

Wirkung von Vitamin C auf die Thrombozytenaggregation bei Rauchern und Nichtrauchern

Thomas H. Schindler¹, Eva Lewandowski², Manfred Olschewski³, Karla Hasler², Ulrich Solzbach¹, Hanjörg Just¹

ZUSAMMENFASSUNG

□ **Hintergrund:** Epidemiologische Studien deuten auf eine protektive Wirkung einer regelmäßigen Einnahme von Vitamin C und Vitamin E als Antioxidans in der Manifestation der koronaren Herzerkrankung hin. Zigarettenrauch enthält große Mengen an Radikalen und reaktionsfreudigen Sauerstoffderivaten, welche die Aggregation der Thrombozyten verstärken. Wir untersuchten die Wirkung von Vitamin C als wichtiges Antioxidans im humanen Plasma auf die Thrombozytenaggregation bei Rauchern und Nichtrauchern.

□ **Probanden und Methode:** Insgesamt wurden 40 Personen (mittleres Alter: 28 ± 9 Jahre) randomisiert. Die Gruppen von chronischen Rauchern (21 ± 9 „Packyears“) und Nichtrauchern bestanden aus jeweils 20 Personen. In jeder Gruppe erhielten je zehn Personen eine intravenöse Gabe von 3 g Vitamin C oder 100 ml 0,9%ige Kochsalzlösung (Plazebogruppe). Die maximale Aggregation der Thrombozyten wurden mittels eines Aggregometers nach 0, 3, 6 und 24 Stunden bei jeweiligen Kollagenkonzentrationen von $0,5 \mu\text{g/ml}$ und $1,0 \mu\text{g/ml}$ ermittelt.

□ **Ergebnisse:** Der Gruppenvergleich mittels Wilcoxon-Rank-Test bei Rauchern mit Vitamin-C-Applikation zeigte eine signifikante Minderung der Thrombozytenaggregation für beide Kollagenkonzentrationen ($0,5 \mu\text{g/ml}$ und $1,0 \mu\text{g/ml}$) nach 6 Stunden im Vergleich zur Plazebogruppe ($p \leq 0,05$), wohingegen bei Nichtrauchern mit Vitamin-C-Applikation eine signifikante Minderung der Thrombozytenaggregation für beide Kollagenkonzentrationen ($0,5 \mu\text{g/ml}$ und $1,0 \mu\text{g/ml}$) nach 3 und 6 Stunden im Vergleich zur Plazebogruppe vorzufinden war ($p \leq 0,03$). Der Vergleich zwischen Rauchern und Nichtrauchern bezüglich der Wirkung von Vitamin C auf die Thrombozytenaggregation für beide Kollagenkonzentrationen zeigte keine signifikanten Unterschiede an (nach 3 Stunden: $p = 0,84$ bzw. $p = 0,97$; nach 6 Stunden: $p = 0,81$ bzw. $p = 0,59$ und nach 24 Stunden $p = 0,57$ bzw. $p = 0,06$, jeweils nicht signifikant).

□ **Schlussfolgerung:** Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Vitamin C über einen bisher unbekanntem Mechanismus einen hemmenden Einfluss auf eine kollageninduzierte Thrombozytenaggregation ausübt. Diese Beobachtungen könnten eine weitere protektive Wirkung von Vitamin C bei der Entwicklung einer koronaren Herzerkrankung darstellen.

Schlüsselwörter: Vitamine · Antioxidanzien · Thrombozyten · Thrombozytenaggregationshemmer · Koronare Herzerkrankung.

Med Klin 2002;97:263–9.

DOI 10.1007/s00063-002-1152-x

Zigarettenrauchen ist als ein wesentlicher Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen anzusehen [19]. Die genauen pathophysiologischen Mechanismen des Zigarettenrauchens bei der Entstehung von kardiovaskulären Erkrankungen müssen aber weiterhin untersucht werden. Bislang konnte gezeigt werden, dass Zigarettenrauch die Endothelfunktion der vasculären Gefäße beeinträchtigt [4], an den Endothelzellen die Expression von Adhäsionsmolekülen auslöst [31] und damit die Adhäsion von zirkulierenden Leukozyten am Endothel und deren Migration in die Gefäßwand begünstigt [7, 14, 16, 18]. Ferner verursachen Bestandteile des Zigarettenrauchs, Nikotin und Kohlenmonoxid, eine direkt toxische Schädigung des vaskulären Endothels [7]. Eine bedeutsame Rolle für die Entwicklung kardiovaskulärer Erkrankungen ist aber auch einer durch das Zigarettenrauchen verstärkten Aktivierung und Aggregation der Thrombozyten zuzuschreiben [3, 28]. Bestandteile des Zigarettenrauchs induzieren eine Adhäsion und Migration von Leukozyten in die Gefäßwand sowie die Formation von intravasalen Leukozyten-Thrombozyten-Aggregaten, welche erste entzündliche Veränderungen der Gefäßwand hervorrufen [7, 14, 16, 18] und in starkem Maße die Entwicklung eines atherosklerotischen Gefäßprozesses begünstigen [2, 3].

Bei Rauchern finden sich im Plasma erhöhte Mengen an sehr reaktiven freien Radikalen und Prooxidanzien, welche die Thrombozytenaggregation verstärken [3, 5] und mit einem erhöhten Verbrauch an Vitamin C [10, 26] sowie einer Anhäufung von zahlreichen Produkten der Lipidoxidation einhergehen [21, 24]. Eine Abnahme des antioxidativen Redoxpotentials bei Rauchern durch erhöhte Mengen an oxidativen Substanzen soll bei der Entwicklung der Atherosklerose eine wesentliche Rolle spielen [32].

¹ Medizinische Klinik III, Klinik für Kardiologie und Angiologie,

² Medizinische Klinik IV, Hämostaseologie, und

³ Medizinische Biometrie und Informatik, Universität Freiburg.

ORIGINALARBEIT

Epidemiologische Studien weisen auf eine protektive Rolle einer regelmäßigen Vitaminzufuhr als Antioxidans in der Manifestation der koronaren Herzkrankung hin [27, 34, 36]. Für Vitamin E konnte eine inhibitorische Wirkung auf die Thrombozytenaggregation über einen Proteinkinase-C-vermittelten Mechanismus nachgewiesen werden [8, 9]. Die Wirkung von Vitamin C als dem wichtigsten wasserlöslichen Antioxidans im menschlichen Plasma auf die Thrombozytenaggregation bei Rauchern ist bislang nicht untersucht worden [10]. Vitamin C vermag sehr effektiv Superoxide und andere Peroxidradikale abzufangen [11, 25]. Des Weiteren übernimmt Vitamin C eine zentrale Rolle in der Regulation des intrazellulären Redoxstatus durch Interaktion mit Glutathion [20].

Ziel dieser plazebokontrollierten, verblindeten, randomisierten Studie war es, die Wirkung einer intravenösen Gabe von 3 g Vitamin C auf die Thrombozytenaggregation bei Rauchern und Nichtrauchern nach 3, 6 und 24 Stunden zu überprüfen.

Probanden und Methode

Insgesamt wurden 40 Personen (männlich 24, weiblich 16, mit einem durchschnittlichen Alter von 28 ± 9 Jahren) randomisiert. Die Gruppe chronischer Rauchern bestand aus zwölf männlichen und acht weiblichen Personen mit einem angegebenen Nikotinus von 21 ± 9 „Packyears“. Die Gruppe lebenslanger Nichtraucher setzte sich aus zehn Männern und zehn Frauen mit einem durchschnittlichen Alter von 26 ± 6 Jahren zusammen. Bei zehn Rauchern (sechs Männer und vier Frauen) und zehn Nichtrauchern (vier Männer und sechs Frauen) wurden intravenös 3 g Vitamin C über eine Zeitspanne von ca. 15 Minuten infundiert. Weitere zehn Raucher und zehn Nichtraucher (fünf Männer, fünf Frauen; mittleres Alter 25 ± 8 Jahre) mit einer intravenösen Infusion von 100 ml 0,9%iger Kochsalzlösung über ca. 15 Minuten bildeten jeweils die Plazebogruppen.

Bei allen Probanden waren weder in klinischen noch in laborchemischen Untersuchungen Hinweise auf Diabetes mellitus, arterielle Hypertonie, Hypercholesterinämie oder hepatische, re-

ABSTRACT

Effect of Vitamin C on Aggregation of Human Platelets in Smokers and Nonsmokers

□ **Background:** Epidemiologic studies suggest a protective effect of regular intake of vitamin C and vitamin E as antioxidant in the manifestation of coronary heart disease. Cigarette smoke contains a large amount of radicals and reactive oxygen-derived substances enhancing aggregation of platelets. We investigated the effect of vitamin C as an important antioxidant in human plasma on the aggregation of human platelets in smokers and nonsmokers.

□ **Test Persons and Method:** Overall 40 persons (mean age: 28 ± 9 years) were randomized. The groups of chronic smokers (21 ± 9 „packyears“) and nonsmokers consisted of 20 persons, respectively. In each group ten persons were treated with intravenous infusion of 3 g vitamin C or 100 ml 0.9% saline solution (placebo). The maximal aggregation was measured with an aggregometer after 0, 3, 6, and 24 hours with collagen concentrations of 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$, respectively.

□ **Results:** In smokers with vitamin C application the group comparison by Wilcoxon's rank test demonstrated a significant decrease of platelet aggregation after 6 hours for both collagen concentrations (0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$) compared to the placebo group ($p \leq 0.05$), whereas nonsmokers with vitamin C application revealed a significant decrease of platelet aggregation after 3 and 6 hours for both collagen concentrations (0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$) compared to the placebo group ($p \leq 0.03$). The comparison between smokers and nonsmokers regarding the effect of vitamin C on platelet aggregation for both collagen concentrations demonstrated no significant difference (3 hours: $p = 0.84$ and $p = 0.97$; 6 hours: $p = 0.81$ and $p = 0.59$; and 24 hours $p = 0.57$ and $p = 0.06$, not significant, respectively).

□ **Conclusion:** These findings suggest that vitamin C exerts an unknown inhibitory effect on collagen-induced platelets aggregation. These observations may represent a further protective effect of vitamin C in the development of coronary heart disease.

Key Words: Vitamins · Antioxidants · Platelets · Platelet aggregation inhibitors · Coronary disease

Med Klin 2002;97:263-9.
DOI 10.1007/s00063-002-1152-x

nale und chronisch entzündliche Erkrankungen vorzufinden. Raucher unterlagen einem zigarettenfreien Intervall von mindestens 48 Stunden vor Untersuchungsbeginn. Mindestens 2 Wochen vor der Untersuchung wurden von den Probanden keine Medikamente eingenommen, welche die Thrombozytenaggregation hätten beeinflussen können. Probanden mit einer regelmäßigen Einnahme von Vitaminen wurden nicht in die Studie mit einbezogen. Alle Probanden wurden über Ablauf und Zweck dieser Studie aufgeklärt und gaben ihr Einverständnis. Die Studie war durch die medizinische Ethikkommission der Universität Freiburg genehmigt worden.

□ **Versuchsablauf:** Bei allen Probanden erfolgte zunächst eine venöse Blutabnahme zur Bestimmung der Laborparameter, wie Blutbild, Lipide, Blutzucker, Leber-, Nieren- und Entzündungswerte. Die erste Blutabnahme zur Bestimmung einer kollagenstimulierten Thrombozytenaggregation zur Ermittlung des jeweiligen Ausgangswertes erfolgte vor der intravenösen Gabe von 3 g Vitamin C in 70 ml isotonischer Kochsalzlösung oder der intravenösen Gabe von 100 ml 0,9%iger Kochsalzlösung. In Abständen von 3, 6 und 24 Stunden nach der jeweiligen Infusion wurden den Probanden wieder 30 ml venöses Blut in Citratröhrchen entnommen und die

aktuelle Thrombozytenaggregation gemessen. Das Aggregometer zur Messung der Thrombozytenaggregation wurde jeweils mit dem frischen plättchenarmen Plasma (PPP) des betreffenden Probanden geeicht. Zur Bestimmung der maximalen Aggregation und der Thrombozyten wurde ein Aggregometer (Apact) zur Messung der Lichttransmission der Suspensionen von Plasmaproben und aggregationsstimulierendem Kollagen verwendet. Die Thrombozyten wurden innerhalb von 1,5 Stunden nach der Abnahme getestet, um sicherzustellen, dass eine Aggregationsminderung nicht auf einer Funktionsminderung der Plättchen selbst beruhte.

Herstellung des plättchenreichen und plättchenarmen Plasmas (PPP): Um das plättchenreiche Plasma (PRP) herzustellen, wurde das venöse Blut in einem Citratröhrchen in einer Laborzentrifuge (Firma Heraeus Sepatech, Omnifuge 2.0/RS) bei 800 G über 10 Minuten bei einer Temperatur von 21 °C zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand als PRP abpipettiert. Mit einer Mikropipette (Firma Blaubrand, intra EDD) wurden 20 µl von diesem PRP abgenommen und in ein Thromboplus-Röhrchen (Firma Sarstedt, Nümbrecht) mit $\leq 2,5$ mg Quecksilber/ml-Lösung gefüllt, um die vorliegende Anzahl der Thrombozyten zu bestimmen. Hiervon wurden ca. 30 µl abpipettiert und in einer Neubauer-Kammer (Firma Blaubrand) für weitere 5 Minuten belassen. Schlussendlich konnte in einer feuchten Kammer die Thrombozytenzahl im PRP mittels eines Mikroskops bestimmt werden. Die verbleibende Restmenge, nachdem der Überstand zur Bestimmung des PRP abpipettiert wurde, wurde erneut in der Omnifuge bei 3500 G über 10 Minuten bei einer Temperatur von 21 °C zentrifugiert, um das plättchenarme Plasma (PPP) im Überstand zu erhalten. Die Zahl der Thrombozyten wurde durch eine entsprechende Mischung des PRP und PPP auf 200 000/µl verdünnt, um bei allen Probanden die gleiche Anzahl von Thrombozyten im untersuchten Plasma zu erhalten.

Induktionslösungen: Zur Induktion der Thrombozytenaggregation wurde

Kollagen verwandt. Das hierfür benötigte Kollagen und der Horm-Puffer zur Verdünnung des Kollagens wurden zunächst langsam auf Raumtemperatur gebracht (Kollagenreagens Horm und SKF Horm Puffer, Firma Nycomed, Ismaning). Zur Herstellung der Induktionslösung wurden 10 µl Kollagen und 990 µl Horm-Puffer vermischt mit einer resultierenden Kollagenkonzentration von 1 µg/ml. Um ferner eine Kollagenkonzentration von 0,5 µg/ml zu erlangen, wurden 300 µl der 1-µg/ml-Kollagenkonzentration 200 µl des Horm-Puffer beigegeben. Die Induktionslösungen in den verschiedenen Konzentrationen wurden täglich neu angesetzt.

Aggregationsmessung: Die Aggregationsmessungen der Thrombozyten wurden mit einem Apact-Messgerät, einem Vier-Kammer-Aggregometer (Automated Platelet Aggregation and Coagulation Tracer, Firma Labor, Ahrensburg) durchgeführt. Zunächst wurde mit 250 µl PPP des jeweiligen Probanden ein PPP-Abgleich durchgeführt. Zur Ermittlung der Genauigkeit des Abgleichs wurde jeweils ein Probedurchlauf mit PRP (bzw. immer mit 200 000/µl Thrombozyten) und der 1-µg/ml-Kollagenkonzentration auf allen vier Kanälen durchgeführt. Für die eigentliche Aggregationsmessung wurden jeweils 225 µl PRP in Küvetten pipettiert und über 6–10 Minuten auf eine Temperatur von 37 °C erwärmt. Nach einer Zeitspanne von ca. 15–20 Sekunden wurde ein PRP-Abgleich durchgeführt. Die Aggregation in 225 µl PRP erfolgte mit 25 µl der jeweiligen Kollagenkonzentrationen von 0,5 und 1 µg/ml. Die Aggregationsmessdauer betrug 360 Sekunden. Die maximale Aggregation der Thrombozyten sowie der Verlauf der Aggregationskurven wurden nach 3, 6 und 24 Stunden ermittelt. Die Auswertung durch den Untersucher erfolgte ohne Kenntnis der Herkunft der jeweiligen Citratröhrchen.

Statistik: Alle Daten sind als Mittelwerte \pm Standardabweichungen angegeben. Unterschiede der jeweiligen Ausgangswerte zwischen den Gruppen wurden mittels Wilcoxon-Rank-Test quantitativ oder χ^2 -Test für qualitative Variablen bestimmt. Relative Verände-

rungen der Thrombozytenaggregation durch die intravenöse Vitamin-C-Gabe innerhalb jeder Gruppe wurde mittels Wilcoxon-Sign-Rank-Test untersucht. Wie die Wirkung von Vitamin C auf die Thrombozytenaggregation bei Rauchern und Nichtrauchern unterschiedlich ausfällt, wurde mittels eines Interaktionstests innerhalb zweifaktorieller ANOVA getestet. Statistische Signifikanz wurde bei einem p-Wert $\leq 0,05$ angenommen.

Ergebnisse

Klinische Charakterisierung: Die klinische Charakterisierung zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Studiengruppen. Das Gesamtcholesterin bei Rauchern war nicht signifikant höher als bei den Nichtrauchern (194 ± 37 mg/dl vs. 179 ± 30 mg/dl, jeweils; $p = n. s.$). In der Gruppe der chronischen Raucher hatten drei Personen grenzwertig erhöhte Cholesterinwerte (200 – 239 mg/dl). In der Nichtrauchergruppe hatte eine Person grenzwertig erhöhtes Cholesterin. Ferner waren keine signifikanten Unterschiede der HDL- und LDL-Cholesterin-Konzentrationen vorzufinden (51 ± 13 mg/dl vs. 60 ± 8 mg/dl HDL und 120 ± 31 mg/dl vs. 112 ± 24 mg/dl LDL, jeweils für Raucher und Nichtraucher; $p = n. s.$). Triglyceride, Fibrinogen sowie Hämoglobin waren in den beiden Gruppen nicht signifikant unterschiedlich (139 ± 55 mg/dl vs. 111 ± 40 mg/dl Triglyceride, 296 ± 63 mg/dl vs. 283 ± 59 mg/dl Fibrinogen und 13 ± 1 g/dl vs. 13 ± 1 g/dl Hämoglobin, jeweils für Raucher und Nichtraucher; $p = n. s.$). Keine der Personen hatte Hinweise auf eine arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus oder kardiovaskuläre Erkrankung. Ferner fanden sich laborchemisch auch keine Anzeichen für chronisch entzündliche Erkrankungen.

Vitamin-C-Spiegel: Vitamin-C-Konzentrationen wurden vor und nach einer intravenösen Infusion von 3 g Vitamin C bei 19 Personen gemessen. Die Vitamin-C-Spiegel lagen zwischen 0,56 und 1,56 mg/100 ml Serum. Die Ausgangswerte der Vitamin-C-Konzentrationen bei chronischen Rauchern waren signifikant niedriger im Vergleich zu den Ausgangswerten

ORIGINALARBEIT

Tabelle 1. Maximale Thrombozytenaggregation (%) (Mittel \pm SD) der einzelnen Studiengruppen ($n = 10$) nach 0, 3, 6 und 24 Stunden (h) bei $0,5 \mu\text{g/ml}$ Kollagen (* bis ** $p \leq 0,04$ und † bis †† $p \leq 0,03$ vs. jeweiligen Ausgangswert).

	0 h	3 h	6 h	24 h
Raucher – Vitamin C	72 \pm 14	60 \pm 27*	55 \pm 26**	71 \pm 16
Nichtraucher – Vitamin C	69 \pm 23	55 \pm 23†	48 \pm 24††	70 \pm 25
Raucher – Plazebo	71 \pm 16	69 \pm 19	69 \pm 19	73 \pm 13
Nichtraucher – Plazebo	67 \pm 19	69 \pm 15	73 \pm 16	72 \pm 20

Tabelle 2. Maximale Thrombozytenaggregation (%) (Mittel \pm SD) der einzelnen Studiengruppen ($n = 10$) nach 0, 3, 6 und 24 Stunden (h) bei $1,0 \mu\text{g/ml}$ Kollagen (* bis *** und † bis ††† $p \leq 0,01$ vs. jeweiligen Ausgangswert).

	0 h	3 h	6 h	24 h
Raucher – Vitamin C	90 \pm 8	79 \pm 11*	73 \pm 12**	84 \pm 3***
Nichtraucher – Vitamin C	86 \pm 7	73 \pm 9†	62 \pm 14††	86 \pm 13
Raucher – Plazebo	83 \pm 9	81 \pm 9	81 \pm 8	81 \pm 7
Nichtraucher – Plazebo	79 \pm 5	77 \pm 6	80 \pm 9	83 \pm 8

bei Nichtrauchern ($0,69 \pm 5 \text{ mg}/100 \text{ ml}$ vs. $1,20 \pm 4 \text{ mg}/100 \text{ ml}$ jeweils; $p \leq 0,03$). Die intravenöse Gabe von 3 g Vitamin C bewirkte einen signifikanten akuten Anstieg der Vitamin-C-Konzentration im Plasma bei Rauchern auf $22 \pm 3 \text{ mg}/100 \text{ ml}$ und bei Nichtrauchern auf $21 \pm 3 \text{ mg}/100 \text{ ml}$ ($p \leq 0,0006$). Der akute Anstieg der Vitamin-C-Spiegel zeigte zwischen Rauchern und Nichtrauchern keinen signifikanten Unterschied ($p = \text{n. s.}$). Bei keiner der 20 untersuchten Personen mit einer einmaligen intravenösen Infusion von 3 g Vitamin C waren bedeutende Nebenwirkungen aufgetreten.

□ **Thrombozytenaggregation:** Wir bestimmten die Wirkung einer einmaligen intravenösen Gabe von 3 g Vitamin C auf die Thrombozytenaggrega-

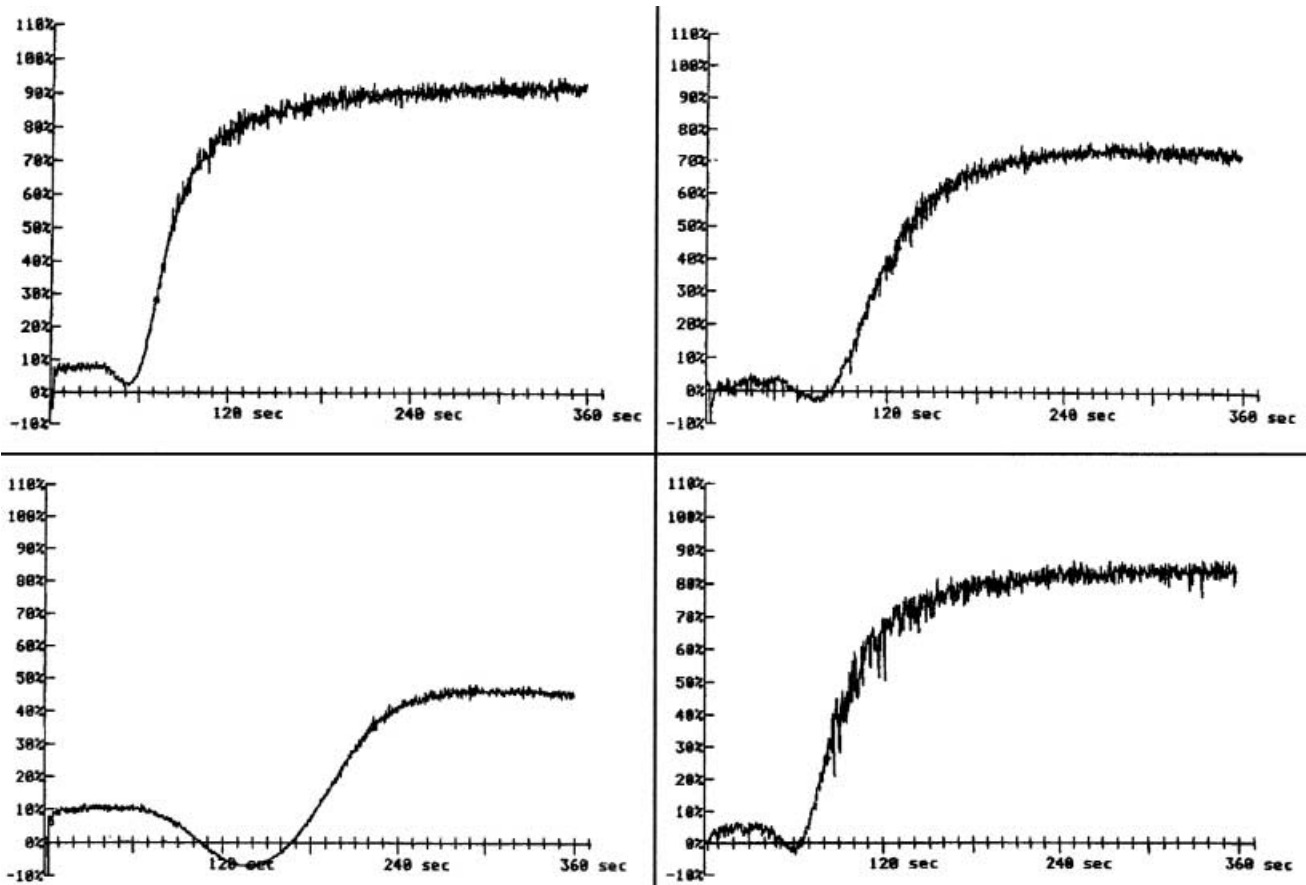


Abbildung 1. Repräsentatives Beispiel der Wirkung von 3 g Vitamin C auf eine kollageninduzierte ($0,5 \mu\text{g/ml}$) Thrombozytenaggregation (%) eines Rauchers nach 0, 3, 6 und 24 Stunden. Die Thrombozyten des Rauchers zeigen bei der Ausgangsmessung vor der intravenösen Gabe von 3 g Vitamin C eine maximale Aggregation von ca. 89% (oberes Feld links). Nach der intravenösen Gabe von 3 g Vitamin C sind nach 3 Stunden (oberes Feld rechts) sowie nach 6 Stunden (unteres Feld links) jeweils eine verminderte Thrombozytenaggregation von ca. 72% bzw. 47% anzutreffen. Nach 24 Stunden findet sich erneut eine angestiegene Thrombozytenaggregation von ca. 84% (unteres Feld rechts).

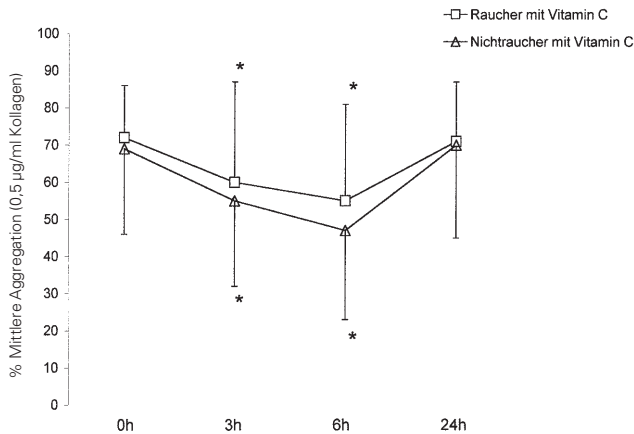


Abbildung 2. Zeitlicher Verlauf der Thrombozytenaggregation von Rauchern und Nichtrauchern nach einer einmaligen intravenösen Gabe von 3 g Vitamin C bei 0,5 µg/ml Kollagen (* $p \leq 0,04$ zum jeweiligen Ausgangswert).

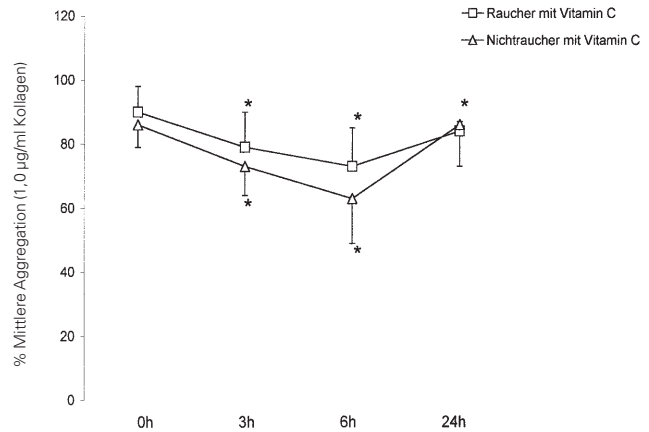


Abbildung 3. Zeitlicher Verlauf der Thrombozytenaggregation von Rauchern ($n = 10$) und Nichtrauchern nach einer einmaligen intravenösen Gabe von 3 g Vitamin C bei 1,0 µg/ml Kollagen (* $p \leq 0,01$ zum jeweiligen Ausgangswert).

tion bei chronischen Rauchern nach 3, 6 und 24 Stunden. Ein Fallbeispiel ist in Abbildung 1 dargestellt. Die maximalen Thrombozytenaggregationswerte (%) der einzelnen Studiengruppen sind in Tabelle 1 (0,5 µg/ml Kollagen) bzw. in Tabelle 2 (1,0 µg/ml Kollagen) aufgezeigt. Die Abbildungen 2 und 3 geben die korrespondierenden Mittelwerte (Mittel \pm SD) der maximalen Thrombozytenaggregation für die jeweiligen Kollagenkonzentrationen der einzelnen Studiengruppen mit Vitamin-C-Gabe im 24-Stunden-Verlauf graphisch wieder.

Wirkung von Vitamin C auf die Thrombozytenaggregation bei Rauchern ($n = 10$): Bei Rauchern führte der Anstieg von Vitamin C im Plasma nach 3 Stunden bereits zu einer signifikanten Hemmung der Thrombozytenaggregation für beide Kollagenkonzentrationen von 0,5 µg/ml und 1,0 µg/ml im Vergleich zum jeweiligen Ausgangswert ($p \leq 0,04$ bzw. $p \leq 0,01$), welche nach 6 Stunden noch deutlicher hervortrat ($p \leq 0,02$ bzw. $p \leq 0,01$). Die erneute Bestimmung der Thrombozytenaggregation bei Rauchern mit Vitamin-C-Applikation zeigte nach 24 Stunden bei einer Kollagenkonzentration von 0,5 µg/ml keine wesentlichen Unterschiede mehr im Vergleich zum Ausgangswert ($p = 0,42$; n. s.), wohingegen bei einer Kollagenkonzentration von 1,0 µg/ml

noch eine signifikante Hemmung der Thrombozytenaggregation im Vergleich zum Ausgangswert vorhanden war ($p \leq 0,01$).

Wirkung von Vitamin C auf die Thrombozytenaggregation bei Nichtrauchern ($n = 10$): Die einmalige intravenöse Gabe von 3 g Vitamin C bei Nichtrauchern bewirkte nach 3 Stunden eine signifikante Hemmung der Thrombozytenaggregation für beide Kollagenkonzentrationen von 0,5 µg/ml und 1,0 µg/ml im Vergleich zum jeweiligen Ausgangswert ($p \leq 0,02$ bzw. $p \leq 0,01$), welche nach 6 Stunden noch offensichtlicher wurde (beide $p \leq 0,01$). Nach 24 Stunden hingegen waren bei Nichtrauchern mit Vitamin-C-Applikation für beide Kollagenkonzentrationen von 0,5 µg/ml und 1,0 µg/ml keine signifikanten Unterschiede der Thrombozytenaggregation im Vergleich zum jeweiligen Ausgangswert mehr vorzufinden ($p = 0,87$ bzw. $p = 0,97$; n. s.).

Gruppenvergleich der Thrombozytenaggregation zwischen Rauchern mit Vitamin-C-Applikation und der Placebogruppe: Der Gruppenvergleich der Wirkung von Vitamin C auf die Thrombozytenaggregation bei Rauchern und der Placebogruppe zeigte für die Kollagenkonzentration von 0,5 µg/ml nach 3 Stunden

einen noch nicht signifikanten Trend ($p \leq 0,16$; n. s.), wobei jedoch für die Kollagenkonzentration von 1,0 µg/ml bereits ein signifikanter Unterschied vorhanden war ($p \leq 0,01$). Nach 6 Stunden waren aber für beide Kollagenkonzentrationen signifikante Unterschiede anzutreffen ($p \leq 0,04$ bzw. $p \leq 0,01$). Der Gruppenvergleich der Thrombozytenaggregation zwischen Rauchern mit Vitamin-C-Applikation und der Placebogruppe ergab nach 24 Stunden für beide Kollagenkonzentrationen keine signifikanten Unterschiede ($p = 0,87$ bzw. $p = 0,97$; n. s.).

Gruppenvergleich der Thrombozytenaggregation zwischen Nichtrauchern mit Vitamin-C-Applikation und der Placebogruppe: Der Gruppenvergleich der Wirkung von Vitamin C auf die Thrombozytenaggregation bei Nichtrauchern gegenüber der Placebogruppe war nach 3 und 6 Stunden für beide Kollagenkonzentrationen von 0,5 µg/ml und 1,0 µg/ml signifikant unterschiedlich (nach 3 Stunden: $p \leq 0,01$ bzw. $p \leq 0,03$ und nach 6 Stunden: $p \leq 0,01$, jeweils). Nach 24 Stunden zeigte die Thrombozytenaggregation für beide Kollagenkonzentrationen zwischen gesunden Nichtrauchern mit Vitamin-C-Applikation und der Placebogruppe keine signifikanten Unterschiede ($p = 0,42$ bzw. $p = 0,10$; n. s.).

ORIGINALARBEIT

□ **Vergleich der Wirkung von Vitamin C auf die Thrombozytenaggregation bei Rauchern und Nichtrauchern:** Die Wirkung von Vitamin C auf die Thrombozytenaggregation bei Rauchern und gesunden Nichtrauchern zeigte nach 3, 6 und 24 Stunden für beide Kollagenkonzentrationen von 0,5 µg/ml und 1,0 µg/ml keine signifikanten Unterschiede (nach 3 Stunden: $p = 0,84$ bzw. $p = 0,97$, n. s.; nach 6 Stunden: $p = 0,81$ bzw. $p = 0,59$, n. s., und nach 24 Stunden $p = 0,57$ bzw. $p = 0,06$, n. s.).

DISKUSSION

Die Ergebnisse unserer Studie zeigen, dass die intravenöse Gabe von 3 g Vitamin C die kollagenstimulierte Thrombozytenaggregation ex vivo bei Rauchern und bei gesunden Nichtrauchern signifikant vermindert. Interessanterweise war das Ausmaß der verminderten Thrombozytenaggregation zwischen Rauchern und Nichtrauchern nicht signifikant unterschiedlich. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Vitamin C über einen bisher unbekanntes Mechanismus einen hemmenden Einfluss auf die kollageninduzierte Thrombozytenaggregation ausübt.

Die Thrombozytenaggregation beinhaltet komplexe Interaktionen von mehreren Gerinnungsfaktoren, Prostaglandinen, Thromboxan, Adenosindiphosphat (ADP) und Arachidonsäure [1, 3, 22, 28]. Die Arachidonsäure unterliegt einer enzymatischen Umwandlung, deren Metaboliten die Aggregation der Thrombozyten beeinflussen können. Zu den wichtigsten Enzymen, welche die Arachidonsäure metabolisieren, gehören die Cyclooxygenase und Lipoxygenase. Metabolische Derivate der thrombozytären Cyclooxygenase (Malondialdehyd, 12-Hydroxy-Heptatriensäure, Thromboxan A₂ und B₂) bzw. der Lipoxygenase (12-Hydroperoxyeicosatetraensäure) verstärken im Allgemeinen die Aggregation. Andererseits werden vom vaskulären Endothel Prostacyclin I₂ und Stickstoffmonoxid freigesetzt, welche einer Thrombozytenaggregation entgegenwirken. Aktivierte Thrombozyten mit Gefäßwandinteraktionen und konsekutiv von Thrombozyten freigesetzte Wachstumsfaktoren sollen wesentlich zur Ent-

wicklung einer Atherosklerose beitragen [28].

Vitamin E

Der Einfluss von Vitaminen auf die Thrombozytenaggregation ist bislang im Wesentlichen für Vitamin E untersucht worden [1, 13, 22, 23, 35]. Vitamin E vermag eine hemmende Wirkung auf die Aktivität der thrombozytären Cyclooxygenase [1] und Lipoxygenase [22] auszuüben. Des Weiteren beschreiben Higashi & Kikuchi [13] einen hemmenden Einfluss von Vitamin E auf eine durch Wasserstoffperoxid induzierte Thrombozytenaggregation. Steiner & Anastasi [35] konnten eine dosisabhängige Hemmung von Vitamin E auf die durch ADP, Adrenalin und Kollagen stimulierte Thrombozytenaggregation aufzeigen. Als Nachteil dieser Studien [13, 35] sind aber relativ hoch dosierte, unphysiologische Vitamin-E-Konzentrationen (0,3–2,0 mmol/l) anzusehen, die für eine signifikante Hemmung der Thrombozytenaggregation verwendet wurden. Hingegen konnten Freedman et al. [9] bei gesunden Probanden mit einer täglichen Einnahme von 400–1 200 IE Vitamin E erstmalig einen Anstieg der Vitamin-E-Konzentration in den Thrombozyten nachweisen, der mit einer Hemmung der Proteinkinase-C-vermittelten Thrombozytenaggregation korrelierte. Eine antioxidative Wirkung von Vitamin E bei der Hemmung der Thrombozytenaggregation scheint somit nicht allein im Vordergrund zu stehen [8, 9]. Unterschiedliche Aussagen mehrerer Untersuchungen deuten darauf hin, dass eine Vitamin-E-vermittelte Hemmung der Thrombozytenaggregation zum Teil auf eine antioxidative Wirkung zurückzuführen ist, während aber auch andere Faktoren, wie die Vitamin-E-vermittelte Hemmung der Proteinkinase C oder die Hemmung der thromboxaninduzierten Thrombozytenaggregation, von Bedeutung sind [6, 8, 15, 22, 30, 33].

Vitamin C

Eine mögliche Beeinflussung der Thrombozytenaggregation durch Vitamin C als wichtigstes Antioxidans des humanen Plasmas, das sehr effektiv Superoxide und andere Peroxidradikale

inaktivieren kann, ist bei Rauchern bislang nicht untersucht worden. Bei Rauchern fanden wir deutlich erniedrigte Vitamin-C-Plasmawerte im Vergleich zu gesunden Nichtrauchern als Hinweis auf einen erhöhten Verbrauch an Antioxidanzien durch reaktive Sauerstoffradikale [10, 26]. Frühere Untersuchungen konnten aufzeigen, dass bei Rauchern eine regelmäßige Zufuhr von Vitamin C die Entstehung von oxidativen Abbauprodukten wie des potenten Vasokonstriktors 8-Epi-Prostaglandin F_{2α} sowie die Oxidation von Fettsäuren an Zellmembranen und an Lipoproteinen verhindert [21, 22, 24]. Eine Anhebung des Plasmaspiegels von Vitamin C müsste demnach einer durch Sauerstoffradikale und andere reaktive Substanzen des Zigarettenrauchs ausgelösten Thrombozytenaggregation entgegenwirken. Erst vor kurzem konnten Wilkinson et al. [38] bei gesunden Probanden eine signifikante Reduktion einer ADP-stimulierten Thrombozytenaggregation 6 Stunden nach einer einmaligen Einnahme von 2 g Vitamin C aufzeigen.

Unsere Ergebnisse zur Wirkung einer akuten intravenösen Gabe von 3 g Vitamin C auf die Thrombozyten zeigten bei Rauchern nach 6 Stunden und bei Nichtrauchern nach 3 bzw. 6 Stunden eine signifikante Reduktion der Thrombozytenaggregation im Vergleich zur jeweiligen Placebogruppe. Interessanterweise war das Ausmaß der durch Vitamin-C-Applikation verminderten kollagenstimulierten Thrombozytenaggregation zwischen Rauchern und Nichtrauchern nicht signifikant unterschiedlich. Dies weist auf einen bisher unbekanntes Mechanismus der Hemmung der Thrombozytenaggregation durch Vitamin C hin, unabhängig von der Belastung des Plasmas an oxidativen Sauerstoffradikalen. Inwieweit bei Rauchern die verminderte Aggregation der Thrombozyten durch Vitamin C auf eine Reduktion von Superoxiden und anderen Peroxidradikalen, einhergehend mit einer vermehrten Bioverfügbarkeit von vaskulärem bzw. thrombozytärem Stickstoffmonoxid, zurückzuführen ist, können wir aus unseren Ergebnissen nicht herleiten. Vitamin C scheint aber über eine Hemmung der gemeinsamen Endstrecke der Thrombozytenaktivierung eine Verminderung der Aggregationsneigung herbei-

zuführen. Möglicherweise unterliegt Vitamin C einer aktiven Aufnahme der Thrombozyten durch ein gemeinsames Transportsystem mit Glucose [37]. Weitere experimentelle und klinische Studien sollten dazu beitragen, den genauen Wirkungsmechanismus von Vitamin C auf die Thrombozyten aufzuklären.

Klinische Bedeutung

Durch Produktion und luminalen Freisetzung von antiaggregatorischen Substanzen wie Prostaglandin I₂ und Stickstoffmonoxid hält das vaskuläre Endothel einen antithrombotischen Gefäßschutz aufrecht. Schädigungsstoffe des Zigarettenrauchs können eine Dysfunktion des vaskulären Endothels mit einem prothrombotischen Zustand der Gefäßwand herbeiführen [39]. Bisher konnte bei Rauchern eine anhaltende Verbesserung der vaskulären Endothelfunktion durch eine regelmäßige Einnahme von Vitamin C nachgewiesen werden [12, 29]. Bei Rauchern hemmt Vitamin C aber auch die Leukozytenadhäsion sowie die Formation von Thrombozyten-Leukozyten-Aggregaten an der Gefäßwand [16, 17]. Unsere Ergebnisse einer hemmenden Wirkung von Vitamin C auf die Thrombozytenaggregation bei Rauchern könnten eine weitere günstige Wirkung von Vitaminen bei der Prävention der koronaren Herzerkrankung darstellen [27, 32, 34, 36]. Die Ergebnisse groß angelegter Präventionsstudien stehen aber noch aus, die es erlauben würden, eine generelle Empfehlung zur zusätzlichen Gabe von Vitamin C und/oder Vitamin E bei Patienten mit kardiovaskulären Risikofaktoren auszusprechen.

Danksagung

Die Arbeiten wurden unterstützt innerhalb des Projektes A1 des „Zentrums für Klinische Forschung II: Herz- und Gefäßkrankheiten – Analyse und Integration von Form und Funktion“ der Albert-Ludwig-Universität Freiburg. Der leitenden MTA des Gerinnungslabors der Universität Freiburg, Frau Pogdani, danken wir für die Unterstützung bei den Aggregationsmessungen.

Literatur

1. Ali M, Gudbranson CG, McDonald JWD. Inhibition of platelet cyclo-oxygenase by alpha-tocopherol. *Prostaglandin Leukotr Med* 1980;4:79-85.
2. Berliner JA, Heinecke JW. The role of oxidized lipoproteins in atherogenesis. *Free Radical Biol Med* 1996;20:707-27.
3. Blache D. Involvement of hydrogen and lipid peroxides in acute tobacco smoking-induced platelet hyperactivity. *Am J Physiol* 1995;268:679-85.
4. Celermajer DS, Sorensen KE, Georgakopoulos D, et al. Cigarette smoking is associated with dose-related and potentially reversible impairment of endothelium-dependent dilation in healthy young adults. *Circulation* 1993;88:2149-55.
5. Church DF, Pryor WA. Free-radical chemistry of cigarette smoke and its toxicological implications. *Environ Health Perspect* 1985;64:111-26.
6. Cox AC, Rao GH, Gerrard JM, White JG. The influence of alpha-tocopherol quinone on platelet structure, function and biochemistry. *Blood* 1980;55:907-14.
7. Facchini FS, Hollenbeck CB, Jeppeson J, et al. Insulin resistance and cigarette smoking. *Lancet* 1992;339:1128-30.
8. FitzGerald GA, Brash AR. Endogenous prostacyclin and thromboxane biosynthesis during chronic vitamin E therapy in man. *Ann NY Acad Sci* 1982;393:209-11.
9. Freedman JE, Farhat JH, Loscalzo J, et al. alpha-Tocopherol inhibits aggregation on human platelets by a protein kinase C-dependent mechanism. *Circulation* 1996;94:2434-40.
10. Frei B, England L, Ames BN. Ascorbate is an outstanding antioxidant in human plasma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:6377-81.
11. Frei B, Stocker R, Ames BN. Antioxidant defense and lipid peroxidation in human blood plasma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85:9748-52.
12. Heitzer T, Just H, Münzel T. Antioxidant vitamin C improves endothelial dysfunction in chronic smokers. *Circulation* 1996;94:6-9.
13. Higashi O, Kikuchi Y. Effects of vitamin E on the aggregation and the lipid peroxidation of platelets exposed to hydrogen peroxide. *Tohoku J Exp Med* 1974;112:271-78.
14. Kalra VK, Ying Y, Deemer K, et al. Mechanism of cigarette smoke condensate-induced adhesion of human monocytes to cultured endothelial cells. *J Cell Physiol* 1994;160:154-62.
15. Kockman V, Vericel E, Croset M, et al. Vitamin E fails to alter the aggregation and oxygenated metabolism of arachidonic acid in the normal human platelet. *Prostaglandins* 1988;36:607-20.
16. Lehr HA, Frei B, Arfors KE. Vitamin C prevents cigarette smoke-induced leukocyte aggregation and adhesion to endothelium in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:7688-92.
17. Lehr HA, Weyrich AS, Saetzler RK, et al. Vitamin C blocks inflammatory platelet-activating factor mimetics created by cigarette smoking. *J Clin Invest* 1997;99:2358-64.
18. Loran DE, Topham MK, Whatley RE, et al. Inflammatory roles of P-selectin. *J Clin Invest* 1993;92:559-70.
19. Meade TW, Imeson J, Stirling Y. Effects of changes in smoking and other characteristics on clotting factors and the risk of ischemic heart disease. *Lancet* 1987;2:986-8.
20. Meister A. Glutathione-ascorbic acid antioxidant system in animals. *J Biol Chem* 1994;269:9397-400.
21. Morrow JD, Frei B, Longmire AW, et al. Increase in circulating products of lipid peroxidation (F2-isoprostanes) in smokers. *N Engl J Med* 1995;332:1198-203.
22. Mower R, Steiner M. Biochemical interaction of arachidonic acid and vitamin E in human platelets. *Prostaglandin Leukotr Med* 1983;10:389-403.
23. Murer EH. Release reaction and energy metabolism in blood platelets with special reference to the burst in oxygen uptake. *Biochem Biophys Acta* 1968;162:320-6.
24. Reilly M, Delanty N, Lawson JA, et al. Modulation of oxidant stress in vivo in chronic cigarette smokers. *Circulation* 1996;94:19-25.
25. Retsky KL, Freeman MW, Frei B. Ascorbic acid oxidation products protect human low density lipoproteins against atherogenic modification. *J Biol Chem* 1993;268:1304-9.
26. Riemersma RA, Wood DA, Macintyre CC, et al. Risk of angina pectoris and plasma concentrations of vitamins A, C and E and carotene. *Lancet* 1991;337:1-5.
27. Rimm EB, Stampfer MJ, Ascherio A, et al. Vitamin E consumption and the risk of coronary heart disease in men. *N Engl J Med* 1993;328:1450-6.
28. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 1993;362:801-9.
29. Schindler TH, Magosaki N, Mix M, et al. Acute and chronic ascorbic acid supplementation improves endothelial dysfunction of coronary microcirculation in chronic smokers. *Circulation* 1999;100:Suppl:1-4362.
30. Seeger W, Moser U, Roka L. Effects of alpha-tocopherol, its carboxylic acid chromane compound and two novel antioxidant isoflavonones on prostaglandin H synthase activity and autoactivation. *Naunyn Schmiedebergers Arch Pharmacol* 1988;338:74-81.
31. Shen Y, Rattan V, Sultana C, et al. Cigarette smoke condensate-induced adhesion molecule expression and transendothelial migration of monocytes. *Am J Physiol* 1996;39:H1124-633.
32. Singh RB, Niaz MA, Bishnoi I, et al. Diet, antioxidant vitamins, oxidative stress and risks of coronary artery disease: the Peerzada Prospective Study. *Acta Cardiol* 1994;49:453-67.
33. Srivasta KC. Vitamin E exerts antiaggregatory effects without inhibiting the enzymes of arachidonic acid cascade in platelets. *Prostaglandin Leukotr Med* 1986;21:177-82.
34. Stampfer MJ, Hennekens CH, Manson JE, et al. Vitamin E consumption and the risk of coronary heart disease in women. *N Engl J Med* 1993;328:1444-9.
35. Steiner M, Anastasi J. Vitamin E: an inhibitor of the platelet release reaction. *J Clin Invest* 1976;57:732-7.
36. Stephens NG, Parsons A, Scholfield PM, et al. Randomised controlled trial of vitamin E in patients with coronary artery disease: Cambridge Heart Antioxidant Study (CHAOS). *Lancet* 1996;347:781-6.
37. Washko P, Levine M. Inhibition of ascorbic acid transport in human neutrophils by glucose. *J Biol Chem* 1992;267:23568-74.
38. Wilkinson HB, Megson IL, MacCallum H, et al. Oral vitamin C reduces arterial stiffness and platelet aggregation in human. *J Cardiovasc Pharmacol* 1999;34:690-3.
39. Zeiher AM, Schächinger V, Minners J. Long-term cigarette smoking impairs endothelium-dependent coronary arterial vasodilator function. *Circulation* 1995;92:1094-100.

Korrespondenzanschrift
Dr. Thomas H. Schindler
Medizinische Klinik 1, Kardiologie
Kantonsspital der Universität Basel
Petersgraben 4
4031 Basel
Schweiz
Telefon (+41/61) 265-5224
Fax -4598
E-Mail: schindler.th@t-online.de