

Axel Herr
Dr. med.

Thrombozytenfunktion unter inhaliertem Stickstoffmonoxid (NO) - In vitro, bei gesunden Probanden und bei Patienten mit acute respiratory distress syndrome (ARDS)

Geboren am 13.08.1971 in Salzgitter
Reifeprüfung am 15.06.1991 in Salzgitter
Studiengang der Fachrichtung Medizin vom SS 1992 bis SS 1999
Physikum am 28.03.1994 an der Universität Heidelberg
Klinisches Studium in Heidelberg
Praktisches Jahr am St. Josefskrankenhaus in Heidelberg

Promotionsfach: Anaesthesiologie
Doktorvater: Professor Dr. med. Johann Motsch

iNO relaxiert die glatte Gefäßmuskulatur und kann damit den pulmonalarteriellen Druck und pulmonalvaskulären Widerstand senken. Dieses Prinzip wird erfolgreich bei der Therapie des ARDS eingesetzt. Trotz der schnellen Inaktivierung des iNO im Organismus sowie der hohen Selektivität für das pulmonale Gefäßsystem scheint iNO einen systemischen Effekt auf die Hämostase durch eine Hemmung der Thrombozytenadhäsion und -aggregation zu haben. Ziel der Arbeit war es daher, die Wirkung von iNO auf die Thrombozytenfunktion in vitro, bei gesunden Probanden und Patienten mit ARDS zu untersuchen.

In vitro wurde PRP von 40 männlichen Probanden mit 0 (Kontrolle), 50, 100, 450 und 884 ppm NO und einem O₂/CO₂/Druckluft-Gemisch (F_iO₂=0,3; 5% CO₂) für 240 min inkubiert.

In vivo führten 36 Probanden eine NO-Inhalation in insgesamt 96 Sitzungen durch (18 Männer und 18 Frauen, jeweils 9 Probanden in Gruppe A bzw. B): Gruppe A erhielt 0 (Kontrolle), 1 und 40, die Gruppe B 3, 5 und 10 ppm NO zur Inhalation. Die Messungen erfolgten 15 min nach Luft/O₂ (F_iO₂=0,25)-Inhalation (t₀), nach 30 (t₃₀) und 60 (t₆₀) min iNO sowie 15 min nach Applikationsende unter Luft/O₂-Gemisch (t_{15 post NO}).

Ebenfalls in vivo wurde die Thrombozytenfunktion unter iNO bei acht Patienten mit schwerem ARDS (sieben Männer, eine Frau) untersucht. Die Blutabnahmen erfolgten vor NO-Titration (t₀) und 2h nach Inhalation der individuellen Optimaldosis (t_{2h}).

Zur Beurteilung der Thrombozytenfunktion wurde die photometrische ADP- bzw. collagen-induzierte Aggregometrie eingesetzt. Flowcytometrische Bestimmungen (FACS-Analysen) dienten zur Messung der Fibrinogenbindung (FI) am GP IIb/IIIa-Rezeptor und der P-Selektin-Expression (PS) auf der Thrombozytenoberfläche. Bei den In-vivo-Studien wurden zusätzlich die In-vitro-Blutungszeit (IVBT) und die cGMP-Plasmaspiegel sowie die Nitrat (NO₃)-Spiegel -ausschließlich bei den gesunden Probanden- gemessen.

In vitro zeigte sich eine Dosisabhängigkeit des thrombozytenhemmenden NO-Effektes bei der ADP-induzierten Aggregation ab 50 ppm NO bei t₂₄₀ (54±1%, P<0,05), der mit der höchsten Konzentration (884 ppm) am frühesten (t₂₀, 37±5%; P<0,01) und ausgeprägtesten (t₂₄₀, 3±3%; P<0,001) auftrat. Dies bestätigte sich auch unter Collagenstimulation, wobei die Inhibition später (ab 100 ppm) und weniger ausgeprägt stattfand. Signifikante dosisabhängige Abnahmen der ADP-stimulierten FACS-Analysen wurden ab 100 ppm beobachtet (FI ab t₁₂₀, 73±17%, bzw. PS ab t₂₄₀, 76±12%; jeweils vs. t₀, P<0,05), die unter 884 ppm noch stärker ausgeprägt waren (FI, t₂₄₀, 33±11% vs. t₀; P<0,01), bzw. frühzeitiger auftraten (PS, ab t₆₀ 77±12% vs. t₀, P<0,05 bis 36±7% vs. t₀, P<0,01 bei t₂₄₀). Dabei bestand eine signifikante

Korrelation zwischen der Thrombozytenaggregation und der Fibrinogenbindung. Die Thrombozyten unterschiedlicher Altersgruppen zeigten im Antwortverhalten auf die NO-Inkubation keine Unterschiede.

Bei den gesunden Probanden konnte ein innerhalb von 15 min reversibler, kurzwirkender inhibitorischer NO-Effekt gezeigt werden: Es kam zu signifikanten Abnahmen der ADP-induzierten Aggregation (Männer ab 3 ppm bei t_{60} , $61\pm 9\%$, $P<0,05$; Frauen ab 5 ppm ab t_{30} , $72\pm 4\%$, $P<0,05$). Die Collageninduktion zeigte wie bereits in vitro eine spätere und weniger stark ausgeprägte Thrombozyteninhibition (Männer und Frauen ab 10 ppm). Es kam zu Abnahmen der ADP-stimulierten FI (Männer und Frauen ab 40 ppm, $49\pm 7\%$ bzw. $30\pm 3\%$, je $P<0,05$) und der basalen PS (Männer bei 40ppm, $3,34\pm 0,28\%$, $P<0,01$; Frauen ab 10 ppm, $2,45\pm 0,38\%$, $P<0,05$) sowie zu Zunahmen der cGMP- (Männer ab 5 ppm $6,71\pm 0,86$ pmol/ml, $P<0,05$; Frauen ab 3 ppm $4,81\pm 0,81$ pmol/ml, $P<0,01$) und NO_3 -Spiegel (Männer, ab 10 ppm Zunahme um $13\pm 6\%$ vs. t_0 , $P<0,05$; Frauen ab 5 ppm Zunahme um $5\pm 7\%$ vs. t_0 , $P<0,01$) sowie zu IVBT-Verlängerungen (Männer, 3/5 ppm, ab t_{30} 155 ± 12 sec, $P<0,05$; Frauen, 40 ppm, ab t_{30} 153 ± 10 sec, $P<0,01$)

Nach Applikationsende kehrten die Werte im Rahmen der Aggregation und der IVBT bei beiden Geschlechtern auf das Ausgangsniveau zurück, wobei in Einzelfällen Reboundeffekte zu beobachten waren, d.h. die Werte von $t_{15 \text{ post NO}}$ lagen mindestens 20% über dem Ausgangswert t_0 , ohne daß in der Gesamtpopulationen signifikante Reboundeffekte festzustellen waren. Solche Effekte wurden auch für den pulmonalarteriellen Druck nach NO-Inhalation beobachtet. Obwohl gefährliche Nebenwirkungen durch eine Hyperaggregabilität der Thrombozyten denkbar wären, ist in der Literatur bisher von keinem entsprechenden Fall berichtet worden.

Beide Geschlechter zeigten unter 40 ppm NO die ausgeprägtesten Reaktionen, während sich die signifikanten Veränderungen der Thrombozytenfunktion in den unteren Dosisbereichen (3 bis 10 ppm) im Betrag nicht wesentlich voneinander unterschieden. Eine definierte Dosisabhängigkeit konnte in vivo aber nicht gefunden werden.

Auch bei den Patienten mit ARDS zeigte sich eine signifikante Abnahme der ADP-induzierten Aggregation ($19\pm 3\%$, t_{2h} , vs. $26\pm 2\%$, t_0 , $P<0,05$), der ADP-stimulierten FI-Bindung ($19\pm 7\%$, t_{2h} , vs. $30\pm 8\%$, t_0 , $P<0,05$), bzw. PS-Expression (ADP-stimuliert: $43\pm 6\%$, t_{2h} , vs. $57\pm 7\%$, t_0 , $P<0,05$; basal: $6,7\pm 1,7\%$, t_{2h} , vs. $10,1\pm 2,2\%$, t_0 , $P<0,05$) sowie eine Zunahme der IVBT (ADP-induziert: 99 ± 13 sec, t_{2h} , vs. 71 ± 11 sec, t_0 , $P<0,05$; EPI-stimuliert: 127 ± 15 sec, t_{2h} , vs. 95 ± 12 sec, t_0 , $P<0,05$) und cGMP-Spiegel ($8,1\pm 1,6$ ng/ml, t_{2h} , vs. $4,7\pm 1,1$ ng/ml, t_0 , $P<0,05$). Bei den Patienten lagen die Ausgangswerte der Funktionsparameter bereits zu t_0 auf einem sehr niedrigen Niveau. Es ist anzunehmen, daß die Thrombozyten der maximal therapierten Patienten durch endo- und exogene Faktoren (Toxine, Kinine bzw. Medikamente) auf diesem Aggregationsniveau lagen.

Insgesamt fanden sich in vivo keine Anzeichen für schwerwiegende Nebenwirkungen, für eine Thrombozytensequestration oder für erhöhte Blutungsneigungen. Darüber hinaus fanden sich keine Probandencharakteristika (z.B. Sportlichkeit, Nikotinkonsum), die für unterschiedliche Reaktionsmuster auf iNO ursächlich sein könnten. Auch konnten wir keine Korrelation zwischen den Nitratplasmaspiegeln und dem Reaktionsverhalten bezüglich der Thrombozytenfunktion der Probanden finden, wobei NO_3 als Marker für die NO-Diffusion über die Luft-Blut-Schranke dienen sollte.

Die Studie belegt eine zeitlich begrenzte, reversible Hemmung der Thrombozytenadhäsion und -aggregation durch iNO über eine Minderung der Fibrinogenbindung am GP IIb/IIIa-Rezeptor unter Beteiligung cGMP-gesteuerter Mechanismen im Zellinneren, was zu einer

IVBT-Verlängerung führt. Auch eine gesenkte P-Selektin-Expression auf der Thrombozytenoberfläche ist an der Inhibition der Thrombozytenfunktion beteiligt.

Der antiaggregatorische Effekt könnte von praktischem klinischen Nutzen sein. Verminderte Reokklusionsraten durch NO nach Infarkten sind in vitro und im Tiermodell gezeigt worden. Bei Schweinen wurde eine Hemmung der Thrombozytenfunktion durch iNO nach akuter Lungenembolie beobachtet. Auch eine geringere Plättchentraumatisierung bei der extrakorporalen Zirkulation wurde in vitro beschrieben.

iNO könnte wegen seiner positiven hämodynamischen Effekte und seiner antithrombotischen Wirkung eine erfolgversprechende zusätzliche Maßnahme der Intensivtherapie und eine attraktive Erweiterung der Antikoagulationstherapie werden und dabei möglicherweise zu einer Einsparung von Thrombolytika führen.