-Responder waren 88,1% der Patienten von einer Hypercholesterinämie betroffen (37 von 42 Patienten), in der ASS-High-Responder-Gruppe waren dies lediglich 69,1%, d.h. 29 von 42 Patienten ($p = 0,0334$, siehe Tab. 24). In der Responder-Gruppe (High- und Medium-Responder zusammengefasst) litten 76,2% (64 von 84 Patienten) an einer Hypercholesterinämie ($p = 0,1142$ im Vergleich mit den Low-Responder-Patienten).

Für die insgesamt 101 Patienten mit Hypercholesterinämie wurde eine mediane maximale Kollagen-induzierte Aggregation von 32,3% (21,8 – 41,7%) bestimmt, für die 25 Patienten ohne Hypercholesterinämie ergab sich ein Median von 24,6% (15,3 – 34,5%), $p = 0,0521$. Das dazugehörige Box-Diagramm zeigt Abb. 89 (rechter Teil der Abbildung). Zusätzlich ist in der gleichen Abbildung (linker Teil) das entsprechende Perzentil-Diagramm dargestellt.

Hinsichtlich der Arachidonsäure- und der ADP-induzierten Thrombozytenaggregation konnte kein Zusammenhang zwischen einer Hypercholesterinämie und einer verstärkten Aggregation nachgewiesen werden: maximale AA-induzierte Aggregation: 5,6% (2,8 – 7,9%) für die Patienten mit Hypercholesterinämie ($n = 101$) versus 4,0% (2,2 – 6,3%) für die Patienten ohne Hypercholesterinämie ($n = 25$), $p = 0,1388$; maximale ADP-induzierte Aggregation: 38,9% (31,2 – 50,1%) für die Patienten mit Hypercholesterinämie ($n = 59$) versus 35,3% (25,5 – 47,6%) für die Patienten ohne Hypercholesterinämie ($n = 14$), $p = 0,4164$ (graphisch nicht dargestellt).

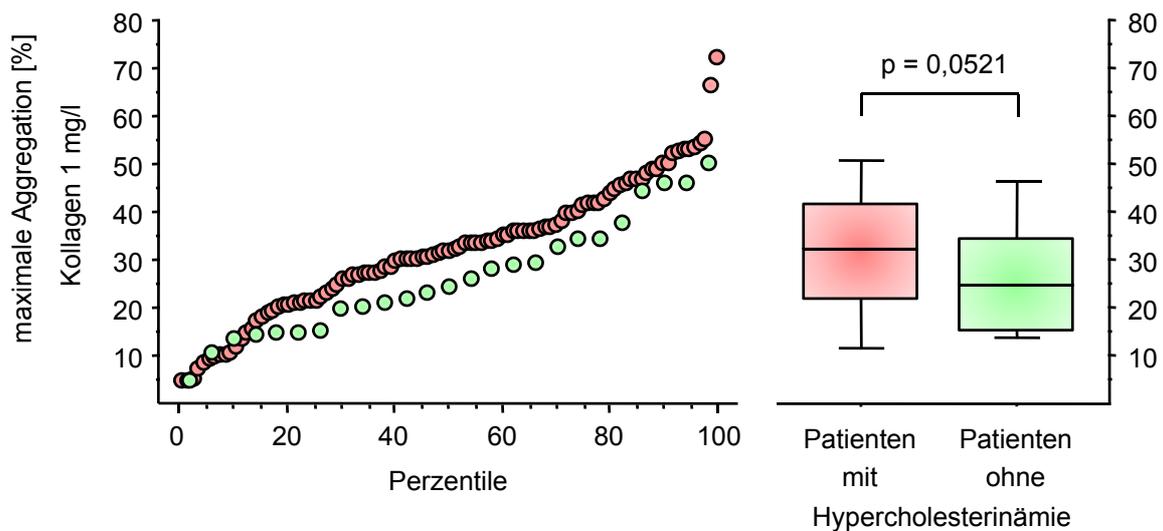


Abb. 89: Vergleich der maximalen Kollagen-induzierten Thrombozytenaggregation zwischen Patienten mit Hypercholesterinämie ($n = 101$, ●) und Patienten ohne Hypercholesterinämie ($n = 25$, ●)

3.8. Atherosklerotische Ereignisse und kardiologische Interventionen – eine retrospektive Analyse

In diesem Kapitel werden die atherosklerotischen Ereignisse und kardiologischen Interventionen beleuchtet, die trotz der kontinuierlichen Therapie mit 100 mg ASS bei den

Studienteilnehmern in der Vergangenheit aufgetreten sind. Dabei wird überprüft, ob die Patienten mit einer „ASS-Resistenz“ vom Typ III möglicherweise häufiger betroffen waren als die Responder-Patienten. Aus dieser retrospektiven Analyse sind zum einen die „Typ I-resistenten“ Patienten (n = 4) ausgeschlossen, zum anderen die Patienten, die in der Vergangenheit das ASS zeitweilig abgesetzt oder die Dosis variiert hatten bzw. die Patienten, bei denen nicht eindeutig rückverfolgt werden konnte, ob das entsprechende Ereignis tatsächlich unter der ASS-Therapie aufgetreten war (n = 15). Somit konnten 111 Patienten in die retrospektive Analyse eingeschlossen werden.

Zunächst wurde das gesamte Kollektiv (n = 111) hinsichtlich der vergangenen Ereignisse betrachtet. Dabei wurden zum einen die High-Responder (n = 32) und zum anderen die Responder (n = 73) mit der Low-Responder-Gruppe (n = 38) verglichen. Die Ergebnisse der Analyse zeigt Tab. 25. Es ist zu erkennen, dass für kein Ereignis – weder für einen Myokardinfarkt noch für eine PTCA mit oder ohne Stentimplantation, eine Bypass-Operation, eine transitorische ischämische Attacke oder für irgendein sonstiges atherosklerotisch bedingtes Ereignis – ein signifikant häufigeres Auftreten in einer der Gruppen festzustellen war.

	High-Responder	Responder (High- und Medium-Responder)	Low-Responder	p ₁ -Wert	p ₂ -Wert
	n = 32	n = 73	n = 38	High-Responder vs. Low-Responder	Responder vs. Low-Responder
Myokardinfarkt, n (%)	2 (6,3)	6 (8,2)	7 (18,4)	0,1296	0,1127
PTCA, n (%)	10 (31,3)	22 (30,1)	10 (26,3)	0,6489	0,6732
Stentimplantation, n (%)	9 (28,1)	18 (24,7)	8 (21,1)	0,4918	0,6705
Bypass-OP, n (%)	5 (15,6)	10 (13,7)	3 (7,9)	0,3112	0,3669
TIA, n (%)	1 (3,1)	2 (2,7)	3 (7,9)	0,3917	0,2140
sonstige Ereignisse, n (%)	0 (0,0)	4 (5,5)	4 (10,5)	0,0587	0,3293
Ereignisse (gesamt), n (%)	14 (43,8)	32 (43,8)	18 (47,4)	0,7621	0,7226

Tab. 25: Ereignisse unter der Therapie mit 100 mg ASS (retrospektive Analyse). Die „sonstigen Ereignisse“ fassen weitere atherosklerotisch bedingte Ereignisse zusammen wie z.B. das Bauchaortenaneurysma. Die Angabe „Ereignisse (gesamt)“ bezieht sich auf die Anzahl der Patienten, die ein oder mehrere Ereignisse in der Vergangenheit erlitten hatten.

Anschließend wurde das Patientenkollektiv in zwei Gruppen eingeteilt:

1. in die Patienten, die vor der Behandlung mit ASS bereits ein MI erlitten hatten (n = 74) und
2. in die Patienten, die vor Therapiebeginn keinen MI durchgemacht hatten (n = 43).

(In diese Analyse konnten sechs Patienten mehr eingeschlossen werden (n = 117) als in die übrige retrospektive Analyse (n = 111).)

Nach Einteilung des Kollektivs in diese zwei Gruppen, wurde deutlich, dass die Patienten, die einen Infarkt vor Therapiebeginn erlitten hatten, signifikant häufiger der Responder- bzw. der High-Responder-Gruppe angehörten als der Low-Responder-Gruppe: Während 74,3% der High-Responder-Patienten (n = 26) und 70,1% der Responder-Patienten (n = 54) einen MI vor der ASS-Behandlung gehabt hatten, hatten dies in der Low-Responder-Gruppe nur die Hälfte (n = 20) der Patienten (p = 0,0312 bzw. p = 0,0322; siehe auch Tab. 26).

	High-Responder	Responder (High- und Medium-Responder)	Low-Responder	p ₁ -Wert	p ₂ -Wert
	n = 35	n = 77	n = 40	High-Responder vs. Low-Responder	Responder vs. Low-Responder
MI vor ASS-Therapie, n (%)	26 (74,3)	54 (70,1)	20 (50,0)	0,0312	0,0322
kein MI vor ASS-Therapie, n (%)	9 (25,7)	23 (29,9)	20 (50,0)	0,0312	0,0322

Tab. 26: Vergleich der Patienten, die bereits einen MI vor Beginn der ASS-Dauertherapie erlitten hatten (n = 74) und der Patienten, die vor Therapiebeginn keinen Infarkt hatten (n = 43), hinsichtlich ihrer „ASS-Response“

Im weiteren Verlauf der retrospektiven Analyse wurden nun diese beiden Gruppen getrennt voneinander untersucht (Abschnitt 3.8.1. und Abschnitt 3.8.2.).

3.8.1. Retrospektive Analyse für die Patienten, die vor der ASS-Therapie bereits einen Myokardinfarkt erlitten hatten

Bei 74 Patienten hatte sich vor dem Behandlungsbeginn mit ASS ein Myokardinfarkt ereignet. Unter der anschließenden Dauertherapie mit 100 mg ASS bekamen 12,2% dieser Patienten einen erneuten Infarkt (n = 9) und das trotz der regelmäßigen täglichen Einnahme.

Von den 74 Patienten wurden 54 Patienten als ASS-Responder identifiziert (26 High- und 28 Medium-Responder) und 20 Patienten als ASS-Low-Responder. Von den Low-Responder-

Patienten erlitt ein Viertel (n = 5) einen der oben erwähnten Reinfarkte, während in der Responder-Gruppe nur 7,4% der Patienten (n = 4) betroffen waren. Dieser Unterschied ist signifikant (p = 0,0398). Anders ausgedrückt bedeutet dies, dass sich bei jedem vierten Low-Responder ein Reinfarkt unter der ASS-Dauertherapie ereignet hatte, während bei den Responder-Patienten nur jeder vierzehnte betroffen war. Das Risiko, einen Reinfarkt zu erleiden, war im Falle der ASS-Low-Response 3,4-fach erhöht.

Kardiologische Interventionen (PTCA, Stentimplantation, Bypass-OP) und sonstige atherosklerotisch bedingte Ereignisse kamen in gleichem Maße bei den Responder- und Low-Responder-Patienten vor (siehe Tab. 27).

	High-Responder	Responder (High- und Medium-Responder)	Low-Responder	p ₁ -Wert	p ₂ -Wert
	n = 26	n = 54	n = 20	High-Responder vs. Low-Responder	Responder vs. Low-Responder
Reinfarkt, n (%)	2 (7,7)	4 (7,4)	5 (25,0)	0,1052	0,0398
PTCA, n (%)	9 (34,6)	18 (33,3)	7 (35,0)	0,9783	0,8929
Stentimplantation, n (%)	8 (30,8)	14 (25,9)	5 (25,0)	0,6666	0,9355
Bypass-OP, n (%)	5 (19,2)	8 (14,8)	2 (10,0)	0,3876	0,5905
TIA, n (%)	1 (3,9)	1 (1,9)	2 (10,0)	0,4020	0,1145
sonstige Ereignisse, n (%)	0 (0,0)	3 (5,6)	2 (10,0)	0,0992	0,4988
Ereignisse (gesamt), n (%)	13 (50,0)	26 (48,2)	12 (60,0)	0,4997	0,3650

Tab. 27: Ereignisse unter der Therapie mit 100 mg ASS bei den Patienten, die bereits einen Myokardinfarkt vor der ASS-Therapie erlitten hatten (n = 74). Die Angaben „sonstige Ereignisse“ und „Ereignisse (gesamt)“ sind in der Legende der Tab. 25 erläutert.

Es sei an dieser Stelle darauf hingewiesen, dass die Zeitspanne, die zur Rückverfolgung herangezogen wurde, für jeden Patienten unterschiedlich groß war – entsprechend der individuellen ASS-Behandlungsdauer (siehe Abschnitt 3.1.3.1. und Abb. 46). Für die Patienten, die bereits einen MI vor der ASS-Therapie erlitten hatten, wurden folgende mittlere ASS-Behandlungszeiträume ermittelt:

- 8,6 ± 6,1 Jahre für die High-Responder (n = 26),
- 8,4 ± 5,9 Jahre für die Responder (n = 54) und
- 5,7 ± 3,9 Jahre für die Low-Responder (n = 20).

Weder für die High-Responder noch für die Responder konnte im Vergleich zu den Low-Responder-Patienten ein Unterschied hinsichtlich dieser Behandlungszeiträume errechnet werden ($p = 0,0779$ bzw. $p = 0,0608$).

Bis sich der Reinfarkt unter der ASS-Therapie ereignet hatte, waren in der High-Responder-Gruppe $2,5 \pm 3,5$ Jahre vergangen, in der Low-Responder-Gruppe $5,0 \pm 2,7$ Jahre ($p = 0,3468$); bei den Responder-Patienten waren es $2,5 \pm 2,1$ Jahre ($p = 0,1687$ im Vergleich mit der Low-Responder-Gruppe).

3.8.2. Retrospektive Analyse für die Patienten, die vor der ASS-Therapie keinen Myokardinfarkt erlitten hatten

Wird die Häufigkeit der Ereignisse, die während der ASS-Therapie auftraten, für die Patientengruppe untersucht, die vor dem Behandlungsbeginn mit ASS von keinem Myokardinfarkt betroffen waren, so konnten keine Unterschiede zwischen High-Responder- bzw. Responder-Patienten und Low-Responder-Patienten ermittelt werden. Es sei jedoch darauf hingewiesen, dass die n-Zahlen für diese Analyse sehr klein sind (siehe Tab. 28).

	High-Responder n = 6	Responder (High- und Medium-Responder) n = 19	Low-Responder n = 18	p ₁ -Wert	p ₂ -Wert
				High-Responder vs. Low-Responder	Responder vs. Low-Responder
Myokardinfarkt, n (%)	0 (0,0)	2 (10,5)	2 (11,1)	0,3938	0,9543
PTCA, n (%)	1 (16,7)	4 (21,1)	3 (16,7)	> 0,9999	0,7335
Stentimplantation, n (%)	1 (16,7)	4 (21,1)	3 (16,7)	> 0,9999	0,7335
Bypass-OP, n (%)	0 (0,0)	2 (10,5)	1 (5,6)	0,5553	0,5798
TIA, n (%)	0 (0,0)	1 (5,3)	1 (5,6)	0,5553	0,9686
sonstige Ereignisse, n (%)	0 (0,0)	1 (5,3)	2 (11,1)	0,3938	0,5148
Ereignisse (gesamt), n (%)	1 (16,7)	6 (31,6)	6 (33,3)	0,4367	0,9093

Tab. 28: Ereignisse unter der Therapie mit 100 mg ASS bei den Patienten, die vor der ASS-Therapie keinen Myokardinfarkt erlitten hatten (n = 37). Die Angaben „sonstige Ereignisse“ und „Ereignisse (gesamt)“ sind in der Legende der Tab. 25 erläutert.

3.9. Untersuchungen zur ASS-Behandlungsdauer bei Patienten mit und ohne „ASS-Resistenz“

Wie in Abschnitt 3.1.3.1. beschrieben, variierte der Zeitraum, über den ASS bereits regelmäßig täglich eingenommen wurde, erheblich. Wird diese Einnahmedauer für die ASS-Responder und ASS-Low-Responder getrennt untersucht, ergibt sich für die Responder ($n = 71$) eine mediane Behandlungsdauer von 8 Jahren (3 – 11,75 Jahren) und für die Low-Responder ($n = 37$) von 7 Jahren (2 – 9,25 Jahren), $p = 0,2869$. Die ASS-High-Responder ($n = 32$) nahmen ASS bereits seit 8,5 Jahren (4 – 12 Jahren) ein. Ein Unterschied ließ sich für die High-Responder im Vergleich zu den Low-Responder-Patienten aber auch nicht errechnen ($p = 0,2480$). Abb. 90 stellt die ASS-Einnahmezeiträume exemplarisch für die High-Responder- und Low-Responder-Patienten als Perzentil-Diagramm dar.

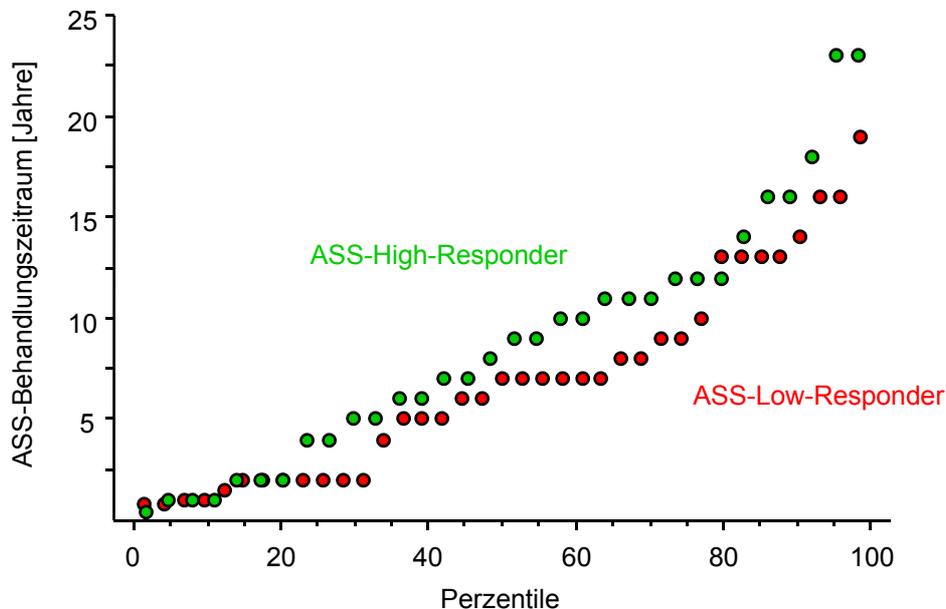


Abb. 90: Perzentil-Diagramm zur ASS-Einnahmedauer der ASS-High-Responder ($n = 32$) und ASS-Low-Responder ($n = 37$)

Zwischen der ASS-Behandlungsdauer und der Kollagen-induzierten Thrombozytenaggregation wurde keine Korrelation festgestellt ($\rho = -0,082$, $p = 0,3954$; graphisch nicht dargestellt). Dennoch war auffällig, dass von denjenigen Patienten, die schon seit zehn oder mehr Jahren mit ASS behandelt wurden ($n = 38$), 76,3% ($n = 29$) der Responder-Gruppe angehörten und lediglich 23,7% ($n = 9$) der Low-Responder-Gruppe; wurden hingegen die Patienten betrachtet, die ASS erst seit ein oder zwei Jahren verordnet bekamen ($n = 26$), so war diese Gruppe ungefähr zur Hälfte (53,9%) aus Responder- und zur anderen Hälfte (46,1%) aus Low-Responder-Patienten zusammengesetzt ($p = 0,0601$).

3.10. Auswirkungen des Einnahmezeitpunkts der ASS-Dosis

Ob die ASS-Tablette am Tag der Untersuchungen oder das letzte Mal am Vortag eingenommen wurde, hatte auf einige der untersuchten Parameter Auswirkungen. Dieses Kapitel gibt Auskunft, inwieweit die Thrombozytenaggregation, das während der Aggregationsreaktion gebildete Thromboxan, die Cyclooxygenase-1-Aktivität und die Exkretion des Thromboxan-Metaboliten 2,3-dinor-Thromboxan B₂ vom ASS-Einnahmezeitpunkt beeinflusst wurden. In diese Auswertung wurden insgesamt 107 Patienten eingeschlossen (Ausschluss der „Typ I-resistenten“ Patienten sowie Information zum Einnahmezeitpunkt bei weiteren 19 Patienten fehlend, siehe auch Abschnitt 3.1.3.1.).

3.10.1. ASS-Einnahmezeitpunkt und Aggregation

Für das Ausmaß der Thrombozytenaggregation spielte es keine Rolle, ob die ASS-Tablette zuletzt am Tag der Messung oder am Vortag eingenommen wurde. So lag die mediane maximale Kollagen-induzierte Thrombozytenaggregation bei 32,0% (22,0 – 39,6%) bzw. 30,6% (21,8 – 41,0%), $p = 0,7969$, siehe auch Abb. 91. Für die Patienten, die ASS das letzte Mal am Tag vor der Aggregationsbestimmung eingenommen hatten, konnte auch ein Zusatz von 100 μM ASS in vitro keine weitere Reduktion der Aggregation hervorrufen (30,6% (21,8 – 41,0%) versus 30,2% (23,6 – 40,8%), $p = 0,5950$; siehe ebenfalls Abb. 91).

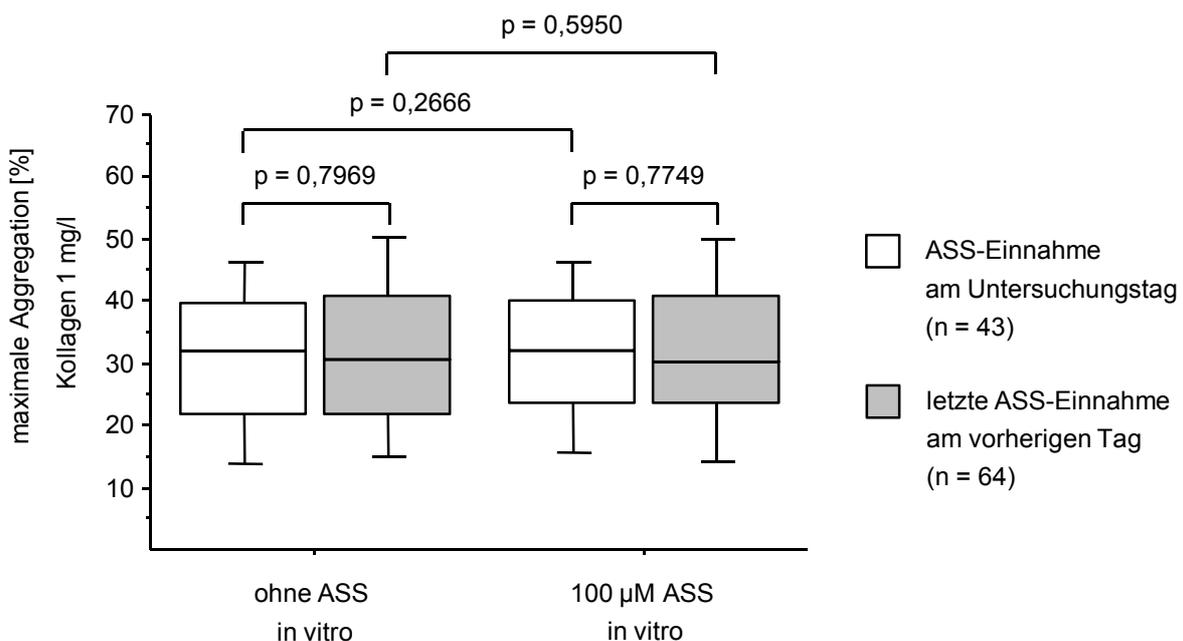


Abb. 91: Maximale Kollagen-induzierte Thrombozytenaggregation in An- bzw. Abwesenheit von ASS in vitro, aufgetrennt nach dem Einnahmezeitpunkt der ASS-Tablette

Auch die Thrombozytenaggregation, die mit Arachidonsäure oder ADP ausgelöst wurde, verhielt sich vom ASS-Einnahmezeitpunkt unabhängig (6,3% (2,7 – 9,0%) versus 5,1% (3,1 – 6,5%) für die AA-induzierte Aggregation ($p = 0,3169$) bzw. 38,4% (32,6 – 50,9%) versus 37,6% (28,9 – 46,2%) für die ADP-induzierte Aggregation ($p = 0,2664$), siehe Abb. 92).

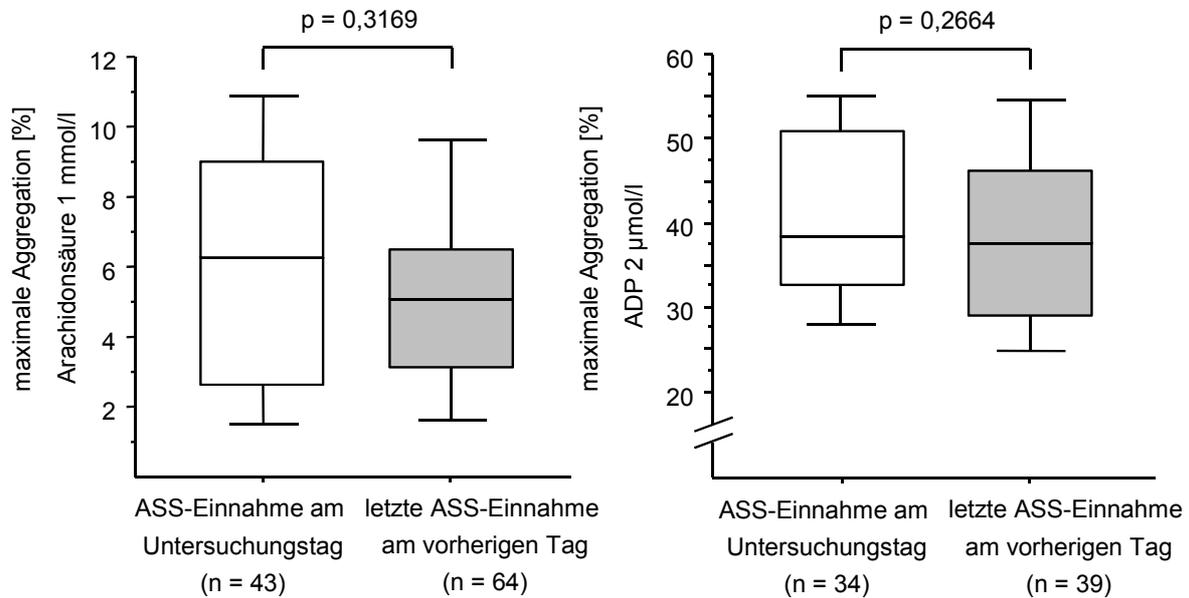


Abb. 92: Maximale Arachidonsäure- bzw. ADP-induzierte Thrombozytenaggregation in Abhängigkeit vom ASS-Einnahmezeitpunkt

Die Ergebnisse der Kontingenztafel (siehe Tab. 29) runden diese Beobachtungen ab: Von den 64 Patienten, die die ASS-Tablette zuletzt am Vortag eingenommen hatten, war ca. ein Drittel ($n = 22$, 34,4%) von einer ASS-Low-Response betroffen, von den 43 Patienten, die ASS am Untersuchungstag eingenommen hatten, war ebenfalls ein Drittel ($n = 14$, 32,6%) betroffen ($p = 0,8454$).

	letzte ASS-Einnahme am Untersuchungstag	letzte ASS-Einnahme am vorherigen Tag	Σ
ASS-Responder	29	42	71
ASS-Low-Responder	14	22	36
Σ	43	64	107

Tab. 29: Kontingenztafel zum ASS-Einnahmezeitpunkt und zur ASS-Response. Die Zahlenwerte beschreiben jeweils die Patientenanzahl n .

Es sei an dieser Stelle noch einmal auf den Abschnitt 3.2.3. bzw. insbesondere auf die Ergebnisse der Abb. 59 verwiesen. Sowohl die beobachtete Verlängerung der lag time als auch die Zunahme der maximalen Steigung, hervorgerufen durch den ASS-Zusatz in vitro, stehen in keinem Zusammenhang zum ASS-Einnahmezeitpunkt. Auch nach Aufteilung des Patientenkollektivs hinsichtlich des Einnahmezeitpunkts bleiben die Unterschiede mit jeweils $p < 0,0001$ signifikant.

3.10.2. ASS-Einnahmezeitpunkt und Thromboxan-Bildung

In diesem Abschnitt wird die Abhängigkeit der durch Kollagen ausgelösten Thromboxan-Synthese vom ASS-Einnahmezeitpunkt untersucht. Aus Abb. 93 geht hervor, dass ausschließlich bei den Patienten, die ASS zuletzt am Tag vor der Aggregationsmessung eingenommen hatten, eine leicht erhöhte Thromboxan-Synthese nachzuweisen war (80 pg/ml (52 – 136 pg/ml) versus 54 pg/ml (47 – 75 pg/ml), $p = 0,0014$), und auch ausschließlich für diese Patienten ein Zusatz von ASS in vitro eine weitere Abnahme der TxB_2 -Bildung bewirkte (von 80 pg/ml auf 52 pg/ml (47 – 75 pg/ml), $p = 0,0002$).

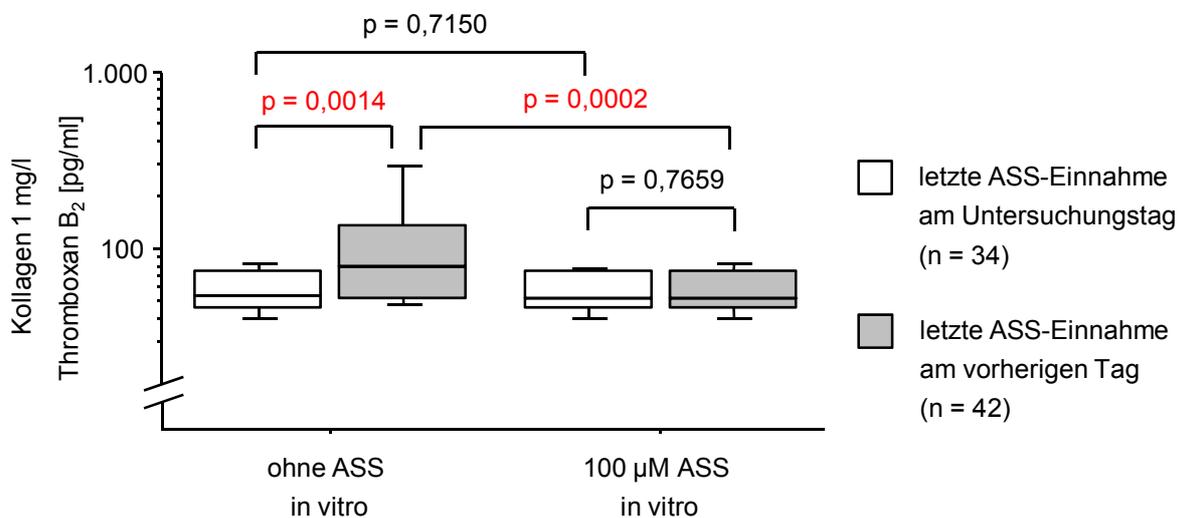


Abb. 93: Einfluss des ASS-Einnahmezeitpunkts auf die Kollagen-induzierte Thromboxan-Bildung in An- bzw. Abwesenheit von ASS in vitro

Diese Beobachtung ergänzt die Ergebnisse aus Abschnitt 3.2.1.2. und Abb. 52 bzw. aus Abschnitt 3.2.3. und Abb. 61, in denen bereits für die Gesamtheit aller Patienten ohne „Typ I-Resistenz“ festgestellt wurde, dass die ASS-Einnahme zwar eine deutliche Reduktion der Thromboxan-Synthese bewirkt hatte, durch den Zusatz von ASS in vitro jedoch eine weitere signifikante Reduzierung möglich war.

Abb. 94 zeigt noch einmal die Regressionsdiagramme aus Abschnitt 3.2.3. (Abb. 62) und Abschnitt 3.4.2. (Abb. 70, linke Graphik), diesmal jedoch unterteilt nach dem Einnahmezeitpunkt der ASS-Tablette. Es verdeutlicht, dass auch für die Patienten, die ASS zuletzt am Tag zuvor eingenommen hatten, keine Korrelation zwischen Thromboxan-Bildung und Aggregationsreaktion nachgewiesen werden konnte – sowohl hinsichtlich der Kollagen-induzierten Thrombozytenaggregation ($\rho = 0,042$, $p = 0,7865$ für die Patienten, die ASS das letzte Mal am Vortag eingenommen hatten und $\rho = -0,115$, $p = 0,5078$ für die Patienten, die ASS am Untersuchungstag eingenommen hatten; linkes Diagramm) als auch hinsichtlich der Arachidonsäure-induzierten Aggregation ($\rho = -0,062$, $p = 0,6922$ bzw. $\rho = -0,120$, $p = 0,4889$; rechtes Diagramm).

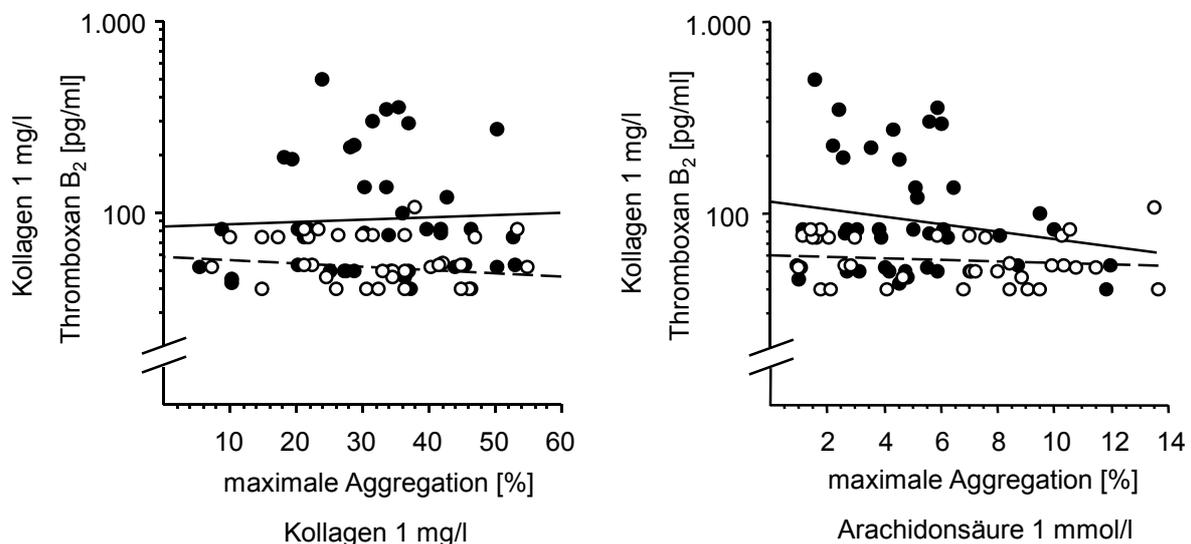


Abb. 94: Regressionsdiagramm der Kollagen-induzierten Thromboxan B_2 -Bildung und der maximalen Aggregation nach Kollagen-Induktion (linkes Diagramm) bzw. Arachidonsäure-Induktion (rechtes Diagramm), aufgetrennt nach dem ASS-Einnahmezeitpunkt, untersucht für $n = 34$ Patienten, die die ASS-Tablette am Untersuchungstag eingenommen hatten (Kreise ohne Füllung, Regressionsgerade gestrichelt) und $n = 42$ Patienten, die ASS zuletzt am Tag zuvor eingenommen hatten (Kreise mit Füllung)

3.10.3. ASS-Einnahmezeitpunkt und COX-1-Vollblut-Aktivität

Der Zeitpunkt der ASS-Einnahme hatte einen starken Einfluss auf die Cyclooxygenase-1-Aktivität im Vollblut. Bei den Patienten, die die ASS-Tablette am Tag der Untersuchung eingenommen hatten, wurde im COX-1-Assay eine mediane TxB_2 -Konzentration von 614 pg/ml (418 – 1029 pg/ml) gemessen. Die Patienten, die ASS das letzte Mal am Vortag eingenommen hatten, wiesen eine signifikant höhere COX-1-Aktivität mit einer medianen

TxB₂-Konzentration von 3293 pg/ml (2355 – 6462 pg/ml) auf ($p < 0,0001$, siehe Abb. 95). Nach Zusatz von ASS in vitro war zwischen beiden Patientengruppen kein Unterschied mehr festzustellen (74 pg/ml (51 – 139 pg/ml) versus 82 pg/ml (46 – 155 pg/ml), $p = 0,9582$; siehe ebenfalls Abb. 95). Durch den ASS-Zusatz wurde die COX-1-Vollblut-Aktivität allerdings nicht nur in der Patientengruppe, die ASS zuletzt am Vortag eingenommen hatten, signifikant gesenkt ($p < 0,0001$), sondern auch in der Gruppe, für die bereits eine sehr niedrige COX-1-Aktivität aufgrund der ASS-Einnahme am Untersuchungstag ermittelt worden war ($p < 0,0001$, siehe ebenfalls Abb. 95).

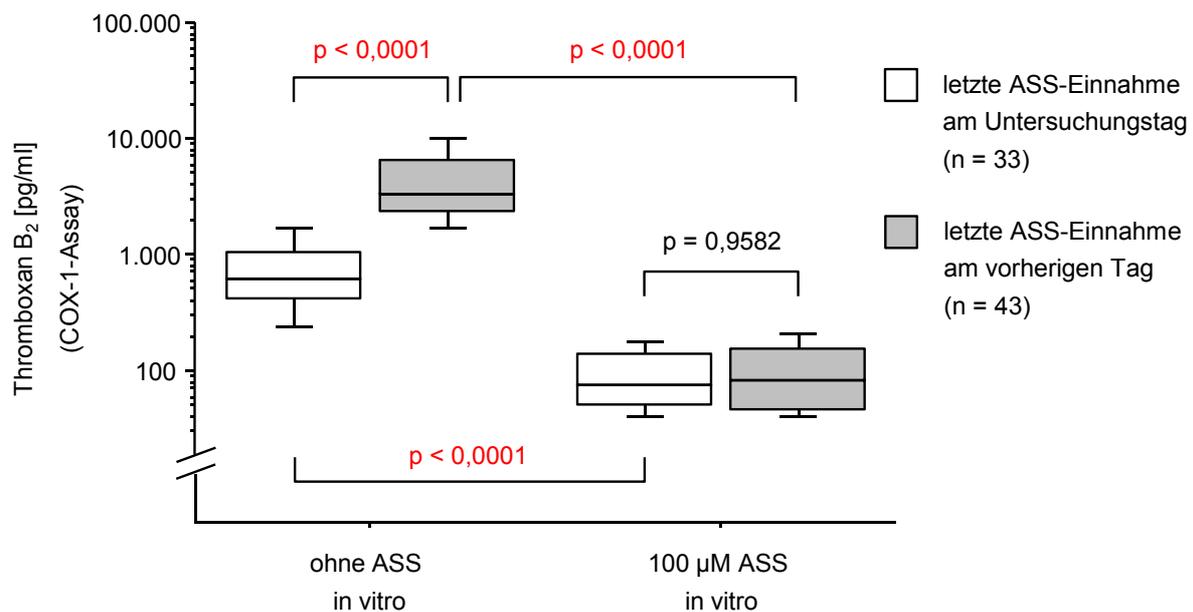


Abb. 95: Abhängigkeit der COX-1-Vollblut-Aktivität vom Einnahmezeitpunkt der ASS-Tablette

Es sei an dieser Stelle auf Abschnitt 3.5. (Abb. 74) verwiesen, in dem bereits von der Reduzierung der COX-1-Aktivität durch den ASS-Zusatz in vitro für die Responder- und Low-Responder-Patienten berichtet worden war.

Abb. 96 (oberes Diagramm) verdeutlicht, dass auch für die Patientengruppe mit der erhöhten COX-1-Aktivität aufgrund der letzten ASS-Einnahme am Vortag keine Abhängigkeit zwischen Kollagen-induzierter Aggregation und COX-1-Aktivität bestand ($\rho = -0,127$, $p = 0,4094$ im Vergleich zu $\rho = -0,209$, $p = 0,2381$ für die Patienten, die ASS am Untersuchungstag eingenommen hatten).

Darüberhinaus konnte für die Patienten, die ASS zuletzt am Vortag eingenommen hatten, auch hinsichtlich der Arachidonsäure- bzw. ADP-induzierten Thrombozytenaggregation kein Zusammenhang zwischen erhöhter COX-1-Aktivität und verstärkter maximaler Aggregation

festgestellt werden, sogar im Gegenteil (für die AA-induzierte Aggregation (Abb. 96, Diagramm links unten): $\rho = -0,345$, $p = 0,0252$ im Vergleich zu $\rho = -0,206$, $p = 0,2432$ für die Patienten, die ASS am Untersuchungstag eingenommen hatten; für die ADP-induzierte Aggregation (Abb. 96, Diagramm rechts unten): $\rho = -0,305$, $p = 0,0603$ im Vergleich zu $\rho = -0,237$, $p = 0,1799$ für die Patienten, die ASS am Untersuchungstag eingenommen hatten).

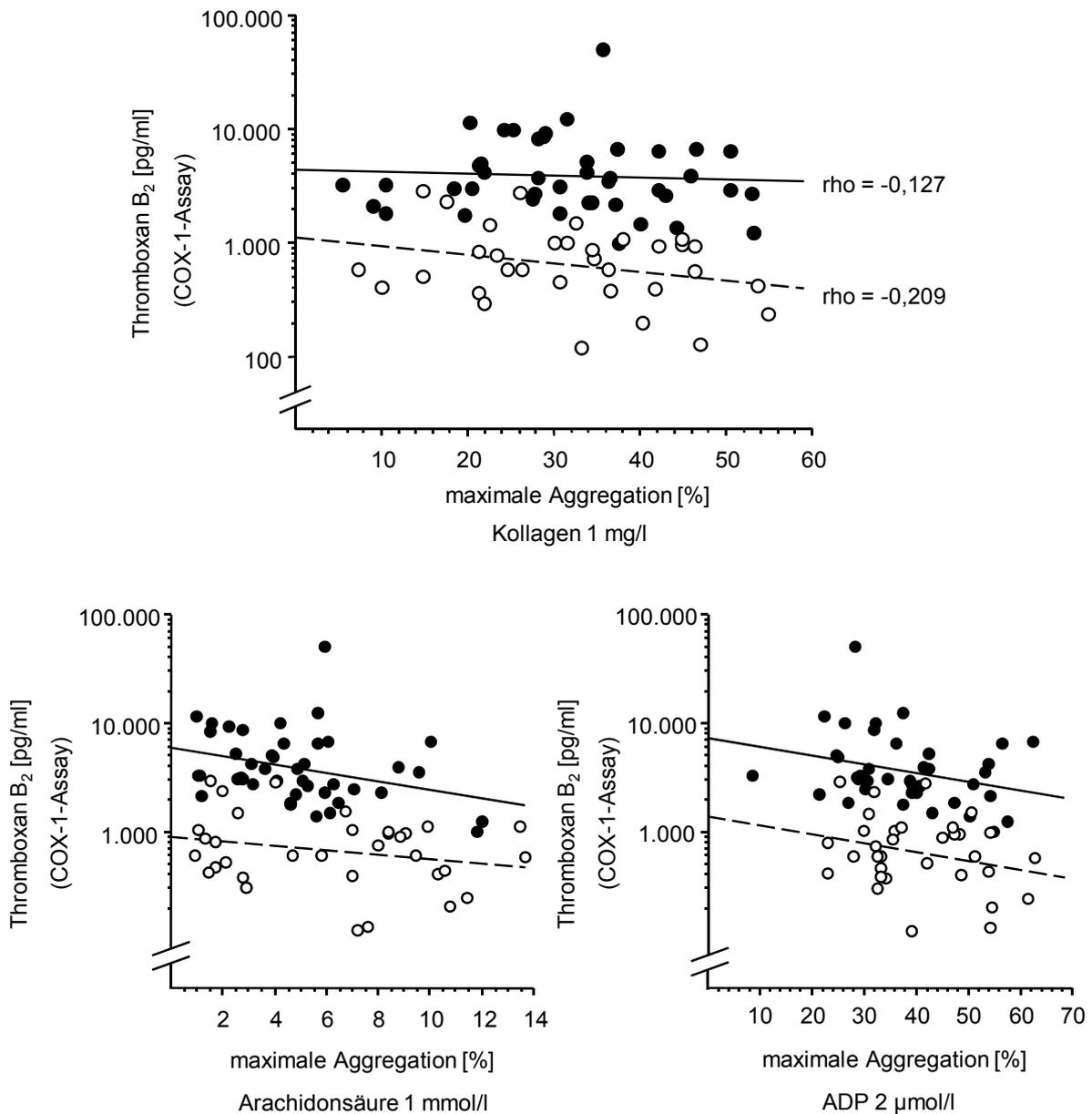


Abb. 96: Regressionsdiagramme der Thromboxan B₂-Konzentration (im COX-1-Vollblut-Assay bestimmt) und der Thrombozytenaggregation nach Kollagen-Induktion (oberes Diagramm), nach Induktion mit AA (Diagramm links unten) bzw. ADP (Diagramm rechts unten). Die weißen Punkte geben die Werte für die Patienten wieder, die ASS am Untersuchungstag bereits eingenommen hatten ($n = 33$), die schwarzen Punkte die Werte für die Patienten, die ASS das letzte Mal am Tag vor der Untersuchung eingenommen hatten ($n = 43$, für die ADP-Messung $n = 39$).

3.10.4. ASS-Einnahmezeitpunkt und 2,3-dinor-Thromboxan B₂-Exkretion

Zwischen der Exkretion des Thromboxan-Metaboliten 2,3-dn-TxB₂ und dem Einnahmezeitpunkt der ASS-Tablette konnte kein Zusammenhang festgestellt werden. So wurde für die Patienten, die ihr ASS bereits am Tag der Untersuchung eingenommen hatten, eine mediane 2,3-dn-TxB₂-Konzentration im Urin von 81 pg/mg Kreatinin (55 – 102 pg/mg) bestimmt und für die Patienten, die ihre ASS-Tablette zuletzt am Vortag eingenommen hatten, eine mediane Konzentration von 83 pg/mg Kreatinin (61 – 146 pg/mg), $p = 0,1897$ (siehe Abb. 97).

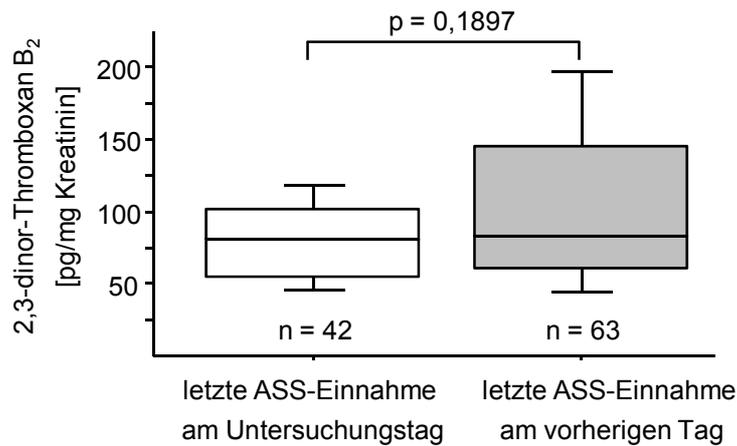


Abb. 97: Exkretion des Thromboxan-Metaboliten 2,3-dinor-Thromboxan B₂ in Abhängigkeit vom ASS-Einnahmezeitpunkt

Abb. 98 fasst die Unabhängigkeit der 2,3-dn-TxB₂-Exkretion und der Kollagen-induzierten Aggregation vom ASS-Einnahmezeitpunkt in Form eines Regressionsdiagramms zusammen. Es sei im Vergleich hierzu auf die Regressionsdiagramme für die Kollagen-induzierte Tx-Bildung (siehe Abb. 94) und für die COX-1-Aktivität (siehe Abb. 96) hingewiesen.

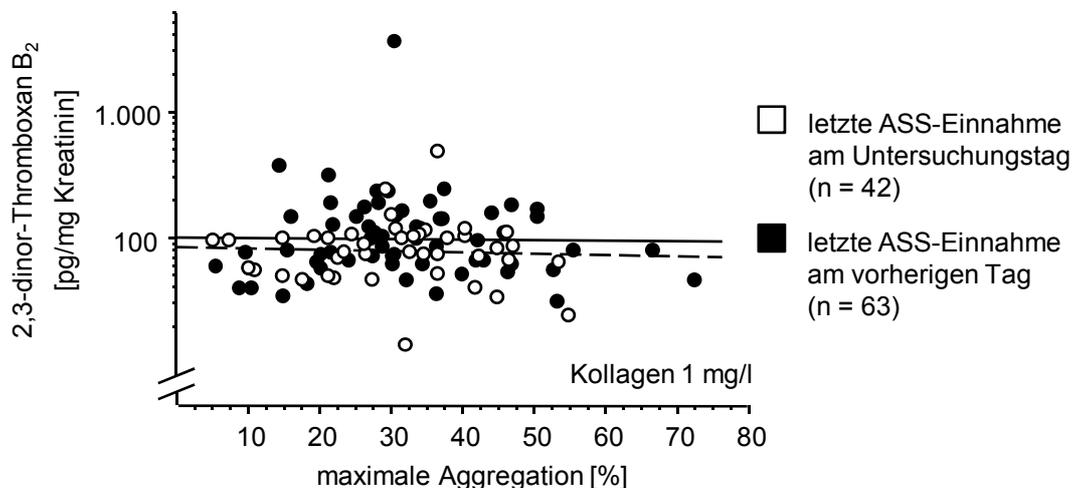


Abb. 98: Regressionsdiagramm zur 2,3-dinor-Thromboxan B₂-Exkretion und Kollagen-induzierten Thrombozytenaggregation in Abhängigkeit vom ASS-Einnahmezeitpunkt

3.10.5. ASS-Einnahmezeitpunkt und Nachweisbarkeit der ASS-Metabolite Salicylursäure und Salicylsäure

Die Untersuchungsergebnisse zur Exkretion der ASS-Metabolite Salicylursäure und Salicylsäure waren stark vom Einnahmezeitpunkt der ASS-Tablette abhängig. Ganz gleich, ob High- oder Low-Responder-Patient – wurde die ASS-Tablette zuletzt am Tag vor der Untersuchung eingenommen, so lag die Exkretion sowohl der Salicylsäure als auch der Salicylursäure signifikant niedriger, als wenn ASS das letzte Mal am Untersuchungstag eingenommen wurde (für die Salicylursäure-Exkretion: 1125 nmol/mg Kreatinin (784 – 1857 nmol/mg) versus 24 nmol/mg Kreatinin (11 – 77 nmol/mg) für die High-Responder, $p = 0,0004$ bzw. 1131 nmol/mg Kreatinin (710 – 1333 nmol/mg) versus 24 nmol/mg Kreatinin (9 – 50 nmol/mg) für die Low-Responder, $p = 0,0002$; siehe Abb. 99 oberes Box-Diagramm; für die Salicylsäure-Exkretion: 34 nmol/mg Kreatinin (7 – 95 nmol/mg) versus 0 nmol/mg Kreatinin (0 – 0 nmol/mg) für die High-Responder, $p = 0,0027$ bzw. 28 nmol/mg Kreatinin (0 – 94 nmol/mg) versus 0 nmol/mg Kreatinin (0 – 0 nmol/mg) für die Low-Responder, $p = 0,0173$; siehe Abb. 99 unteres Box-Diagramm). In Kapitel 3.3. wurde bereits erläutert, dass hinsichtlich der ASS-Metabolit-Exkretion zwischen der High-Responder- und der Low-Responder-Gruppe keine Unterschiede festzustellen waren; auch nach der weiteren Unterteilung der beiden Patientengruppen anhand des ASS-Einnahmezeitpunkts konnten keine Unterschiede ermittelt werden. (Die p-Werte sind in Abb. 99 eingezeichnet.)

Hervorzuheben ist, dass bei jedem High-Responder- und bei jedem Low-Responder-Patienten eine Salicylursäure-Exkretion ermittelt wurde, sofern ASS am Untersuchungstag eingenommen worden war (ersichtlich aus dem oberen Perzentil-Diagramm der Abb. 99). Hingegen konnte Salicylsäure nicht bei jedem dieser Patienten nachgewiesen werden ($n = 4$, siehe unteres Perzentil-Diagramm der Abb. 99). Jedoch war bei einer Vielzahl von Patienten, die ASS zuletzt am Vortag eingenommen hatten, weder eine Salicylsäure- noch eine Salicylursäure-Exkretion nachweisbar (siehe ebenfalls Abb. 99).

Zwei Patienten mit „Typ I-Resistenz“ hatten angegeben, ASS am Tag der Untersuchung eingenommen zu haben. Im Urin der beiden Patienten konnte aber keine Salicylursäure (und auch keine Salicylsäure) nachgewiesen werden (Patient 2 und 3 der Tab. 30). Ein weiterer Patient mit „Typ I-Resistenz“ berichtete, die Tablette das letzte Mal am Vortag eingenommen zu haben – bei diesem Patienten konnte jedoch eine geringe Menge Salicylursäure (siehe auch Kapitel 3.3.) in der Urinprobe identifiziert werden (Patient 1 der Tab. 30). Eingehendere

Untersuchungen zur Ursache der „Typ I-Resistenz“ in diesem Fall sind in Abschnitt 3.12.1. zu finden. Für den vierten „Typ I-resistenten“ Patienten fehlt leider die Angabe des ASS-Einnahmezeitpunkts. Bei diesem Patienten lag keine ASS-Metabolit-Exkretion vor (Patient 4 der Tab. 30).

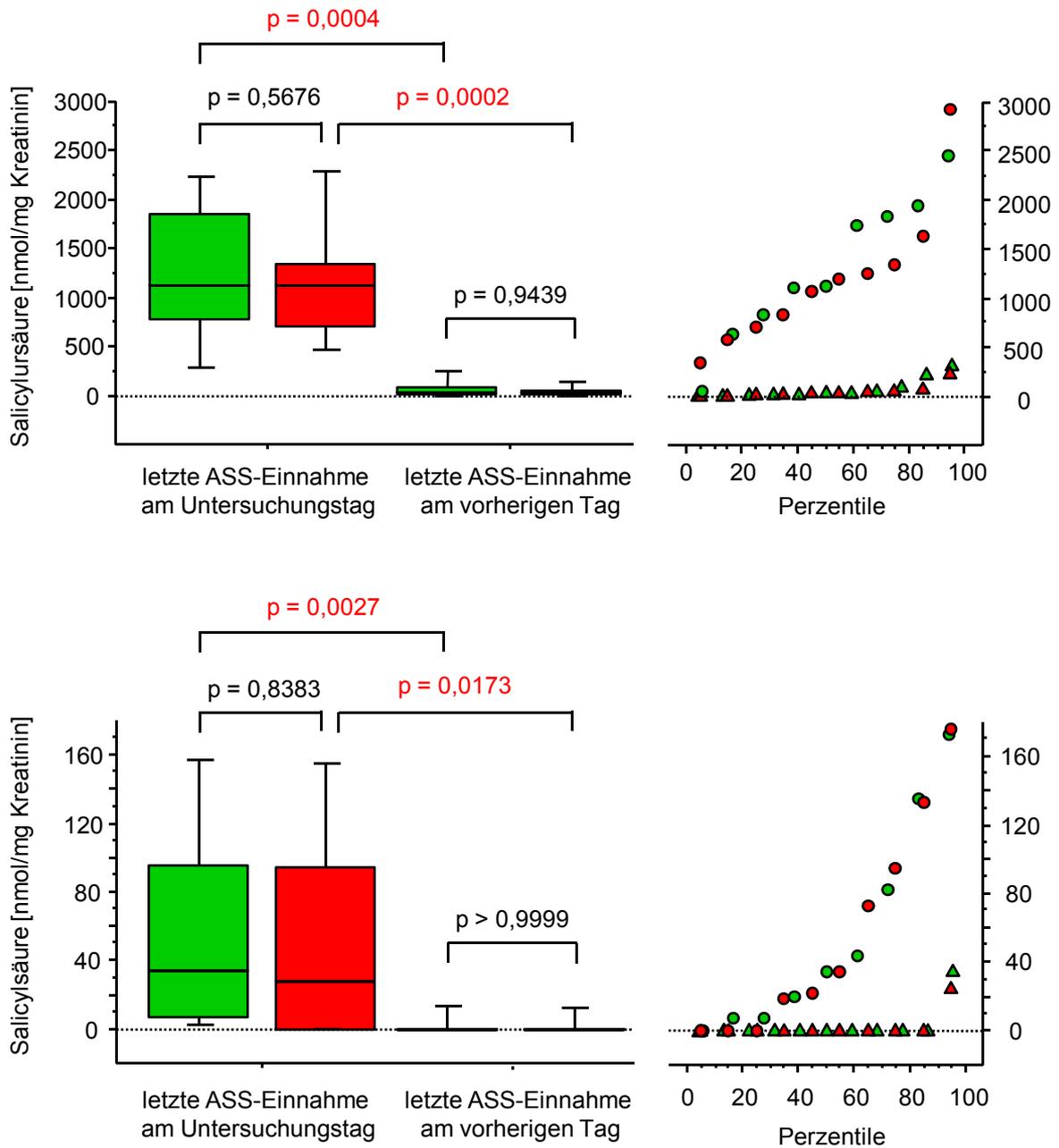


Abb. 99: Abhängigkeit der Exkretion der ASS-Metabolite vom ASS-Einnahmezeitpunkt. Die Konzentrationen der High-Responder sind in grün dargestellt, die der Low-Responder in rot. Die Kreise in den Perzentil-Diagrammen symbolisieren die Einnahme am Untersuchungstag, die Dreiecke die Einnahme am Tag zuvor.

Patient mit „Typ I-Resistenz“	Angabe des Patienten zur letzten ASS-Einnahme	Salicylursäure im Urin	Salicylsäure im Urin	Anmerkung
1	am Tag vor der Untersuchung	ja	nein	zusätzliche Einnahme von Ibuprofen
2	am Tag der Untersuchung	nein	nein	zusätzliche Einnahme von Esomeprazol
3	am Tag der Untersuchung	nein	nein	Einnahme von Aspirin® protect
4	keine Angabe	nein	nein	Patient wurde von der Studie „überrascht“.

Tab. 30: ASS-Metabolit-Exkretion der „Typ I-resistenten“ Patienten (n = 4). Neben der Angabe zum ASS-Einnahmezeitpunkt sind Besonderheiten aufgeführt, die im Zusammenhang mit einer „ASS-Resistenz“ vom Typ I evtl. von Bedeutung sein könnten (siehe Abschnitt 4.2.).

3.11. Einnahme des Original-Präparats oder Einnahme eines Generikums – Überprüfung der Thrombozytenaggregation

In diesem Kapitel werden die Patienten, die mit dem Original-Präparat Aspirin® bzw. Aspirin® protect behandelt wurden, mit denjenigen Patienten verglichen, die ein Generikum einnahmen. Von diesen Untersuchungen sind die „Typ I-resistenten“ Patienten (n = 4) ausgeschlossen. Wie bereits in Tab. 16 (Abschnitt 3.1.3.1.) für das gesamte Studienkollektiv aufgeführt, nahmen die meisten Patienten ein Generikum ein. Das ASS-Präparat der Firma Ratiopharm (HerzASS-ratiopharm®) wurde in etwa so häufig eingenommen (n = 16) wie Aspirin® (n = 14). Für alle anderen generischen ASS-Präparate (n = 96) erfolgte keine weitere Gruppeneinteilung, da die Gruppengrößen aufgrund der Vielzahl der verschiedenen Hersteller zu klein geworden wären.

Sowohl die Behandlung mit Aspirin® als auch die Behandlung mit HerzASS-ratiopharm® führte zu einer in gleichem Maße inhibierten thrombozytären TxB₂-Synthese (75 pg/ml (50 – 128 pg/ml) versus 54 pg/ml (48 – 81 pg/ml), p = 0,3823). Die COX-1-Vollblut-Aktivität der Aspirin®-einnehmenden Patienten betrug 2.951 pg/ml (1.314 – 5.900 pg/ml), die COX-1-Aktivität der mit HerzASS® behandelten Patientengruppe lag bei 964 pg/ml (552 – 2.803 pg/ml), p = 0,0742. Die leicht höhere COX-1-Aktivität der Aspirin®-Gruppe lässt sich dadurch erklären, dass sich beide Gruppen signifikant hinsichtlich des Einnahmezeitpunkts unterscheiden. Während von den mit Aspirin® behandelten Patienten lediglich 28,6% ihre Aspirin®-Tablette am Tag der Untersuchung eingenommen hatten, waren es bei den mit

HerzASS[®] behandelten Patienten zwei Drittel ($p = 0,0402$). Über den Zusammenhang zwischen COX-1-Aktivität und ASS-Einnahmezeitpunkt informiert Abschnitt 3.10.3.

Von den vierzehn Aspirin[®]-einnehmenden Patienten waren elf Patienten ASS-Responder (78,6%) und drei Patienten ASS-Low-Responder (21,4%). Von den Patienten, die HerzASS-ratiopharm[®] einnahmen, waren die Hälfte Responder, die andere Hälfte Low-Responder. Für diese Verhältnisse wurde kein signifikanter Unterschied berechnet ($p = 0,1052$). Werden allerdings für diese zwei Patientengruppen die Werte für die maximale Kollagen-induzierte Thrombozytenaggregation verglichen, so liegt der Median für die Patienten, die mit Aspirin[®] behandelt wurden, bei 29,3% (26,3 – 34,6%) und der Median für die mit HerzASS[®] behandelte Gruppe bei 37,3% (32,2 – 46,7%), $p = 0,0460$. Auch hinsichtlich der Aggregation, die mit Arachidonsäure oder ADP ausgelöst worden war, ergaben sich signifikante Unterschiede (für die AA-induzierte maximale Aggregation: 5,6% (4,6 – 8,0%) für die Patienten, die mit Aspirin[®] behandelt wurden, versus 8,6% (7,0 – 10,3%) für die Patienten, die mit HerzASS-ratiopharm[®] behandelt wurden, $p = 0,0460$; für die ADP-induzierte maximale Aggregation: 37,4% (30,3 – 38,8%) versus 50,9% (45,9 – 54,4%), $p = 0,0044$). Folgende Punkte müssen im Zusammenhang mit diesen Ergebnissen beachtet werden:

- Das mittlere Alter der Aspirin[®]-einnehmenden Patientengruppe ($n = 14$) lag bei 67 ± 7 Jahren, das der HerzASS[®]-Gruppe ($n = 16$) bei 71 ± 6 Jahren, $p = 0,1292$. In der Aspirin[®]-Gruppe waren lediglich zwei Patienten unter 60, in der HerzASS[®]-Gruppe nur ein Patient ($p = 0,4642$). In Abschnitt 3.7.1. wurde über den Zusammenhang zwischen der Aggregation und dem Alter berichtet.
- Während in der Aspirin[®]-Gruppe 64,3% der Patienten ($n = 9$) von einer Hypercholesterinämie betroffen waren, waren es in der HerzASS[®]-Gruppe 87,5% ($n = 14$), $p = 0,1337$. Mit Untersuchungen zur Hypercholesterinämie und „ASS-Resistenz“ beschäftigt sich Abschnitt 3.7.2.

Beim Vergleich der relativ kleinen Patienten-Gruppe, die mit dem ASS-Original-Präparat behandelt wurde ($n = 14$), mit der sehr großen Gruppe aller Patienten, die ein Generikum einnahmen ($n = 112$), konnten hinsichtlich der Thrombozytenaggregation keine Unterschiede errechnet werden.

3.12. Untersuchungen zum Einfluss der weiteren Medikation auf die ASS-Response

Von den vom Studienkollektiv eingenommenen Medikamenten konnte für keines ein Zusammenhang zu einer „ASS-Resistenz“ vom Typ III hergestellt werden (siehe Tab. 31).

	High-Responder	Responder (High- und Medium-Responder)	Low-Responder	p ₁ -Wert	p ₂ -Wert
	n = 42	n = 84	n = 42	High-Responder vs. Low-Responder	Responder vs. Low-Responder
Statin, n (%)	30 (71,4)	62 (73,8)	37 (88,1)	0,0573	0,0654
β-Blocker, n (%)	28 (66,7)	61 (72,6)	31 (73,8)	0,4740	0,8871
Diuretikum, n (%)	14 (33,3)	26 (31,0)	14 (33,3)	0,9376	0,8202
ACE-Inhibitor, n (%)	17 (40,5)	38 (45,2)	20 (47,6)	0,5097	0,8004
ATII-Rezeptor-Antagonist, n (%)	7 (16,7)	11 (13,1)	5 (11,9)	0,5329	0,8499
Nitrovasodilatator, n (%)	10 (23,8)	17 (20,2)	9 (21,4)	0,7942	0,8763
Calciumkanalblocker, n (%)	6 (14,3)	13 (15,5)	7 (16,7)	0,7629	0,8631
Insulin/orales Antidiabetikum, n (%)	3 (7,1)	6 (7,1)	7 (16,7)	0,1778	0,0976

Tab. 31: Begleitmedikation der ASS-Responder bzw. High-Responder und ASS-Low-Responder im Vergleich (n = 126). Die Patienten mit einer „ASS-Resistenz“ vom Typ I sind von dieser Analyse ausgeschlossen.

Auch die tägliche Einnahme von Antioxidantien (siehe Abschnitt 3.1.3.4.) hatte keinen Einfluss auf die antiaggregatorische Wirksamkeit von ASS. Es hatten 19% (n = 16) der ASS-Responder-Patienten bzw. 19% der High-Responder-Patienten (n = 8) angegeben, regelmäßig täglich mindestens ein antioxidativ wirkendes Nahrungsergänzungsmittel einzunehmen, in der ASS-Low-Responder-Gruppe waren es ebenfalls 19% (n = 8).

3.12.1. Gleichzeitige Einnahme von ASS und Ibuprofen – Ursache einer „ASS-Resistenz“ vom Typ I

Wie bereits detailliert in Abschnitt 3.1.3.3. beschrieben, hatten einige der Patienten, neben ihrer ASS-Einnahme, ein nichtsteroidales Antiphlogistikum mindestens einmal innerhalb der Woche vor der Untersuchung eingenommen. Bis auf einen Fall konnte kein Zusammenhang

zwischen Thrombozytenaggregation und NSAID-Einnahme festgestellt werden. Bei diesem einen Patienten stellte sich jedoch eine eindeutige Interaktion zwischen ASS und Ibuprofen heraus. Er hatte beide Tabletten einen Tag vor der Untersuchung zusammen eingenommen. Am Untersuchungstag selbst hatte er bis zur Blutentnahme bzw. Urinabgabe weder die ASS- noch die Ibuprofen-Einnahme wiederholt. Bei der Bestimmung der Thrombozytenaggregation, welche mit 1 mg/l Kollagen induziert wurde, ergab sich für die maximale Aggregation ein Wert von 66,4%, der durch den Zusatz von ASS in vitro auf 33,6% reduziert werden konnte. Die Original-Aggregationskurven zeigt Abb. 100. (Hierzu sei angemerkt, dass die aus der Abbildung ablesbaren maximalen Aggregationswerte niedriger liegen als die im Text erwähnten. Ursache hierfür ist die Korrektur der Original-Werte durch einen Faktor, bedingt durch den Einsatz zweier unterschiedlicher Kollagen-Chargen im Laufe der Studie (siehe auch Abschnitt 2.3.2.).)

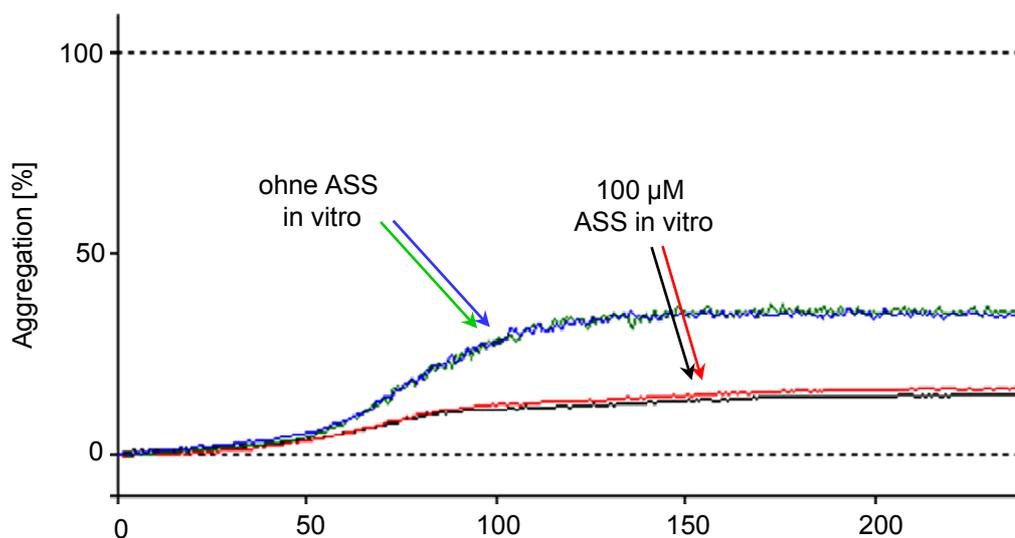


Abb. 100: Aggregationskurven eines Patienten, der einen Tag vor der Untersuchung seine ASS 100mg-Tablette zusammen mit einer Ibuprofen-Tablette (600 mg) eingenommen hatte. Die Thrombozytenaggregation, ausgelöst mit 1 mg/l Kollagen, konnte durch den Zusatz von 100 µM ASS in vitro deutlich reduziert werden. Erläuterungen zu den jeweils bestimmten Werten für die maximale Aggregation sind im Text dieses Abschnitts zu finden.

Außerdem wurde bei der Untersuchung der Kollagen-induzierten Thromboxan-Synthese festgestellt, dass in Abwesenheit von ASS in vitro eine TxB_2 -Konzentration von 2.022 pg pro ml Aggregationsüberstand vorherrschte, die sich in Anwesenheit von ASS in vitro auf 50 pg/ml verringern ließ. Bei diesem Patienten lag somit eine „ASS-Resistenz“ vom Typ I vor (zur Identifizierung einer „Typ I-Resistenz“ siehe Kapitel 3.2. Abschnitt 3.2.1.).

Die mit 1 mmol/l Arachidonsäure ausgelöste maximale Thrombozytenaggregation lag für diesen Patienten bei 7,9%.

Der Patient hatte sehr glaubhaft versichert, seine ASS-Tabletten regelmäßig täglich eingenommen zu haben. Darüberhinaus wurde bei der Überprüfung der ASS-Metabolit-Exkretion Salicylursäure im Urin nachgewiesen (siehe auch Kapitel 3.10. Abschnitt 3.10.5. sowie Tab. 30 „Patient 1“). Demnach kann für die „ASS-Resistenz“ vom Typ I dieses Patienten keine mangelnde Einnahmetreue ursächlich sein, sondern eine Interaktion der gleichzeitig eingenommenen ASS- und Ibuprofen-Tablette.

3.13. Allgemeine Laborparameter im Zusammenhang mit einer „ASS-Resistenz“

Dieses Kapitel beschäftigt sich mit der Analyse möglicher Zusammenhänge zwischen einer „ASS-Resistenz“ vom Typ III und den im Studienkollektiv bestimmten allgemeinen Laborparametern (siehe auch Kapitel 3.1. Abschnitt 3.1.4.).

Hierzu werden als erstes die Ergebnisse des kleinen Blutbildes betrachtet. Es wird die Low-Responder-Gruppe zum einen mit der High-Responder- und zum anderen mit der Responder-Gruppe (High- und Medium-Responder zusammengefasst) verglichen. Wie aus Tab. 32 hervorgeht, wurde für die Anzahl der Erythrozyten, für die Hämoglobin-Konzentration und für die Anzahl der Thrombozyten ein Zusammenhang mit einer ASS-Low-Response errechnet.

Für die Low-Responder-Gruppe zeigte sich im Vergleich zu der Responder-Gruppe (jedoch nicht im Vergleich zur High-Responder-Gruppe) eine leicht niedrigere Erythrozytenzahl bzw. Hämoglobin-Konzentration (siehe auch Abb. 101 linkes bzw. mittleres Perzentil-Diagramm). Eine Korrelation dieser beiden Parameter zur ermittelten Thrombozytenaggregation lag aber nicht vor (für die Kollagen-induzierte maximale Aggregation und Erythrozytenzahl: $\rho = -0,056$, $p = 0,5322$; siehe Abb. 102 rechtes Diagramm; für die Kollagen-induzierte maximale Aggregation und die Hämoglobin-Konzentration: $\rho = -0,073$, $p = 0,4160$; graphisch nicht dargestellt).

	High-Responder n = 42	Responder (High- und Medium-Responder) n = 84	Low-Responder n = 42	p ₁ -Wert	p ₂ -Wert
				High-Responder vs. Low-Responder	Responder vs. Low-Responder
Erythrozyten, Anzahl/pl	4,7 ± 0,3	4,8 ± 0,4	4,6 ± 0,5	0,1325	0,0248
hypochrome Erythrozyten, %	0,6 ± 2,2	0,5 ± 1,6	0,4 ± 0,4	0,4351	0,5932
Hämoglobin, g/dl	14,6 ± 1,1	14,8 ± 1,2	14,3 ± 1,3	0,2338	0,0261
Hämatokrit, Vol%	42,2 ± 3,2	42,8 ± 3,4	41,7 ± 3,3	0,4273	0,0848
MCV, fl	89,8 ± 4,6	90,2 ± 4,4	90,9 ± 4,6	0,2916	0,4203
MCH, pg	31,0 ± 1,7	31,2 ± 1,6	31,1 ± 1,5	0,8052	0,7907
MCHC, g/dl	34,6 ± 1,4	34,6 ± 1,3	34,3 ± 1,4	0,3105	0,1790
Thrombozyten, Anzahl/nl	259 ± 63	246 ± 60	219 ± 56	0,0028	0,0140
Leukozyten, Anzahl/nl	6,4 ± 1,6	6,4 ± 1,4	6,2 ± 1,5	0,5229	0,3747

Tab. 32: Kleines Blutbild des Studienkollektivs, unterteilt in ASS-High-Responder, ASS-Responder (High- und Medium-Responder) und ASS-Low-Responder. Die Werte sind als Mittelwert mit Standardabweichung angegeben.

Für die Thrombozytenzahl waren die Unterschiede stärker ausgeprägt. So konnte für diesen Parameter nicht nur ein Unterschied zwischen der Low-Responder- und der Responder-Gruppe gefunden werden, sondern auch zwischen der Low- und High-Responder-Gruppe. Wie aus Tab. 32 ersichtlich, wiesen die (High-)Responder signifikant höhere Thrombozytenzahlen auf als die Low-Responder (siehe auch Abb. 101 rechtes Perzentil-Diagramm).

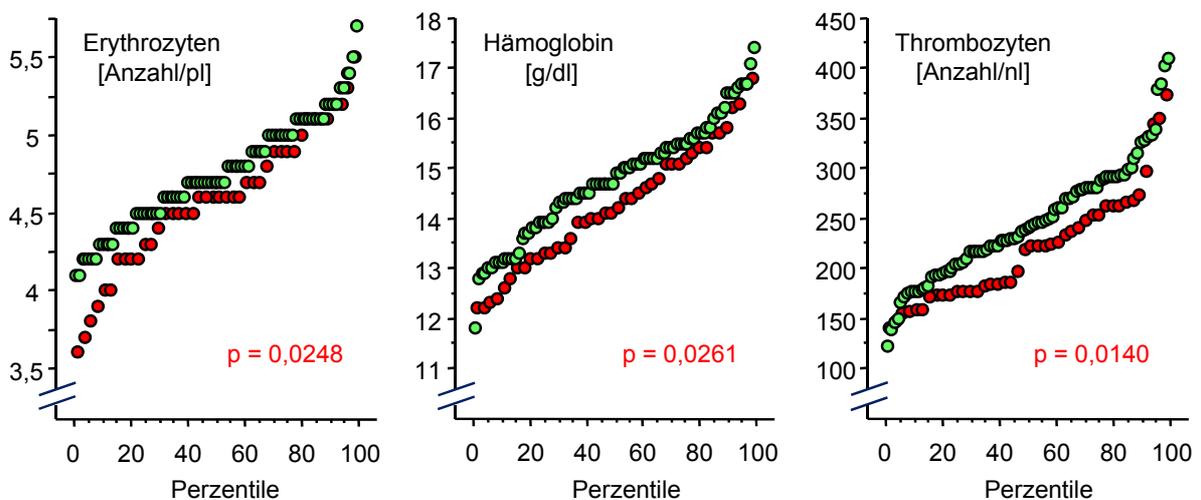


Abb. 101: Perzentil-Diagramme zur Erythrozytenzahl, zur Hämoglobin-Konzentration und zur Thrombozytenzahl der ASS-Responder-Patienten (●, n = 84) und der ASS-Low-Responder-Patienten (●, n = 42)

Darüberhinaus bestand eine inverse Korrelation zwischen der Thrombozytenzahl und der ermittelten Thrombozytenaggregation (für die Kollagen-induzierte maximale Aggregation: $\rho = -0,290$, $p = 0,0013$; siehe Abb. 102 linkes Diagramm; für die Arachidonsäure-induzierte maximale Aggregation: $\rho = -0,355$, $p < 0,0001$; graphisch nicht dargestellt; für die ADP-induzierte maximale Aggregation: $\rho = -0,347$, $p = 0,0032$; graphisch nicht dargestellt).

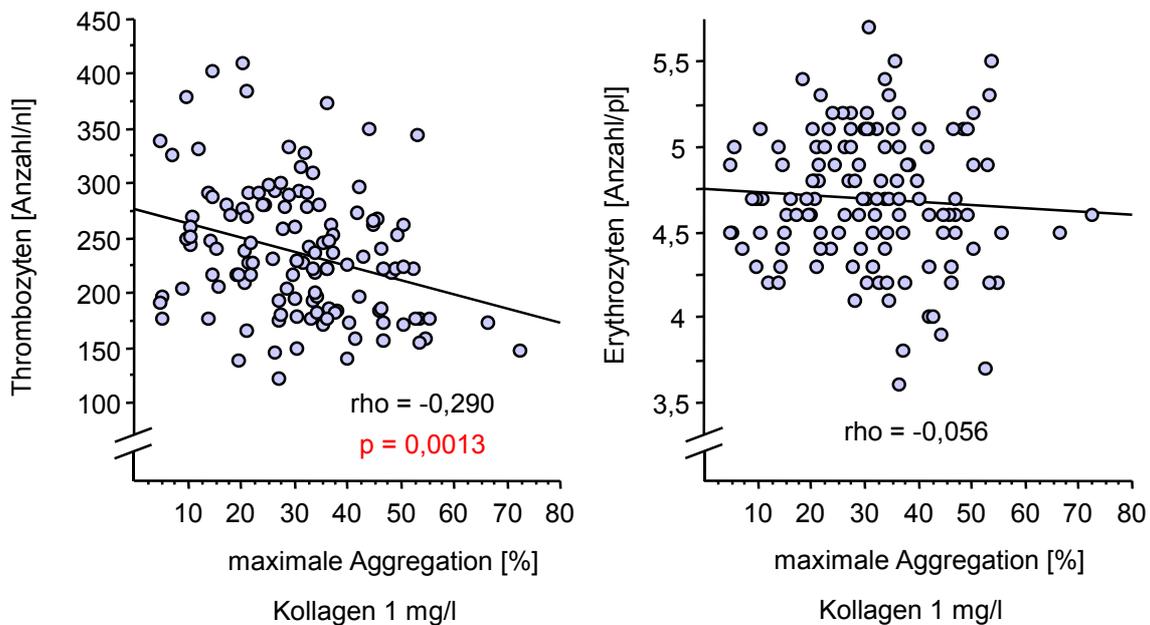


Abb. 102: Regressionsdiagramme zur Aggregation (induziert mit 1 mg/l Kollagen) und Thrombozytenzahl bzw. Erythrozytenzahl. Die „Typ I-resistenten“ Patienten wurden von dieser Analyse ausgeschlossen.

Für keinen der untersuchten klinisch-chemischen Laborparameter ergab sich eine Verknüpfung zu einer verminderten ASS-Antwort. Das bedeutet im Einzelnen, dass eine im Studienkollektiv identifizierte „ASS-Resistenz“ vom Typ III unabhängig sowohl vom Gesamt-Cholesterin, vom HDL- und LDL-Cholesterin, von den Triglyceriden, der Blutglucose als auch vom CRP-Wert, vom Serum-Kreatinin und von der Harnsäure-Konzentration vorlag. In Tab. 33 sind die Ergebnisse für die (High-)Responder- und Low-Responder-Patienten gegenübergestellt.

Das Ergebnis der CRP-Wert-Bestimmung sei durch folgende Analyse ergänzt:

Wie in Kapitel 3.1. Abschnitt 3.1.4. beschrieben, wiesen elf Patienten (bzw. zehn nach Ausschließen der „Typ I-resistenten“ Patienten) eine CRP-Konzentration auf, die außerhalb des Normbereiches lag ($\geq 5,0$ mg/l). Für diese Patientengruppe ergab sich hinsichtlich der Thrombozytenaggregation kein Unterschied im Vergleich zu den Patienten, bei denen der

CRP-Wert im Normbereich lag ($n = 112$). Zum Beispiel wurden für die mediane maximale Kollagen-induzierte Aggregation folgende Werte ermittelt: 33,3% (26,3 – 50,5%) für die Patientengruppe mit erhöhtem CRP versus 30,8% (21,2 – 40,1%) für die Patienten mit einem CRP-Wert im Normalbereich, $p = 0,2529$. Abb. 103 zeigt das dazugehörige Box-Diagramm sowie die Einzelwerte in Form eines Perzentil-Diagramms.

In Abschnitt 3.1.4. wurde das Studienkollektiv zusätzlich in mehrere Gruppen anhand der unterschiedlichen CRP-Konzentrationen innerhalb des Normbereiches eingeteilt (Abb. 47). Aber auch diese Gruppen verhielten sich hinsichtlich der Thrombozytenaggregation gleich. Eine Korrelation zwischen CRP und Aggregation wurde nicht beobachtet (z.B. für die max. Kollagen-induzierte Aggregation: $\rho = 0,087$, $p = 0,3367$; graphisch nicht dargestellt).

	High-Responder n = 42	Responder (High- und Medium-Responder) n = 84	Low-Responder n = 42	p ₁ -Wert	p ₂ -Wert
				High-Responder vs. Low-Responder	Responder vs. Low-Responder
Gesamt-Cholesterin, mg/dl	184 ± 39	183 ± 37	173 ± 29	0,1249	0,1324
HDL-Cholesterin, mg/dl	53 ± 14	54 ± 15	55 ± 12	0,5234	0,7285
Risikofaktor Cholesterin/HDL	3,6 ± 0,8	3,6 ± 0,9	3,3 ± 0,9	0,1436	0,1479
LDL-Cholesterin, mg/dl	104 ± 32	104 ± 33	98 ± 26	0,3386	0,3078
LDL/HDL	2,1 ± 0,7	2,1 ± 0,8	1,9 ± 0,8	0,3634	0,3150
Triglyceride, mg/dl	129 ± 64	121 ± 65	107 ± 62	0,1107	0,2294
Glucose im Serum, mg/dl*	101 ± 21	101 ± 20	97 ± 17	0,5779	0,4474
CRP (supersensitiv), mg/l**	1,0 (0,7 – 2,7)	1,2 (0,7 – 2,7)	1,1 (0,7 – 1,8)	0,8132	0,8652
Kreatinin im Serum, mg/dl	1,0 ± 0,2	0,9 ± 0,2	1,0 ± 0,2	0,5612	0,4053
Harnsäure, mg/dl	5,9 ± 1,5	6,0 ± 1,4	6,0 ± 1,1	0,8664	0,9240

Tab. 33: Klinisch-chemische Laborparameter des Studienkollektivs unter Ausschluss der „Typ I-resistenten“ Patienten, unterteilt in ASS-High-Responder, ASS-Responder (High- und Medium-Responder) und ASS-Low-Responder. Die Werte sind (mit Ausnahme des CRP) als Mittelwert mit Standardabweichung angegeben. *Die Blutzucker-Konzentrationen beziehen sich nur auf $n = 17$ High-Responder, $n = 35$ Responder und $n = 27$ Low-Responder. **Für das CRP wurde der Median mit Interquartilenabstand berechnet.

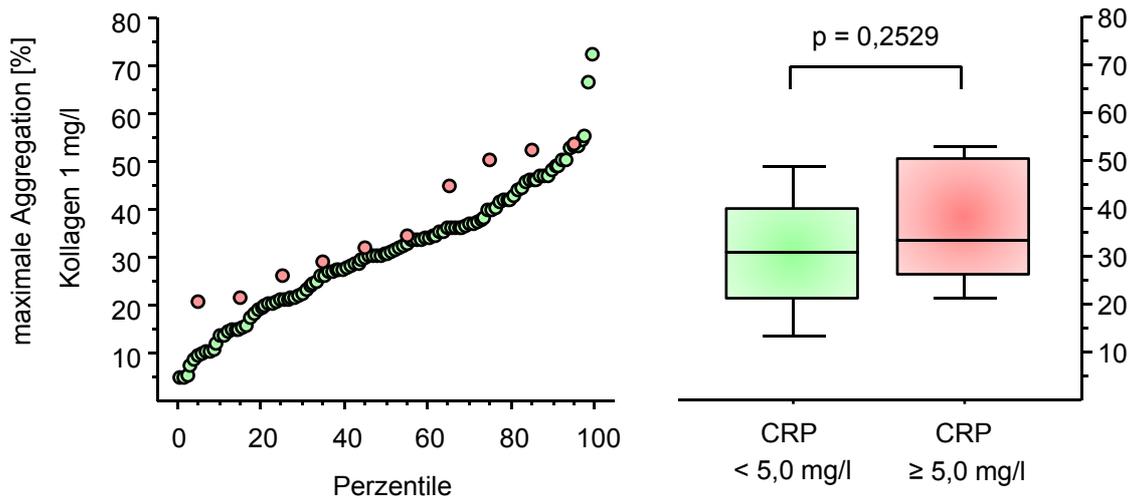


Abb. 103: Vergleich der maximalen Kollagen-induzierten Thrombozytenaggregation zwischen Patienten mit einer CRP-Konzentration außerhalb des Normbereichs, d.h. $\geq 5,0$ mg/l ($n = 10$, ●) und Patienten, bei denen der CRP-Wert im Normbereich lag ($n = 112$, ●)

Auch der Blutdruck (sowohl der systolische als auch der diastolische) stand in keinem Zusammenhang zu einer ASS-Low-Response. Tab. 34 vergleicht die Werte für die (High-)Responder und Low-Responder. Auch bei Betrachtung der Patienten, für die am Untersuchungstag ein systolischer Blutdruck von über 140 mmHg gemessen wurde, zeigte sich keine Verbindung zu einer verstärkten Thrombozytenaggregation ($p = 0,6294$). Ebenfalls stand die Thrombozytenaggregation in keinem Zusammenhang zu einem diastolischen Blutdruck von über 90 mmHg ($p = 0,3500$).

	High-Responder n = 42	Responder (High- und Medium-Responder) n = 84	Low-Responder n = 42	p ₁ -Wert	p ₂ -Wert
				High-Responder vs. Low-Responder	Responder vs. Low-Responder
systolischer Blutdruck, mmHg	140 ± 22	140 ± 20	140 ± 16	0,9594	0,8443
diastolischer Blutdruck, mmHg	84 ± 10	84 ± 10	81 ± 10	0,2062	0,0862
Herzfrequenz, 1/min	65 ± 8	65 ± 9	65 ± 8	0,9738	0,8553

Tab. 34: Blutdruck und Herzfrequenz des Studienkollektivs, unterteilt in ASS-High-Responder, ASS-Responder und ASS-Low-Responder. Die Patienten mit einer „ASS-Resistenz“ vom Typ I sind von dieser Analyse ausgeschlossen. Die Werte sind als Mittelwert mit Standardabweichung angegeben.

3.14 Impfung und „ASS-Resistenz“

In diesem Kapitel wird untersucht, inwieweit das Vorliegen einer „ASS-Resistenz“ mit einer Impfung, die innerhalb der letzten drei Monate vor der Aggregationsbestimmung durchgeführt worden war, in Zusammenhang gebracht werden kann. Von den Analysen sind alle Patienten mit einer „Typ I-Resistenz“ ausgeschlossen.

Eine Subgruppe von 74 Patienten wurde am Untersuchungstag gefragt, wie lange die letzte Impfung zurücklag, und um welche Impfung es sich handelte. Dabei gab ein Drittel der Befragten ($n = 25$) an, dass sie innerhalb der letzten drei Monate mindestens einmal geimpft worden waren. Bei zwei Drittel der Patienten ($n = 49$) lag die letzte Impfung länger als drei Monate zurück. Eine detaillierte Auflistung der vergangenen Zeiträume seit der letzten Impfung und der dazugehörigen Patientenzahlen liefert Tab. 35.

Zeitraum seit der letzten Impfung	n (%)
≥ 3 Tage ≤ 1 Woche	2 (2,7)
> 1 Woche ≤ 2 Wochen	4 (5,4)
> 2 Wochen ≤ 1 Monat	2 (2,7)
> 1 Monat ≤ 2 Monate	6 (8,1)
> 2 Monate ≤ 3 Monate	11 (14,9)
> 3 Monate	49 (66,2)

Tab. 35: Seit der letzten Impfung vergangene Zeit für insgesamt 74 befragte Patienten

Bei der Impfung handelte es sich in der Mehrzahl der Fälle ($n = 21$) um eine Gripeschutzimpfung. Zwei Patienten waren eine Woche bzw. fünf Wochen vor ihrem Untersuchungstermin gegen Pneumokokken geimpft worden, ein weiterer Patient zwei Wochen zuvor gegen Hepatitis A, und ein Patient hatte einen Monat zuvor eine Tetanus/Diphtherie-Impfung erhalten.

Zunächst wurde untersucht, ob eine Abhängigkeit zwischen der seit der letzten Impfung vergangenen Zeit und der Thrombozytenaggregation bestand. Hierzu zeigt Abb. 104 jeweils die maximale Kollagen-induzierte Aggregation für die in Tab. 35 gebildeten Gruppen auf. Der Median für die Patientengruppe, die ihre letzte Impfung nur wenige Tage vor der

Aggregationsbestimmung erhalten hatte, lag bei 43,5% (34 – 53%), der Median für z.B. die Patienten, die nicht innerhalb der letzten drei Monate geimpft worden waren, bei 31,6% (22,3 – 38,0%). Es wurde weder zwischen diesen beiden Gruppen ein signifikanter Unterschied berechnet ($p = 0,1667$) noch zwischen allen anderen Gruppen. Gleiches galt auch für die Thrombozytenaggregation, die mit Arachidonsäure bzw. ADP ausgelöst worden war (graphisch nicht dargestellt).

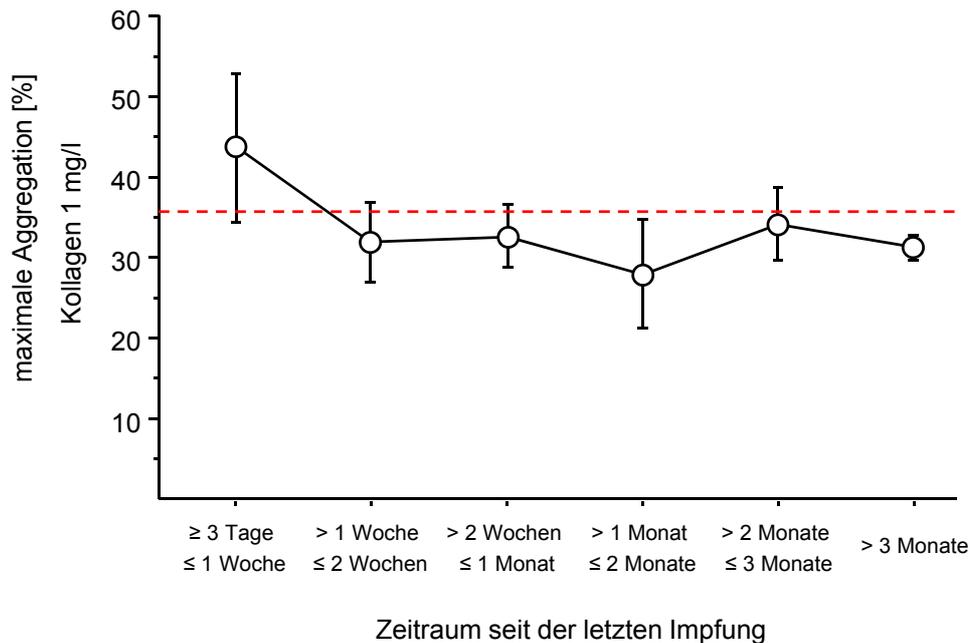


Abb. 104: Maximale Kollagen-induzierte Thrombozytenaggregation in Abhängigkeit von der seit der letzten Impfung vergangenen Zeit. Die jeweiligen Patientenzahlen (n) sind der Tab. 35 zu entnehmen. Die Werte sind als Mittelwert \pm Standardfehler angegeben. Der maximale Aggregationswert von 36,3% beschreibt die Grenze zwischen ASS-Response und ASS-Low-Response (als rote gestrichelte Linie eingezeichnet).

Darüberhinaus wurde überprüft, ob es von Bedeutung war, gegen welche Infektionskrankheit die Impfung gerichtet war. Bei dieser Analyse wurde festgestellt, dass alle vier bereits erwähnten Patienten, die gegen Pneumokokken, Hepatitis A oder Tetanus/Diphtherie geimpft worden waren, der ASS-Low-Responder-Gruppe angehören. Werden zum Vergleich die Patienten betrachtet, die innerhalb der letzten drei Monate vor der Aggregationsbestimmung nicht geimpft worden waren (weder gegen Grippe noch gegen irgendeine sonstige Infektionskrankheit, $n = 49$), so ist anhand der Kontingenztafel (Tab. 36 obere Tafel) zu erkennen, dass von diesen Patienten lediglich 32,7% ($n = 16$) der Low-Responder-Gruppe zuzurechnen sind. Für diese Beziehung wurde ein p -Wert von 0,0075 errechnet.

Beim Vergleich mit den innerhalb der letzten drei Monate vor der Untersuchung gegen Grippe geimpften Patienten (n = 21) ergab sich, dass ebenfalls die zuvor gegen Pneumokokken, Hepatitis A oder Tetanus/Diphtherie geimpften Patienten signifikant häufiger zur Low-Responder-Gruppe gehören ($p = 0,0231$, Tab. 36 mittlere Tafel). Lediglich 38,1% (n = 8) der gegen Grippe geimpften Patienten sind ASS-Low-Responder.

Durch Zusammenfassen der kurz zuvor gegen Grippe geimpften Patienten und der kurz zuvor nichtgeimpften Patienten zu einer Gruppe von 70 Patienten, die drei Monate vor der Untersuchung weder eine Pneumokokken- noch eine Hepatitis A- oder Tetanus-/Diphtherie-Impfung erhalten hatten, blieben die Verhältnisse signifikant, wie aus der unteren Kontingenztafel der Tab. 36 deutlich wird ($p = 0,0084$).

$p = 0,0075$	Impfung gegen Pneumokokken, Hepatitis A oder Tetanus/Diphtherie	keine Impfung innerhalb der letzten 3 Monate	Σ
Responder	0	33	33
Low-Responder	4	16	20
Σ	4	49	53

$p = 0,0231$	Impfung gegen Pneumokokken, Hepatitis A oder Tetanus/Diphtherie	Impfung gegen Grippe	Σ
Responder	0	13	13
Low-Responder	4	8	12
Σ	4	21	25

$p = 0,0084$	Impfung gegen Pneumokokken, Hepatitis A oder Tetanus/Diphtherie	keine Impfung gegen Pneumokokken, Hepatitis A oder Tetanus/Diphtherie	Σ
Responder	0	46	46
Low-Responder	4	24	28
Σ	4	70	74

Tab. 36: Kontingenztafeln zur ASS-Response und Impfung. Die Zahlenwerte beschreiben jeweils die Patientenzahl n.

Hinsichtlich der Thrombozytenaggregation wurden folgende Ergebnisse festgestellt:

- Die Patienten, die innerhalb der letzten drei Monate vor der Aggregationsbestimmung gegen Pneumokokken, Hepatitis A oder Tetanus/Diphtherie geimpft worden waren, wiesen eine signifikant höhere maximale Kollagen-induzierte Thrombozytenaggregation auf im Vergleich zu denjenigen Patienten, die in den vergangenen drei Monaten vor Untersuchungsbeginn keine Impfung (weder gegen Grippe noch gegen irgendeine andere Infektionskrankheit) erhalten hatten (n = 49): 46,7% (39,7 – 51,7%) versus 31,6% (22,3 – 38,0%), p = 0,0140, siehe Abb. 105.
- Beim Vergleich dieser vier gegen Pneumokokken, Hepatitis A oder Tetanus/Diphtherie geimpften Patienten mit den 21 gegen Grippe geimpften Patienten ergab sich für die maximale Kollagen-induzierte Thrombozytenaggregation ebenfalls ein signifikanter Unterschied (46,7% (39,7 – 51,7%) versus 30,6% (21,0 – 40,7%), p = 0,0379, siehe Abb. 105).
- Auch wenn die gegen Grippe geimpfte Gruppe mit der nichtgeimpften Gruppe zusammengefasst wurde, blieb der Unterschied für die maximale Kollagen-induzierte Thrombozytenaggregation mit p = 0,0158 signifikant.

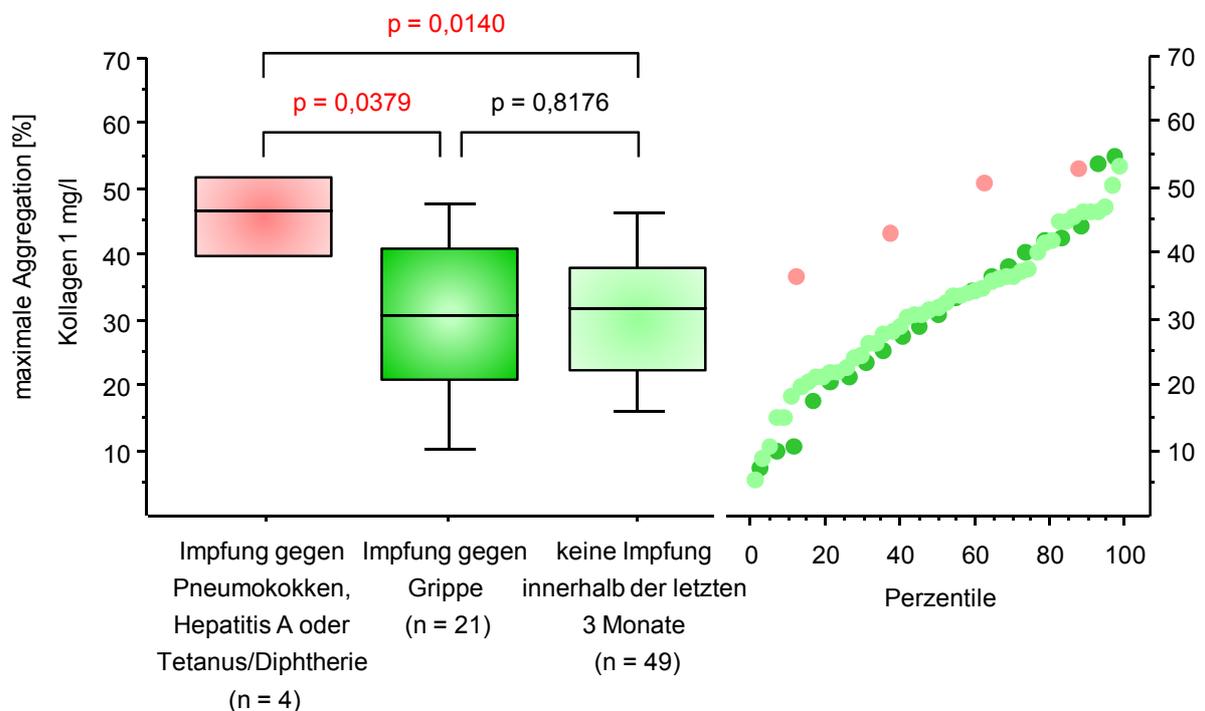


Abb. 105: Maximale Kollagen-induzierte Thrombozytenaggregation der innerhalb der letzten drei Monate vor der Aggregationsbestimmung gegen Pneumokokken, Hepatitis A oder Tetanus/Diphtherie geimpften Patienten (●), der im gleichen Zeitraum gegen Grippe geimpften Patienten (●) und der Patienten, die in diesem Zeitraum keine Impfung erhalten hatten (●)

- Aus Abb. 105 ist ebenfalls ersichtlich, dass es für die Kollagen-induzierte Thrombozytenaggregation unerheblich war, ob innerhalb der vergangenen drei Monate vor Untersuchungsbeginn eine Gripeschutzimpfung vorgenommen worden war oder keine Impfung ($p = 0,8176$).
- Bei der Überprüfung der Thrombozytenaggregation mit verschiedenen Kollagen-Konzentrationen wurde für die gegen Pneumokokken, Hepatitis A oder Tetanus/Diphtherie geimpften Patienten ein EC_{50} -Wert von 0,10 mg/l Kollagen ermittelt, für die Patienten, die innerhalb der letzten drei Monate nicht geimpft worden waren, ein Wert von 1,33 mg/l Kollagen und für die gegen Grippe geimpften Patienten ein Wert von 1,49 mg/l. Die entsprechenden Konzentrations-Wirkungskurven sind in Abb. 106 dargestellt. Es wurde allerdings zwischen keiner dieser Kurven ein signifikanter Unterschied berechnet (für den Vergleich zwischen der gegen Pneumokokken, Hepatitis A oder Tetanus/Diphtherie geimpften Gruppe mit der nichtgeimpften Gruppe $p = 0,1059$ bzw. mit der gegen Grippe geimpften Gruppe $p = 0,0929$).

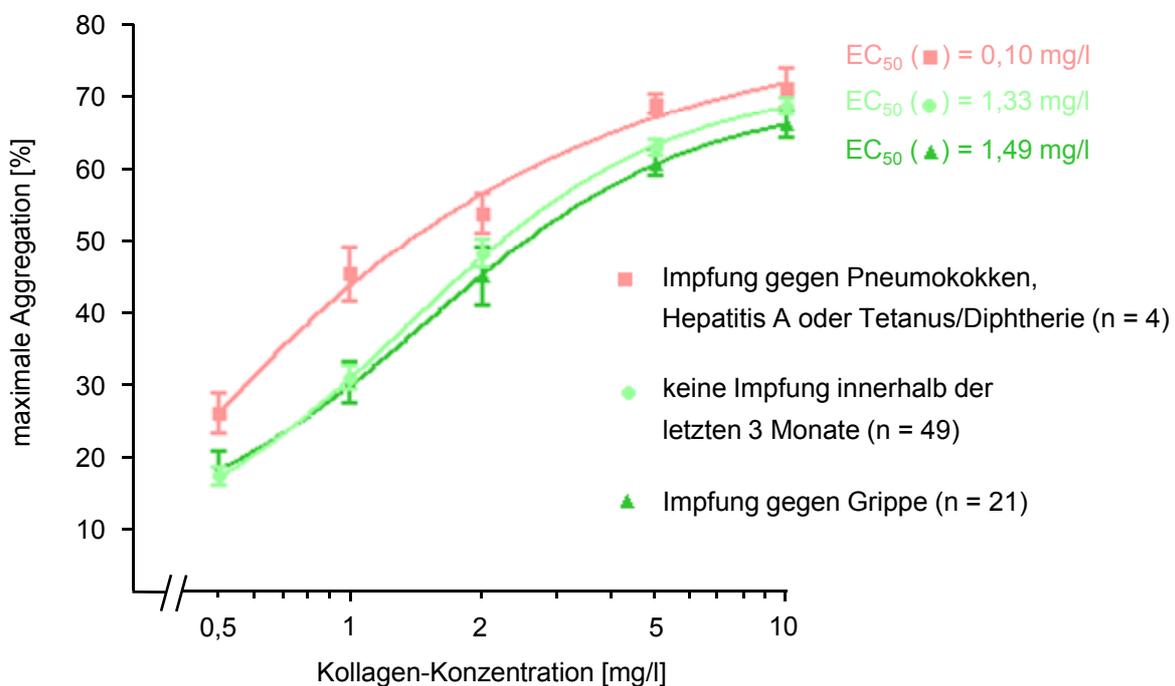


Abb. 106: Thrombozytenaggregation der innerhalb der letzten drei Monate vor der Aggregationsbestimmung gegen Pneumokokken, Hepatitis A oder Tetanus/Diphtherie geimpften Patienten, der im gleichen Zeitraum gegen Grippe geimpften Patienten und der Patienten, die in diesem Zeitraum keine Impfung erhalten hatten, ausgelöst mit verschiedenen Kollagen-Konzentrationen. Die Werte für die maximale Aggregation sind als Mittelwerte mit Standardfehler angegeben.

- Für die Thrombozytenaggregation, die mit Arachidonsäure bzw. ADP ausgelöst wurde, spielte es keine Rolle, ob innerhalb der drei Monate vor der Untersuchung eine Impfung, ganz gleich gegen welche Infektionskrankheit, durchgeführt worden war oder nicht.

Einige ausgewählte Parameter, die bereits in den vorangegangenen Kapiteln im Zusammenhang mit einer „ASS-Resistenz“ untersucht worden sind, stellt Tab. 37 für die in diesem Kapitel gebildeten Gruppen zusammen.

	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3	Gruppe 4	Gruppe 5
	Impfung innerhalb der letzten Woche vor der Untersuchung	Impfung gegen Pneumokokken, Hepatitis A oder Tetanus/ Diphtherie	Impfung gegen Grippe	keine Impfung innerhalb der letzten drei Monate	keine Impfung gegen Pneumokokken, Hepatitis A oder Tetanus/ Diphtherie
	n = 2	n = 4	n = 21	n = 49	n = 70
Alter, Jahre	73 ± 9	71 ± 7	67 ± 6	68 ± 8	68 ± 7
Alter ≥ 60, n (%)	2 (100,0)	4 (100,0)	19 (90,5)	45 (91,8)	64 (91,4)
Hypercholesterinämie, n (%)	1 (50,0)	4 (100,0)	17 (81,0)	38 (77,6)	55 (78,6)
ASS-Behandlungsdauer, Jahre	9,5 (5 – 14)	15 (7,75 – 17,5)	10 (5 – 13)	6 (2 – 12)	7 (3 – 12)
Erythrozyten, Anzahl/pl	4,8 ± 0,1	4,8 ± 0,6	4,7 ± 0,4	4,7 ± 0,4	4,7 ± 0,4
Hämoglobin, g/dl	14,9 ± 0,3	14,9 ± 1,8	14,4 ± 1,4	14,7 ± 1,2	14,6 ± 1,2
Thrombozyten, Anzahl/nl	186 ± 14	207 ± 39	241 ± 67	245 ± 65	244 ± 66
CRP (supersensitiv), mg/l	2,2 (1,4 – 3,0)	1,1 (0,8 – 1,5)	1,1 (0,7 – 1,8)	1,2 (0,7 – 2,5)	1,2 (0,7 – 2,4)

	p ₁	p ₂	p ₃	p ₄	p ₅
	Gruppe 1 versus Gruppe 4	Gruppe 2 versus Gruppe 3	Gruppe 2 versus Gruppe 4	Gruppe 2 versus Gruppe 5	Gruppe 3 versus Gruppe 4
Alter, Jahre	0,4101	0,2617	0,4707	0,3947	0,6504
Alter ≥ 60, n (%)	0,6738	0,5199	0,5523	0,5413	0,8522
Hypercholesterinämie, n (%)	0,3679	0,3409	0,2871	0,2998	0,7506
ASS-Behandlungsdauer, Jahre	0,4990	0,2299	0,1786	0,1791	0,1777
Erythrozyten, Anzahl/pl	0,7807	0,4523	0,6244	0,5445	0,4893
Hämoglobin, g/dl	0,7806	0,5960	0,7717	0,6940	0,4705
Thrombozyten, Anzahl/nl	0,2131	0,3434	0,2638	0,2746	0,8229
CRP (supersensitiv), mg/l	0,2749	0,8530	0,7363	0,7651	0,9847

Tab. 37: Einige ausgewählte Parameter für die in diesem Kapitel gebildeten Gruppen im Vergleich. Für das Alter, die Erythrozytenzahl, die Hämoglobin-Konzentration und die

Thrombozytenzahl sind jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung angegeben, für die ASS-Behandlungsdauer und die CRP-Konzentration jeweils der Median und der Interquartilenabstand.

Auffällig sind die im Vergleich niedrigen Thrombozytenzahlen der Patienten, die ihre letzte Impfung nur wenige Tage vor der Aggregationsbestimmung erhalten hatten und der Patienten, die innerhalb der letzten drei Monate vor der Untersuchung gegen Pneumokokken, Hepatitis A oder Tetanus/Diphtherie geimpft worden waren. Dennoch konnte weder für die Thrombozytenzahl noch für einen der sonstigen Parameter ein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen festgestellt werden (ersichtlich aus der p-Werte-Tabelle).

3.15. COX-2 als mögliche Ursache einer „ASS-Resistenz“

Dieses Kapitel setzt sich mit der Frage auseinander, ob der COX-2 im Zusammenhang mit der im Studienkollektiv identifizierten „ASS-Resistenz“ eine Bedeutung zukommt. Im ersten Abschnitt werden die Ergebnisse der Untersuchungen zur thrombozytären COX-2 vorgestellt, der zweite Abschnitt beschäftigt sich mit der COX-2 im Vollblut.

3.15.1. Untersuchungen zur COX-2 in Thrombozyten

3.15.1.1. COX-2-Expression in Thrombozyten

Zunächst wurden die Thrombozytenproteine einer Patientengruppe untersucht, für die eine Expression der COX-2 zu erwarten war. Es handelte sich bei diesen Patienten nicht um Teilnehmer an der in dieser Arbeit vorgestellten Studie; es waren drei Patienten, die sich in der Klinik und Poliklinik für Herz- und Gefäßchirurgie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf einer Bypass-Operation unterzogen hatten. Wie bereits in Kapitel 1.7. Abschnitt 1.7.1. erwähnt, konnte die Arbeitsgruppe um Zimmermann et al. eine drastische Zunahme der COX-2-Expression in Thrombozyten, hervorgerufen durch eine Bypass-Operation, nachweisen (Zimmermann et al. 2003).

Die Auswahl der Patienten erfolgte in Kooperation mit Herrn Prof. Dr. Dr. Herman Reichenspurner und Herrn Dr. Hendrik Treede. Es wurden jeweils einen Tag vor der Bypass-OP sowie fünf Tage nach der OP Blutproben entnommen. Die Operation erfolgte bei allen

Patienten unter Einsatz der Herz-Lungen-Maschine. Die Patienten hatten im Rahmen der OP keine Thrombozytenkonzentrate erhalten.

Unmittelbar nach der Blutentnahme wurden die Thrombozytenproteine gewonnen (wie in Kapitel 2.8. Abschnitt 2.8.1. beschrieben) und eingefroren. Der Nachweis des COX-1- und COX-2-Proteins sowie die Quantifizierung des COX-2-Proteins erfolgten ebenfalls wie in Kapitel 2.8. beschrieben.

Die Western Blots zur COX-1- bzw. COX-2-Expression in den Thrombozyten zeigt Abb. 107. Während für die COX-1 eine gleichbleibend starke Expression zu erkennen ist, erscheint die COX-2-Expression im Vergleich recht schwach. Dennoch konnte für jede Thrombozyten-Probe COX-2-Protein nachgewiesen werden. Unter Berücksichtigung der GAPDH-Expression wurde für jeden dieser drei Patienten in der Tat auch eine verstärkte Expression der COX-2 fünf Tage nach der Bypass-Operation festgestellt.

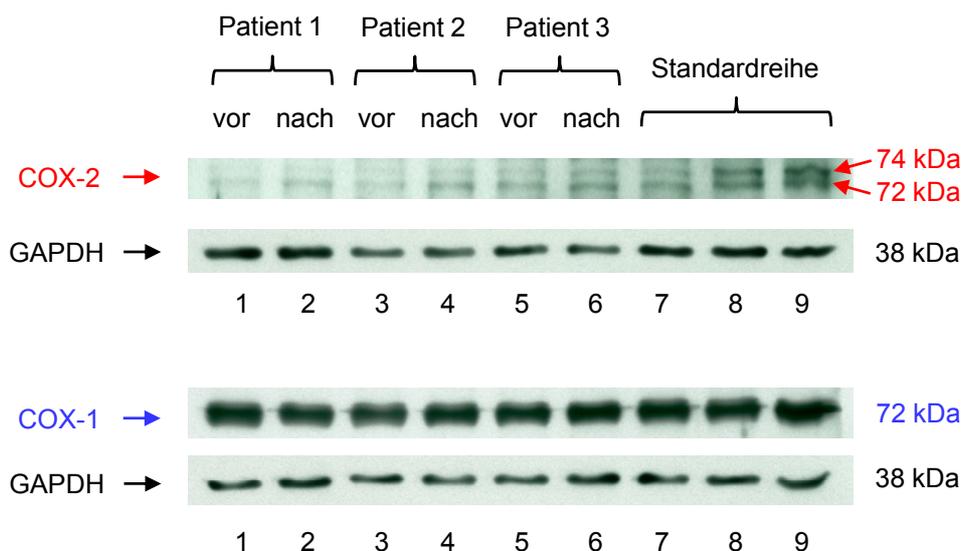


Abb. 107: Western Blots zur COX-1- bzw. COX-2-Expression in Thrombozyten jeweils einen Tag vor und fünf Tage nach der Bypass-Operation für $n = 3$ Patienten (jeweils Spur 1-6). Pro Geltasche wurden $50 \mu\text{g}$ Gesamt-Thrombozytenprotein aufgetragen. Die Quantifizierung des COX-2-Proteins erfolgte anhand der COX-2-Standardreihe (Spur 7-9): Spur 7 entspricht je $50 \mu\text{g}$ der Thrombozytenprotein-Standardpräparation (siehe Kapitel 2.8. Abschnitt 2.8.1.3.) ohne Zusatz rekombinanten COX-2-Proteins; in Spur 8 wurden je 375 pg humane r-COX-2, in Spur 9 je 750 pg humane r-COX-2, in jeweils $50 \mu\text{g}$ der Thrombozytenprotein-Standardpräparation eingebettet, aufgetragen. GAPDH diente als Ladungskontrolle.

Allerdings war die Zunahme der Expression nicht so stark ausgeprägt wie sie für die Patienten von Zimmermann et al. (2003) beschrieben wurde; dennoch war die thrombozytäre mediane COX-2-Konzentration fünf Tage nach der Bypass-Operation mit 6.457 pg/mg Gesamt-

Thrombozytenprotein (6.030 – 7.519 pg/mg) um das 2,5-Fache höher im Vergleich zur Konzentration einen Tag vor der OP (2.632 pg COX-2/mg Gesamt-Thrombozytenprotein (2.529 – 3.101 pg/mg)). Statistischen Berechnungen zufolge war die Zunahme der Expression für diese kleine Patientengruppe nicht signifikant ($p = 0,1088$, siehe Abb. 108).

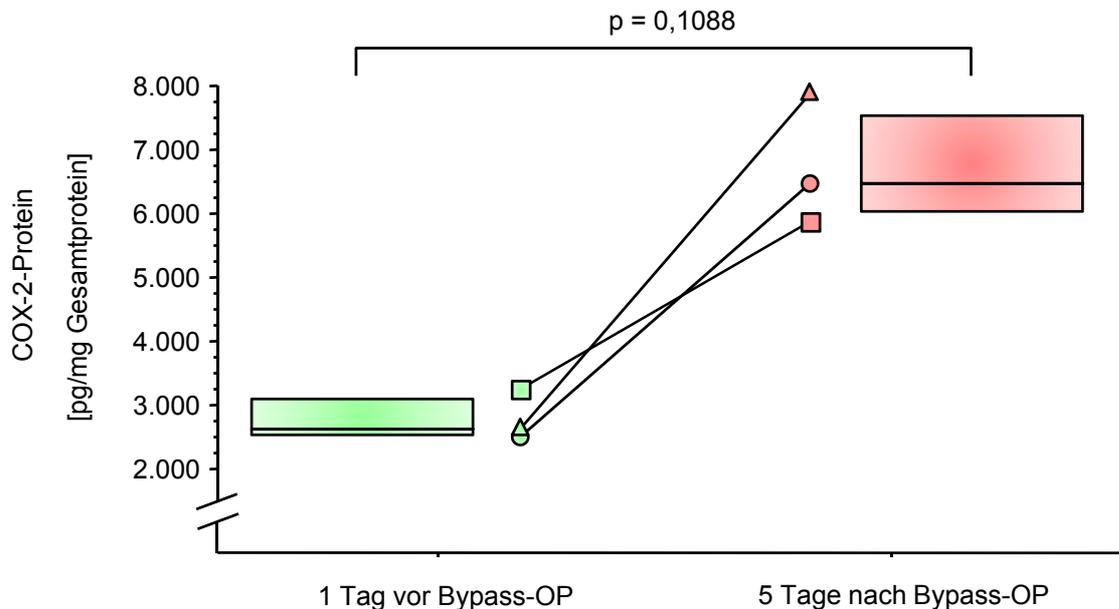


Abb. 108: COX-2-Expression in Thrombozyten einen Tag vor bzw. fünf Tage nach Bypass-Operation ($n = 3$)

Der verwendete COX-2-Antikörper erlaubte es, die COX-2 in zwei ihrer Glykosylierungsstadien zu analysieren. Für die COX-2 in ihrer 72 kDa-Form und für die stärker glykosylierte COX-2 mit 74 kDa konnte in gleichem Maße eine Erhöhung der Konzentration nach der Bypass-OP beobachtet werden (für die 72 kDa-Form von 2.224 pg/mg Gesamtprotein (2.221 – 2.605 pg/mg) auf 5.657 pg/mg Gesamtprotein (5.030 – 6.424 pg/mg), $p = 0,1088$; für die 74 kDa-Form von 412 pg/mg Gesamtprotein (306 – 497 pg/mg) auf 1.066 pg/mg Gesamtprotein (866 – 1.161 pg/mg), $p = 0,1088$; siehe Abb. 109). Sowohl vor als auch nach der OP war die COX-2 in ihrer 72 kDa-Form um den Faktor 5 vermehrt vertreten als die COX-2 mit 74 kDa.

Mit der gleichen Methode wurde anschließend die thrombozytäre COX-2-Expression für eine Subgruppe des Studienkollektivs von 44 Patienten untersucht. In der Mehrzahl der Fälle wurde auch für diese Patienten neben der COX-1-Expression eine Expression der COX-2 in den Thrombozyten festgestellt. Lediglich bei vier Patienten konnte keine COX-2 nachgewiesen werden.

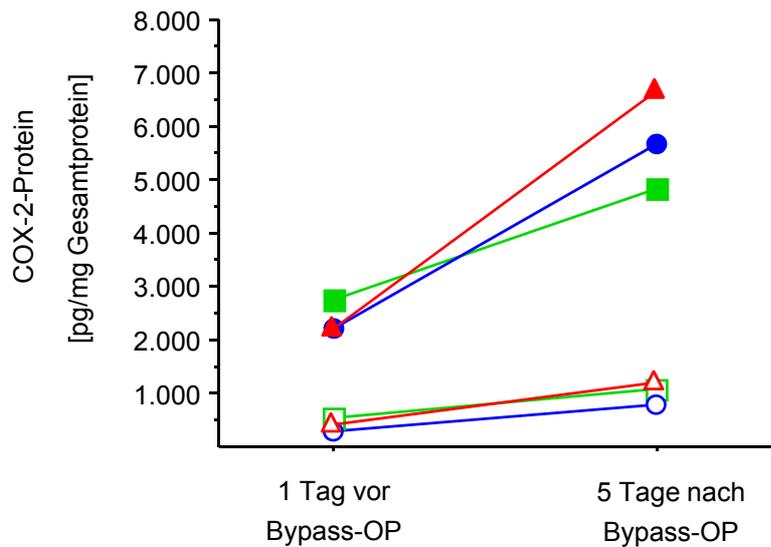


Abb. 109: COX-2 in ihrer 72 kDa-Form (Symbole mit Füllung) und 74 kDa-Form (Symbole ohne Füllung) für $n = 3$ Patienten einen Tag vor bzw. fünf Tage nach Bypass-Operation

Die ASS-Responder-Gruppe ($n = 25$) und die ASS-Low-Responder-Gruppe ($n = 19$) verhielten sich hinsichtlich der COX-2-Expression gleich (780 pg COX-2/mg Gesamt-Thrombozytenprotein (216 – 1.173 pg/mg) für die Responder-Patienten versus 810 pg/mg Gesamtprotein (614 – 1.004 pg/mg) für die Low-Responder-Patienten, $p = 0,7223$). Auch, wenn die thrombozytären COX-2-Konzentrationen der 72 kDa- und der 74 kDa-Form getrennt voneinander analysiert wurden, ergaben sich keine Unterschiede zwischen Responder- und Low-Responder-Patienten (für die 72 kDa-Form: 585 pg/mg Gesamtprotein (165 – 843 pg/mg) für die Responder versus 618 pg/mg Gesamtprotein (379 – 722 pg/mg) für die Low-Responder, $p = 0,7134$; für die 74 kDa-Form: 228 pg/mg Gesamtprotein (20 – 311 pg/mg) für die Responder versus 131 pg/mg Gesamtprotein (24 – 407 pg/mg) für die Low-Responder, $p = 0,8127$; siehe Abb. 110).

So wie bereits für die drei Bypass-operierten Patienten im ersten Teil dieses Abschnitts gezeigt wurde, war auch für das Studienkollektiv der ASS-Responder und ASS-Low-Responder die COX-2 in ihrer 72 kDa-Form im Vergleich zur 74 kDa-Form die stärker vertretene Form (um den Faktor 2,5 für die Responder-Gruppe und um den Faktor 5 für die Low-Responder-Gruppe).

Zwischen der maximalen Kollagen-induzierten Aggregation und der thrombozytären COX-2-Expression bestand keine Korrelation (z.B. für beide COX-2-Banden zusammengefasst: $\rho = -0,017$, $p = 0,9122$; graphisch nicht dargestellt). Gleiches galt auch für die durch AA bzw. ADP induzierte Aggregation.

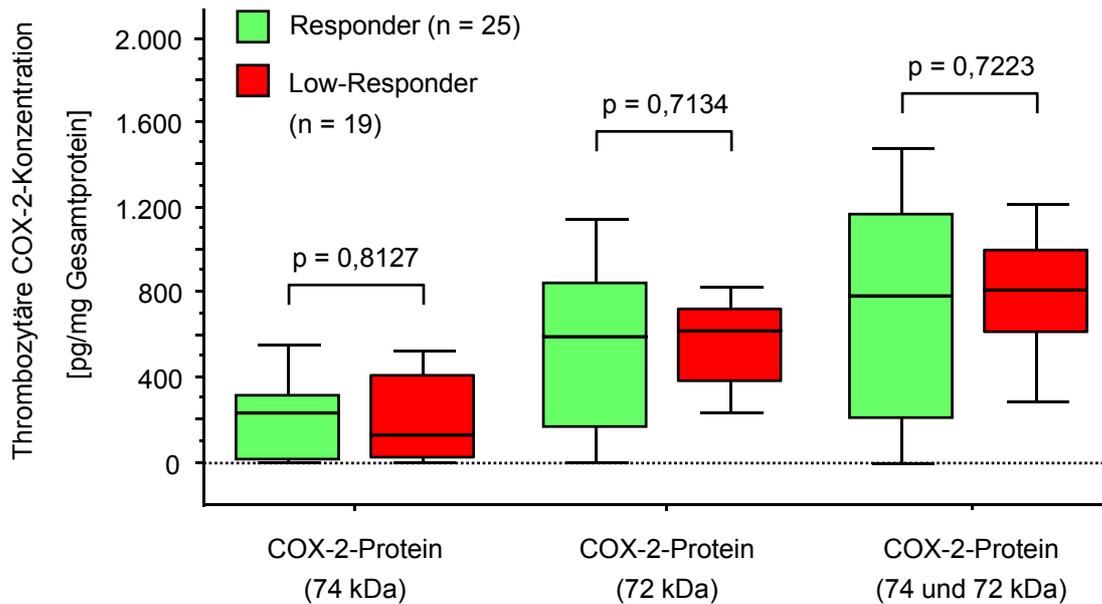


Abb. 110: Vergleich der COX-2-Konzentrationen in den Thrombozyten der ASS-Responder- und ASS-Low-Responder-Patienten

In den vorangehenden Kapiteln wurden verschiedene Subgruppen des Studienkollektivs gebildet und hinsichtlich des Auftretens einer „ASS-Resistenz“ vom Typ III untersucht. Im Folgenden werden einige ausgewählte dieser Subgruppen näher bezüglich ihrer thrombozytären COX-2-Expression untersucht:

- In Kapitel 3.7. wurde zum einen ein Alter über 60, zum anderen eine Hypercholesterinämie mit einer „ASS-Resistenz“ in Verbindung gebracht. Da die COX-2-Expression nur für einen Patienten unter 60 bestimmt worden ist, kann im Hinblick auf das Alter keine Aussage getroffen werden. Der Vergleich der COX-2-Expression in den Thrombozyten der Patienten mit Hypercholesterinämie ($n = 37$) und der ohne ($n = 7$) erbrachte keinen signifikanten Unterschied (725 pg COX-2/mg Gesamt-Thrombozytenprotein (397 – 1.034 pg/mg) für die Patienten mit Hypercholesterinämie versus 924 pg/mg Gesamtprotein (632 – 1.382 pg/mg) für die Patienten ohne Hypercholesterinämie, $p = 0,1628$), auch nicht bei getrennter Analyse der beiden COX-2-Formen.
- Die ASS-Behandlungsdauer (siehe auch Kapitel 3.9.) stand in keinem Zusammenhang zur COX-2-Expression in den Thrombozyten (z.B. für beide COX-2-Formen zusammengefasst: $\rho = 0,073$, $p = 0,6576$).

- In Kapitel 3.13. wurde für die Erythrozytenzahl, die Hämoglobin-Konzentration und für die Thrombozytenzahl ein signifikanter Zusammenhang zu einer „ASS-Resistenz“ vom Typ III nachgewiesen. Keiner dieser drei Parameter korrelierte mit der thrombozytären COX-2-Protein-Konzentration ($\rho = -0,256$, $p = 0,0929$ für die Anzahl der Erythrozyten, $\rho = -0,134$, $p = 0,3802$ für die Hämoglobin-Konzentration, $\rho = -0,153$, $p = 0,3152$ für die Anzahl der Thrombozyten). Das gleiche galt auch für die getrennte Untersuchung der 72 kDa- bzw. 74 kDa-Form der COX-2.
- Bei der Überprüfung, inwieweit die CRP-Konzentration im Plasma mit einer COX-2-Expression in den Thrombozyten zusammenhing, stellte sich heraus, dass ein erhöhter CRP-Wert mit einer erhöhten Konzentration der COX-2 in ihrer 74 kDa-Form einherging. In Abb. 111 sind für die in Abschnitt 3.1.4. anhand der unterschiedlichen CRP-Werte gebildeten Gruppen die thrombozytären COX-2 (74 kDa)-Protein-Konzentrationen dargestellt.

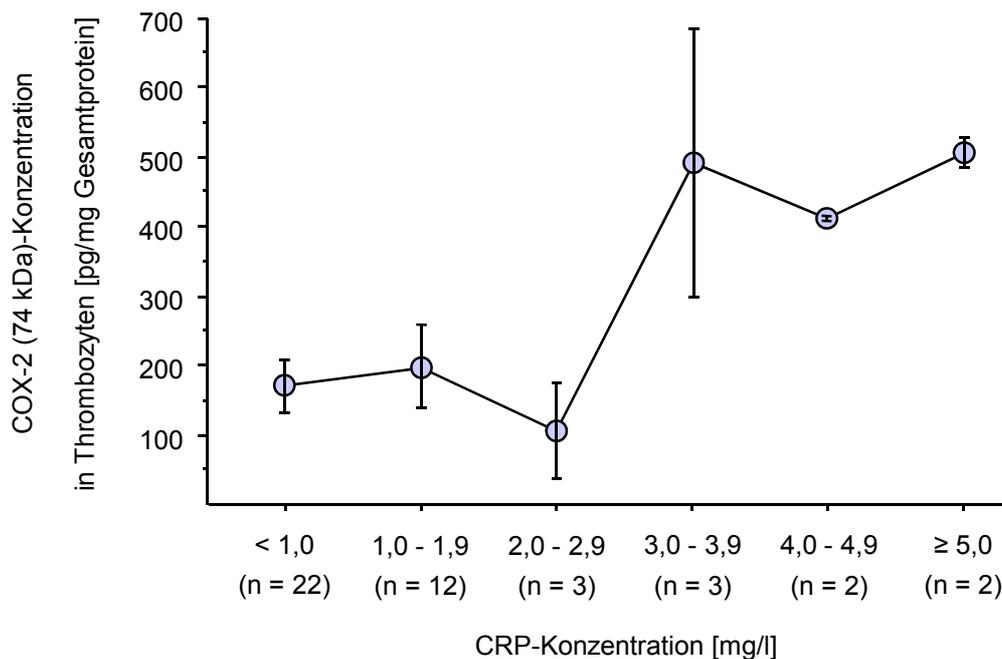


Abb. 111: COX-2 (74 kDa)-Konzentration in den Thrombozyten in Abhängigkeit von der CRP-Plasma-Konzentration. Die Werte sind als Mittelwert mit Standardfehler angegeben.

Da die Patientengruppen, insbesondere im Fall eines erhöhten CRP-Wertes, recht klein waren, wurden für die folgende Analyse jeweils 3 Gruppen zusammengefasst, so dass sich für die Patienten mit einer CRP-Konzentration $\geq 3,0$ mg/l ($n = 7$) eine mediane COX-2 (74 kDa)-Konzentration von 415 pg/mg Gesamtprotein (331 – 519 pg/mg) ergab und für die Patienten mit einem CRP-Wert $< 3,0$ mg/l ($n = 37$) eine mediane

COX-2 (74 kDa)-Konzentration von 126 pg/mg Gesamtprotein (0 – 284 pg/mg), $p = 0,0013$ (siehe Abb. 112). Für die 72 kDa-Form der COX-2 errechnete sich kein Unterschied ($p = 0,6884$, siehe ebenfalls Abb. 112). Zwischen der Konzentration dieser COX-2-Form und dem CRP-Wert bestand keine Korrelation ($\rho = -0,192$, $p = 0,2085$; graphisch nicht dargestellt), während die COX-2 (74 kDa)-Konzentration mit der CRP-Konzentration korrelierte ($\rho = 0,332$, $p = 0,0297$; siehe Abb. 113).

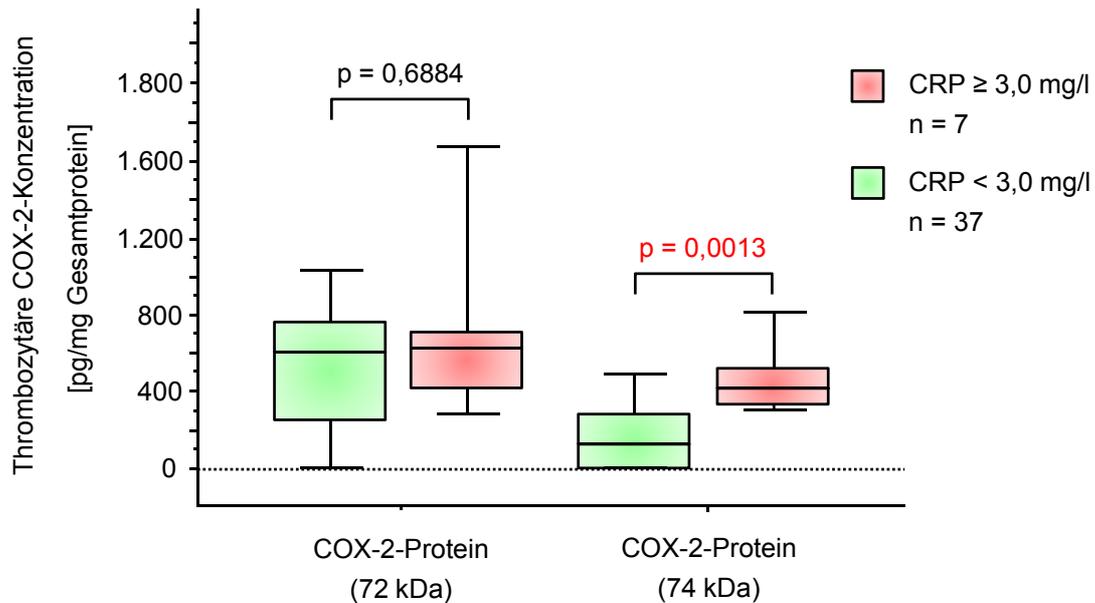


Abb. 112: Thrombozytäre Konzentrationen des COX-2-Proteins in seiner 72 kDa- bzw. 74 kDa-Form bei Patienten mit einem CRP-Wert $\geq 3,0$ mg/l im Vergleich zu Patienten mit einem CRP-Wert $< 3,0$ mg/l

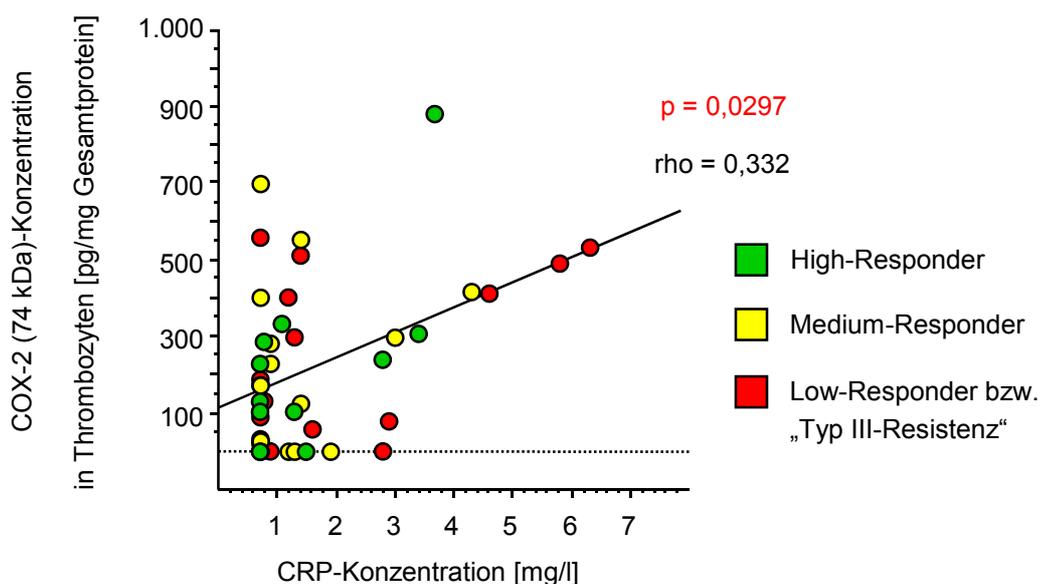


Abb. 113: Korrelation zwischen der COX-2 (74 kDa)-Konzentration in den Thrombozyten und dem CRP-Wert im Plasma. Das untere Detektionslimit für den CRP-Wert lag bei 0,7 mg/l.

- Für die Patienten, die innerhalb der letzten Woche vor der Untersuchung eine Impfung erhalten hatten ($n = 2$), zeigte sich für die thrombozytäre COX-2 in ihrer 74 kDa-Form eine Konzentration von 403 pg/mg Gesamt-Thrombozytenprotein (297 – 509 pg/mg), für die Patienten, bei denen die letzte Impfung länger als drei Monate zurücklag ($n = 29$), eine Konzentration von 131 pg/mg Gesamtprotein (0 – 311 pg/mg), $p = 0,1266$ (siehe Abb. 114, rechts). Für die 72 kDa-Form der COX-2 errechnete sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied mit $p = 0,8094$ (siehe Abb. 114, links).

Die COX-2-Expression der Patienten, die innerhalb der letzten drei Monate vor der Untersuchung gegen Pneumokokken, Hepatitis A oder Tetanus/Diphtherie geimpft worden waren ($n = 4$), unterschied sich mit 905 pg COX-2/mg Gesamtprotein (742 – 1.034 pg/mg) nicht von der Expression der Patienten, bei denen im gleichen Zeitraum keine Impfung vorgenommen worden war ($n = 29$; 780 pg COX-2/mg Gesamtprotein (396 – 1.079 pg/mg), $p = 0,5812$) und auch nicht von der Expression der Patienten, die innerhalb der letzten drei Monate vor der Untersuchung gegen Grippe geimpft worden waren ($n = 10$; 789 pg COX-2/mg Gesamtprotein (543 – 1.051 pg/mg), $p = 0,5716$). Die getrennte Analyse der 72 kDa- bzw. 74 kDa-Form lieferte ein analoges Ergebnis.

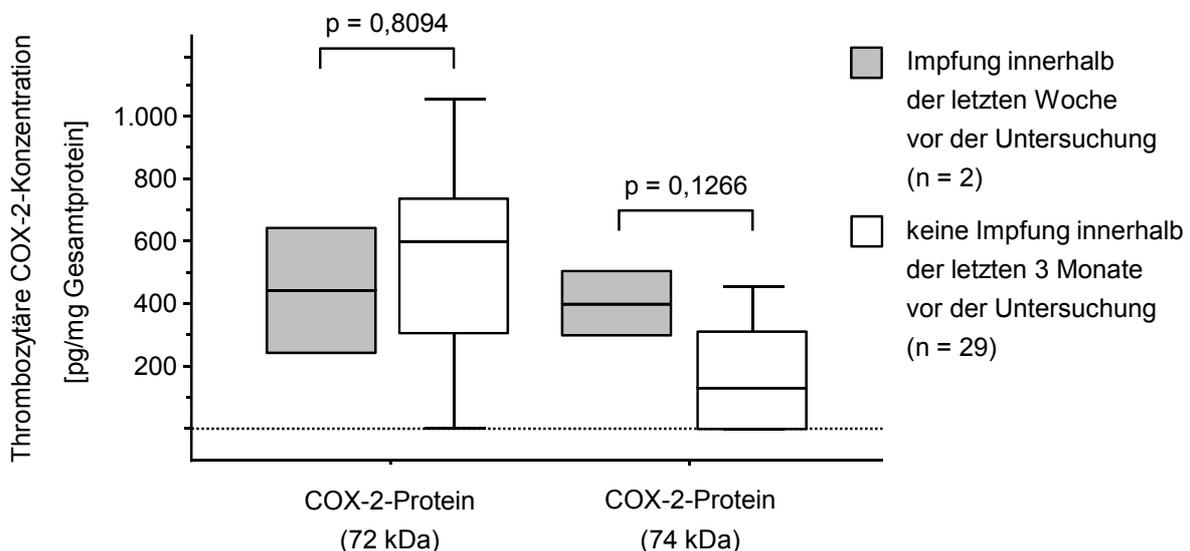


Abb. 114: Vergleich der COX-2-Konzentrationen in den Thrombozyten der Patienten, die nur wenige Tage vor dem Untersuchungstermin geimpft worden waren und der Patienten, bei denen die letzte Impfung mindestens drei Monate zurücklag

3.15.1.2. Einfluss eines selektiven COX-2-Inhibitors auf die Thrombozytenaggregation

Durch den Zusatz des selektiven COX-2-Hemmers Rofecoxib (10 μ M) zum plättchenreichen Plasma kam es weder für die ASS-Responder-Patienten (n = 50) zu einer Beeinflussung der Kollagen-induzierten Thrombozytenaggregation (maximale Aggregation: 25,1% (16,0 – 32,6%) ohne Rofecoxib in vitro versus 24,8% (15,8 – 32,5%) mit Rofecoxib in vitro, p = 0,2065) noch für die ASS-Low-Responder-Patienten (n = 30, maximale Aggregation: 43,6% (40,1 – 48,3%) ohne Rofecoxib in vitro versus 42,8% (39,4% - 48,4%) mit Rofecoxib in vitro, p = 0,1135), noch für die Patienten mit einer „Typ I-Resistenz“ (n = 3, maximale Aggregation: 73,0% (45,5 – 85,4%) ohne Rofecoxib in vitro versus 66,2% (45,2 – 84,3%) mit Rofecoxib in vitro, p > 0,9999), siehe auch Abb. 115.

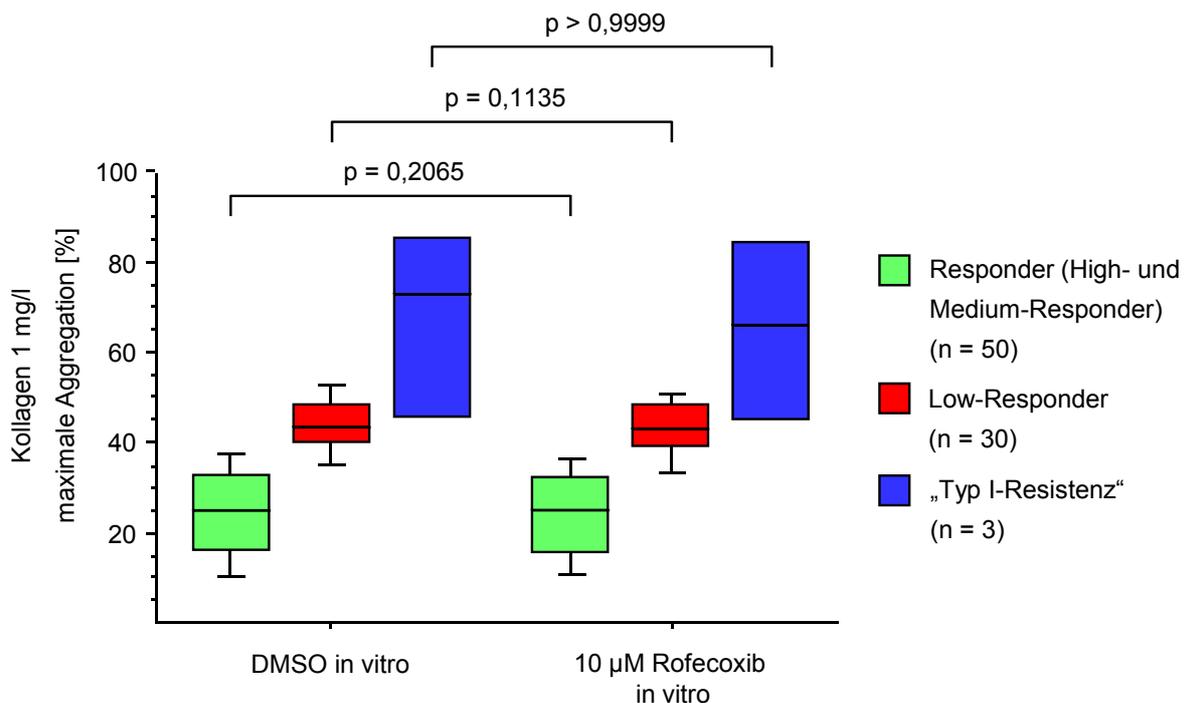


Abb. 115: Maximale Kollagen-induzierte Thrombozytenaggregation der ASS-Responder, Low-Responder und der Patienten mit einer „ASS-Resistenz“ vom Typ I in An- bzw. Abwesenheit des selektiven COX-2-Inhibitors Rofecoxib. DMSO diente als Lösungsmittelkontrolle für Rofecoxib.

Insgesamt gesehen zeigte Rofecoxib keine bzw. nur sehr geringe Effekte auf die Thrombozytenaggregation. Dennoch war ein Zusammenhang zur COX-2-Expression in den Thrombozyten erkennbar. So ließ sich zum Beispiel die maximale Kollagen-induzierte

Thrombozytenaggregation derjenigen Patienten, die eine thrombozytäre COX-2-Expression von über 1.000 pg pro mg Gesamt-Thrombozytenprotein aufwiesen (n = 12), durch den Zusatz von Rofecoxib in vitro signifikant stärker reduzieren als die Aggregation derjenigen Patienten, für die weniger als 1.000 pg COX-2/mg Gesamtprotein ermittelt worden war (n = 30), $p = 0,0085$, siehe Abb. 116.

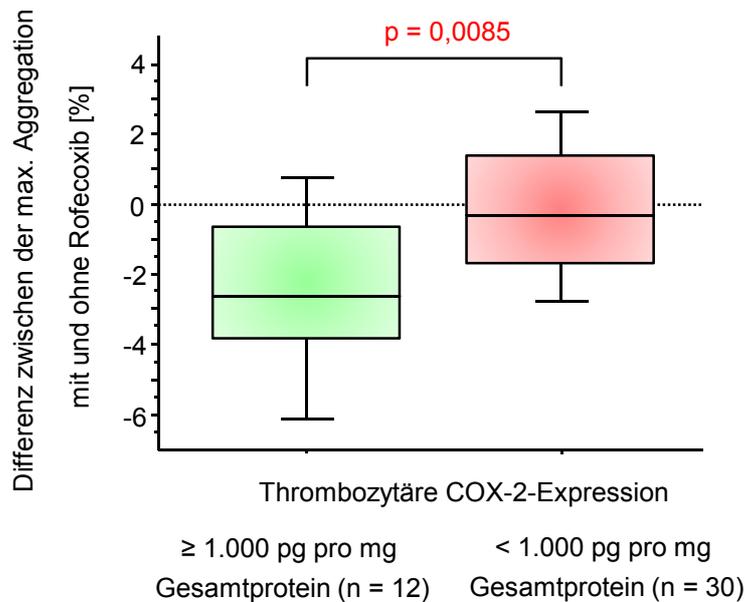


Abb. 116: Einfluss von Rofecoxib in vitro auf die Kollagen-induzierte Aggregation in Abhängigkeit vom COX-2-Proteingehalt der Thrombozyten

Das Regressionsdiagramm in Abb. 117 verdeutlicht, dass zwischen der thrombozytären COX-2-Expression und dem Effekt von Rofecoxib in vitro auf die durch Kollagen ausgelöste Thrombozytenaggregation eine schwache, allerdings signifikante Korrelation bestand ($\rho = 0,373$, $p = 0,0169$).

Auch bei getrennter Betrachtung der COX-2 in ihrer 72 kDa- bzw. 74 kDa-Form konnte jeweils eine Konzentrationsgrenze ermittelt werden, ab welcher Rofecoxib in vitro signifikant stärker auf die Aggregation Einfluss nahm (für die 72 kDa-Form: 800 pg/mg Gesamtprotein, $p = 0,0224$; für die 74 kDa-Form: 300 pg/mg Gesamtprotein, $p = 0,0422$, graphisch nicht dargestellt).

Für die Subgruppen des Studienkollektivs bzw. für die Parameter, für die kein Zusammenhang zur thrombozytären COX-2-Expression festgestellt werden konnte, zeigte auch Rofecoxib in vitro keinen Einfluss auf die Thrombozytenaggregation. Im Einzelnen handelt es sich hierbei um das Vorliegen einer Hypercholesterinämie, die Dauer der ASS-

Einnahme, die Erythrozytenzahl, die Hämoglobin-Konzentration und die Thrombozytenzahl (siehe auch Abschnitt 3.15.1.1.). Auch für ein Alter über 60 wurde kein Zusammenhang festgestellt.

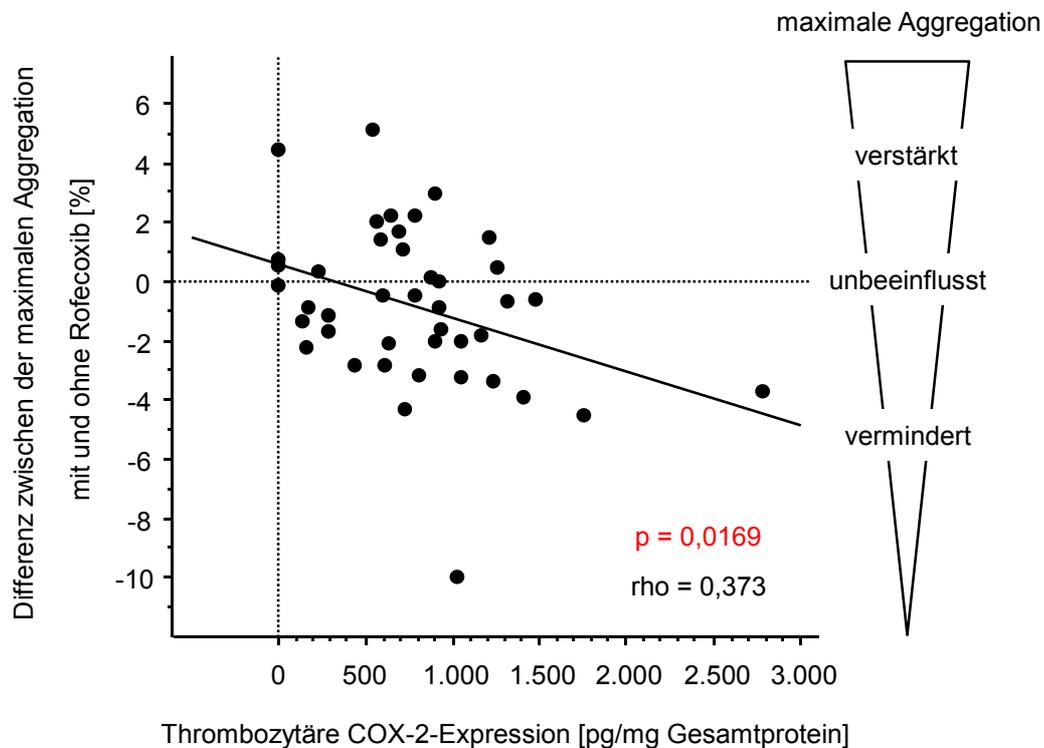


Abb. 117: Zusammenhang zwischen der thrombozytären COX-2-Expression und dem Effekt des selektiven COX-2-Inhibitors Rofecoxib *in vitro* auf die Thrombozytenaggregation

Während für die Patienten mit erhöhtem CRP-Wert eine erhöhte Konzentration der COX-2 in ihrer 74 kDa-Form in den Thrombozyten nachgewiesen werden konnte (siehe Kapitel 3.15.1.1. sowie Abb. 111 bis Abb. 113), ergab sich durch den Zusatz von Rofecoxib *in vitro* zum plättchenreichen Plasma allerdings ebenfalls keine Reduzierung der Aggregation. Die mediane Veränderung der maximalen Kollagen-induzierten Aggregation lag für die Patienten mit einem CRP-Wert ≥ 3 mg/l bei 0,03 % (n = 12).

Darüberhinaus zeigte Rofecoxib *in vitro* auch bei denjenigen Patienten, die innerhalb der letzten drei Monate vor der Untersuchung eine Impfung gegen Pneumokokken, Hepatitis A oder Tetanus/Diphtherie erhalten hatten, keine aggregationsbeeinflussende Wirkung (mediane Veränderung der maximalen Kollagen-induzierten Aggregation: 0,0%). Für die Patienten, die nur wenige Tage vor der Aggregationsbestimmung geimpft worden waren, kann keine Aussage gemacht werden, da für die Analyse nur ein Patient zur Verfügung stand. (Die Ergebnisse zur COX-2-Expression dieser Patienten sind dem Kapitel 3.15.1.1. zu entnehmen.)

3.15.1.3. Einfluss eines selektiven COX-2-Inhibitors auf die Kollagen-induzierte Thromboxan-Bildung

Wie bereits in Kapitel 3.2. Abschnitt 3.2.3. bzw. Abb. 61 dargestellt, kam es bei allen Patienten (die „Typ I-resistenten“ ausgenommen) nur zu einer geringen Thromboxan B₂-Bildung im Verlauf der Kollagen-induzierten Aggregationsreaktion, und zwischen ASS-Responder- und ASS-Low-Responder-Patienten ließen sich keine Unterschiede feststellen, auch nicht nach Zusatz von ASS in vitro. Das Gleiche wurde für den Zusatz von Rofecoxib in vitro beobachtet: Die mediane TxB₂-Konzentration in den Aggregationsüberständen der Responder unterschied sich in Anwesenheit von Rofecoxib mit 75 pg/ml (50 – 91 pg/ml) nicht von der Konzentration in den Überständen der Low-Responder (54 pg/ml (52 – 83 pg/ml), $p = 0,4867$, siehe Abb. 118).

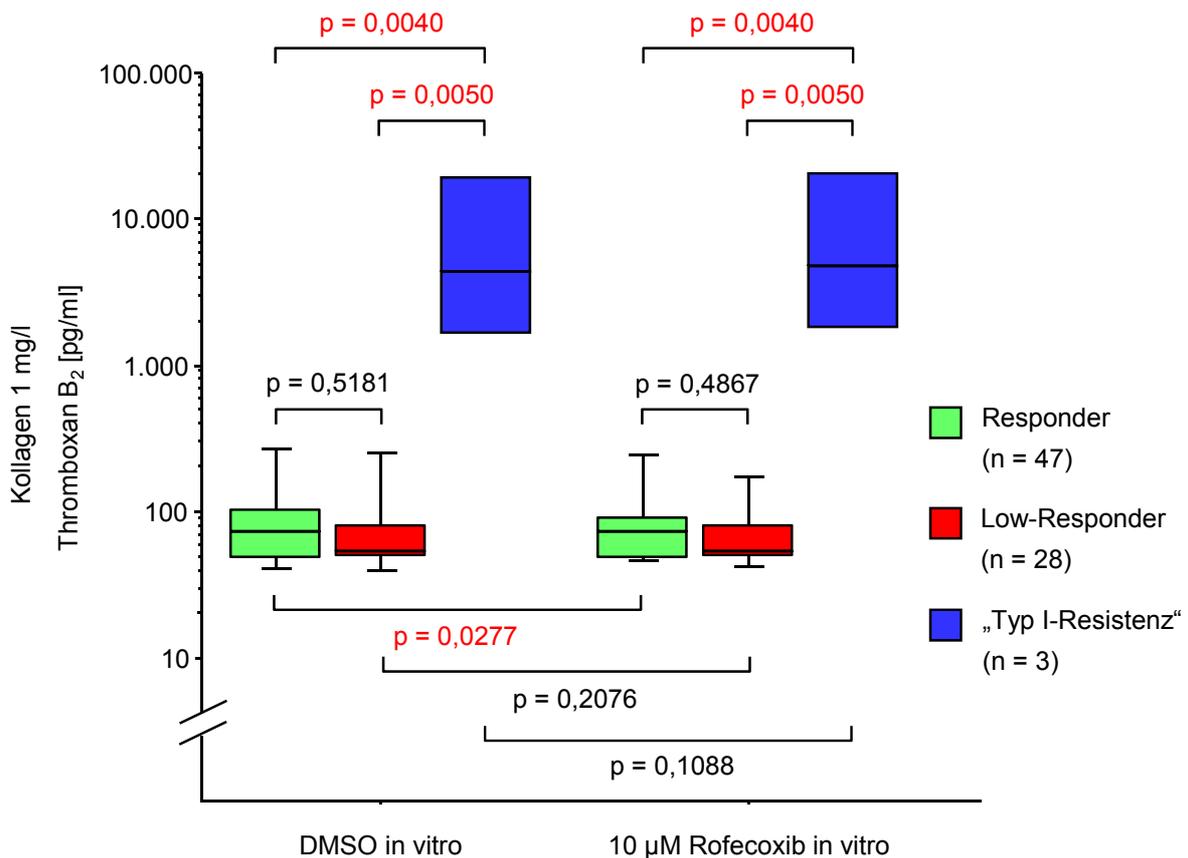


Abb. 118: Thromboxan B₂-Konzentrationen in An- bzw. Abwesenheit des selektiven COX-2-Hemmers Rofecoxib in vitro nach Induktion mit 1 mg/l Kollagen, bestimmt in den Aggregationsüberständen der ASS-Responder, ASS-Low-Responder und „Typ I-resistenten“ Patienten

Während ASS in vitro in der Lage war, die Kollagen-induzierte TxB₂-Bildung der „Typ I-resistenten“ Patienten deutlich zu senken (siehe Kapitel 3.2. Abschnitt 3.2.1.2. und Abb. 52),

war eine Reduktion durch Rofecoxib, wie erwartet, nicht möglich (4.357 pg/ml (1.701 – 19.627 pg/ml) in Anwesenheit des Lösungsmittels DMSO versus 4.872 pg/ml (1.857 – 20.564 pg/ml) in Anwesenheit von Rofecoxib, $p = 0,1088$, siehe Abb. 118).

Überraschenderweise konnte die bereits durch die ASS-Einnahme stark gehemmte TxB_2 -Synthese im Fall der Responder-Patienten durch den Zusatz von Rofecoxib in vitro zusätzlich geringfügig, aber signifikant, reduziert werden (von 75 pg/ml (50 – 104 pg/ml) auf 75 pg/ml (50 – 91 pg/ml), $p = 0,0277$).

Diese Reduzierung ließ sich durch den Anteil derjenigen Patienten erklären, die ihre ASS-Tablette zuletzt am Tag vor der Untersuchung eingenommen hatten, denn nur für diese Patientengruppe fand sich eine (minimale, aber signifikante) Hemmung der TxB_2 -Synthese durch Rofecoxib in vitro (83 pg/ml (52 – 195 pg/ml) versus 81 pg/ml (52 – 138 pg/ml), $p = 0,0022$, siehe Abb. 119). Die TxB_2 -Konzentrationen in den Aggregationsüberständen derjenigen Patienten, die ASS zuletzt am Untersuchungstag eingenommen hatten, waren von Rofecoxib in vitro unbeeinflusst ($p = 0,5002$, siehe ebenfalls Abb. 119).

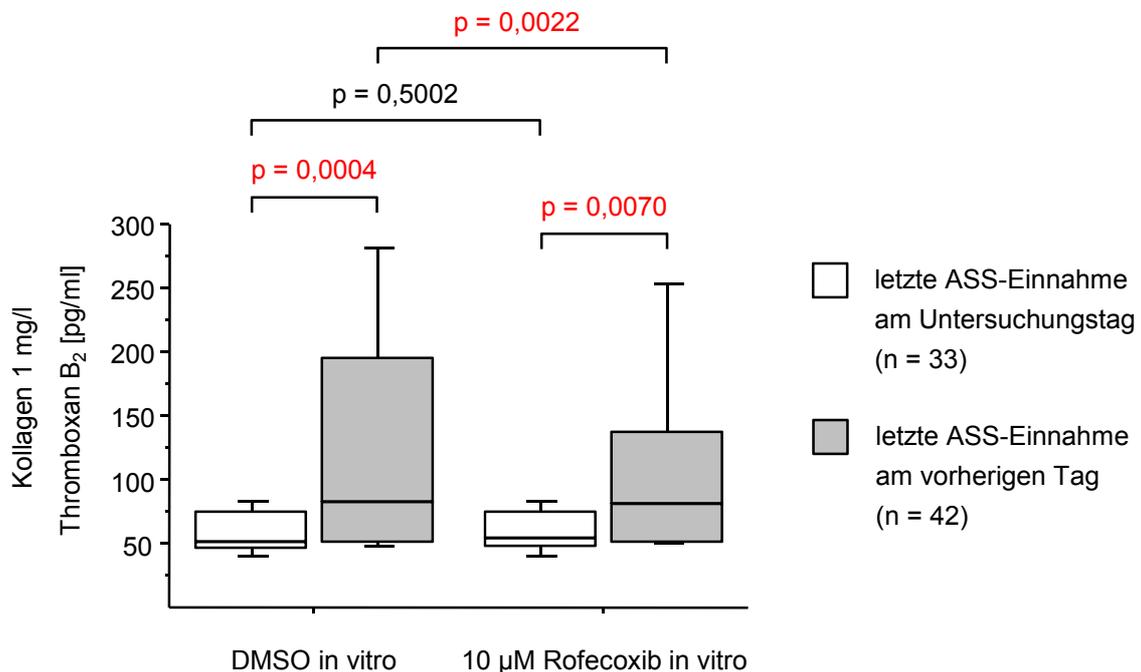


Abb. 119: Einfluss des Einnahmezeitpunkts der ASS-Tablette auf die durch Kollagen ausgelöste Thromboxan B_2 -Bildung in An- bzw. Abwesenheit von Rofecoxib in vitro

Bereits in Kapitel 3.10. Abschnitt 3.10.2. und Abb. 93 wurde, im Zusammenhang mit der ASS-Wirkung in vitro, auf den Einfluss des ASS-Einnahmezeitpunkts auf die TxB_2 -Synthese eingegangen. Der Unterschied zwischen dem ASS-Effekt in vitro und dem Rofecoxib-Effekt

in vitro auf die TxB_2 -Bildung besteht darin, dass sich die TxB_2 -Konzentrationen der anhand des ASS-Einnahmezeitpunkts gebildeten Gruppen im Fall des Rofecoxib-Zusatzes nach wie vor signifikant voneinander unterscheiden ($p = 0,0004$ ohne Rofecoxib und $p = 0,0070$ nach Zusatz von Rofecoxib, siehe Abb. 119).

Darüberhinaus stand die im vorangehenden Abschnitt gezeigte Beeinflussung der Kollagen-induzierten Thrombozytenaggregation durch Rofecoxib in Abhängigkeit von der thrombozytären COX-2-Expression (siehe Abb. 116 und Abb. 117) in keinem Zusammenhang zu der für Rofecoxib beobachteten Reduzierung der Kollagen-induzierten TxB_2 -Bildung ($\rho = 0,065$, $p = 0,5609$, siehe Abb. 120). Außerdem bestätigt das Regressionsdiagramm dieser Abb. 120, dass die durch Rofecoxib bedingte Senkung der TxB_2 -Konzentration vom Einnahmezeitpunkt der ASS-Tablette abhängig war, während sich die durch Rofecoxib hervorgerufene Veränderung der Aggregation vom ASS-Einnahmezeitpunkt unabhängig verhielt.

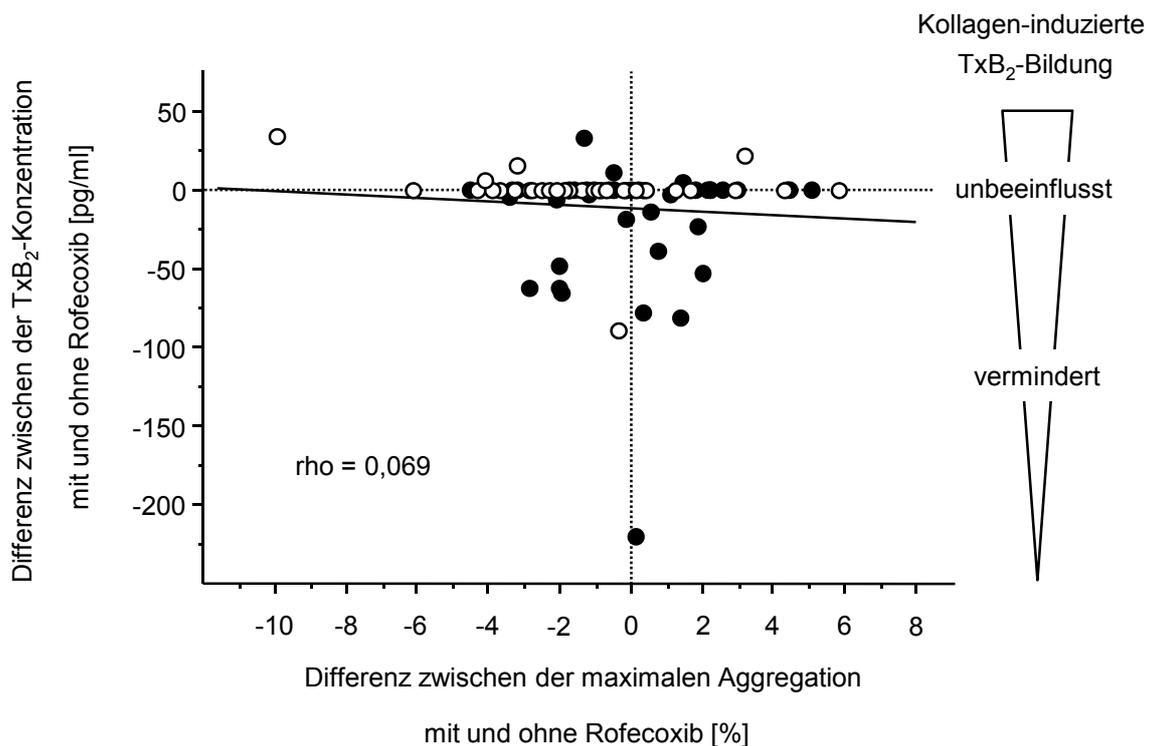


Abb. 120: Regressionsdiagramm zur Wirkung des selektiven COX-2-Hemmers Rofecoxib einerseits auf die mit 1 mg/l Kollagen induzierte Thrombozytenaggregation, andererseits auf die mit 1 mg/l Kollagen induzierte TxB_2 -Bildung. Von den 75 untersuchten Patienten hatten 33 Patienten ihre ASS-Tablette zuletzt am Tag der Untersuchung eingenommen (Kreise ohne Füllung), 42 Patienten zuletzt am Vortag (Kreise mit Füllung).

3.15.2. Untersuchungen zur COX-2 im Vollblut

3.15.2.1. Untersuchungen zur COX-2-vermittelten Thromboxan-Synthese

Unter Verwendung des selektiven COX-2-Hemmers Rofecoxib im sog. COX-1-Aktivitäts-Vollblut-Assay (siehe Kapitel 2.6. Abschnitt 2.6.1.) wurde nicht die COX-1-Vollblut-Aktivität bestimmt, sondern vielmehr die COX-2-Vollblut-Aktivität hinsichtlich der Thromboxan-Synthese.

Wie aus Abb. 121 ersichtlich ist, wurden im Versuchsansatz mit Rofecoxib in vitro für die ASS-Responder- und ASS-Low-Responder-Gruppe ähnlich niedrige TxB_2 -Konzentrationen gemessen (1.738 pg/ml (607 – 3.083 pg/ml) für die Responder versus 1.291 pg/ml (518 – 3.303 pg/ml) für die Low-Responder, $p = 0,4095$).

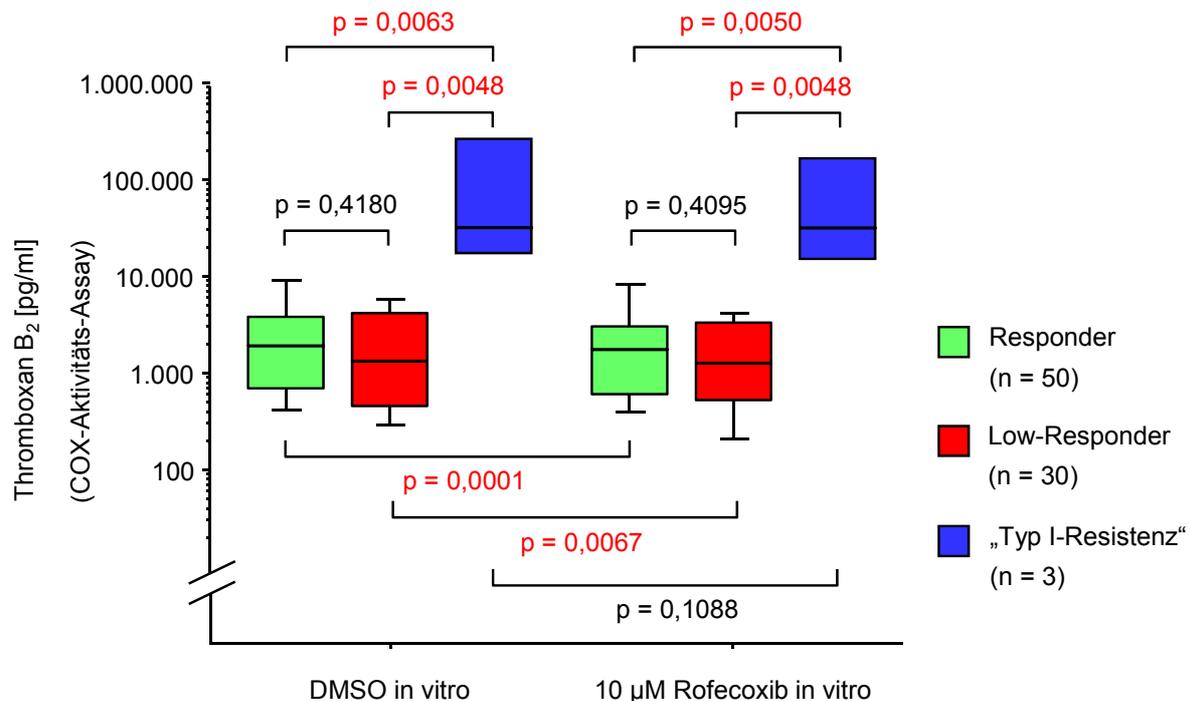


Abb. 121: Thromboxan B_2 -Konzentrationen der ASS-Responder und der „ASS-resistenten“ Patienten vom Typ III (Low-Responder) sowie vom Typ I, gemessen im COX-„1“-Aktivitäts-Vollblut-Assay unter Verwendung des selektiven COX-2-Inhibitors Rofecoxib

Die Patienten mit einer „ASS-Resistenz“ vom Typ I wiesen auch nach Zusatz von Rofecoxib in vitro mit 31.430 pg/ml (15.349 – 165.646 pg/ml) signifikant höhere TxB_2 -Konzentrationen auf im Vergleich zur ASS-Responder-Gruppe auf der einen Seite und zur ASS-Low-Responder-Gruppe auf der anderen Seite ($p = 0,0050$ bzw. $p = 0,0048$, siehe ebenfalls Abb. 121). Dies ist ein entscheidender Unterschied zu dem Versuchsansatz mit ASS in vitro,

in welchem die TxB_2 -Konzentrationen für die „Typ I-resistenten“ Patienten deutlich gesenkt werden konnten (siehe Kapitel 3.5. bzw. Abb. 74).

Wie im vorangehenden Abschnitt für die COX-2-vermittelte Thromboxan-Bildung im plättchenreichen Plasma beschrieben wurde, kam es im Fall der Responder-Patienten trotz der bereits stark gehemmten TxB_2 -Synthese noch zu einer weiteren Reduzierung. Im COX-Vollblut-Assay zeigte sich dieser Zusammenhang erneut, sowohl für die Responder als auch für die Low-Responder: Ohne Rofecoxib-Zusatz in vitro (d.h. nur mit dem Lösungsmittel DMSO) wurde für die Responder eine mediane TxB_2 -Konzentration von 1.945 pg/ml (684 – 3.827 pg/ml) gemessen, die sich in Anwesenheit von Rofecoxib in vitro signifikant auf 1.738 pg/ml (607 – 3.083 pg/ml) verringern ließ, $p = 0,0001$; für die Low-Responder wurde in Anwesenheit nur des Lösungsmittels DMSO eine mediane TxB_2 -Konzentration von 1.308 pg/ml (471 – 4.141 pg/ml) ermittelt, in Anwesenheit von Rofecoxib in vitro eine Konzentration von 1.291 pg/ml (518 – 3.303 pg/ml), $p = 0,0067$, siehe Abb. 121.

Auch in diesen beiden Fällen konnte für die durch Rofecoxib bedingte zwar geringfügige, aber signifikante Reduzierung wieder ein Zusammenhang zum Einnahmezeitpunkt der ASS-Tablette hergestellt werden. Rofecoxib war in der Lage, die im COX-,1“-Assay bestimmten TxB_2 -Konzentrationen derjenigen Patienten, die ihre Tablette zuletzt am Tag vor der Untersuchung eingenommen hatten, von 3.499 pg/ml (2.221 – 5.201 pg/ml) auf 2.422 pg/ml (1.772 – 4.491 pg/ml) zu senken, $p = 0,0003$, siehe Abb. 122.

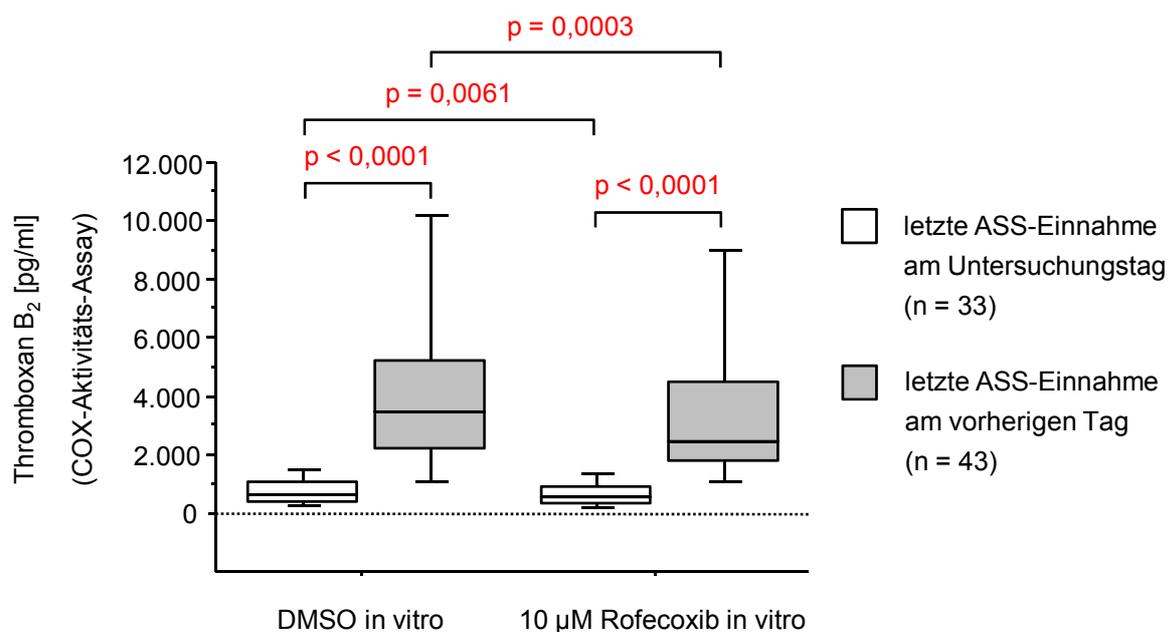


Abb. 122: Abhängigkeit der im COX-,1“-Vollblut-Aktivitätsassay bestimmten TxB_2 -Konzentrationen vom ASS-Einnahmezeitpunkt in An- und Abwesenheit des selektiven COX-2-Hemmers Rofecoxib

Aber auch für die Patienten, die ASS zuletzt am Untersuchungstag eingenommen hatten, war durch den Zusatz von Rofecoxib noch eine leichte, aber signifikante Reduzierung der TxB_2 -Werte zu beobachten (von 636 pg/ml (426 – 1.063 pg/ml) auf 551 pg/ml (326 – 881 pg/ml), $p = 0,0061$; siehe ebenfalls Abb. 122).

Es war allerdings nicht möglich, durch den Rofecoxib-Zusatz einen Zustand *in vitro* zu erreichen, in dem sich die beiden anhand des ASS-Einnahmezeitpunkts gebildeten Gruppen nicht mehr hinsichtlich ihrer Thromboxan-Konzentrationen unterschieden. Ein p -Wert von unter 0,0001 blieb bestehen.

3.15.2.2. Ergebnisse des COX-2-Vollblut-Aktivitätsassays

Dieser Abschnitt beschäftigt sich mit den Ergebnissen des „klassischen“ COX-2-Aktivitätsassays, in welchem die Prostaglandin E_2 -Synthese als Maß für die COX-2-Aktivität im Vollblut herangezogen wird.

Zwischen der ASS-Responder- und der ASS-Low-Responder-Gruppe zeigte sich kein Unterschied hinsichtlich der COX-2-Aktivität (32.160 pg PGE_2 /ml (22.349 – 50.489 pg/ml) versus 38.020 pg PGE_2 /ml (17.031 – 54.815 pg/ml), $p = 0,9517$, siehe Abb. 123 linker Teil). Die Patienten mit einer „ASS-Resistenz“ vom Typ I wiesen eine mediane PGE_2 -Konzentration von nur 16.078 pg/ml (9.283 – 22.874 pg/ml) auf, für die sich allerdings kein signifikanter Unterschied zur Responder- bzw. Low-Responder-Gruppe errechnete ($p = 0,0894$ bzw. $p = 0,1857$, siehe ebenfalls Abb. 123 linker Teil).

Nach Zusatz von 10 μM des selektiven COX-2-Hemmers Rofecoxib wurde die COX-2-Aktivität sowohl in der Responder- als auch in der Low-Responder-Gruppe signifikant gesenkt (von 32.160 pg/ml auf 869 pg/ml (625 – 1.471 pg/ml) für die Responder und von 38.020 pg/ml auf 873 pg/ml (590 – 1.499 pg/ml) für die Low-Responder, jeweils $p < 0,0001$). Auch in der Gruppe der „Typ I-resistenten“ Patienten kam es durch den Rofecoxib-Zusatz zu einer deutlichen Hemmung der COX-2-Aktivität, indem eine mediane PGE_2 -Konzentration von 1.384 pg/ml (961 – 2.785 pg/ml) erreicht wurde (Abb. 123).

Zwischen der thrombozytären COX-2-Expression und der COX-2-Vollblut-Aktivität bestand kein Zusammenhang ($\rho = -0,118$, $p = 0,4515$; graphisch nicht dargestellt).

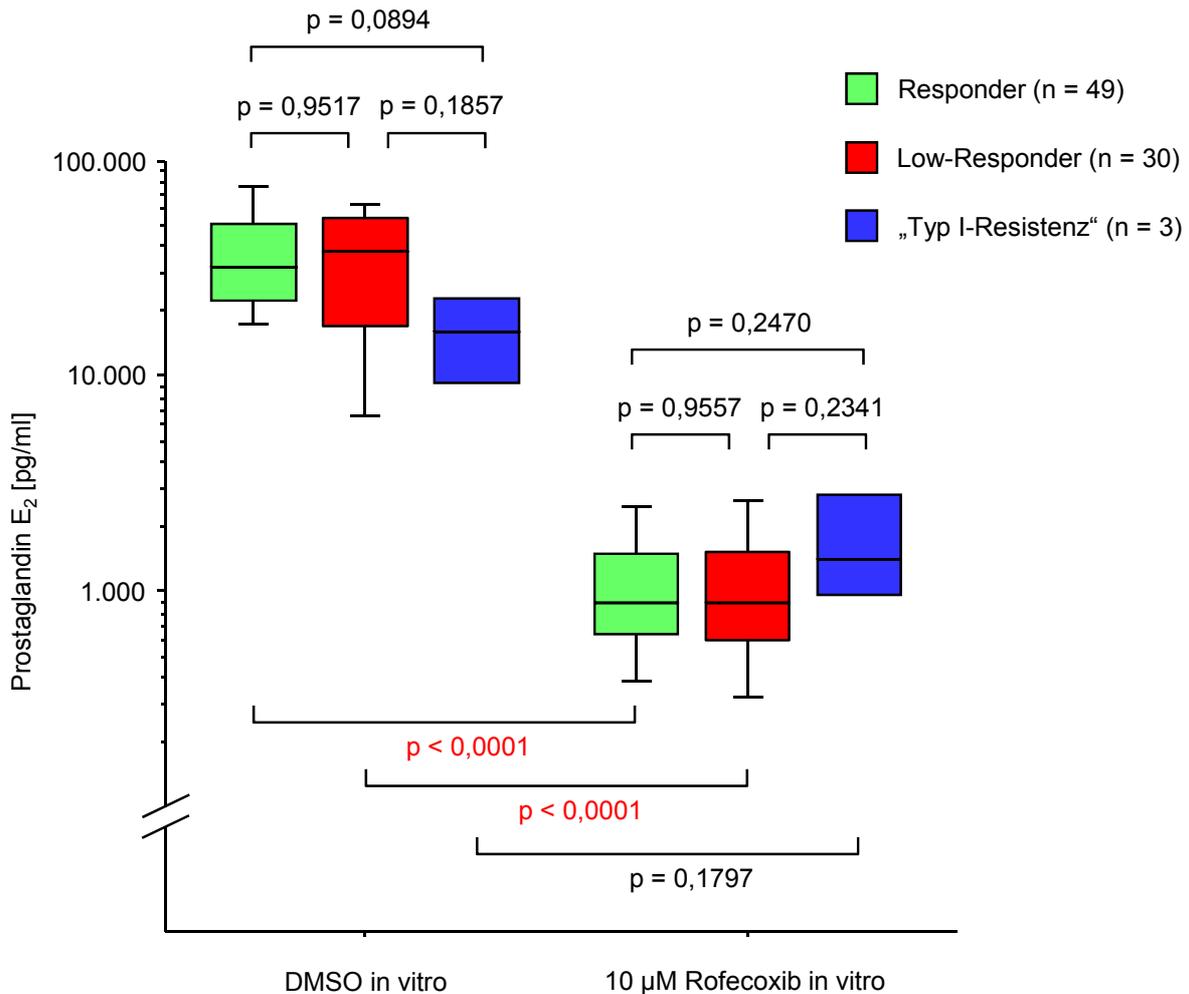


Abb. 123: Prostaglandin E₂-Konzentrationen der ASS-Responder und der „ASS-resistenten“ Patienten vom Typ III (Low-Responder) sowie vom Typ I, gemessen im COX-2-Aktivitäts-Vollblut-Assay in An- bzw. Abwesenheit des selektiven COX-2-Inhibitors Rofecoxib

Dennoch zeigte sich für die Patienten mit erhöhtem CRP-Wert (für diese Patienten wurde eine erhöhte Konzentration der COX-2 in ihrer 74 kDa-Form in den Thrombozyten nachgewiesen, siehe Kapitel 3.15.1.1. sowie Abb. 111 bis Abb. 113) eine relativ hohe COX-2-Vollblut-Aktivität, wenngleich sich diese nicht signifikant von der COX-2-Aktivität der Patienten mit einem niedrigeren CRP-Wert unterschied. Außerdem waren von dieser Beobachtung erst Patienten mit einem CRP-Wert von über 5,0 mg/l betroffen (53.245 pg PGE₂/ml (49.418 – 60.150 pg/ml) für einen CRP-Wert $\geq 5,0$ mg/l (n = 5) versus 33.783 pg/ml (22.045 – 54.838 pg/ml) für einen CRP-Wert $< 5,0$ mg/l (n = 71), $p = 0,1236$; graphisch nicht dargestellt).

Des Weiteren wurde im COX-2-Vollblut-Aktivitäts-Assay für diejenigen Patienten, die innerhalb der letzten drei Monate vor der Untersuchung gegen Pneumokokken, Hepatitis A

oder Tetanus/Diphtherie geimpft worden waren ($n = 4$), eine mediane PGE_2 -Konzentration von 57.338 pg/ml (25.769 – 90.095 pg/ml) ermittelt. Für die Patienten, die im gleichen Zeitraum keine Impfung erhalten hatten ($n = 46$), lag die PGE_2 -Konzentration mit 35.272 pg/ml (22.869 – 59.645 pg/ml) niedriger, allerdings nicht signifikant ($p = 0,4745$). Auch für die innerhalb der letzten drei Monate vor der Untersuchung gegen Grippe geimpften Patienten ($n = 21$) lag die PGE_2 -Konzentration mit 31.689 pg/ml (20.293 – 48.682 pg/ml) niedriger, aber ebenfalls nicht signifikant ($p = 0,2994$, graphisch nicht dargestellt).

Für die zwei Patienten, die nur wenige Tage vor ihrem Untersuchungstermin geimpft worden waren, ergab sich hinsichtlich der COX-2-Vollblut-Aktivität kein Unterschied im Vergleich zu denjenigen Patienten, bei denen die Impfung länger als drei Monate zurück lag ($n = 46$): 39.996 pg PGE_2 /ml (10.238 – 69.755 pg/ml) versus 35.272 pg/ml (22.869 – 59.645 pg/ml), $p = 0,7964$.

3.16. COX-unabhängige Bildung von Isoprostanen als mögliche Ursache einer „ASS-Resistenz“

In diesem Kapitel wird überprüft, ob eine „ASS-Resistenz“ mit einer verstärkten Exkretion des Isoprostans 8-iso-Prostaglandin $\text{F}_{2\alpha}$ (8-iso-PGF $_{2\alpha}$) einherging. Diese Analysen wurden mit 122 Patienten durchgeführt, da für zwei Patienten kein Urin zur Verfügung stand, und weitere sechs Patienten aufgrund aktuellen Rauchens ausgeschlossen wurden.

Die Raucher wurden aus dem Grund aus den Analysen herausgenommen, weil zwischen Rauchen und der F_2 -Isoprostan-Exkretion ein erwiesener Zusammenhang besteht (Morrow et al. 1995, Reilly et al. 1996) – in der Tat wiesen die Raucher dieser Studie eine signifikant höhere 8-iso-PGF $_{2\alpha}$ -Exkretion im Vergleich zu den Nichtrauchern auf (417 pg/mg Kreatinin (228 – 563 pg/mg) versus 202 pg/mg Kreatinin (159 – 255 pg/mg), $p = 0,0391$, siehe Abb. 124) – und sich zudem die Raucher dieser Studie ungleichmäßig auf die einzelnen ASS-Response-Gruppen verteilen (vier Raucher gehören der High-Responder-Gruppe an, lediglich ein Raucher der Low-Responder-Gruppe, und bei einem Raucher wurde eine „Typ I-Resistenz“ nachgewiesen). Für die fünf Raucher ohne „Typ I-Resistenz“ wurde eine mediane maximale Kollagen-induzierte Thrombozytenaggregation von 21,6% (13,3 – 34,3%) ermittelt.

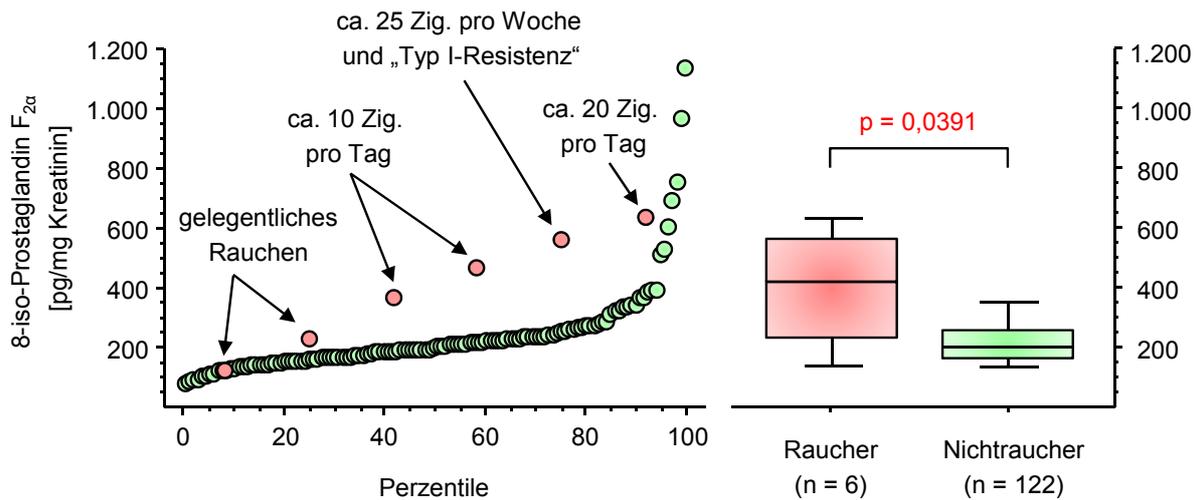


Abb. 124: Zusammenhang zwischen dem Rauchen von Zigaretten und der Exkretion von 8-iso-Prostaglandin $F_{2\alpha}$

Für die Gruppe der „Typ I-resistenten“ Patienten ($n = 3$) wurde beim Vergleich mit allen Patienten ohne „Typ I-Resistenz“ ($n = 119$) eine signifikant höhere mediane 8-iso-PGF $_{2\alpha}$ -Konzentration im Urin festgestellt (342 pg/mg Kreatinin (264 – 472 pg/mg) versus 196 pg/mg Kreatinin (159 – 247 pg/mg), $p = 0,0365$; siehe Abb. 125 rechtes Box-Diagramm).

Die ASS-Responder-Patienten ($n = 79$) zeigten mit einer medianen 8-iso-PGF $_{2\alpha}$ -Konzentration von 186 pg/mg Kreatinin (147 – 230 pg/mg) eine signifikant niedrigere Isoprostan-Exkretion als die ASS-Low-Responder-Patienten ($n = 40$), für die eine mediane 8-iso-PGF $_{2\alpha}$ -Exkretion von 230 pg/mg Kreatinin (188 – 318 pg/mg) bestimmt wurde ($p = 0,0009$, siehe Abb. 125 linkes Box-Diagramm).

Zwischen der High- und Medium-Responder-Gruppe bestand hinsichtlich der Isoprostan-Exkretion kein Unterschied ($p = 0,2163$), so dass diese zwei Gruppen für alle Analysen dieses Kapitels zusammengefasst werden konnten.

Während sich die 8-iso-PGF $_{2\alpha}$ -Exkretion der Responder-Patienten signifikant von der Exkretion der „Typ I-resistenten“ Patienten unterschied ($p = 0,0196$), zeigte sich zwischen der Low-Responder-Gruppe und der Gruppe der „Typ I-resistenten“ Patienten kein signifikanter Unterschied ($p = 0,1271$, siehe Abb. 125 linkes Box-Diagramm).

Zusätzlich sind die Einzelwerte der 8-iso-PGF $_{2\alpha}$ -Konzentration in Form eines Perzentil-Diagramms in Abb. 126 dargestellt.

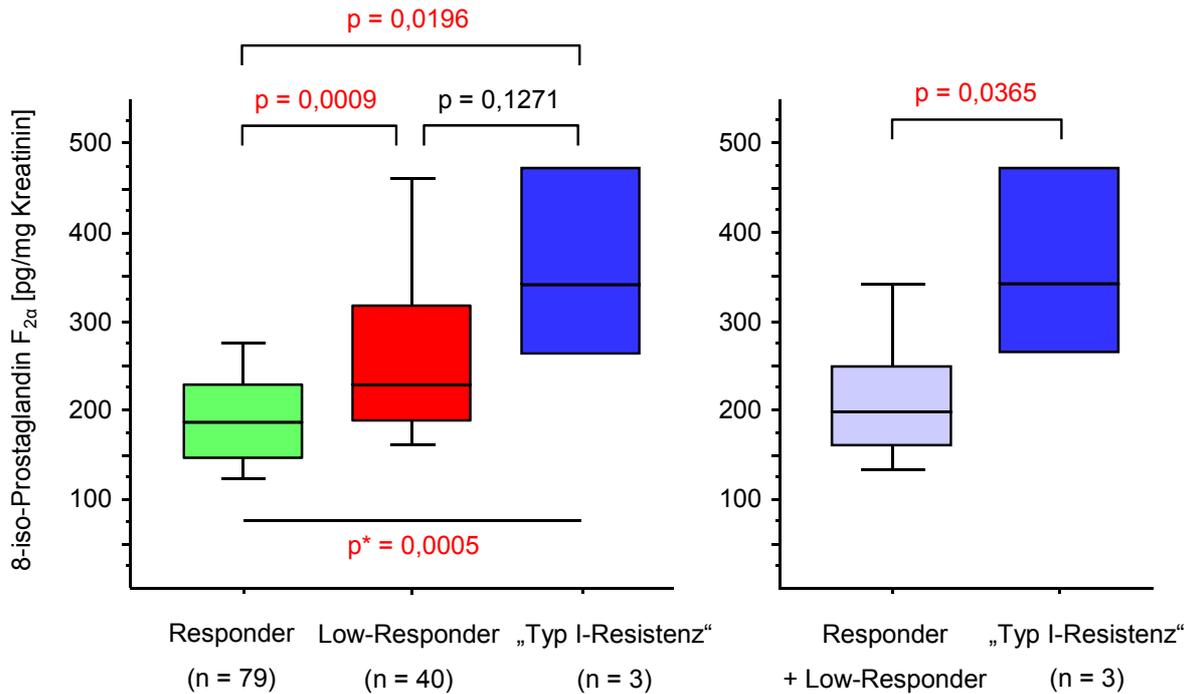


Abb. 125: 8-iso-Prostaglandin $F_{2\alpha}$ -Exkretion der ASS-Responder, der ASS-Low-Responder und der Patienten mit einer „ASS-Resistenz“ vom Typ I. Im linken Box-Diagramm wird mit p^* der Vergleich aller drei Gruppen beschrieben.

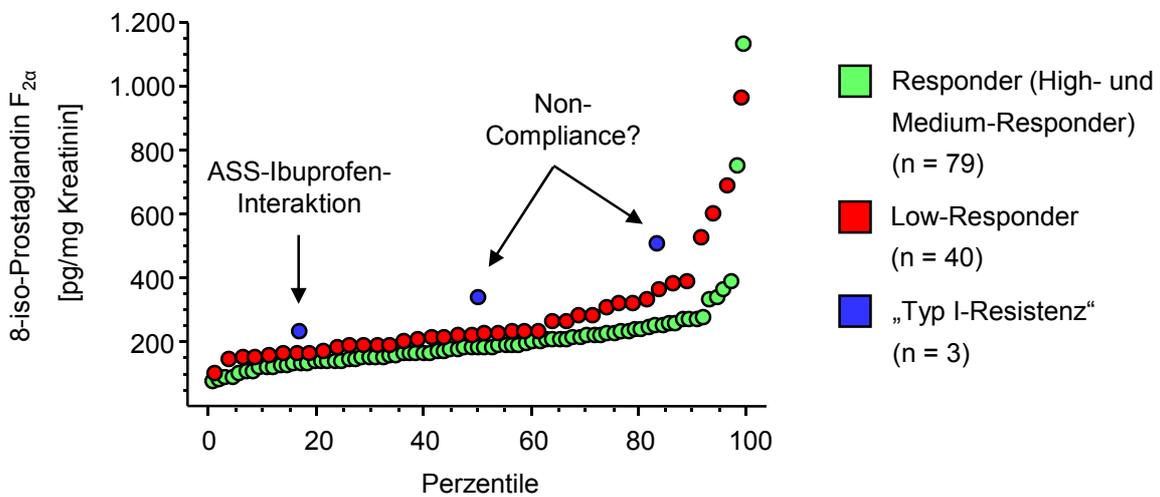


Abb. 126: Perzentil-Diagramm zur 8-iso-Prostaglandin $F_{2\alpha}$ -Exkretion der ASS-Responder, ASS-Low-Responder und der „Typ I-resistenten“ Patienten

Aus der oberen Kontingenztafel der Tab. 38 ist ersichtlich, dass eine im Vergleich sehr niedrige Isoprostan-Exkretion von unter 150 pg 8-iso-PGF $_{2\alpha}$ /mg Kreatinin bei 27% der Responder-Patienten zu verzeichnen war (n = 21), während bei den ASS-Low-Responder-Patienten lediglich bei einem Patienten eine derart niedrige Exkretion beobachtet werden

konnte. 97,5% (n = 39) aller Low-Responder wiesen eine 8-iso-PGF_{2α}-Konzentration auf, die über 150 pg/mg Kreatinin lag. Für diese Verhältnisse errechnete sich ein p-Wert von 0,0014.

Eine 8-iso-PGF_{2α}-Konzentration von über 300 pg/mg Kreatinin wurde nur bei knapp 8% (n = 6) der ASS-Responder festgestellt, von der ASS-Low-Responder-Gruppe waren hingegen 27,5% betroffen (n = 11), p = 0,0034, siehe Tab. 38 untere Kontingenztabelle.

p = 0,0014	8-iso-PGF _{2α} < 150 pg/mg Kreatinin	8-iso-PGF _{2α} ≥ 150 pg/mg Kreatinin	Σ
Responder	21	58	79
Low-Responder	1	39	40
Σ	22	97	119

p = 0,0167	8-iso-PGF _{2α} < 200 pg/mg Kreatinin	8-iso-PGF _{2α} ≥ 200 pg/mg Kreatinin	Σ
Responder	46	33	79
Low-Responder	14	26	40
Σ	60	59	119

p = 0,0176	8-iso-PGF _{2α} < 250 pg/mg Kreatinin	8-iso-PGF _{2α} ≥ 250 pg/mg Kreatinin	Σ
Responder	65	14	79
Low-Responder	25	15	40
Σ	90	29	119

p = 0,0034	8-iso-PGF _{2α} < 300 pg/mg Kreatinin	8-iso-PGF _{2α} ≥ 300 pg/mg Kreatinin	Σ
Responder	73	6	79
Low-Responder	29	11	40
Σ	102	17	119

Tab. 38: Kontingenztabelle zu verschiedenen 8-iso-Prostaglandin F_{2α}-, „Grenzwert“-Konzentrationen und der ASS-Response. Die Zahlenwerte beschreiben jeweils die Patientenzahl n.

Die ROC-Analyse (siehe Abb. 127) ergab, dass sich die ROC-Kurve, die aus der Sensitivität und Spezifität für jeden gemessenen 8-iso-PGF_{2α}-Wert ermittelt wurde, signifikant von der

Diagonalen unterschied ($p = 0,001$). Es errechnete sich eine Fläche unter der ROC-Kurve (AUC) von 0,687 (95% KI 0,588 – 0,785).

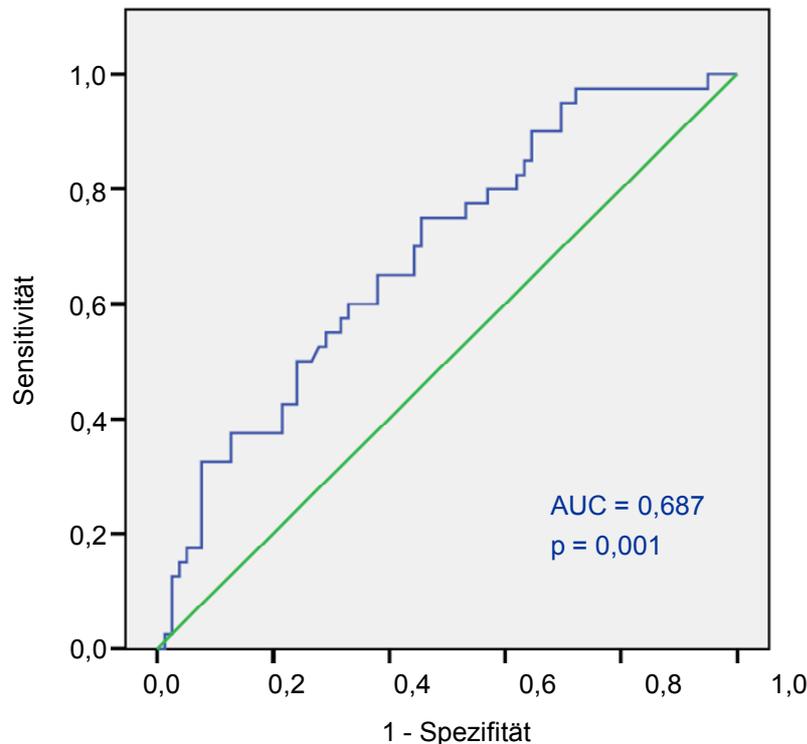


Abb. 127: ROC-Analyse der 8-iso-Prostaglandin $F_{2\alpha}$ -Konzentrationsbestimmung für das Vorliegen einer „ASS-Resistenz“. Es ist für jede gemessene 8-iso-PGF $_{2\alpha}$ -Konzentration ($n = 119$) die Sensitivität und Spezifität gegeneinander aufgetragen (ROC-Kurve, blau). Zur Überprüfung, ob die Isoprostan-Bestimmung eine Trennschärfe hinsichtlich des Auftretens einer „ASS-Resistenz“ aufwies, wurde die Fläche unter der ROC-Kurve mit der Fläche unter der Diagonalen (grün) verglichen und die Signifikanz mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests bestimmt.

Bei der linearen Regressionsanalyse ergab sich zwischen der 8-iso-PGF $_{2\alpha}$ -Exkretion und der maximalen Kollagen-induzierten Aggregation ein signifikanter Zusammenhang ($\rho = 0,192$, $p = 0,0374$, siehe Abb. 128). Zusätzlich sind die beiden „Grenzwerte“ von 150 pg bzw. 300 pg 8-iso-PGF $_{2\alpha}$ /mg Kreatinin in der Abb. 128 eingezeichnet, so dass die oben beschriebene Verteilung der ASS-Responder- bzw. ASS-Low-Responder-Patienten mit 8-iso-PGF $_{2\alpha}$ -Konzentrationen oberhalb bzw. unterhalb dieser „Grenzwerte“ abgelesen werden kann.

Durch den Einsatz unterschiedlicher Kollagen-Konzentrationen zur Aggregationsauslösung konnte für diejenigen Patienten, die eine 8-iso-PGF $_{2\alpha}$ -Exkretion unter 150 pg/mg Kreatinin aufwiesen, eine EC $_{50}$ -Konzentration von 1,99 mg Kollagen/l ermittelt werden, während für die Patienten mit einer 8-iso-PGF $_{2\alpha}$ -Exkretion über 150 pg/mg Kreatinin bereits eine

Kollagen-Konzentration von 1,10 mg/l für den halbmaximalen Effekt ausreichte ($p = 0,0045$, siehe Abb. 129 linke Graphik).

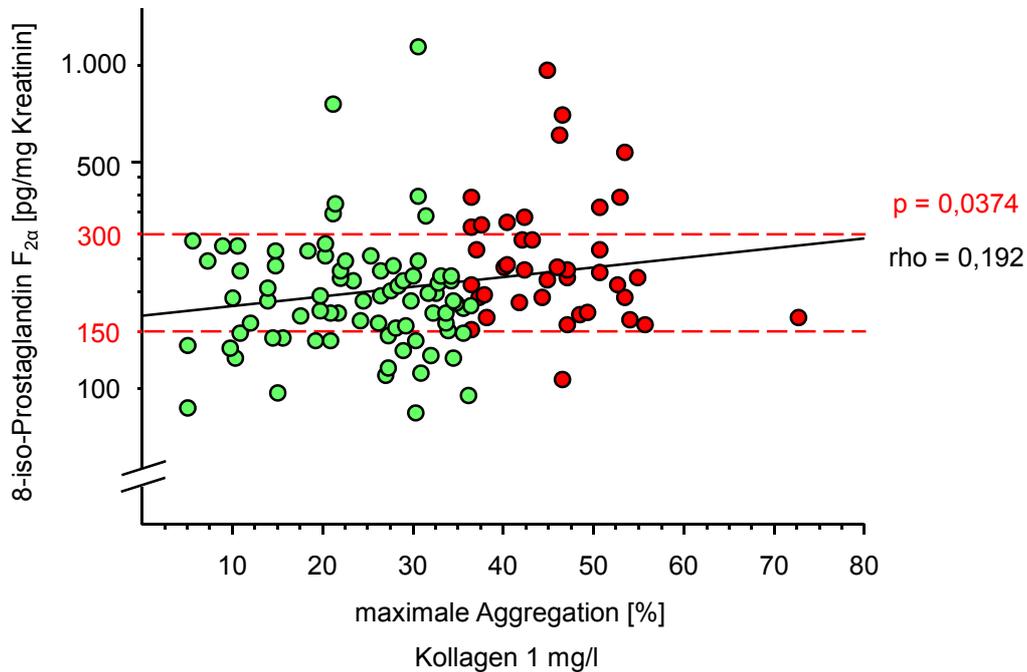


Abb. 128: 8-iso-Prostaglandin $F_{2\alpha}$ -Exkretion und maximale Kollagen-induzierte Thrombozytenaggregation von 119 Patienten, unterteilt in ASS-Responder ($n = 79$, ●) und ASS-Low-Responder ($n = 40$, ●). Die rot gestrichelten Linien sind jeweils für eine „Grenzwert“-Konzentration von 150 pg bzw. 300 pg 8-iso-PGF $_{2\alpha}$ /mg Kreatinin eingezeichnet.

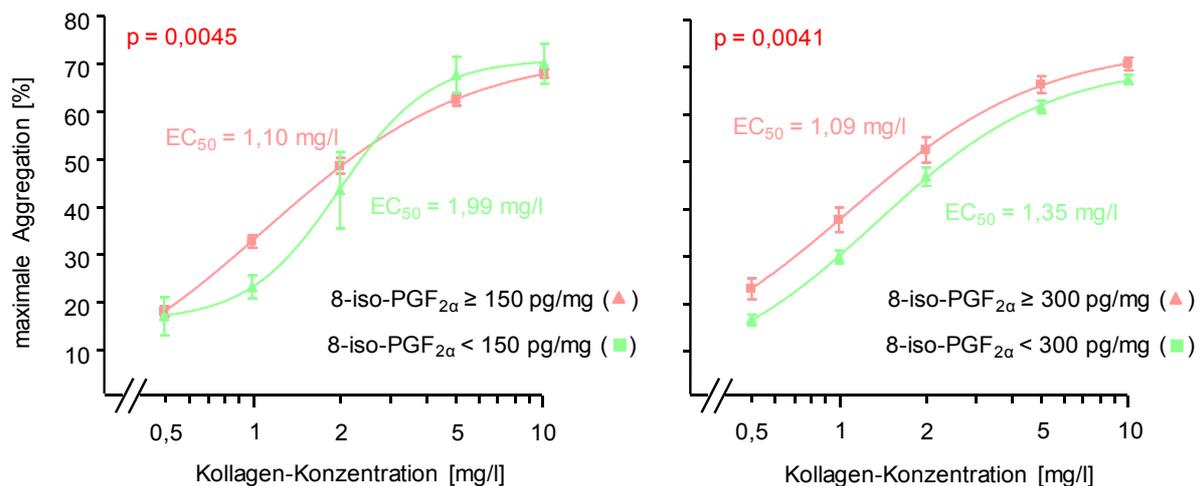


Abb. 129: Mit unterschiedlichen Kollagen-Konzentrationen ausgelöste Thrombozytenaggregation der Patienten mit einer 8-iso-Prostaglandin $F_{2\alpha}$ -Exkretion, die zum einen oberhalb ($n = 97$) bzw. unterhalb ($n = 22$) von 150 pg/mg Kreatinin lag (linke Graphik), zum anderen oberhalb ($n = 17$) bzw. unterhalb ($n = 102$) von 300 pg/mg Kreatinin (rechte Graphik). Die Werte für die maximale Aggregation sind als Mittelwerte mit Standardfehler angegeben.

Ebenfalls unterschied sich der EC_{50} -Wert der Kollagen-Konzentrations-Wirkungskurve der Patienten mit einer 8-iso-PGF_{2α}-Exkretion unterhalb von 300 pg/mg Kreatinin mit 1,35 mg/l Kollagen signifikant von dem EC_{50} -Wert der Kurve derjenigen Patienten, die 8-iso-PGF_{2α}-Konzentrationen oberhalb von 300 pg/mg Kreatinin aufwiesen (1,09 mg/l), $p = 0,0041$, siehe Abb. 129 rechte Graphik.

Zusammengefasst bestand zwischen der Urinexkretion des Isoprostans 8-iso-PGF_{2α} und der Kollagen-induzierten Thrombozytenaggregation eine deutliche Beziehung. Wurde die Aggregation allerdings mit Arachidonsäure oder ADP ausgelöst, zeigte sich kein Zusammenhang zur Isoprostan-Exkretion (z.B. $\rho = -0,063$, $p = 0,4913$ für die maximale AA-induzierte Aggregation bzw. $\rho = -0,011$, $p = 0,9254$ für die maximale ADP-induzierte Aggregation; graphisch nicht dargestellt).

Da sich die Isoprostan-Exkretion vom ASS-Einnahmezeitpunkt unabhängig verhielt ($p = 0,5748$), ergab sich weder zur Kollagen-induzierten Thromboxan B₂-Bildung ein Zusammenhang ($\rho = -0,154$, $p = 0,1840$) noch zur COX-1-Vollblut-Aktivität ($\rho = -0,163$, $p = 0,1532$).

Auch die Ausscheidung des Thromboxan-Metaboliten 2,3-dinor-Thromboxan B₂ korrelierte nicht mit der Ausscheidung des 8-iso-PGF_{2α} ($\rho = 0,054$, $p = 0,5547$) und auch die im Urin bestimmte 2,3-dinor-6-keto-Prostaglandin F_{1α}-Konzentration stand in keinem Zusammenhang zur 8-iso-PGF_{2α}-Konzentration ($\rho = 0,094$, $p = 0,3075$).

Inwieweit bestimmte Parameter, die bereits in den vorangehenden Kapiteln hinsichtlich des Auftretens einer „ASS-Resistenz“ (vom Typ III) untersucht worden sind, mit einer verstärkten Isoprostan-Exkretion in Verbindung gebracht werden können, wird im Folgenden betrachtet:

- Eine Korrelation zwischen dem Lebensalter und der 8-iso-PGF_{2α}-Exkretion bestand nicht ($\rho = 0,029$, $p = 0,7568$; siehe Abb. 130). Dennoch war auffällig, dass von den „Unter-60-Jährigen“ lediglich ein Patient eine Isoprostan-Konzentration von über 300 pg/mg Kreatinin aufwies (340 pg/mg Kreatinin), von den „Über-60-Jährigen“ waren es 16 Patienten, die zum Großteil 8-iso-PGF_{2α}-Konzentrationen zeigten, die weit über 300 pg/mg Kreatinin lagen (im Mittel 516 pg/mg Kreatinin). Von diesen 16 Patienten waren 69% ($n = 11$) als Low-Responder identifiziert worden (siehe ebenfalls Abb. 130).

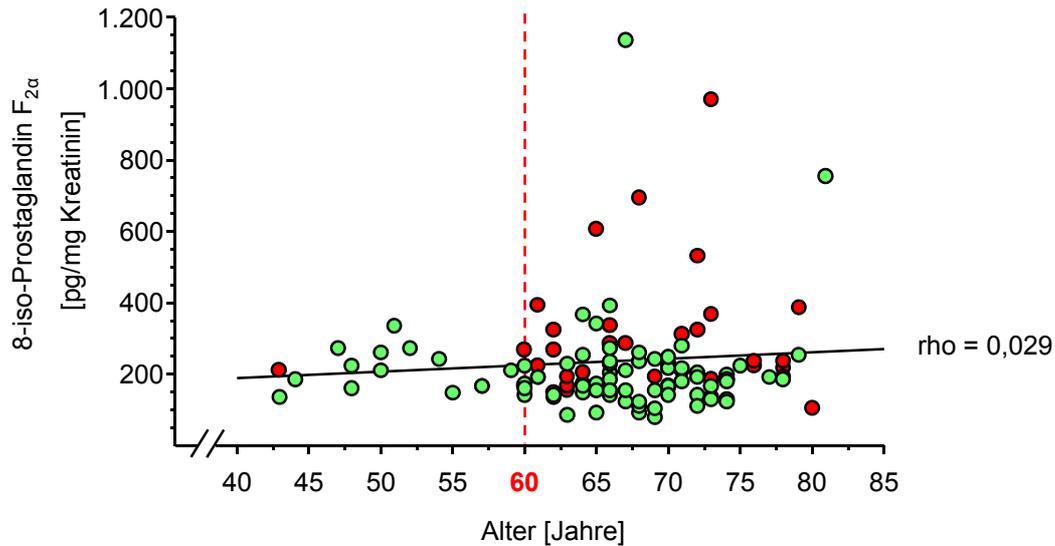


Abb. 130: Urinexkretion des Isoprostans 8-iso-Prostaglandin $F_{2\alpha}$ in Abhängigkeit vom Lebensalter. Ab einem Alter von 60 Jahren wurde signifikant häufiger eine „ASS-Low-Response“ beobachtet (siehe auch Abschnitt 3.7.1.). Die ASS-Responder-Patienten ($n = 79$) sind in grün dargestellt, die ASS-Low-Responder-Patienten ($n = 40$) in rot.

- Das Vorliegen einer Hypercholesterinämie war für das Ausmaß der 8-iso-PGF $_{2\alpha}$ -Exkretion bedeutungslos ($p = 0,4115$).
- Auch die ASS-Behandlungsdauer zeigte keinen Einfluss auf die Isoprostan-Exkretion ($\rho = 0,082$, $p = 0,4102$).
- Ob das Original-Präparat Aspirin[®] oder das Generikum HerzASS-ratiopharm[®] eingenommen wurde, war für die 8-iso-PGF $_{2\alpha}$ -Exkretion unerheblich ($p = 0,7711$).
- Bei der Analyse der Laborparameter wurden folgende Ergebnisse festgestellt: Weder für die Anzahl der Thrombozyten noch für die CRP-Plasma-Konzentration konnte ein Zusammenhang zur Isoprostan-Exkretion nachgewiesen werden (für die Thrombozytenzahl: $\rho = -0,024$, $p = 0,7913$; für den CRP-Wert: $\rho = 0,043$, $p = 0,6452$). Für die Anzahl der Erythrozyten bzw. für die Hämoglobin-Konzentration zeigte sich bei der Regressionsanalyse jeweils ein schwacher Zusammenhang ($\rho = -0,182$, $p = 0,0485$ bzw. $\rho = -0,224$, $p = 0,0150$), hervorgerufen durch sechs Patienten, die trotz einer hohen 8-iso-PGF $_{2\alpha}$ -Konzentration eine im Vergleich niedrige Erythrozytenzahl und Hämoglobin-Konzentration aufwiesen.
- Die mediane 8-iso-PGF $_{2\alpha}$ -Exkretion der Patienten, die innerhalb der letzten drei Monate vor der Aggregationsbestimmung gegen Pneumokokken, Hepatitis A oder

Tetanus/Diphtherie geimpft worden waren ($n = 4$), lag mit 327 pg/mg Kreatinin (249 – 377 pg/mg) höher als die der im gleichen Zeitraum nicht gegen eine dieser Infektionskrankheiten geimpften Patienten ($n = 70$, 226 pg 8-iso-PGF_{2α}/mg Kreatinin (192 – 278 pg/mg)), aber nicht signifikant ($p = 0,1260$, siehe auch Abb. 131, linkes Box-Diagramm). Wurde die gegen Grippe geimpfte Patientengruppe ($n = 21$) mit denjenigen Patienten verglichen, die in den vergangenen drei Monaten vor Untersuchungsbeginn keine Impfung (weder gegen Grippe noch gegen irgendeine andere Infektionskrankheit) erhalten hatten ($n = 49$), so ergab sich hinsichtlich der Isoprostan-Exkretion kein Unterschied (222 pg 8-iso-PGF_{2α}/mg Kreatinin (194 – 290 pg/mg) versus 229 pg/mg Kreatinin (184 – 276 pg/mg), $p = 0,5469$, graphisch nicht dargestellt). Die zwei Patienten, die nur wenige Tage vor ihrem Untersuchungstermin geimpft worden waren, zeigten eine mediane 8-iso-PGF_{2α}-Konzentration von 287 pg/mg Kreatinin (185 – 388 pg/mg). Den Vergleich zu den 49 nicht geimpften Patienten stellt das rechte Box-Diagramm der Abb. 131 dar.

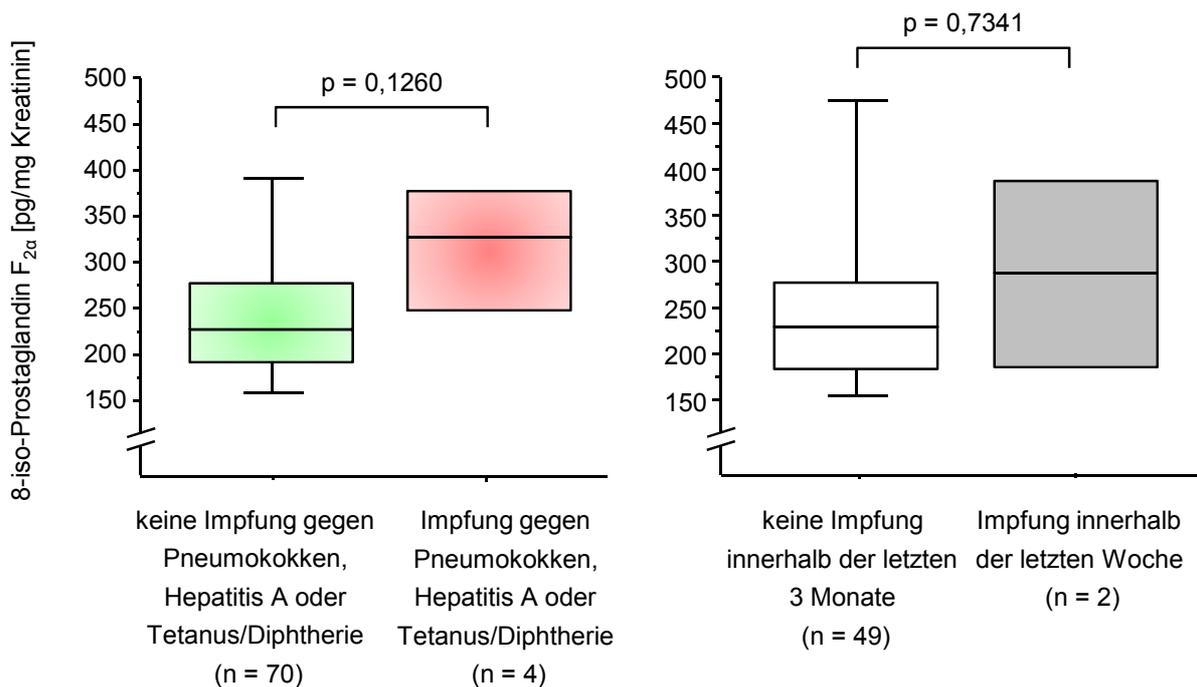


Abb. 131: Beziehung zwischen einer Impfung und der Exkretion von 8-iso-Prostaglandin F_{2α}

- Zwischen der Isoprostan-Exkretion und dem COX-2-Gehalt in den Thrombozyten konnte kein Zusammenhang nachgewiesen werden ($\rho = 0,119$, $p = 0,4355$). Das galt auch bei Betrachtung der beiden einzelnen COX-2-Formen ($\rho = 0,057$, $p = 0,7094$ für die 72 kDa-Form bzw. $\rho = 0,085$, $p = 0,5751$ für die 74 kDa-Form). Für eine thrombozytäre COX-2-Expression von über 1.000 pg/mg Gesamtprotein ($n = 13$)

wurde eine mediane 8-iso-PGF_{2α}-Konzentration im Urin von 230 pg/mg Kreatinin (216 – 343 pg/mg) bestimmt, für eine COX-2-Expression unter 1.000 pg/mg Gesamtprotein (n = 31) eine 8-iso-PGF_{2α}-Konzentration von 220 pg/mg Kreatinin (185 – 286 pg/mg), p = 0,2975.

- Die COX-2-Vollblut-Aktivität hatte ebenfalls keinen Einfluss auf die Isoprostan-Exkretion (rho = -0,148, p = 0,1996).

3.17. Polymorphismen des ADP-Rezeptors P2Y₁₂ als mögliche Ursache einer „ASS-Resistenz“

Dieses Kapitel beschäftigt sich mit der Frage, ob Polymorphismen des thrombozytären ADP-Rezeptors P2Y₁₂ eine Erklärung für die verminderte antiaggregatorische Wirksamkeit von ASS (im Fall der „Typ III-resistenten“ Patienten) liefern. Unter Ausschluss der Patienten mit einer „ASS-Resistenz“ vom Typ I wurde die Genotypisierung für insgesamt 124 Patienten durchgeführt.

Die Allel-Häufigkeiten des 52G>T-Polymorphismus und des 34C>T-Polymorphismus des P2Y₁₂-Rezeptor-Gens betragen 0,84 für das 52G-Allel bzw. 0,70 für das 34C-Allel. Die Verteilungen der Genotypen gehorchten dem Gesetz nach Hardy-Weinberg und sind in Tab. 39 angegeben. Aufgrund der geringen Anzahl an Patienten, die homozygot für das 52T-Allel (n = 2) bzw. 34T-Allel (n = 11) waren, wurden diese Patienten für die im Folgenden beschriebenen Analysen jeweils mit den heterozygoten Patienten zusammen betrachtet. (Die für die Mutation homozygoten und die heterozygoten Patienten verhielten sich für alle untersuchten Parameter gleich.)

Da zwischen der ADP- und der Kollagen-induzierten Thrombozytenaggregation ein hochsignifikanter Zusammenhang nachgewiesen werden konnte (p < 0,0001, siehe auch Abschnitt 3.4.3. Abb. 71), wurden für die Auswertungen dieses Kapitels nicht nur die Ergebnisse der ADP-induzierten Aggregation, sondern auch die Ergebnisse der Kollagen-induzierten Aggregation herangezogen.

Wie der Abb. 132 zu entnehmen ist, zeigte sich die mit 1 mg/l Kollagen induzierte maximale Thrombozytenaggregation vom 52G>T-Polymorphismus unbeeinflusst: 32,7% (21,9 –

38,6%) für die Träger mindestens eines 52T-Allels (n = 38) versus 32,5% (21,2 – 41,6%) für die Nichtträger des 52T-Allels (n = 86), p = 0,7656; linkes Box-Diagramm. Ein ähnliches Ergebnis ließ sich für den 34C>T-Polymorphismus feststellen (maximale Kollagen-induzierte Aggregation: 33,4% (22,3 – 38,9%) für die 64 Träger mindestens eines 34T-Allels versus 31,4% (21,2 – 42,1%) für die 60 Nichtträger des 34T-Allels, p = 0,9382; rechtes Box-Diagramm).

Polymorphismus	Genotyp	Häufigkeit, n (%)
52G>T	GG	86 (69,4)
	GT	36 (29,0)
	TT	2 (1,6)
34C>T	CC	60 (48,4)
	CT	53 (42,7)
	TT	11 (8,9)

Tab. 39: Häufigkeiten der P2Y₁₂-Rezeptor-Genotypen im Studienkollektiv (n = 124)

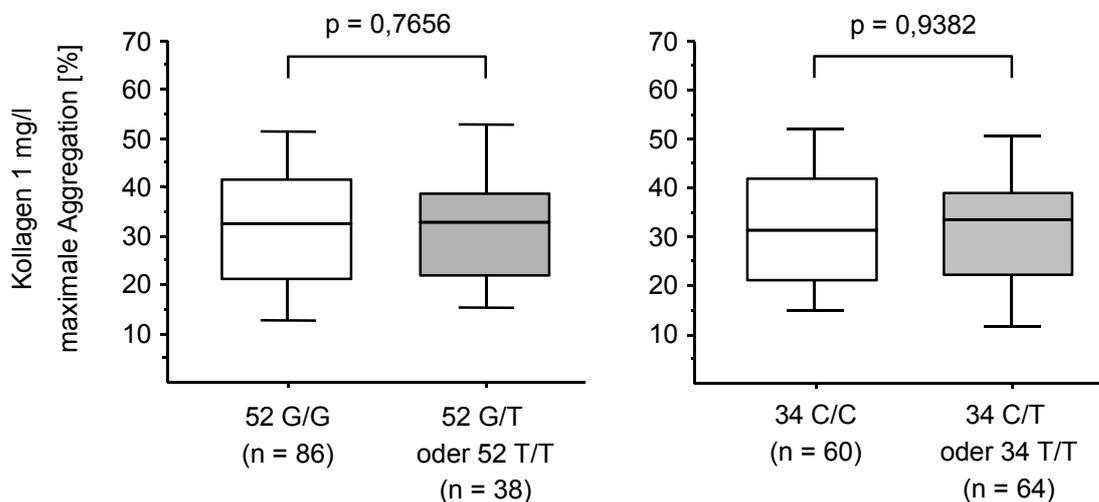


Abb. 132: Maximale Kollagen-induzierte Aggregation in Abhängigkeit vom P2Y₁₂-Genotyp

Wurde Kollagen zur Aggregationsauslösung in verschiedenen Konzentrationen eingesetzt, so unterschied sich der EC₅₀-Wert der Konzentrations-Wirkungskurve derjenigen Patienten, die Träger des 52T-Allels waren (n = 17) mit 1,54 mg/l Kollagen nicht von dem EC₅₀-Wert derjenigen Patienten, die von diesem Polymorphismus nicht betroffen waren (1,26 mg/l

Kollagen, $n = 58$), $p = 0,5600$, siehe Abb. 133 links. Auch der 34C>T-Polymorphismus hatte keinen Einfluss auf die EC_{50} -Werte (1,60 mg/l Kollagen für die 42 Träger des 34T-Allels versus 1,20 mg/l Kollagen für die 33 Nichtträger des 34T-Allels, $p = 0,2508$; siehe Abb. 133 rechts).

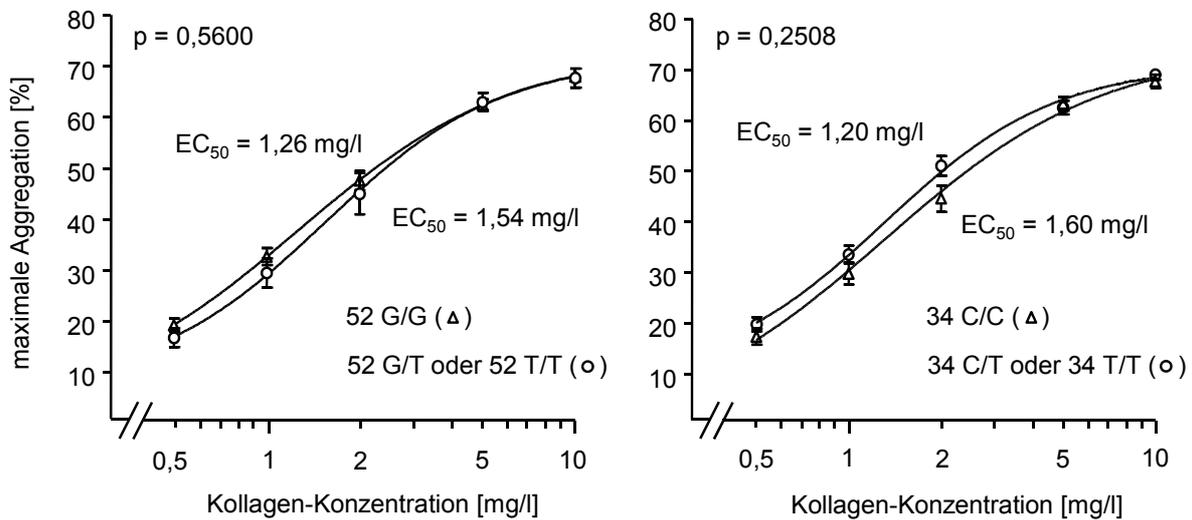


Abb. 133: Konzentrations-Wirkungskurven der Kollagen-induzierten Thrombozytenaggregation in Abhängigkeit vom $P2Y_{12}$ -Genotyp. Die Werte für die maximale Aggregation sind als Mittelwerte mit Standardfehler angegeben.

Nicht nur die Kollagen-induzierte Aggregation verhielt sich von den untersuchten Polymorphismen des ADP-Rezeptors $P2Y_{12}$ unabhängig, auch die Aggregation, die mit 2 μM ADP ausgelöst worden war, zeigte sich vom Genotyp unbeeinflusst.

Die Träger des mutierten 52T-Allels ($n = 16$) wiesen eine mediane maximale ADP-induzierte Thrombozytenaggregation von 33,1% (29,9 – 40,9%) auf, die Nichtträger des 52T-Allels ($n = 56$) eine mediane maximale Aggregation von 39,1% (31,5 – 49,7%), $p = 0,3431$; siehe Abb. 134, linkes Box-Diagramm. Für den 34C>T-Polymorphismus wurde ebenfalls keine signifikante Beziehung zu der mit ADP ausgelösten maximalen Thrombozytenaggregation nachgewiesen: 39,1% (30,8 – 50,7%) für die 39 Träger des 34T-Allels versus 34,2% (30,4 – 43,6%) für die 33 Nichtträger des 34T-Allels, $p = 0,2398$; siehe Abb. 134, rechtes Box-Diagramm.

10,5% ($n = 13$) der 124 untersuchten Patienten waren Träger beider Polymorphismen (52T und 34T). Zwischen diesen Patienten und denjenigen Patienten, die keinen der untersuchten $P2Y_{12}$ -Polymorphismen trugen (28,2% des Kollektivs, $n = 35$) bestand ebenfalls sowohl hinsichtlich der ADP- als auch hinsichtlich der Kollagen-induzierten Aggregation kein

Unterschied (auch nicht beim Einsatz unterschiedlicher Kollagen-Konzentrationen). Exemplarisch ist in Abb. 135 die maximale mit 1 mg/l Kollagen ausgelöste Thrombozytenaggregation für diese beiden Patientengruppen dargestellt (33,1% (22,4 – 39,6%) für die Träger beider Polymorphismen versus 27,4% (20,7 – 42,8%) für die Nichtträger, $p = 0,8346$).

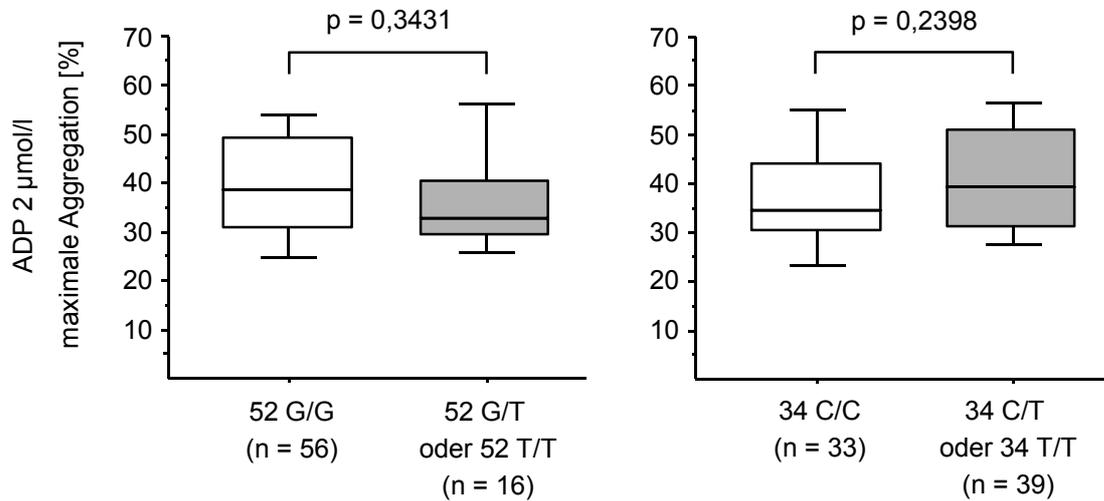


Abb. 134: Maximale ADP-induzierte Thrombozytenaggregation in Abhängigkeit vom $P2Y_{12}$ -Genotyp

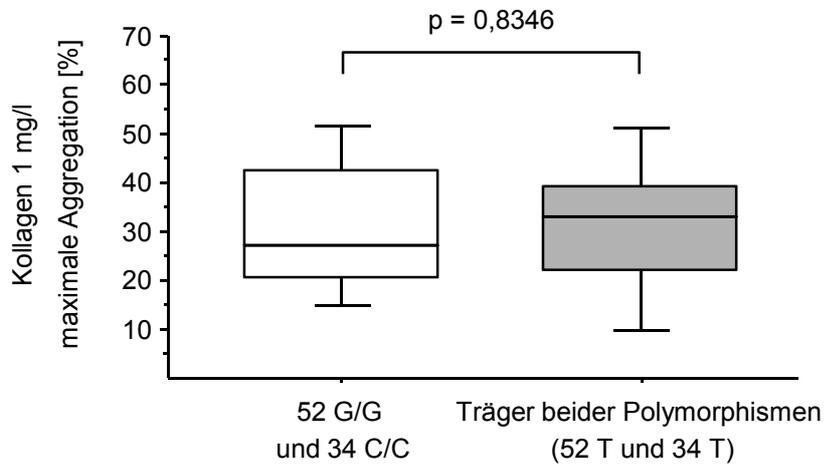


Abb. 135: Maximale Kollagen-induzierte Thrombozytenaggregation der Patienten, die Träger beider Polymorphismen, 52T und 34T, sind ($n = 13$) und der Patienten, die weder von dem einen noch von dem anderen Polymorphismus betroffen sind ($n = 35$)

3.18. Versuche zur Überwindung einer „ASS-Resistenz“ (Fallbeispiele)

Im Folgenden werden zwei Fallbeispiele vorgestellt, bei denen versucht wurde, durch Änderung der Medikation eine verbesserte ASS-Response zu erreichen.

Beim Fallbeispiel 1 handelt es sich um eine 65 Jahre alte Patientin, die sich vier Jahre zuvor einer Bypass-Operation unterzogen hatte und seitdem mit täglich 100 mg ASS (HerzASS-ratiopharm®) behandelt wurde. An ihrem ersten Untersuchungstermin wurde trotz der regelmäßigen ASS-Einnahme eine unzureichende Hemmung sowohl der Kollagen (1 mg/l)-induzierten Thrombozytenaggregation ($46,2\% \pm 2,1$) als auch der ADP (2 µmol/l)-induzierten Aggregation ($47,6\% \pm 4,9$) festgestellt, siehe auch Tab. 40 Spalte 1.

Die Patientin fand sich zu weiteren drei Untersuchungsterminen ein. Für die erste Folgeuntersuchung hatte ihr Hausarzt zunächst die ASS-Dosis auf 300 mg pro Tag erhöht. Für die zweite Folgeuntersuchung wurde die ASS-Behandlung unterbrochen und die Patientin erhielt anstelle von ASS 75 mg Clopidogrel. Für die letzte Untersuchung hatte die Patientin eine Kombination aus 100 mg ASS und 75 mg Clopidogrel eingenommen. Jede dieser drei Behandlungen erstreckte sich über einen Zeitraum von ca. 20 Tagen, bevor die Thrombozytenaggregation bestimmt wurde.

Im zweiten Fallbeispiel hatte sich eine 68-jährige Patientin vorgestellt, die zwei Jahre zuvor zwei Bypässe erhalten hatte und zunächst mit 100 mg ASS behandelt worden war, bis sich – unter laufender Therapie – ein gutes Jahr später ein Myokardinfarkt ereignet hatte. Von diesem Zeitpunkt an hatte ihr Arzt ihr zusätzlich zu den 100 mg ASS 75 mg Clopidogrel verordnet. Bei dieser Patientin sollte überprüft werden, ob diese Kombinationsbehandlung tatsächlich die Thrombozytenaggregationshemmung verbessert oder ob durch die alleinige Therapie mit 100 mg ASS das gleiche Ergebnis erzielt werden kann. Somit wurde für den zweiten Untersuchungstermin Clopidogrel für mindestens 14 Tage abgesetzt.

3.18.1. Therapie mit 300 mg ASS

Die Therapie mit 300 mg ASS lieferte kein befriedigendes Ergebnis (Fallbeispiel 1): Die maximale Kollagen-induzierte Thrombozytenaggregation konnte zwar um ca. 10% gesenkt werden (siehe Tab. 40 Spalte 2), dennoch handelte es sich definitionsgemäß (siehe Abschnitt 3.2.2. Tab. 21) nach wie vor um einen Wert aus dem Bereich der ASS-Low-Response.

3.18.2. Therapie mit 75 mg Clopidogrel

Erwartungsgemäß kam es durch die Behandlung mit 75 mg Clopidogrel (Fallbeispiel 1) zu einer nicht gehemmten Arachidonsäure (1 mmol/l)-induzierten Aggregation ($73,5\% \pm 6,7$, siehe auch Tab. 40 Spalte 3), und die maximale ADP (2 $\mu\text{mol/l}$)-induzierte Thrombozytenaggregation zeigte sich mit $33,0\% \pm 2,8$ im Vergleich zur ASS-Behandlung stärker gehemmt. Insgesamt ergab sich unter der Monotherapie mit Clopidogrel eine extrem hohe maximale Kollagen (1 mg/l)-induzierte Aggregation ($77,6\% \pm 2,0$).

3.18.3. Kombinationstherapie aus 100 mg ASS und 75 mg Clopidogrel

Unter der Kombinationsbehandlung mit 100 mg ASS und 75 mg Clopidogrel zeigte die Patientin aus dem ersten Fallbeispiel eine deutliche Reduzierung der maximalen ADP (2 $\mu\text{mol/l}$)-induzierten Thrombozytenaggregation von $47,6\% \pm 4,9$ (unter der Monotherapie mit 100 mg ASS) auf $29,9\% \pm 0,6$ (siehe auch Tab. 40 Spalte 4). In ähnlichem Ausmaß wurde die maximale Kollagen (1 mg/l)-induzierte Aggregation vermindert (von $46,2\% \pm 2,1$ auf $25,2\% \pm 0,2$).

Die Aggregationskurven nach Kollagen-Induktion sind für alle vier Behandlungsansätze des Fallbeispiels 1 in Abb. 136 dargestellt, die Aggregationskurven nach ADP-Induktion in Abb. 137.

	1	2	3	4
	100 mg ASS pro Tag	300 mg ASS pro Tag	75 mg Clopidogrel pro Tag	100 mg ASS + 75 mg Clopidogrel pro Tag
max. Aggregation [%] induziert mit				
1 mg/l Kollagen	$46,2 \pm 2,1$	$36,6 \pm 1,0$	$77,6 \pm 2,0$	$25,2 \pm 0,2$
1 mg/l Kollagen (100 μM ASS)	$45,6 \pm 5,9$	$36,4 \pm 2,0$	$28,6 \pm 4,6$	$25,2 \pm 0,5$
1 mmol/l Arachidonsäure	$9,1 \pm 0,5$	$6,1 \pm 0,4$	$73,5 \pm 6,7$	$6,6 \pm 0,3$
2 $\mu\text{mol/l}$ ADP	$47,6 \pm 4,9$	$49,6 \pm 4,2$	$33,0 \pm 2,8$	$29,9 \pm 0,6$

Tab. 40: Fallbeispiel 1. In der Tabelle sind die Werte für die maximale Aggregation, ausgelöst durch die Thrombozytenagonisten Kollagen, Arachidonsäure bzw. ADP, angegeben (Mittelwert \pm Standardabweichung, $n = 2$), die während unterschiedlicher aggregationshemmender Therapien (Spalte 1 bis 4) bestimmt worden sind.

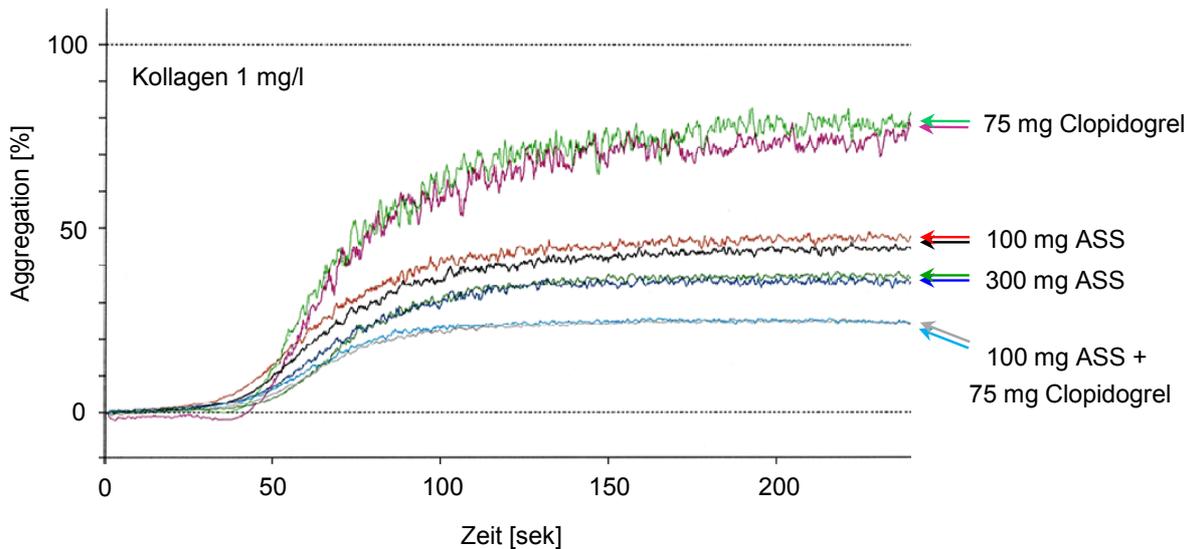


Abb. 136: Aggregationskurven, induziert mit 1 mg/l Kollagen, der Patientin aus dem Fallbeispiel 1. Die Messungen wurden für jede der angegebenen Therapien als Doppelbestimmung durchgeführt.

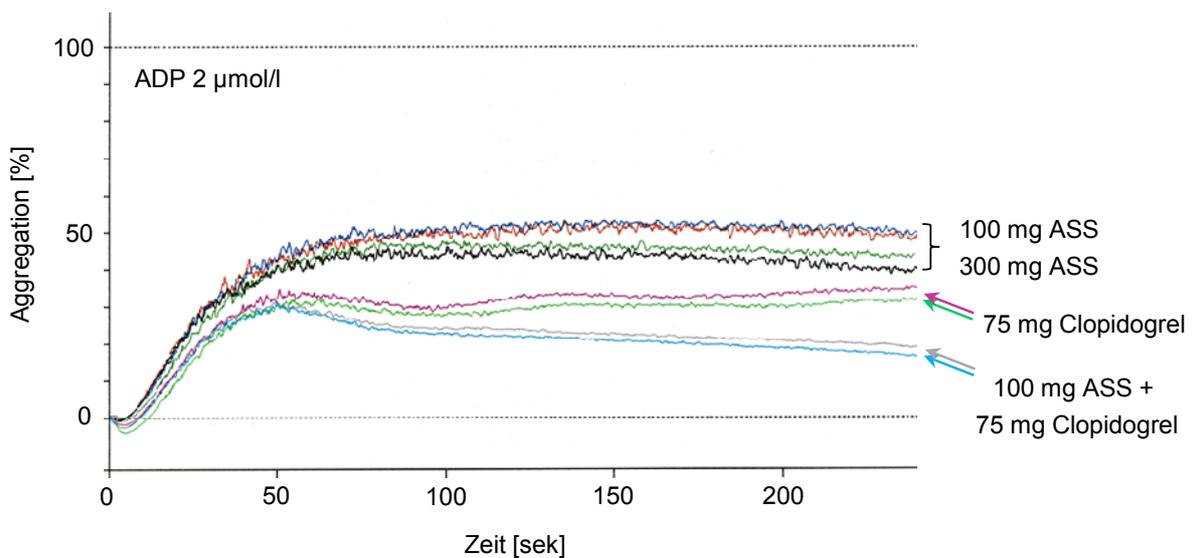


Abb. 137: Aggregationskurven, induziert mit 2 µmol/l ADP, der Patientin aus dem Fallbeispiel 1. Die Messungen wurden für jede der angegebenen Therapien als Doppelbestimmung durchgeführt.

Die Patientin aus dem Fallbeispiel 2 zeigte unter der Kombinationsbehandlung (100 mg ASS und 75 mg Clopidogrel pro Tag) eine maximale Kollagen (1 mg/l)-induzierte Thrombozytenaggregation von $29,4\% \pm 1,9$, eine maximale ADP (2 µmol/l)-induzierte Aggregation von $37,1\% \pm 1,5$ und eine maximale AA (1 mmol/l)-induzierte Aggregation von $12,6\% \pm 2,5$. Nach Absetzen des Clopidogrels, aber unter Beibehaltung der ASS-Therapie, ließ sich bei der Patientin eine erhebliche Verschlechterung sowohl der Kollagen- als auch der

ADP-induzierten Thrombozytenaggregation feststellen: Mit 1 mg/l Kollagen wurde eine maximale Aggregation von $46,4\% \pm 3,6$ ermittelt, mit 2 $\mu\text{mol/l}$ ADP eine maximale Aggregation von $63,1\% \pm 4,9$. Die maximale Arachidonsäure (1 mmol/l)-induzierte Aggregation blieb mit $13,7\% \pm 1,5$ relativ konstant.

3.18.3.1. Isoprostan-Exkretion unter der Kombinationstherapie

Sowohl die Patientin aus dem Fallbeispiel 1 als auch die Patientin aus dem zweiten Fallbeispiel wiesen unter der Monotherapie mit 100 mg ASS eine hohe Urinexkretion des Isoprostans 8-iso-PGF_{2 α} auf (608 pg 8-iso-PGF_{2 α} /mg Kreatinin für die erste Patientin bzw. 694 pg/mg Kreatinin für die zweite Patientin). Unter der Kombinationstherapie mit zusätzlich 75 mg Clopidogrel pro Tag zeigte sich für beide Patientinnen eine deutlich niedrigere Isoprostan-Exkretion (430 pg 8-iso-PGF_{2 α} /mg Kreatinin für die Patientin aus dem Fallbeispiel 1 bzw. 427 pg/mg Kreatinin für die Patientin aus dem zweiten Fallbeispiel).

4. Diskussion

4.1. Methodik der „ASS-Resistenz“-Bestimmung

Bis Anfang der 90er Jahre galt die Bestimmung der in vivo-Blutungszeit als brauchbarster Test zur Untersuchung der Thrombozytenfunktion (Nilsson et al. 1963, Harker und Slichter 1972, Guidelines on platelet function testing 1988). Bald wurden die Grenzen dieses Testverfahrens erkannt (Rodgers und Levin 1990, Lind 1991, Peterson et al. 1998) und andere weniger invasive Methoden standen zur Verfügung. Die Möglichkeit der turbidimetrischen Bestimmung der Thrombozytenaggregation (optische Aggregometrie) revolutionierte die Thrombozytenfunktionsdiagnostik (Born 1962, O'Brien 1962). Bis heute stellt die optische Aggregometrie den „Goldstandard“ unter den Thrombozytenfunktionstests dar (Harrison et al. 2007). Durch den Einsatz unterschiedlicher Thrombozytenagonisten ist es möglich, zahlreiche Informationen zu verschiedenen Aspekten der Plättchenfunktion zu erhalten (Zhou und Schmaier 2005). Es werden nicht nur Störungen der Thrombozytenfunktion in den meisten Laboratorien mit Hilfe der optischen Aggregometrie diagnostiziert (Moffat et al. 2005), auch Studien, die die Wirksamkeit antithrombozytärer Substanzen untersuchen, arbeiten zu einem hohen Prozentsatz mit dieser Methode.

Die optische Aggregometrie ist aber auch mit einigen Nachteilen behaftet. Sie erfordert ein relativ großes Probenvolumen, eine unmittelbare Bearbeitung der Proben, eine zeit- aufwendige Probenpräparation sowie einen geschulten Untersucher. Aus diesem Grund ist die optische Aggregometrie nur spezialisierten Laboren vorbehalten. Ein weiterer Kritikpunkt der Methode ist der initiale Zentrifugationsschritt zur Gewinnung des plättchenreichen Plasmas; bestimmte Plättchenfraktionen könnten verloren gehen oder Thrombozyten könnten vorzeitig aktiviert werden. Darüberhinaus befinden sich die Thrombozyten während der Aggregationsreaktion nicht in ihrer physiologischen Umgebung; es fehlt z.B. die Beeinflussung durch Erythrozyten und Leukozyten. Auch der Einfluss der Gefäßwand oder die hohen Scherkräfte, die im Bereich einer atherosklerotisch veränderten Gefäßwand vorherrschen, werden in der optischen Aggregometrie nicht berücksichtigt.

Aufgrund dieser Problematik wurden zahlreiche alternative Testverfahren entwickelt. In weitgehend physiologischer Umgebung befinden sich die Thrombozyten z.B. bei der Methode der Vollblutaggregometrie, welche auf einer elektrischen Impedanzmessung basiert (Cardinal und Flower 1980). Mit dem Ziel schneller durchführbare und in der Handhabung einfachere

Testsysteme zu erhalten, wurden verschiedene Point-of-Care (POC)-Tests entworfen. Hierzu zählt der „Rapid Platelet Function Assay“ (RPFA bzw. VerifyNow® Aspirin, Accumetrics, San Diego, CA, USA), eine automatisierte turbidimetrische Vollblutmethode, bei der die Thrombozyten durch Propylgallat (ältere Variante) oder Arachidonsäure (neue Variante) aktiviert werden und an mit Fibrinogen beschichtete Partikel binden, die in der Folge agglutinieren (Smith et al. 1999). Dieser Test erfordert kein spezialisiertes Labor und liefert innerhalb von fünf Minuten ein Ergebnis. Mittlerweile wird von vielen Laboren auch der „Platelet Function Analyzer“ (PFA-100®, Siemens Healthcare Diagnostics), ebenfalls ein POC-Test, eingesetzt. Beim PFA-100® wird die Blutprobe zunächst durch eine Kapillare angesaugt, wodurch ein erhöhter Scherstress simuliert wird. Anschließend passieren die aktivierten Thrombozyten eine mit Kollagen/Adrenalin oder Kollagen/ADP beschichtete Membran mit zentraler Öffnung. Die Zeit bis zur Okklusion dieser Öffnung wird als Maß für die Plättchenfunktion herangezogen (Mammen et al. 1998). Der „Cone and Plate(let) Analyzer“ (Impact®, DiaMed, Cressier, Schweiz), ein weiterer POC-Test zur Überprüfung der antithrombozytären Therapie, ist seit kurzer Zeit verfügbar (Spectre et al. 2005).

Aufgrund der Tatsache, dass Thrombozyten bestimmte Oberflächenrezeptoren (z.B. P-Selektin) erst im aktivierten Zustand exprimieren, sind auch durchflusszytometrische Verfahren zur Thrombozytenfunktionsbestimmung geeignet (Schmitz et al. 1998, Michelson und Furman 1999, Michelson 2006). Einige Untersucher verwenden häufig in Kombination mit anderen Thrombozytenfunktionstests die Thrombelastographie (TEG). TEG-Geräte werden traditionell in der Blutgerinnungsdiagnostik eingesetzt, haben heute aber auch in der Plättchenfunktionsdiagnostik Bedeutung erlangt, da durch die Verwendung von Agonisten wie AA und ADP mit Hilfe des TEG® Platelet Mapping™ Assay (Haemoscope Corporation, Niles, IL, USA) auch eine Hemmung der Thrombozytenaggregation quantifiziert werden kann (Bowbrick et al. 2003, Tantry et al. 2005).

Eine weit verbreitete Methode ist die Bestimmung von TxB₂ im Serum (mittels ELISA) als Maß für die COX-abhängige Thrombozytenaktivierung. Der Nachweis der TxB₂-Metabolite (z.B. 2,3-dinor-TxB₂ oder 11-dehydro-TxB₂) im Urin lässt einen Rückschluss auf die TxA₂-Synthese in vivo zu und damit auf die systemische Thrombozytenaktivierung.

All die vorbenannten Methoden werden für Untersuchungen zur „ASS-Resistenz“ eingesetzt. Dabei beeinflusst die jeweilige Methode entscheidend die Prävalenz einer „ASS-Resistenz“ (Hovens et al. 2007). So verglichen z.B. Hézard et al. die optische Aggregometrie mit dem

PFA-100[®] und stellten fest, dass je nach Methode eine andere Häufigkeit der „ASS-Resistenz“ in demselben Kollektiv resultierte: 9% wurden mittels optischer Aggregometrie als „resistent“ eingestuft und 52% mittels PFA-100[®] (Hézar et al. 2002). Lordkipanidzé et al. bestimmten die „ASS-Resistenz“ in einem Studienkollektiv mit 201 stabilen KHK-Patienten, die täglich ≥ 80 mg ASS/Tag einnahmen, sogar mit Hilfe sechs verschiedener Methoden. Die Häufigkeit einer „ASS-Resistenz“ schwankte zwischen 4% (optische Aggregometrie mit AA als Thrombozytenagonist) und 59,5% (PFA-100[®]). Durch Verwendung von ADP in der optischen Aggregometrie wurden je nach ADP-Konzentration entweder 10,3% (5 μ M ADP), 17,9% (10 μ M ADP) oder 51,7% (20 μ M ADP) der Patienten als „resistent“ bezeichnet. Mit Hilfe der Vollblutaggregometrie waren es 18%. Der VerifyNow[®] Aspirin Assay identifizierte 6,7%, und durch die Bestimmung von 11-dehydro-TxB₂ im Urin wurden 22,9% der Patienten als „resistent“ eingestuft. Die Testergebnisse korrelierten schlecht miteinander, so dass die Autoren schlussfolgerten, die verschiedenen Testverfahren seien unterschiedlich effektiv hinsichtlich der Identifizierung „ASS-resistenter“ Patienten (Lordkipanidzé et al. 2007).

Somit stellt sich die Frage, welche Methode ist die beste zur Bestimmung einer „ASS-Resistenz“? Die aktuelle Metaanalyse von Krasopoulos et al. ergab, dass die optische Aggregometrie grundsätzlich die wenigsten Patienten als „ASS-resistent“ einstuft, und dass die Ergebnisse der Studien, die mit dieser Methode arbeiteten, die geringste Heterogenität zeigen und das, obwohl verschiedene Agonisten verwendet wurden (Krasopoulos et al. 2008). Am stärksten wichen die Ergebnisse voneinander ab, die mit der PFA-100[®]-Methode erzielt wurden. Außerdem ist die Inzidenz der „ASS-Resistenz“ mit dieser Methode deutlich höher im Vergleich zu den anderen Testverfahren (Krasopoulos et al. 2008). Dies könnte daran liegen, dass die Verschlusszeit im PFA-100[®] stark von der von-Willebrand-Faktor (vWF)-Aktivität abhängt (Jilma 2001), möglicherweise sogar stärker als von der Thrombozytenfunktion (Haubelt et al. 2005). Haubelt et al. konnten bei gesunden Probanden zeigen, dass die Verschlusszeit signifikant mit der vWF-Plasma-Konzentration assoziiert war, jedoch nicht mit der Thrombozytenaggregation (Haubelt et al. 2005). Etliche Untersuchungen zeigten, dass erhöhte vWF-Konzentrationen mit dem Unvermögen von ASS, die Verschlusszeit zu verlängern, einhergingen (Chakroun et al. 2004, Harrison et al. 2005, McCabe et al. 2005). Mehrere Untersucher halten die PFA-100[®]-Methode – im Gegensatz zur optischen Aggregometrie – für die Beurteilung der ASS-Wirkung bei stabilen KHK-Patienten für nicht aussagekräftig (Eikelboom und Hankey 2003, Gum et al. 2003, Steinhubl et al. 2003, Jilma 2004).

Dennoch zeigte sich in mehreren Studien für die mittels PFA-100[®] identifizierten „ASS-resistenten“ Patienten ein Zusammenhang zu vaskulärbedingten Ereignissen (Grundmann et al. 2003, Lanza et al. 2003, Frossard et al. 2004, Fuchs et al. 2006, Christie et al. 2008). Letztendlich entscheidet die Fähigkeit eines Tests, klinische Ereignisse vorherzusagen, darüber, ob eine Methode zur Identifizierung „ASS-resistenter“ Patienten geeignet ist oder nicht. Für die meisten der oben aufgeführten Methoden existieren Studien, die eine Assoziation zwischen der im Labor ermittelten „ASS-Resistenz“ und der kardiovaskulären Ereignisrate beobachteten (Harrison et al. 2007, Gurbel et al. 2007a). Allerdings ist die Studienlage aufgrund geringer Fallzahlen zum Teil recht begrenzt. Einige der Methoden sind noch relativ neu (VerifyNow[®] Aspirin mit AA als Agonist, Impact[®] „Cone and Plate(let) Analyzer“, TEG[®] Platelet Mapping[™]), andere Methoden sind sehr kostenintensiv und daher nicht weit verbreitet (z.B. die durchflusszytometrischen Untersuchungen). In der Metaanalyse von Krasopoulos et al. konnte für diejenigen Patienten, die mittels optischer Aggregometrie als „resistent“ eingestuft wurden, das höchste Risiko für wiederkehrende kardiovaskuläre Ereignisse ermittelt werden (Krasopoulos et al. 2008). Diese Daten verdeutlichen, dass nach wie vor der „historische Goldstandard“, die optische Aggregometrie, eine der geeignetsten Methoden zur „ASS-Resistenz“-Bestimmung ist. Auch die Analyse der TxB₂-Metabolit-Exkretion ist eine geeignete Methode, da in einer großen Studie mit zunehmender Ausscheidung des TxB₂-Metaboliten 11-dehydro-TxB₂ ein signifikanter Anstieg der kardiovaskulären Ereignisrate beobachtet wurde (Eikelboom et al. 2002, siehe auch Kapitel 1. Abschnitt 1.4.4.).

Ein grundlegendes Problem bei der Bestimmung der „ASS-Resistenz“ ist, dass keine Methode in der Lage ist, jede Komponente der komplexen Thrombozytenfunktion zu erfassen. Einige Methoden sind eher COX-spezifisch (z.B. die optische Aggregometrie mit AA als Agonist, die TxB₂-Metabolit-Bestimmung im Urin), andere COX-unspezifisch (z.B. die optische Aggregometrie mit Kollagen oder ADP als Agonist, PFA-100[®]), wodurch sich zu einem großen Teil die unterschiedlichen Studienergebnisse (siehe oben sowie Abschnitt 1.4.3. Tab. 2) erklären lassen. Somit ist es derzeit auf dem Gebiet der Erforschung der „ASS-Resistenz“ die beste Lösung, mehrere Methoden miteinander zu kombinieren. Hierzu schlägt ein Grundsatzpapier der „International Society on Thrombosis and Haemostasis (ISTH) Working Group on Aspirin Resistance“ (Michelson et al. 2005, Pulcinelli und Riondino 2006) vor, zunächst die Klassifikation nach Weber et al. (2002) zu berücksichtigen, um deutlich zwischen Thromboxan-abhängiger und Thromboxan-unabhängiger „ASS-Resistenz“ („ASS-

Pseudoresistenz“) zu unterscheiden, d.h. die optische Aggregometrie ist die empfohlene Methode. Weiterhin soll neben Kollagen auch AA und ADP als Thrombozytenagonist eingesetzt werden. Darüberhinaus wird die Bestimmung von TxB₂ in den Aggregationsüberständen empfohlen sowie der Einsatz von COX-1- und COX-2-Inhibitoren in vitro. Außerdem rät die Arbeitsgemeinschaft, eine mögliche Non-Compliance nicht außer Acht zu lassen und schlägt die Bestimmung der ASS-Metabolite vor. Zusätzlich befürworten die Autoren, die TxB₂-Metabolit-Exkretion zu untersuchen (Pulcinelli und Riondino 2006). Die vorliegende Arbeit verfährt entsprechend dieser aktuellen Empfehlungen.

Welches Testverfahren für eine routinemäßige Überprüfung der Thrombozytenfunktion bei Patienten unter einer ASS-Therapie geeignet wäre, ist nicht geklärt. Derzeit wird keine Routineuntersuchung empfohlen (Michelson et al. 2005, Szczeklik et al. 2005, Harrison et al. 2007, Patrono und Rocca 2008).

4.2. „ASS-Resistenz“ vom Typ I

In der vorliegenden Arbeit zeigten von 130 stabilen KHK-Patienten vier Patienten (3,1%) eine „ASS-Resistenz“ vom Typ I nach Weber, da sich durch den Zusatz von ASS in vitro sowohl eine deutliche Verbesserung der Kollagen-induzierten Thrombozytenaggregation als auch der TxB₂-Bildung erzielen ließ (siehe Abschnitt 3.2.1.). Diese Patientengruppe wies im Vergleich zu allen anderen Patienten eine signifikant höhere COX-1-Vollblut-Aktivität auf, die durch ASS in vitro unterdrückt werden konnte (vgl. Abschnitt 3.5.), d.h. ASS wäre im Prinzip bei dieser Form der „Resistenz“ in der Lage, seinen Wirkmechanismus an der COX auszuüben und einen aggregationshemmenden Effekt hervorzurufen, nur scheinbar wird die thrombozytäre COX in vivo nur unzureichend von ASS erreicht.

Die restlichen 126 Patienten zeigten zwar gewisse interindividuelle Schwankungen hinsichtlich der TxB₂-Bildung während der Aggregationsreaktion (von 40 pg/ml bis 503 pg/ml), die durch ASS in vitro signifikant beeinflusst werden konnten (vgl. Abb. 52), diese spiegelten aber lediglich den Einnahmezeitpunkt der ASS-Tablette wider (siehe Abschnitt 3.10.2. sowie Abb. 93) und hatten keinen Einfluss auf die Thrombozytenaggregation (Abb. 94). Ein analoges Ergebnis wurde für die COX-1-Aktivität im Vollblut beobachtet (siehe Abschnitt 3.10.3.).

4.2.1. Mangelnde Compliance

Grundsätzlich sollte beim Auftreten einer „Typ I-Resistenz“ an die Möglichkeit einer Non-Compliance gedacht werden. In der Tat ergab die Untersuchung der ASS-Abbauprodukte Salicylsäure und Salicylursäure im Urin bei drei der vier „Typ I-resistenten“ Patienten ein vollständiges Fehlen beider Metabolite (vgl. Abschnitt 3.3. sowie 3.10.5.). Bei diesen drei Patienten ist somit eine Non-Compliance sehr wahrscheinlich. Allerdings variierte das Ausmaß der ungenügenden ASS-Wirkung erheblich: Die Patienten 2 und 3 (siehe Tab. 30) zeigten eine bei weitem nicht so stark erhöhte COX-1-Aktivität im Vergleich zu Patient 4 (siehe Abschnitt 3.5. sowie Abb. 77); außerdem war die Aggregationsreaktion (vgl. Abb. 50 und Abb. 70) und TxB₂-Bildung (vgl. Abb. 53 und Abb. 63) zwar unzureichend gehemmt, aber nicht in so hohem Ausmaß wie bei Patient 4. Somit war bei Patient 2 und 3 noch ein gewisser, wenn auch unbefriedigender, ASS-Effekt vorhanden. Bei Patient 4 muss hingegen eine ausgeprägte Non-Compliance vorgelegen haben. Dieser Patient wurde auch – im Gegensatz zu den meisten anderen Patienten dieser Studie – erst am Tag der Untersuchung über das Wesen und die Bedeutung der Studie aufgeklärt. Die Mehrzahl der Patienten hatte mindestens zwei Wochen vor dem geplanten Termin ein Informationsblatt zur Studie erhalten, so dass diesen Patienten bewusst war, dass der regelmäßigen täglichen ASS-Einnahme im Rahmen dieser Studie eine besondere Bedeutung zukam. Diese Vorgehensweise hat mit Sicherheit den Anteil nicht einnahmetreuer Patienten minimiert, denn der Blick in die Literatur zeigt, dass eine größere Anzahl kardiovaskulärer Patienten die verordnete ASS-Therapie nicht einzuhalten scheint.

So untersuchten Schwartz et al. die AA-induzierte Thrombozytenaggregation bei 190 ASS-behandelten Patienten, die in der Vergangenheit einen Myokardinfarkt erlitten hatten. Bei 17 Patienten (9%) wurde keine Hemmung der Aggregation beobachtet. Anschließend erhielten die Patienten unter Aufsicht 325 mg ASS. Zwei Stunden später wurde die Aggregation erneut überprüft, diesmal zeigte nur ein Patient eine nicht inhibierte Aggregation (Schwartz et al. 2005).

Cotter et al. bestimmten bei 73 Post-MI-Patienten unter laufender ASS-Therapie die TxB₂-Konzentrationen im Serum und identifizierten 21 Patienten mit intakter TxB₂-Produktion. Nach eingehender Befragung stellte sich heraus, dass mehr als die Hälfte dieser Patienten (12 von 21 Patienten) ASS nicht oder nur unregelmäßig eingenommen hatte (Cotter et al. 2004).

Wahrscheinlich ist die Non-Compliance die Hauptursache einer „Typ I-Resistenz“. Die Folgen einer mangelnden Einnahmetreue sind naheliegend. So konnten Cotter et al. in einem 12-monatigen Follow-up zeigen, dass die Patienten mit Non-Compliance eine vierfach erhöhte Inzidenz rekurrenter kardiovaskulärer Ereignisse aufwiesen (Cotter et al. 2004). Auch kurzfristige Unterbrechungen der ASS-Therapie, z.B. für zahnärztliche Eingriffe, sind mit einem erhöhten Risiko für koronare Ereignisse assoziiert (Ferrari et al. 2005, Iakovou et al. 2005, Biondi-Zoccai et al. 2006).

4.2.2. Pharmakodynamische Interaktionen

Bei einem der Patienten mit einer „ASS-Resistenz“ vom Typ I wurde Salicylursäure im Urin entdeckt (siehe Abschnitt 3.3. sowie 3.10.5.) – ein eindeutiger Beweis, dass der Patient die ASS-Tablette eingenommen hatte. Eine genauere Überprüfung der zusätzlichen Medikation ergab, dass sich der Patient in einer Behandlung mit Ibuprofen befand, und dass er seine vor der Untersuchung letzte ASS-Tablette zusammen mit einer Ibuprofen-Tablette eingenommen hatte (vgl. Abschnitt 3.1.3.3.). Erstmals wurde von Rao et al. gezeigt, dass Ibuprofen in der Lage ist, die antithrombozytäre Wirkung von ASS aufzuheben (Rao et al. 1983). Diese Beobachtung konnte später von Catella-Lawson et al. bestätigt werden (Catella-Lawson et al. 2001). Bevor ASS den Serin-Rest 529 der COX acetyliert (siehe Abb. 2), geht ASS im Eingangsbereich der COX eine schwache Bindung mit der Aminosäure Arg 120 ein, eine Bindungsstelle, die auch von dem kompetitiven COX-Inhibitor Ibuprofen besetzt wird (Mancini et al. 1995). Bei gleichzeitiger Anwesenheit von ASS und Ibuprofen kommt es infolge einer Konkurrenz um diese Bindungsstelle zu einer Verhinderung der irreversiblen Hemmung der COX durch ASS. Da Ibuprofen im Gegensatz zu ASS ein reversibler Hemmer ist, gibt Ibuprofen die COX nach einigen Stunden wieder frei. ASS ist zu diesem Zeitpunkt bereits metabolisiert ($t_{1/2} = 15 - 20$ min). Dies erklärt, dass der Patient trotz ASS-Einnahme eine erhöhte COX-Aktivität und eine verstärkte Thrombozytenaggregation zeigte, und dass der Zusatz von ASS *in vitro* sowohl die TxB₂-Bildung als auch die Aggregation reduzieren konnte (siehe Abschnitt 3.12.1 sowie Abb. 100).

Eine weitere Patientin wurde zusätzlich zu ASS mit dem präferentiellen COX-2-Hemmer Meloxicam behandelt (siehe Abschnitt 3.1.3.3.). Bei dieser Patientin wurde keine „Typ I-Resistenz“ beobachtet. Dieser Befund deckt sich mit den Ergebnissen von van Ryn et al., die ebenfalls keine Interaktion zwischen Meloxicam und ASS feststellen konnten (van Ryn et al.

2004). Generell scheinen die NSAIDs, die bevorzugt die COX-2 hemmen, nicht mit ASS zu interagieren; das konnte z.B. für Diclofenac (Catella-Lawson et al. 2001), Celecoxib (Wilner et al. 2002, Renda et al. 2006, Gladding et al. 2008) und für das vom Markt genommene Rofecoxib (Catella-Lawson et al. 2001) gezeigt werden.

Eine Abschwächung der antithrombozytären ASS-Wirkung wurde nur für nicht-selektive COX-Hemmer nachgewiesen – neben Ibuprofen auch für Naproxen (Capone et al. 2005, Gladding et al. 2008) und Indometacin (Livio et al. 1982, Gladding et al. 2008).

In mehreren Arbeiten ließ sich für die kombinierte Therapie von ASS und Ibuprofen ein Zusammenhang zu einem erhöhten Risiko für tödliche und nicht-tödliche vaskuläre Komplikationen feststellen, zum Beispiel in einer Post-hoc-Analyse der Physicians' Health Study (Kurth et al. 2003) und in einer Beobachtungsstudie bei Patienten mit bestehender kardiovaskulärer Erkrankung (MacDonald et al. 2003). In einer aktuellen dänischen Studie von Gislason et al. kamen die Autoren zu dem Ergebnis, dass Patienten nach einem Myokardinfarkt trotz ASS-Behandlung ein erhöhtes Sterberisiko haben, wenn sie zusätzlich Ibuprofen erhalten hatten. Unter höheren Dosierungen von Ibuprofen (>1.200 mg/Tag) war das relative Sterberisiko sogar mehr als verdoppelt (Gislason et al. 2006). Diese Studien unterstützen die Hypothese der klinischen Relevanz einer ASS-Ibuprofen-Interaktion.

Wahrscheinlich ist, dass die in einigen der bisherigen „ASS-Resistenz“-Studien beobachtete persistierende TxB₂-Synthese trotz ASS-Einnahme (z.B. in der Studie von Eikelboom et al. 2002) für eine nicht unerhebliche Anzahl von Patienten auf einer derartigen Interaktion beruht haben könnte. Die Studien hatten zum Teil die Einnahme von NSAIDs als Ausschlusskriterium definiert, zum Teil nicht. In Anbetracht der Tatsache, dass NSAIDs zu den sehr häufig eingenommenen Arzneimitteln zählen, erscheint die Gefahr dieser Interaktion recht hoch (FitzGerald 2003). Wenngleich die medizinischen Fachkreise informiert sind, besteht jedoch das Problem, dass einige NSAIDs ohne Rezept erhältlich sind – in Deutschland z.B. Ibuprofen und Naproxen.

4.2.3. Pharmakokinetische Ursachen

Untersuchungen von Benedek et al. haben gezeigt, dass die orale Bioverfügbarkeit von ASS beachtlichen intra- und interindividuellen Schwankungen unterliegt (Benedek et al. 1995). Die Autoren behandelten gesunde männliche Probanden an drei Tagen mit je 80 mg ASS,

wobei zwischen jeder Dosis eine zweiwöchige Auswaschphase eingehalten wurde. Sie bestimmten jeweils die Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve (AUC) für ASS im Plasma. Die AUC war sehr variabel, und bei einigen Probanden mit besonders niedriger AUC konnte gleichzeitig eine verminderte ASS-Wirkung auf die AA-induzierte Aggregation festgestellt werden. Allerdings konnte der umgekehrte Zusammenhang nicht bestätigt werden: Eine reduzierte systemische Verfügbarkeit bedeutete nicht, dass die Thrombozyten unzureichend gehemmt waren.

Da niedrig dosiertes ASS im Wesentlichen präsystemisch zur Wirkung kommt (vgl. Abschnitt 1.2.2. und 1.2.4.), kann anhand der Überprüfung der AUC im systemischen Kreislauf ebenso wenig wie anhand der in der vorliegenden Arbeit bestimmten ASS-Metabolit-Exkretion beurteilt werden, ob pharmakokinetische Ursachen zur verminderten ASS-Wirkung beigetragen haben. Hierzu müsste die präsystemische ASS-Konzentration ermittelt werden, die allerdings schwer zugänglich ist. Somit könnten prinzipiell bei „Typ I-resistenten“ Patienten auch pharmakokinetische Variationen, die in erster Linie die Resorption betreffen und nicht die Metabolisierung in der Leber, als Ursache der „Resistenz“ in Frage kommen.

Zu diesem Schluss kamen auch Gonzalez-Conejero et al., die in einer kürzlich publizierten Arbeit 24 gesunde Probanden mit 100 mg ASS behandelten und bei 33% mit Hilfe der PFA-100[®]-Methode (vgl. Abschnitt 4.1.) eine „ASS-Resistenz“ identifizierten. Nach dem Zusatz von 30 μ M ASS in vitro war kein Fall von „Resistenz“ mehr zu beobachten. Bei einer anschließenden Behandlung der Patienten mit 500 mg ASS waren die Verschlusszeiten ebenfalls adäquat verlängert. Daraus schlossen die Autoren, dass Unterschiede in der Pharmakokinetik, beispielsweise in der Absorption, eine Rolle spielen könnten (Gonzalez-Conejero et al. 2005).

4.2.3.1. Pharmakokinetische Interaktionen

Zum Teil wird als mögliche Ursache einer „ASS-Resistenz“ die pharmakokinetische Interaktion zwischen ASS und Medikamenten, die die Magensäure neutralisieren (z.B. Protonenpumpenhemmer), diskutiert (Fernández-Fernández 2002, Hankey und Eikelboom 2006). ASS liegt bei physiologischem Magen-pH überwiegend in nicht ionisierter, d.h. lipidlöslicher Form vor, so dass die Resorption von ASS bereits im Magen beginnt. Giraud et al. konnten an Ratten zeigen, dass eine Erhöhung des Magen-pH durch die Applikation von Omeprazol zu einer Reduktion sowohl der Resorption als auch der Bioverfügbarkeit von

ASS führt (Giraud et al. 1997). Sobald der Magen-pH über den pK_a -Wert von ASS (3,5) steigt, liegt ASS größtenteils in ionisierter Form vor. Ab pH 6,5 wird ASS im Magen nicht mehr resorbiert (Hollander et al. 1981). Da es in der Arbeit von Giraud et al. durch Omeprazol zu einer Reduzierung der ASS-Konzentration im Blut, nicht aber zu einer Beeinflussung der Salicylsäure-Konzentration kam, vermuteten die Autoren, dass die Absorption infolge des hohen Magen-pH verstärkt in Richtung Darm verlagert wurde. Im Darm würde ASS vermehrt durch Esterasen hydrolysiert, so dass infolge weniger ASS, dafür mehr Salicylsäure resorbiert würde (Giraud et al. 1997).

In der Tat konnte in einer Studie mit 11 gesunden Probanden gezeigt werden, dass Omeprazol die Bioverfügbarkeit von ASS signifikant herabsetzte (Anand et al. 1999). Die Autoren überprüften allerdings nicht, ob auch die therapeutischen Effekte von ASS reduziert waren. Eine weitere Studie mit 14 gesunden Probanden kam zu einem entgegengesetzten Ergebnis (Iñarrea et al. 2000). Omeprazol (20 mg/Tag) hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Bioverfügbarkeit von ASS. Auch die Wirkung von 125 mg ASS auf die Blutungszeit und die Kollagen- bzw. AA-induzierte Thrombozytenaggregation war von der gleichzeitigen Therapie mit Omeprazol unbeeinflusst (Iñarrea et al. 2000).

Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass einer der in der vorliegenden Arbeit identifizierten „Typ I-resistenten“ Patienten (Patient 2, siehe Tab. 30) aufgrund eines Barrett-Ösophagus mit täglich 40 mg Esomeprazol behandelt wurde. Demnach wäre bei diesem Patienten auch eine pharmakokinetische Interaktion als „Resistenz“-Ursache denkbar. Jedoch konnten bei diesem Patienten keine ASS-Metabolite im Urin nachgewiesen werden. Nach der Theorie von Giraud et al. (s.o.) hätten aber Metabolite gefunden werden müssen. Somit erscheint bei diesem Patienten doch eine Non-Compliance wahrscheinlicher zu sein.

4.2.3.2. Magensaftresistente ASS-Formulierungen

Mit dem Bestreben, die gastrointestinalen Nebenwirkungen von ASS zu reduzieren, werden häufig magensaftresistente ASS-Zubereitungen eingesetzt. Bei diesen Zubereitungen erfolgt die Freisetzung von ASS im oberen Dünndarm bei pH 6,5. Während bei einer herkömmlichen ASS-Tablette die maximale Plasma-Konzentration (c_{\max}) bereits nach 30 bis 40 min erreicht ist, erfolgt die Absorption von ASS aus einer magensaftresistenten Tablette verzögert: Es kann bis zu 4 bis 6 Stunden dauern, bis c_{\max} erreicht wird (Cerletti et al. 2003). Dabei stellt sich die Frage, ob es durch die verzögerte Resorption teilweise zu einem frühzeitigen Abbau

von ASS noch vor Erreichen des Pfortaderbluts kommt. Da die initialen Dosisfindungsstudien überwiegend mit herkömmlichen ASS-Tabletten durchgeführt wurden, sind die derzeit empfohlenen niedrigen ASS-Dosierungen möglicherweise nicht direkt auf magensaftresistente Formulierungen übertragbar (Maree und Fitzgerald 2007).

In der Tat konnten Cox et al. in einer Cross-Over-Studie mit 71 gesunden Probanden zeigen, dass unter der Therapie mit 75 mg ASS in magensaftresistenter Darreichungsform bei 14 Probanden keine 95%ige Hemmung der TxB_2 -Synthese (siehe Abschnitt 1.2.5.) erzielt wurde, während alle Probanden unter der Therapie mit 75 mg ASS als Standardformulierung eine ausreichend inhibierte TxB_2 -Synthese aufwiesen (Cox et al. 2006). Maree et al. untersuchten 131 stabile KHK-Patienten, die mit 75 mg ASS/Tag (magensaftresistente Tabletten) behandelt wurden. Die Autoren entdeckten bei 44% der Patienten erhöhte Serum- TxB_2 -Werte. Bei diesen Patienten war die AA-induzierte Thrombozytenaggregation zum Teil nicht ausreichend gehemmt. Die Aggregation konnte in jedem Fall durch den Zusatz von ASS in vitro (50 μM) vollständig unterdrückt werden. Somit schien ASS bei einigen Patienten unterdosiert zu sein – möglicherweise aufgrund der Magensaftresistenz der Tablette (Maree et al. 2005). In einer Studie von Cerletti et al. mit gesunden Probanden wurde die Wirkung magensaftresistenter ASS-Tabletten in zwei unterschiedlichen Dosierungen überprüft. Die Autoren kamen zu dem Schluss, dass hinsichtlich der TxB_2 -Metabolit-Exkretion die tägliche Einnahme von 160 mg ASS der Einnahme von 80 mg ASS/Tag deutlich überlegen ist (Cerletti et al. 2003).

In der vorliegenden Arbeit wurden lediglich acht Patienten mit magensaftresistenten ASS-Tabletten (Aspirin[®] protect) behandelt. Von den wenigen in dieser Studie identifizierten „Typ I-resistenten“ Patienten (n = 4) befand sich ein Patient tatsächlich unter Aspirin[®] protect-Behandlung (Patient 3, siehe Tab. 30). Inwieweit die Darreichungsform in diesem Fall mit der „ASS-Resistenz“ zusammenhängt, ist fraglich. Der Patient hatte angegeben, die letzte Tablette am Morgen des Untersuchungstages eingenommen zu haben. Es konnten keine ASS-Metabolite im Urin nachgewiesen werden, möglicherweise, weil der Patient die Tablette unmittelbar vor der Urinabgabe eingenommen hatte und somit aufgrund der verzögerten Resorption noch nicht genügend ASS angeflutet war. Unter diesen Umständen könnte die magensaftresistente Formulierung tatsächlich Ursache der „Typ I-Resistenz“ sein (allerdings ließ sich der exakte Einnahmezeitpunkt nicht mehr zurückverfolgen). Die eingenommenen 100 mg ASS vom Vortag hätten somit bei diesem Patienten nicht ausgereicht, um die Aggregation über 24 Stunden konstant zu inhibieren.

4.2.4. Sonstige mögliche Ursachen einer „Typ I-Resistenz“

Wie in Abschnitt 1.2.6. beschrieben, kann bereits mit der wiederholten täglichen Gabe von 30 mg ASS ein vollständiger pharmakodynamischer Effekt erzielt werden (Patrignani et al. 1982). ASS wird jedoch zur Sekundärprophylaxe bei KHK-Patienten mit einem mindestens 2,5-fachen „Sicherheitszuschlag“ dosiert, um individuellen Schwankungen Rechnung zu tragen (Körpergewicht, Thrombozytenzahl, Geschwindigkeit des Thrombozytenumsatzes, etc.). Dennoch könnte die Möglichkeit bestehen, dass dieser „pauschale Sicherheitszuschlag“ im Einzelfall nicht ausreichend ist, insbesondere, wenn mehrere ungünstige Faktoren gleichzeitig auftreten. So steigt z.B. das Risiko, von einer „ASS-Resistenz“ vom Typ I betroffen zu sein, mit zunehmendem Körpergewicht (Maree et al. 2005, Cox et al. 2006). Auch die „Typ I-resistenten“ Patienten der vorliegenden Arbeit wiesen einen mittleren BMI von $27,7 \text{ kg/m}^2$ auf, ein Wert, der über dem Durchschnitts-BMI der übrigen Studienteilnehmer lag ($26,6 \text{ kg/m}^2$, vgl. Tab. 13).

In der Literatur lässt sich ebenfalls für Patienten mit deutlich beschleunigtem Thrombozytenumsatz eine reduzierte Wirksamkeit von ASS finden, z.B. für Patienten nach einer Bypass-Operation (Zimmermann et al. 2003). Wenn der Anteil zirkulierender Thrombozyten mit nicht acetylierter COX über 10% steigt, ist keine ausreichende Aggregationshemmung mehr gewährleistet (Di Minno et al. 1983). Allerdings konnte die „ASS-Resistenz“ der Patienten in der Arbeit von Zimmermann et al. nicht ausschließlich durch einen erhöhten Anteil nicht acetylierter COX-1 infolge des erhöhten Plättchenumsatzes erklärt werden.

Auf der Grundlage einer kürzlich veröffentlichten Arbeit von Denis et al. ergeben sich weitere interessante Erklärungsmöglichkeiten für eine „ASS-Resistenz“, u.a. auch für die „Typ I-Resistenz“. Denis et al. konnten zeigen, dass humane Thrombozyten trotz eines fehlenden Zellkerns ein funktionelles Spliceosom besitzen sowie prä-mRNA. Die Autoren stellten fest, dass Thrombozyten infolge einer Aktivierung von Oberflächenrezeptoren in der Lage sind, prä-mRNA durch Herausschneiden der Introns und Zusammenfügen der Exons (Splicing) in reife mRNA umzuwandeln, und dass die mRNA in Protein translatiert wurde (Denis et al. 2005). Es folgten Untersuchungen von Evangelista et al., in welchen beobachtet wurde, dass die Thrombozyten gesunder Probanden nach ASS-Zusatz in vitro eine komplett inhibierte TxB_2 -Synthese zeigten, wenn die Thrombozyten für 30 min mit Thrombin und Fibrinogen stimuliert wurden. Wurde die TxB_2 -Bildung allerdings nach einem 24-stündigen Stimulationszeitraum überprüft, so hatten die Thrombozyten die Fähigkeit zur TxB_2 -Synthese

zurückerlangt. Befand sich hingegen der Translationshemmer Rapamycin im Reaktionsansatz, so blieb die TxB₂-Synthese über die gesamten 24 Stunden unterdrückt. Die Autoren vermuteten, dass diesem Phänomen eine thrombozytäre de novo-Synthese von COX-1 zugrunde lag, und dass dieser Mechanismus möglicherweise eine „ASS-Resistenz“ erklären könnte (Evangelista et al. 2006).

Da in der vorliegenden Arbeit lediglich bei vier von 130 Patienten eine persistierende TxB₂-Synthese beobachtet wurde, und zudem für diese vier Patienten andere Ursachen wie z.B. Non-Compliance oder eine Ibuprofen-ASS-Interaktion sehr wahrscheinlich sind, scheint für die „ASS-Resistenz“ unter stabilen KHK-Patienten der von Evangelista et al. postulierte Mechanismus eher von untergeordneter Bedeutung zu sein.

4.3. „ASS-Resistenz“ vom Typ II

4.3.1. Ein selten auftretendes Phänomen bei stabilen KHK-Patienten

Die sog. „Typ II-Resistenz“, d.h. das direkte Versagen von ASS, die COX-Aktivität in den Thrombozyten zu hemmen, sowohl nach Einnahme von ASS als auch nach in vitro Zugabe, wird auch als die „echte Resistenz“ oder als die „Resistenz im engeren Sinne“ bezeichnet (siehe Abschnitt 1.4.5.). Diese Form der „Resistenz“ wurde für keinen Patienten der vorliegenden Studie gefunden. Es wurden zwar für zahlreiche Patienten trotz der ASS-Einnahme zum Teil sehr hohe Aggregationswerte nach Kollagen-Induktion festgestellt (siehe z.B. Abb. 48 sowie Abschnitt 3.2.2.), die sich auch nicht – im Gegensatz zu den „Typ I-resistenten“ Patienten – durch den Zusatz von ASS in vitro reduzieren ließen (siehe Abb. 57 und Abb. 58), jedoch war die TxB₂-Synthese während der Aggregationsreaktion für jeden dieser Patienten gehemmt (vgl. Abb. 61). Geringfügige Unterschiede der ermittelten TxB₂-Konzentrationen korrelierten nicht mit der Aggregation (Abb. 62, Abb. 70 links) – im Unterschied zur „Typ I-Resistenz“ (vgl. Abb. 63, Abb. 70 rechts). Die Ergebnisse des COX-1-Vollblut-Aktivitäts-Assays (siehe Abschnitt 3.5.) bestätigen, dass ASS den eigentlichen Wirkmechanismus, die Hemmung der COX-1, für jeden dieser Patienten erfüllt hat. Dies wird zusätzlich dadurch deutlich, dass keiner der Patienten ohne „Typ I-Resistenz“ eine maximale AA-induzierte Aggregation von über 20% zeigte (vgl. Abschnitt 3.4.2.).

Die „Typ II-Resistenz“ scheint somit nicht nur bei gesunden Personen ein selten auftretendes Phänomen zu sein (Gonzalez-Conejero et al. 2005, Fontana et al. 2006), sondern auch bei Patienten mit stabiler KHK. Das wird durch weitere Arbeiten bestätigt, in denen ASS größtenteils sogar in höherer Dosierung als 100 mg/Tag eingesetzt wurde (Schwartz et al. 2005, Tantry et al. 2005, Meen et al. 2008). Schwartz et al. untersuchten die AA-induzierte Aggregation und stellten nach der kontrollierten Einnahme von 325 mg ASS bei lediglich einem Patienten von 190 Patienten eine nicht inhibierte Aggregation fest (Schwartz et al. 2005). Tantry et al. verwendeten zur „ASS-Resistenz“-Bestimmung ebenfalls AA als Thrombozytenagonisten, zum einen in der optischen Aggregometrie, zum anderen in der Thrombelastographie. Die Autoren identifizierten mit beiden Methoden von 223 mit 325 mg ASS behandelten Patienten ebenfalls nur einen Fall von „Resistenz“ (Tantry et al. 2005). In den Untersuchungen von Meen et al. wurde für alle 289 getesteten KHK-Patienten, die mit 75 oder 160 mg ASS/Tag behandelt wurden, eine gehemmte AA-induzierte Aggregation beobachtet (Meen et al. 2008).

4.3.2. COX-2-Expression in Thrombozyten

In anderen Patientenkollektiven scheint die „ASS-Resistenz“ vom Typ II von größerer Bedeutung zu sein, zum Beispiel für Patienten nach einer Bypass-Operation (Zimmermann et al. 2003). Wie bereits in Abschnitt 1.7.1. beschrieben, zeigten Patienten wenige Tage nach einer Bypass-OP trotz ASS-Einnahme eine unzureichend gehemmte Aggregation und TxB₂-Bildung, die sich auch durch ASS in vitro nur zum Teil reduzieren ließ. Als mögliche Ursache dieser „Resistenz“ wurde zunächst eine teilweise COX-2-vermittelte thrombozytäre TxA₂-Synthese vermutet. In der Tat konnten Zimmermann et al. eine erhebliche Steigerung der COX-2-Expression in Thrombozyten nach Bypass-OP beobachten (Zimmermann et al. 2003). Auch in Vorversuchen zur vorliegenden Studie wurde die thrombozytäre COX-2-Expression für drei Patienten einen Tag vor und fünf Tage nach Bypass-OP untersucht und eine Zunahme der Expression festgestellt (siehe Abschnitt 3.15.1.1. Abb. 107 bis Abb. 109), allerdings in nicht so starkem Ausmaß wie für die Patienten von Zimmermann et al. beschrieben.

Entsprechend dieser Vorversuche wurde auch die thrombozytäre COX-2-Expression für die stabilen KHK-Patienten der vorliegenden Studie ermittelt. Überraschend war, dass bei immerhin 91% der untersuchten Patienten eine COX-2-Expression in den Thrombozyten nachgewiesen werden konnte, wenngleich diese deutlich niedriger lag als die entsprechende

COX-1-Expression (siehe Abschnitt 3.15.1.1.). Dies steht im Gegensatz zu mehreren Arbeiten, in denen kein COX-2-Protein in Thrombozyten identifiziert wurde (Patrignani et al. 1999, Reiter et al. 2001, Takahashi et al. 2008). Möglicherweise liegt die Diskrepanz in einer unterschiedlichen Sensitivität der Methoden begründet. Wahrscheinlicher ist jedoch, dass die Unterschiede der Studienkollektive eine Rolle gespielt haben. Die drei zitierten Studien führten ihre Untersuchungen mit gesunden Probanden durch, die vorliegende Studie mit stabilen KHK-Patienten. Interessant ist in diesem Zusammenhang eine aktuelle Studie von Riondino et al., in die Patienten eingeschlossen wurden, die nicht notwendigerweise an einer KHK erkrankt sein mussten, die aber Risikofaktoren für eine KHK mitbrachten (Bluthochdruck, eine Dyslipidämie und/oder Zigarettenrauchen). Die Autoren konnten bei 46% dieser Patienten COX-2-Protein in den Thrombozyten nachweisen (Riondino et al. 2008). Demnach könnte eine thrombozytäre COX-2-Expression möglicherweise mit der Entwicklung einer Atherosklerose zusammenhängen.

Da im Studienkollektiv kein Fall von „Typ II-Resistenz“ identifiziert worden war, wurde zunächst, wie erwartet, kein Zusammenhang zwischen einer „ASS-Low-Response“ und der COX-2-Expression in Thrombozyten entdeckt (vgl. Abb. 110). Auch eine Wirkung des selektiven COX-2-Hemmers Rofecoxib auf die thrombozytäre TxB₂-Synthese blieb erwartungsgemäß aus (vgl. Abb. 118). Die minimalen Effekte, die beobachtet wurden, hingen mit dem Einnahmezeitpunkt der ASS-Tablette zusammen (vgl. Abb. 119 und Abb. 120) und lassen vermuten, dass ein geringfügiger Anteil der TxB₂-Synthese in Thrombozyten auf die COX-2 zurückzuführen ist, dass dieser Anteil aber in keiner Beziehung zu einer verminderten ASS-Wirkung steht. Somit kann für die Patienten der vorliegenden Arbeit eine COX-2-vermittelte thrombozytäre TxB₂-Synthese als „Resistenz“-Ursache eindeutig ausgeschlossen werden.

Riondino et al. gelangten zu einem ähnlichen Ergebnis. Die Autoren zeigten für zehn Patienten mit thrombozytärer COX-2-Expression, dass die COX-2 in Anwesenheit von ASS nur zu weniger als 2% zur TxB₂-Synthese beitrug (Riondino et al. 2008). Wie eingangs beschrieben (vgl. Abschnitt 1.7.1.), konnten Rocca et al. bei Patienten, die infolge eines gesteigerten Thrombozytenumsatzes (hervorgerufen durch eine immune Thrombozytopenie oder Stammzelltransplantation) eine stark erhöhte thrombozytäre COX-2-Expression aufwiesen, eine signifikante Abnahme der thrombozytären TxB₂-Synthese durch den hochselektiven COX-2-Hemmer NS-398 beobachten (Rocca et al. 2002). Dieses Ergebnis bestätigt, dass die COX-2 an der TxB₂-Synthese in Thrombozyten beteiligt sein kann. Die

Untersuchungen von Rocca et al. zeigen aber auch, dass die COX-2-vermittelte TxB₂-Bildung für den ASS-Effekt von untergeordneter Bedeutung zu sein scheint, da bei diesen Patienten der Zusatz von 50 µM ASS in vitro eine nahezu vollständige Hemmung der TxB₂-Bildung bewirkte.

Obwohl in der vorliegenden Arbeit für alle Patienten ohne „Typ I-Resistenz“ eine supprimierte thrombozytäre TxB₂-Synthese festgestellt wurde, kam es erstaunlicherweise dennoch durch den selektiven COX-2-Hemmer Rofecoxib in Abhängigkeit von der thrombozytären COX-2-Expression zu einer signifikanten, wenngleich auch nur leichten Abnahme der Kollagen-induzierten Aggregation (siehe Abb. 116 und Abb. 117). Wenn diesem Effekt eine Bedeutung beizumessen ist, dann nur in Verbindung mit einer „Typ III-Resistenz“. Hierauf wird im Abschnitt 4.4.4.6. näher eingegangen.

Zimmermann et al. fanden für die Patienten nach Bypass-Operation, dass Celecoxib weder die TxB₂-Synthese noch die Aggregation signifikant reduzieren konnte (Zimmermann et al. 2003). Die Autoren schlussfolgerten, dass eine COX-2-Expression in Thrombozyten zwar in Verbindung mit einer „ASS-Resistenz“ beobachtet wurde, dass aber eine direkte Beteiligung der thrombozytären COX-2 an einer „Typ II-Resistenz“ ausgeschlossen werden kann.

4.3.3. Sonstige mögliche Ursachen einer „Typ II-Resistenz“

Censarek et al. machten eine interessante Beobachtung bei einigen Patienten nach Bypass-OP. Die Autoren konnten eine Hochregulation von COX-2a mRNA in Thrombozyten nachweisen (Censarek et al. 2004). COX-2a ist eine Splice-Variante der COX-2. Für das COX-2a-Protein konnte allerdings keine Enzymaktivität, gemessen anhand der Bildung von 6-keto-PGF_{1α}, festgestellt werden, so dass eine Beteiligung der COX-2a an der Entstehung einer postoperativen „ASS-Resistenz“ äußerst unwahrscheinlich ist (Censarek et al. 2007).

Die derzeit aktuellste Erklärungsmöglichkeit für die „Typ II-Resistenz“ nach Bypass-OP stammt von Mattiello und Mitarbeitern. Die Autoren konnten für den in Thrombozyten vorkommenden unidirektionalen organischen Anionen-Transporter MRP4 (Ritter et al. 2005) zeigen, dass ASS mit Hilfe dieses Transporters aus Thrombozyten ausgeschleust werden kann (Mattiello et al. 2007). Die Autoren beobachteten eine verstärkte Anreicherung von ASS und Salicylsäure in Thrombozyten, wenn diese mit dem MRP4-Inhibitor Dipyridamol behandelt wurden. Gleichzeitig wurde die COX-Hemmung, gemessen anhand der TxB₂-Produktion, um

41% gesteigert. Außerdem zeigten Plättchen, die aus MRP4-siRNA transfizierten Megakaryozyten hervorgingen, eine deutlich geringere TxB₂-Synthese im Vergleich zu Thrombozyten aus nicht transfizierten Megakaryozyten. Für die Thrombozyten von Patienten nach Bypass-OP konnten Mattiello et al. sowohl eine Überexpression von MRP4 nachweisen als auch eine Reduzierung der TxB₂-Produktion in Gegenwart von Dipyridamol um 49%. Somit machten die Autoren einen verstärkten Auswärtstransport von ASS über MRP4 für die „ASS-Resistenz“ nach Bypass-OP verantwortlich (Mattiello et al. 2007).

Darüberhinaus existieren in der Literatur einige weitere Hypothesen zur „ASS-Resistenz“ vom Typ II, z.B. Polymorphismen des COX-1-Gens (Michelson et al. 2006). Maree et al. führten einen Teil der variablen ASS-Wirkung auf Variationen im COX-1-Gen zurück, da die Autoren einen Zusammenhang zur AA-induzierten Thrombozytenaggregation und TxB₂-Synthese herstellen konnten (Maree et al. 2005). Auch Halushka et al. entdeckten für einen COX-1-Polymorphismus eine funktionelle Relevanz; dieser Polymorphismus ging allerdings mit einer erhöhten Sensitivität der COX-1 gegenüber ASS einher (Halushka et al. 2003). Im Gegensatz hierzu konnte in einer Arbeit von Hillarp et al. kein Unterschied zwischen Trägern und Nicht-Trägern verschiedener COX-1-Polymorphismen in Bezug auf die Aggregation festgestellt werden (Hillarp et al. 2003). Allerdings betraf auch keine der untersuchten Mutationen das katalytische Zentrum der COX-1. In einer aktuellen Arbeit von Takahashi et al. konnte ebenfalls kein Zusammenhang zwischen einer „ASS-Resistenz“ und Variationen im COX-1-Gen nachgewiesen werden. Die Häufigkeit des Auftretens von COX-1-Mutationen war jedoch sehr gering im untersuchten japanischen Kollektiv (Takahashi et al. 2008). Somit ist die Bedeutung von Polymorphismen des COX-1-Gens für eine „ASS-Resistenz“ weiterhin ungeklärt.

Auch posttranslationale Modifikationen der COX-1 kommen als Ursache einer „Typ II-Resistenz“ in Frage. Zum Beispiel ist bekannt, dass die Reduktion atherothrombotischer Ereignisse durch ASS bei Patienten mit Diabetes nicht so effektiv ist wie bei Patienten ohne Diabetes (ATC 2002, Sacco et al. 2003). Liegen erhöhte Blutzucker-Konzentrationen vor, so findet eine Glykierung von Proteinen statt, z.B. von Hämoglobin (Saudek et al. 2005). Es konnte nachgewiesen werden, dass eine Glykierung die Acetylierung von Proteinen verhindern kann (Watala et al. 2005). Demnach könnte möglicherweise eine vermehrte Thrombozytenprotein-Glykierung (insbesondere der COX-1) bei diabetischen Patienten mit hohen Glucose-Konzentrationen zu einer verminderten Acetylierung der COX-1 durch ASS führen und auf diese Weise eine „ASS-Resistenz“ bei Diabetikern erklären. In der vorliegenden Arbeit

konnten allerdings für die Diabetiker im Studienkollektiv (n = 14; 10,8%) bzw. für die Patienten mit einer Glucose-Konzentration im Serum von über 110 mg/dl (n = 13) keine Anzeichen einer „ASS-Resistenz“ vom Typ II festgestellt werden.

4.4. „ASS-Resistenz“ vom Typ III

Auch nach Ausschluss der in der vorliegenden Studie identifizierten Patienten mit „Typ I-Resistenz“ wurde trotz der regelmäßigen Einnahme von ASS eine erhebliche interindividuelle Variabilität der Kollagen-induzierten Thrombozytenaggregation beobachtet; die Werte für die maximale Aggregation lagen zwischen 4,9 und 72,6% (vgl. Abb. 48 und Tab. 21). Wurde ASS in vitro hinzugesetzt, blieb die Aggregation unverändert (vgl. Abb. 49). Es gab somit eindeutig Patienten, bei denen ASS nicht den gewünschten aggregationshemmenden Effekt hervorgerufen hatte.

Aus dem Histogramm in Abb. 48 geht hervor, dass es keinen klaren Grenzwert für eine unzureichende Hemmung der Kollagen-induzierten Thrombozytenaggregation durch ASS gibt. Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Arbeit diejenigen Patienten als ASS-Low-Responder eingestuft, die der obersten Terzile mit der höchsten Aggregation angehörten. Das entsprach einem Grenzwert von 36,3% für die maximale Aggregation, die mit 1 mg/l Kollagen induziert wurde und betraf 42 Patienten.

Die Patienten wurden als Low- und nicht als Non-Responder bezeichnet, da bei jedem dieser Patienten durchaus ein ASS-Effekt zu erkennen war: Die Kollagen-induzierte TxB₂-Synthese war zu annähernd 100% inhibiert (siehe Abb. 52). Auch die maximale Arachidonsäure (1 mmol/l)-induzierte Aggregation lag bei keinem Patienten höher als 20% (vgl. Abschnitt 3.4.2.), ein in der Literatur gebräuchlicher Grenzwert zur Beurteilung, ob die thrombozytäre COX ausreichend durch ASS inhibiert wurde (z.B. Tantry et al. 2005). Außerdem hatte die ASS-Einnahme zu einer Hemmung der COX-1-Aktivität im Vollblut geführt, die für die Low-Responder-Patienten gleichermaßen ausgeprägt war wie für die Responder-Patienten (vgl. Abschnitt 3.5.).

Somit erfüllten die Low-Responder der vorliegenden Arbeit alle Kriterien einer „ASS-Resistenz“ vom Typ III bzw. einer sog. „ASS-Pseudoresistenz“ (Weber et al. 2002, vgl. auch Abschnitt 1.4.5.). Der Weg, der über die thrombozytäre COX zur Thrombozytenaggregation

führt, wird bei den „Typ III-resistenten“ Patienten effektiv durch ASS gehemmt. Allerdings erfolgt die Aktivierung und Aggregation von Thrombozyten grundsätzlich durch eine Vielzahl von Agonisten, die über die Interaktion mit spezifischen Oberflächenrezeptoren verschiedene Signalwege auslösen (Davi und Patrono 2007). Dem COX-abhängigen Weg stehen weitere Aggregationsmechanismen gegenüber. Auf diese kann ASS zum Teil auch Einfluss ausüben, da die einzelnen Wege untereinander vernetzt sind. Wirkt ASS in gewünschter Weise, so wird z.B. in starkem Ausmaß die Kollagen-abhängige Aggregation gehemmt (Gawaz 2001), in geringerem Umfang auch die ADP-abhängige Aggregation (Faraday et al. 2006, Ohmori et al. 2006, Gurbel et al. 2007b). Kommt es allerdings zu einer übermäßig starken Ausprägung eines oder mehrerer COX-unabhängiger Aktivierungswege, so kann durch ASS unter Umständen keine ausreichende Aggregationshemmung mehr erreicht werden – es liegt eine „ASS-Pseudoresistenz“ vor.

Bei den „pseudoresistenten“ Patienten der vorliegenden Studie äußerte sich das Überwiegen COX-unabhängiger Mechanismen nicht nur in einer verstärkten Kollagen-induzierten Aggregation (vgl. Abb. 57 und Abb. 67), sondern auch in einer verstärkten ADP-induzierten Aggregation (siehe Abb. 71, Abb. 72 sowie Tab. 23). Obwohl die maximale AA-induzierte Aggregation bei keinem der nicht „Typ I-resistenten“ Patienten höher als 20% lag, und die thrombozytäre TxB₂-Synthese für jeden dieser Patienten so weit unterdrückt war, dass kein Zusammenhang zur Aggregation bestand, zeigten die Low-Responder erstaunlicherweise auch eine signifikant höhere Aggregation nach AA-Induktion als die Responder (siehe Abb. 68). Darüberhinaus korrelierte die durch AA ausgelöste Aggregation hochsignifikant sowohl mit der Kollagen-induzierten (vgl. Abb. 69) als auch mit der ADP-induzierten Aggregation (vgl. Abb. 73). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass AA eine Thrombozytenaggregation – wenn auch nur in geringem Umfang – über einen COX-unabhängigen Weg hervorrufen kann. Möglicherweise ist der Weg sogar stärker ausgeprägt, je stärker der COX-Weg blockiert ist (vgl. Abb. 76 links).

4.4.1. Charakterisierung der Patienten mit „Typ III-Resistenz“

In der Literatur werden zahlreiche Faktoren diskutiert, die mit der Variabilität der antithrombozytären ASS-Wirkung in Verbindung gebracht wurden. Einige dieser Faktoren traten auch im Zusammenhang mit der in der vorliegenden Arbeit identifizierten „Typ III-Resistenz“ auf.

4.4.1.1. Assoziation mit dem Alter und einer Hypercholesterinämie

Eine mangelnde ASS-Wirkung stand in deutlicher Beziehung zu einem erhöhten Lebensalter (siehe Abschnitt 3.7.1.). Die Patienten, die über 60 Jahre alt waren, zeigten eine signifikant erhöhte Kollagen- und AA-induzierte Thrombozytenaggregation (vgl. Abb. 86 bis Abb. 88). Es hatten zwar nicht viele unter 60 jährige Patienten an der Studie teilgenommen (n = 17), dennoch war von den 17 Patienten lediglich ein Patient ein ASS-Low-Responder (vgl. Abb. 85). In der Literatur ist von allen kardiovaskulären Risikofaktoren ein erhöhtes Lebensalter am häufigsten mit einer „ASS-Resistenz“ assoziiert (Grottemeyer et al. 1993, Gum et al. 2001, Alberts et al. 2004, Faraday et al. 2006, Akay et al. 2007). Faraday et al. konnten zeigen, dass dieser Zusammenhang hauptsächlich die Thrombozytenaktivierung über die COX-unabhängigen Wege betraf, d.h. die „Typ III-Resistenz“ (Faraday et al. 2007). Diese Ergebnisse könnten zum Teil erklären, dass ältere Patienten trotz einer ASS-Behandlung häufiger von wiederkehrenden kardiovaskulären Ereignissen betroffen sind als jüngere (van Wijk et al. 2005).

Auch eine Hypercholesterinämie wurde in der vorliegenden Studie mit einer „ASS-Resistenz“ assoziiert (siehe Abschnitt 3.7.2. sowie Abb. 89). Dieser Zusammenhang war allerdings nicht so stark ausgeprägt wie für das Alter. Interessant ist, dass sich die Responder und Low-Responder nicht in den am Untersuchungstag bestimmten Blutfettwerten (Gesamt-Cholesterin, HDL, LDL, Triglyceride) unterschieden (vgl. Tab. 33). Im Vergleich hierzu gibt es mehrere Arbeiten, in denen ein Zusammenhang zwischen einer verminderten ASS-Wirkung und einem erhöhten Gesamt-Cholesterin (Friend et al. 2003, Watala et al. 2004, Markuszewski et al. 2006), erhöhten LDL-Werten (Friend et al. 2003), erniedrigten HDL-Werten (Watala et al. 2004, Faraday et al. 2006, Stejskal et al. 2006) sowie erhöhten Triglycerid-Konzentrationen (Friend et al. 2003, Markuszewski et al. 2006, Stejskal et al. 2006) nachgewiesen wurde. Diese Ergebnisse decken sich mit klinischen Beobachtungen, in denen ASS bei Patienten mit erhöhtem Gesamt-Cholesterin weniger effektiv hinsichtlich der Reduktion koronarer Ereignisse war (Physicians' Health Study 1989, Meade und Brennan 2000). Möglicherweise konnte in der vorliegenden Arbeit für die Cholesterin-Werte keine direkte Verbindung zur „ASS-Resistenz“ hergestellt werden, da alle bis auf einen Patienten ein gutes HDL/LDL-Verhältnis zeigten (vgl. Abschnitt 3.1.4.). Das hing damit zusammen, dass sich die meisten Patienten zum Zeitpunkt der Untersuchung in einer Therapie mit Lipidsenkern, hauptsächlich mit niedrig dosierten Statinen, befanden (vgl. Abschnitt 3.1.3.2.). Die Blutfettwerte der Low-Responder lagen sogar tendenziell niedriger als die der Responder,

da aus der Low-Responder-Gruppe deutlich mehr Patienten mit einem Statin behandelt wurden (vgl. Tab. 31). Trotz der erfolgreich lipidsenkenden Therapie zeigten die Patienten mit der Grunderkrankung „Hypercholesterinämie“ dennoch eine erhöhte Thrombozytenaggregation. Interessant ist in diesem Zusammenhang eine aktuelle Arbeit von Tirnaksiz et al., in der mit einer Statin-Therapie – allerdings mit einer hochdosierten (Atorvastatin 40 mg/Tag) – die Häufigkeit des Auftretens einer „ASS-Resistenz“ signifikant (um 65%) reduziert werden konnte (Tirnaksiz et al. 2007). Die Autoren führten diese Wirkung auf die pleiotropen und antiinflammatorischen Effekte der Statine zurück.

4.4.1.2. Assoziation mit Entzündungsparametern, oxidativem Stress und Impfung

In der vorliegenden Arbeit gibt es mehrere Hinweise, dass eine „ASS-Resistenz“ vom Typ III mit entzündlichen Prozessen und erhöhtem „oxidativem Stress“ zusammenhängen könnte. Es ist bekannt, dass entzündliche und oxidative Vorgänge eine entscheidende Rolle in der Pathophysiologie der Atherosklerose und KHK spielen (Ross 1999, Dhalla et al. 2000, Harrison et al. 2003, Hansson 2005). Bei KHK-Patienten sind sowohl verschiedene Entzündungsmarker, wie z.B. das C-reaktive Protein (CRP), als auch Marker des „oxidativen Stresses“ (z.B. Isoprostane) im Vergleich zu Patienten ohne KHK erhöht (Danesh et al. 2004, Schwedhelm et al. 2004). Darüberhinaus können Entzündungsmarker das Risiko für vaskuläre Ereignisse vorhersagen (Danesh et al. 2004, Lindahl et al. 2000). Es gibt Arbeiten, die zeigen konnten, dass z.B. Restenosen nach PTCA häufiger bei Patienten mit erhöhten Entzündungswerten (CRP, sCD40L) auftraten; es wurde spekuliert, dass bei diesen Patienten eine durch ASS nicht beeinflussbare Thrombozytenaktivierung zu der hohen Restenoserate beigetragen haben könnte (Cipollone et al. 2003). Vor diesem Hintergrund wurden in der vorliegenden Studie sowohl Entzündungsparameter (CRP, COX-2) als auch Marker des „oxidativen Stresses“ (8-iso-Prostaglandin F_{2a}) im Zusammenhang mit der ASS-Wirkung überprüft.

Ein signifikanter Zusammenhang zwischen der CRP-Konzentration und der Thrombozytenaggregation bzw. „ASS-Resistenz“ konnte nicht nachgewiesen werden (vgl. Abschnitt 3.13.). Für die Patienten mit einem CRP-Wert ≥ 5 mg/l ($n = 10$) ließ sich eine leicht verstärkte Aggregation im Vergleich zu den Patienten mit einem CRP < 5 mg/l ($n = 112$) erkennen (siehe Abb. 103), signifikant war dieser Unterschied aber auch nicht. Möglicherweise war die Patientenzahl für diesen Vergleich zu gering. Im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit konnten Markuszewski et al. (2006) einen signifikanten Zusammenhang finden. Die Autoren

untersuchten 45 mit 75 bis 150 mg ASS behandelte KHK-Patienten, überprüften die AA- und Kollagen-induzierte Aggregation sowie die CRP-Konzentrationen im Serum und verglichen die Ergebnisse mit denen von 45 Kontrollprobanden ohne KHK, die die gleiche ASS-Dosis pro Tag einnahmen. Zunächst stellte sich heraus, dass die Patienten mit KHK – wie erwartet – höhere CRP-Konzentrationen aufwiesen als die Patienten ohne KHK. Die KHK-Patienten sprachen deutlich schlechter auf ASS an; dabei fiel die Aggregationshemmung umso schwächer aus, je höher die Serum-CRP-Konzentration war ($p = 0,0024$).

Ob CRP lediglich ein Marker für entzündliche Prozesse ist oder ob CRP aktiv an der Entstehung einer Atherothrombose beteiligt ist, ist Gegenstand aktueller Forschungen. Es gibt zahlreiche Arbeiten, die eine aktive Beteiligung vermuten lassen (Verma et al. 2006). Ein endgültiger Beweis steht jedoch noch aus (Scirica und Morrow 2006). Insbesondere ist auch der direkte Einfluss von CRP in vivo auf die Thrombozytenaggregation nicht geklärt (siehe Abschnitt 4.4.4.5.).

Interessant ist, dass in der vorliegenden Arbeit ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Serum-CRP-Konzentration und der COX-2-Expression in den Thrombozyten nachgewiesen werden konnte (vgl. Abb. 111 bis Abb. 113). Eine verstärkte thrombozytäre COX-2-Expression konnte zwar nicht die im Studienkollektiv identifizierte „ASS-Resistenz“ erklären (vgl. Abb. 110), dennoch scheint es einen Zusammenhang zur Thrombozytenaggregation zu geben (vgl. Abb. 116 und Abb. 117) – trotz der durch ASS erfolgreich inhibierten thrombozytären TxB₂-Synthese (vgl. Abb. 120 sowie Abschnitt 4.4.4.6.).

Ein weiteres Ergebnis der vorliegenden Arbeit ist, dass Patienten, die ein bis fünf Wochen vor der Aggregationsbestimmung gegen Pneumokokken, Hepatitis A oder Tetanus/Diphtherie geimpft worden waren ($n = 4$), eine verstärkte Thrombozytenaggregation im Vergleich zu denjenigen Patienten zeigten, die innerhalb der letzten drei Monate vor der Aggregationsbestimmung nicht geimpft worden waren (vgl. Abb. 105 und Abb. 106). Bei diesen vier Patienten wurde eine Restaktivität der Thrombozyten von 37% bis 53% beobachtet, so dass alle vier Patienten als ASS-Low-Responder eingestuft wurden. Für die Grippeschutzimpfung konnte dieser Zusammenhang nicht bestätigt werden. Es ist bekannt, dass eine Impfung eine vorübergehende systemische Entzündungsreaktion induziert, einhergehend mit einer Verschlechterung der Endothelfunktion (Hingorani et al. 2000). Eine Verbindung zwischen einer „ASS-Resistenz“ und einer Impfung wäre somit vorstellbar. Vermutlich müssten die Patienten unmittelbar nach einer Impfung am stärksten betroffen sein.

Im Studienkollektiv waren nur zwei Patienten in der Woche vor der Aggregationsbestimmung geimpft worden. Beide Patienten zeigten in der Tat auch eine schlechte Aggregationshemmung (vgl. Abb. 104) mit gleichzeitig erhöhter thrombozytärer COX-2-Expression im Vergleich zu den nicht geimpften Patienten (siehe Abb. 114 rechts). Denkbar wäre allerdings auch, dass andere Gründe zu der verstärkten Aggregation geführt haben, z.B. waren die vier gegen Pneumokokken, Hepatitis A oder Tetanus/Diphtherie geimpften Patienten über 60 alt und zeigten eine Hypercholesterinämie – zwei Faktoren, die eine „ASS-Resistenz“ begünstigen (siehe Abschnitt 4.4.1.1.). Diese Ergebnisse können somit lediglich einen Anstoß liefern, um den möglichen Zusammenhang zwischen einer Impfung und einer „ASS-Resistenz“ weiter zu untersuchen.

Wahrscheinlich nimmt eine akute Infektion im Vergleich zu einer Impfung stärkeren Einfluss auf die Thrombozytenaggregation, da Ausmaß und Dauer der systemischen Entzündungsreaktion bei einer Infektion stärker ausgeprägt sind (Melbye et al. 2004) als bei einer Impfung (Hingorani et al. 2000). Das würde erklären, weshalb in einer großen Studie von Smeeth und Mitarbeitern für akute Infektionen ein vorübergehend drastisch erhöhtes Risiko, einen Myokardinfarkt oder Schlaganfall zu erleiden, gefunden wurde, während für den Zeitraum von drei Monaten nach einer Impfung (gegen Grippe, Tetanus und Pneumokokken) kein gesteigertes Risiko beobachtet werden konnte (Smeeth et al. 2004).

In einer aktuellen Arbeit von Modica et al. wurden 358 Patienten mit akutem Koronarsyndrom unter ASS (75 mg/Tag)-Behandlung untersucht. Die Autoren stellten fest, dass die Patienten, die während ihres Krankenhausaufenthalts zusätzlich eine Infektion durchmachten (n = 66), eine verstärkte Aggregation zeigten im Vergleich zu den Patienten ohne Infektion. Patienten mit schwereren Infektionen (Pneumonie) waren stärker betroffen als Patienten mit leichteren (z.B. Harnwegsinfektionen). Von den zehn an einer Pneumonie erkrankten Patienten wurden neun als ASS-Non-Responder eingestuft (90%), während von den 277 Patienten ohne Infektion 128 Patienten (46%) betroffen waren (p = 0,006). Zwischen einer „ASS-Non-Responsiveness“ und einer erhöhten CRP-Konzentration bestand ein signifikanter Zusammenhang (Modica et al. 2007). Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen Kreutz et al., die in ihrer Studie 18 generell gesunde Probanden während einer gewöhnlichen Erkältung und sechs Wochen danach untersuchten. Während der Erkältung war sowohl die P-Selektin-Expression als auch die ADP (1 µM)-induzierte Aggregation signifikant höher als nach überstandener Infektion. Die Autoren führten die verstärkte Thrombozytenaktivierung und -aggregation auf entzündliche Veränderungen im Zusammenhang mit der Infektion

zurück, da es während der Erkältung zu einem Anstieg der CRP- und TNF α -Konzentrationen im Serum gekommen war, z.B. für CRP: 3,7 mg/l \pm 1,3 versus 2,2 mg/l \pm 1,5; p = 0,004 (Kreutz et al. 2007). Das bedeutet, dass sogar minimale entzündliche Veränderungen mit einer verstärkten Aggregation einhergehen können. Somit wäre es durchaus denkbar, dass Patienten, die aufgrund ihrer koronaren Herzerkrankung bereits eine verstärkte Thrombozytenaktivierung besitzen, durch zusätzliche inflammatorische Stimuli – u.a. vielleicht infolge einer aktuellen Impfung – eine Thrombozytenaktivierung erfahren, die unter Umständen durch ASS nicht ausreichend inhibiert werden kann.

Eine biochemische Verbindung zwischen einer geringgradig systemischen Entzündung und der Aktivierung von Thrombozyten bilden die Isoprostane (Davì und Patrono 2007). In der vorliegenden Arbeit wurde insbesondere bei denjenigen Patienten eine „ASS-Resistenz“ festgestellt, bei denen ein erhöhter „oxidativer Stress“, bestimmt anhand der 8-iso-Prostaglandin F $_{2\alpha}$ -Exkretion, nachgewiesen werden konnte (vgl. Abb. 125 und Abb. 126). Das Ausmaß der Kollagen-induzierten Aggregation war deutlich mit der 8-iso-PGF $_{2\alpha}$ -Ausscheidung assoziiert (vgl. Abb. 128 und Abb. 129). Isoprostane können durch Wechselwirkung mit dem Thromboxan-Rezeptor proaggregatorisch wirken (vgl. Abschnitt 1.7.2.). Da die Isoprostane unabhängig von der COX gebildet werden, lässt sich die unzureichende ASS-Wirkung, die in der vorliegenden Arbeit festgestellt wurde, zum Teil durch eine verstärkte Isoprostan-Bildung erklären. Auf diesen Zusammenhang wird im Abschnitt 4.4.4.7. näher eingegangen.

Auch die in Verbindung mit einer Impfung (gegen Pneumokokken, Hepatitis A oder Tetanus/Diphtherie) beobachtete erhöhte Thrombozytenaggregation ging mit einer verstärkten Isoprostan-Synthese einher (vgl. Abb. 131). Dieser Zusammenhang war zwar nicht signifikant, dennoch zeigten die betroffenen vier Patienten eine im Vergleich hohe mediane Isoprostan-Exkretion von über 300 pg/mg Kreatinin – ein Grenzwert, für den in der vorliegenden Studie mit relativ hoher Wahrscheinlichkeit eine „ASS-Resistenz“ vorhergesagt werden konnte (vgl. Tab. 38, siehe auch Abb. 127). Interessant wäre anhand einer höheren Fallzahl zu überprüfen, ob es nach einer Impfung zu einer vorübergehend gesteigerten Isoprostan-Bildung kommt.

In Abb. 138 sind die in der vorliegenden Arbeit ermittelten Zusammenhänge zwischen Thrombozytenaggregation, Entzündung und „oxidativem Stress“ noch einmal zusammengefasst.

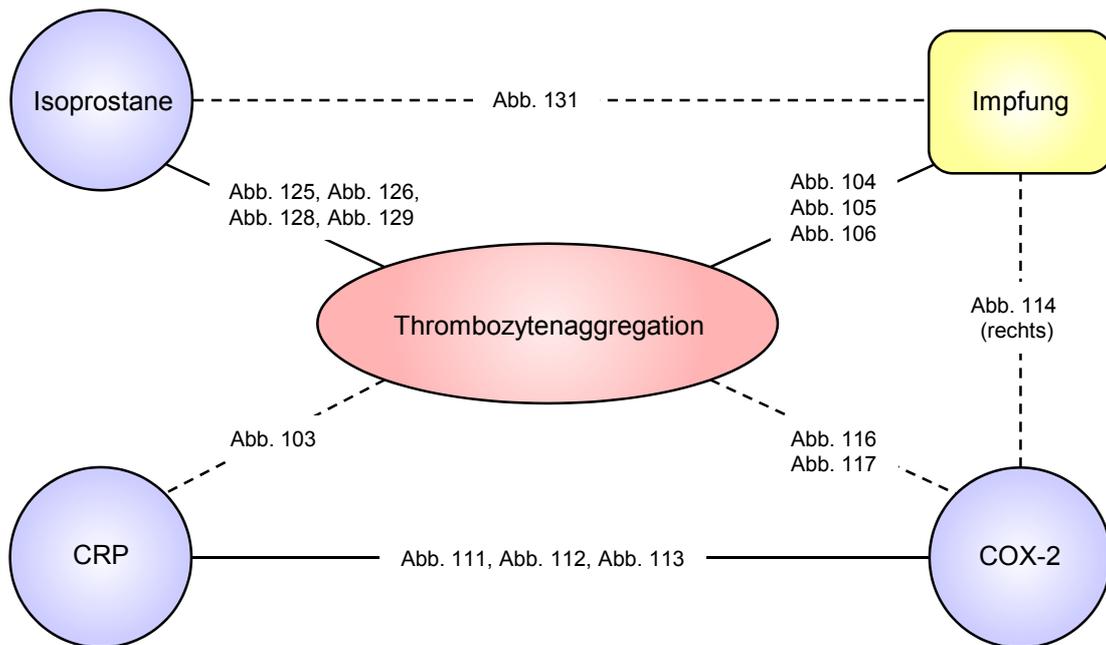


Abb. 138: Zusammenhänge zwischen Thrombozytenaggregation, Entzündungsparametern (CRP und COX-2), oxidativem Stress (Isoprostane) und Impfung. Das Schema soll lediglich die in der vorliegenden Studie ermittelten Zusammenhänge aufzeigen. Die durchgezogenen Linien stehen für signifikante Ergebnisse, die gestrichelten Linien für Ergebnisse, die einen Trend erkennen lassen.

4.4.1.3. Weitere Risikofaktoren im Zusammenhang mit einer „Typ III-Resistenz“

In der aktuellen Metaanalyse von Krasopoulos et al. stellte sich heraus, dass von allen untersuchten Patientencharakteristika das weibliche Geschlecht am häufigsten von einer „ASS-Resistenz“ betroffen war. Dieses Ergebnis wurde in sieben Studien mit insgesamt 1554 Patienten gefunden (Krasopoulos et al. 2008). Die schlechtere Aggregationshemmung bei Frauen scheint hauptsächlich in Verbindung mit einer „Typ III-Resistenz“ aufzutreten, denn der thrombozytäre COX-Weg wird nach Untersuchungen von Becker et al. durch ASS gleichermaßen effektiv bei Frauen und Männern gehemmt. Darüberhinaus waren diejenigen Frauen betroffen, für die auch schon vor der ASS-Therapie die stärkste Aggregation ermittelt worden war (Becker et al. 2006). Für die Primärprävention mit ASS konnte auch tatsächlich gezeigt werden, dass Frauen weniger von einer ASS-Therapie profitieren als Männer (Ridker et al. 2005, Berger et al. 2006). In der vorliegenden Arbeit war die Patientenzahl zu gering, um Unterschiede zwischen Frauen und Männern hinsichtlich der ASS-Wirkung feststellen zu können (siehe Tab. 24).

Auch ein erhöhter Blutdruck wird in der Literatur mit einer „ASS-Resistenz“ assoziiert (Meade und Brennan 2000, Gasparyan et al. 2008). In der vorliegenden Arbeit hatten über die Hälfte der Patienten am Untersuchungstag einen zu hohen Blutdruck (siehe Abschnitt 3.1.4.). Diese Patienten waren aber nicht häufiger von einer „ASS-Resistenz“ betroffen als die Patienten mit normalen Blutdruckwerten. Da bei den meisten Patienten des Studienkollektivs (86,9%) die Grunderkrankung Hypertonie vorlag, kann in dieser Studie der Einfluss einer Hypertonie auf die Aggregationshemmung nicht beurteilt werden.

Es ist bekannt, dass Rauchen zu einer Verstärkung der Thrombozytenaggregation führt (Davis et al. 1985, Hung et al. 1995, Ichiki et al. 1996). ASS ist nur unzureichend in der Lage, die durch das Rauchen verursachte Hyperaggregabilität der Thrombozyten zu hemmen (Davis et al. 1985, Hung et al. 1995, Ikonomidis et al. 2005, Stejskal et al. 2006). Die Raucher der vorliegenden Studie waren bis auf einen Patienten nicht „Typ III-resistent“, allerdings rauchten aktuell auch nur sechs Patienten.

Wie bereits in Abschnitt 4.3.3. erläutert, wird bei diabetischen Patienten häufig eine unzureichende antithrombozytäre ASS-Wirkung mit einer „Typ II-Resistenz“ assoziiert. Es gibt aber auch einige Arbeiten, die einen Zusammenhang zwischen einem Diabetes und einer „ASS-Resistenz“ vom Typ III nachweisen konnten (Mori et al. 1992, Watala et al. 2004, DiChiara et al. 2007). In der vorliegenden Studie waren 16,7% der ASS-Low-Responder Diabetiker und 8,3% der ASS-Responder (vgl. Tab. 24). Ein gewisser Trend zur „Typ III-Resistenz“ ist somit auch für die Diabetiker dieser Studie zu erkennen.

Patienten mit Übergewicht oder Adipositas scheinen ein besonders hohes Risiko zu haben, von einer „ASS-Resistenz“ betroffen zu sein. Für diese Patientengruppe ist in erster Linie eine ungenügende Hemmung des COX-Weges durch ASS beschrieben (Tamminen et al. 2003, Maree et al. 2005, COX et al. 2006, vgl. auch Abschnitt 4.2.4.). Allerdings konnten Davì et al. zeigen, dass adipöse Patienten neben einer erhöhten Thrombozytenaktivierung auch eine verstärkte Lipid-Peroxidation, gemessen anhand der Exkretion von 8-iso-PGF_{2α}, aufwiesen (Davì et al. 2002). Es wäre somit durchaus denkbar, dass es bei Patienten mit Adipositas zusätzlich zu einer verstärkten COX-unabhängig vermittelten Thrombozytenaggregation kommt, die in der Folge durch ASS nicht ausreichend zu hemmen wäre (vgl. Abschnitt 1.7.2. Abb. 7). In der vorliegenden Arbeit waren 66,2% der Patienten übergewichtig (n = 86) – für diese Patienten konnte allerdings nicht häufiger eine „Typ III-Resistenz“ nachgewiesen werden als für die normalgewichtigen Patienten. Auch bei den adipösen Patienten ergab sich

kein Zusammenhang zur „Typ III-Resistenz“; es hatten allerdings nur 17 Studienteilnehmer eine Adipositas (vgl. Tab. 24).

Erfreulicherweise spielte das jeweils eingenommene ASS-Präparat (Original oder Generikum) keine Rolle im Hinblick auf das Ausmaß der Hemmung der TxA₂-Synthese (vgl. Abschnitt 3.11.). Vor dem Hintergrund einer kürzlich vom Zentrallaboratorium Deutscher Apotheker (ZL) durchgeführten Reihenuntersuchung von 13 verschiedenen ASS-Präparaten, war dieses Ergebnis zu erwarten: Für alle geprüften Präparate konnte das ZL eine vergleichbare biopharmazeutische Qualität nachweisen (Potthast et al. 2003). Dass dennoch eine verstärkte Thrombozytenaggregation im Sinne einer „Typ III-Resistenz“ unter den mit HerzASS[®] behandelten Patienten im Vergleich zu den mit Aspirin[®] behandelten Patienten in der vorliegenden Studie zu beobachten war, liegt aller Wahrscheinlichkeit nach darin begründet, dass sich die beiden Gruppen in zwei entscheidenden Punkten voneinander unterschieden: Zum einen waren die Patienten der HerzASS[®]-Gruppe durchschnittlich vier Jahre älter als die Patienten der Aspirin[®]-Gruppe, zum andern waren 87,5% der HerzASS[®] behandelten Patienten von einer Hypercholesterinämie betroffen, während in der Aspirin[®]-Gruppe nur 64,3% betroffen waren. Sowohl das Alter als auch eine Hypercholesterinämie sind mit einer „ASS-Resistenz“ vom Typ III assoziiert (vgl. Abschnitt 4.4.1.1.). Eine besondere Bedeutung kann somit den Ergebnissen zum Einfluss des ASS-Präparats auf die Aggregation nicht beigemessen werden.

Eine weitere Beobachtung der vorliegenden Arbeit war, dass sich die „Typ III-resistenten“ Patienten von den Responder-Patienten durch eine geringfügig, aber dennoch signifikant niedrigere Hämoglobin-Konzentration und Erythrozytenzahl unterschieden (vgl. Tab. 32 sowie Abb. 101 links und Mitte). In einer Studie von Gum et al. zur „ASS-Resistenz“ wurde für die Hämoglobin-Konzentration ein ähnliches Ergebnis gefunden. Da die Werte für die „resistenten“ und nicht „resistenten“ Patienten trotz des signifikanten Unterschieds jeweils im Normbereich lagen, wurde dem Ergebnis keine besondere Bedeutung beigemessen (Gum et al. 2001). Auch in der vorliegenden Studie war die mittlere Hämoglobin-Konzentration bzw. Erythrozytenzahl sowohl für die Responder als auch für die Low-Responder im Referenzbereich. Zudem bestand keine Korrelation mit der Aggregation (vgl. Abb. 102 rechts).

Deutlicher als die Erythrozytenzahl war die Thrombozytenzahl mit der „ASS-Resistenz“ assoziiert (vgl. Tab. 32 sowie Abb. 101 rechts). Zwischen Thrombozytenzahl und maximaler Kollagen-induzierter Aggregation bestand eine signifikante, allerdings nur schwach

ausgeprägte, inverse Korrelation (vgl. Abb. 102 links). Die Bedeutung dieses Zusammenhangs ist fraglich, zudem die mittleren Thrombozytenzahlen sowohl für die „resistenten“ als auch für die nicht „resistenten“ Patienten im Normbereich lagen. Es mag an dieser Stelle die Frage aufkommen, ob es nicht notwendig gewesen wäre, die Unterschiede in der Thrombozytenzahl jeweils durch Verdünnung des PRP mit PPP auszugleichen – ein gebräuchliches Verfahren in der optischen Aggregometrie, da die Thrombozytenzahl als bedeutsame Einflussgröße für die Aggregation betrachtet wird (Dacie et al. 1984, Cattaneo 2003). Kürzlich konnte allerdings bewiesen werden, dass die Verdünnung mit PPP eine artifizielle Aggregationshemmung hervorruft (Cattaneo et al. 2007) – eine Beobachtung, die auch in Vorversuchen zu der vorliegenden Studie gemacht wurde, weshalb auf den Verdünnungsschritt verzichtet wurde. Heute wird von einer Einstellung der Thrombozytenzahl mit PPP abgeraten (Cattaneo et al. 2007).

4.4.2. Klinische Bedeutung einer „Typ III-Resistenz“

Zahlreiche Studien dokumentieren eine klinische Bedeutung der „ASS-Resistenz“ (siehe auch Abschnitt 1.4.4.). Drei aktuelle Metaanalysen bestätigen, dass das mangelnde oder fehlende Ansprechen auf ASS bei kardiovaskulären Patienten mit einem signifikant erhöhten Risiko für wiederkehrende kardiovaskuläre Ereignisse verbunden ist (Snoep et al. 2007, Krasopoulos et al. 2008, Sofi et al. 2008). Fast alle Studien zur „ASS-Resistenz“ haben nicht zwischen den drei „Resistenz“-Typen (vgl. Abschnitt 1.4.5.) unterschieden (z.B. Eikelboom et al. 2002, Gum et al. 2003, Yilmaz et al. 2005, Lev et al. 2006, Chen et al. 2007, Pamukcu et al. 2007). Es ist aber durchaus wichtig zu wissen, in welchem Ausmaß die COX-abhängigen Mechanismen der Thrombozytenaktivierung („Typ I- und Typ II-Resistenz“) bzw. in welchem Ausmaß die COX-unabhängigen Mechanismen („Typ III-Resistenz“) die Ereignisrate beeinflussen. Davon wäre abhängig, ob für jeden „Resistenz“-Typ die Notwendigkeit einer verbesserten antithrombotischen Therapie besteht.

Die Studie von Ohmori et al. ist eine der wenigen Studien, die sich mit der klinischen Bedeutung einer „ASS-Resistenz“ von Patienten beschäftigt hat, die trotz supprimierter COX-Aktivität eine verstärkte Thrombozytenaggregation aufwiesen. Ohmori et al. untersuchten 136 stabile Patienten entweder mit KHK oder einem Schlaganfall in der Vorgeschichte, die täglich mit 81 mg ASS behandelt wurden. Die Autoren stellten für die Quartile mit der stärksten Kollagen-induzierten Restaktivität der Thrombozyten ein 8-fach erhöhtes Risiko für

kardiovaskuläre Ereignisse innerhalb eines einjährigen Beobachtungszeitraumes fest (Ohmori et al. 2006).

Auch die vorliegende Studie beschäftigt sich mit der klinischen Bedeutung der im Studienkollektiv identifizierten „ASS-Resistenz“ vom Typ III. Es wurde eine retrospektive Analyse durchgeführt (siehe Abschnitt 3.8.). Da es sich bei den KHK-Patienten des relativ kleinen Studienkollektivs um stabile Patienten handelte, waren erwartungsgemäß nur wenige Ereignisse im Rückverfolgungszeitraum von durchschnittlich 7 Jahren eingetreten. Daher können die Ergebnisse nur mit Vorsicht interpretiert werden. Von den Low-Responder-Patienten hatten 18,4% einen Myokardinfarkt unter der ASS-Therapie erlitten (7 von 38 Patienten), während bei den Responder-Patienten nur 8,2% (6 von 73 Patienten) betroffen waren (vgl. Tab. 25). Dieser Unterschied war nicht signifikant, lässt aber möglicherweise einen Trend erkennen. Signifikant wurde dieses Ergebnis, wenn diejenigen Patienten separat betrachtet wurden, die vor der ASS-Therapie bereits einen Myokardinfarkt erlitten hatten ($n = 74$) – Patienten, die somit einem besonders hohen Risiko für erneute Ereignisse ausgesetzt waren. Interessanterweise waren von diesen 74 Patienten im Verhältnis nur wenige Patienten von einer ASS-Low-Response betroffen ($n = 20$; vgl. Tab. 26). Für diese betroffenen 20 Low-Responder war das Reinfarkt-Risiko unter ASS-Therapie allerdings signifikant erhöht im Vergleich zu den Responder-Patienten: Jeder vierte erlitt einen Reinfarkt – bei den Responder-Patienten nur jeder vierzehnte (vgl. Abschnitt 3.8.1. sowie Tab. 27).

Ein Kritikpunkt der retrospektiven Analyse mag sein, dass sich die Responder- und Low-Responder-Gruppe hinsichtlich der Rückverfolgungszeiträume deutlich voneinander unterscheiden (vgl. Abschnitt 3.8.1.). Allerdings war der mittlere Rückverfolgungszeitraum für die Responder größer als für die Low-Responder (8,4 versus 5,7 Jahre). Deshalb kann ausgeschlossen werden, dass nur aufgrund der unterschiedlich großen Zeiträume mehr Reinfarkte in der Low-Responder-Gruppe gezählt wurden.

Das Reinfarkt-Risiko scheint für ASS-Low-Responder somit größer zu sein. Die Reinfarkte traten allerdings bei den Low-Responder-Patienten nicht frühzeitiger auf als bei den Responder-Patienten. Die mittlere Zeit, die von Beginn der ASS-Therapie bis zum Auftreten des Reinfarktes vergangen war, lag für die Low-Responder bei 5 Jahren und für die Responder bei 2,5 Jahren (vgl. Abschnitt 3.8.1.). Es mag die Frage aufkommen, ob die ASS-Low-Response über den kompletten Rückverfolgungszeitraum in gleichem Maße ausgeprägt

war. Es ist mit Sicherheit ein Kritikpunkt der vorliegenden Studie, dass die Thrombozytenaggregation nur zu einem Zeitpunkt bestimmt worden ist. Es kann nicht zwangsläufig davon ausgegangen werden, dass sich die Aggregation über den gesamten ASS-Behandlungszeitraum konstant verhalten hat. In einigen Arbeiten wird z.B. von einer Abschwächung des ASS-Effekts mit zunehmender Behandlungsdauer berichtet (Helgason et al. 1994, Pulcinelli et al. 2004). Auf diese Problematik wird im nächsten Abschnitt näher eingegangen. Aber auch Zustände einer vorübergehenden „ASS-Resistenz“ sind beschrieben worden, z.B. während einer Infektion (vgl. Abschnitt 4.4.1.2.).

Die retrospektive Analyse der vorliegenden Arbeit liefert erste Hinweise, dass möglicherweise Patienten, die trotz komplett supprimierter thrombozytärer TxA₂-Synthese eine COX-unabhängig vermittelte Thrombozytenaktivität aufweisen, ein erhöhtes Risiko für wiederkehrende kardiovaskuläre Ereignisse haben. Es bleibt abzuwarten, ob die prospektive Nachverfolgung dieses Ergebnis bestätigen kann.

4.4.3. Die ASS-Wirkung in Abhängigkeit von der Behandlungsdauer

In der Literatur sind nur wenige Studien zu finden, in denen die Messungen zur Thrombozytenaggregation über einen längeren ASS-Einnahmezeitraum mehrmals wiederholt wurden. FitzGerald et al. untersuchten die Aggregation von gesunden Probanden einmal pro Woche über einen Zeitraum von zwei Monaten. Trotz einer schrittweisen Erhöhung der ASS-Dosis wurde eine Abnahme der Hemmwirkung auf die ADP-induzierte Aggregation beobachtet (FitzGerald et al. 1983a, siehe auch Abschnitt 1.4.2.). Auch Helgason et al. machten die Beobachtung, dass ASS die Aggregation nicht konstant über längere Zeit inhibierte. Die Autoren konnten in einem Kollektiv von 306 Schlaganfall-Patienten nachweisen, dass nur 75% der Patienten bei der initialen Überprüfung eine komplett durch ASS (325 mg/Tag) gehemmte Aggregation aufwiesen. Während einer sechsmonatigen Nachbeobachtung der Aggregation dieser Patienten stellte sich heraus, dass bei ca. 30% mit der Zeit nur noch eine partielle Aggregationshemmung zu beobachten war (Helgason et al. 1994).

Pulcinelli et al. bestimmten die Kollagen- und ADP-induzierte Aggregation bei 150 ASS-behandelten Patienten über einen Zeitraum von zwei Jahren. Die Autoren stellten fest, dass sechs bis zwölf Monate nach Behandlungsbeginn eine Abnahme der aggregationshemmenden Wirkung einsetzte (insbesondere nach Kollagen-Induktion), obwohl über den gesamten

Zeitraum die gleiche ASS-Dosis eingenommen wurde (entweder 100 mg/Tag oder 330 mg/Tag). Nach 24 Monaten war der Verlust der antithrombozytären ASS-Wirkung am stärksten ausgeprägt. Da sich bei 80 Patienten, die mit dem Aggregationshemmer Ticlopidin therapiert wurden, keine Abschwächung in der Wirkung zeigte, vermuteten die Autoren einen für ASS spezifischen Effekt (Pulcinelli et al. 2004).

Berglund und Wallentin kamen zu einem entgegengesetzten Ergebnis. Die Autoren konnten bei 100 Patienten mit instabiler KHK unter Dauertherapie mit 75 mg ASS/Tag im 2-Jahres-Follow-up keine Abschwächung der Aggregationshemmung beobachten (Berglund und Wallentin 1991). In einer aktuellen Arbeit von Stejskal et al. wurde die Aggregation von Patienten nach akutem Koronarsyndrom, die mit 100 mg ASS/Tag behandelt wurden, untersucht – zunächst eine Woche nach dem Ereignis, dann drei Monate, ein Jahr, zwei, drei und vier Jahre danach. Bei der ersten Messung waren 55% der Patienten ASS-Non-Responder; nach vier Jahren waren es 57%. Lediglich neun Patienten, die anfangs als Responder eingestuft worden waren, zeigten bei der letzten Messung eine Non-Response, und acht ursprüngliche Non-Responder waren nach vier Jahren Responder. Die Autoren schlussfolgerten, dass wiederholte Messungen über einen längeren Zeitraum nicht notwendig sind (Stejskal et al. 2006).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Thrombozytenaggregation bis auf wenige Ausnahmen (siehe Abschnitt 4.4.5.) nicht zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt. Die Patienten wurden allerdings befragt, seit wann eine regelmäßige ASS-Behandlung durchgeführt wurde. Dabei stellte sich heraus, dass Patienten mit langer Behandlungsdauer nicht häufiger von einer „ASS-Resistenz“ betroffen waren als Patienten mit kürzerer Behandlungsdauer (vgl. Abschnitt 3.9.) – im Gegenteil: Lag der Beginn der ASS-Therapie zehn Jahre oder länger zurück, so war nur jeder vierte Patient ein Low-Responder, während unter denjenigen Patienten, die ASS erst seit ein oder zwei Jahren einnahmen, jeder zweite Patient als Low-Responder eingestuft worden war. Aus dieser Beobachtung könnte zunächst geschlossen werden, dass eine zunehmende Behandlungsdauer nicht mit einer verstärkten „Resistenz“-Entwicklung zusammenhängt. Allerdings kann die Frage, ob es im Einzelfall zu einer Abschwächung der ASS-Wirkung mit der Zeit gekommen ist, nicht anhand dieser Beobachtung beantwortet werden. Möglicherweise mag es unmittelbar mit der klinischen Bedeutung der ASS-Low-Response zusammenhängen, dass das Verhältnis „resistent“ zu „nicht resistent“ bei langjähriger Behandlungsdauer in Richtung „nicht resistent“ verschoben ist.

4.4.4. Potentielle Mechanismen der „ASS-Resistenz“ vom Typ III

4.4.4.1. Extrathrombozytäre Mechanismen

Während anhand der thrombozytären TxA_2 -Synthese und anhand der TxA_2 -Synthese im Vollblut größtenteils erkannt werden konnte, ob die ASS-Tablette am Untersuchungstag oder am Tag zuvor eingenommen worden war (vgl. Abschnitt 3.10.2. Abb. 93 und Abb. 94 sowie Abschnitt 3.10.3. Abb. 95 und Abb. 96), war der Einfluss des ASS-Einnahmezeitpunkts hingegen nicht zu beobachten, wenn die Thromboxan-Metabolit (2,3-dn- TxB_2)-Exkretion betrachtet wurde (siehe Abschnitt 3.10.4. Abb. 97 und Abb. 98). Darüberhinaus korrelierte die 2,3-dn- TxB_2 -Exkretion weder mit der TxA_2 -Synthese der Thrombozyten (vgl. Abb. 81 rechts) noch mit der des Vollbluts (vgl. Abb. 81 links), während zwischen der thrombozytären und der im Vollblut bestimmten Tx-Produktion ein Zusammenhang nachgewiesen werden konnte (siehe Abb. 77 links). Diese Ergebnisse bestätigen, dass die Exkretion von 2,3-dn- TxB_2 mehr als nur die TxA_2 -Synthese der Thrombozyten widerspiegelt; sie liefert eine Aussage zur TxA_2 -Bildung im gesamten Körper (FitzGerald et al. 1983b).

Die Thrombozyten leisten, wenn kein ASS eingenommen wird, zweifelsohne den größten Beitrag zur in vivo- TxA_2 -Synthese. Dass aber auch eine extrathrombozytäre TxA_2 -Synthese die Tx-Metabolit-Ausscheidung mitbestimmt, wird dadurch deutlich, dass niedrig dosiertes ASS die Exkretion der Tx-Metabolite auch bei wiederholten Gaben nur unvollständig reduziert, z.B. zu 80% bis 90% bei gesunden Probanden, die mit einer täglichen Dosis von 80 bis 160 mg ASS behandelt wurden (FitzGerald et al. 1983a). Bei Patienten mit ausgeprägter Atherosklerose scheint der Anteil der extrathrombozytären TxA_2 -Bildung noch höher zu liegen. Das konnte z.B. für Patienten mit instabiler Angina pectoris (Vejar et al. 1990, Cipollone et al. 1997, Cipollone et al. 2000) sowie für Demenz-Patienten nach einem Schlaganfall (Van Kooten et al. 1999) gezeigt werden. Als zugrunde liegender Mechanismus wird eine TxA_2 -Produktion z.B. von Monozyten, Makrophagen und Endothelzellen diskutiert. Diese Zelltypen sind zum einen in Besitz einer Thromboxan-Synthase (Nüsing und Ullrich 1990), zum anderen kann es in diesen Zellen zu einer Hochregulation der COX-2 kommen, hervorgerufen durch proinflammatorische Mediatoren, die im Zusammenhang mit einer Atherosklerose gebildet werden (Schönbeck et al. 1999, Cipollone et al. 2004a). In der Folge kann in diesen Zellen COX-2-vermittelt TxA_2 produziert werden, denkbar wäre auch ein transzellulärer Syntheseweg (siehe Abschnitt 1.7.1.).

Da Cipollone et al. bei Patienten mit instabiler Angina pectoris eine Tx-Metabolit-Ausscheidung beobachteten, die unter der Behandlung mit Indobufen (COX-1-/COX-2-Hemmer) geringer ausgeprägt war als unter ASS-Therapie (Cipollone et al. 1997), und da in einer weiteren Arbeit von Cipollone et al. eine Assoziation zwischen der in vivo-TxA₂-Produktion und der Isoprostan-Exkretion hergestellt wurde (Cipollone et al. 2000), ergab sich für die vorliegende Arbeit die interessante Frage, ob die Patienten mit einer „ASS-Resistenz“ vom Typ III auch von einer extrathrombozytären TxA₂-Synthese betroffen sind, insbesondere vor dem Hintergrund, dass es in der vorliegenden Arbeit mehrere Anhaltspunkte gibt, dass entzündliche Prozesse und eine verstärkte Isoprostan-Bildung für die „ASS-Resistenz“ vom Typ III eine Rolle spielen (siehe Abschnitt 4.4.1.2. sowie Abb. 138).

In der vorliegenden Arbeit wurde allerdings kein Zusammenhang zwischen der 2,3-dn-TxB₂-Ausscheidung und einer „ASS-Resistenz“ vom Typ III gefunden (vgl. Abschnitt 3.6.1. sowie Abb. 78). Die Thrombozytenaggregation verhielt sich unabhängig von der in vivo-TxA₂-Synthese (vgl. Abb. 79 und Abb. 80). Die ASS-Einnahme hat sowohl bei den Responder- als auch bei den Non-Responder-Patienten zu einer vergleichbaren Reduzierung der 2,3-dn-TxB₂-Konzentrationen geführt, wenn zum Vergleich Werte aus der Literatur für Patienten mit Atherosklerose, die kein ASS eingenommen haben, herangezogen werden (z.B. Knapp et al. 1988). Die mediane 2,3-dn-TxB₂-Konzentration der „Typ I-resistenten“ Patienten der vorliegenden Arbeit kann ebenfalls als Vergleich dienen, allerdings hat die Heterogenität der „Typ I-Resistenz“-Gruppe hinsichtlich des Ausmaßes der Hemmung der thrombozytären TxA₂-Synthese (vgl. Abb. 53) zur Folge, dass die Unterschiede zur Responder- bzw. Low-Responder-Gruppe nicht signifikant ausfielen (vgl. Abb. 78).

Darüberhinaus verhielt sich die in vivo-TxA₂-Synthese nicht nur unabhängig von der 8-iso-PGF_{2α}-Exkretion (siehe Abschnitt 3.16.), sondern auch von der im Vollblut ermittelten COX-2-Aktivität (Daten wurden nicht gezeigt). Auch die in vivo-Produktion des TxA₂-Gegenspielers Prostacyclin wurde untersucht. Die Ausscheidung des Prostacyclin-Metaboliten 2,3-dn-6-keto-PGF_{1α} zeigte sich bei den Responder- und Low-Responder-Patienten gleichermaßen (vgl. Abschnitt 3.6.2. Abb. 82 und Abb. 83), ebenso das in vivo-Verhältnis TxA₂ zu Prostacyclin (vgl. Abschnitt 3.6.3. und Abb. 84). Somit sind extrathrombozytäre Mechanismen der TxA₂-Bildung für die „Typ III-resistenten“ Patienten der vorliegenden Arbeit nicht von Bedeutung.

Allerdings muss festgehalten werden, dass sowohl hinsichtlich der in vivo-TxA₂-Synthese, der in vivo-Prostacyclin-Synthese als auch hinsichtlich des TxA₂/Prostacyclin-Verhältnisses beachtliche Schwankungen zu beobachten waren: Die 2,3-dn-TxB₂-Konzentrationen lagen zwischen 15 und 3.463 pg/mg Kreatinin, die 2,3-dn-6-keto-PGF_{1α}-Konzentrationen zwischen 4 und 367 pg/mg Kreatinin und das TxA₂/Prostacyclin-Verhältnis zwischen 0,2 und 34,6. Zum jetzigen Zeitpunkt ist unklar, in welchem Bereich sich die einzelnen Werte idealerweise aufhalten sollten (Schrör et al. 2006, Patrono und Rocca 2007). Aus diesem Grund interessiert bei der geplanten prospektiven Nachbeobachtung der Patienten der vorliegenden Studie nicht nur die Ereignisrate in Bezug auf die „ASS-Resistenz“, so wie sie in dieser Arbeit definiert wurde, sondern auch in Bezug auf die in vivo-TxA₂-Synthese, die in vivo-Prostacyclin-Synthese und insbesondere in Bezug auf das TxA₂/Prostacyclin-Verhältnis. Die Studie von Eikelboom et al. war die erste Studie, in der eine klinische Bedeutung für eine verstärkte TxA₂-Metabolit-Exkretion nachgewiesen werden konnte (Eikelboom et al. 2002, siehe auch Abschnitt 1.4.4.); allerdings wurde in der Studie nicht differenziert, ob es sich bei der erhöhten in vivo-TxA₂-Synthese um TxA₂ extrathrombozytären Ursprungs handelte oder ob eine mangelnde Compliance oder eine Interaktion mit NSAIDs ursächlich war.

4.4.4.2. Hypersensitivität gegenüber Kollagen

Nach der Definition von Weber et al. (2002) ist allen Patienten mit einer „ASS-Resistenz“ vom Typ III gemeinsam, dass die durch Kollagen ausgelöste Aggregation von ASS nicht genügend inhibiert werden kann. So sprachen die Thrombozyten der Low-Responder der vorliegenden Studie bereits auf geringste Kollagen-Konzentrationen an ($EC_{50} = 0,19$ mg/l), während vergleichbare Kollagen-Konzentrationen im PRP der Responder keine Aggregation auslösen konnten (siehe Abb. 67).

Kawasaki et al. machten eine ähnliche Beobachtung an gesunden Probanden, die mit 324 mg ASS behandelt wurden. Die Autoren stuften drei von insgesamt acht Probanden aufgrund einer unzureichend verlängerten Blutungszeit trotz vorheriger ASS-Einnahme als ASS-Non-Responder ein. Es wurde für die Non-Responder ein EC_{50} -Wert für Kollagen von 0,48 mg/l ermittelt und für die Responder von 0,91 mg/l (Kawasaki et al. 2000). In der vorliegenden Studie war der Unterschied noch stärker ausgeprägt. Kawasaki et al. vermuteten als Ursache der „ASS-Resistenz“ eine erhöhte Sensitivität der Thrombozyten gegenüber Kollagen. Dieses Ergebnis ließ vermuten, dass eine „ASS-Resistenz“ möglicherweise mit genetischen

Variationen der Kollagen-Rezeptoren zusammenhängen könnte. Tatsächlich konnte für einen häufig vorkommenden Polymorphismus des GPIa-Gens (807C>T) eine erhöhte Dichte des Kollagen-Rezeptors GPIa-IIa auf der Thrombozytenoberfläche beobachtet werden (Kunicki et al. 1997, Macchi et al. 2002b) sowie ein häufigeres Vorkommen bei Post-MI-Patienten im Vergleich zu gesunden Patienten (Moshfegh et al. 1999). Allerdings konnte dieser Polymorphismus bisher nicht mit einer „ASS-Resistenz“ in Verbindung gebracht werden, weder bei gesunden Probanden (Gonzalez-Conejero et al. 2005), noch bei Patienten mit stabiler Angina pectoris (Macchi et al. 2003).

Ein weiterer Polymorphismus im Zusammenhang mit einer Hypersensitivität gegenüber Kollagen ist der 13254C>T-Polymorphismus des GPVI-Kollagen-Rezeptor-Gens. Für diesen konnte kürzlich in einem Kollektiv mit 101 stabilen KHK-Patienten gezeigt werden, dass ASS-Non-Responder, die mittels PFA-100[®] unter Verwendung der Kollagen/Adrenalin-Messzelle (siehe auch Abschnitt 4.1.) identifiziert worden waren, häufiger von diesem Polymorphismus betroffen waren als ASS-Responder (38% versus 13%, Lepántalo et al. 2006). Es wäre somit durchaus interessant, auch die Patienten der vorliegenden Studie im Hinblick auf genetische Veränderungen des GPVI-Rezeptors zu untersuchen. Allerdings lässt sich die „ASS-Resistenz“ der vorliegenden Arbeit nur zum Teil durch eine Hypersensitivität gegenüber Kollagen erklären, denn eine erhöhte Kollagen-induzierte Aggregation ging in der Mehrzahl der Fälle auch mit einer erhöhten ADP-induzierten Aggregation einher (vgl. Abb. 71). Dieser Zusammenhang deutet darauf hin, dass sich die Unterschiede der Kollagen-induzierten Aggregation nicht ausschließlich auf Veränderungen im Kollagen-spezifischen Signalweg zurückführen lassen. Auch Ohmori et al. berichteten von 50 mit 81 mg ASS behandelten Patienten, bei denen diejenigen Patienten mit einer verstärkten Kollagen-Antwort reagierten, die gleichzeitig eine erhöhte ADP-induzierte Aggregation zeigten (Ohmori et al. 2006).

4.4.4.3. Hypersensitivität gegenüber ADP

Die ASS-Low-Responder der vorliegenden Arbeit zeigten eine signifikant höhere ADP-induzierte Aggregation im Vergleich zu den Responder-Patienten (vgl. Abb. 72 sowie Tab. 23). Diese Beobachtung stimmt mit Ergebnissen von Macchi et al. überein. Macchi et al. untersuchten die Plättchenfunktion mittels PFA-100[®] von 72 Patienten mit stabiler Angina pectoris, die seit mindestens einem Monat mit 160 mg ASS/Tag therapiert wurden. Die

Autoren identifizierten zunächst mit Hilfe der Kollagen/Adrenalin-Messzelle 21 „ASS-resistente“ Patienten (29,2%). Anschließend wurde die Kollagen/ADP-Messzelle eingesetzt: Die Verschlusszeiten für die „resistenten“ Patienten im Vergleich zu den ASS-sensitiven Patienten waren signifikant kürzer. Darüberhinaus konnten die Autoren anhand durchflusszytometrischer Messungen zeigen, dass die Thrombozyten der „resistenten“ Patienten übermäßig stark durch ADP aktiviert wurden (Macchi et al. 2002a). Macchi et al. verwendeten für ihre Untersuchungen sehr hohe ADP-Konzentrationen, sowohl in der Kollagen/ADP-Messzelle (50 µg ADP) als auch in der Durchflusszytometrie (10 µM ADP). Obwohl in der vorliegenden Arbeit wesentlich geringere ADP-Konzentrationen (2 µM) eingesetzt wurden, konnte eine Hypersensitivität gegenüber ADP bei „ASS-resistenten“ Patienten bestätigt werden.

Es stellt sich somit die Frage, welche Mechanismen einer erhöhten Sensitivität gegenüber ADP zugrunde liegen könnten. Macchi et al. vermuteten, dass Interaktionen zwischen Thrombozyten und Erythrozyten eine Rolle spielen, denn mehrere Arbeiten sind bekannt, bei denen Zell-Zell-Interaktionen die Reaktion von Thrombozyten auf Aggregationsstimuli wie ADP veränderten (Valles et al. 1991, Santos et al. 1997, Valles et al. 1998). In der Tat konnte auch gezeigt werden, dass der prothrombotische Einfluss von Erythrozyten die antithrombotischen Effekte einer ASS-Therapie abschwächen kann (Valles et al. 1998). Macchi et al. untersuchten die Aktivierung bzw. Aggregation von Thrombozyten in Vollblut, d.h. in Anwesenheit von Erythrozyten. Interessant ist, dass in der vorliegenden Arbeit eine Hypersensitivität gegenüber ADP beobachtet wurde, obwohl die Aggregationsexperimente in PRP, d.h. in Abwesenheit von Erythrozyten, durchgeführt wurden. Das könnte bedeuten, dass entweder der Einfluss von Erythrozyten für die in der vorliegenden Studie identifizierte „ASS-Resistenz“ keine Rolle spielt oder dass Erythrozyten in der Lage sind, längerfristige Veränderungen im Aggregationsverhalten der Thrombozyten hervorzurufen.

Weitere Erklärungsmöglichkeiten für eine verstärkte ADP-induzierte Aggregation sind Polymorphismen der ADP-Rezeptoren auf der Thrombozytenoberfläche. Jefferson et al. untersuchten 330 Post-MI-Patienten, die mit 81 mg ASS/Tag behandelt wurden. Die Autoren entdeckten einen signifikanten Zusammenhang zwischen einem Polymorphismus des P2Y₁-Gens (893C>T) und einer „ASS-Resistenz“, die bei 95 Patienten (29%) anhand der AA-induzierten Aggregation festgestellt worden war (Jefferson et al. 2005). Auch in der vorliegenden Arbeit könnte dieser Polymorphismus zu der „Resistenz“ beigetragen haben; P2Y₁-Polymorphismen wurden allerdings nicht untersucht. Die vorliegende Arbeit

beschäftigte sich hingegen mit Polymorphismen des P2Y₁₂-Rezeptor-Gens. Diese wurden bereits bei gesunden Probanden mit einer verstärkten ADP-induzierten Aggregation assoziiert (Fontana et al. 2003a), waren bisher aber nur unzureichend im Zusammenhang mit einer „ASS-Resistenz“ bei stabilen KHK-Patienten untersucht worden. Die Ergebnisse werden in Abschnitt 4.4.4.8. diskutiert.

4.4.4.4. Verstärkte Arachidonsäure-induzierte Aggregation trotz COX-Hemmung

Wie bereits im Abschnitt 4.4. einleitend erwähnt, konnte bei den „ASS-resistenten“ Patienten der vorliegenden Studie mit Arachidonsäure eine schwache Thrombozytenaggregation ausgelöst werden, die signifikant höher lag als die der „ASS-Responder“ (vgl. Abb. 68). Da die TxA₂-Synthese aber komplett supprimiert war und somit in keiner Beziehung zum Ausmaß der Aggregation stand (vgl. Abb. 70 links), muss die beobachtete AA-induzierte Aggregation Thromboxan-unabhängig vermittelt worden sein. In zwei aktuellen Arbeiten wurde diese Beobachtung zwar nicht im Zusammenhang mit der AA-induzierten Aggregation beschrieben, wohl aber in Verbindung mit einem AA-induzierten Aktivierungszustand von Thrombozyten. So untersuchte Gurbel et al. 125 stabile KHK-Patienten. Die AA-induzierte Aggregation war bei den meisten Patienten komplett durch ASS inhibiert, dennoch beobachteten die Autoren, dass es durch die Stimulation mit AA zu einer Zunahme der Expression von P-Selektin und aktiviertem GPIIb-IIIa auf der Thrombozytenoberfläche kam, d.h. die Thrombozyten wurden trotz Hemmung des COX-Weges in einen aktivierten Zustand versetzt (Gurbel et al. 2007b). Ein ähnlicher Zusammenhang wurde von Frelinger et al. beschrieben. Die Autoren führten eine Studie mit 700 ASS-behandelten Patienten durch, die sich zu einer Herzkatheteruntersuchung vorstellten. Bei 670 Patienten mit inhibierter Serum-TxB₂-Konzentration wurde eine restliche AA-induzierte Aktivierung (bestimmt anhand der P-Selektin-Expression auf der Thrombozytenoberfläche) festgestellt, die sich auch durch Zusatz von ASS in vitro nicht reduzieren ließ. Bei Patienten, die zusätzlich mit Clopidogrel behandelt wurden (n = 211), zeigte sich hingegen eine signifikant niedrigere AA-induzierte Aktivierung. Die Autoren folgerten, dass die unter ASS-Therapie beobachtete restliche AA-induzierte Thrombozytenaktivierung von der COX unabhängig ist und zum Teil durch ADP vermittelt wird (Frelinger et al. 2006). In der vorliegenden Arbeit, in der nicht die Aktivierung, sondern die Aggregation überprüft wurde, konnte in der Tat auch für die Aggregation ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem ADP- und dem AA-Signalweg gefunden werden (siehe Abb. 73).

Die Frage, über welchen Mechanismus AA in der Lage ist, die Aggregation zu verstärken, ohne zu TxA₂ umgesetzt zu werden, kann die vorliegende Arbeit nicht beantworten. Es mag lediglich spekuliert werden, dass AA trotz der durch ASS acetylierten COX zu Verbindungen umgewandelt werden kann, die die Aggregation fördern. Dazu zählen zum Beispiel die Isoprostane wie das 8-iso-PGF_{2α} (siehe Abschnitt 1.7.2.). In der Tat konnte in der vorliegenden Arbeit auch ein signifikanter Zusammenhang zwischen einer „ASS-Resistenz“ und einer verstärkten 8-iso-PGF_{2α}-Exkretion nachgewiesen werden (siehe Abschnitt 3.16., 4.4.1.2. sowie 4.4.4.7.). Während die Isoprostan-Bildung signifikant mit der Kollagen-induzierten Aggregation korrelierte (vgl. Abb. 128) und die Kollagen-induzierte Aggregation wiederum signifikant mit der AA-induzierten Aggregation (vgl. Abb. 69), konnte der Nachweis einer direkten Beziehung zwischen der Isoprostan-Bildung und der AA-induzierten Aggregation allerdings nicht erbracht werden (siehe Abschnitt 3.16.).

Auch die Bildung sonstiger Prostaglandin-ähnlicher Verbindungen aus AA wäre vorstellbar, z.B. die Umwandlung von AA in Hydroxyeicosatetraensäuren (HETE-Verbindungen). Auf diese Theorie wird in Abschnitt 4.4.4.6. näher eingegangen.

4.4.4.5. C-reaktives Protein – ein Verstärker der Thrombozytenaggregation?

In der vorliegenden Studie zeigten Patienten mit einer Serum-CRP-Konzentration von über 5 mg/l eine tendenziell stärkere Thrombozytenaggregation als Patienten mit einem niedrigeren CRP-Wert (vgl. Abb. 103). Wesentlich deutlicher war der Zusammenhang zwischen einer „ASS-Resistenz“ und erhöhten CRP-Werten in anderen Studien ausgeprägt (Markuszewski et al. 2006, Kreutz et al. 2007, Modica et al. 2007). Diese Studien wurden in Abschnitt 4.4.1.2. vorgestellt. Aber auch in der vorliegenden Arbeit sprechen mehrere Ergebnisse dafür, dass eine verstärkte Thrombozytenaggregation u.a. mit entzündlichen Veränderungen einhergehen kann. Diese Ergebnisse sind im Abschnitt 4.4.1.2. ausführlich erläutert und in Abb. 138 zusammengefasst. Somit stellt sich die Frage, ob z.B. das CRP auch aktiv auf die Thrombozytenaggregation Einfluss nehmen kann.

CRP kommt in mindestens zwei unterschiedlichen Konformationen vor – als natives pentameres CRP (nCRP) und als modifiziertes monomeres CRP (mCRP): nCRP ist die im Serum messbare Form; mCRP entsteht durch Dissoziation von nCRP und stellt die an Gewebe (z.B. Gefäßinnenwand) gebundene Form dar und ist aus diesem Grund nicht im Serum zu finden (Schwedler et al. 2006). Für nCRP und mCRP werden zum Teil

entgegengesetzte Effekte beschrieben. Khreiss et al. konnten in einer in vitro-Studie für nCRP antiaggregatorische, für mCRP proaggregatorische Wirkungen nachweisen (Khreiss et al. 2004). In einer in vitro-Arbeit von Miyazawa et al. wurde nCRP minimal oxidiert und anschließend der Effekt auf die Thrombozytenaggregation gemessen. Erstaunlicherweise konnte durch nCRP nach der oxidativen Veränderung eine irreversible Thrombozytenaggregation ausgelöst werden, wenn gleichzeitig ein weiterer Thrombozytenagonist wie z.B. PAF oder ADP in einer geringen Konzentration vorlag, mit der alleine eingesetzt nur eine reversible Aggregation hervorrufbar war (Miyazawa et al. 1988). Diese Arbeit ist besonders interessant im Zusammenhang mit der vorliegenden Studie, da Patienten mit erhöhtem „oxidativen Stress“ eine verstärkte Aggregation zeigten (vgl. Abschnitt 3.16. sowie 4.4.1.2.). Möglicherweise mag das nCRP bei diesen Patienten aufgrund oxidativer Veränderungen zur Aggregation der Thrombozyten beigetragen haben. Letztendlich aber fallen die Interpretationen bei der derzeitigen Datenlage schwer, insbesondere, weil sich herausgestellt hat, dass CRP je nach Präparation unterschiedliche Wirkungen zeigt (Lafuente et al. 2005, Pepys et al. 2005, Taylor et al. 2005) und unsicher ist, ob die beobachteten Effekte auch tatsächlich in vivo von Bedeutung sind (Nilsson 2005, Pepys 2005, Scirica und Morrow 2006).

4.4.4.6. Umwandlung von Arachidonsäure zu Hydroxyeicosatetraensäuren (HETE-Verbindungen)

In der vorliegenden Studie wurde die Beobachtung gemacht, dass die Thrombozytenaggregation in Abhängigkeit vom thrombozytären COX-2-Gehalt durch einen selektiven COX-2-Hemmer (Rofecoxib) signifikant reduziert werden konnte (vgl. Abb. 116 und Abb. 117). Dieses Ergebnis war überraschend, denn der Effekt kann nicht über eine Hemmung einer COX-2-vermittelten TxA₂-Synthese erklärt werden (siehe Abb. 120). Die teilweise beobachteten minimalen Hemmeffekte von Rofecoxib auf die thrombozytäre TxA₂-Synthese hingen mit dem Einnahmezeitpunkt der ASS-Tablette zusammen und waren unabhängig von der Aggregationshemmung (Abb. 120). Somit ergibt sich die Frage, über welchen Weg die thrombozytäre COX-2 zur Aggregation beigetragen haben könnte.

In den Thrombozyten exprimierte COX-2 wurde möglicherweise trotz der bevorzugten Hemmung der COX-1 durch ASS (siehe Abschnitt 1.2.3.) acetyliert. Die Acetylierung der COX-2 resultiert wie die COX-1-Hemmung in einer vollständigen Unterbindung der

Prostaglandin-Synthese. Allerdings erlangt die COX-2 im Unterschied zur COX-1 eine neue Funktion: Sie wandelt Arachidonsäure in 15(R)-Hydroxy-5,8,11,13-eicosatetraensäure (15(R)-HETE) um (Holtzman et al. 1992, Meade et al. 1993), das 15-Epimer von 15(S)-HETE. Letzteres ist ein Zwischenprodukt der natürlichen Lipoxin-Route des AA-Stoffwechsels (Serhan et al. 1984). Interessanterweise kann 15(R)-HETE analog zu 15(S)-HETE durch die 5-Lipoxygenase (5-LO) der Leukozyten weiter umgesetzt werden, so dass neben den natürlichen Lipoxinen (Serhan 1989, Levy et al. 1993) die 15-epi-Lipoxine entstehen (Clària und Serhan 1995), die auch als „aspirin triggered lipoxins“ (ATL) bezeichnet werden. Die ATL-Bildung verläuft, analog der Lipoxin-Biosynthese, transzellulär (Serhan 2005).

Bemerkenswert ist, dass bereits die Einnahme niedriger ASS-Dosen genügt (81 mg/Tag), um im Plasma einen signifikanten Anstieg der ATL-Plasma-Konzentration zu beobachten (Chiang et al. 2004). Aus diesem Grund liegt die Vermutung nahe, dass auch in der vorliegenden Studie die Einnahme von 100 mg ASS/Tag zu einer ATL-Synthese geführt hat sowie dementsprechend auch zu einer 15(R)-HETE-Synthese in Thrombozyten – insbesondere in denjenigen Thrombozyten mit verstärkter COX-2-Expression. HETE-Verbindungen besitzen eine starke strukturelle Ähnlichkeit zu den Prostaglandinen. Aus diesem Grund scheinen HETE-Verbindungen zum Teil ihre Wirkungen durch Bindung an TxA_2 -Rezeptoren zu vermitteln (Teschmariam et al. 1995, Van Diest et al. 1996, Cayatte et al. 2000). Ob auch 15(R)-HETE an die TxA_2 -Rezeptoren der Thrombozyten binden kann, ist nicht bekannt. Ebenso ist ungeklärt, ob relevante biologische Wirkungen von 15(R)-HETE ausgehen. Wäre 15(R)-HETE tatsächlich an einer verstärkten Aggregation beteiligt, so ließe sich erklären, dass der selektive COX-2-Hemmer im speziellen Fall der erhöhten thrombozytären COX-2-Expression aggregationshemmende Eigenschaften zeigte – vorausgesetzt, der COX-2-Hemmer kann trotz der Acetylierung der COX-2 an das Enzym binden. Hierfür gibt es mehrere Hinweise (Serhan et al. 2000, Fiorucci et al. 2003). So behandelten z.B. Fiorucci et al. 32 gesunde Probanden mit einer Kombination aus 100 mg ASS und 200 mg des selektiven COX-2-Hemmers Celecoxib pro Tag. Die Autoren stellten fest, dass der selektive COX-2-Hemmer zu einer signifikanten Reduzierung der ATL-Produktion führte, wurden die Ergebnisse mit den ATL-Konzentrationen verglichen, die unter der ASS-Monotherapie gemessen worden waren (Fiorucci et al. 2003). Da in der vorliegenden Arbeit weder ATL- noch 15(R)-HETE-Konzentrationen bestimmt wurden und auch kein TxA_2 -Rezeptor-antagonist eingesetzt wurde, bleibt die hier entwickelte Theorie zum jetzigen Zeitpunkt hypothetisch.

Auch Buchanan und Brister brachten eine gesteigerte HETE-Synthese mit einer „ASS-Resistenz“ in Verbindung. Die Autoren überprüften die Wirkung einer dauerhaften ASS-Einnahme (325 mg/Tag über mindestens 3 Monate) auf die Blutungszeit bei 40 KHK-Patienten einen Monat vor einer geplanten Bypass-OP. Bei 43% der Patienten wurde keine Verlängerung der Blutungszeit festgestellt (Buchanan und Brister 1995). Weitere Untersuchungen ergaben, dass sowohl die Thrombozytenadhäsion als auch die 12-HETE-Synthese der Thrombozyten bei den ASS-Non-Responder-Patienten gesteigert war, während ASS die TxA₂-Synthese reduziert hatte. Buchanan und Brister vermuteten eine erhöhte Sensitivität der Adhäsionsrezeptoren hervorgerufen durch den 12-HETE-Konzentrationsanstieg. Die Autoren folgerten weiter, dass die vermehrte Produktion von 12-HETE eine Folge der COX-Hemmung sein könnte, da hierdurch der 12-LO ein erhöhter Anteil des gemeinsamen Substrats Arachidonsäure zur Verfügung steht (Buchanan und Brister 1995).

4.4.4.7. Vermehrte Entstehung von Isoprostanen

Eine Hypothese der vorliegenden Arbeit war, dass eine „ASS-Resistenz“ vom Typ III durch eine verstärkte Bildung von Isoprostanen erklärt werden kann (vgl. Abschnitt 1.7.2. Abb. 7). Diese Hypothese konnte zum Teil verifiziert werden, denn die „Typ III-resistenten“ Patienten wiesen in der Tat eine signifikant höhere 8-iso-PGF_{2α}-Exkretion im Vergleich zu den ASS-Responder-Patienten auf (vgl. Abschnitt 3.16. Abb. 125, Abb. 126 sowie Tab. 38).

Wie bereits in der Einleitung erläutert, entstehen die Isoprostane überwiegend auf nicht-enzymatischem Weg. In geringem Umfang kann 8-iso-PGF_{2α} auch durch die COX-1 synthetisiert werden: Aktivierte Thrombozyten bilden 8-iso-PGF_{2α} und TxA₂ in einem Verhältnis von ungefähr 1:1000 (Wang et al. 1995, Praticò et al. 1995). Diese Quelle kann für die Low-Responder der vorliegenden Studie eindeutig ausgeschlossen werden, da die COX-1-Aktivität durch ASS bei den nicht „Typ I-resistenten“ Patienten vollständig inhibiert war (vgl. Abschnitt 3.5.). 8-iso-PGF_{2α} kann auch mit Hilfe der COX-2 produziert werden: Dann liegt das Verhältnis 8-iso-PGF_{2α} zu PGE₂ zwischen 1:5 und 1:30 (Praticò et al. 1996a, Patrignani et al. 1996). Bei den Low-Responder-Patienten konnte auch für eine COX-2-vermittelte 8-iso-PGF_{2α}-Synthese kein Anhaltspunkt gefunden werden, denn weder die thrombozytäre COX-2-Expression noch die COX-2-Vollblut-Aktivität stand in einer Beziehung zur 8-iso-PGF_{2α}-Ausscheidung; darüberhinaus korrelierte die 8-iso-PGF_{2α}-Exkretion auch nicht mit der in vivo-TxA₂-Synthese, die eine Aussage zur COX-Aktivität des gesamten Körpers liefert (vgl.

Abschnitt 3.16. sowie 4.4.4.1.). Diese Daten stimmen mit den Beobachtungen anderer Studien überein, aus denen ebenfalls gefolgert wurde, dass die COX-abhängige 8-iso-PGF_{2α}-Synthese nicht signifikant zur 8-iso-PGF_{2α}-Gesamtsynthese beiträgt (Patrono und FitzGerald 1997). Durch ASS in geringer Dosierung (z.B. 75 mg für 7 Tage) kann die 8-iso-PGF_{2α}-Exkretion nicht reduziert werden (Catella et al. 1995). Im Gegenteil, es gibt sogar Hinweise, dass es unter ASS eher zu einer gesteigerten Isoprostan-Bildung kommt (Möbert und Becker 1998). Erklärt werden kann dies durch eine aufgrund der COX-Hemmung gesteigerte Ansammlung von AA, so dass in der Folge vermehrt AA für den Angriff reaktiver Sauerstoffspezies zur Verfügung steht. Die häufig in der vorliegenden Arbeit als Kontrolle dienende Gruppe der „Typ I-resistenten“ Patienten scheint sich in diesem Zusammenhang schlecht zu eignen, denn da in dieser Gruppe die PG-Bildung nur unzureichend durch ASS unterdrückt war, hätte man eher eine niedrigere Isoprostan-Synthese erwartet – das Gegenteil war aber der Fall: Die 8-iso-PGF_{2α}-Konzentrationen lagen signifikant höher im Vergleich zu den nicht „Typ I-resistenten“ Patienten (vgl. Abb. 125 und Abb. 126). Die „Typ I-resistenten“ Patienten nehmen demnach eine Sonderstellung hinsichtlich der Isoprostan-Bildung ein.

Über welchen Mechanismus die Isoprostane auf die Thrombozytenaggregation einwirken, wird seit vielen Jahren zum Teil kontrovers diskutiert. Es ist erwiesen, dass 8-iso-PGF_{2α} an den TxA₂-Rezeptor (TxA₂-R) bindet. In einer aktuellen Arbeit von Khasawneh et al. konnten drei Aminosäuren des TxA₂-R identifiziert werden, über welche 8-iso-PGF_{2α} gebunden wird (Khasawneh et al. 2008). Durch den Einsatz von TxA₂-Rezeptor-Antagonisten konnte gezeigt werden, dass 8-iso-PGF_{2α} TxA₂-Rezeptor-vermittelt zu einer Aktivierung von Thrombozyten führt: zur Ca²⁺-Freisetzung aus intrazellulären Speichern, zur Formveränderung der Thrombozyten sowie zu einer reversiblen Aggregation (Morrow et al. 1992, Fukunaga et al. 1993, Yin et al. 1994, Fukunaga et al. 1997, Audoly et al. 2000, Khasawneh et al. 2008). Darüberhinaus kann 8-iso-PGF_{2α} eine dosisabhängige irreversible Aggregation auslösen, wenn gleichzeitig ein weiterer Thrombozytenagonist anwesend ist wie z.B. Kollagen, ADP oder Arachidonsäure, der alleine eingesetzt zu keiner Aggregation geführt hätte (Praticò et al. 1996b, Khasawneh et al. 2008). TxA₂-Rezeptor-Knock-out-Mäuse zeigen keine dieser Effekte (Audoly et al. 2000). Außerdem verstärkt 8-iso-PGF_{2α} die Thrombozytenadhäsion und reduziert die antiadhäsiven und antiaggregatorischen Wirkungen von NO (Minuz et al. 1998).

Die proaggregatorischen Wirkungen von 8-iso-PGF_{2α} konnten in der Regel nur mit unphysiologisch hohen Konzentrationen nachgewiesen werden. Dem kann allerdings entgegengesetzt werden, dass 8-iso-PGF_{2α} lediglich stellvertretend für eine Reihe von

Isoprostanen gemessen wird. Die durch freie Radikale katalysierte Umwandlung der AA bringt eine Vielzahl von biologisch aktiven Isoeicosanoiden hervor. Allein von den Isoprostanen der F₂-Serie gibt es bis zu 64 Vertreter (Taber et al. 1997). Außerdem wäre es denkbar, dass es lokal durchaus auch zu sehr hohen Isoprostan-Konzentrationen kommen kann.

Interessant ist, dass 8-iso-PGF_{2α} auch antiaggregatorische Eigenschaften besitzt: Wird eine Aggregation mit einem TxA₂-Analogon ausgelöst, so kann 8-iso-PGF_{2α} die Aggregation hemmen (Morrow et al. 1992, Yin et al. 1994). Diese Beobachtung lässt vermuten, dass 8-iso-PGF_{2α} entweder ein partieller TxA₂-Rezeptor-Agonist ist (Yin et al. 1994) oder dass 8-iso-PGF_{2α} neben der agonistischen Wirkung am TxA₂-R noch einen separaten inhibitorischen Signalweg aktiviert. Die Daten von Khasawneh et al. sprechen für letztere Theorie, da die Autoren neben den bereits erwähnten Bindungsstellen für 8-iso-PGF_{2α} am TxA₂-R zusätzlich eine TxA₂-Rezeptor-unabhängige Bindungsstelle ausfindig machen konnten. Zusätzlich stellten die Autoren fest, dass die inhibitorische Wirkung von 8-iso-PGF_{2α} mit einem cAMP-Konzentrationsanstieg verbunden war (Khasawneh et al. 2008). Diese Beobachtung spricht für einen zweiten Signalweg, der an einen anderen Rezeptor als den TxA₂-R gebunden ist, z.B. an einen für die Isoprostane eigenen Rezeptor. Die Affinität von 8-iso-PGF_{2α} an den TxA₂-R scheint höher zu sein als die Affinität zu dem bislang unbekanntem zweiten Rezeptor (Khasawneh et al. 2008).

Da die TxA₂-Rezeptoren bei komplett supprimierter TxA₂-Synthese, so wie es für die Patienten der vorliegenden Studie der Fall war (die „Typ I-resistenten“ Patienten ausgenommen), vermehrt für die Interaktion mit den Isoprostanen zur Verfügung stehen, lässt sich unter diesen Umständen eine stärker ausgeprägte pro- als antiaggregatorische Wirkung der Isoprostane vermuten. Tatsächlich konnte eine Korrelation zwischen der Kollagen-induzierten Aggregation und der 8-iso-PGF_{2α}-Exkretion nachgewiesen werden (vgl. Abb. 128). Die Korrelation war allerdings nur recht schwach. Auch die Beobachtung, dass es keinen Zusammenhang zur ADP- bzw. AA-induzierten Aggregation gab, macht deutlich, dass die vermehrte Bildung von 8-iso-PGF_{2α} nur einen Teil der „ASS-Resistenz“ im Studienkollektiv erklären kann. Dennoch konnten zwei Grenzwerte, ein oberer (300 pg 8-iso-PGF_{2α}/mg Kreatinin) und ein unterer (150 pg 8-iso-PGF_{2α}/mg Kreatinin), ermittelt werden, mit dessen Hilfe sich eine „ASS-Resistenz“ mit einer hohen Wahrscheinlichkeit vorhersagen ließ (vgl. Tab. 38 sowie Abb. 127). Das Risiko, von einer ASS-Low-Response betroffen zu sein, war doppelt so hoch (um den Faktor 2,3), wenn eine 8-iso-PGF_{2α}-Exkretion von über

300 pg/mg Kreatinin gemessen worden war im Vergleich zu einer Exkretion von unter 300 pg/mg Kreatinin (vgl. Tab. 38). Besonders deutlich äußerte sich die unzureichende ASS-Wirkung der Patienten mit hoher Isoprostan-Bildung (über 300 pg/mg Kreatinin), wenn die Kollagen-Konzentrations-Wirkungskurven betrachtet wurden: Für diese Patienten reichte bereits eine signifikant niedrigere Kollagen-Konzentration aus verglichen mit denjenigen Patienten, die eine 8-iso-PGF_{2α}-Exkretion von unter 300 pg/mg Kreatinin aufwiesen, um einen halbmaximalen Aggregationseffekt auszulösen (vgl. Abb. 129).

In der Annahme, dass die „ASS-Resistenz“ bei stabilen KHK-Patienten zu einem Teil durch eine verstärkte Isoprostan-Bildung vermittelt wird und möglicherweise auch durch weitere Substanzen, die im Rahmen einer Entzündungsreaktion auftreten (vgl. Abschnitt 4.4.4.5. und 4.4.4.6.), ist es wahrscheinlich, dass die Beziehung zwischen „oxidativem Stress“, systemischer Entzündung und der gegenüber ASS unempfindlichen Thrombozytenaktivierung durch eine Vielzahl von „feed-forward“-Mechanismen verstärkt und aufrechterhalten wird. So ist es z.B. bekannt, dass aktivierte Thrombozyten zu einer Verstärkung des „oxidativen Stresses“ führen, da sie ihrerseits in der Lage sind, beachtliche Mengen reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) zu produzieren (Krötz et al. 2004), u.a. durch Aktivierung der thrombozytären Isoform der NADPH-Oxidase (Pignatelli et al. 2004). Außerdem werden eine Reihe von Substanzen (Interleukin-1β, sCD40L, P-Selektin, Plättchenfaktor 4, etc.) unmittelbar nach der Aktivierung von Thrombozyten sezerniert, synthetisiert oder auf der Thrombozytenoberfläche exponiert, durch die eine Vielzahl inflammatorischer Prozesse induziert werden (Gawaz et al. 2005). Vaskuläre Entzündungsreaktionen führen wiederum zu einer gesteigerten Produktion von ROS (Nathan 2002, Stocker und Keaney 2004, Davì und Patrono 2007), wodurch es auf der einen Seite zu einer indirekten Thrombozytenaktivierung durch Verminderung der NO-Bioverfügbarkeit kommen kann (Loscalzo 2003) und auf der anderen Seite zu einer verstärkten Lipid-Peroxidation mit der Synthese von Isoprostanen. Isoprostane sind vermutlich neben einer Steigerung der Thrombozytenaggregation auch direkt an der Aufrechterhaltung bzw. Verstärkung einer systemischen Entzündung beteiligt. Mit 8-iso-PGF_{2α} konnte z.B. eine Adhäsion von Monozyten an Endothelzellen hervorgerufen werden (Leitinger et al. 2001). Außerdem konnte für 8-iso-PGF_{2α} eine Hochregulation der Expression verschiedener inflammatorischer Gene beobachtet werden (Scholz et al. 2003, Tang et al. 2005). In Abb. 139 ist zusammengefasst, wie es bei den Low-Responder-Patienten im Studienkollektiv zu einer Thrombozytenaggregation trotz der ASS-Einnahme gekommen sein könnte und welche potentiellen Verstärkungsmechanismen zur Aufrechterhaltung der „ASS-Resistenz“ beigetragen haben könnten.

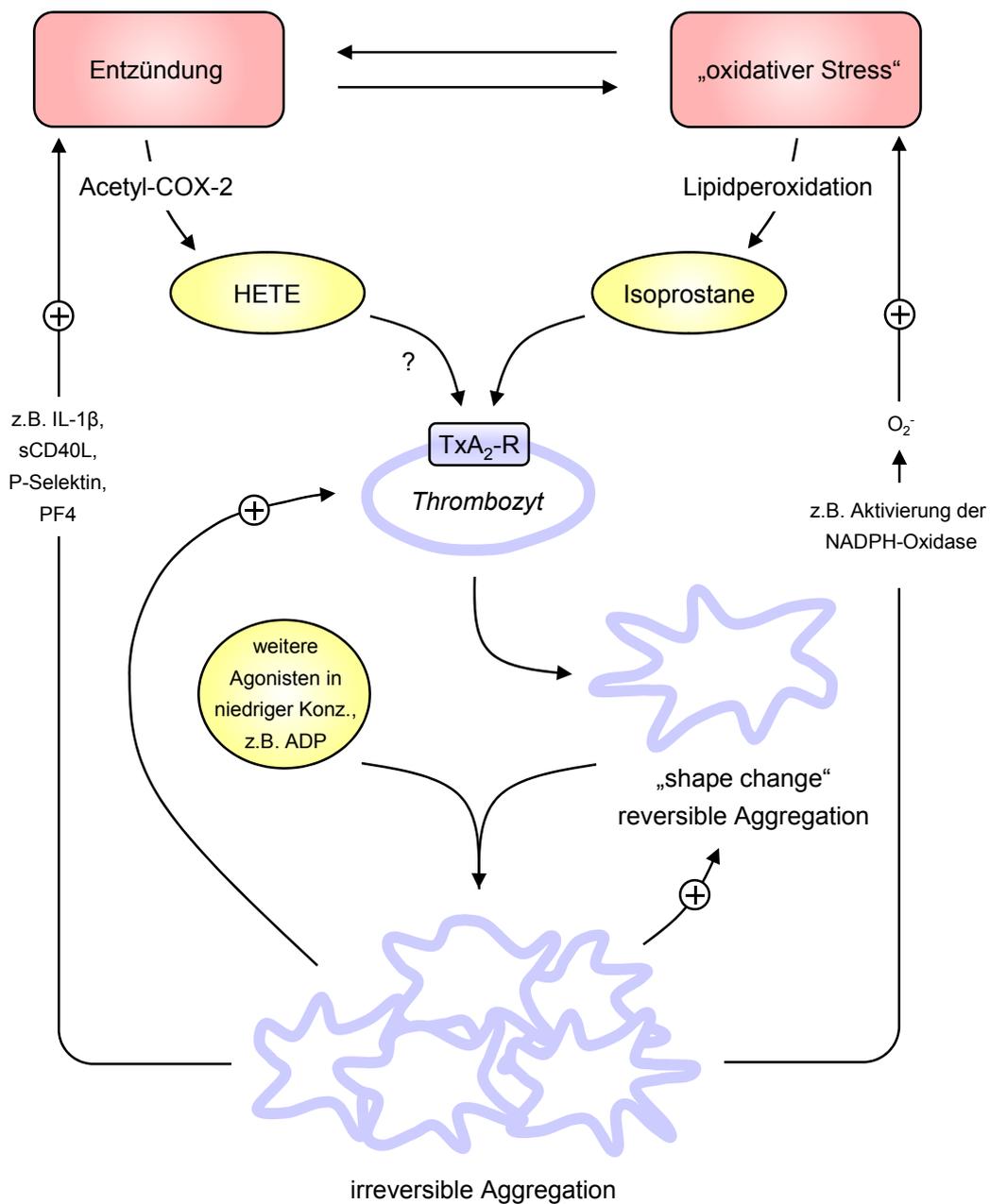


Abb. 139: „Oxidativer Stress“ und Entzündung – Thrombozytenaggregation trotz ASS-Einnahme. Obwohl ASS bei den KHK-Patienten der vorliegenden Studie eine komplette Unterdrückung der thrombozytären TxA₂-Synthese bewirkte, waren zum Teil Patienten mit erhöhtem „oxidativen Stress“ oder Anzeichen einer geringgradigen Entzündung von einer unzureichenden Aggregationshemmung betroffen. Bei diesen Patienten hat vermutlich eine vermehrte Synthese von Verbindungen, die anstelle von TxA₂ mit dem TxA₂-Rezeptor (TxA₂-R) interagieren können (z.B. Isoprostane), zur „ASS-Resistenz“ beigetragen. Die mit Plus-Symbol gekennzeichneten Pfeile zeigen potentielle „feed-forward“-Mechanismen auf, die für eine Verstärkung und Aufrechterhaltung der „ASS-Resistenz“ verantwortlich sein könnten.

4.4.4.8. Genetische Ursachen

Als Ursache einer „ASS-Resistenz“ kommen auch genetische Faktoren in Frage. Zahlreiche Studien haben sich bisher sowohl mit COX-Polymorphismen auseinandergesetzt als auch mit Polymorphismen etlicher thrombozytärer Oberflächenrezeptoren (Goodman et al. 2007). Während genetische Variationen des COX-1-Gens mit einer „Typ II-Resistenz“ in Verbindung gebracht wurden (siehe Abschnitt 4.3.3.), können Polymorphismen von Oberflächenrezeptoren Ursache einer „Typ III-Resistenz“ sein. In einer Studie von Faraday et al. wurde die Erblichkeit einer „ASS-Resistenz“ anhand von insgesamt 1.880 asymptomatischen Probanden aus 309 weißen und 208 schwarzen Familien, in denen sich bereits in jüngeren Jahren eine KHK manifestiert hatte, untersucht. Die Autoren stellten fest, dass die nach ASS-Einnahme (81 mg/Tag) verbliebene Thrombozytenaktivität in hohem Maße von erblichen Faktoren mitbestimmt wurde (Faraday et al. 2007). Davon waren hauptsächlich die nicht direkt von der COX abhängigen Aktivierungswege betroffen, d.h. die „ASS-Resistenz“ vom Typ III scheint in besonderem Maße genetischen Einflüssen zu unterliegen. In der Mehrzahl der Fälle zeigte sich eine verstärkte Thrombozyten-Restaktivität nach ASS-Einnahme, wenn auch schon vor der ASS-Einnahme eine hohe Thrombozytenaktivität beobachtet wurde (Faraday et al. 2007).

Auf Polymorphismen im Kollagen-Rezeptor-Gen wurde bereits im Zusammenhang mit einer Hypersensitivität gegenüber Kollagen in Abschnitt 4.4.4.2. eingegangen. Genetische Veränderungen der ADP-Rezeptoren könnten eine Erklärung für die bei den „Typ III-resistenten“ Patienten beobachtete Hypersensitivität gegenüber ADP liefern. Neben Polymorphismen des P2Y₁-Gens (siehe Abschnitt 4.4.4.3.) kommen auch Polymorphismen des P2Y₁₂-Gens in Frage, die in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden (siehe auch Abschnitt 1.7.3.). Für den 52G>T-Polymorphismus (H2-Haplotyp) des P2Y₁₂-Rezeptors konnte allerdings keine Assoziation mit einer „ASS-Resistenz“ festgestellt werden (vgl. Abschnitt 3.17.). Träger des H2-Haplotyps zeigten im Vergleich zu Nichtträgern keine verstärkte Thrombozytenaggregation, weder nach ADP-Induktion (vgl. Abb. 134 links) noch nach Kollagen-Induktion (vgl. Abb. 132 links und Abb. 133 links) – zwei aggregationsauslösende Wege, die eng miteinander korrelierten (vgl. Abb. 71). Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu den Ergebnissen von Fontana et al., die bei gesunden, nicht behandelten Trägern des H2-Haplotyps eine deutlich erhöhte Aggregationsantwort auf ADP feststellten (Fontana et al. 2003a). Die Autoren hatten vermutet, dass betroffene Patienten – trotz einer antithrombozytären Therapie – einem höheren Risiko für atherothrombotische Ereignisse

ausgesetzt sind. Da in der vorliegenden Studie keine verminderte ASS-Wirkung im Zusammenhang mit dem H2-Haplotyp beobachtet werden konnte, und da in einer kürzlich veröffentlichten klinischen Studie mit 540 KHK-Patienten kein erhöhtes kardiovaskuläres Risiko für Träger des H2-Haplotyps festzustellen war (Schettert et al. 2006), kann die Vermutung von Fontana et al. nicht bestätigt werden. Bernardo et al. und Lev et al. untersuchten ebenfalls den H2-Haplotyp im Zusammenhang mit einer „ASS-Resistenz“; die Autoren nutzten jeweils eine andere Definition der „ASS-Resistenz“ bzw. verwendeten eine andere Methode zur „Resistenz“-Bestimmung (PFA-100[®] in der Arbeit von Bernardo et al.) im Vergleich zur vorliegenden Studie. Aber auch diese zwei Arbeiten kamen zu dem Schluss, dass dem H2-Haplotyp keine Bedeutung unter einer ASS-Therapie zukommt (Bernardo et al. 2006, Lev et al. 2007). Auch unter der Behandlung mit Clopidogrel scheint es zwischen Trägern und Nichtträgern des H2-Haplotyps keine Unterschiede hinsichtlich der Thrombozytenaggregation zu geben (Angiolillo et al. 2005).

Der zweite P2Y₁₂-Rezeptor-Polymorphismus (34C>T), der in der vorliegenden Arbeit untersucht wurde, war ebenfalls nicht mit einer reduzierten ASS-Antwort verbunden (vgl. Abb. 132, Abb. 133 sowie Abb. 134 jeweils rechts). Diese Beobachtung stimmt sowohl mit dem Ergebnis von Fontana et al. bei unbehandelten Probanden überein (Fontana et al. 2003a) als auch mit dem Ergebnis einer klinischen Studie von Ziegler et al., in der weder der 34C>T- noch der 52G>T-Polymorphismus mit einem erhöhten Risiko für zerebrovaskuläre Ereignisse bei pAVK-Patienten unter ASS-Therapie assoziiert werden konnte (Ziegler et al. 2005). Interessant ist, dass in derselben Studie Träger des 34T-Allels im Vergleich zu Nichtträgern unter einer Dauertherapie mit Clopidogrel ein vierfach erhöhtes Risiko für neurologische Ereignisse zeigten (Ziegler et al. 2005).

Die Diskrepanz zwischen den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit und der Studie von Fontana et al. (2003a) in Bezug auf den H2-Haplotyp könnte wie folgt erklärt werden: Eine Aktivierung des P2Y₁₂-Rezeptors führt u.a. zu einer gesteigerten TxA₂-Produktion (Paul et al. 1999, Jin et al. 2002, Shankar et al. 2006). Diese war bei den Patienten der vorliegenden Studie komplett supprimiert – im Gegensatz zu den Probanden der Studie von Fontana et al., die nicht mit ASS behandelt wurden. Somit könnte vermutet werden, dass der H2-Haplotyp vor allem in eine verstärkte TxA₂-Synthese involviert ist. Das hätte bei unbehandelten Probanden tatsächlich eine erhöhte Aggregation zur Folge, während der Effekt unter ASS-Behandlung nicht zum Tragen käme. Um diesen Mechanismus näher zu untersuchen, wäre z.B. die Verwendung von TxA₂-Rezeptor-Antagonisten in weiteren Studien interessant. Auch

Hetherington et al. führten Untersuchungen zum H2-Haplotyp sowie zu drei weiteren P2Y₁₂-Polymorphismen durch. Das Studienkollektiv erhielt keine antithrombozytäre Therapie; die Autoren überprüften die Fibrinogen-Bindung an aktivierte GPIIb-IIIa-Rezeptoren. Keiner der Polymorphismen hatte einen Einfluss auf die Fibrinogen-Bindung (Hetherington et al. 2005). Auch dieses Ergebnis stimmt mit der vorliegenden Arbeit überein, wenn der H2-Haplotyp für eine gesteigerte TxA₂-Bildung nach P2Y₁₂-Rezeptor-Stimulation von Bedeutung ist, denn es ist bekannt, dass die Fibrinogen-Bindung in einer direkten Beziehung zur ADP-Rezeptor-Aktivierung steht, jedoch relativ unbeeinflusst von der TxA₂-Bildung ist. Zusammenfassend trägt weder der 52G>T-Polymorphismus (H2-Haplotyp) noch der 34C>T-Polymorphismus in größerem Ausmaß zur „ASS-Resistenz“ bei. Auch das gleichzeitige Vorhandensein beider Polymorphismen scheint für die ASS-Wirkung bedeutungslos zu sein (vgl. Abb. 135).

Als eine weitere mögliche genetische Ursache einer „ASS-Resistenz“ vom Typ III kommen Polymorphismen des GPIIb-IIIa-Rezeptors in Frage. Der häufig vorkommende P1^{A2}-Polymorphismus im GPIIIa-Gen wurde sowohl mit einer verminderten Unterdrückung der Thrombin-Bildung nach ASS-Einnahme assoziiert (Undas et al. 1999) als auch mit einer verkürzten Blutungszeit (Szczeklik et al. 2000). Allerdings ist die Datenlage zum Teil widersprüchlich (Cooke et al. 1998, Michelson et al. 2000, Macchi et al. 2003, Lev et al. 2007), so dass die Bedeutung dieses Polymorphismus zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht geklärt ist.

Interessant könnten insbesondere im Zusammenhang mit der vorliegenden Arbeit genetische Variationen im COX-2-Gen sein. Cipollone et al. untersuchten den 765G>C-Polymorphismus in einem Kollektiv von 864 Post-MI-Patienten und einer gleichen Anzahl von Kontroll-Patienten. Die Autoren stellten fest, dass Träger des Polymorphismus ein signifikant geringeres MI- und Schlaganfall-Risiko aufwiesen als Nichtträger (Cipollone et al. 2004b). Der Mechanismus, über welchen dieser Polymorphismus seine protektive Wirkung vermittelt, ist noch unbekannt. Allerdings geht der Polymorphismus sowohl mit einer verminderten COX-2-Expression und -aktivität als auch mit einer signifikanten Reduzierung der Serum-CRP-Konzentration einher (Papafili et al. 2002, Cipollone et al. 2004b). Außerdem konnte kürzlich bei gesunden Probanden gezeigt werden, dass es unter der Behandlung mit 100 mg ASS bei Trägern des 765C-Allels im Vergleich zu Nichtträgern zu einer signifikant stärkeren Inhibierung der 11-dehydro-TxB₂-Synthese kam. Es sind allerdings nur 24 Probanden untersucht worden (Gonzalez-Conejero et al. 2005). Ob andere Polymorphismen des COX-2-Gens eine Rolle bei der „ASS-Resistenz“ spielen, ist eine ebenfalls derzeit offene Frage.

4.4.5. **Therapeutische Möglichkeiten zur Überwindung einer „ASS-Resistenz“ vom Typ III**

In der Literatur lassen sich mehrere Hinweise finden, dass eine „ASS-Resistenz“ bei einigen Patienten durch eine Erhöhung der täglichen ASS-Dosis zu überwinden ist. Zum Beispiel ergab die Metaanalyse von Hovens et al. zur Prävalenz der „ASS-Resistenz“, dass in Studien mit ASS-Dosen ≥ 300 mg/Tag signifikant seltener eine unzureichende ASS-Wirkung zu beobachten war als in Studien mit täglichen Dosen von ≤ 100 mg ASS (Hovens et al. 2007). Einige zusätzliche Untersuchungen bestätigen diese Beobachtung (Christiaens et al. 2003, Macchi et al. 2003, Malhotra et al. 2003, Abaci et al. 2005, Lee et al. 2005, von Pape et al. 2005, Gurbel et al. 2007b). So bestimmten z.B. Macchi et al. die Wirkung von 160 mg ASS/Tag mittels PFA-100[®] bei 98 Patienten mit stabiler Angina pectoris. Es wurden 29 „ASS-resistente“ Patienten (29,6%) identifiziert, von denen im Anschluss 25 Patienten für mindestens einen Monat mit 300 mg ASS/Tag behandelt wurden. Eine erneute Bestimmung der Plättchenfunktion ergab, dass unter der höheren ASS-Dosis nur noch 11 Patienten „resistent“ waren (Macchi et al. 2003). Von Pape und Mitarbeiter machten eine ähnliche Beobachtung bei der Untersuchung von 212 Post-MI-Patienten. Unter der Therapie mit 100 mg ASS waren zunächst 18,4% der Patienten „ASS-resistent“, nach Steigerung der Compliance nur noch 10,4% und nach Erhöhung der ASS-Dosis auf 200 bis 300 mg/Tag nur noch 1,4% (von Pape et al. 2005). In diesen Studien konnte aufgrund der verwendeten Methodik nicht zwischen COX-abhängiger und COX-unabhängiger „ASS-Resistenz“ unterschieden werden, so dass die Frage schwer zu beantworten ist, ob die beobachteten positiven Effekte der höheren ASS-Dosierung auch für „Typ III-resistente“ Patienten gelten. Hierzu liefert die ASPECT-Studie (Aspirin-Induced Platelet Effect Study) ein interessantes Ergebnis (Gurbel et al. 2007b). Die Autoren konnten in einem Kollektiv von 125 stabilen KHK-Patienten zeigen, dass trotz nahezu komplett inhibierter AA-induzierter Aggregation, eine variable Kollagen- und ADP-induzierte Aggregation zu beobachten war, die tatsächlich in einer Beziehung zur eingenommenen ASS-Dosis stand (162 mg ASS/Tag waren effektiver als 81 mg ASS/Tag). Es wurde vermutet, dass ASS neben der COX-1-Hemmung weitere antithrombozytäre Effekte in Abhängigkeit von der Dosis ausübt (Gurbel et al. 2007b).

Demnach mag eine Erhöhung der ASS-Dosis durchaus erfolgversprechend sein, allerdings scheint es, dass bei weitem nicht jeder „ASS-Low-Responder“ davon profitiert. Zum Beispiel wurde in dem Fallbeispiel 1 der vorliegenden Arbeit (siehe Abschnitt 3.18.) die ASS-Dosis von 100 mg auf 300 mg erhöht. Es zeigte sich eine Reduzierung der maximalen Kollagen-

induzierten Aggregation um ca. 10%, die ADP-induzierte blieb unverändert. Da die Werte nach wie vor einer „ASS-Low-Response“ zuzuordnen waren, stellte die Dosiserhöhung für diese Patientin keine sinnvolle therapeutische Alternative dar. Auch darf nicht außer Acht gelassen werden, dass jede Steigerung der Dosis mit einer Zunahme an Nebenwirkungen verbunden ist (siehe Abschnitt 1.2.6.). Außerdem konnte in den aktuellen Metaanalysen zur klinischen Relevanz der „ASS-Resistenz“ keine Beziehung zwischen der Ereignisrate und der ASS-Dosis festgestellt werden (Snoep et al. 2007, Krasopoulos et al. 2008). Auch die vielen großen klinischen Studien zur Überprüfung der Effektivität von ASS haben ergeben, dass höhere ASS-Dosen keine höhere antithrombotische Wirksamkeit zur Folge hatten (ATC 2002, Campbell et al. 2007, siehe auch Abschnitt 1.2.6.). Das bedeutet zwar nicht, dass es im Einzelfall nicht dennoch zu einer verbesserten antithrombozytären Wirksamkeit kommen kann, aber grundsätzlich löst eine erhöhte ASS-Dosis nicht das vielfältige Problem der „ASS-Resistenz“.

Die vorliegende Arbeit konnte einen Zusammenhang zwischen einer „ASS-Resistenz“ und Entzündungsprozessen zeigen (vgl. Abschnitt 4.4.1.2.) sowie eine Beteiligung der COX-2 an der Aggregationsreaktion (vgl. Abschnitt 4.4.4.6.). Dennoch werden COX-2-Hemmer zur Überwindung einer „ASS-Resistenz“ höchstwahrscheinlich keine Rolle spielen, da seit einiger Zeit bekannt ist, dass COX-2-Hemmer das kardiovaskuläre Risiko erhöhen, vermutlich aufgrund der Unterdrückung der endothelialen Prostacyclin-Synthese (Steffel et al. 2006).

Eine vielversprechende Behandlungsmöglichkeit bei Vorliegen einer „ASS-Resistenz“ stellt die zusätzliche Gabe eines ADP-Rezeptor-Antagonisten (z.B. Clopidogrel) dar. In der vorliegenden Arbeit wurde festgestellt, dass die Thrombozyten „ASS-resistenter“ Patienten besonders stark auf den Agonisten ADP ansprechen (vgl. Abschnitt 4.4.4.3.), so dass eine Blockierung des ADP-abhängigen Aktivierungsweges durch Clopidogrel äußerst sinnvoll erscheint. Wie in den Fallbeispielen (siehe Abschnitt 3.18.) gezeigt, konnte durch die duale Behandlung mit ASS und Clopidogrel sowohl die ADP-induzierte Aggregation um 18% (Fallbeispiel 1) bzw. 26% (Fallbeispiel 2) gesenkt werden als auch die Kollagen-induzierte Aggregation um 21% (Fallbeispiel 1) bzw. 17% (Fallbeispiel 2) im Vergleich zur ASS-Monotherapie (vgl. auch Abschnitt 3.18.3. Tab. 40, Abb. 136 sowie Abb. 137). Das Fallbeispiel 1 demonstriert zusätzlich, dass die alleinige Behandlung mit Clopidogrel nicht in Frage kommt, da sowohl die AA- als auch die Kollagen-induzierte Aggregation nicht oder nur unzureichend durch Clopidogrel beeinflusst wird (vgl. Tab. 40 sowie Abb. 136).

Neben dem direkten Effekt von Clopidogrel auf die ADP-induzierte Thrombozytenaggregation könnten sich möglicherweise noch weitere Eigenschaften des Clopidogrels auf Faktoren, die im Zusammenhang mit einer „ASS-Resistenz“ von Bedeutung sind, positiv auswirken. So konnte z.B. kürzlich in einer Studie mit 103 ASS-behandelten KHK-Patienten gezeigt werden, dass es durch die zusätzliche Einnahme von Clopidogrel sowohl zu einer Reduzierung oxidativer (8-iso-PGF_{2α}) als auch inflammatorischer Parameter (CRP, sCD40L, RANTES) kam (Heitzer et al. 2006). Da in der vorliegenden Studie sowohl oxidative als auch entzündliche Vorgänge mit einer „ASS-Resistenz“ assoziiert wurden (siehe Abschnitt 4.4.1.2. sowie Abschnitt 4.4.4.5. bis 4.4.4.7.), erscheint eine zusätzliche Behandlung der „resistenten“ Patienten mit Clopidogrel vor diesem Hintergrund als besonders aussichtsreich. Tatsächlich hatte sich die Isoprostan-Ausscheidung in den beiden Fallbeispielen um 29% (Fallbeispiel 1) bzw. um 38,5% (Fallbeispiel 2) unter der Kombinationstherapie reduziert (vgl. Abschnitt 3.18.3.1.).

Unterstützt wird die Vermutung, dass „ASS-resistente“ Patienten von Clopidogrel profitieren könnten, durch eine kürzlich von Eikelboom et al. publizierte randomisierte, doppelblinde, Placebo-kontrollierte Crossover-Studie mit 36 ASS-behandelten pAVK-Patienten. Die Autoren konnten nachweisen, dass bei denjenigen Patienten, bei denen ASS die geringste Plättcheninhibition hervorgerufen hatte, die größten antiaggregatorischen Effekte von Clopidogrel zu beobachten waren (Eikelboom et al. 2005). In den verschiedenen großen klinischen Studien zur Bestimmung der Wirksamkeit einer dualen antithrombozytären Therapie im Vergleich zur ASS-Monotherapie zeigte sich, dass die Kombination aus ASS und Clopidogrel hinsichtlich der kardiovaskulären Ereignisrate der Monotherapie deutlich überlegen war (COMMIT [Clopidogrel and Metoprolol in Myocardial Infarction Trial], Chen et al. 2005; CURE [Clopidogrel in Unstable angina to prevent Recurrent Events], Yusuf et al. 2001; PCI-CURE [Substudie von CURE], Mehta et al. 2001; CREDO [Clopidogrel for the Reduction of Events During Observation], Steinhubl et al. 2002). Während in der CHARISMA (Clopidogrel for High Atherothrombotic Risk and Ischemic Stabilization, Management, and Avoidance)-Studie zunächst kein Vorteil für die Kombinationstherapie festgestellt wurde (Bhatt et al. 2006), ergab eine spätere Subgruppen-Analyse von insgesamt 9.478 Patienten mit früherem MI, Schlaganfall oder mit symptomatischer pAVK, dass die Patienten unter der Behandlung mit ASS und Clopidogrel signifikant seltener von einem vaskulärbedingten Ereignis betroffen waren als die Patienten unter der alleinigen ASS-Therapie; das Auftreten schwerer Blutungen war unabhängig vom Therapieregime (Bhatt et al. 2007). Diese Subgruppen-Analyse verdeutlicht, dass es wichtig ist, die bestimmten

Patientengruppen zu identifizieren, die von einer dualen antithrombozytären Therapie profitieren könnten. Die Studie von Pamukcu et al. ist bisher eine der wenigen Studien, in der „ASS-resistente“ KHK-Patienten mit Clopidogrel behandelt und nachbeobachtet wurden. Die Autoren behandelten 28 zuvor mittels PFA-100[®] identifizierte „ASS-resistente“ KHK-Patienten mit zusätzlich 75 mg Clopidogrel für 6 bis 12 Monate. Tatsächlich traten vermehrt kardiovaskuläre Ereignisse auf, wenn Clopidogrel abgesetzt und die Behandlung mit ASS alleine fortgesetzt wurde (Pamukcu et al. 2007).

Wenngleich die ASS-Clopidogrel-Therapie erfolgversprechend scheint, so haben sich doch in letzter Zeit Berichte gehäuft, in denen eine „Clopidogrel-Resistenz“ beobachtet worden war (Michos et al. 2006, Wang et al. 2006, Snoep et al. 2007). Von besonderer Bedeutung ist die kombinierte „ASS-Clopidogrel-Resistenz“ (Lev et al. 2006, Templin et al. 2006). Lev et al. konnten z.B. in einem Kollektiv mit 150 KHK-Patienten zeigen, dass 47,4% der „ASS-resistenten“ Patienten (9 von 19 Patienten) auch von einer „Clopidogrel-Resistenz“ betroffen waren (Lev et al. 2006). Es stellt sich die Frage, ob diese duale „Resistenz“ auch bei anderen P2Y₁₂-Rezeptor-Antagonisten auftritt. Es befinden sich derzeit einige interessante Substanzen in der klinischen Erprobung, so z.B. Prasugrel (Jakubowski et al. 2007) oder AZD6140 (Steinhubl und Roe 2007).

Wie in Abschnitt 4.4.4.7. beschrieben, spielt wahrscheinlich die vermehrte Bildung von Isoprostanen für die Ausprägung einer „ASS-Resistenz“ eine wichtige Rolle. Da nachgewiesen werden konnte, dass Isoprostane am TxA₂-Rezeptor agonistisch wirken, kommt der Behandlung einer „ASS-Resistenz“ mit TxA₂-Rezeptor-Antagonisten möglicherweise eine entscheidende Bedeutung zu. Die Behandlung könnte zunächst bei rein mechanistischer Betrachtung mehrere Vorteile miteinander verbinden: Nicht nur die aggregationsfördernde Wirkkomponente der Isoprostane (und auch vielleicht die der HETE-Verbindungen, siehe Abschnitt 4.4.4.6.) würde inhibiert, sondern gleichzeitig auch die aggregationshemmende Wirkkomponente der Isoprostane verstärkt – durch Anreicherung an einen cAMP-gekoppelten Rezeptor (Isoprostan-Rezeptor?) infolge der Verdrängung vom TxA₂-R (Khasawneh et al. 2008, siehe auch Abschnitt 4.4.4.7.). Auch die erwünschte Prostacyclin-Synthese wird durch TxA₂-R-Antagonisten nicht supprimiert, im Gegenteil: Für den kombinierten TxA₂-R-Antagonisten und TxA₂-Synthase-Inhibitor Terbogrel konnte sogar eine Steigerung der Prostacyclin-Bildung beobachtet werden (Guth et al. 2004). Im Zusammenhang mit einer „ASS-Resistenz“ wurde Terbogrel von der Arbeitsgruppe um Zimmermann et al. untersucht. Bei „ASS-resistenten“ Patienten nach Bypass-Operation

konnten die Autoren eine erfolgreiche Hemmung der Thrombozytenaggregation durch Terbogrel beobachten (Zimmerman et al. 2003). Es handelte sich bei diesen Patienten allerdings um Patienten mit einer „Typ II-Resistenz“ (siehe Abschnitt 1.4.5.), so dass es sehr interessant bleibt, abzuwarten, ob auch Patienten mit einer „Typ III-Resistenz“ von einer Therapie mit TxA₂-R-Antagonisten profitieren könnten. Derzeit ist allerdings noch kein TxA₂-R-Antagonist für den klinischen Gebrauch zugelassen.

Vor dem Hintergrund, dass ein gestörtes Gleichgewicht der körpereigenen pro- und antioxidativen Systeme mit der Folge des „oxidativen Stresses“ für eine „ASS-Resistenz“ mitverantwortlich sein könnte, ist zu überlegen, ob eine verbesserte ASS-Wirkung erreichbar wäre, wenn zusätzlich Antioxidantien eingenommen würden. In der vorliegenden Arbeit wurden die Patienten zwar auch nach der Einnahme von Antioxidantien gefragt, und 18,5% der Patienten nahmen auch regelmäßig täglich mindestens ein antioxidativ wirkendes Nahrungsergänzungsmittel zu sich (vgl. Abschnitt 3.1.3.4.) – ein Zusammenhang zur „ASS-Resistenz“ konnte aber nicht festgestellt werden (vgl. Abschnitt 3.12.). Da im Rahmen dieser Studie weder Art und Dosierung des Antioxidans noch ein definierter Behandlungszeitraum festgelegt worden war, konnte kaum mit einem positiven Ergebnis gerechnet werden. In der AVASAS (Aspirin Versus AScorbic acid plus Aspirin in Stroke)-Studie konnte hingegen gezeigt werden, dass die kombinierte Behandlung mit ASS (300 mg/Tag) und Vitamin C (200 mg/Tag) im Vergleich zur alleinigen ASS-Therapie mit einer signifikant geringeren Isoprostan-Exkretion einherging (Polidori et al. 2005). Davì et al. stellten bei Untersuchungen an Patienten mit Hypercholesterinämie (Davì et al. 1997) bzw. Diabetes (Davì et al. 1999) fest, dass es unter einer Behandlung mit Vitamin E nicht nur zu einer signifikanten Reduktion der 8-iso-PGF_{2α}-Konzentration kam, sondern auch zu einer geringeren Thrombozytenaktivierung, gemessen anhand der TxB₂-Metabolit-Exkretion. Cipollone et al. bestimmten Vitamin E-Plasma-Konzentrationen von ASS-behandelten Patienten mit instabiler Angina pectoris und entdeckten eine inverse Korrelation zur Ausscheidungsrate von sowohl 8-iso-PGF_{2α} als auch 11-dehydro-TxB₂ (Cipollone et al. 2000). Diese Arbeiten lieferten die ersten Hinweise, dass es nicht nur zu einer Reduktion des „oxidativen Stresses“ unter Antioxidantien kommt, sondern infolgedessen möglicherweise auch zu einer Verminderung der Thrombozytenaktivität.

Allerdings ist der Nutzen einer Vitamin-Supplementierung zur Prophylaxe kardiovaskulärer Erkrankungen sehr umstritten. Aus mehreren großen randomisierten kontrollierten Studien ließ sich kein Nutzenbeleg ableiten (Vivekananthan et al. 2003). In einer kürzlich

veröffentlichten Metaanalyse wurde u.a. für Vitamin E sogar eine erhöhte Sterblichkeit festgestellt (Bjelakovic et al. 2007). Lediglich in der CHAOS (Cambridge Heart AntiOxidant Study)-Studie hatte die Einnahme von Vitamin E zu einer deutlichen Senkung der Herzinfarktrate geführt (Stephens et al. 1996). Roberts et al. kritisierten die bisher durchgeführten Studien zur Wirksamkeit von Antioxidantien, da in keiner dieser Studien überprüft worden war, ob es durch das Antioxidans tatsächlich auch zu einer Beeinflussung des „oxidativen Stresses“ gekommen war (Roberts et al. 2007). Die Autoren hatten in eigenen Untersuchungen festgestellt, dass mehrere Faktoren für eine bestmögliche Reduzierung des „oxidativen Stresses“ zusammenwirken müssen – eine längerfristige antioxidative Behandlungsdauer (mindestens 16 Wochen) und eine ausreichend hohe Dosierung (1.600 I.E./Tag oder 3.200 I.E./Tag); außerdem ist entscheidend, ob das natürliche oder das künstliche Vitamin E eingenommen wird (Burton et al. 1998) und ob auch tatsächlich ein Zustand erhöhten „oxidativen Stresses“ nachweisbar ist. Meagher et al. vermuteten, dass nur deshalb häufig keine positiven Effekte von Antioxidantien zu beobachten wären, weil bei einigen Probanden/Patienten möglicherweise gar kein „oxidativer Stress“ vorgelegen habe (Meagher et al. 2001). Demzufolge wären Studien wünschenswert, in denen überprüft würde, ob „ASS-resistente“ Patienten mit hohem „oxidativen Stress“ von einer ASS-Antioxidans-Kombination profitieren könnten.

4.5. Schlussfolgerungen

Die vorliegende Studie zeigt, dass zahlreiche stabile KHK-Patienten, die zur kardiovaskulären Sekundärprophylaxe mit 100 mg ASS/Tag behandelt werden, von einer unbefriedigenden Thrombozytenaggregationshemmung betroffen sind. Es handelt sich bei dieser „ASS-Resistenz“ nicht um ein Unvermögen von ASS, die COX zu hemmen; d.h. eine „ASS-Resistenz im engeren Sinne“ („Typ II-Resistenz“) ist bei stabilen KHK-Patienten nicht oder allenfalls nur sehr selten anzutreffen. Vielmehr handelt es sich in einigen Fällen um eine Non-Compliance oder um eine Abschwächung der ASS-Wirkung aufgrund einer Interaktion mit NSAIDs („Typ I-Resistenz“). Diese Form der „Resistenz“ ist prinzipiell vermeidbar. Ein sehr viel größeres Problem stellt die „Typ III-Resistenz“ dar, die im Studienkollektiv am häufigsten beobachtet wurde. Diese Patienten zeigen eine starke Thrombozytenaggregation, die über Wege hervorgerufen wird, die durch die alleinige Hemmung der COX nicht

beeinflusst werden können. Vermutlich sind diese Patienten einem erhöhten Risiko für wiederkehrende kardiovaskuläre Ereignisse ausgesetzt; die retrospektive Analyse der vorliegenden Arbeit unterstützt die Hypothese.

Eine „ASS-Resistenz“ vom Typ III scheint durch verschiedene Faktoren hervorgerufen zu werden. Insbesondere scheinen Anzeichen einer chronisch systemischen Entzündung und ein gestörtes oxidatives/antioxidatives Gleichgewicht zu einer unzureichenden ASS-Wirkung beizutragen. Möglicherweise spielt die COX-unabhängige Bildung von proaggregatorisch wirksamen Isoprostanen eine zentrale Rolle.

Trotz der offensichtlichen Grenzen der antithrombozytären ASS-Therapie stellt die Behandlung mit ASS gegenwärtig die bestmögliche Wahl in der Sekundärprophylaxe der KHK dar. Derzeit kann für die klinische Praxis kein Thrombozytenfunktionstest zur Identifizierung „ASS-resistenter“ Patienten empfohlen werden und auch keine Umstellung der Therapie. Die zusätzliche Gabe von Clopidogrel oder TxA₂-Rezeptor-Antagonisten sind vielversprechende Ansätze zur Überwindung einer „ASS-Resistenz“, aber noch stehen große klinische Studien aus, die diese Therapieoptionen systematisch untersuchen. Möglicherweise mag es in ferner Zukunft eine individualisierte antithrombozytäre Therapie geben – bis dahin müssen aber noch viele weitere Erkenntnisse zur „ASS-Resistenz“ gewonnen werden.

5. Zusammenfassung – Summary

Hintergrund: Niedrig dosierte Acetylsalicylsäure (ASS) ist das Mittel der Wahl in der antithrombozytären Sekundärprophylaxe der koronaren Herzerkrankung (KHK). Trotz ASS-Therapie erleidet eine beachtliche Anzahl von Patienten erneut kardiovaskuläre Ereignisse. Daher stellt sich die Frage, ob diese Ereignisse zum Teil das Resultat einer fehlenden oder verminderten Wirkung von ASS („ASS-Resistenz“) sind. Zu dem Phänomen der „ASS-Resistenz“ können gegenwärtig zahlreiche Fragen nicht ausreichend beantwortet werden: Kommt der „ASS-Resistenz“ eine klinische Bedeutung zu? Wie häufig tritt sie auf? Welche Methode zur „Resistenz“-Bestimmung liefert die zuverlässigsten Ergebnisse? Welche Ursachen und Mechanismen liegen einer mangelnden ASS-Wirkung zugrunde? Gibt es therapeutische Alternativen zur Überwindung einer „ASS-Resistenz“?

Zielsetzung: Ziel der vorliegenden Arbeit war, „ASS-resistente“ KHK-Patienten zu identifizieren, zu charakterisieren und verschiedene Hypothesen zu „Resistenz“-Mechanismen zu überprüfen. Es sollte untersucht werden, ob eine verstärkte COX-2-Expression in Thrombozyten, eine extrathrombozytäre Thromboxan A₂-Synthese, eine vermehrte Bildung von Isoprostanen oder genetische Variationen des thrombozytären P2Y₁₂-Rezeptors zur „ASS-Resistenz“ beitragen.

Methoden: Es wurden 130 stabile KHK-Patienten, die mit 100 mg ASS/Tag behandelt wurden, in die Studie eingeschlossen. Die Patienten wurden ausführlich zu kardiovaskulären Risikofaktoren, zur Krankengeschichte und zur aktuellen Medikation befragt. Die Bestimmung der Thrombozytenaggregation erfolgte turbidimetrisch in plättchenreichem Plasma. Als Agonisten wurden Kollagen (0,5, 1, 2, 5 und 10 mg/l), AA (1 mM) und ADP (2 µM) verwendet. Außerdem wurde der Einfluss von 100 µM ASS und 10 µM des selektiven COX-2-Hemmers Rofecoxib in vitro auf die Aggregation untersucht. Die Kollagen-induzierte TxB₂-Bildung wurde mittels EIA bestimmt. Die ASS-Metabolite Salicylsäure und Salicylursäure wurden im Urin mittels HPLC quantifiziert. Es wurden COX-1-Vollblut-Aktivitätsassays durchgeführt sowie Versuche zur Ermittlung der COX-2-Vollblut-Aktivität sowohl hinsichtlich der PGE₂- als auch TxB₂-Bildung. Darüberhinaus wurde die Urinexkretion der Metabolite 2,3-dn-TxB₂ und 2,3-dn-6-keto-PGF_{1α} mittels GC-tandem MS analysiert. Anhand von Western Blots erfolgte die Quantifizierung der COX-2 aus Thrombozytenproteinen. Mittels IAC und GC-MS wurde die 8-iso-PGF_{2α}-Exkretion bestimmt. Die P2Y₁₂-Rezeptor-Polymorphismen (52G>T und 34C>T) wurden mit Hilfe der PCR-RFLP-Analyse untersucht.

Ergebnisse: Es wurde hinsichtlich der maximalen Kollagen-induzierten Aggregation eine erhebliche interindividuelle Variabilität festgestellt. Die TxA_2 -Bildung war bei allen bis auf 4 Patienten komplett supprimiert. Lediglich bei diesen 4 Patienten konnte durch den Zusatz von ASS in vitro eine Reduktion der Aggregation (um 50%) erzielt werden, einhergehend mit einer nahezu 100%igen Inhibierung der TxA_2 -Synthese. Bei einem dieser Patienten wurde die verminderte ASS-Wirkung durch eine ASS-Ibuprofen-Interaktion hervorgerufen, bei den weiteren 3 Patienten durch pharmakokinetische Besonderheiten oder mangelnde Einnahmetreue. Von den verbliebenen 126 Patienten wurden diejenigen Patienten, die der obersten Terzile mit der höchsten Aggregation angehörten, als ASS-Low-Responder eingestuft ($n = 42$). Die Thrombozyten der Low-Responder sprachen bereits auf geringste Kollagen-Konzentrationen an ($\text{EC}_{50} = 0,19 \text{ mg/l}$), während vergleichbare Konzentrationen im PRP der Responder keine Aggregation auslösen konnten ($p < 0,0001$). Zusätzlich zeigten die Low-Responder eine verstärkte ADP-induzierte ($p < 0,0001$) sowie AA-induzierte Aggregation ($p < 0,0001$), obwohl bei letzterer kein Wert über 20% lag. Die Low-Responder waren signifikant älter ($p = 0,0004$) und häufiger von einer Hypercholesterinämie betroffen ($p = 0,0334$). Patienten, die in den letzten 3 Monaten vor Studienbeginn gegen Pneumokokken, Hepatitis A oder Tetanus/Diphtherie geimpft worden waren, zeigten eine höhere Aggregation als die kurz zuvor nicht geimpften Patienten ($p = 0,0140$). Responder und Low-Responder unterschieden sich zwar nicht in der thrombozytären COX-2-Expression, dennoch ließ sich die Aggregation im Gegensatz zur TxA_2 -Synthese in Abhängigkeit vom thrombozytären COX-2-Gehalt etwas durch Rofecoxib reduzieren ($p = 0,0169$). Je höher der Serum-CRP-Wert lag, desto höher war die COX-2 (74 kDa)-Expression in den Thrombozyten ($p = 0,0297$). Die Low-Responder zeigten eine deutlich verstärkte 8-iso-PGF $_{2\alpha}$ -Exkretion ($p = 0,0009$). Die P2Y $_{12}$ -Polymorphismen standen in keiner Beziehung zur „ASS-Resistenz“. Die retrospektive Analyse ergab, dass Low-Responder, die vor Beginn der ASS-Therapie bereits einen MI erlitten hatten, signifikant häufiger von einem Reinfarkt unter ASS betroffen waren als Responder ($p = 0,0398$).

Schlussfolgerungen: Bei zahlreichen ASS-behandelten KHK-Patienten ist die Aggregation trotz komplett inhibierter TxA_2 -Synthese nur unzureichend gehemmt. Insbesondere scheinen Anzeichen einer chronisch systemischen Entzündung und ein gestörtes oxidatives/antioxidatives Gleichgewicht zur „ASS-Resistenz“ beizutragen. Möglicherweise spielt die COX-unabhängige Bildung von proaggregatorisch wirksamen Isoprostanen eine zentrale Rolle. Diese Patienten sind vermutlich einem erhöhten Risiko für wiederkehrende kardiovaskuläre Ereignisse ausgesetzt. Die zusätzliche Gabe von Clopidogrel oder TxA_2 -R-Antagonisten könnten vielversprechende Ansätze zur Überwindung einer „ASS-Resistenz“ sein.

Summary

Background: Low-dose aspirin is the most commonly used antiplatelet drug for secondary prevention in patients with coronary artery disease (CAD). Despite aspirin therapy, a substantial number of patients experience recurrent cardiovascular events. Thus, the question arises whether these events are in part due to a lacking or diminished response to aspirin (“aspirin resistance”). Currently, numerous questions regarding the phenomenon of “aspirin resistance” cannot be answered sufficiently: Is there a relation between “aspirin resistance” and clinical outcomes? How prevalent is “aspirin resistance”? Which laboratory method gives the most reliable results? Which are the causes and mechanisms underlying a reduced aspirin response? Are there therapeutic opportunities to overcome “aspirin resistance”?

Aim: The aim of the present work was to identify and to characterize “aspirin-resistant” CAD patients and to test several hypothetical mechanisms of “aspirin resistance”. The objective was to investigate whether increased platelet COX-2 expression, extraplatelet TxA₂ biosynthesis, isoprostane formation or genetic variations of the platelet receptor P2Y₁₂ contribute to aspirin non-responsiveness.

Methods: A total of 130 stable CAD patients taking 100 mg aspirin per day were included in the present study. Patient history, cardiovascular risk factors and the actual medication were recorded using a standardized questionnaire. Platelet aggregation was studied in platelet-rich plasma by turbidimetry. Platelets were stimulated either by collagen (0.5, 1, 2, 5 and 10 mg/L), arachidonic acid (1 mM) or ADP (2 μM). Furthermore, platelet aggregation was determined in samples treated with 100 μM aspirin or with 10 μM rofecoxib, a selective COX-2 inhibitor, *in vitro*. Collagen-induced TxA₂ formation was measured by EIA. The aspirin metabolites salicylic acid and salicyluric acid were quantified in urine by HPLC. In whole blood, COX-1 and COX-2 activity assays were performed; in this, the contribution of COX-2 activity to both TxA₂ and PGE₂ synthesis was studied. In addition, urinary excretion of 2,3-dn-TxB₂ and 2,3-dn-6-keto-PGF_{1α} was analyzed by GC-tandem MS. Western Blotting was carried out to quantify platelet COX-2 protein expression. Determination of urinary excretion of 8-iso-PGF_{2α} was performed by IAC and GC-MS. P2Y₁₂ receptor polymorphisms (52G>T and 34C>T) were detected by PCR-RFLP analysis.

Results: Despite regular aspirin treatment, a wide interindividual variability of maximal *ex vivo* platelet aggregation responses to collagen was noted. TxA₂ formation was completely inhibited in all but 4 patients. Only in these 4 patients, a reduction of platelet aggregation

(about 50%) was achieved by adding aspirin in vitro, accompanied by a nearly 100% inhibition of TxA_2 synthesis. In one of these patients, “aspirin resistance” was caused by an interaction between aspirin and ibuprofen. In the other three patients, reduced aspirin response was due to pharmacokinetic mechanisms or noncompliance. Among the remaining 126 patients, those patients were defined to be aspirin low-responders who belong to the highest tertile of residual platelet activity ($n = 42$). Platelets of low-responders formed aggregates when stimulated by very low collagen concentrations ($\text{EC}_{50} = 0.19 \text{ mg/L}$), whereas comparable concentrations did not evoke aggregation in platelet-rich plasma of responders ($p < 0.0001$). In addition, aspirin low-responders had significantly higher ADP-induced ($p < 0.0001$) and arachidonic acid-induced aggregation ($p < 0.0001$), although the latter did not show any value above 20%. Low-responders were significantly older ($p = 0.0004$) and more often hypercholesterolemic ($p = 0.0334$). Patients who had received vaccination against pneumococcus, hepatitis A, or tetanus/diphtheria within 3 months preceding the study had a significantly higher residual platelet activity than those who had received no immunization ($p = 0.0140$). There was no significant difference in the levels of COX-2 protein expression between aspirin responders and aspirin non-responders; however, depending on platelet COX-2 protein concentration, aggregation in contrast to TxA_2 formation was somewhat reduced by rofecoxib ($p = 0.0169$). Serum C-reactive protein levels correlated positively with COX-2 (74 kDa) expression in platelets ($p = 0.0297$). Aspirin low-responders showed a significantly higher urinary excretion of 8-iso-PGF_{2 α} compared to aspirin responders ($p = 0.0009$). The P2Y₁₂ receptor polymorphisms did not contribute to “aspirin resistance”. A retrospective analysis revealed that aspirin low-responders who had experienced their first myocardial infarction before the first prescription of aspirin were significantly more affected by a reinfarction during chronic aspirin treatment than aspirin responders ($p = 0.0398$).

Conclusions: Despite complete inhibition of the TxA_2 amplification pathway, a considerable number of CAD patients taking low dose aspirin for cardiovascular protection showed an inadequate inhibition of platelet aggregation. Signs of chronic systemic inflammation and an altered oxidant/antioxidant balance seem to contribute to “aspirin resistance”. The increased platelet reactivity may be mediated by isoprostanes which are released by a non-enzymatic, free radical-mediated mechanism, and activate platelets via TxA_2 receptor stimulation. These “aspirin resistant” patients are likely to be at increased risk of recurrent cardiovascular events compared with “aspirin sensitive” patients. The addition of platelet inhibitors like clopidogrel or TxA_2 receptor antagonists may be helpful to overcome “aspirin resistance”.

6. Abkürzungen

A

a bzw. A	Adenin
A, mA, μ A	Ampere, Milliampere, Mikroampere
Å	Ångström ($1 \text{ Å} = 10^{-10} \text{ m}$)
AA	Arachidonsäure
ACE	Angiotensin-Converting-Enzym
AChE	Acetylcholinesterase
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
a.H.	außer Handel
ANOVA	analysis of variance
APACT	automated platelet aggregation coagulation tracer
APS	Ammoniumpersulfat
Arg	Arginin
ASS	Acetylsalicylsäure
AT	Angiotensin
ATC	Antithrombotic Trialists' Collaboration
ATL	aspirin triggered lipoxins
AUC	Fläche unter der Kurve, area under the curve

B

BMI	Body Mass Index
bp	Basenpaare
BSTFA	N,O-bis(Trimethylsilyl)trifluoroacetamid

C

C	Cytosin
°C	Grad Celsius
Ca	Calcium
COX	Cyclooxygenase
CRP	C-reaktives Protein

D

d	Tag
DMSO	Dimethylsulfoxid
dn	dinor
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTPs	Desoxyribonucleotid-5'-triphosphat, Gemisch zu gleichen Anteilen aus Adenosin-5'-triphosphat, Cytidin-5'-triphosphat, Guanosin-5'-triphosphat, Thymidin-5'-triphosphat

E

EC ₅₀	Konzentration, die zum halbmaximalen Effekt führt
------------------	---

Abkürzungen

ECL	enhanced chemiluminescence
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EIA	enzyme immuno assay
EU	Endotoxin Units
eV	Elektronenvolt
G	
g, mg, µg, pg	Gramm, Milligramm, Mikrogramm, Pikogramm
G	Guanin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase
GC	Gaschromatographie
GC-MS	Gaschromatographie-Massenspektrometrie
GC-tandem MS	Gaschromatographie-Tandemmassenspektrometrie
GP	Glykoprotein
GPIIb-IIIa	Fibrinogen-Rezeptor
GPIa-IIa	ein Kollagen-Rezeptor
GPVI	ein Kollagen-Rezeptor
H	
h	Stunde
HCl	Salzsäure
HDL	High-density-Lipoprotein
HETE	Hydroxyeicosatetraensäure
HPLC	high performance liquid chromatography
HRP	Horseradish Peroxidase
I	
IAC	Immunaффinitätschromatographie
IC ₅₀	Pharmakon-Konzentration, bei der 50% Hemmung erzielt wird, inhibitory concentration
ID	Innendurchmesser
I.E.	Internationale Einheit
Ig	Immunglobulin
IL-1β	Interleukin-1β
K	
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
KHK	koronare Herzerkrankung
KI	Konfidenzintervall
Koll-R	Kollagen-Rezeptor
Konz.	Konzentration

Abkürzungen

L

l, dl, ml, µl, nl, pl, fl	Liter, Deziliter, Milliliter, Mikroliter, Nanoliter, Pikoliter, Femtoliter
λ	Wellenlänge
LDL	Low-density-Lipoprotein
LO	Lipoxygenase
LPE	Flüssigphasenextraktion
LPS	Lipopolysaccharide

M

m, cm, mm, µm, nm	Meter, Zentimeter, Millimeter, Mikrometer, Nanometer
M	Molarität
MCH	mittlerer Hämoglobingehalt des Erythrozyten
MCHC	mittlere Hämoglobinkonzentration des Erythrozyten
mCRP	modifiziertes C-reaktives Protein
MCV	mittleres Erythrozytenvolumen
MeOH	Methanol
MI	Myokardinfarkt
min	Minute
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mol, mmol, µmol	Mol, Millimol, Mikromol
mRNA	Messenger-Ribonucleinsäure
MRP	Multidrug Resistance-Related Protein
MS	Massenspektrometrie
MSWS	Mass Spectrometry Workstation
m/z	Masse/Ladung

N

n	Patientenanzahl bzw. Anzahl der Proben
N	Normalität
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
nCRP	natives C-reaktives Protein
NEB	New England Biolabs [®]
NICI	negative ion chemical ionization
NSAID	non-steroidal anti-inflammatory drug

O

o	ortho
OP	Operation

P

PAF	Platelet-activating factor
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
pAVK	periphere arterielle Verschlusskrankheit
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung

Abkürzungen

PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PF4	Plättchenfaktor 4
PFA	Platelet Function Analyzer
PFB	Pentafluorobenzyl
PG	Prostaglandin
PGI ₂	Prostacyclin
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H ⁺ -Konzentration
PL	Phospholipase
PI ^{A1} /PI ^{A2}	Polymorphismus im GPIIIa-Gen
p.o.	per os
POC	Point-of-Care
PRP	plättchenreiches Plasma
PPP	plättchenarmes Plasma
PTCA	perkutane transluminale Coronarangioplastie
P2X ₁ , P2Y ₁ , P2Y ₁₂	ADP-Rezeptoren
R	
r	Korrelationskoeffizient nach Pearson
r-COX	rekombinante Cyclooxygenase
RFLP	Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus
ρ (rho)	Rang-Korrelationskoeffizient nach Spearman
RANTES secreted	regulated upon activation normally T-cell expressed and secreted
RNA	Ribonucleinsäure
ROC	Receiver-Operating-Characteristics
ROS	reactive oxygen species
RPFA	Rapid Platelet Function Assay
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
S	
sCD40L	soluble CD40 Ligand
SD	Standardabweichung
SDS	Sodiumdodecylsulfat
sek	Sekunden
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
SIM	selected-ion monitoring
siRNA	small interfering RNA
Sma	Serratia marcescens
SNP	single nucleotide polymorphism
SPE	Festphasenextraktion
T	
t	Zeit
t bzw. T	Thymin

Abkürzungen

$t_{1/2}$	Halbwertszeit
t_r	Retentionszeit
Taq	Thermus aquaticus
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TBST	TBS mit Tween [®] 20
TEG	Thrombelastographie
TEMED	Tetramethylethylenamin
TIA	transitorische ischämische Attacke
TMS	Trimethylsilyl
TNF α	Tumornekrosefaktor- α
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Tsp	Thermus species
Tx	Thromboxan
TxA ₂ -R	Thromboxan A ₂ -Rezeptor
TxS	Thromboxan A ₂ -Synthase
U	
U	Unit
UV	Ultraviolett
V	
V, kV	Volt, Kilovolt
Vol	Volumen
vs.	versus
v/v	Volumengehalt in Prozent
vWF	von-Willebrand-Faktor
Z	
Zig.	Zigaretten
ZL	Zentrallaboratorium Deutscher Apotheker

7. Literatur

- Abaci A, Yilmaz Y, Caliskan M, Bayram F, Cetin M, Unal A, Cetin S (2005) Effect of increasing doses of aspirin on platelet function as measured by PFA-100 in patients with diabetes. *Thromb Res* 116(6): 465-470
- Akay OM, Canturk Z, Akin E, Bal C, Gulbas Z (2007) Aspirin Resistance Frequency: A Prospective Study in 280 Healthy Turkish Volunteers. *Clin Appl Thromb Hemost*: in press
- Alberts MJ, Bergman DL, Molner E, Jovanovic BD, Ushiwata I, Teruya J (2004) Antiplatelet effect of aspirin in patients with cerebrovascular disease. *Stroke* 35(1): 175-178
- Aleil B, Ravanat C, Cazenave JP, Rochoux G, Heitz A, Gachet C (2005) Flow cytometric analysis of intraplatelet VASP phosphorylation for the detection of clopidogrel resistance in patients with ischemic cardiovascular diseases. *J Thromb Haemost* 3(1): 85-92
- Anand BS, Sanduja SK, Lichtenberger LM (1999) Effect of omeprazole on the bioavailability of aspirin: a randomized controlled study on healthy volunteers. *Gastroenterology* 116: A371
- Andersen K, Hurlen M, Arnesen H, Seljeflot I (2002) Aspirin non-responsiveness as measured by PFA-100 in patients with coronary artery disease. *Thromb Res* 108(1): 37-42
- Angiolillo DJ, Fernandez-Ortiz A, Bernardo E, Ramirez C, Cavallari U, Trabetti E, Sabaté M, Jimenez-Quevedo P, Hernández R, Moreno R, Escaned J, Alfonso F, Bañuelos C, Costa MA, Bass TA, Pignatti PF, Macaya C (2005) Lack of association between the P2Y₁₂ receptor gene polymorphism and platelet response to clopidogrel in patients with coronary artery disease. *Thromb Res* 116(6): 491-497
- Antithrombotic Trialists' Collaboration (2002) Collaborative meta-analysis of randomised trials of antiplatelet therapy for prevention of death, myocardial infarction, and stroke in high risk patients. *BMJ* 324(7329): 71-86 [Erratum (2002), *BMJ* 324(7330): 141]
- Audoly LP, Rocca B, Fabre JE, Koller BH, Thomas D, Loeb AL, Coffman TM, FitzGerald GA (2000) Cardiovascular responses to the isoprostanes iPF_{2α}-III and iPE₂-III are mediated via the thromboxane A₂ receptor in vivo. *Circulation* 101(24): 2833-2840
- Awad JA, Morrow JD, Takahashi K, Roberts LJ 2nd (1993) Identification of non-cyclooxygenase-derived prostanoid (F₂-isoprostane) metabolites in human urine and plasma. *J Biol Chem* 268(6): 4161-4169

- Bakar SK, Niazi S (1983) High-performance liquid chromatographic determination of aspirin and its metabolites in plasma and urine. *J Pharm Sci* 72(9): 1020-1023
- Becker DM, Segal J, Vaidya D, Yanek LR, Herrera-Galeano JE, Bray PF, Moy TF, Becker LC, Faraday N (2006) Sex differences in platelet reactivity and response to low-dose aspirin therapy. *JAMA* 295(12): 1420-1427
- Belton O, Byrne D, Kearney D, Leahy A, Fitzgerald DJ (2000) Cyclooxygenase-1 and -2-dependent prostacyclin formation in patients with atherosclerosis. *Circulation* 102(8): 840-845
- Benedek IH, Joshi AS, Pieniaszek HJ, King SY, Kornhauser DM (1995) Variability in the pharmacokinetics and pharmacodynamics of low dose aspirin in healthy male volunteers. *J Clin Pharmacol* 35(12): 1181-1186
- Berger JS, Roncaglioni MC, Avanzini F, Pangrazzi I, Tognoni G, Brown DL (2006) Aspirin for the primary prevention of cardiovascular events in women and men: a sex-specific meta-analysis of randomized controlled trials. *JAMA* 295(3): 306-313 [Erratum (2006), *JAMA* 295(17): 2002]
- Berglund U, Wallentin L (1991) Persistent inhibition of platelet function during long-term treatment with 75 mg acetylsalicylic acid daily in men with unstable coronary artery disease. *Eur Heart J* 12(3): 428-433
- Bernardo E, Angiolillo DJ, Ramírez C, Cavallari U, Trabetti E, Sabaté M, Hernández R, Moreno R, Escaned J, Alfonso F, Bañuelos C, Costa MA, Bass TA, Pignatti PF, Macaya C, Fernandez-Ortiz A (2006) Lack of association between gene sequence variations of platelet membrane receptors and aspirin responsiveness detected by the PFA-100 system in patients with coronary artery disease. *Platelets* 17(8): 586-590
- Berrouschoot J, Schwetlick B, von Twickel G, Fischer C, Uhlemann H, Siegemund T, Siegemund A, Roessler A (2006) Aspirin resistance in secondary stroke prevention. *Acta Neurol Scand* 113(1): 31-35
- Bhatt DL, Flather MD, Hacke W, Berger PB, Black HR, Boden WE, Cacoub P, Cohen EA, Creager MA, Easton JD, Hamm CW, Hankey GJ, Johnston SC, Mak KH, Mas JL, Montalescot G, Pearson TA, Steg PG, Steinhubl SR, Weber MA, Fabry-Ribaudo L, Hu T, Topol EJ, Fox KA; CHARISMA Investigators (2007) Patients with prior myocardial infarction, stroke, or symptomatic peripheral arterial disease in the CHARISMA trial. *J Am Coll Cardiol* 49(19): 1982-1988
- Bhatt DL, Fox KA, Hacke W, Berger PB, Black HR, Boden WE, Cacoub P, Cohen EA, Creager MA, Easton JD, Flather MD, Haffner SM, Hamm CW, Hankey GJ, Johnston SC, Mak KH, Mas JL, Montalescot G, Pearson TA, Steg PG, Steinhubl SR, Weber MA, Brennan DM, Fabry-Ribaudo L, Booth J, Topol EJ; CHARISMA

- Investigators (2006) Clopidogrel and aspirin versus aspirin alone for the prevention of atherothrombotic events. *N Engl J Med* 354(16): 1706-1717
- Biondi-Zoccai GG, Lotrionte M, Agostoni P, Abbate A, Fusaro M, Burzotta F, Testa L, Sheiban I, Sangiorgi G (2006) A systematic review and meta-analysis on the hazards of discontinuing or not adhering to aspirin among 50,279 patients at risk for coronary artery disease. *Eur Heart J* 27(22): 2667-2674
- Bjelakovic G, Nikolova D, Gluud LL, Simonetti RG, Gluud C (2007) Mortality in randomized trials of antioxidant supplements for primary and secondary prevention: systematic review and meta-analysis. *JAMA* 297(8): 842-857 [Erratum (2008), *JAMA* 299(7): 765-766]
- Bode-Böger SM, Böger RH, Schubert M, Frölich JC (1998) Effects of very low dose and enteric-coated acetylsalicylic acid on prostacyclin and thromboxane formation and on bleeding time in healthy subjects. *Eur J Clin Pharmacol* 54(9-10): 707-714
- Böger RH, Bode-Böger SM (1993) Endothelial dysfunction in peripheral arterial occlusive disease: from basic research to clinical use. *Vasa* 26(3): 180-184
- Born GV (1962) Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature* 194: 927-929
- Born GV, Cross MJ (1963) The aggregation of blood platelets. *J Physiol* 168: 178-195
- Bornstein NM, Karepov VG, Aronovich BD, Gorbulev AY, Treves TA, Korczyn AD (1994) Failure of aspirin treatment after stroke. *Stroke* 25(2): 275-277
- Bowbrick VA, Mikhailidis DP, Stansby G (2003) Value of thromboelastography in the assessment of platelet function. *Clin Appl Thromb Hemost.* 9(2): 137-142
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254
- Brideau C, Kargman S, Liu S, Dallob AL, Ehrich EW, Rodger IW, Chan CC (1996) A human whole blood assay for clinical evaluation of biochemical efficacy of cyclooxygenase inhibitors. *Inflamm Res* 45: 68-74
- Brown BG, Cukingnan RA, DeRouen T, Goede LV, Wong M, Fee HJ, Roth JA, Carey JS (1985) Improved graft patency in patients treated with platelet-inhibiting therapy after coronary bypass surgery. *Circulation* 72(1): 138-146
- Buchanan MR, Brister SJ (1995) Individual variation in the effects of ASA on platelet function: implications for the use of ASA clinically. *Can J Cardiol* 11(3): 221-227

- Buchanan MR, Schwartz L, Bourassa M, Brister SJ, Peniston CM; BRAT Investigators (2000) Results of the BRAT study--a pilot study investigating the possible significance of ASA nonresponsiveness on the benefits and risks of ASA on thrombosis in patients undergoing coronary artery bypass surgery. *Can J Cardiol* 16(11): 1385-1390
- Burton GW, Traber MG, Acuff RV, Walters DN, Kayden H, Hughes L, Ingold KU (1998) Human plasma and tissue alpha-tocopherol concentrations in response to supplementation with deuterated natural and synthetic vitamin E. *Am J Clin Nutr* 67(4): 669-684
- Campbell CL, Smyth S, Montalescot G, Steinhubl SR (2007) Aspirin dose for the prevention of cardiovascular disease: a systematic review. *JAMA* 297(18): 2018-2024
- Capone ML, Sciulli MG, Tacconelli S, Grana M, Ricciotti E, Renda G, Di Gregorio P, Merciaro G, Patrignani P (2005) Pharmacodynamic interaction of naproxen with low-dose aspirin in healthy subjects. *J Am Coll Cardiol* 45(8): 1295-1301
- Cardinal DC, Flower RJ (1980) The electronic aggregometer: a novel device for assessing platelet behavior in blood. *J Pharmacol Methods* 3(2): 135-158
- Catella F, Reilly MP, Delanty N, Lawson JA, Moran N, Meagher E, FitzGerald GA (1995) Physiological formation of 8-epi-PGF_{2α} in vivo is not affected by cyclooxygenase inhibition. *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res* 23: 233-236
- Catella-Lawson F, Reilly MP, Kapoor SC, Cucchiara AJ, DeMarco S, Tournier B, Vyas SN, FitzGerald GA (2001) Cyclooxygenase inhibitors and the antiplatelet effects of aspirin. *N Engl J Med* 345(25): 1809-1817
- Cattaneo M (2003) Inherited platelet-based bleeding disorders. *J Thromb Haemost* 1(7): 1628-1636
- Cattaneo M, Lecchi A, Zighetti ML, Lussana F (2007) Platelet aggregation studies: autologous platelet-poor plasma inhibits platelet aggregation when added to platelet-rich plasma to normalize platelet count. *Haematologica* 92(5): 694-697
- Cattaneo M, Zighetti ML, Lombardi R, Martinez C, Lecchi A, Conley PB, Ware J, Ruggeri ZM (2003) Molecular bases of defective signal transduction in the platelet P2Y₁₂ receptor of a patient with congenital bleeding. *Proc Natl Acad Sci USA* 100(4): 1978-1983
- Cavallari U, Trabetti E, Malerba G, Biscuola M, Girelli D, Olivieri O, Martinelli N, Angiolillo DJ, Corrocher R, Pignatti PF (2007) Gene sequence variations of the platelet P2Y₁₂ receptor are associated with coronary artery disease. *BMC Med Genet* 8: 59

- Cayatte AJ, Du Y, Oliver-Krasinski J, Lavielle G, Verbeuren TJ, Cohen RA (2000) The thromboxane receptor antagonist S18886 but not aspirin inhibits atherogenesis in apo E-deficient mice: evidence that eicosanoids other than thromboxane contribute to atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20(7): 1724-1728
- Censarek P, Freidel K, Udelhoven M, Ku SJ, Hohlfeld T, Meyer-Kirchrath J, Schrör K, Weber AA (2004) Cyclooxygenase COX-2a, a novel COX-2 mRNA variant, in platelets from patients after coronary artery bypass grafting. *Thromb Haemost* 92(5): 925-928
- Censarek P, Steger G, Paolini C, Hohlfeld T, Grosser T, Zimmermann N, Fleckenstein D, Schrör K, Weber AA (2007) Alternative splicing of platelet cyclooxygenase-2 mRNA in patients after coronary artery bypass grafting. *Thromb Haemost* 98(6): 1309-1315
- Cerletti C, Dell'Elba G, Manarini S, Pecce R, Di Castelnuovo A, Scorpiglione N, Feliziani V, de Gaetano G (2003) Pharmacokinetic and pharmacodynamic differences between two low dosages of aspirin may affect therapeutic outcomes. *Clin Pharmacokinet* 42(12): 1059-1070
- Cerskus AL, Ali M, Davies BJ, McDonald JW (1980) Possible significance of small numbers of functional platelets in a population of aspirin-treated platelets in vitro and in vivo. *Thromb Res* 18(3-4): 389-397
- Chakroun T, Gerotziafas G, Robert F, Lecrubier C, Samama MM, Hatmi M, Elalamy I (2004) In vitro aspirin resistance detected by PFA-100 closure time: pivotal role of plasma von Willebrand factor. *Br J Haematol* 124(1): 80-85
- Chamorro A, Escolar G, Revilla M, Obach V, Vila N, Reverter JC, Ordinas A (1999) Ex vivo response to aspirin differs in stroke patients with single or recurrent events: a pilot study. *J Neurol Sci* 171(2): 110-114
- Chan CC, Boyce S, Brideau C, Charleson S, Cromlish W, Ethier D, Evans J, Ford-Hutchinson AW, Forrest MJ, Gauthier JY, Gordon R, Gresser M, Guay J, Kargman S, Kennedy B, Leblanc Y, Leger S, Mancini J, O'Neill GP, Ouellet M, Patrick D, Percival MD, Perrier H, Prasit P, Rodger I, Tagari P, Therien M, Vickers P, Visco D, Wang Z, Webb J, Wong E, Xu LJ, Young RN, Zamboni R, Riendeau D (1999) Rofecoxib [Vioxx, MK-0966; 4-(4'-methylsulfonylphenyl)-3-phenyl-2-(5H)-furanone]: a potent and orally active cyclooxygenase-2 inhibitor. Pharmacological and biochemical profiles. *J Pharmacol Exp Ther* 290(2): 551-560
- Chen WH, Cheng X, Lee PY, Ng W, Kwok JY, Tse HF, Lau CP (2007) Aspirin resistance and adverse clinical events in patients with coronary artery disease. *Am J Med* 120(7): 631-635

- Chen WH, Lee PY, Ng W, Tse HF, Lau CP (2004) Aspirin resistance is associated with a high incidence of myonecrosis after non-urgent percutaneous coronary intervention despite clopidogrel pretreatment. *J Am Coll Cardiol* 43(6): 1122-1126
- Chen ZM, Jiang LX, Chen YP, Xie JX, Pan HC, Peto R, Collins R, Liu LS; COMMIT (CLOpidogrel and Metoprolol in Myocardial Infarction Trial) collaborative group (2005) Addition of clopidogrel to aspirin in 45,852 patients with acute myocardial infarction: randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 366(9497): 1607-1621
- Chiang N, Bermudez EA, Ridker PM, Hurwitz S, Serhan CN (2004) Aspirin triggers antiinflammatory 15-epi-lipoxin A₄ and inhibits thromboxane in a randomized human trial. *Proc Natl Acad Sci USA* 101(42): 15178-15183
- Christiaens L, Macchi L, Herpin D, Coisne D, Duplantier C, Allal J, Mauco G, Brizard A (2003) Resistance to aspirin in vitro at rest and during exercise in patients with angiographically proven coronary artery disease. *Thromb Res* 108(2-3): 115-119
- Christie DJ, Kottke-Marchant K, Gorman RT (2008) Hypersensitivity of platelets to adenosine diphosphate in patients with stable cardiovascular disease predicts major adverse events despite antiplatelet therapy. *Platelets* 19(2): 104-110
- Cipollone F, Ciabattini G, Patrignani P, Pasquale M, Di Gregorio D, Bucciarelli T, Davì G, Cuccurullo F, Patrono C (2000) Oxidant stress and aspirin-insensitive thromboxane biosynthesis in severe unstable angina. *Circulation* 102(9): 1007-1013
- Cipollone F, Ferri C, Desideri G, Paloscia L, Materazzo G, Mascellanti M, Fazia M, Iezzi A, Cuccurullo C, Pini B, Bucci M, Santucci A, Cuccurullo F, Mezzetti A (2003) Preprocedural level of soluble CD40L is predictive of enhanced inflammatory response and restenosis after coronary angioplasty. *Circulation* 108(22): 2776-2782
- Cipollone F, Patrignani P, Greco A, Panara MR, Padovano R, Cuccurullo F, Patrono C, Rebuszi AG, Liuzzo G, Quaranta G, Maseri A (1997) Differential suppression of thromboxane biosynthesis by indobufen and aspirin in patients with unstable angina. *Circulation* 96(4): 1109-1116
- Cipollone F, Rocca B, Patrono C (2004a) Cyclooxygenase-2 expression and inhibition in atherothrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24(2): 246-255
- Cipollone F, Toniato E, Martinotti S, Fazia M, Iezzi A, Cuccurullo C, Pini B, Ursi S, Vitullo G, Averna M, Arca M, Montali A, Campagna F, Uchino S, Spigonardo F, Taddei S, Viridis A, Ciabattini G, Notarbartolo A, Cuccurullo F, Mezzetti A; Identification of New Elements of Plaque Stability (INES) Study Group (2004b) A polymorphism in the cyclooxygenase 2 gene as an inherited protective factor against myocardial infarction and stroke. *JAMA* 291(18): 2221-2228

- Clària J, Serhan CN (1995) Aspirin triggers previously undescribed bioactive eicosanoids by human endothelial cell-leukocyte interactions. *Proc Natl Acad Sci USA* 92(21): 9475-9479
- Clarke RJ, Mayo G, Price P, FitzGerald GA (1991) Suppression of thromboxane A₂ but not of systemic prostacyclin by controlled-release aspirin. *N Engl J Med* 325(16): 1137-1141
- Cooke GE, Bray PF, Hamlington JD, Pham DM, Goldschmidt-Clermont PJ (1998) PIA₂ polymorphism and efficacy of aspirin. *Lancet* 351(9111): 1253
- Cotter G, Shemesh E, Zehavi M, Dinur I, Rudnick A, Milo O, Vered Z, Krakover R, Kaluski E, Kornberg A (2004) Lack of aspirin effect: aspirin resistance or resistance to taking aspirin? *Am Heart J* 147(2): 293-300
- Cox D, Maree AO, Dooley M, Conroy R, Byrne MF, Fitzgerald DJ (2006) Effect of enteric coating on antiplatelet activity of low-dose aspirin in healthy volunteers. *Stroke* 37(8): 2153-2158
- Cracowski JL, Durand T, Bessard G (2002) Isoprostanes as a biomarker of lipid peroxidation in humans: physiology, pharmacology and clinical implications. *Trends Pharmacol Sci* 23(8): 360-366
- Cryer B, Feldman M (1998) Cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 selectivity of widely used nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Am J Med* 104(5): 413-421
- Cullen L, Kelly L, Connor SO, Fitzgerald DJ (1998) Selective cyclooxygenase-2 inhibition by nimesulide in man. *J Pharmacol Exp Ther* 287(2): 578-582
- Dacie JV, Lewis SM, Pitney WR, Brozovic M (1984) Quantitative assay of coagulation factors. *Practical Haematology*, Churchill Livingstone, Edinburgh: 248-258
- Dale GL (1997) Platelet kinetics. *Curr Opin Hematol* 4(5): 330-334
- Danesh J, Wheeler JG, Hirschfield GM, Eda S, Eiriksdottir G, Rumley A, Lowe GD, Pepys MB, Gudnason V (2004) C-reactive protein and other circulating markers of inflammation in the prediction of coronary heart disease. *N Engl J Med* 350(14): 1387-1397
- Daniel JL, Dangelmaier C, Jin J, Ashby B, Smith JB, Kunapuli SP (1998) Molecular basis for ADP-induced platelet activation. I. Evidence for three distinct ADP receptors on human platelets. *J Biol Chem* 273(4): 2024-2029
- Daniel VC, Minton TA, Brown NJ, Nadeau JH, Morrow JD (1994) Simplified assay for the quantification of 2,3-dinor-6-keto-prostaglandin F_{1α} by gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B* 653: 117-122

- Davi G, Alessandrini P, Mezzetti A, Minotti G, Bucciarelli T, Costantini F, Cipollone F, Bon GB, Ciabattoni G, Patrono C (1997) In vivo formation of 8-epi-prostaglandin $F_{2\alpha}$ is increased in hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17(11): 3230-3235
- Davi G, Ciabattoni G, Consoli A, Mezzetti A, Falco A, Santarone S, Pennese E, Vitacolonna E, Bucciarelli T, Costantini F, Capani F, Patrono C (1999) In vivo formation of 8-iso-prostaglandin $F_{2\alpha}$ and platelet activation in diabetes mellitus: effects of improved metabolic control and vitamin E supplementation. *Circulation* 99(2): 224-229
- Davi G, Guagnano MT, Ciabattoni G, Basili S, Falco A, Marinopiccoli M, Nutini M, Sensi S, Patrono C (2002) Platelet activation in obese women: role of inflammation and oxidant stress. *JAMA* 288(16): 2008-2014
- Davi G, Patrono C (2007) Platelet activation and atherothrombosis. *N Engl J Med* 357(24): 2482-2494
- Davis JW, Hartman CR, Lewis HD Jr, Shelton L, Eigenberg DA, Hassanein KM, Hignite CE, Ruttinger HA (1985) Cigarette smoking--induced enhancement of platelet function: lack of prevention by aspirin in men with coronary artery disease. *J Lab Clin Med* 105(4): 479-483
- Denis MM, Tolley ND, Bunting M, Schwertz H, Jiang H, Lindemann S, Yost CC, Rubner FJ, Albertine KH, Swoboda KJ, Fratto CM, Tolley E, Kraiss LW, McIntyre TM, Zimmerman GA, Weyrich AS (2005) Escaping the nuclear confines: signal-dependent pre-mRNA splicing in anucleate platelets. *Cell* 122(3): 379-391
- DeWitt DL, el-Harith EA, Kraemer SA, Andrews MJ, Yao EF, Armstrong RL, Smith WL (1990) The aspirin and heme-binding sites of ovine and murine prostaglandin endoperoxide synthases. *J Biol Chem* 265(9): 5192-5198
- Dhalla NS, Temsah RM, Netticadan T (2000) Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. *J Hypertens* 18(6): 655-673
- DiChiara J, Bliden KP, Tantry US, Hamed MS, Antonino MJ, Suarez TA, Bailon O, Singla A, Gurbel PA (2007) The effect of aspirin dosing on platelet function in diabetic and nondiabetic patients: an analysis from the aspirin-induced platelet effect (ASPECT) study. *Diabetes* 56(12): 3014-3019
- Di Minno G, Silver MJ, Murphy S (1983) Monitoring the entry of new platelets into the circulation after ingestion of aspirin. *Blood* 61(6): 1081-1085
- Dixon DA, Kaplan CD, McIntyre TM, Zimmerman GA, Prescott SM (2000) Post-transcriptional control of cyclooxygenase-2 gene expression. The role of the 3'-untranslated region. *J Biol Chem* 275(16): 11750-11757

- Dutch TIA Trial Study Group (1991) A comparison of two doses of aspirin (30 mg vs. 283 mg a day) in patients after a transient ischemic attack or minor ischemic stroke. *N Engl J Med* 325(18): 1261-1266
- Eikelboom JW, Hankey GJ (2003) Aspirin resistance: a new independent predictor of vascular events? *J Am Coll Cardiol* 41(6): 966-968
- Eikelboom JW, Hankey GJ, Thom J, Claxton A, Yi Q, Gilmore G, Staton J, Barden A, Norman PE (2005) Enhanced antiplatelet effect of clopidogrel in patients whose platelets are least inhibited by aspirin: a randomized crossover trial. *J Thromb Haemost* 3(12): 2649-2655
- Eikelboom JW, Hirsh J, Weitz JI, Johnston M, Yi Q, Yusuf S (2002) Aspirin-resistant thromboxane biosynthesis and the risk of myocardial infarction, stroke, or cardiovascular death in patients at high risk for cardiovascular events. *Circulation* 105(14): 1650-1655
- Evangelista V, Manarini S, Di Santo A, Capone ML, Ricciotti E, Di Francesco L, Tacconelli S, Sacchetti A, D'Angelo S, Scilimati A, Sciulli MG, Patrignani P (2006) De novo synthesis of cyclooxygenase-1 counteracts the suppression of platelet thromboxane biosynthesis by aspirin. *Circ Res* 98(5): 593-595
- Falardeau P, Oates JA, Brash AR (1981) Quantitative analysis of two minor urinary metabolites of prostaglandin I₂. *Anal Biochem* 115: 359-367
- Faraday N, Becker DM, Yanek LR, Herrera-Galeano JE, Segal JB, Moy TF, Bray PF, Becker LC (2006) Relation between atherosclerosis risk factors and aspirin resistance in a primary prevention population. *Am J Cardiol* 98(6): 774-779
- Faraday N, Yanek LR, Mathias R, Herrera-Galeano JE, Vaidya D, Moy TF, Fallin MD, Wilson AF, Bray PF, Becker LC, Becker DM (2007) Heritability of platelet responsiveness to aspirin in activation pathways directly and indirectly related to cyclooxygenase-1. *Circulation* 115(19): 2490-2496
- Farrell B, Godwin J, Richards S, Warlow C (1991) The United Kingdom transient ischaemic attack (UK-TIA) aspirin trial: final results. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 54(12): 1044-1054
- Fernández-Fernández FJ (2002) Might proton pump inhibitors prevent the antiplatelet effects of low- or very low-dose aspirin? *Arch Intern Med* 162(19): 2248
- Ferrari E, Benhamou M, Cerboni P, Marcel B (2005) Coronary syndromes following aspirin withdrawal: a special risk for late stent thrombosis. *J Am Coll Cardiol* 45(3): 456-459

- Fiorucci S, Santucci L, Wallace JL, Sardina M, Romano M, del Soldato P, Morelli A (2003) Interaction of a selective cyclooxygenase-2 inhibitor with aspirin and NO-releasing aspirin in the human gastric mucosa. *Proc Natl Acad Sci USA* 100(19): 10937-10941
- FitzGerald GA (1991) Mechanisms of platelet activation: thromboxane A₂ as an amplifying signal for other agonists. *Am J Cardiol* 68(7): 11B-15B
- FitzGerald GA (2003) Parsing an enigma: the pharmacodynamics of aspirin resistance. *Lancet* 361(9357): 542-544
- FitzGerald GA, Oates JA, Hawiger J, Maas RL, Roberts LJ 2nd, Lawson JA, Brash AR (1983a) Endogenous biosynthesis of prostacyclin and thromboxane and platelet function during chronic administration of aspirin in man. *J Clin Invest* 71(3): 676-688
- FitzGerald GA, Pedersen AK, Patrono C (1983b) Analysis of prostacyclin and thromboxane biosynthesis in cardiovascular disease. *Circulation* 67(6): 1174-1177
- Fontana P, Dupont A, Gandrille S, Bachelot-Loza C, Reny JL, Aiach M, Gaussem P (2003a) Adenosine diphosphate-induced platelet aggregation is associated with P2Y₁₂ gene sequence variations in healthy subjects. *Circulation* 108: 989-995
- Fontana P, Gaussem P, Aiach M, Fiessinger JN, Emmerich J, Reny JL (2003b) P2Y₁₂ H2 haplotype is associated with peripheral arterial disease: a case-control study. *Circulation* 108(24): 2971-2973
- Fontana P, Nolli S, Reber G, de Moerloose P (2006) Biological effects of aspirin and clopidogrel in a randomized cross-over study in 96 healthy volunteers. *J Thromb Haemost* 4(4): 813-819
- Frelinger AL 3rd, Furman MI, Linden MD, Li Y, Fox ML, Barnard MR, Michelson AD (2006) Residual arachidonic acid-induced platelet activation via an adenosine diphosphate-dependent but cyclooxygenase-1- and cyclooxygenase-2-independent pathway: a 700-patient study of aspirin resistance. *Circulation* 113(25): 2888-2896
- Friend M, Vucenik I, Miller M (2003) Research pointers: Platelet responsiveness to aspirin in patients with hyperlipidaemia. *BMJ* 326(7380): 82-83
- Frossard M, Fuchs I, Leitner JM, Hsieh K, Vlcek M, Losert H, Domanovits H, Schreiber W, Laggner AN, Jilma B (2004) Platelet function predicts myocardial damage in patients with acute myocardial infarction. *Circulation* 110(11): 1392-1397
- Fu JY, Masferrer JL, Seibert K, Raz A, Needleman P (1990) The induction and suppression of prostaglandin H₂ synthase (cyclooxygenase) in human monocytes. *J Biol Chem* 265(28): 16737-16740

- Fuchs I, Frossard M, Spiel A, Riedmüller E, Laggner AN, Jilma B (2006) Platelet function in patients with acute coronary syndrome (ACS) predicts recurrent ACS. *J Thromb Haemost* 4(12): 2547-2552
- Fukunaga M, Makita N, Roberts LJ 2nd, Morrow JD, Takahashi K, Badr KF (1993) Evidence for the existence of F₂-isoprostane receptors on rat vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol* 264(6 Pt 1): C1619-C1624
- Fukunaga M, Yura T, Grygorczyk R, Badr KF (1997) Evidence for the distinct nature of F₂-isoprostane receptors from those of thromboxane A₂. *Am J Physiol* 272(4 Pt 2): F477-F483
- Gallet C, Rosa JP, Habib A, Leuret M, Lévy-Tolédano S, Maclouf J (1999) Tyrosine phosphorylation of cortactin associated with Syk accompanies thromboxane analogue-induced platelet shape change. *J Biol Chem* 274(33): 23610-23616
- García Rodríguez LA, Hernández-Díaz S, de Abajo FJ (2001) Association between aspirin and upper gastrointestinal complications: systematic review of epidemiologic studies. *Br J Clin Pharmacol* 52(5): 563-571
- Gasparyan AY, Watson T, Lip GY (2008) The role of aspirin in cardiovascular prevention: implications of aspirin resistance. *J Am Coll Cardiol* 51(19): 1829-1843
- Gawaz M (2001) Blood platelets: physiology, pathophysiology, membrane receptors, antiplatelet principles, and therapy for atherothrombotic diseases. Georg Thieme Verlag, Stuttgart
- Gawaz M, Langer H, May AE (2005) Platelets in inflammation and atherogenesis. *J Clin Invest* 115(12): 3378-3384
- Giraud MN, Sanduja SK, Felder TB, Illich PA, Dial EJ, Lichtenberger LM (1997) Effect of omeprazole on the bioavailability of unmodified and phospholipid-complexed aspirin in rats. *Aliment Pharmacol Ther* 11(5): 899-906
- Gislason GH, Jacobsen S, Rasmussen JN, Rasmussen S, Buch P, Friberg J, Schramm TK, Abildstrom SZ, Køber L, Madsen M, Torp-Pedersen C (2006) Risk of death or reinfarction associated with the use of selective cyclooxygenase-2 inhibitors and nonselective nonsteroidal antiinflammatory drugs after acute myocardial infarction. *Circulation* 113(25): 2906-2913
- Gladding PA, Webster MW, Farrell HB, Zeng IS, Park R, Ruijne N (2008) The antiplatelet effect of six non-steroidal anti-inflammatory drugs and their pharmacodynamic interaction with aspirin in healthy volunteers. *Am J Cardiol* 101(7): 1060-1063
- Goldman S, Copeland J, Moritz T, Henderson W, Zadina K, Ovitt T, Doherty J, Read R, Chesler E, Sako Y, et al. (1988) Improvement in early saphenous vein graft patency

- after coronary artery bypass surgery with antiplatelet therapy: results of a Veterans Administration Cooperative Study. *Circulation* 77(6): 1324-1332
- Gonzalez-Conejero R, Rivera J, Corral J, Acuña C, Guerrero JA, Vicente V (2005) Biological assessment of aspirin efficacy on healthy individuals: heterogeneous response or aspirin failure? *Stroke* 36(2): 276-280.
- Goodman T, Sharma P, Ferro A (2007) The genetics of aspirin resistance. *Int J Clin Pract* 61(5): 826-834
- Grotemeyer KH, Scharafinski HW, Husstedt IW (1993) Two-year follow-up of aspirin responder and aspirin non responder. A pilot-study including 180 post-stroke patients. *Thromb Res* 71(5): 397-403
- Grundmann K, Jaschonek K, Kleine B, Dichgans J, Topka H (2003) Aspirin non-responder status in patients with recurrent cerebral ischemic attacks. *J Neurol* 250(1): 63-66
- Guidelines on platelet function testing (1988) The British Society for Haematology BCSH Haemostasis and Thrombosis Task Force. *J Clin Pathol* 41(12): 1322-1330
- Gum PA, Kottke-Marchant K, Poggio ED, Gurm H, Welsh PA, Brooks L, Sapp SK, Topol EJ (2001) Profile and prevalence of aspirin resistance in patients with cardiovascular disease. *Am J Cardiol* 88(3): 230-235
- Gum PA, Kottke-Marchant K, Welsh PA, White J, Topol EJ (2003) A prospective, blinded determination of the natural history of aspirin resistance among stable patients with cardiovascular disease. *J Am Coll Cardiol* 41(6): 961-965 [Erratum (2006), *J Am Coll Cardiol* 48(9): 1918]
- Gurbel PA, Becker RC, Mann KG, Steinhubl SR, Michelson AD (2007a) Platelet function monitoring in patients with coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 50(19): 1822-1834
- Gurbel PA, Bliden KP, DiChiara J, Newcomer J, Weng W, Neerchal NK, Gesheff T, Chaganti SK, Etherington A, Tantry US (2007b) Evaluation of dose-related effects of aspirin on platelet function: results from the Aspirin-Induced Platelet Effect (ASPECT) study. *Circulation* 115(25): 3156-3164
- Guth BD, Narjes H, Schubert HD, Tanswell P, Riedel A, Nehmiz G (2004) Pharmacokinetics and pharmacodynamics of terbogrel, a combined thromboxane A₂ receptor and synthase inhibitor, in healthy subjects. *Br J Clin Pharmacol* 58(1): 40-51
- Halushka MK, Walker LP, Halushka PV (2003) Genetic variation in cyclooxygenase 1: effects on response to aspirin. *Clin Pharmacol Ther* 73(1): 122-130

- Hamberg M, Svensson J, Samuelsson B (1975) Thromboxanes: a new group of biologically active compounds derived from prostaglandin endoperoxides. *Proc Natl Acad Sci USA* 72(8): 2994-2998
- Hamsten A, Svensson J, Walldius G, Szamosi A, de Faire U (1985) Shortened megakaryocyte-platelet regeneration time in young survivors of myocardial infarction. *Am Heart J* 110(6): 1154-1160
- Hankey GJ, Eikelboom JW (2006) Aspirin resistance. *Lancet* 367(9510): 606-617
- Hansson GK (2005) Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med* 352(16): 1685-1695
- Harker LA, Slichter SJ (1972) The bleeding time as a screening test for evaluation of platelet function. *N Engl J Med* 287(4): 155-159
- Harris RC, McKanna JA, Akai Y, Jacobson HR, Dubois RN, Breyer MD (1994) Cyclooxygenase-2 is associated with the macula densa of rat kidney and increases with salt restriction. *J Clin Invest* 94(6): 2504-2510
- Harrison D, Griendling KK, Landmesser U, Hornig B, Drexler H (2003) Role of oxidative stress in atherosclerosis. *Am J Cardiol* 91(3A): 7A-11A
- Harrison P, Frelinger AL 3rd, Furman MI, Michelson AD (2007) Measuring antiplatelet drug effects in the laboratory. *Thromb Res* 120(3): 323-336
- Harrison P, Mackie I, Mathur A, Robinson MS, Hong Y, Erusalimsky JD, Machin SJ, Martin JF (2005) Platelet hyper-function in acute coronary syndromes. *Blood Coagul Fibrinolysis* 16(8): 557-562
- Haubelt H, Anders C, Vogt A, Hoerdts P, Seyfert UT, Hellstern P (2005) Variables influencing Platelet Function Analyzer-100 closure times in healthy individuals. *Br J Haematol* 130(5): 759-767
- Heitzer T, Rudolph V, Schwedhelm E, Karstens M, Sydow K, Ortak M, Tschentscher P, Meinertz T, Böger R, Baldus S (2006) Clopidogrel improves systemic endothelial nitric oxide bioavailability in patients with coronary artery disease: evidence for antioxidant and antiinflammatory effects. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26(7): 1648-1652
- Helgason CM, Hoff JA, Kondos GT, Brace LD (1993a) Platelet aggregation in patients with atrial fibrillation taking aspirin or warfarin. *Stroke* 24(10): 1458-1461
- Helgason CM, Tortorice KL, Winkler SR, Penney DW, Schuler JJ, McClelland TJ, Brace LD (1993b) Aspirin response and failure in cerebral infarction. *Stroke* 24(3): 345-350

- Helgason CM, Bolin KM, Hoff JA, Winkler SR, Mangat A, Tortorice KL, Brace LD (1994) Development of aspirin resistance in persons with previous ischemic stroke. *Stroke* 25(12): 2331-2336
- Hetherington SL, Singh RK, Lodwick D, Thompson JR, Goodall AH, Samani NJ (2005) Dimorphism in the P2Y₁ ADP receptor gene is associated with increased platelet activation response to ADP. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25: 252-257
- Hézard N, Metz D, Nazeyrollas P, Droullé C, Potron G, Nguyen P (2002) PFA-100 and flow cytometry: can they challenge aggregometry to assess antiplatelet agents, other than GPIIb/IIIa blockers, in coronary angioplasty? *Thromb Res* 108(1): 43-47
- Hillarp A, Palmqvist B, Lethagen S, Villoutreix BO, Mattiasson I (2003) Mutations within the cyclooxygenase-1 gene in aspirin non-responders with recurrence of stroke. *Thromb Res* 112(5-6): 275-283
- Hingorani AD, Cross J, Kharbanda RK, Mullen MJ, Bhagat K, Taylor M, Donald AE, Palacios M, Griffin GE, Deanfield JE, MacAllister RJ, Vallance P (2000) Acute systemic inflammation impairs endothelium-dependent dilatation in humans. *Circulation* 102(9): 994-999
- Hohlfeld T, Schrör K (1998) Acetylsalicylsäure und Thromboxaninhibitoren. *Hämostaseologie* 18: 156-200
- Hollander D, Dadufalza VD, Fairchild PA (1981) Intestinal absorption of aspirin. Influence of pH, taurocholate, ascorbate, and ethanol. *J Lab Clin Med* 98(4): 591-598
- Hollopeter G, Jantzen HM, Vincent D, Li G, England L, Ramakrishnan V, Yang RB, Nurden P, Nurden A, Julius D, Conley PB (2001) Identification of the platelet ADP receptor targeted by antithrombotic drugs. *Nature* 409(6817): 202-207
- Holtzman MJ, Turk J, Shornick LP (1992) Identification of a pharmacologically distinct prostaglandin H synthase in cultured epithelial cells. *J Biol Chem* 267(30): 21438-21445
- Hovens MM, Snoep JD, Eikenboom JC, van der Bom JG, Mertens BJ, Huisman MV (2007) Prevalence of persistent platelet reactivity despite use of aspirin: a systematic review. *Am Heart J* 153(2): 175-181
- Hung J, Lam JY, Lacoste L, Letchacovski G (1995) Cigarette smoking acutely increases platelet thrombus formation in patients with coronary artery disease taking aspirin. *Circulation* 92(9): 2432-2436
- Iakovou I, Schmidt T, Bonizzoni E, Ge L, Sangiorgi GM, Stankovic G, Airoldi F, Chieffo A, Montorfano M, Carlino M, Michev I, Corvaja N, Briguori C, Gerckens U, Grube E,

- Colombo A (2005) Incidence, predictors, and outcome of thrombosis after successful implantation of drug-eluting stents. *JAMA* 293(17): 2126-2130
- Ichiki K, Ikeda H, Haramaki N, Ueno T, Imaizumi T (1996) Long-term smoking impairs platelet-derived nitric oxide release. *Circulation* 94(12): 3109-3114
- Ikonomidis I, Lekakis J, Vamvakou G, Andreotti F, Nihoyannopoulos P (2005) Cigarette smoking is associated with increased circulating proinflammatory and procoagulant markers in patients with chronic coronary artery disease: effects of aspirin treatment. *Am Heart J* 149(5): 832-839
- Iñarra P, Esteva F, Cornudella R, Lanas A (2000) Omeprazole does not interfere with the antiplatelet effect of low-dose aspirin in man. *Scand J Gastroenterol* 35(3): 242-246
- Jaffe EA, Weksler BB (1979) Recovery of endothelial cell prostacyclin production after inhibition by low doses of aspirin. *J Clin Invest* 63(3): 532-535
- Jakubowski JA, Matsushima N, Asai F, Naganuma H, Brandt JT, Hirota T, Freestone S, Winters KJ (2007) A multiple dose study of prasugrel (CS-747), a novel thienopyridine P2Y₁₂ inhibitor, compared with clopidogrel in healthy humans. *Br J Clin Pharmacol* 63(4): 421-430
- Jefferson BK, Foster JH, McCarthy JJ, Ginsburg G, Parker A, Kottke-Marchant K, Topol EJ (2005) Aspirin resistance and a single gene. *Am J Cardiol* 95(6): 805-808
- Jilma B (2001) Platelet function analyzer (PFA-100): a tool to quantify congenital or acquired platelet dysfunction. *J Lab Clin Med* 138(3): 152-163
- Jilma B (2004) Therapeutic failure or resistance to aspirin. *J Am Coll Cardiol* 43(7): 1332-1333
- Jin J, Quinton TM, Zhang J, Rittenhouse SE, Kunapuli SP (2002) Adenosine diphosphate (ADP)-induced thromboxane A₂ generation in human platelets requires coordinated signaling through integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ and ADP receptors. *Blood* 99(1): 193-198
- Juul-Möller S, Edvardsson N, Jahnmatz B, Rosén A, Sørensen S, Omblus R (1992) Double-blind trial of aspirin in primary prevention of myocardial infarction in patients with stable chronic angina pectoris. The Swedish Angina Pectoris Aspirin Trial (SAPAT) Group. *Lancet* 340(8833): 1421-1425
- Karim S, Habib A, Lévy-Toledano S, Maclouf J (1996) Cyclooxygenase-1 and -2 of endothelial cells utilize exogenous or endogenous arachidonic acid for transcellular production of thromboxane. *J Biol Chem* 271(20): 12042-12048
- Kawasaki T, Ozeki Y, Igawa T, Kambayashi J (2000) Increased platelet sensitivity to collagen in individuals resistant to low-dose aspirin. *Stroke* 31(3): 591-595

- Khasawneh FT, Huang JS, Mir F, Srinivasan S, Tiruppathi C, Le Breton GC (2008) Characterization of isoprostane signaling: evidence for a unique coordination profile of 8-iso-PGF_{2α} with the thromboxane A₂ receptor, and activation of a separate cAMP-dependent inhibitory pathway in human platelets. *Biochem Pharmacol* 75(12): 2301-2315
- Khreiss T, József L, Potempa LA, Filep JG (2004) Opposing effects of C-reactive protein isoforms on shear-induced neutrophil-platelet adhesion and neutrophil aggregation in whole blood. *Circulation* 110(17): 2713-2720
- Knapp HR, Healy C, Lawson J, FitzGerald GA (1988) Effects of low-dose aspirin on endogenous eicosanoid formation in normal and atherosclerotic men. *Thromb Res* 50(3): 377-386
- Krasopoulos G, Brister SJ, Beattie WS, Buchanan MR (2008) Aspirin "resistance" and risk of cardiovascular morbidity: systematic review and meta-analysis. *BMJ* 336(7637): 195-198
- Kratzer MA, Born GV (1985) Simulation of primary haemostasis in vitro. *Haemostasis* 15(6): 357-362
- Kreutz RP, Tantry US, Bliden KP, Gurbel PA (2007) Inflammatory changes during the 'common cold' are associated with platelet activation and increased reactivity of platelets to agonists. *Blood Coagul Fibrinolysis* 18(8): 713-718
- Krivosíková Z, Spustová V, Dzúrik R (1996) A highly sensitive HPLC method for the simultaneous determination of acetylsalicylic, salicylic and salicyluric acids in biologic fluids: pharmacokinetic, metabolic and monitoring implications. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 18(8): 527-532
- Krötz F, Sohn HY, Pohl U (2004) Reactive oxygen species: players in the platelet game. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24(11): 1988-1996
- Kujubu DA, Fletcher BS, Varnum BC, Lim RW, Herschman HR (1991) TIS10, a phorbol ester tumor promoter-inducible mRNA from Swiss 3T3 cells, encodes a novel prostaglandin synthase/cyclooxygenase homologue. *J Biol Chem* 266(20): 12866-12872
- Kunicki TJ, Kritzik M, Annis DS, Nugent DJ (1997) Hereditary variation in platelet integrin alpha 2 beta 1 density is associated with two silent polymorphisms in the alpha 2 gene coding sequence. *Blood* 89(6): 1939-1943
- Kurth T, Glynn RJ, Walker AM, Chan KA, Buring JE, Hennekens CH, Gaziano JM (2003) Inhibition of clinical benefits of aspirin on first myocardial infarction by nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Circulation* 108(10): 1191-1195

- Küster LJ, Frölich JC (1986) Platelet aggregation and thromboxane release induced by arachidonic acid, collagen, ADP and platelet-activating factor following low dose acetylsalicylic acid in man. *Prostaglandins* 32(3): 415-423
- Lafuente N, Azcutia V, Matesanz N, Cercas E, Rodríguez-Mañas L, Sánchez-Ferrer CF, Peiró C (2005) Evidence for sodium azide as an artifact mediating the modulation of inducible nitric oxide synthase by C-reactive protein. *J Cardiovasc Pharmacol* 45(3): 193-196
- Lanza GA, Sestito A, Iacovella S, Morlacchi L, Romagnoli E, Schiavoni G, Crea F, Maseri A, Andreotti F (2003) Relation between platelet response to exercise and coronary angiographic findings in patients with effort angina. *Circulation* 107(10): 1378-1382
- Lawson JA, Rokach J, FitzGerald GA (1999) Isoprostanes: formation, analysis and use as indices of lipid peroxidation in vivo. *J Biol Chem* 274(35): 24441-24444
- Lecomte M, Laneuville O, Ji C, DeWitt DL, Smith WL (1994) Acetylation of human prostaglandin endoperoxide synthase-2 (cyclooxygenase-2) by aspirin. *J Biol Chem* 269(18): 13207-13215
- Lee PY, Chen WH, Ng W, Cheng X, Kwok JY, Tse HF, Lau CP (2005) Low-dose aspirin increases aspirin resistance in patients with coronary artery disease. *Am J Med* 118(7): 723-727
- Leitinger N, Huber J, Rizza C, Mechtcheriakova D, Bochkov V, Koshelnick Y, Berliner JA, Binder BR (2001) The isoprostane 8-iso-PGF_{2α} stimulates endothelial cells to bind monocytes: differences from thromboxane-mediated endothelial activation. *FASEB J* 15(7): 1254-1256
- Lepäntalo A, Mikkelsen J, Reséndiz JC, Viiri L, Backman JT, Kankuri E, Karhunen PJ, Lassila R (2006) Polymorphisms of COX-1 and GPVI associate with the antiplatelet effect of aspirin in coronary artery disease patients. *Thromb Haemost* 95(2): 253-259
- Leslie CC (2004) Regulation of the specific release of arachidonic acid by cytosolic phospholipase A₂. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 70(4): 373-376
- Lev EI, Patel RT, Guthikonda S, Lopez D, Bray PF, Kleiman NS (2007) Genetic polymorphisms of the platelet receptors P2Y₁₂, P2Y₁ and GP IIIa and response to aspirin and clopidogrel. *Thromb Res* 119(3): 355-360
- Lev EI, Patel RT, Maresh KJ, Guthikonda S, Granada J, DeLao T, Bray PF, Kleiman NS (2006) Aspirin and clopidogrel drug response in patients undergoing percutaneous coronary intervention: the role of dual drug resistance. *J Am Coll Cardiol* 47(1): 27-33

- Levy BD, Romano M, Chapman HA, Reilly JJ, Drazen J, Serhan CN (1993) Human alveolar macrophages have 15-lipoxygenase and generate 15(S)-hydroxy-5,8,11-cis-13-trans-eicosatetraenoic acid and lipoxins. *J Clin Invest* 92(3): 1572-1579
- Lind SE (1991) The bleeding time does not predict surgical bleeding. *Blood* 77(12): 2547-2552
- Lindh B, Toss H, Siegbahn A, Venge P, Wallentin L (2000) Markers of myocardial damage and inflammation in relation to long-term mortality in unstable coronary artery disease. FRISC Study Group. Fragmin during Instability in Coronary Artery Disease. *N Engl J Med* 343(16): 1139-1147
- Livio M, Del Maschio A, Cerletti C, de Gaetano G (1982) Indomethacin prevents the long-lasting inhibitory effect of aspirin on human platelet cyclo-oxygenase activity. *Prostaglandins* 23(6): 787-796
- Loll PJ, Picot D, Garavito RM (1995) The structural basis of aspirin activity inferred from the crystal structure of inactivated prostaglandin H₂ synthase. *Nat Struct Biol* 2(8): 637-643
- Lordkipanidzé M, Pharand C, Schampaert E, Turgeon J, Palisaitis DA, Diodati JG (2007) A comparison of six major platelet function tests to determine the prevalence of aspirin resistance in patients with stable coronary artery disease. *Eur Heart J* 28(14): 1702-1708
- Lorenz RL, Schacky CV, Weber M, Meister W, Kotzur J, Reichardt B, Theisen K, Weber PC (1984) Improved aortocoronary bypass patency by low-dose aspirin (100 mg daily). Effects on platelet aggregation and thromboxane formation. *Lancet* 1(8389): 1261-1264
- Loscalzo J (2003) Oxidant stress: a key determinant of atherothrombosis. *Biochem Soc Trans* 31(Pt 5): 1059-1061.
- Lynch SM, Morrow JD, Roberts LJ 2nd, Frei B (1994) Formation of non-cyclooxygenase-derived prostanoids (F₂-isoprostanes) in plasma and low density lipoprotein exposed to oxidative stress in vitro. *J Clin Invest* 93(3): 998-1004
- Macchi L, Christiaens L, Brabant S, Sorel N, Allal J, Mauco G, Brizard A (2002a) Resistance to aspirin in vitro is associated with increased platelet sensitivity to adenosine diphosphate. *Thromb Res* 107(1-2): 45-49
- Macchi L, Christiaens L, Brabant S, Sorel N, Ragot S, Allal J, Mauco G, Brizard A (2003) Resistance in vitro to low-dose aspirin is associated with platelet P1^{AI} (GP IIIa) polymorphism but not with C807T(GP Ia/IIa) and C-5T Kozak (GP Ibalpha) polymorphisms. *J Am Coll Cardiol* 42(6): 1115-1119

- Macchi L, Petit E, Brizard A, Gil R, Neau JP (2004) Aspirin resistance in vitro and hypertension in stroke patients. *J Thromb Haemost* 2(11): 2051-2053
- Macchi L, Sorel N, Brabant S, Christiaens L, Mauco G (2002b) Relationship between C-5T Kozak, C807T genotypes and expression of glycoproteins Ib alpha and Ia-IIa at platelet surface: from genotype to phenotype. *Thromb Haemost* 88(2): 368
- MacDonald TM, Wei L (2003) Effect of ibuprofen on cardioprotective effect of aspirin. *Lancet* 361(9357): 573-574
- Malhotra S, Sharma YP, Grover A, Majumdar S, Hanif SM, Bhargava VK, Bhatnagar A, Pandhi P (2003) Effect of different aspirin doses on platelet aggregation in patients with stable coronary artery disease. *Intern Med J* 33(8): 350-354
- Mammen EF, Comp PC, Gosselin R, Greenberg C, Hoots WK, Kessler CM, Larkin EC, Liles D, Nugent DJ (1998) PFA-100 system: a new method for assessment of platelet dysfunction. *Semin Thromb Hemost* 24(2): 195-202
- Mancini JA, O'Neill GP, Bayly C, Vickers PJ (1994) Mutation of serine-516 in human prostaglandin G/H synthase-2 to methionine or aspirin acetylation of this residue stimulates 15-R-HETE synthesis. *FEBS Lett* 342(1): 33-37
- Mancini JA, Riendeau D, Falguyret JP, Vickers PJ, O'Neill GP (1995) 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* 270(49): 29372-29377
- Maree AO, Curtin RJ, Chubb A, Dolan C, Cox D, O'Brien J, Crean P, Shields DC, Fitzgerald DJ (2005) Cyclooxygenase-1 haplotype modulates platelet response to aspirin. *J Thromb Haemost* 3(10): 2340-2345
- Maree AO, Curtin RJ, Dooley M, Conroy RM, Crean P, Cox D, Fitzgerald DJ (2005) Platelet response to low-dose enteric-coated aspirin in patients with stable cardiovascular disease. *J Am Coll Cardiol* 46(7): 1258-1263
- Maree AO, Fitzgerald DJ (2007) Variable platelet response to aspirin and clopidogrel in atherothrombotic disease. *Circulation* 115(16): 2196-2207
- Markuszewski L, Rosiak M, Golanski J, Rysz J, Spsychalska M, Watala C (2006) Reduced blood platelet sensitivity to aspirin in coronary artery disease: are dyslipidaemia and inflammatory states possible factors predisposing to sub-optimal platelet response to aspirin? *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 98(5): 503-509
- Marnett LJ, Rowlinson SW, Goodwin DC, Kalgutkar AS, Lanzo CA (1999) Arachidonic acid oxygenation by COX-1 and COX-2. Mechanisms of catalysis and inhibition. *J Biol Chem* 274(33): 22903-22906

- Masferrer JL, Zweifel BS, Seibert K, Needleman P (1990) Selective regulation of cellular cyclooxygenase by dexamethasone and endotoxin in mice. *J Clin Invest* 86(4): 1375-1379
- Mattiello T, Guerriero R, Lotti L, Gaudio C, Frati L, Pulcinelli FM (2007) Evidence of aspirin excretion from platelet by MRP4 transport responsible for reduced drug activity in patients at 5 days CABS. *J Thromb Haemost* 5 (Suppl 2): O-T-070
- McAdam BF, Catella-Lawson F, Mardini IA, Kapoor S, Lawson JA, FitzGerald GA (1999) Systemic biosynthesis of prostacyclin by cyclooxygenase (COX)-2: the human pharmacology of a selective inhibitor of COX-2. *Proc Natl Acad Sci USA* 96(1): 272-277 [Erratum (1999), *Proc Natl Acad Sci USA* 96(10): 5890]
- McCabe DJ, Harrison P, Mackie IJ, Sidhu PS, Lawrie AS, Purdy G, Machin SJ, Brown MM (2005) Assessment of the antiplatelet effects of low to medium dose aspirin in the early and late phases after ischaemic stroke and TIA. *Platelets* 16(5): 269-280
- Meade EA, Smith WL, DeWitt DL (1993) Differential inhibition of prostaglandin endoperoxide synthase (cyclooxygenase) isozymes by aspirin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs. *J Biol Chem* 268(9): 6610-6614
- Meade TW, Brennan PJ (2000) Determination of who may derive most benefit from aspirin in primary prevention: subgroup results from a randomised controlled trial. *BMJ* 321(7252): 13-17
- Meagher EA, Barry OP, Lawson JA, Rokach J, FitzGerald GA (2001) Effects of vitamin E on lipid peroxidation in healthy persons. *JAMA* 285(9): 1178-1182
- Melbye H, Hvidsten D, Holm A, Nordbø SA, Brox J (2004) The course of C-reactive protein response in untreated upper respiratory tract infection. *Br J Gen Pract* 54(506): 653-658
- Meen O, Brosstad F, Khiabani H, Gjertsen E, Lauritsen ME, Pedersen TM, Bjørnsen S, Schjelderup NM, Ameln W, Ng EC, Wettergreen M, Siddique SP, Erikssen G (2008) No case of COX-1-related aspirin resistance found in 289 patients with symptoms of stable CHD remitted for coronary angiography. *Scand J Clin Lab Invest* 68(3): 185-191
- Mehta SR, Yusuf S, Peters RJ, Bertrand ME, Lewis BS, Natarajan MK, Malmberg K, Rupprecht H, Zhao F, Chrolavicius S, Copland I, Fox KA; Clopidogrel in Unstable angina to prevent Recurrent Events trial (CURE) Investigators (2001) Effects of pretreatment with clopidogrel and aspirin followed by long-term therapy in patients undergoing percutaneous coronary intervention: the PCI-CURE study. *Lancet* 358(9281): 527-533

- Michelson AD (2006) Evaluation of platelet function by flow cytometry. *Pathophysiol Haemost Thromb* 35(1-2): 67-82
- Michelson AD, Cattaneo M, Eikelboom JW, Gurbel P, Kottke-Marchant K, Kunicki TJ, Pulcinelli FM, Cerletti C, Rao AK; Platelet Physiology Subcommittee of the Scientific and Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis; Working Group on Aspirin Resistance (2005) Aspirin resistance: position paper of the Working Group on Aspirin Resistance. *J Thromb Haemost* 3(6): 1309-1311
- Michelson AD, Frelinger AL, Furman MI (2006) Resistance to antiplatelet drugs. *Eur Heart J* 8 (Suppl G): G53-G58
- Michelson AD, Furman MI (1999) Laboratory markers of platelet activation and their clinical significance. *Curr Opin Hematol* 6(5): 342-348
- Michelson AD, Furman MI, Goldschmidt-Clermont P, Mascelli MA, Hendrix C, Coleman L, Hamlington J, Barnard MR, Kickler T, Christie DJ, Kundu S, Bray PF (2000) Platelet GP IIIa P1^A polymorphisms display different sensitivities to agonists. *Circulation* 101(9): 1013-1018
- Michos ED, Ardehali R, Blumenthal RS, Lange RA, Ardehali H (2006) Aspirin and clopidogrel resistance. *Mayo Clin Proc* 81(4): 518-526
- Minuz P, Andrioli G, Degan M, Gaino S, Ortolani R, Tommasoli R, Zuliani V, Lechi A, Lechi C (1998) The F₂-isoprostane 8-epiprostaglandin F_{2α} increases platelet adhesion and reduces the antiadhesive and antiaggregatory effects of NO. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18(8): 1248-1256
- Minuz P, Gaino S, Zuliani V, Tommasoli RM, Benati D, Ortolani R, Zancanaro C, Berton G, Santonastaso CL (2002) Functional role of p38 mitogen activated protein kinase in platelet activation induced by a thromboxane A₂ analogue and by 8-iso-prostaglandin F_{2α}. *Thromb Haemost* 87(5): 888-898
- Mitchell JA, Akarasereenont P, Thiemermann C, Flower RJ, Vane JR (1994) Selectivity of nonsteroidal antiinflammatory drugs as inhibitors of constitutive and inducible cyclooxygenase. *Proc Natl Acad Sci USA* 90(24): 11693-11697
- Miyazawa K, Kiyono S, Inoue K (1988) Modulation of stimulus-dependent human platelet activation by C-reactive protein modified with active oxygen species. *J Immunol* 141(2): 570-574
- Mizuno K, Yamamoto S, Lands WE (1982) Effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs on fatty acid cyclooxygenase and prostaglandin hydroperoxidase activities. *Prostaglandins* 23(5): 743-757

- Möbert J, Becker BF (1998) Cyclooxygenase inhibition aggravates ischemia-reperfusion injury in the perfused guinea pig heart: involvement of isoprostanes. *J Am Coll Cardiol* 31(7): 1687-1694
- Modica A, Karlsson F, Mooe T (2007) Platelet aggregation and aspirin non-responsiveness increase when an acute coronary syndrome is complicated by an infection. *J Thromb Haemost* 5(3): 507-511
- Moffat KA, Ledford-Kraemer MR, Nichols WL, Hayward CP (2005) Variability in clinical laboratory practice in testing for disorders of platelet function: results of two surveys of the North American Specialized Coagulation Laboratory Association. *Thromb Haemost* 93(3): 549-553
- Moncada S, Vane JR (1979) Arachidonic acid metabolites and the interactions between platelets and blood-vessel walls. *N Engl J Med* 300(20): 1142-1147
- Mori TA, Vandongen R, Douglas AJ, McCulloch RK, Burke V (1992) Differential effect of aspirin on platelet aggregation in IDDM. *Diabetes* 41(3): 261-266
- Morrow JD (2000) The isoprostanes: their quantification as an index of oxidant stress status in vivo. *Drug Metab Rev* 32(3-4): 377-385
- Morrow JD, Awad JA, Boss HJ, Blair IA, Roberts LJ 2nd (1992) Non-cyclooxygenase-derived prostanoids (F₂-isoprostanes) are formed in situ on phospholipids. *Proc Natl Acad Sci USA* 89(22): 10721-10725
- Morrow JD, Frei B, Longmire AW, Gaziano JM, Lynch SM, Shyr Y, Strauss WE, Oates JA, Roberts LJ 2nd (1995) Increase in circulating products of lipid peroxidation (F₂-isoprostanes) in smokers. Smoking as a cause of oxidative damage. *N Engl J Med* 332(18): 1198-1203
- Morrow JD, Hill KE, Burk RF, Nammour TM, Badr KF, Roberts LJ 2nd (1990) A series of prostaglandin F₂-like compounds are produced in vivo in humans by a non-cyclooxygenase, free radical-catalyzed mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA* 87(23): 9383-9387
- Morrow JD, Minton TA, Roberts LJ 2nd (1992) The F₂-isoprostane, 8-epi-prostaglandin F_{2α}, a potent agonist of the vascular thromboxane/endoperoxide receptor, is a platelet thromboxane/endoperoxide receptor antagonist. *Prostaglandins* 44(2): 155-163
- Moshfegh K, Wuillemin WA, Redondo M, Lämmle B, Beer JH, Liechti-Gallati S, Meyer BJ (1999) Association of two silent polymorphisms of platelet glycoprotein Ia/IIa receptor with risk of myocardial infarction: a case-control study. *Lancet* 353(9150): 351-354

- Mueller MR, Salat A, Stangl P, Murabito M, Pulaki S, Boehm D, Koppensteiner R, Ergun E, Mittlboeck M, Schreiner W, Losert U, Wolner E (1997) Variable platelet response to low-dose ASA and the risk of limb deterioration in patients submitted to peripheral arterial angioplasty. *Thromb Haemost* 78(3): 1003-1007
- Nathan C (2002) Points of control in inflammation. *Nature* 420(6917): 846-852
- National Center for Biotechnology Information. US National Library of Medicine. P2RY₁₂ purinergic receptor P2Y, G-protein coupled, 12 [Homo sapiens]. Available at http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=gene&cmd=Retrieve&dopt=full_report&list_uids=64805 (last accessed 16 April 2008)
- Nilsson IM, Magnusson S, Borchgrevink C (1963) The Duke and Ivy Methods for determination of the bleeding time. *Thromb Diath Haemorrh* 10: 223-234
- Nilsson J (2005) CRP--marker or maker of cardiovascular disease? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25(8): 1527-1528
- Nüsing R, Ullrich V (1990) Immunoquantitation of thromboxane synthase in human tissues. *Eicosanoids* 3(3): 175-180
- O'Banion MK, Sadowski HB, Winn V, Young DA (1991) A serum- and glucocorticoid-regulated 4-kilobase mRNA encodes a cyclooxygenase-related protein. *J Biol Chem* 266(34): 23261-23267
- O'Brien JR (1962) Platelet aggregation: Part II Some results from a new method of study. *J Clin Pathol* 15: 452-455
- O'Brien JR (1968) Effects of salicylates on human platelets. *Lancet* 1(7546): 779-783
- O'Donnell CJ, Larson MG, Feng D, Sutherland PA, Lindpaintner K, Myers RH, D'Agostino RA, Levy D, Tofler GH; Framingham Heart Study (2001) Genetic and environmental contributions to platelet aggregation: the Framingham heart study. *Circulation* 103(25): 3051-3056
- Ohmori T, Yatomi Y, Nonaka T, Kobayashi Y, Madoiwa S, Mimuro J, Ozaki Y, Sakata Y (2006) Aspirin resistance detected with aggregometry cannot be explained by cyclooxygenase activity: involvement of other signaling pathway(s) in cardiovascular events of aspirin-treated patients. *J Thromb Haemost* 4(6): 1271-1278
- Otto JC, DeWitt DL, Smith WL (1993) N-Glycosylation of prostaglandin endoperoxide synthases-1 and -2 and their orientations in the endoplasmatic reticulum. *J Biol Chem* 268(24): 18234-18242
- Pamukcu B, Oflaz H, Onur I, Oncul A, Ozcan M, Umman B, Mercanoglu F, Meric M, Nisanci Y (2007) Clinical relevance of aspirin resistance in patients with stable

- coronary artery disease: a prospective follow-up study (PROSPECTAR). *Blood Coagul Fibrinolysis* 18(2): 187-192
- Papafili A, Hill MR, Brull DJ, McAnulty RJ, Marshall RP, Humphries SE, Laurent GJ (2002) Common promoter variant in cyclooxygenase-2 represses gene expression: evidence of role in acute-phase inflammatory response. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22(10): 1631-1636
- Patrignani P, Filabozzi P, Patrono C (1982) Selective cumulative inhibition of platelet thromboxane production by low-dose aspirin in healthy subjects. *J Clin Invest* 69(6): 1366-1372
- Patrignani P, Panara MR, Sciulli MG, Santini G, Renda G, Patrono C (1997) Differential inhibition of human prostaglandin endoperoxide synthase-1 and -2 by nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *J Physiol Pharmacol* 48(4): 623-631
- Patrignani P, Santini G, Panara MR, Sciulli MG, Greco A, Rotondo MT, di Giamberardino M, Maclouf J, Ciabattoni G, Patrono C (1996) Induction of prostaglandin endoperoxide synthase-2 in human monocytes associated with cyclo-oxygenase-dependent F₂-isoprostane formation. *Br J Pharmacol* 118(5): 1285-1293
- Patrignani P, Sciulli MG, Manarini S, Santini G, Cerletti C, Evangelista V (1999) COX-2 is not involved in thromboxane biosynthesis by activated human platelets. *J Physiol Pharmacol* 50(4): 661-667
- Patrono C (2001) Measurement of cyclooxygenase isozyme inhibition in humans: exploring the clinical relevance of biochemical selectivity. *Clin Exp Rheumatol* 19: 45-50
- Patrono C (2003) Aspirin resistance: definition, mechanisms and clinical read-outs. *J Thromb Haemost* 1(8): 1710-1713
- Patrono C, Bachmann F, Baigent C, Bode C, De Caterina R, Charbonnier B, Fitzgerald D, Hirsh J, Husted S, Kvasnicka J, Montalescot G, García Rodríguez LA, Verheugt F, Vermeylen J, Wallentin L, Priori SG, Alonso Garcia MA, Blanc JJ, Budaj A, Cowie M, Dean V, Deckers J, Fernández Burgos E, Lekakis J, Lindahl B, Mazzotta G, Morais J, Oto A, Smiseth OA, Morais J, Deckers J, Ferreira R, Mazzotta G, Steg PG, Teixeira F, Wilcox R; European Society of Cardiology (2004a) Expert consensus document on the use of antiplatelet agents. *Eur Heart J* 25(2): 166-181
- Patrono C, Ciabattoni G, Patrignani P, Pugliese F, Filabozzi P, Catella F, Davì G, Forni L (1985) Clinical pharmacology of platelet cyclooxygenase inhibition. *Circulation* 72(6): 1177-1184
- Patrono C, Ciabattoni G, Pinca E, Pugliese F, Castrucci G, De Salvo A, Satta MA, Peskar BA (1980) Low dose aspirin and inhibition of thromboxane B₂ production in healthy subjects. *Thromb Res* 17(3-4): 317-327

- Patrono C, Ciabattini G, Pugliese F, Pierucci A, Blair IA, FitzGerald GA (1986) Estimated rate of thromboxane secretion into the circulation of normal humans. *J Clin Invest* 77(2): 590-594
- Patrono C, Collier B, FitzGerald GA, Hirsh J, Roth G (2004b) Platelet-active drugs: the relationships among dose, effectiveness, and side effects: the Seventh ACCP Conference on Antithrombotic and Thrombolytic Therapy. *Chest* 126 (Suppl 3): 234S-264S
- Patrono C, FitzGerald GA (1997) Isoprostanes: potential markers of oxidant stress in atherothrombotic disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17(11): 2309-2315
- Patrono C, García Rodríguez LA, Landolfi R, Baigent C (2005) Low-dose aspirin for the prevention of atherothrombosis. *N Engl J Med* 353(22): 2373-2383
- Patrono C, Rocca B (2007) Drug insight: aspirin resistance--fact or fashion? *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 4(1): 42-50
- Patrono C, Rocca B (2008) Aspirin: promise and resistance in the new millennium. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28(3): s25-s32
- Paul BZ, Jin J, Kunapuli SP (1999) Molecular mechanism of thromboxane A₂-induced platelet aggregation. Essential role for P2T_{AC} and α_{2a} receptors. *J Biol Chem* 274(41): 29108-29114
- Pedersen AK, FitzGerald GA (1984) Dose-related kinetics of aspirin. Presystemic acetylation of platelet cyclooxygenase. *N Engl J Med* 311(19): 1206-1211
- Pepys MB (2005) CRP or not CRP? That is the question. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25(6): 1091-1094
- Pepys MB, Hawkins PN, Kahan MC, Tennent GA, Gallimore JR, Graham D, Sabin CA, Zychlinsky A, de Diego J (2005) Proinflammatory effects of bacterial recombinant human C-reactive protein are caused by contamination with bacterial products, not by C-reactive protein itself. *Circ Res* 97(11): e97-103
- Peters AJ, Borries M, Gradaus F, Jax TW, Schoebel FC, Strauer BE (2001) In vitro bleeding test with PFA-100-aspects of controlling individual acetylsalicylic acid induced platelet inhibition in patients with cardiovascular disease. *J Thromb Thrombolysis* 12(3): 263-272
- Peters RJ, Mehta SR, Fox KA, Zhao F, Lewis BS, Kopecky SL, Diaz R, Commerford PJ, Valentin V, Yusuf S (2003) Effects of aspirin dose when used alone or in combination with clopidogrel in patients with acute coronary syndromes: observations from the Clopidogrel in Unstable angina to prevent Recurrent Events (CURE) study. *Circulation* 108(14): 1682-1687

- Peterson P, Hayes TE, Arkin CF, Bovill EG, Fairweather RB, Rock WA Jr, Triplett DA, Brandt JT (1998) The preoperative bleeding time test lacks clinical benefit: College of American Pathologists' and American Society of Clinical Pathologists' position article. *Arch Surg* 133(2): 134-139
- Physicians' Health Study Research Group (1989) Final report on the aspirin component of the ongoing Physicians' Health Study. Steering Committee of the Physicians' Health Study Research Group. *N Engl J Med* 321(3): 129-135
- Pignatelli P, Sanguigni V, Lenti L, Ferro D, Finocchi A, Rossi P, Violi F (2004) gp91phox-dependent expression of platelet CD40 ligand. *Circulation* 110(10): 1326-1329
- Polidori MC, Praticò D, Ingegneri T, Mariani E, Spazzafumo L, Del Sindaco P, Cecchetti R, Yao Y, Ricci S, Cherubini A, Stahl W, Sies H, Senin U, Mecocci P; AVASAS Study Group (2005) Effects of vitamin C and aspirin in ischemic stroke-related lipid peroxidation: results of the AVASAS (Aspirin Versus Ascorbic acid plus Aspirin in Stroke) Study. *Biofactors* 24(1-4): 265-274
- Poston RS, Gu J, Brown JM, Gammie JS, White C, Nie L, Pierson RN 3rd, Griffith BP (2006) 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* 131(1): 122-130
- Potthast H, Haufe S, Glaab V (2003) Acetylsalicylsäure-Präparate im Vergleich. *Pharm Ztg* 148: 644-647
- Pradelles P, Grassi J, Maclouf J (1985) Enzyme immunoassays of eicosanoids using acetylcholinesterase as label: An alternative to radioimmunoassay. *Anal Chem* 57: 1170-1173
- Praticò D, FitzGerald GA (1996a) Generation of 8-epiprostaglandin F_{2α} by human monocytes. Discriminate production by reactive oxygen species and prostaglandin endoperoxide synthase-2. *J Biol Chem* 271(15): 8919-8924
- Praticò D, Lawson JA, FitzGerald GA (1995) Cyclooxygenase-dependent formation of the isoprostane, 8-epi prostaglandin F_{2α}. *J Biol Chem* 270(17): 9800-9808
- Praticò D, Smyth EM, Violi F, FitzGerald GA (1996b) Local amplification of platelet function by 8-Epi prostaglandin F_{2α} is not mediated by thromboxane receptor isoforms. *J Biol Chem* 271(25): 14916-14924
- Pulcinelli FM, Pignatelli P, Celestini A, Riondino S, Gazzaniga PP, Violi F (2004) Inhibition of platelet aggregation by aspirin progressively decreases in long-term treated patients. *J Am Coll Cardiol* 43(6): 979-984

- Pulcinelli FM, Riondino S (2006) More on aspirin resistance: position paper of the Working Group on Aspirin Resistance. Proposal for a Laboratory Test Guiding Algorithm. *J Thromb Haemost* 4(2): 485-487
- Rao GH, Johnson GG, Reddy KR, White JG (1983) Ibuprofen protects platelet cyclooxygenase from irreversible inhibition by aspirin. *Arteriosclerosis* 3(4): 383-388
- Reilly IA, FitzGerald GA (1987) Inhibition of thromboxane formation in vivo and ex vivo: implications for therapy with platelet inhibitory drugs. *Blood* 69(1): 180-186
- Reilly M, Delanty N, Lawson JA, FitzGerald GA (1996) Modulation of oxidant stress in vivo in chronic cigarette smokers. *Circulation* 94(1): 19-25
- Reiter R, Resch U, Sinzinger H (2001) Do human platelets express COX-2? *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 64(6): 299-305
- Renda G, Tacconelli S, Capone ML, Sacchetta D, Santarelli F, Sciulli MG, Zimarino M, Grana M, D'Amelio E, Zurro M, Price TS, Patrono C, De Caterina R, Patrignani P (2006) Celecoxib, ibuprofen, and the antiplatelet effect of aspirin in patients with osteoarthritis and ischemic heart disease. *Clin Pharmacol Ther* 80(3): 264-274
- Reuter HD (1998) *Der Thrombozyt*. 2. Auflage, Science Data Supply, Köln
- Ridker PM, Cook NR, Lee IM, Gordon D, Gaziano JM, Manson JE, Hennekens CH, Buring JE (2005) A randomized trial of low-dose aspirin in the primary prevention of cardiovascular disease in women. *N Engl J Med* 352(13): 1293-1304
- Riondino S, Trifirò E, Principessa L, Mascioletti S, Di Renzo L, Gaudio C, Biasucci LM, Crea F, Pulcinelli FM (2008) Lack of biological relevance of platelet cyclooxygenase-2 dependent thromboxane A₂ production. *Thromb Res*: in press
- RISC Group (1990) Risk of myocardial infarction and death during treatment with low dose aspirin and intravenous heparin in men with unstable coronary artery disease. *Lancet* 336(8719): 827-830
- Ritter CA, Jedlitschky G, Meyer zu Schwabedissen H, Grube M, Köck K, Kroemer HK (2005) Cellular export of drugs and signaling molecules by the ATP-binding cassette transporters MRP4 (ABCC4) and MRP5 (ABCC5). *Drug Metab Rev* 37(1): 253-278
- Roberts LJ 2nd, Oates JA, Linton MF, Fazio S, Meador BP, Gross MD, Shyr Y, Morrow JD (2007) The relationship between dose of vitamin E and suppression of oxidative stress in humans. *Free Radic Biol Med* 43(10): 1388-1393
- Rocca B, Secchiero P, Ciabattini G, Ranelletti FO, Catani L, Guidotti L, Melloni E, Maggiano N, Zauli G, Patrono C (2002) Cyclooxygenase-2 expression is induced

- during human megakaryopoiesis and characterizes newly formed platelets. *Proc Natl Acad Sci USA* 99(11): 7634-7639
- Rodgers RP, Levin J (1990) A critical reappraisal of the bleeding time. *Semin Thromb Hemost* 16(1): 1-20
- Ross R (1999) Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* 340(2): 115-126
- Roth GJ, Majerus PW (1975) The mechanism of the effect of aspirin on human platelets. I. Acetylation of a particulate fraction protein. *J Clin Invest* 56(3): 624-632
- Rudez G, Pons D, Leebeek F, Monraats P, Schrevel M, Zwinderman A, de Winter R, Tio R, Doevendans P, Jukema W, de Maat M (2008) Platelet receptor P2RY₁₂ haplotypes predict restenosis after percutaneous coronary interventions. *Hum Mutat* 29(3): 375-380
- Ruggeri ZM (2002) Platelets in atherothrombosis. *Nat Med* 8(11): 1227-1234
- Sacco M, Pellegrini F, Roncaglioni MC, Avanzini F, Tognoni G, Nicolucci A; PPP Collaborative Group (2003) Primary prevention of cardiovascular events with low-dose aspirin and vitamin E in type 2 diabetic patients: results of the Primary Prevention Project (PPP) trial. *Diabetes Care* 26(12): 3264-3272
- SALT Collaborative Group (1991) Swedish Aspirin Low-Dose Trial (SALT) of 75 mg aspirin as secondary prophylaxis after cerebrovascular ischaemic events. *Lancet* 338(8779): 1345-1349
- Santos MT, Valles J, Aznar J, Marcus AJ, Broekman MJ, Safier LB (1997) Prothrombotic effects of erythrocytes on platelet reactivity. Reduction by aspirin. *Circulation* 95(1): 63-68
- Saudek CD, Kalyani RR, Derr RL (2005) Assessment of glycemia in diabetes mellitus: hemoglobin A1c. *J Assoc Physicians India* 53: 299-305
- Schettert IT, Pereira AC, Lopes NH, Hueb WA, Krieger JE (2006) Association between platelet P2Y₁₂ haplotype and risk of cardiovascular events in chronic coronary disease. *Thromb Res* 118(6): 679-683
- Schmitz G, Rothe G, Ruf A, Barlage S, Tschöpe D, Clemetson KJ, Goodall AH, Michelson AD, Nurden AT, Shankey TV (1998) European Working Group on Clinical Cell Analysis: Consensus protocol for the flow cytometric characterisation of platelet function. *Thromb Haemost* 79(5): 885-896
- Scholz H, Yndestad A, Damås JK, Waehre T, Tonstad S, Aukrust P, Halvorsen B (2003) 8-isoprostane increases expression of interleukin-8 in human macrophages through activation of mitogen-activated protein kinases. *Cardiovasc Res* 59(4): 945-954.

- Schönbeck U, Sukhova GK, Graber P, Coulter S, Libby P (1999) Augmented expression of cyclooxygenase-2 in human atherosclerotic lesions. *Am J Pathol* 155(4): 1281-1291
- Schrör K, Hohlfeld T (2005) Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie. Derivate des Arachidonsäurestoffwechsels. 9. Auflage, Urban und Fischer Verlag, München, Kapitel 15, S. 356
- Schrör K, Weber AA, Hohlfeld T (2006) Aspirin "resistance". *Blood Cells Mol Dis* 36(2): 171-176
- Schwartz KA, Schwartz DE, Ghosheh K, Reeves MJ, Barber K, DeFranco A (2005) Compliance as a critical consideration in patients who appear to be resistant to aspirin after healing of myocardial infarction. *Am J Cardiol* 95(8): 973-975
- Schwedhelm E, Bartling A, Lenzen H, Tsikas D, Maas R, Brümmer J, Gutzki FM, Berger J, Frölich JC, Böger RH (2004) Urinary 8-iso-prostaglandin F_{2α} as a risk marker in patients with coronary heart disease: a matched case-control study. *Circulation* 109(7): 843-848
- Schwedler SB, Filep JG, Galle J, Wanner C, Potempa LA (2006) C-reactive protein: a family of proteins to regulate cardiovascular function. *Am J Kidney Dis* 47(2): 212-222
- Scirica BM, Morrow DA (2006) Is C-reactive protein an innocent bystander or proatherogenic culprit? The verdict is still out. *Circulation* 113(17): 2128-2134
- Serhan CN (1989) On the relationship between leukotriene and lipoxin production by human neutrophils: evidence for differential metabolism of 15-HETE and 5-HETE. *Biochim Biophys Acta* 1004(2): 158-168
- Serhan CN (2005) Lipoxins and aspirin-triggered 15-epi-lipoxins are the first lipid mediators of endogenous anti-inflammation and resolution. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 73(3-4): 141-162
- Serhan CN, Clish CB, Brannon J, Colgan SP, Chiang N, Gronert K (2000) Novel functional sets of lipid-derived mediators with antiinflammatory actions generated from omega-3 fatty acids via cyclooxygenase 2-nonsteroidal antiinflammatory drugs and transcellular processing. *J Exp Med* 192(8): 1197-1204
- Serhan CN, Hamberg M, Samuelsson B (1984) Lipoxins: novel series of biologically active compounds formed from arachidonic acid in human leukocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 81(17): 5335-5339
- Shankar H, Garcia A, Prabhakar J, Kim S, Kunapuli SP (2006) P2Y₁₂ receptor-mediated potentiation of thrombin-induced thromboxane A₂ generation in platelets occurs through regulation of Erk1/2 activation. *J Thromb Haemost* 4(3): 638-647

- Shiraga M, Miyata S, Kato H, Kashiwagi H, Honda S, Kurata Y, Tomiyama Y, Kanakura Y (2005) Impaired platelet function in a patient with P2Y₁₂ deficiency caused by a mutation in the translation initiation codon. *J Thromb Haemost* 3(10): 2315-2323
- Siegmund W, Hoffmann C, Zschesche M, Steinijs VW, Sauter R, Krüger WD, Diedrich F (1998) Relative bioavailability of rapidly dispersing, plain, and microencapsuled acetylsalicylic acid tablets after single dose administration. *Int J Clin Pharmacol Ther* 36(3): 133-138
- Sirois J, Richards JS (1992) Purification and characterization of a novel, distinct isoform of prostaglandin endoperoxide synthase induced by human chorionic gonadotropin in granulosa cells of rat preovulatory follicles. *J Biol Chem* 267(9): 6382-6388
- Smeeth L, Thomas SL, Hall AJ, Hubbard R, Farrington P, Vallance P (2004) Risk of myocardial infarction and stroke after acute infection or vaccination. *N Engl J Med* 351(25): 2611-2618
- Smith WL, Garavito RM, DeWitt DL (1996) Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and -2. *J Biol Chem* 271(52): 33157-33160
- Smith WL, Lands WE (1971) Stimulation and blockade of prostaglandin biosynthesis. *J Biol Chem* 246(21): 6700-6702
- Smith JW, Steinhubl SR, Lincoff AM, Coleman JC, Lee TT, Hillman RS, Collier BS (1999) Rapid platelet-function assay: an automated and quantitative cartridge-based method. *Circulation* 99(5): 620-625
- Snoep JD, Hovens MM, Eikenboom JC, van der Bom JG, Huisman MV (2007) Association of laboratory-defined aspirin resistance with a higher risk of recurrent cardiovascular events: a systematic review and meta-analysis. *Arch Intern Med* 167(15): 1593-1599
- Snoep JD, Hovens MM, Eikenboom JC, van der Bom JG, Jukema JW, Huisman MV (2007) Clopidogrel nonresponsiveness in patients undergoing percutaneous coronary intervention with stenting: a systematic review and meta-analysis. *Am Heart J* 154(2): 221-231
- Sofi F, Marcucci R, Gori AM, Abbate R, Gensini GF (2008) Residual platelet reactivity on aspirin therapy and recurrent cardiovascular events - A meta-analysis. *Int J Cardiol*: in press
- Spectre G, Brill A, Gural A, Shenkman B, Touretsky N, Mosseri E, Savion N, Varon D (2005) A new point-of-care method for monitoring anti-platelet therapy: application of the cone and plate(let) analyzer. *Platelets* 16(5): 293-299
- Steffel J, Lüscher TF, Ruschitzka F, Tanner FC (2006) Cyclooxygenase-2 inhibition and coagulation. *J Cardiovasc Pharmacol* 47 (Suppl 1): S15-S20

- Steinhubl SR, Berger PB, Mann JT 3rd, Fry ET, DeLago A, Wilmer C, Topol EJ; CREDO Investigators. Clopidogrel for the Reduction of Events During Observation (2002) Early and sustained dual oral antiplatelet therapy following percutaneous coronary intervention: a randomized controlled trial. *JAMA* 288(19): 2411-2420 [Erratum (2003), *JAMA* 289(8): 987]
- Steinhubl S, Roe MT (2007) Optimizing platelet P2Y₁₂ inhibition for patients undergoing PCI. *Cardiovasc Drug Rev* 25(2): 188-203 [Erratum (2007), *Cardiovasc Drug Rev* 25(3): 299]
- Steinhubl SR, Varanasi JS, Goldberg L (2003) Determination of the natural history of aspirin resistance among stable patients with cardiovascular disease. *J Am Coll Cardiol* 42(7): 1336-1337 [Erratum (2004), *J Am Coll Cardiol* 43(1): 154]
- Stejskal D, Václavík J, Lacnáč B, Prosková J (2006) Aspirin resistance measured by cationic propyl gallate platelet aggregometry and recurrent cardiovascular events during 4 years of follow-up. *Eur J Intern Med* 17(5): 349-354
- Stephens NG, Parsons A, Schofield PM, Kelly F, Cheeseman K, Mitchinson MJ (1996) Randomised controlled trial of vitamin E in patients with coronary disease: Cambridge Heart Antioxidant Study (CHAOS). *Lancet* 347(9004): 781-786
- Stocker R, Keaney JF Jr (2004) Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol Rev* 84(4): 1381-1478
- Storey RF, Wilcox RG, Heptinstall S (2002) Comparison of the pharmacodynamic effects of the platelet ADP receptor antagonists clopidogrel and AR-C69931MX in patients with ischaemic heart disease. *Platelets* 13(7): 407-413
- Szczeklik A, Musiał J, Undas A, Sanak M (2005) Aspirin resistance. *J Thromb Haemost* 3(8): 1655-1662
- Szczeklik A, Undas A, Sanak M, Frolow M, Wegrzyn W (2000) Relationship between bleeding time, aspirin and the P1A1/A2 polymorphism of platelet glycoprotein IIIa. *Br J Haematol* 110(4): 965-967
- Taber DF, Morrow JD, Roberts LJ 2nd (1997) A nomenclature system for the isoprostanes. *Prostaglandins* 53(2): 63-67
- Takahashi K, Nammour TM, Fukunaga M, Ebert J, Morrow JD, Roberts LJ 2nd, Hoover RL, Badr KF (1992) Glomerular actions of a free radical-generated novel prostaglandin, 8-epi-prostaglandin F_{2α}, in the rat. Evidence for interaction with thromboxane A₂ receptors. *J Clin Invest* 90(1): 136-141
- Takahashi S, Ushida M, Komine R, Shimodaira A, Uchida T, Ishihara H, Shibano T, Watanabe G, Ikeda Y, Murata M (2008) Platelet responsiveness to in vitro aspirin is

- independent of COX-1 and COX-2 protein levels and polymorphisms. *Thromb Res* 121(4): 509-517
- Tamminen M, Lassila R, Westerbacka J, Vehkavaara S, Yki-Järvinen H (2003) Obesity is associated with impaired platelet-inhibitory effect of acetylsalicylic acid in nondiabetic subjects. *Int J Obes Relat Metab Disord* 27(8): 907-911
- Tang M, Cyrus T, Yao Y, Vocun L, Praticò D (2005) Involvement of thromboxane receptor in the proatherogenic effect of isoprostane F_{2α}-III: evidence from apolipoprotein E- and LDL receptor-deficient mice. *Circulation* 112(18): 2867-2874
- Tantry US, Bliden KP, Gurbel PA (2005) Overestimation of platelet aspirin resistance detection by thrombelastograph platelet mapping and validation by conventional aggregometry using arachidonic acid stimulation. *J Am Coll Cardiol* 46(9): 1705-1709
- Taylor DW, Barnett HJ, Haynes RB, Ferguson GG, Sackett DL, Thorpe KE, Simard D, Silver FL, Hachinski V, Clagett GP, Barnes R, Spence JD (1999) Low-dose and high-dose acetylsalicylic acid for patients undergoing carotid endarterectomy: a randomised controlled trial. ASA and Carotid Endarterectomy (ACE) Trial Collaborators. *Lancet* 353(9171): 2179-2184
- Taylor KE, Giddings JC, van den Berg CW (2005) C-reactive protein-induced in vitro endothelial cell activation is an artifact caused by azide and lipopolysaccharide. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25(6): 1225-1230
- Templin C, Schaefer A, Stumme B, Drexler H, von Depka M (2006) Combined aspirin and clopidogrel resistance associated with recurrent coronary stent thrombosis. *Clin Res Cardiol* 95(2): 122-126
- Tesfamariam B, Brown ML, Cohen RA (1995) 15-Hydroxyeicosatetraenoic acid and diabetic endothelial dysfunction in rabbit aorta. *J Cardiovasc Pharmacol* 25(5): 748-755
- Tirnaksiz E, Pamukcu B, Oflaz H, Nisanci Y (2007) Effect of high dose statin therapy on platelet function; statins reduce aspirin resistant platelet aggregation in patients with coronary heart disease. *J Thromb Thrombolysis*: in press
- Tohgi H, Konno S, Tamura K, Kimura B, Kawano K (1992) Effects of low-to-high doses of aspirin on platelet aggregability and metabolites of thromboxane A₂ and prostacyclin. *Stroke* 23(10): 1400-1403
- Topper JN, Cai J, Falb D, Gimbrone MA Jr (1996) Identification of vascular endothelial genes differentially responsive to fluid mechanical stimuli: cyclooxygenase-2, manganese superoxide dismutase, and endothelial cell nitric oxide synthase are selectively up-regulated by steady laminar shear stress. *Proc Natl Acad Sci USA* 93(19): 10417-10422

- Tschoepe D (1995) The activated megakaryocyte-platelet-system in vascular disease: focus on diabetes. *Semin Thromb Hemost* 21(2): 152-160
- Tsikis D (1998) Application of gas chromatography-mass spectrometry and gas chromatography-tandem mass spectrometry to assess in vivo synthesis of prostaglandins, thromboxane, leukotrienes, isoprostanes and related compounds in humans. *J Chromatogr B* 717: 201-245
- Tsikis D, Gutzki FM, Böhme M, Fuchs I, Frölich JC (2000) Solid- and liquid-phase extraction for the gas chromatographic-tandem mass spectrometric quantification of 2,3-dinor-thromboxane B₂ and 2,3-dinor-6-oxo-prostaglandin F_{1α} in human urine. *J Chromatogr A* 885: 351-359
- Undas A, Sanak M, Musial J, Szczeklik A (1999) Platelet glycoprotein IIIa polymorphism, aspirin, and thrombin generation. *Lancet* 353(9157): 982-983
- Valles J, Santos MT, Aznar J, Marcus AJ, Martinez-Sales V, Portoles M, Broekman MJ, Safier LB (1991) Erythrocytes metabolically enhance collagen-induced platelet responsiveness via increased thromboxane production, adenosine diphosphate release, and recruitment. *Blood* 78(1): 154-162
- Valles J, Santos MT, Aznar J, Osa A, Lago A, Cosin J, Sanchez E, Broekman MJ, Marcus AJ (1998) Erythrocyte promotion of platelet reactivity decreases the effectiveness of aspirin as an antithrombotic therapeutic modality: the effect of low-dose aspirin is less than optimal in patients with vascular disease due to prothrombotic effects of erythrocytes on platelet reactivity. *Circulation* 97(4): 350-355
- Van Der Ouderaa FJ, Buytenhek M, Nugteren DH, Van Dorp DA (1980) Acetylation of prostaglandin endoperoxide synthetase with acetylsalicylic acid. *Eur J Biochem* 109(1): 1-8
- Van Diest MJ, Herman AG, Verbeuren TJ (1996) Influence of hypercholesterolaemia on the reactivity of isolated rabbit arteries to 15-lipoxygenase metabolites of arachidonic acid: comparison with platelet-derived agents and vasodilators. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 54(2): 135-145
- Vane JR (1971) Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nat New Biol* 231(25): 232-235
- Van Kooten F, Ciabattini G, Koudstaal PJ, Grobbee DE, Kluft C, Patrono C (1999) Increased thromboxane biosynthesis is associated with poststroke dementia. *Stroke* 30(8): 1542-1547
- Van Ryn J, Kink-Eiband M, Kuritsch I, Feifel U, Hanft G, Wallenstein G, Trummlitz G, Pairet M (2004) Meloxicam does not affect the antiplatelet effect of aspirin in healthy male and female volunteers. *J Clin Pharmacol* 44(7): 777-784

- Van Wijk I, Kappelle LJ, Van Gijn J, Koudstaal PJ, Franke CL, Vermeulen M, Gorter JW, Algra A; LiLAC study group (2005) Long-term survival and vascular event risk after transient ischaemic attack or minor ischaemic stroke: a cohort study. *Lancet* 365(9477): 2098-2104
- Vejar M, Fragasso G, Hackett D, Lipkin DP, Maseri A, Born GV, Ciabattini G, Patrono C (1990) Dissociation of platelet activation and spontaneous myocardial ischemia in unstable angina. *Thromb Haemost* 63(2): 163-168
- Verma S, Devaraj S, Jialal I (2006) Is C-reactive protein an innocent bystander or proatherogenic culprit? C-reactive protein promotes atherothrombosis. *Circulation* 113(17): 2135-2150
- Vesterqvist O (1986) Rapid recovery of in vivo prostacyclin formation after inhibition by aspirin. Evidence from measurements of the major urinary metabolite of prostacyclin by GC-MS. *Eur J Clin Pharmacol* 30(1): 69-73
- Vivekananthan DP, Penn MS, Sapp SK, Hsu A, Topol EJ (2003) Use of antioxidant vitamins for the prevention of cardiovascular disease: meta-analysis of randomised trials. *Lancet* 361(9374): 2017-2023 [Erratum (2004), *Lancet* 363(9409): 662]
- Von Pape KW, Strupp G, Bonzel T, Bohner J (2005) Effect of compliance and dosage adaptation of long term aspirin on platelet function with PFA-100 in patients after myocardial infarction. *Thromb Haemost* 94(4): 889-891
- Wang TH, Bhatt DL, Topol EJ (2006) Aspirin and clopidogrel resistance: an emerging clinical entity. *Eur Heart J* 27(6): 647-654
- Wang Z, Ciabattini G, Créminon C, Lawson J, Fitzgerald GA, Patrono C, Maclouf J (1995) Immunological characterization of urinary 8-epi-prostaglandin F_{2α} excretion in man. *J Pharmacol Exp Ther* 275(1): 94-100
- Warner TD, Giuliano F, Vojnovic I, Bukasa A, Mitchell JA, Vane JR (1999) Nonsteroid drug selectivities for cyclooxygenase-1 rather than cyclooxygenase-2 are associated with human gastrointestinal toxicity: a full in vitro analysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 96(13): 7563-7568
- Watala C, Golanski J, Pluta J, Boncler M, Rozalski M, Luzak B, Kropiwnicka A, Drzewoski J (2004) Reduced sensitivity of platelets from type 2 diabetic patients to acetylsalicylic acid (aspirin)-its relation to metabolic control. *Thromb Res* 113(2): 101-113
- Watala C, Pluta J, Golanski J, Rozalski M, Czyz M, Trojanowski Z, Drzewoski J (2005) 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* 83(2): 148-158

- Weber AA, Przytulski B, Schanz A, Hohlfeld T, Schrör K (2002) Towards a definition of aspirin resistance: a typological approach. *Platelets* 13: 37-40
- Weber AA, Zimmermann KC, Meyer-Kirchrath J, Schrör K (1999) Cyclooxygenase-2 in human platelets as a possible factor in aspirin resistance. *Lancet* 353(9156): 900
- Wilner KD, Rushing M, Walden C, Adler R, Eskra J, Noveck R, Vargas R (2002) Celecoxib does not affect the antiplatelet activity of aspirin in healthy volunteers. *J Clin Pharmacol* 42(9): 1027-1030
- Xie WL, Chipman JG, Robertson DL, Erikson RL, Simmons DL (1991) Expression of a mitogen-responsive gene encoding prostaglandin synthase is regulated by mRNA splicing. *Proc Natl Acad Sci USA* 88(7): 2692-2696
- Yamagata K, Andreasson KI, Kaufmann WE, Barnes CA, Worley PF (1993) Expression of a mitogen-inducible cyclooxygenase in brain neurons: regulation by synaptic activity and glucocorticoids. *Neuron* 11(2): 371-386
- Yilmaz MB, Balbay Y, Caldir V, Ayaz S, Guray Y, Guray U, Korkmaz S (2005) Late saphenous vein graft occlusion in patients with coronary bypass: possible role of aspirin resistance. *Thromb Res* 115(1-2): 25-29
- Yin K, Halushka PV, Yan YT, Wong PY (1994) Antiaggregatory activity of 8-epi-prostaglandin F_{2α} and other F-series prostanoids and their binding to thromboxane A₂/prostaglandin H₂ receptors in human platelets. *J Pharmacol Exp Ther* 270(3): 1192-1196
- Yura T, Fukunaga M, Khan R, Nassar GN, Badr KF, Montero A (1999) Free-radical-generated F₂-isoprostane stimulates cell proliferation and endothelin-1 expression on endothelial cells. *Kidney Int* 56(2): 471-478
- Yusuf S, Sleight P, Pogue J, Bosch J, Davies R, Dagenais G (2000) 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* 342(3): 145-153 [Erratum (2000), *N Engl J Med* 342(10): 748; Erratum (2000), *N Engl J Med* 342(18): 1376]
- Yusuf S, Zhao F, Mehta SR, Chrolavicius S, Tognoni G, Fox KK; Clopidogrel in Unstable Angina to Prevent Recurrent Events Trial Investigators (2001) Effects of clopidogrel in addition to aspirin in patients with acute coronary syndromes without ST-segment elevation. *N Engl J Med* 345(7): 494-502 [Erratum (2001), *N Engl J Med* 345(20): 1506; Erratum (2001), *N Engl J Med* 345(23):1716]
- Ziegler S, Maca T, Alt E, Speiser W, Schneider B, Minar E (2002) Monitoring of antiplatelet therapy with the PFA-100 in peripheral angioplasty patients. *Platelets* 13(8): 493-497

- Ziegler S, Schillinger M, Funk M, Felber K, Exner M, Mlekusch W, Sabeti S, Amighi J, Minar E, Brunner M, Müller M, Mannhalter C (2005) Association of a functional polymorphism in the clopidogrel target receptor gene, P2Y₁₂, and the risk for ischemic cerebrovascular events in patients with peripheral artery disease. *Stroke* 36(7): 1394-1399.
- Zimmermann N, Kienzle P, Weber AA, Winter J, Gams E, Schrör K, Hohlfeld T (2001) Aspirin resistance after coronary artery bypass grafting. *J Thorac Cardiovasc Surg* 121(5): 982-984
- Zimmermann N, Wenk A, Kim U, Kienzle P, Weber AA, Gams E, Schrör K, Hohlfeld T (2003) Functional and biochemical evaluation of platelet aspirin resistance after coronary artery bypass surgery. *Circulation* 108(5): 542-547
- Zhou L, Schmaier AH (2005) Platelet aggregation testing in platelet-rich plasma: description of procedures with the aim to develop standards in the field. *Am J Clin Pathol* 123(2): 172-183

8. Material

8.1. Substanzen

Acetonitril	Merck (Darmstadt)
Acetylsalicylsäure (ASS)	Sigma (Deisenhofen)
Acrylamid/Bisacrylamid; 37,5:1	Biogene (North America, USA)
Adenosin-5'-diphosphat (ADP)	Serva (Heidelberg)
Agarose, small DNA	Biozym Scientific GmbH (Hessisch Oldendorf)
Ammoniumpersulfat (APS)	Bio-Rad (München)
anti-COX-1 (Ziege, polyklonal)	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, California, USA)
anti-COX-2 (Ziege, polyklonal)	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, California, USA)
anti-GAPDH (Maus, polyklonal)	Abcam (Cambridge, UK)
anti-Maus IgG (Ziege, HRP-konjugiert)	Sigma (Deisenhofen)
anti-Ziege IgG (Esel, HRP-konjugiert)	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, California, USA)
Aqua ad iniectabilia	Baxter (Unterschleißheim)
Aqua purificata	aus eigener Wasserdeionisierungsanlage, Millipore (Schwalbach)
Arachidonsäure-Reagenz	Rolf Greiner BioChemica (Flacht)
Borsäure	Merck (Darmstadt)
Bradford-Reagenz	Bio-Rad (München)
Bromphenolblau	Merck (Darmstadt)
Calciumchlorid	Serva (Heidelberg)
Cutasept [®] F	Bode Chemie (Hamburg)
Cyclooxygenase-1, ovin	Cayman (Ann Arbor, Michigan, USA)
Cyclooxygenase-2, human, rekombinant	Cayman (Ann Arbor, Michigan, USA)
Dichlordimethylsilan	Sigma (Deisenhofen)
Diethylether	Riedel-de Haën (Seelze)
di-Kaliumhydrogenphosphat-Trihydrat	Merck (Darmstadt)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck (Darmstadt)
DNA-Längenstandard, 100 bp, GeneRuler [™]	Fermentas (Burlington, Ontario, Kanada)
dNTP-Mix, peqGOLD	Peqlab (Erlangen)
Entwickler G150	Agfa-Gevaert (Mortsel, Belgien)
Essigsäure 100% (Eisessig)	Merck (Darmstadt)
Ethanol	Merck (Darmstadt)
Ethidiumbromid	Sigma (Deisenhofen)
Ethylacetat	Merck (Darmstadt)
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma (Deisenhofen)
Fixierer G354	Agfa-Gevaert (Mortsel, Belgien)
γ-Globulin, bovin	Bio-Rad (München)

Glycerol	Merck (Darmstadt)
Glycin	Roth (Karlsruhe)
[² H ₄]-15(S)-8-iso-Prostaglandin F _{2α}	Cayman (Ann Arbor, Michigan, USA)
Horm [®] -Puffer	Nycomed (Unterschleißheim)
4-Hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxyl	Aldrich (Steinheim)
8-Isoprostane Affinity Column (20 ml)	Cayman (Ann Arbor, Michigan, USA)
Kaliumchlorid	Merck (Darmstadt)
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck (Darmstadt)
Kochsalzlösung, physiologisch	Baxter (Unterschleißheim)
Kollagen-Reagenz Horm [®]	Nycomed (Unterschleißheim)
LPS von E. coli 0111: B4 mit 500.000 EU/mg	Sigma (Deisenhofen)
β-Mercaptoethanol	Sigma (Deisenhofen)
Methanol	JT Baker (Deventer, Niederlande)
Milchpulver	Nestle (Frankfurt)
Molekularsieb (Perlform, 0,3 nm)	Merck (Darmstadt)
Natriumazid	Roth (Karlsruhe)
Natriumchlorid	JT Baker (Deventer, Niederlande)
Natriumhydroxid	Merck (Darmstadt)
NEB-Puffer 1 und NEB-Puffer 4	New England BioLabs (Ipswich, Massachusetts, USA)
n-Heptan	Merck (Darmstadt)
N,N-Diisopropylethylamin (DIPEA, Hünig's Base)	Sigma (Deisenhofen)
N,O-bis(Trimethylsilyl)trifluoroacetamid (BSTFA)	Pierce (Rockford, Illinois, USA)
Nonidet [®] P40-Ersatzprodukt (Nonylphenylpolyethylenglykol)	Fluka Chemie GmbH (Buchs, Schweiz)
Oligonucleotide (Primer)	MWG-Biotech AG (Ebersberg)
ortho-Anissäure (2-Methoxybenzoesäure)	Aldrich (Steinheim)
ortho-Phosphorsäure	Merck (Darmstadt)
2,3,4,5,6-Pentafluorobenzylbromid (PFB-Bromid)	Aldrich (Steinheim)
Phosphate buffered saline (PBS)	Biochrom (Berlin)
Ponceau S	Sigma (Deisenhofen)
2-Propanol	Merck (Darmstadt)
Protease-Inhibitor-Cocktail	Sigma (Deisenhofen)
Proteinstandard (Precision Plus)	Bio-Rad (München)
Pufferlösungen CertiPUR [®] (pH 4, pH 7, pH 9)	Merck (Darmstadt)
Reaktionspuffer Y (für PCR)	Peqlab (Erlangen)
Rofecoxib	Merck (Whitehouse Station, New Jersey, USA)
Salicylsäure	Sigma (Deisenhofen)
Salicylursäure (o-Hydroxyhippursäure)	Sigma (Deisenhofen)
Salzsäure	Merck (Darmstadt)
Sma I	New England BioLabs (Ipswich, Massachusetts, USA)
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Serva (Heidelberg)

Stickstoff, flüssig	Linde (Hannover)
Taq-DNA-Polymerase, SAWADY	Peqlab (Erlangen)
Tetramethylethylenamin (TEMED)	Merck (Darmstadt)
Toluol	Roth (Karlsruhe)
Tri-Natriumcitrat	Merck (Darmstadt)
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	Merck (Darmstadt)
Tsp509 I	New England Biolabs (Ipswich, Massachusetts, USA)
Tween [®] 20 (Polyoxyethylensorbitan-monolaurat)	Sigma (Deisenhofen)
Ultrapur [®] Wasser	Merck (Darmstadt)
Xylencyanol	Sigma (Deisenhofen)

8.2. Gase

Argon	Linde (Hannover)
Helium	Linde (Hannover)
Methan	Linde (Hannover)
Stickstoff	Linde (Hannover)

8.3. Kits

Enhanced Chemiluminescence (ECL) Kit	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
Prostaglandin E ₂ EIA Kit - Monoclonal	Cayman (Ann Arbor, Michigan, USA)
QIAamp DNA Blood Mini Kit	Qiagen (Hilden)
Thromboxan B ₂ EIA Kit	Cayman (Ann Arbor, Michigan, USA)

8.4. Chemikalien mit R- und S-Sätzen

Acetonitril	R: 11-20/21/22-36	S: 16-36/37
Acetylsalicylsäure (ASS)	R: 22-36/37/38	S: 26
Acrylamid/Bisacrylamid 37,5:1	R: 45-46-23/24/25-48	S: 36/37/39-43-45-60
Ammoniumpersulfat (APS)	R: 8-22-36/37/38-42/43	S: 22-24-26-37
Argon	R: -	S: 9-23
Bradford-Reagenz	R: 34-20/21/22	S: 24-25-45-36/37/39
Calciumchlorid	R: 36	S: 22-44
Dichlordimethylsilan	R: 11-36/37/38	S: 16-26
Diethylether	R: 12-19-22-66-67	S: 9-16-29-33
Essigsäure	R: 10-35	S: 23-26-45
Ethanol	R: 11	S: 7-16

Material

Ethidiumbromid	R: 22-26-36/37/38-40	S: 26-28-36/37/39-45-51
Ethylacetat	R: 11-36-66-67	S: 16-23-29-33
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	R: 22-36/37/38	S: 26-36
Helium	R: -	S: 9-36/37/39
4-Hydroxy-2,2,6,6-tetramethyl-piperidin-1-oxyl	R: 36/37/38	S: 26-36
β -Mercaptoethanol	R: 24-20/22-36/37-41	S: 26-36/37/39-45
Methan	R: 12	S: 9-16-33
Methanol	R: 11-23/24/25-39/23/24/25	S: 7-16-36/37-45
Natriumazid	R: 28-32-50/53	S: 28-45-60-61
Natriumchlorid	R: 36/37/38	S: 26-36
Natriumhydroxid	R: 35	S: 26-37/39-45
n-Heptan	R: 11-38-50/53-65-67	S: 9-16-29-33-60-61-62
N,N-Diisopropylethylamin (DIPEA, Hünig's Base)	R: 11-22-34-52/53	S: 16-26-36/37/39-45-60
N,O-bis(Trimethylsilyl)-trifluoroacetamid (BSTFA)	R: 10-35	S: 7/9-36/37/39
Nonidet [®] P40-Ersatzprodukt (Nonylphenylpolyethylenglykol)	R: 22-41-51/53	S: 26-39-46-61
ortho-Phosphorsäure	R: 34	S: 26-36/37/39-45
2,3,4,5,6-Pentafluorobenzylbromid (PFB-Bromid)	R: 34	S: 26-36/37/39-45
Ponceau S	R: 36/37/38	S: 26-36
2-Propanol	R: 11	S: 7-16
Salicylsäure	R: 22-41	S: 22-24-26-39
Salzsäure	R: 34-37	S: 26-36/37/39-45
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	R: 22-36/38	S: -
Stickstoff, flüssig	R: -	S: 9-23-36/37/39
Stickstoff, gasförmig	R: -	S: 9-36/37/39
Tetramethylethylenamin (TEMED)	R: 11-20/22-34	S: 16-26-36/37/39-45
Toluol	R: 11-38-48/20-63-65-67	S: (2)-36/37-62-46
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	R: 36/38	S: -
Xylencyanol	R: 36	S: 24

8.5. Lösungen und Puffer

Blockingpuffer (5%ig):

Milchpulver	2,5 g
TBST	50 ml

Dichlordimethylsilan-Lösung (6%ig):

Dichlordimethylsilan	60 ml
Toluol	ad 1000 ml

Elutionslösung (für SPE):

Ethanol absolut		95% (v/v)
Aqua purificata		5%

Ethidiumbromid-Stammlösung:

Ethidiumbromid (als Tablette)		10 mg
Aqua ad iniectabilia	ad	1 ml
zum Gebrauch: mit Aqua ad iniectabilia 1:10 verdünnen (Konzentration 1 mg/ml)		

Lämmli-Puffer (3x):

Tris-HCl (1 M, pH 6,8)		18,75 ml
Glycerol		30 ml
SDS 20%		30 ml
β-Mercaptoethanol		15 ml
Bromphenolblau		2 mg
Aqua purificata	ad	100 ml
mit HCl auf pH 6,8 einstellen		

Laufmittel (für HPLC):

Methanol		350 ml
Aqua purificata	ad	1000 ml
mit 85%iger Phosphorsäure auf pH 2,5 einstellen		

Laufpuffer (für SDS-PAGE):

Tris-HCl		15 g
Glycin		72 g
Aqua purificata		800 ml
pH-Kontrolle (pH 8,3)		
SDS 20%		25 ml
Aqua purificata	ad	1000 ml
(Konzentration 5x)		
zum Gebrauch: mit Aqua purificata 1:5 verdünnen (Endkonzentration 1x)		

Lysis-Puffer:

Tris-HCl (10 mM, pH 6,8)		100 ml
Nonidet P-40		200 µl
kurz vor Gebrauch: 10 ml mit 10 µl Protease-Inhibitor-Cocktail versetzen		

Ponceau S:

Ponceau S		0,5 g
Eisessig		25 ml
Aqua purificata	ad	500 ml
gegebenenfalls filtrieren		

Material

Probenauftragspuffer (für PCR-Proben):

Bromphenolblau		50 mg
Xylencyanol		25 mg
Glycerol		37,8 g
Aqua purificata	ad	100 ml
sterilfiltrieren		

Säulenpuffer (für SPE):

di-Kaliumhydrogenphosphat-Trihydrat		17,40 g
Kaliumdihydrogenphosphat		3,22 g
Natriumchlorid		29,20 g
Natriumazid		0,50 g
Aqua purificata	ad	1000 ml

Transferpuffer (für Elektrophoretik):

Glycin		144,2 g
Tris-HCl		30,3 g
Aqua purificata		700 ml
pH-Kontrolle (pH 8,3)		
SDS 20%		10 ml
Aqua purificata	ad	1000 ml
(Konzentration 10x)		
Gebrauchslösung (1x):		
10x Transferpuffer		100 ml
Methanol		100 ml
Aqua purificata	ad	1000 ml

Tri-Natriumcitrat-Lösung (0,106 M):

Tri-Natriumcitrat		31,17 g
Aqua purificata		800 ml
mit 1 N HCl auf pH 7,4 einstellen		
Aqua purificata	ad	1000 ml
sterilfiltrieren		

Tris-Borat-EDTA-Puffer (TBE):

Tris Base		54,0 g
Borsäure		27,5 g
EDTA (0,5 M, pH 8,0)		20 ml
Aqua purificata	ad	1000 ml
(Konzentration 5x)		
zum Gebrauch: mit Aqua purificata 1:5 verdünnen (Endkonzentration 1x)		

Tris-gepufferte Kochsalzlösung (TBS):

Tris-HCl		24,2 g
Natriumchlorid		80,0 g
Aqua purificata		ca. 600 ml
mit 1 N HCl auf pH 7,6 einstellen		
Aqua purificata	ad	1000 ml
(Konzentration 10x)		
zum Gebrauch: mit Aqua purificata 1:10 verdünnen (Endkonzentration 1x)		

Tris-gepufferte Kochsalzlösung mit Tween® (TBST):

TBS (1x)		1000 ml
Tween® 20		1 ml

8.6. Gele

Agarosegel (3%ig):

Agarose, small DNA		9 g
TBE (1x)	ad	300 ml
in der Mikrowelle dreimal aufkochen, anschließend unter Rühren etwas abkühlen lassen, 10 µl Ethidiumbromid-Lösung hinzugeben		

Sammelgel (4%ig):

Acrylamid/Bisacrylamid 40% (37,5:1)		0,6 ml
Aqua ad iniectabilia		3,8 ml
Tris (0,5 M, pH 6,8)		1,6 ml
SDS 20%		30 µl
während des Rührens 6 µl TEMED und 30 µl einer 10%igen APS-Lösung zusetzen		

Trenngel (10%ig):

Acrylamid/Bisacrylamid 40% (37,5:1)		2,53 ml
Aqua ad iniectabilia		5,48 ml
Tris (2 M, pH 8,8)		2,0 ml
SDS 20%		50 µl
während des Rührens 5 µl TEMED und 50 µl einer 10%igen APS-Lösung zusetzen; nach Pipettieren zwischen die Glasplatten sofort mit 2-Propanol überschichten (für eine glatte Oberfläche nach Polymerisation)		

8.7. Verbrauchsmaterialien

Abdeckmatte für MegaBlock (1,2 ml)	Sarstedt (Nümbrecht)
Autosampler-Glasgefäße für GC-MS (2 ml)	Varian (Darmstadt)
Autosampler-Glasgefäße mit Rundboden für HPLC Chromacol [®]	Abimed (Langenfeld)
Citrat-Monovetten (10 ml)	Sarstedt (Nümbrecht)
Combitips [®] plus für Multipette [®] plus	Eppendorf (Hamburg)
Deckgläser	Knittel Gläser (Braunschweig)
EDTA-Monovetten (2,7 und 9 ml)	Sarstedt (Nümbrecht)
Einmal-Pasteurpipetten	Sarstedt (Nümbrecht)
Einmalspritzen, steril (2, 5, 10 ml)	Braun (Melsungen)
Eppendorfgefäße (0,5, 1,5, 2 ml)	Eppendorf (Hamburg)
Etiketten für Drucker (25,4 x 10 mm)	Avery (Holzkirchen)
Etiketten für Drucker (45,7 x 16,9 mm)	Avery (Holzkirchen)
Falcon Röhrchen (15, 50 ml)	Becton Dickinson (Heidelberg)
Filtropur V zur Vakuumfiltration	Sarstedt (Nümbrecht)
FUJI Super RX	FUJI Photo Film GmbH (Düsseldorf)
Gewinde-Flaschen G 1s (0,8 ml) für PFB-TMS-Derivatisierung	CS-Chromatographie Service GmbH (Langerwehe)
Heparin-Monovetten (9 ml)	Sarstedt (Nümbrecht)
Kapillarsäule factorFOUR [™] (30 m x 0,25 mm ID, 0,25 µm Filmdicke)	Varian (Darmstadt)
Kodak [®] Biomax XAR-5 Film	Sigma (Deisenhofen)
Kryo-Lagerkassetten	Kryotec (Hamburg)
Küvetten für Proteinbestimmung (10 x 4 x 45 mm)	Sarstedt (Nümbrecht)
Küvetten mit Mixer für das Aggregometer	Rolf Greiner BioChemica (Flacht)
Limited volume inserts für Autosampler-Glasgefäße für GC-MS (0,1 ml)	Brown Chromatography Supplies GmbH (Kreuzwertheim)
Microcentrifuge Tubes Costar [®] 1,7 ml prelubricated (für COX-1-Assay)	Corning (New York, USA)
96 MikroWell [™] Platten (Nunc [™])	Nunc (Wiesbaden)
Multi-Adapter für S-Monovette [®]	Sarstedt (Nümbrecht)
Multiply [®] PCR 8er-Ketten (0,2 ml)	Sarstedt (Nümbrecht)
Multiply [®] -Deckelketten	Sarstedt (Nümbrecht)
Nitrocellulose Transfermembran Protran [®] (0,45 µm)	Schleicher & Schuell BioScience GmbH – Whatman Group (Dassel)
Objektträger	Knittel Gläser (Braunschweig)
Omnifix [®] -F (1 ml)	Braun (Melsungen)
Parafilm M [®]	Pechiney Plastic Packaging (Menasha, Wisconsin, USA)
Pipettenspitzen (alle Größen)	Sarstedt (Nümbrecht)

PP-Röhrchen (13 ml)	Sarstedt (Nümbrecht)
Rührspatel (120 mm)	Sarstedt (Nümbrecht)
Schraubkappen und Dichtscheiben G8 (für Gewinde-Flaschen)	CS-Chromatographie Service GmbH (Langerwehe)
Serologische Pipetten (2, 10, 25 ml)	Sarstedt (Nümbrecht)
Serum-Monovetten (9 ml)	Sarstedt (Nümbrecht)
Sterican [®] Kanülen	Braun (Melsungen)
Trennsäule für die HPLC (ChromCart 250/4,6 Nucleosil 100-5 C ₁₈)	Macherey-Nagel (Düren)
Urinbecher (100 ml)	Greiner Bio-One (Kremsmünster, Österreich)
Venofix [®] (21G, 0,8 x 20 mm, 30 cm)	Braun (Melsungen)
Wathman [®] Pure Cellulose Chromatography Paper (3 MM Chr)	Schleicher & Schuell BioScience GmbH – Whatman Group (Dassel)
Zellstofftupfer Pur-Zellin [®]	Paul Hartmann AG (Heidenheim)

8.8. Laborgeräte

Analysenwaage	Sartorius (Göttingen)
Aggregometer APACT 2	LABOR (Ahrensburg)
Blotkammer	Bio-Rad (München)
Boso-Medimat (Blutdruckmessgerät)	Bosch + Sohn (Jungingen)
CASY [®] Cell Counter	Schärfe System (Reutlingen)
ChemiGenius, Bio Imaging System	Syngene (Cambridge, England)
Chromabond [®] Vakuumkammer	Macherey-Nagel (Düren)
Dewargefäße	KGW-Isotherm (Karlsruhe)
Digitalwaage	Sartorius (Göttingen)
Drehschieber-Vakuumpumpe RZ 5 (4 x 10 ⁻⁴ mbar)	Vacuubrand (Wertheim)
GC-MS (CP-3800, 1200 Quadrupole MS)	Varian (Walnut Creek, USA)
Gene Amp [®] PCR System 9700	Applied Biosystems (Weiterstadt)
Heizblock	Fisher Bioblock Scientific (Illkirch, Frankreich)
Horizontal-Gelelektrophorese-System, Primo Maxicell [®] (für DNA-Gele)	Thermo Electron Corporation (Holbrook, New York, USA)
HPLC-Degaser Degasys DG-1210,	
HPLC-Pumpe P680,	
HPLC-Injektor ASI-100,	
HPLC-Säulenofen STH585,	
HPLC-UV-Detektor UVD340 U	Dionex Softron GmbH (Germering)
Kühltruhen (-20°C, -80°C)	Kryotec (Hamburg)

Kühlzentrifuge 5415 R	Eppendorf (Hamburg)
Laboport [®] Vakuumpumpe	KNF Neuberger (Trenton, New Jersey, USA)
Magnetrührer MR3000/ MR3002	Heidolph (Kelheim)
Membran-Vakuumpumpe MZ2C	Vacuubrand (Wertheim)
Mikroliterspritze (50 µl)	Hamilton Bonaduz AG (Bonaduz, Schweiz)
Mikroskop Axioskop 2	Carl Zeiss (Jena)
Mikrotiterplatten Photometer	Tecan (Grödig/Salzburg, Österreich)
Mikrowelle	Sharp Electronics (Hamburg)
Mini-PROTEAN [®] 3 Elektrophorese-System	Bio-Rad (München)
MRW [™] strip washer	Dynatech Laboratories, heute: Dynex Technologies (Worthing, West Sussex, Großbritannien)
Multipette [®] plus	Eppendorf (Hamburg)
Öffnungszange für Autosamplergefäße	Abimed (Langenfeld)
pH-Elektrode	NeoLab (Heidelberg)
pH-Meter	Knick (Berlin)
Photometer	Perkin Elmer (Palo Alto, USA)
Pipetten (0,1-2,5 µl; 20-200 µl, 100-1000 µl, 500-5000 µl)	Eppendorf (Hamburg)
Pipettierhilfe accu-jet [®]	Brand (Wertheim)
Power Supply	Bio-Rad (München)
Reagent Basin (60 ml) für Transferpette [®] -8	Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)
Rotations-Vakuum-Konzentrator RVC 2-25	Christ (Osterode)
Schüttelapparatur Duomax 1030	Heidolph (Kelheim)
Thermometer EcoScan	Scottech (Hamilton, Neuseeland)
Thermomixer 5436	Eppendorf (Hamburg)
Thermostat 5320	Eppendorf (Hamburg)
Transferpette [®] -8 (20-200 µl)	Brand (Wertheim)
TurboVap [®] LV Evaporator	Zymark/Caliper (Rüsselsheim)
Ultraschall Reiniger Bandelin Sonorex RK 100	Bandelin (Berlin)
Vakuumofen (vacutherm [®])	Heraeus (Hanau)
Verschlusszange für Autosamplergefäße	Abimed (Langenfeld)
Vortexer	Heidolph (Kelheim)
Wasserdeionisierungsanlage	Millipore (Schwalbach)
Zentrifuge 5415 D	Eppendorf (Hamburg)
Zentrifuge Rotina 35 R	Hettich (Tuttlingen)

9. Lebenslauf

Name: Anneke Bierend
E-Mail: Anneke.Bierend@gmx.de
Geburtsdatum: 21.09.1976
Geburtsort: Itzehoe

Schulbildung: 08.1982 – 06.1995 Grundschule und Gymnasium Brunsbüttel
Abitur/Preis des Fonds der Chemischen Industrie

Praktikum: 08.1995 – 09.1995 Bayer AG, Brunsbüttel

Studium: 10.1995 – 09.1999 Pharmazie an der Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg

Famulatur: 02.1996 – 03.1996 Apotheke zum Goldenen Kopf, Köln
07.1996 – 08.1996 Bayer AG, Leverkusen
08.1997 1. Staatsexamen

Studentische Tätigkeit: 10.1997 – 09.1998 Tutorin für Studienanfänger
09.1999 2. Staatsexamen

Praktisches Jahr: 10.1999 – 10.2000 Mohren-Apotheke, Bayreuth
Stadt-Apotheke, Aschersleben
11.2000 3. Staatsexamen/Pharmazeutische Prüfung
Approbation als Apothekerin

Berufstätigkeit: 02.2001 – 12.2002 Neue Apotheke Eppendorf, Hamburg

Promotion: 01.2003 – 07.2008 Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf,
Institut für Experimentelle und Klinische
Pharmakologie und Toxikologie,
Abteilung für Klinische Pharmakologie

Aufbaustudium: 10.2002 – 11.2005 Molekularbiologie am Zentrum für Molekulare
Neurobiologie, Hamburg

Lehrtätigkeit: 04.2003 – 03.2006 Pharmakologie für Pharmazie- und
Medizinstudierende, Universität Hamburg

Stipendium: 09.2004 – 02.2007 Promotionsstipendium der Deutschen Stiftung für
Herzforschung

10. Publikationen

Originalarbeiten

Böger GI, Rudolph TK, Maas R, Schwedhelm E, Dumbadze E, Bierend A, Benndorf RA, Böger RH (2007) Asymmetric dimethylarginine determines the improvement of endothelium-dependent vasodilation by simvastatin – effect of combination with oral L-arginine. *J Am Coll Cardiol* 49(23): 2274-2282

Bierend A, Rau T, Maas R, Schwedhelm E, Böger RH (2008) P2Y₁₂ polymorphisms and antiplatelet effects of aspirin in patients with coronary artery disease. *Br J Clin Pharmacol* 65(4): 540-547

Bierend A, Maas R, Schwedhelm E, Rau T, Kom GD, Tsikas D, Böger RH (2008) Inflammation and oxidative stress are causes of non-responsiveness to the antiplatelet effects of acetylsalicylic acid in patients with stable coronary artery disease (Manuskript in Vorbereitung)

Vorträge mit publiziertem Abstract

Böger GI, Maas R, Schwedhelm E, Bierend A, Benndorf R, Kastner M, Steenpaß A, Böger RH (2004) Improvement of endothelium-dependent vasodilation by simvastatin is potentiated by combination with L-arginine sustained release in patients with elevated ADMA levels. *J Am Coll Cardiol* 34: 525A

Böger GI, Maas R, Schwedhelm E, Bierend A, Benndorf R, Böger RH (2004) Erhöhte ADMA-Konzentration: Ursache der fehlenden Verbesserung der endothelabhängigen Vasodilatation durch Simvastatin. *Z Kardiol* 93 (Suppl 3): V242

Bierend A, Rau T, Maas R, Böger RH (2006) The 52G>T polymorphism in the ADP receptor gene P2RY₁₂ has no influence on ADP- and collagen-induced platelet aggregation in aspirin-treated patients with coronary artery disease (CAD). *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 372 (Suppl 1): 554A

Bierend A, Rau T, Maas R, Böger RH (2006) „ASS-Resistenz“ bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit: Trotz komplett inhibierter Thromboxan-Synthese keine ausreichende Hemmung der Thrombozytenaggregation. Clin Res Cardiol 95 (Suppl 5): V1562

Poster mit publiziertem Abstract

Schulze F, Böger GI, Maas R, Schwedhelm E, Bierend A, Benndorf RA, Böger RH (2005) Improvement of endothelium-dependent vasodilation by simvastatin is facilitated by combination with L-arginine in patients with elevated ADMA levels. 2nd International symposium on triglycerides and HDL: role in cardiovascular disease and the metabolic syndrome

Beiträge in HERZ HEUTE – Zeitschrift der Deutschen Herzstiftung

Bierend A, Maas R, Böger RH (2007) ASS: Wirkungen und Nebenwirkungen – Vorbeugung gegen Herzinfarkt und Schlaganfall mit Acetylsalicylsäure (Teil I). HERZ HEUTE Heft 1: 8-14

Bierend A, Maas R, Böger RH (2007) ASS: Wirkungen und Nebenwirkungen – Vorbeugung gegen Herzinfarkt und Schlaganfall mit Acetylsalicylsäure (Teil II). HERZ HEUTE Heft 3: 18-23

11. Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass die der Universität Hamburg zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel

„ASS-Resistenz“ bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung

in der Arbeitsgruppe für Klinische Pharmakologie des Instituts für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Rainer H. Böger selbstständig und allein von mir unter den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt wurde.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Fakultät ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch diese oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Hamburg, Juli 2008

12. Danksagung

Diese Arbeit wäre nicht zustande gekommen ohne die Unterstützung vieler Menschen.

Ich bedanke mich bei *Herrn Prof. Dr. Thomas Eschenhagen* und bei *Herrn Prof. Dr. Hasso Scholz* für die Möglichkeit der Durchführung meiner Doktorarbeit im pharmakologischen Institut. Herrn Prof. Scholz bin ich sehr dankbar, dass er sich für meine Förderung entscheidend mit eingesetzt hat.

Bei meinem Betreuer *Herrn Prof. Dr. Rainer H. Böger* bedanke ich mich für das außerordentlich interessante Thema sowie für die vielfältigen Unterstützungen, insbesondere für die Hilfe bei der Anfertigung von Veröffentlichungen sowie für die zügige Durchsicht meiner Arbeit. Bei *Herrn Prof. Dr. Hans-Jürgen Duchstein* bedanke ich mich herzlich für die Übernahme der Betreuung im Fachbereich Chemie.

Herrn Prof. Dr. Renke Maas und *Herrn Dr. Edzard Schwedhelm* bin ich dankbar für zahlreiche Hilfestellungen. Ebenso gebührt *Herrn Dr. Thomas Rau* mein Dank für seine wertvollen Anregungen und seine Hilfsbereitschaft.

Auch *Herrn Dr. Friedrich Schulze*, *Frau Dr. Ghainsom Kom*, *Herrn Martin Karjalainen* sowie *Frau Claudia Schmidt* danke ich herzlich für ihre Unterstützung. Ganz besonders bedanke ich mich bei *Frau Anna Steenpaß* und *Frau Mariola Kastner*, nicht nur für ihre Hilfe bei etlichen Fragen des Laboralltags, sondern auch für die große Unterstützung bei der Durchführung der Western Blots und der zahlreichen EIAs.

Vielen Dank an *Frau Beate Mettner* für die großartige Idee, die Patienten aus den Herzsportgruppen für diese Studie zu rekrutieren. *Frau Simone Bremer* bin ich dankbar für die Kontaktaufnahme mit den Patienten sowie für die Koordinierung der Patiententermine. Ein ganz besonderes Dankeschön an *all meine Patienten*, die interessiert und hoch motiviert an meiner Studie teilgenommen haben.

Bei der *Deutschen Stiftung für Herzforschung* bedanke ich mich für die finanzielle Förderung.

Tausend Dank an *meine Schwester Henrike* für ihre humorvolle und aufmunternde Art.

Mein allergrößter Dank gilt *meinen Eltern*, die mir ermöglicht haben, diesen Weg zu gehen und die mich in jeder Hinsicht unendlich unterstützen.