

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik IV
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München,
Direktor Prof. Dr. med. M. Reincke

und dem

Walter-Brendel-Zentrum für Experimentelle Medizin,
Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität zu München
Direktor Prof. Dr. med. U. Pohl

Auswirkungen
des nicht-steroidalen Antirheumatikums Diclofenac
und des
spezifischen Cyclooxygenase-2-Hemmers Parecoxib auf die
Thrombozyten-Endothel-Interaktion *in vivo*

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Lena Struthmann

aus Dachau

2013

Mit Genehmigung der medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. med. Florian Krötz
Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Michael Spannagl
Prof. Dr. med. Christian Weber
Priv. Doz. Dr. med. Karin Kurnik

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 10.01.2013

Inhaltsverzeichnis

1. <i>EINLEITUNG</i>	1
1.1 Die Rolle des Gefäßendothels in Inflammation und Thrombose.....	2
1.2 Thrombozyten.....	3
1.3 Cyclooxygenasen und deren Hemmung.....	4
1.3.1 Diclofenac.....	7
1.3.2 Parecoxib.....	7
1.4 Prostanoid- und deren Wirkung im Gefäßbett.....	8
1.5 Fragestellungen dieser Arbeit.....	10
2. <i>MATERIAL UND METHODEN</i>	11
2.1 Puffer und Medien.....	11
2.2 Untersuchung der Thrombozyten-Endothel-Interaktion und der festen Gefäßwandadhäsion in vivo.....	12
2.2.1 Versuchstiere und deren Haltung.....	12
2.2.2 Das Modell der Rückenhautkammer zur Beobachtung der Mikrozirkulation in vivo.....	12
2.2.3 Legen des zentralen Venenkatheters in die Vena jugularis.....	14
2.2.4 Narkose der Tiere.....	15
2.2.5 Intravitalmikroskopie (IVM).....	16
2.2.6 Beurteilung der Thrombozyten-Endothel-Interaktion.....	17
2.2.6.1 Isolation der Thrombozyten.....	17
2.2.6.2 Versuchsanordnung.....	18
2.2.6.3 Klassifizierung von rollenden und fest adhären-ten Thrombozyten.....	18
2.2.6.4 Gefäßverschlusszeit.....	18
2.3 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA).....	19
2.4 Detektion von β_3 -Integrin auf humanen mikrovaskulären Endothelzellen.....	20
2.4.1 Zellkultur.....	20
2.4.2 Versuchsansätze und FACS-Messungen.....	20
2.5 Software.....	21
2.6 Statistik.....	21
3. <i>ERGEBNISSE</i>	22
3.1 Die Wirkung einer Hemmung der COX-2 auf die Thrombozyten-Endothel-Interaktion in vivo.....	22
3.2 Messung der Metabolite von Prostazyklin und Thromboxan A_2	30
3.3 TNF α erhöht die endotheliale CD61-Expression.....	33
4. <i>DISKUSSION</i>	34
4.1 Der Einfluss einer Cyclooxygenasehemmung auf die Thrombozyten-Endothel-Interaktion und eine arteriö-äre Thrombusbildung in gesunden Gefäßen im Tierversuch.....	34
4.1.1 Die Rolle der COX-2-Spezifität der Cyclooxygenasehemmstoffe.....	35
4.1.2 Bewertung der „Prostanoid-Imbalance-Hypothese“.....	36
4.1.3 Diclofenac – Vergleich mit klinischen Daten.....	38
4.1.4 Parecoxib – Vergleich mit klinischen Daten.....	39
4.1.5 Vergleich mit anderen NSAR und ASS.....	40
4.2 Experimentelle Cyclooxygenasehemmung bei akuter Entzündung.....	42
4.2.1 Thrombozytenaktivierung unter entzündlichen Bedingungen.....	44
4.2.2 Klinische Bedeutung für die Anwendung von Cyclooxygenasehemmstoffen bei entzündlichen Erkrankungen.....	45
4.3 Limitationen dieser Untersuchung.....	54
5. <i>ZUSAMMENFASSUNG</i>	56
6. <i>ANHANG</i>	57
6.1 Abkürzungsverzeichnis.....	57
6.2 Abbildungsverzeichnis.....	58
6.3 Tabellenverzeichnis.....	58
6.4 Referenzen.....	59
6.5 Publikationen.....	67

1. Einleitung

Nicht-steroidale Antirheumatika (NSAR) wie Diclofenac, Ibuprofen und Acetylsalicylsäure (ASS) nehmen einen erheblichen Marktanteil an allen frei verkäuflichen Medikamenten ein. Konsumenten sind meist ältere Patienten mit zahlreichen Begleiterkrankungen. Dabei sind die Nebenwirkungen der NSAR nicht unerheblich. Eine häufige Nebenwirkung der NSAR ist deren gastrointestinale Toxizität welche von Magenbeschwerden bis hin zu Ulzera und Magenblutungen reicht^{1,2}. Die Wirkungen und Nebenwirkungen der NSAR entstehen durch eine Hemmung der Cyclooxygenaseenzyme (COX), welche für die Bildung bestimmter Botenstoffe, sogenannter Prostanoiden verantwortlich sind. COX-Enzyme bilden aus Arachidonsäure über Prostaglandin G₂ (P_gG₂) Prostaglandin H₂ (P_gH₂). Über an die Cyclooxygenasen gekoppelte weitere Enzyme, die Prostanoidsynthetasen, werden die Prostanoiden Prostaglandin D₂, E₂, F_{2α}, I₂ (P_gD₂, P_gE₂, P_gF_{2α}, P_gI₂) und Thromboxan A₂ (TxA₂) gebildet. Die Prostanoidsynthetasen heißen nach ihren Produkten Prostaglandin D-, E- und F-Synthetase (P_gDS, P_gES, P_gFS), Prostazyklinsynthetase (P_gIS) und Thromboxansynthetase (TxAS). Im Organismus gibt es zwei Isoformen der Cyclooxygenasen. Die COX-1 ist unter anderem für einen Schutz des Magens vor Autodigestion über eine Produktion von P_gE₂ und eine Förderung der Thrombozytenaggregation über TxA₂ zuständig. Die COX-2 wird allgemein als ein Hauptmediator von Entzündungsreaktionen und Schmerzempfindung angesehen. Diese werden von verschiedenen Prostanoiden vermittelt, unter anderem auch über COX-2 abhängig gebildetes P_gI₂³. Die gastrointestinale Toxizität der NSAR entsteht durch eine Hemmung der COX-1 abhängigen P_gE₂-Produktion^{4,5}. Mit dem Ziel die über die COX-2-Hemmung vermittelten analgetischen Effekte der NSAR zu erhalten und die unerwünschten Nebenwirkungen der COX-1-Hemmung zu vermeiden, wurden spezifischere Inhibitoren für die COX-2 entwickelt. Erstaunlicherweise zeigte sich aber im Jahre 2000 im Rahmen der „Vioxx Gastrointestinal Outcome Research“-Studie (VIGOR), einer Multicenterstudie an 8076 Patienten, die den ersten neuentwickelten spezifischen COX-2-Hemmer Rofecoxib mit dem NSAR Naproxen bezüglich gastrointestinaler Toxizität verglich, dass vermehrt Myokardinfarkte in der Patientengruppe mit spezifischer COX-2-Hemmung auftraten⁶. In der „Adenomatous Polyp Prevention on Vioxx“-Studie (APPROVe, 2004), die an 2587 Patienten die Wirkung von Rofecoxib auf Rezidive von Kolonpolypen untersuchte, traten erneut erhöhte Raten thromboembolischer Ereignisse auf^{7,8}. Dies führte zu einem Abbruch der Studie und der Hersteller nahm Rofecoxib weltweit vom Markt. Interessanterweise zeigte auch das NSAR Diclofenac im multinationalen Etoricoxib und Diclofenac Arthritis Langzeitprogramm (MEDAL), das zwischen 2002

und 2006 an 34.701 Patienten durchgeführt wurde und die kardiovaskuläre Sicherheit und gastrointestinale Verträglichkeit des COX-2-Hemmers Etoricoxib und des NSAR Diclofenac untersuchte, eine fast identische Rate an kardiovaskulären Ereignissen unter Diclofenac und Etoricoxib-Medikation^{9,10}. Eine kardiovaskuläre Gefährdung scheint demnach sowohl von den spezifischen COX-2-Hemmern als auch von einigen NSAR wie Diclofenac auszugehen. Als eine mögliche Ursache des erhöhten kardiovaskulären Risikos wurde nach VIGOR allgemein ein Kippen des Gleichgewichtes zwischen dem antithrombozytär wirksamen PGI₂ und dem thrombozytenaktivierenden TxA₂ zugunsten von TxA₂ angenommen („Prostanoid-Imbalance-Hypothese“).

In der vorliegenden Arbeit wurde im Tiermodell untersucht, ob eine erhöhte Atherothrombosegefährdung unter COX-2-Hemmung durch den spezifischen COX-2-Hemmer Parecoxib oder das NSAR Diclofenac vorliegt und welche Rolle das Gleichgewicht der Prostanoiden im Gefäßsystem dabei spielt. Da zum Zeitpunkt des Beginns dieser Arbeit außerdem unklar war, ob die klinisch beobachteten kardiovaskulären Ereignisse von vorbestehenden Risikofaktoren, wie beispielsweise einer Atherosklerose, abhängig sind, wurde weiterhin untersucht, ob eine kurzfristige intravasale Entzündung Auslöser der klinisch beobachteten kardiovaskulären Ereignisse sein könnte oder ob es eine grundlegende Gefährdung durch COX-2-Hemmer auch im gesunden Gefäßsystem gibt.

1.1 Die Rolle des Gefäßendothels in Inflammation und Thrombose

Das gesunde Gefäßendothel besteht aus einem einschichtigen Zellverband, der zum Lumen hin mit einer Schicht aus Glykoproteinen und Proteoglykanen überzogen ist. Aufgaben des Gefäßendothels sind die Regulation des Stoffaustausches zwischen Blut und Gewebe, die Produktion von den Gefäßtonus und damit den Blutdruck beeinflussenden Substanzen wie Stickstoffmonoxid (NO) und PGI₂, die Aktivierung von weißen Blutkörperchen in Entzündungsprozessen, die Neubildung von Gefäßen (Angiogenese) und die Aktivierung und Hemmung von Gerinnungsprozessen. Es wirkt einer Thrombozytenaktivierung, einer Adhäsion von Thrombozyten und der darauf folgenden Bildung eines Thrombus (primäre Hämostase) durch Freisetzung von antithrombozytär wirksamen Substanzen wie NO, ecto-ATPase und PGI₂ entgegen¹¹. Des Weiteren werden die Aktivierung der Gerinnungsfaktoren (sekundäre Hämostase) und dem entgegengesetzt fibrinolytische Vorgänge am Endothel initiiert. Ist das Gefäßendothel intakt, so bietet es kaum Anheftungsmöglichkeiten für Thrombozyten¹². Es ist sowohl Ziel als auch Quelle von Zytokinen. Unter entzündlichen Bedingungen werden Zytokine wie Interleukin-1 (Il-1) oder Tumornekrosefaktor α (TNF α) durch Makrophagen, Endo-

thelzellen und Fibroblasten freigesetzt. Diese binden an Rezeptoren auf Endothel- und Blutzellen und stoßen dort eine Vielzahl anti- und prothrombogener Reaktionsketten an. So werden unter IL-1 - und $\text{TNF}\alpha$ -Exposition durch das Endothel prothrombogene Substanzen wie ADP, von Willebrand Faktor (vWF) und Thromboplastin freigesetzt und endotheliale Oberflächenrezeptoren vermehrt exprimiert¹³. Diese Faktoren können aktivierend auf Thrombozyten wirken und fördern damit eine Thrombusbildung. Bei einer Verletzung des Gefäßendothels liegen darüber hinaus subendotheliale Kollagenfasern frei die wiederum Thrombozyten aktivieren und deren Aggregation einleiten¹⁴. Dem entgegen wirkt eine Aktivierung endothelialer Cyclooxygenasen und NO-Synthetasen (NOS) und die darauf folgende Bildung von antithrombogen wirksamem Pgl_2 und NO.

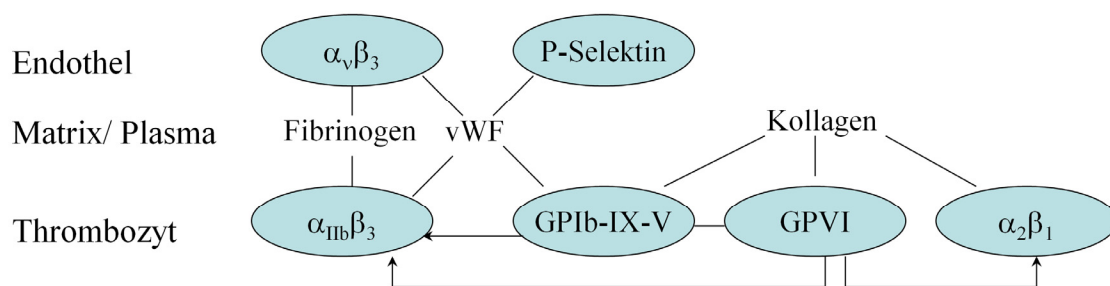


Abb. 1 Interaktion thrombozytärer Adhäsionsmoleküle ($\alpha_{IIb}\beta_3$, GPIb-IX-V, GPVI, $\alpha_2\beta_1$) mit Liganden wie dem Kollagen der vaskulären Matrix und dem von Willebrand Faktor (vWF) oder Fibrinogen des Plasmas und mit endothelialen Adhäsionsmolekülen ($\alpha_v\beta_3$, P-Selektin)¹³

1.2 Thrombozyten

Thrombozyten sind anukleäre Zellfragmente, die aus kernhaltigen Megakaryozyten abgeschert werden. Sie befinden sich circa zehn Tage in der Blutzirkulation bevor sie durch Makrophagen in Milz und Leber aus dieser entfernt werden. Hauptaufgabe der Thrombozyten ist ihre Rolle in der zellulären (primären) Hämostase. Normalerweise adhären Thrombozyten nur äußerst selten fest an die Gefäßwand^{12,15}. Anders verhält es sich dagegen, wenn Thrombozyten direkt durch subendotheliale Strukturen wie dem Kollagen einer geschädigten Gefäßwand oder indirekt durch inflammatorische Endothelaktivierung, wie unter Einfluss von $\text{TNF}\alpha$, Interleukin- 1β oder bakteriellem Lipopolysaccharid, aktiviert werden^{16,17}. Durch den von Endothelzellen gebildeten vWF wird der thrombozytäre Rezeptorkomplex GPIb mit den Kollagenfasern verbunden. Durch diese Anheftung an die Gefäßwand werden die Thrombozyten weiter aktiviert und erfahren eine Formveränderung. Sie setzen vasokonstriktorische (Serotonin, platelet derived growth factor, TxA_2) und aggregationsfördernde Substanzen (ADP, TxA_2 , Calcium, vWF, Fibrinogen) aus ihren Speichergranula frei^{13,14,18}. Durch das von

der thrombozytären COX-1 der aktivierten Thrombozyten gebildete TxA_2 , ADP und den Entzündungsmediator PAF (platelet activating factor) kommt es zu einer Rekrutierung weiterer Thrombozyten, die über Oberflächenrezeptoren verbunden werden. Im Zuge der Formveränderung der Thrombozyten (Bildung von Mikrovilli) werden Oberflächenrezeptoren wie P-Selektin oder das Glykoprotein GPIIb/IIIa (Integrin $\alpha_{\text{IIb}}\beta_{\text{III}}$) auf der thrombozytären Zelloberfläche vermehrt exprimiert^{13,19}. Diese dienen der Vernetzung der Thrombozyten mit dem Endothel über den vWF und Fibrinogen und der Thrombozyten untereinander über Fibrinogen. Unter Thrombineinwirkung kommt es zur Spaltung von Fibrinogen zu Fibrin und in Verbindung mit der plasmatischen Gerinnung (sekundäre Hämostase) zur Bildung eines irreversiblen Thrombus.

1.3 Cyclooxygenasen und deren Hemmung

1971 wurde durch Vane, Smith und Willis erstmals die Funktionsweise von Acetylsalicylsäure, die in einer Synthesehemmung von Prostaglandinen besteht, nachgewiesen²⁰. Der Wirkstoff Salicin war in verschiedenen Aufbereitungen schon seit Hippokrates, damals in Form eines Weidenrindenextraktes, im 19ten Jahrhundert dann zur Acetylsalicylsäure weiterentwickelt, als fiebersenkende und schmerzstillende Arznei verwendet worden²¹. Hemler und Lands isolierten 1976 die Cyclooxygenase als das für die Prostaglandinsynthese zuständige Protein²². 1980 und 1983 wurde nachgewiesen, dass Aspirin die COX über die Acetylierung eines Serin (Serin 530 bei der COX-1, Serin 516 bei der COX-2) hemmt^{23,24}. DeWitt et al. gelang es 1988 den komplementären DNA-Strang (cDNA) der Prostaglandin G/H Synthetase (Cyclooxygenase) zu klonieren und schon 1989 gab es Hinweise auf eine zweite Isoform der Cyclooxygenase^{25,26} die sich mit der Identifizierung der hierfür kodierenden messenger (m)RNA bestätigten^{27,28}. Die COX-1 und -2 stimmen in 59 Prozent ihrer Aminosäuresequenz überein²⁸ und auch ihre Kristallstruktur ist bemerkenswert ähnlich^{29,30}. Die Cyclooxygenasen bestehen aus zwei funktionellen Einheiten, von denen die eine Cyclooxygenase- und die andere Hydroperoxidaseaktivität besitzt. Im hydrophoben Kanal der Cyclooxygenasen wird der erste Schritt des Arachidonsäurestoffwechsels, der Umbau von Arachidonsäure in Prostaglandin G_2 ($\text{P}_\text{G}\text{G}_2$) und folgend durch die Peroxidase weiter zu Prostaglandin H_2 ($\text{P}_\text{G}\text{H}_2$), katalysiert³¹. Daher werden Cyclooxygenasen chemisch korrekt auch als Prostaglandin H-Synthetasen (PGHS) bezeichnet. Im Unterschied zur COX-1 besitzt der hydrophobe Kanal der COX-2 durch den Austausch von Isoleucin gegen Valin an Stelle 523 der Aminosäuresequenz noch eine Seitentasche^{32,33}. Dieser strukturelle Unterschied ermöglichte die Entwicklung spezifischer Hemmer der COX-2. Die COX-1^{25,34,35} ist ubiquitär im Körper vorhanden

und produziert als konstitutiv exprimiertes Enzym Eicosanoide unter physiologischen und pathologischen Bedingungen. Eine Induktion der COX-1 kann beispielsweise durch intravasculäre Scherbeanspruchung oder die Wirkung von vaskulärem endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF) auf Endothelzellen erfolgen^{36,37}. Während die COX-1 die Hauptquelle für die ständig produzierten, zytoprotektiven Prostaglandine der Magenmukosa ist³⁸, scheint die COX-2^{27,28,39,40} im Heilungsprozess von Magengeschwüren zu überwiegen⁴. Die endotheliale COX-2 spielt eine bedeutende Rolle in der Synthese der Prostaglandine $\text{Pgf}_{2\alpha}$, Pge_2 und Pgi_2 , wobei im Gefäßsystem unter physiologischen Bedingungen größtenteils Pgi_2 synthetisiert wird. Während die TxS sowohl, wenn auch schwächer, mit der COX-1 als auch mit der COX-2 interagiert, geschieht eine Interaktion bei der PgIS hauptsächlich mit der COX-2^{41,42}. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass die systemische Prostazyklinproduktion von der Aktivität der COX-2 abhängig ist. Diese Hypothese bestätigte sich in einer Studie von McAdam et al. in der durch Celecoxib die COX-2 spezifisch gehemmt wurde⁴³. Die spezifische Hemmung der COX-2 äußerte sich in einer Reduktion des Pgi_2 -Metaboliten 2,3-dinor-6-keto- $\text{Pgf}_{1\alpha}$ im Urin gesunder Probanden bei nur leicht beeinträchtigter Bildung des TxA_2 -Metaboliten TxB_2 . Auch die COX-2 wird in einigen Organen, wie dem Gefäßendothel, der glatten Gefäßmuskulatur, den Nieren oder dem Gehirn konstitutiv exprimiert^{44,45}. Sie ist zusätzlich durch zahlreiche proinflammatorische Stimuli wie Lipopolysaccharid, Il-1 , oder $\text{TNF}\alpha$ ⁴⁶, Scherbeanspruchung⁴⁷ und Wachstumsfaktoren, wie den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF) induzierbar⁴⁸⁻⁵¹. Die PGHS wird im Gefäßendothel, vaskulärer glatter Muskulatur und vielen anderen Organen konstitutiv exprimiert^{52,53}. Die Entwicklung der spezifischen COX-2-Hemmer geschah vor dem Hintergrund, dass die COX-1-Hemmung der NSAR für die gastrointestinalen Nebenwirkungen verantwortlich zu sein scheint und der erwünschte analgetische und antiinflammatorische Effekt vornehmlich durch die Hemmung der von der COX-2 gebildeten Prostaglandine Pgi_2 und Pge_2 erreicht werden konnte. Daher wurden Pharmaka entwickelt, die die COX-2 stärker hemmen als die COX-1. Wie oben erwähnt besteht zwischen der PGHS-1 und -2 ein struktureller Unterschied in Form einer Seitentasche des hydrophoben Kanals der COX. Spezifische COX-2-Hemmer belegen die Seitentasche des hydrophoben Kanals der COX-2 und blockieren den Zugang von Arachidonsäure zum Aktivitätszentrum des Enzyms. Da sie sperriger sind als die relativ unspezifischen NSAR wie beispielsweise ASS ist ihnen nur eingeschränkter Zugang zum Aktivitätszentrum der COX-1 möglich. Einige spezifische COX-2-Hemmer, die als Vorläufer für die klinisch verwendeten Pharmaka entwickelt wurden, wie NS-398 oder DuP-697 binden primär an beide Cyclooxygenaseisomere. Dann erfolgt eine mit der Expositionszeit zunehmende Hemmung der COX-2. Neben

der zeitlich zunehmenden Hemmung nimmt auch die Dosierung Einfluss auf die COX-2-Hemmung⁵⁴. Mit Celecoxib (Monsanto) und Rofecoxib (Merck) erschienen 1995 die ersten klinisch verwendeten spezifischen COX-2-Hemmer auf dem Markt. Diese Medikamente zeigten in verschiedenen klinischen Studien eine effektive Schmerzlinderung bei verminderter Toxizität für den Magen-Darm-Trakt. Zu diesen Studien gehören die oben bereits erwähnte VIGOR-Studie sowie die „Celecoxib long term arthritis safety study“ (CLASS). Inhalt der CLASS-Studie, in der vom Jahr 1998 bis zum Jahr 2000 7968 Patienten untersucht wurden, war der Vergleich der gastrointestinalen Toxizität des COX-2-Hemmers Celecoxib mit den NSAR Ibuprofen und Diclofenac^{1,6}. Wie oben bereits erwähnt traten im Rahmen der VIGOR-Studie vermehrt Myokardinfarkte auf. In den folgenden Jahren wurden weitere Studien durchgeführt, die die Effektivität der COX-2-Hemmung bei verschiedenen Indikationen, wie der Prävention eines Rezidivs von Kolonpolypen, dem postoperativen Schmerzmanagement oder auch dem Einsatz bei Alzheimer-Demenz prüfen sollten. Bei der „Adenomatous Polyp Prevention on Vioxx“ Studie (APPROVe, 2000-2001), die an 2587 Patienten die Auswirkung des COX-2-Hemmers Rofecoxib auf Rezidive neoplastischer Dickdarmpolypen untersuchte, traten erneut erhöhte Raten thromboembolischer Ereignisse auf^{7,8}. Dies führte zu einem Abbruch der Studie und Merck nahm Rofecoxib weltweit vom Markt. Allerdings erfüllten 38 Prozent aller Patienten, die im Rahmen der VIGOR-Studie einen Myokardinfarkt erlitten, die Kriterien der amerikanischen Zulassungsbehörde (Food and Drug Administration, FDA) für eine Medikation mit niedrig dosierter ASS (Kriterien hierfür sind: stattgefundenen Myokardinfarkt, Angina pectoris, zerebrovaskuläre Ereignisse, transiente ischämische Attacken, Angioplastie oder koronarer Bypass). Nur in dieser Gruppe war ein Unterschied zwischen Naproxen und Rofecoxib bezüglich der Anzahl kardiovaskulärer Ereignisse gegeben. Weitere Studien die als Nebeneffekt vermehrt kardiovaskuläre Ereignisse zeigten waren der „Celecoxib trial for colonic adenoma prevention“⁵⁵, der an 2035 Patienten eine potentiell präventive Wirkung des COX-2-Hemmers Celecoxib auf die Entwicklung kolorektaler Adenome untersuchte und zwei Studien zu einer Medikation mit Valdecoxib und Parecoxib im postoperativen Schmerzmanagement bei koronaren Bypassoperationen (CABG)^{56,57} (Einzelheiten Tabelle 4). Wie oben bereits erwähnt zeigte das NSAR Diclofenac im Rahmen der MEDAL-Studie eine ähnliche Rate kardiovaskulärer Ereignisse unter Diclofenac- und Etoricoxib-Medikation⁹. Die Ursache dieses Effektes wird nun im Folgenden beleuchtet.

1.3.1 Diclofenac

Diclofenac ist ein nicht-steroidales Antiphlogistikum und Analgetikum. Es hemmt die Bildung von Prostanoiden über eine reversible Blockade des Aktivitätszentrums im hydrophoben Kanal der Cyclooxygenasen. NSAR, mit Ausnahme von ASS, hemmen beide Cyclooxygenasen reversibel über eine sterische Blockade des Kanals. Wenn auch allgemein bisher als nicht-selektives Antiphlogistikum angenommen, haben neuere Studien eine bevorzugte Affinität von Diclofenac zur COX-2 gezeigt. In einer randomisierten Fallkontrollstudie von Hinz et al. zeigte Diclofenac, in klinisch gebräuchlicher Dosierung, eine mit 99 Prozent bei einmaliger Gabe und bei erreichtem konstanten Serumspiegel signifikant stärkere Hemmung der COX-2 als eine Medikation mit den spezifischen COX-2-Hemmern Celecoxib (70 %/81 %, Einmal-dosis/Steady State) oder Rofecoxib (56 %/72 %) ⁵⁸. Im Vollblutansatz erreichte Diclofenac in einer therapeutischen Dosierung von 150- 200 mg/die keinen für eine 80%ige Hemmung (IC₈₀) der COX-1 ausreichenden Wirkspiegel. Die COX-2 hingegen wurde schon bei 13- 30fach geringeren Konzentrationen ausreichend gehemmt ⁵⁹. Es hat sich herausgestellt, dass die IC₈₀ direkt mit einer ausreichenden Analgesie korreliert ⁶⁰. Damit kann Diclofenac in einer Dosierung die zu einer befriedigenden Analgesie führt, als spezifischer COX-2-Hemmer betrachtet werden.

1.3.2 Parecoxib

Parecoxib (Dynastat[®], Pfizer) ist die intravenös applizierte Vorstufe des spezifischen COX-2-Hemmers Valdecoxib (Bextra[®], Pfizer). Laut Fachinformationen wird bei intravenöser oder intramuskulärer Applikation die maximale Plasmakonzentration des Parecoxib-Metaboliten Valdecoxib nach 30 Minuten bis zu einer Stunde erreicht. Parecoxib wird mit einer Plasma-halbwertszeit von 22 Minuten in vivo fast vollständig zu Valdecoxib metabolisiert und im Leberstoffwechsel über die P450 Cytochrome (CYP) 3A4, 2C9 und durch CYP unabhängige Glukuronidierung der Sulfonamiduntereinheiten abgebaut. Im oben bereits erwähnten Vollblutansatz zeigte Valdecoxib bei einer therapeutischen Dosierung von 10 mg/die eine 200fach niedrigere Plasmakonzentration als für eine 80%ige Hemmung der COX-1 und eine 2- 4fach niedrigere Konzentration als für eine 80%ige Hemmung der COX-2 notwendig wäre ⁵⁹.

1.4 Prostaganoide und deren Wirkung im Gefäßbett

Wie eingangs bereits erwähnt erfolgt der Umbau von Arachidonsäure zu P_2G_2 im hydrophoben Kanal der COX. Darauf folgend wird durch die Peroxidase aus P_2G_2 P_2H_2 gebildet³¹. P_2H_2 wiederum wird über Synthetasen in die aktiven Metabolite P_2E_2 , $\text{P}_2\text{F}_{2\alpha}$, P_2D_2 , P_2I_2 und TxA_2 umgewandelt (Abb. 2). Die TxS gekoppelt an die COX-1 wurde erstmals in Thrombozyten beschrieben⁶¹. Sie gehört wie die P₂IS zu den Cytochrom P450 Enzymen^{53,62}. Obwohl die TxS in Gegenwart niedriger Level der zytosolischen Phospholipase $\text{A}_{2\alpha}$ (cPLA_{2α}), die Arachidonsäure zur Synthese der Prostaganoide bereitstellt, primär an die COX-2 gekoppelt ist, ist die COX-1 in Zellen, die größere Mengen cPLA_{2α} bereitstellen, wie beispielsweise Thrombozyten, der bevorzugte Interaktionspartner der TxS⁴¹. Das über die thrombozytäre TxS produzierte TxA_2 bewirkt über den thrombozytären Thromboxan A₂ Rezeptor (TP) eine Formveränderung der Thrombozyten und darauf folgend eine Thrombozytenaggregation⁶³. Auf der anderen Seite wird im Sinne eines negativen Feedback-Mechanismus über den TP der glatten Gefäßmuskulatur auch eine Freisetzung von P_2I_2 das antiaggregatorisch und vasodilatierend wirkt hervorgerufen⁶⁴. Des Weiteren bewirkt TxA_2 über Rezeptoren der vaskulären glatten Muskulatur eine Vasokonstriktion^{65,66}, sowie eine Konstriktion anderer mit glatter Muskulatur ausgestatteter Organe wie der Bronchien, der Eingeweide, des Uterus und der Harnblase. In Endothelzellen bewirkt TxA_2 eine Beschleunigung der Expression von Adhäsionsmolekülen wie das intrazelluläre Adhäsionsmolekül-1 (ICAM-1), das vaskuläre Zelladhäsionsmolekül-1 (VCAM-1) und das endotheliale Leukozytenadhäsionsmolekül-1 (ELAM-1)^{67,68}. Sowohl P_2E_2 als auch P_2I_2 tragen hauptsächlich über eine Stimulation von Prostaglandin E Rezeptoren (insbesondere den P_2E_2 -Rezeptor EP3) und Prostazyklinrezeptoren (IP) zur Schleimproduktion des Magens, zu einer verminderten Säuresekretion und reduzierten Pepsinsekretion und damit zum Schutz der Magenschleimhaut bei^{4,5}. Vaskuläre glatte Muskelzellen, Thrombozyten und viele andere Organe verfügen über den Rezeptor für P_2I_2 (IP)⁶⁹⁻⁷². In der Gefäßmuskulatur führt eine Aktivierung des IP zu einer Relaxation und darauf folgend zu einer Vasodilatation. In Thrombozyten bewirkt P_2I_2 über eine G-Protein vermittelte Signalkaskade eine intrazelluläre Hemmung des Signalweges des Thromboxanrezeptors und damit eine verminderte Sekretion von ADP, Serotonin und anderen thrombozytenaktivierenden Mediatoren. Eine Hemmung der Expression des GPIIb/IIIa-Rezeptors und damit eine verminderte Bindung an Fibrinogen wirkt einer Thrombusbildung weiter entgegen⁷³.

1.5 Fragestellungen dieser Arbeit

Zu Beginn dieser Arbeit war durch die klinischen Befunde der VIGOR-Studie bekannt, dass Rofecoxib ein erhöhtes kardiovaskuläres Risiko aufweist. Durch tierexperimentelle Untersuchungen unserer eigenen Arbeitsgruppe war außerdem bekannt, dass unter Coxibtherapie eine verminderte endotheliale Prostazyklinbildung und folgend daraus eine vermehrte arterioläre Thrombozyten-Endothel-Interaktion vorliegt. Weiterhin lagen vereinzelt klinische Studien vor, die ein erhöhtes Atherothromboserisiko auch unter anderen selektiven COX-2-Hemmern und einigen NSAR nahelegten^{6,7,12}. Unklar war, ob es dabei zu einer Verschiebung des Gleichgewichtes zwischen antithrombozytärem PGI₂ und dem eine Thrombozytenaggregation fördernden TxA₂ kommt, wenngleich das mehrfach postuliert worden war und ob dies auch oder eventuell sogar vermehrt unter dem Einfluss entzündlicher Mediatoren der Fall ist.

Daher ergaben sich für unsere Arbeit folgende Fragestellungen:

1. Welche Auswirkungen haben andere klinisch gebräuchliche COX-Hemmer (Parecoxib, Diclofenac) auf die Thrombozyten-Endothel-Interaktion *in vivo*?
2. Besteht ein erhöhtes Atherothromboserisiko unter COX-Hemmung durch Parecoxib und Diclofenac?
3. Welchen Stellenwert hat die Gleichgewichtshypothese der Prostanoiden im Rahmen intraarterieller Thrombogenese unter spezifischer COX-2-Hemmung?
4. Welche Rolle spielen Risikofaktoren wie eine intravasale Entzündung bei der intraarteriellen Thrombogenese?

2. Material und Methoden

2.1 Puffer und Medien

PBS ⁻	Phosphat gepufferte Salzlösung: 160 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,5 mM KH ₂ PO ₄
PBS ⁺	Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS ⁻) mit 0,9 mM Ca ²⁺ und 0,5 mM Mg ²⁺
HMEC-Wachstumsmedium	400 ml M199 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland), 40 ml fetales Kälberserum (FCS, Biochrom, Berlin, Germany), 40 ml Endothelzellwachstumsmedium (Pro- moCell, Heidelberg, Deutschland), 3 ml Streptomycin
HMEC-Hungermedium	400 ml M199, 4 ml FCS, 3 ml Streptomycin
Thrombozyten-Resuspensionspuffer	138 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 12 mM NaHCO ₃ , 0,4 mM NaH ₂ PO ₄ , 1 mM MgCl ₂ , 5 mM D-Glucose, 5 mM HEPES in destilliertem Wasser auf einen pH-Wert von 7,35 eingestellt

2.2 Untersuchung der Thrombozyten-Endothel-Interaktion und der festen Gefäßwandadhäsion in vivo

2.2.1 Versuchstiere und deren Haltung

Alle Tierversuche wurden nach Genehmigung durch die Regierung von Oberbayern nach § 8 Absatz 1 des deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt. Verwendet wurden syrische Goldhamster (*Mesocricetus auratus*) und „Black Six“-Mäuse (*C57BL/6*) beiden Geschlechtes. Die Hamster befanden sich in einer Gewichtsklasse zwischen 80 g und 135 g, die Mäuse zwischen 20 g und 30 g. Die Tiere entstammten größtenteils der eigenen Zucht, wobei die Zuchttiere aus dem Inzuchtstamm der Firma Charles River (Sulzfeld, Deutschland) stammten. Bei Zuchtengpässen wurden sie in der entsprechenden Gewichtsklasse von Charles River zugekauft. Die Tiere hatten freien Zugang zu Wasser und Futter und wurden unter einem jahreszeitlich bedingten Tag-Nacht-Rhythmus bei einer Raumtemperatur von 22- 24 °C gehalten.

2.2.2 Das Modell der Rückenhautkammer zur Beobachtung der Mikrozirkulation in vivo

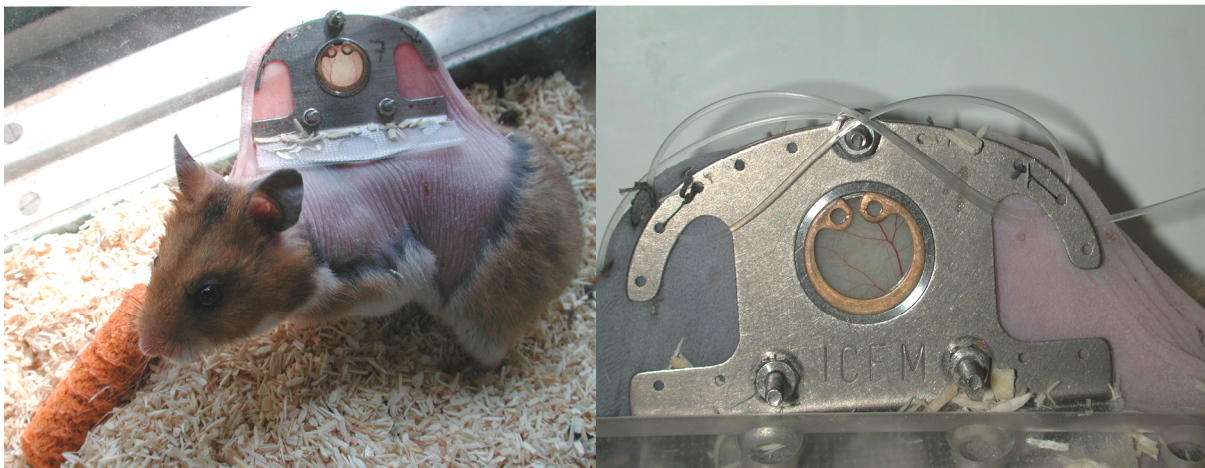


Abb. 3 Die Rückenhautkammer

Links ein von der Rückenhautkammer vollkommen unbeeinträchtigter Hamster, rechts Nahaufnahme der Kammer mit Aufsicht auf die Venen und Arterien der Rückenhaut.

Durch das Aufbringen einer Titankammer auf die Rückenhaut der Versuchstiere können Gefäße direkt beobachtet und unter verschiedenen Bedingungen am lebenden Tier untersucht werden. Dieses Verfahren wurde bereits vielfach zur Untersuchung der Mikrozirkulation in vivo durchgeführt⁷⁴. Verwendet wurden Kammern die in der Werkstatt des Instituts für Chirurgische Forschung des Klinikums der Ludwig-Maximilians-Universität in München hergestellt wurden. Die Kammern bestehen aus zwei Platten, die in der Mitte ein Loch von einem Zentimeter Durchmesser besitzen. Bei dem vorderen Teil der Kammer ist das Loch durch ein Deckglas mit Sprengring verschlossen. Die Blätter der Rückenhautkammer für Hamster ha-

ben eine Breite von 4,8 cm und eine Höhe von 3,8 cm, die für Mäuse eine Breite von 3,5 cm und eine Höhe von 3 cm. Goldhamster besitzen auf dem Rücken zwei symmetrische Nävi. Der Rücken wurde in einem Rechteck, das von den Ohren bis circa einen Zentimeter über die Nävi hinaus und beidseits bis zur Grenze zwischen goldfarbenem Rückenfell und weißem Bauchfell reichte, mit einem Tierlanghaarschneider (Favorita II GT 104, Aesculap, Tuttlingen, Deutschland) rasiert. Anschließend wurde der Rücken mit einer Enthaarungscreme (Pilca Enthaarungscreme, GlaxoSmithKline, München, Deutschland) enthaart. Die Rückenhaut wurde im Gegenlicht so angehoben und die beiden aneinander liegenden Hautareale gegeneinander verschoben, dass die zwei großen Gefäßbäume der Rückenhaut und die Nävi vorerst übereinander lagen. In einem zweiten Schritt wurde die Haut verschoben, bis die Querverzweigungen der vorderen und hinteren Gefäßbäume der hinteren Haut in der Umschlagfalte zu liegen kamen. In dieser Position wurde die Haut mit zwei Fäden rechts und links fixiert und an Schwanenhälsen aufgehängt. Die rückwärtige Hälfte der Rückenhautkammer wurde dann so an der Hautfalte festgenäht, dass das Loch der Kammer circa einen Millimeter vom hinteren Ast des vorderen Gefäßbaumes entfernt zu liegen kam. Mit einer Venenverweilkanüle für Großtiere wurde daraufhin die Haut durchstoßen, die Schrauben der Kammer mittels der Hülse hindurch geführt und mit Bulldog-Klemmen fixiert. Die Lage des durchscheinenden Loches der rückseitigen Kammerhälfte wurde nun auf der Vorderseite mit einem Stift markiert. Für die Präparation wurde das Tier in Seitenlage gebracht und die Haut mit den Fäden über die Tischkante aufgespannt. Die Haut wurde in dem markierten Rund, nach einem oberflächlichen Hautschnitt, stumpf von der darunter liegenden Bindegewebsschicht gelöst und anschließend abpräpariert. In einem zweiten Schritt wurde die nächste Bindegewebsschicht angehoben, mit der Schere in zwei Hälften geteilt und ebenfalls vorsichtig abpräpariert. Die gewünschte Gefäßschicht war nun nur noch von dünnen Häutchen bedeckt. Diese wurden mit der flach aufliegenden Schere abpräpariert. Mit Hilfe von Präpariersaugern wurde überprüft, ob sich noch Gewebe über der Gefäßschicht befand. Nun wurden die Bulldog-Klemmen entfernt und der vordere Teil der Kammer mit Muttern an den Schrauben der hinteren Kammerhälfte befestigt. Die frei präparierte Gefäßschicht legte sich flach an das Glas der Vorderseite an. Der vordere Kammerteil wurde an der Haut der Umschlagfalte und dem hinteren Teil der Kammer festgenäht. Bei Mäusen erfolgte die Präparation analog der Präparation beim Hamster. Die Präparation erfolgte zwei Tage vor der Versuchsdurchführung um ein Abklingen einer eventuell durch die Operation verursachten ödematösen Irritation der gefäßführenden Schicht zu ermöglichen.

2.2.3 Legen des zentralen Venenkatheters in die Vena jugularis

Das Legen des zentralen Venenkatheters erfolgte am ersten Tag nach Präparation der Rückenhautkammer. Für die Hamster wurde ein 25 cm langer Silikonschlauch (Omnilab, München, Deutschland) vorbereitet der an einem Ende mit zwei Markierungen von je circa einem Zentimeter Länge versehen wurde. Dieser wurde auf eine 27 Gauge-Kanüle (Becton, Dickinson and Company, Heidelberg, Deutschland) einer mit NaCl-Lösung (0,9 %) gefüllten einen Milliliter fassenden Spritze (Becton, Dickinson and Company, Heidelberg, Deutschland) aufgezogen und entlüftet. Der Hals der Tiere wurde ventral rasiert. Das Tier wurde in Rückenlage so auf zwei Plexiglasblöcken von vier Zentimetern Höhe gelagert, dass die Kammer zwischen diesen zu liegen kam. Der Kopf des Tieres zeigte zum Präparator. Für die Mäuse war ein spezieller Tisch mit einem Schlitz angefertigt worden, in den die Kammer so eingefädelt wurde, dass die Mäuse flach auf dem Rücken liegen konnten. Der Katheter musste über einer Flamme an einem Ende auf circa sieben Millimetern Länge dünner gezogen werden um später in die Vena jugularis der Mäuse inseriert werden zu können. Die restliche Vorbereitung entsprach der bei den Hamstern. Nach der entsprechenden Lagerung wurde der Hals leicht überstreckt und die Haut wurde unter Spannung auf der rechten Halsseite mit einem Skalpell eingeschnitten. Nun wurde die Haut mit einer geraden Schere von rechts nach links vorsichtig untertunnelt. Entlang dieses Weges wurde die Venenverweilkanüle bis zur Oberkante der Hautfalte vor der Kammer vorgeschoben und durch die Haut ausgestochen. Durch die Kanülenhülse wurde der Silikonkatheter hindurch gefädelt und auf der linken Seite des Tieres auf dem Operationstuch befestigt. Mit der Schere wurde nun stumpf auf der rechten Halsseite durch den Schnitt in die Tiefe bis zur Vena jugularis präpariert. Die Vena jugularis wurde ganz frei präpariert und über eine leicht geöffnete Schere gelegt. Die Vene wurde durch eine Mikroklemme (5 mm Branchenlänge für Hamster, 4,5 mm für Mäuse) an ihrem kaudalen Ende im Bereich der Vena jugularis communis abgeklemmt. Drei Fäden von circa vier Zentimetern Länge wurden nun in einem nicht zugezogenen einfachen Knoten locker um die Vene herum gelegt. Der am weitesten kranial gelegene Knoten wurde zugezogen und die Vena jugularis communis zwischen dem zugezogenen Knoten und der Mikroklemme mit einer Mikroschere eingeschnitten. Nach nochmaligem Entlüften wurde der Katheter in die Vene eingeführt und mit dem mittleren Knoten lose befestigt. Die Mikroklemme wurde gelöst und der Katheter unter Spannung der Vene vorgeschoben, bis die zweite Markierung gerade verschwunden war. Bei den Mäusen wurde der Katheter circa fünf Millimeter inseriert. Durch Aspiration und anschließender Spülung mit 0,9%iger NaCl-Lösung wurde die korrekte Lage des Katheters überprüft. Nach Insertion des Katheters wurden die vorgelegten Fäden festge-

zogen. Die Haut des Halses wurde mit Einzelknopfnähten verschlossen. Der Katheter wurde an der Austrittsstelle am Rücken zu einem Teil unter die Haut zurückgeschoben um ihn spannungsfrei zu halten. Der übrige Teil wurde kurz vor der Kammer mittels Naht fixiert. Das offene Ende wurde verknotet und durch Abschmelzen des Endes zusätzlich verschlossen um eine Belüftung oder ein Zurücklaufen von Blut durch einen etwaigen Unterdruck zu verhindern. Abschließend wurde der Katheter schlaufenförmig an der Kammer mit Omnifilm (Hartmann AG, Heidenheim, Deutschland) befestigt. Der Katheter wurde spätestens am Vortag des Versuches gelegt, damit die Tiere am Versuchstag von der Narkose unbeeinflusst waren. Die Tiere tolerierten sowohl die Narkose, als auch Kammer und Katheter gut. Sie zeigten keinerlei Zeichen einer Beeinträchtigung. Alle Fäden, Nadeln und Präpariertupfer stammten von der Firma Fine Science Tools (F.S.T., Heidelberg, Deutschland). Die Präparationsinstrumente und Klemmen wurden von F.S.T. und Medicon (Tuttlingen, Deutschland), die verwendeten Spritzen und Kanülen von Becton, Dickinson and Company (Heidelberg, Niederlassung Deutschland) bezogen.

2.2.4 Narkose der Tiere

Die Hamster wurden zur Präparation der Rückenhautkammer und dem Legen des Jugulariskatheters mittels intraperitonealer Injektion einer Mischung aus 1000 µl Ketanest (Konzentration 5 mg/ml, Ketanest[®] S, Pfizer Pharma GmbH, Berlin, Deutschland), 600 µl Xylazin (Konzentration 20 mg/ml, Rompun[®], Bayer HealthCare, Leverkusen, Deutschland) und 1000 µl 0,9%iger NaCl-Lösung (BBraun, Melsungen, Deutschland) narkotisiert. Einem 70 g schweren Hamster wurden davon 250 µl verabreicht. Die Narkose dauerte circa eine Stunde an und war somit für die Dauer der Präparation von einer dreiviertel Stunde ausreichend. In Ausnahmefällen wurden bei Bedarf 50 µl der Narkosemischung nachinjiziert oder die Narkose wurde durch Sevofluran per inhalationem aufrechterhalten. Für die Mausnarkose wurde eine Mischung aus 160 µl Fentanyl (Konzentration 0,05 mg/ml, CuraMED[®] Pharma GmbH, Karlsruhe, Deutschland), 800 µl Midazolam (Konzentration 1 mg/ml, Ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland), 80 µl Medetomidinhydrochlorid (1 mg/ml, Domitor[®], Orion Pharma Corporation, Espoo, Finnland) und 2960 µl 0,9%iger NaCl-Lösung hergestellt. Von dieser Mischung wurden den Tieren 15 µl/g Körpergewicht (KG) intraperitoneal appliziert. Um ein Austrocknen der Augen während der Narkose zu vermeiden, wurden diese mit Bepanthen[®] Augen- und Nasensalbe (Bayer HealthCare, Leverkusen, Deutschland) abgedeckt.

2.2.5 Intravitalmikroskopie (IVM)

Der Arbeitsplatz für die intravitalmikroskopischen Untersuchungen bestand aus einem Mikroskop mit Durchlichtbeleuchtung (Zeiss AxioTech Vario, Firma Zeiss, Göttingen, Deutschland), einer Kaltlichtquelle (Zeiss, Göttingen, Deutschland), einer auf dem Mikroskop aufgesetzten Kamera mit einer Bildfrequenz von 14,5 Bildern pro Sekunde (Modell C8484, Hamamatsu, Herrsching, Deutschland) und einem mit dieser Kamera verbundenen Computer. Der Mikroskopiertisch und die Anordnung der Objektive wurden hierfür in einer Sonderanfertigung der Firma Zeiss geliefert. Die Tiere lagen in einer mit Luftlöchern versehenen Plexiglasröhre mit einem Durchmesser von 3,8 cm für Hamster und 2,4 cm für Mäuse (Eigenbau der institutseigenen Werkstatt), die am hinteren Ende mit einer ebenfalls mit Löchern versehenen Plexiglasplatte verschlossen wurde. Die Tiere schlüpfen selbst in die Röhren und zeigten auch in diesen keine Anzeichen von Angst. An der Oberseite der Röhre befand sich ein Schlitz durch den die Kammer hinausragte. Die Kammer wurde auf einem Aufsatz (Eigenbau der institutseigenen Werkstatt) auf dem Mikroskopiertisch fixiert und konnte so in gewünschter Position unter das Objektiv verbracht werden. Der Katheter wurde mit einer einen Milliliter fassenden Spritze mit aufgesetzter 27 Gauge-Kanüle, die zum Spülen des Katheters mit NaCl-Lösung (0,9 %) gefüllt war, versehen. Die intravitalmikroskopischen Untersuchungen erfolgten dann am wachen, nicht narkotisierten Tier.

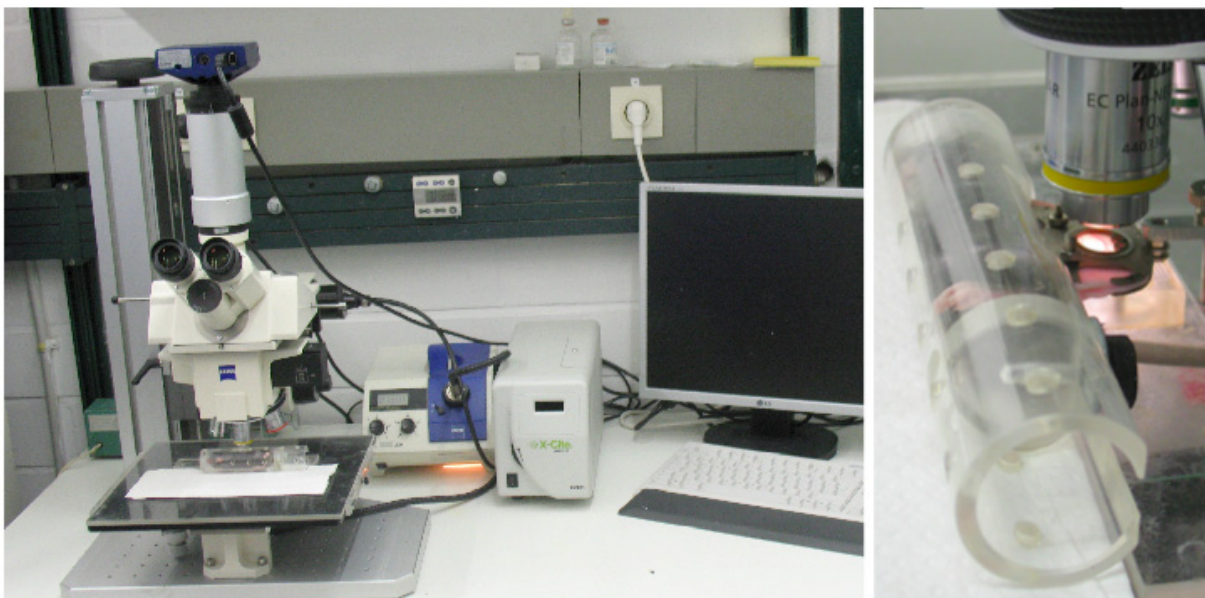


Abb. 4 Das Intravitalmikroskop

Links der Apparateaufbau für die Intravitalmikroskopie (Intravitalmikroskop mit aufgesetzter Kamera, Lichtquelle und Rechner für die Aufnahme und Übertragung der Kamerabilder), rechts eine Nahaufnahme einer Maus in einer Plexiglasröhre, deren Kammer für die Aufnahmen auf dem Tisch fixiert wurde (Bilder mit freundlicher Genehmigung von N. Hellwig)

2.2.6 Beurteilung der Thrombozyten-Endothel-Interaktion

2.2.6.1 Isolation der Thrombozyten

Für die Messungen des Thrombozytenverhaltens *in vivo* wurden menschliche Thrombozyten aus dem Vollblut gesunder, freiwilliger Spender, die zuvor mindestens eine Woche keine Medikamente eingenommen hatten, gewonnen. Die Spender wurden vor der Blutentnahme über den wissenschaftlichen Gebrauch des Blutes aufgeklärt und stimmten dem schriftlich zu. Pro Versuch wurden 40 ml Vollblut, versetzt mit zehnpromzentigem Natriumcitrat (0,106 mol/L), verteilt auf sechs Zentrifugenröhrchen (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) bei 1300 Umdrehungen pro Minute (U/min) in einer Megafuge 1.0 R Zentrifuge (DJB Labcare Ltd, Newport Pagnell, England) bei ausgeschalteter Bremse, um ein Aufwirbeln des so genannten „buffy coats“ aus Leukozyten und Thrombozyten durch das Bremsen zu verhindern, über 15 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde der thrombozytenreiche Überstand (PRP= platelet rich plasma) mit einer Einmal-Plastikpipette vorsichtig abgenommen. Dies ergab circa 20 ml PRP. Um die Thrombozytenaktivierung während der Waschschrirte und der Färbung zu hemmen wurde ein Mikroliter Iloprost (Konzentration 10 µg/ml, Ilomedin[®], Bayer HealthCare Pharmaceuticals, Berlin, Deutschland) je 10 ml PRP hinzugefügt. Das PRP wurde auf vier der oben erwähnten Reagenzröhrchen verteilt und bei 1500 U/min (Heraeus Megafuge 1.0 R, DJB Labcare Ltd, Newport Pagnell, England) 10 Minuten, diesmal mit eingeschalteter Bremse zentrifugiert. Die Thrombozyten befanden sich nun, als so genanntes „Pellet“ gesammelt, im unteren Teil der Zentrifugenröhrchen. Der Überstand der nur wenige Thrombozyten enthielt (platelet poor plasma, PPP) wurde wiederum vorsichtig abgenommen. Die Thrombozyten selbst wurden nun in insgesamt einem Milliliter PPP vorsichtig resuspendiert. Die Thrombozytensuspension wurde mit weiteren drei Millilitern PPP verdünnt und zur Fluoreszenzfärbung mit 20 µl Calcein AM (Konzentration 100 µg/ml, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) und einem Mikroliter Iloprost (Konzentration 10 µg/ml) versetzt. Es erfolgte eine Inkubation bei Raumtemperatur in Dunkelheit über 30 Minuten. Die Suspension wurde auf vier Zentrifugenröhrchen verteilt, jeweils mit zwei Millilitern PPP verdünnt und bei 1500 U/min (Megafuge 1.0R) über 10 Minuten zentrifugiert. Die abzentrifugierten Thrombozyten wurden nach Abnahme des Überstandes mit einem Milliliter Thrombozyten-Resuspensionspuffer (Zusammensetzung siehe Tabelle) resuspendiert und die Lösung auf eine Konzentration von 200.000/µl eingestellt. Bis zur Injektion im Rahmen des folgenden Versuches wurde die Suspension in Dunkelheit bei Raumtemperatur aufbewahrt. Die isolierten und fluoreszenzgefärb-

ten Thrombozyten wurden innerhalb von maximal 30 Minuten nach Färbung im Versuch verwandt.

2.2.6.2 Versuchsanordnung

Alle Reagenzien wurden vor den intravitalmikroskopischen Aufnahmen verabreicht. Parecoxib und TNF α wurden intravenös, Diclofenac intraperitoneal appliziert. Die applizierten Medikamentendosen und Inkubationszeiten wurden analog zu den in vitro Dosierungen bei einem Milliliter Medium (siehe unten) auf ein geschätztes Blutvolumen von zehn Millilitern bei einem 100 g schweren Tier berechnet. Sie betragen für Parecoxib 1 mg/kg KG, injiziert vierhalb Stunden vor den Aufnahmen, für Diclofenac 1 mg/kg KG, injiziert eine Stunde vor den Aufnahmen und für TNF α 0,5 μ g/kg KG, injiziert vier Stunden vor den Aufnahmen. Nach Injektion und Inkubation der Tiere mit den entsprechenden Medikamenten und/ oder TNF α wurden die Tiere in der oben erwähnten Plexiglasröhre auf dem Mikroskopiertisch fixiert. Circa eine Minute vor einer Aufnahme wurden 50 μ l der Thrombozytensuspension über den Katheter injiziert. Es wurden pro Tier 5- 8 Aufnahmen von je 30 Sekunden Länge gemacht.

2.2.6.3 Klassifizierung von rollenden und fest adhärenen Thrombozyten

Ausgewertet wurden 100 Thrombozyten pro Filmsequenz, wobei alle zehn Bilder gemessen wurde. Die Flussgeschwindigkeit einzelner Thrombozyten wurde aus der Länge der Thrombozytenspur pro Einzelbild und der Expositionszeit von 0,069539 Sekunden bei Aufnahme jedes einzelnen Bildes errechnet. Die Zahl der Thrombozyten pro Geschwindigkeitseinheit wurde prozentual zu allen gemessenen Thrombozyten gesetzt. Die Anzahl der Thrombozyten in den unteren fünf Prozent der Geschwindigkeitsverteilung errechneten sich relativ zum schnellsten Thrombozyten pro Einzelgefäß und wurden dann wiederum zu der Gesamtzahl ins Verhältnis gesetzt. Als fest adhären an der Gefäßwand galten Thrombozyten die sich über mindestens 30 Sekunden nicht von der Stelle bewegten. Die Zahl fest adhärenen Thrombozyten wurde in Bezug zur beobachteten Gefäßfläche gesetzt. Gefäße mit unregelmäßigem Fluss wurden von der Auswertung ausgeschlossen.

2.2.6.4 Gefäßverschlusszeit

Um den Einfluss veränderter Eicosanoidspiegel im Blut und deren aktivierende Wirkung auf Thrombozyten in Hinblick auf eine akute Atherothrombose weiter zu untersuchen wurde die Zeit von einer traumatischen Gefäßwandverletzung bis zum vollständigen thrombotischen

Gefäßverschluss gemessen. Über den Katheter wurden den Tieren 50 µl einer fünfprozentigen FITC-Dextranlösung (Fluorescein-Isothiocyanat gelabelte Dextranlösung, MW 150.000, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland) injiziert. Auf die vom Deckglas befreite Kammer wurden 30 µl einer FeCl₃-Lösung (Konzentration 25 mmol/L) an einer vorher bestimmten Stelle einer Arterie pipettiert und die Zeit bis zum vollständigen Sistieren des Flusses in dieser Arterie gemessen. Die Thrombozyten-Endothel-Interaktion im Gefäßverschluss wurde mittels Calcein-gefärbter Thrombozyten im Rückenhautkammermodell in „Black Six“-Mäusen weiter untersucht. Ob die Gleichgewichtstheorie der Eicosanoide ursächlich für einen beschleunigten Gefäßverschluss nach traumatischer Gefäßwandverletzung unter Cyclooxygenasehemmung ist, wurde durch eine 15-minütige intravenöse Perfusion mit dem klinisch verwendeten Prostazyklinanalogon Iloprost in einer Dosierung von 2 ng/kg KG/min überprüft.

2.3 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Die Menge an 6-keto-PGF_{1α} und TxB₂, als Abbauprodukte von PGI₂ und TxA₂, wurde im Serum der Versuchstiere mittels eines kommerziell erhältlichen Immunoassay-Kits (ELISA, Assay designs, Ann Arbor, USA) gemäß den Herstellerangaben gemessen. Die Blutentnahme zur Gewinnung der Seren der Versuchstiere erfolgte mittels Herzpunktion von subxiphoidal in Richtung der linken Klavikula unter Palpation des Herzschlages mit der fixierenden Hand. In der Spritze war ein Mikroliter Indomethacin (20 mM, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland) pro Milliliter Vollblut vorgelegt, um die Tätigkeit der COX der Blutzellen zum Zeitpunkt der Blutentnahme zu stoppen. Nach 30 Minuten Gerinnungszeit wurden die Proben bei 1000 g (1 g (g= Erdbeschleunigung) = 9,81 m/s²) zwei Minuten abzentrifugiert und der Serumüberstand vorsichtig abgenommen. Die Proben wurden bei -80 °C bis zur Durchführung der ELISA-Messungen aufbewahrt. Für die reinen Blutabnahmen erfolgte keine Rückenhautkammerpräparation und Katheterimplantation um die Tiere möglichst wenig zu beanspruchen. Die Applikation aller Substanzen erfolgte hier intraperitoneal. Von einer Blutentnahme nach Durchführung der Intravitalmikroskopie wurde abgesehen, da sich hier zu unterschiedliche Zeiten ergeben hätten und die Proben durch die injizierten Thrombozyten und FITC-Dextran verfälscht worden wären.

2.4 Detektion von β_3 -Integrin auf humanen mikrovaskulären Endothelzellen

2.4.1 Zellkultur

Verwendet wurden humane mikrovaskuläre Endothelzellen (HMEC), die von Ades et al. zur Verfügung gestellt wurden⁷⁵. Sie wurden in HMEC-Kulturmedium (s.o.) in Six-Well-Kulturschalen bei 37 °C und fünf Prozent CO₂ im Inkubator kultiviert. Das Kulturmedium wurde alle zwei Tage ausgetauscht und die Zellen bei Konfluenz, nach Waschen mit PBS⁺ und Ablösen mit Trypsin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland), in Kulturmedium auf frische Zellkulturplatten eins zu zwei verteilt. 24 Stunden vor Versuchsdurchführung wurden die Zellen mit PBS⁺ gewaschen und ein Milliliter Hungermedium (s.o.) aufgebracht.

2.4.2 Versuchsansätze und FACS-Messungen

Jeweils drei Schalen wurden mit 10 µg/ml Diclofenac (Diclofenac-ratiopharm[®] SF, Ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland) eine Stunde und mit 10 µg/ml Parecoxib (Dynastat[®], Firma Pfizer, Berlin, Deutschland) viereinhalb Stunden inkubiert. Analog wurde mit 5 ng/ml TNF α (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland) vier Stunden allein oder in Kombination mit Diclofenac oder Parecoxib in oben genannten Konzentrationen und Inkubationszeiten behandelt. Anschließend wurden die Zellen mit PBS⁻ gewaschen und mit 300 µl Accutase[®] (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland) abgelöst. Die Zellen wurden in ein 1,5 Milliliter fassendes Eppendorfgefäß aufgenommen und mit einer Tischzentrifuge abzentrifugiert (2000 U/min, 3 min). Der Überstand wurde abgenommen und die Zellen in 100 µl FACSFlow-Puffer resuspendiert. Nun wurden die Zellen mit vier Mikrolitern CD61-FITC Antikörper (AbD Serotec, Oxford, Großbritannien) 15 Minuten bei Raumtemperatur gefärbt, erneut abzentrifugiert und in 600 µl FACSFlow-Puffer resuspendiert. Der Anteil der fluoreszenzmarkierten und damit Integrin-tragenden Zellen wurde nun unverzüglich im FACScan-Durchflusszytometer gemessen. Die erhobenen Daten wurden mit der Software CellQuest[™] ausgewertet. Das FACScan-Durchflusszytometer, der FACSFlow-Puffer und die Auswertungssoftware CellQuest[™] stammten von Becton, Dickinson and Company (Heidelberg, Niederlassung Deutschland).

2.5 Software

Zur Aufzeichnung und Auswertung der intravitalmikroskopischen Filme wurde das Programm Simple PCI (Version 5.3.1, Compix Inc. Sewickley, USA) verwendet. Jegliche Graphiken wurden mit Sigma Plot (Version 10.0, Systat Software GmbH, Erkrath, Deutschland) erstellt. Die Statistiken wurden mit Sigmastat (ebenfalls Systat Software GmbH) berechnet.

2.6 Statistik

Zur Beschreibung der nicht normalverteilten, in Histogrammen dargestellten Geschwindigkeitsverteilungen wird im Ergebnisteil der Median aller Messungen angegeben. Die Verteilung dieser Geschwindigkeiten wurde mit Hilfe des Kruskal-Wallis-Tests, mit einer post-hoc-Korrektur für multiple Vergleiche nach Dunn, analysiert. Alle anderen Ergebnisse werden als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben und in den Abbildungen als Mittelwert \pm Standardfehler dargestellt. Kontinuierliche, normalverteilte Variablen wurden mittels des „Student's t-test“ analysiert, nicht normalverteilte, kontinuierliche Variablen mittels des Wilcoxon-Rangsummentests. Vergleiche von kontinuierlichen, normalverteilten Variablen mehrerer Gruppen untereinander wurden mittels einseitiger Varianzanalyse (ANOVA), gefolgt von einer post-hoc-Korrektur für Mehrfachtestungen nach Dunn analysiert. Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ wurde eine statistische Signifikanz angenommen.

3. Ergebnisse

3.1 Die Wirkung einer Hemmung der COX-2 auf die Thrombozyten-Endothel-Interaktion in vivo

Zunächst wurde untersucht, inwieweit Diclofenac die Thrombozyten-Endothel-Interaktion eine Stunde nach intraperitonealer Injektion beeinflusst. Hierbei fand sich eine signifikant erhöhte Interaktion zwischen den injizierten Thrombozyten und der Gefäßwand. Dies zeigt sich in Histogrammen der Geschwindigkeitsverteilung durch eine Linksverschiebung hin zu langsameren Geschwindigkeiten verglichen mit den Geschwindigkeitsverteilungen unbehandelter Tiere. Die mediane Thrombozyten-Flussgeschwindigkeit betrug in Kontrollexperimenten 0,901 mm/s (n= 3549 Thrombozyten, 7 verschiedene Tiere, Streuungsbreite: 0,035- 4,499 mm/s) und unter Diclofenacmedikation 0,652 mm/s (n= 3453 Thrombozyten, 7 verschiedene Tiere, Streuungsbreite: 0,023- 4,368 mm/s). Eine Behandlung mit TNF α verlangsamte die Thrombozyten auf 0,589 mm/s (n= 3033 Thrombozyten, 6 verschiedene Tiere, Streuungsbreite: 0,035- 3,82 mm/s). Eine kombinierte Gabe von Diclofenac und TNF α führte zu einer noch weiter verstärkten Thrombozyten-Endothel-Interaktion, was sich in einer medianen Geschwindigkeitsreduktion auf 0,511 mm/s (n= 3039 Thrombozyten, 6 verschiedene Tiere, Streuungsbreite: 0,023- 4,300 mm/s, Abb. 3) äußerte. Viereinhalb Stunden vor den intravitalmikroskopischen Aufnahmen intravenös appliziertes Parecoxib führte intravaskulär, ähnlich wie Diclofenac, vermehrt zu Thrombozyten-Endothel-Interaktionen. Auch hier kam es zu einer Verlangsamung der Thrombozytengeschwindigkeiten. Die mediane Geschwindigkeit betrug für Parecoxib 0,677 mm/s (n= 3122 Thrombozyten, 6 verschiedene Tiere, Streuungsbreite 0,023- 3,538 mm/s). In der Kombination von Parecoxib mit TNF α ergab sich ein medianer Wert von 0,563 mm/s (n= 2926 Thrombozyten, 6 verschiedene Tiere, Streuungsbreite 0,023- 3,594 mm/s). Gegenübergestellt wurden diesen Tieren die oben erwähnten Kontroll- und mit TNF α behandelten Tiere (mediane Geschwindigkeiten: Kontrolle 0,901 mm/s, TNF α 0,589 mm/s). (Histogramme der Daten Abb. 5)

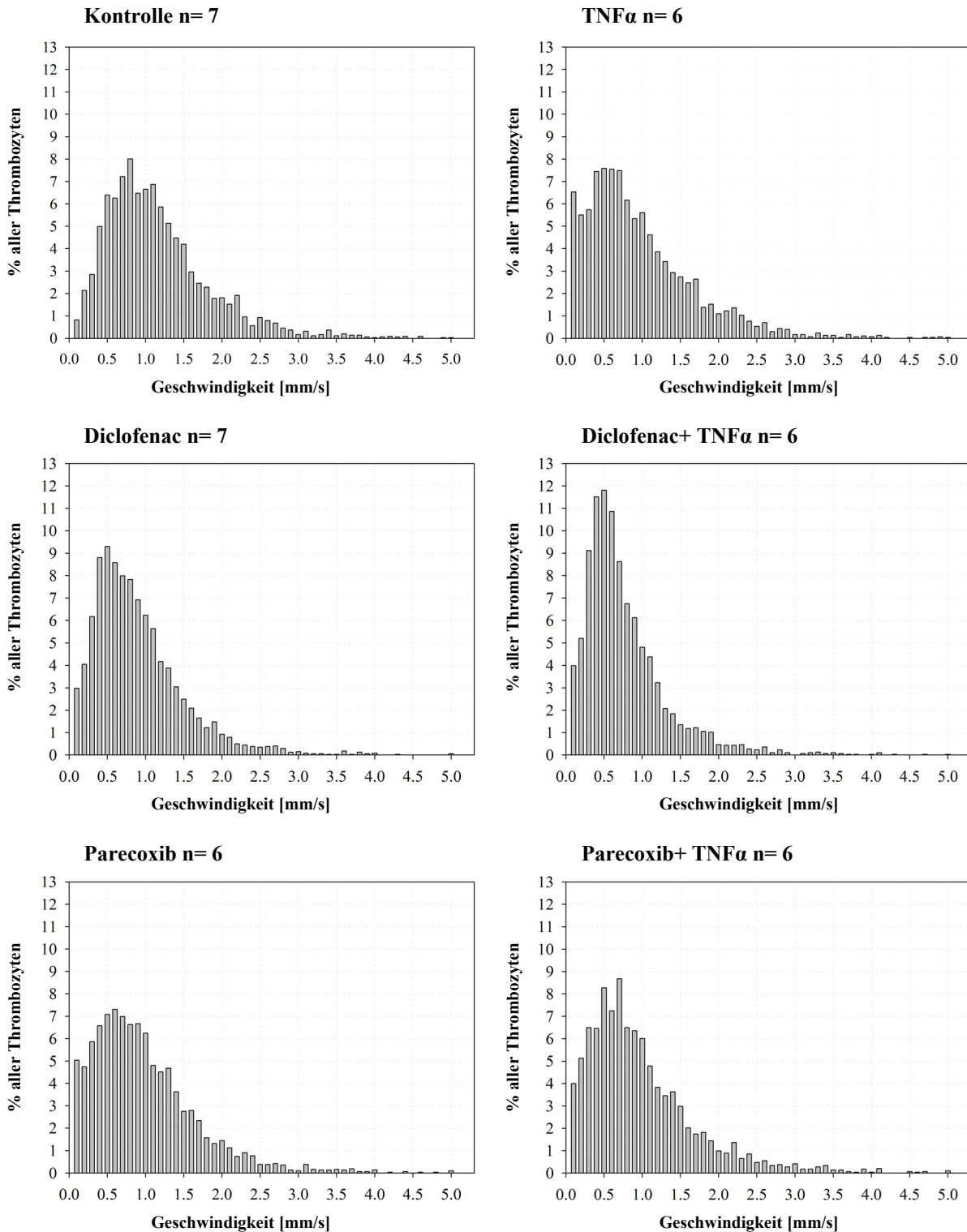


Abb. 5 Die Interaktion von Thrombozyten mit dem Endothel wird durch TNF α , Diclofenac, Parecoxib und einer Kombination aus COX-2-Inhibitoren und TNF α verstärkt

Diclofenac (1 mg/kg KG) und Parecoxib (1 mg/kg KG) verstärkten die Thrombozyten-Endothel-Interaktion in vivo verglichen mit den Kontrolltieren, TNF α (0,5 μ g/kg KG) hatte einen der Coxibwirkung vergleichbaren Effekt. Eine kombinierte Gabe von COX-2-Inhibitoren und TNF α zeigte keine additiven Effekte im Sinne einer weiter verstärkten Thrombozyten-Endothel-Interaktion.

Bei den Kontrolltieren interagierten $0,96 \pm 0,16$ % aller Thrombozyten ($n= 3549$ Thrombozyten, 36 Gefäße in 7 verschiedenen Tieren) im Sinne eines an der Gefäßwand „Entlangrollens“ (im Folgenden als „Roller“ bezeichnet) mit dem Endothel. Nach Applikation von $\text{TNF}\alpha$ stieg dieser Wert signifikant auf $5,3 \pm 0,79$ % ($n= 3033$ Thrombozyten, 32 Gefäße in 6 verschiedenen Tieren, $p= 0,001$ vs. Kontrolle). Unter Diclofenacmedikation kam es zu einer Zunahme der Roller auf $3,09 \pm 0,84$ % ($n= 3453$ Thrombozyten, 34 Gefäße in 7 unterschiedlichen Tieren, $p < 0,01$ vs. Kontrolle). Die Kombination von $\text{TNF}\alpha$ und Diclofenac führte zu einem Anstieg auf $2,62 \pm 0,53$ % aller Thrombozyten ($n= 3039$ Thrombozyten, 31 Gefäße in 6 Tieren, $p < 0,01$ vs. Kontrolle). Der Effekt des $\text{TNF}\alpha$ auf das Rollen der Thrombozyten wurde durch Diclofenac vollständig aufgehoben ($p < 0,05$ vs. $\text{TNF}\alpha$, alle Daten Abb. 6). Auch Parecoxib führte, mit Rollerzahlen von $6,49 \pm 2,29$ % aller Thrombozyten zu einem signifikantem Anstieg rollender Thrombozyten verglichen mit den Kontrolltieren ($n= 3122$ Thrombozyten, 30 Gefäße in 6 Tieren, $p= 0,001$). In der Kombination von Parecoxib und $\text{TNF}\alpha$ war sowohl gegenüber $\text{TNF}\alpha$ allein, als auch gegenüber den Kontrollen und Parecoxib allein kein signifikanter Unterschied mehr erkennbar ($n= 2926$ Thrombozyten, 30 Gefäße in 6 verschiedenen Tieren). Die Zahl der fest an der Gefäßwand adhärenen Thrombozyten war tendenziell, wengleich auch nicht signifikant, höher unter Diclofenacmedikation im Vergleich zu den Kontrolltieren. In den Kontrollen fanden sich $3,0 \pm 2,1$ fest adhärenen Thrombozyten/ mm^2 (Analyse von 35 Gefäßen in 7 verschiedenen Tieren). Diclofenac erhöhte diese Zahl auf $8,8 \pm 3,7$ fest adhärenen Thrombozyten/ mm^2 (31 Gefäße, 6 Tiere). Eine intraperitoneale Applikation von $\text{TNF}\alpha$, vier Stunden vor den Messungen, hingegen induzierte eine feste Adhärenz von $45,7 \pm 15,7$ Thrombozyten/ mm^2 (30 Gefäße, 6 Tiere, $p < 0,01$ vs. Kontrolle). Eine zusätzliche Medikation mit Diclofenac verminderte die durch $\text{TNF}\alpha$ stark erhöhte Adhäsion. Diese Reduktion des Effektes von $\text{TNF}\alpha$ durch Diclofenac war nicht signifikant im Vergleich mit $\text{TNF}\alpha$ allein. Im Vergleich mit den Kontrollen war die Zahl fest adhärenen Thrombozyten jedoch weiterhin signifikant erhöht. Es ergaben sich Werte von $17,8 \pm 7,1$ fest adhärenen Thrombozyten/ mm^2 (30 Gefäße, 6 Tiere, $p < 0,05$ vs. Kontrolle, nicht signifikant vs. $\text{TNF}\alpha$, alle Daten Abb. 7). Parecoxib führte mit $14,1 \pm 5,5$ Thrombozyten/ mm^2 zu einer signifikant höheren Zahl fest an der Gefäßwand adhärenen Thrombozyten ($n= 30$ Gefäße in 6 verschiedenen Tieren, $p < 0,05$ vs. Kontrolle) verglichen mit den Kontrolltieren. In Kombination mit $\text{TNF}\alpha$ kam es zu einem weiteren wenn auch gegenüber Parecoxib allein nicht signifikanten Anstieg auf $25,0 \pm 8,9$ Thrombozyten/ mm^2 ($n= 29$ Gefäße in 6 Tieren, $p < 0,05$ vs. Kontrolle). Gegenüber $\text{TNF}\alpha$ verminderte sich die feste Adhärenz tendenziell.

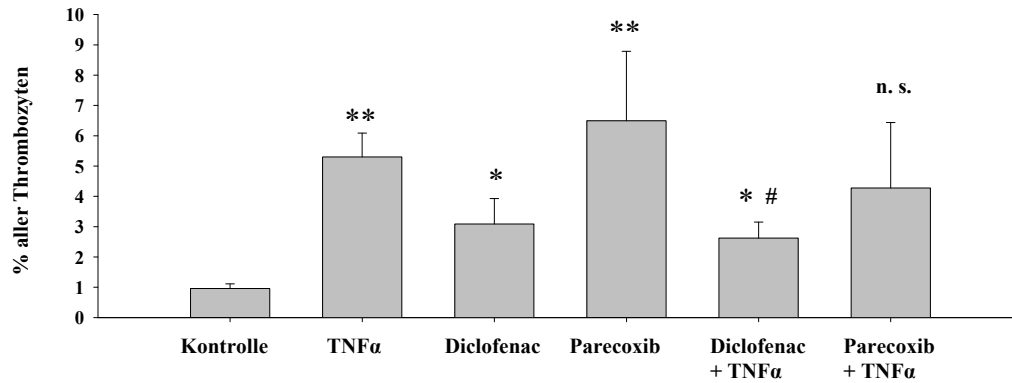


Abb. 6 Die Zahl der an der Gefäßwand entlang rollenden Thrombozyten wird durch TNF α , Diclofenac und Parecoxib erhöht

Es fanden sich signifikant mehr an der Gefäßwand entlang rollende Thrombozyten unter Diclofenac- (1 mg/kg KG, 34 Gefäße in sieben Tieren) und Parecoxibmedikation (1 mg/kg KG, 30 Gefäße in sechs Tieren) und nach Applikation von TNF α (0,5 μ g/kg KG, 32 Gefäße in sechs Tieren) verglichen mit der Kontrollgruppe (36 Gefäße in sechs Tieren). Diclofenac verhinderte den Effekt des TNF α und führte zu keiner weiteren Steigerung (31 Gefäße in sechs Tieren). Eine Kombination von Parecoxib und TNF α führte nur tendenziell zu erhöhten Rollerzahlen (30 Gefäße in sechs Tieren).

Signifikant vs. Kontrolle: ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$; Signifikant vs. TNF α : # $p < 0,05$

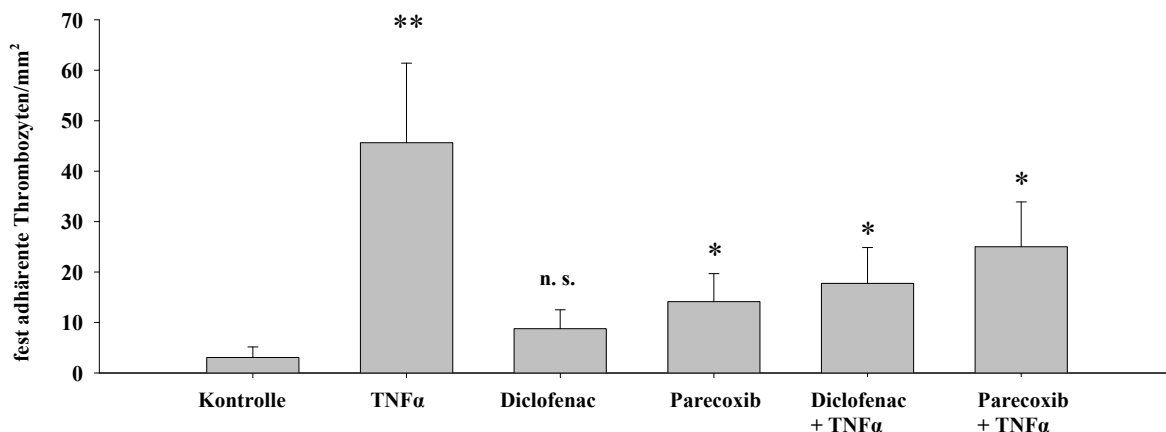


Abb. 7 TNF α und Parecoxib verstärken eine feste Thrombozytenadhäsion an die Gefäßwand

Diclofenac (1 mg/kg KG, 31 Gefäße in sechs Tieren) allein bewirkte im Vergleich zu den Kontrollen (35 Gefäße in sieben Tieren) eine leichte, nicht signifikante Erhöhung der Zahl fest adhäreneter Thrombozyten. Eine Medikation mit Parecoxib (1 mg/kg KG, 30 Gefäße in sechs Tieren) führte zu signifikant mehr fest an der Gefäßwand adhäreneten Thrombozyten. Dies war auch nach TNF α -Applikation der Fall (0,5 μ g/kg KG, 30 Gefäße in sechs Tieren). Diclofenac verhinderte den Effekt des TNF α (30 Gefäße in sechs Tieren). Der adhäsionsfördernde Effekt des TNF α wurde durch Parecoxib (29 Gefäße in sechs Tieren), wenn auch nicht signifikant gegenüber TNF α allein, vermindert. Gegenüber den Kontrollen blieb eine signifikante Erhöhung der Adhärenz bestehen. Insgesamt war die Zahl fest adhäreneter Thrombozyten niedrig.

Signifikant vs. Kontrolle: ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$

Um zu überprüfen, ob die beobachtete Thrombozyten-Endothel-Interaktion unter Diclofenacmedikation auch in anderen Spezies auftritt, wurden die Versuche zusätzlich mit „Black Six“-Mäusen durchgeführt. Hier wurde speziell die Thrombozyten-Endothel-Interaktion im traumatischen Gefäßverschluss untersucht. Der Median der Geschwindigkeiten lag in diesen Versuchen bei den Kontrollen bei $0,913 \pm 0,03$ mm/s ($n = 649$ Thrombozyten, 3 verschiedene Tiere, Streuungsbreite 0,033- 4,675 mm/s). In der Diclofenacgruppe lagen die Geschwindigkeiten bei $0,473 \pm 0,02$ mm/s ($n = 421$ Thrombozyten, 3 verschiedene Tiere, Streuungsbreite 0,047- 3,582 mm/s). In diesen Versuchen wurde außerdem, um der Ursache der verstärkten Thrombozyten-Endothel-Interaktion unter Diclofenacmedikation weiter auf den Grund zu gehen, nach der einstündigen Inkubationszeit mit Diclofenac das Prostazyklinanalogon Iloprost infundiert. Iloprost verhinderte die proadhäsive Wirkung von Diclofenac und führte zu Thrombozytengeschwindigkeiten von $1,335 \pm 0,063$ mm/s ($n = 497$ Thrombozyten, 3 verschiedene Tiere, Streuungsbreite 0,047- 9,517 mm/s). Dies stellte eine signifikante Veränderung hin zu langsameren Geschwindigkeiten in der Diclofenacgruppe verglichen mit den Kontrolltieren oder auch verglichen mit der Kombination Diclofenac und Iloprost dar. (Histogramme der Daten Abb. 8, Filmausschnitte der Versuche Abb. 9)

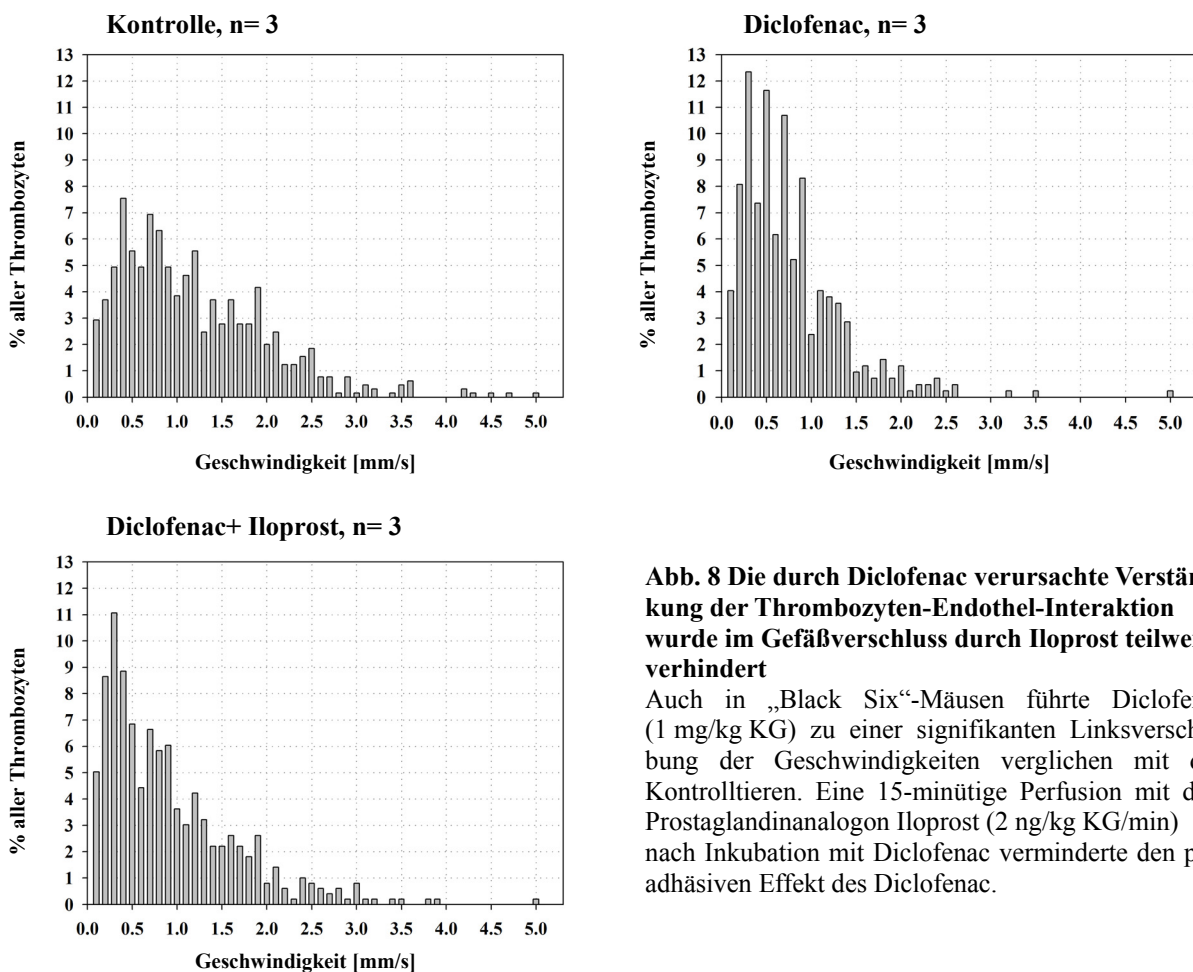


Abb. 8 Die durch Diclofenac verursachte Verstärkung der Thrombozyten-Endothel-Interaktion wurde im Gefäßverschluss durch Iloprost teilweise verhindert

Auch in „Black Six“-Mäusen führte Diclofenac (1 mg/kg KG) zu einer signifikanten Linksverschiebung der Geschwindigkeiten verglichen mit den Kontrolltieren. Eine 15-minütige Perfusion mit dem Prostaglandinanalogon Iloprost (2 ng/kg KG/min) nach Inkubation mit Diclofenac verminderte den proadhäsiven Effekt des Diclofenac.

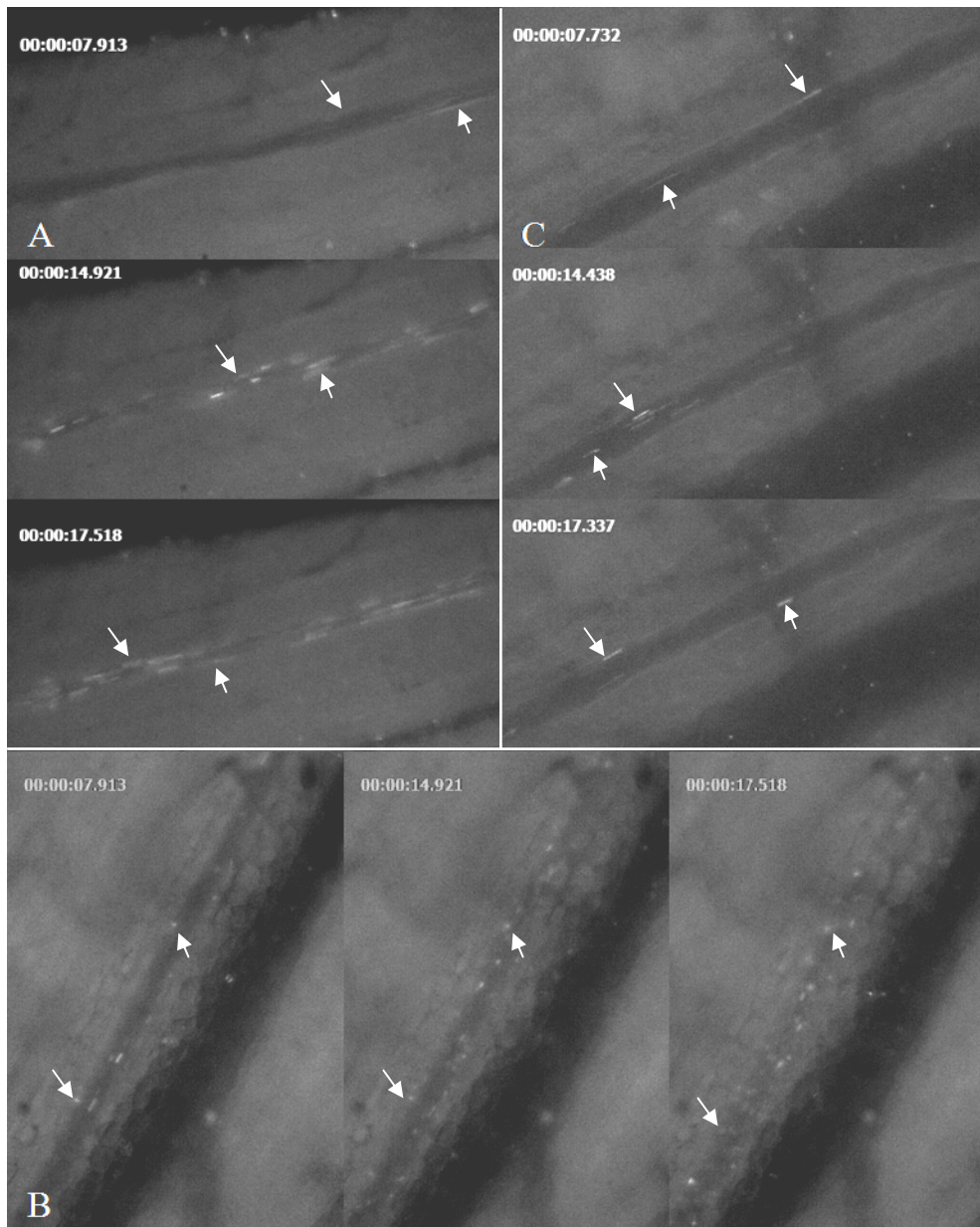


Abb. 9 Die durch Diclofenac (1 mg/kg KG) verstärkte Thrombozyten-Endothel-Interaktion (B) nach FeCl₃ (30 µl, 25 mM) induzierter Gefäßwandverletzung kann durch das Prostazyklinanalogon Iloprost (2 ng/kg KG/min) (C) verhindert werden (A= Kontrolle). Die Pfeile zeigen beispielhaft Thrombozyten im Gefäßbett. In Reihe B ist eine deutliche Verstärkung der Adhäsion von Thrombozyten nach Diclofenac-applikation zu sehen. (Bildfolge A/C vertikal, B horizontal)

Um den Effekt der unterschiedlichen Behandlungen auf die thrombozytenabhängige intraarterielle Thrombusbildung in vivo zu untersuchen, wurde die Zeit bis zum thrombotischen Gefäßverschluss nach exogener Gefäßwandverletzung gemessen. Diclofenac verkürzte signifikant die Gefäßverschlusszeit von 323 ± 31 Sekunden in Kontrolltieren ($n=6$) auf $113,1 \pm 43,3$ Sekunden ($n=8$, $p < 0,01$). $\text{TNF}\alpha$ wiederum verkürzte die Gefäßverschlusszeit im Vergleich zu den Kontrollen auf $43,8 \pm 18,4$ Sekunden ($n=8$, $p < 0,001$). Diclofenac bewirkte in Kombination mit $\text{TNF}\alpha$ keine zusätzliche Beschleunigung des thrombotischen Verschlusses, sondern hob den Effekt des $\text{TNF}\alpha$ teilweise auf, was sich in einer Verschlusszeit von $77,6 \pm 50,3$ Sekunden ($n=7$, $p < 0,01$ vs. Kontrolle) äußerte. Die Gefäßverschlusszeit war sowohl unter Parecoxibmedikation als auch unter der Behandlung mit der Kombination aus $\text{TNF}\alpha$ und Parecoxib gegenüber den Kontrollen signifikant erniedrigt. Bei den mit Parecoxib behandelten Tieren ergaben sich Zeiten von $129,2 \pm 43,1$ Sekunden ($n=6$ verschiedene Tiere, $p < 0,01$ vs. Kontrolle). Die Kombination von Parecoxib und $\text{TNF}\alpha$ führte zu einer noch weiter verkürzten Verschlusszeit von $83,7 \pm 23,1$ Sekunden ($n=7$ unterschiedliche Tiere, $p < 0,001$). Zwischen $\text{TNF}\alpha$ und Parecoxib oder der Kombination aus $\text{TNF}\alpha$ und Parecoxib traten keine signifikanten Unterschiede auf (alle Daten Abb. 10). Im Gefäßverschlussversuch in der Maus wirkte eine Iloprostperfusion nach Diclofenacapplikation, mit einer Gefäßverschlusszeit von $180,5 \pm 69$ Sekunden versus Diclofenac allein mit $24 \pm 6,4$ Sekunden, protektiv (je $n=3$ unterschiedliche Tiere, $p < 0,05$). Damit lag es in einem den Kontrollen ($185 \pm 61,7$ Sekunden, $n=3$) vergleichbaren Bereich. Dies deutet darauf hin, dass die vermehrte Thrombozyten-Endothel-Interaktion unter Diclofenacmedikation durch eine verminderte Prostazyklinfreisetzung bedingt sein könnte. (Abb. 11)

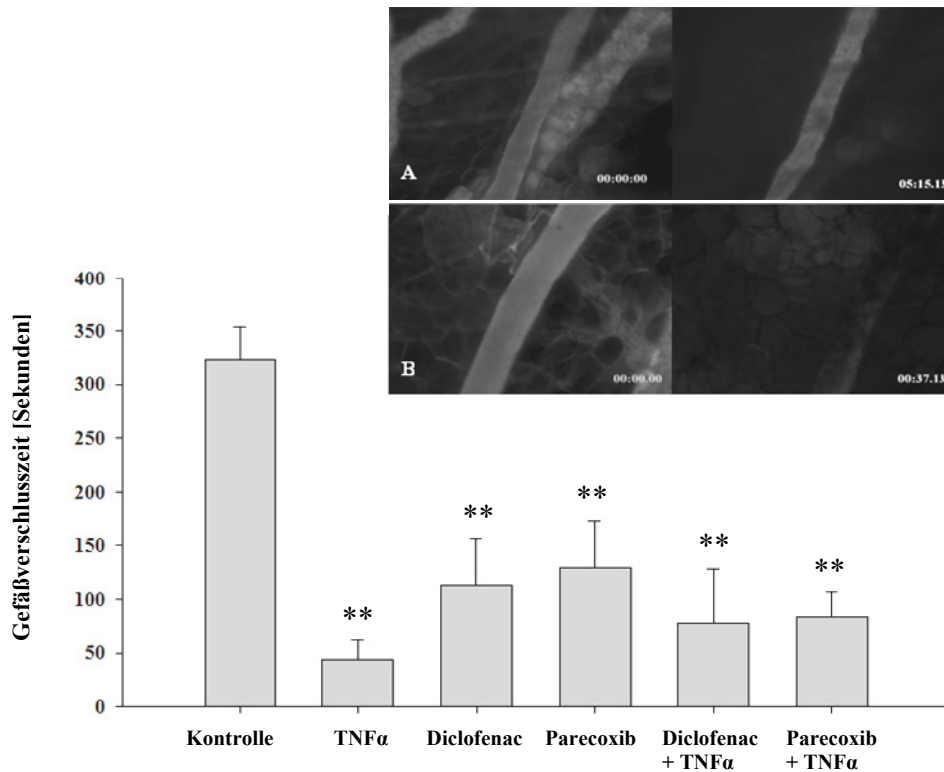


Abb. 10 Beschleunigung eines Gefäßverschlusses durch TNF α , Diclofenac, Parecoxib und der Kombination aus COX-2-Inhibitoren und TNF α im Hamster

Auf eine Verletzung der Gefäßwand hin zeigte sich in Anwesenheit von Diclofenac (1 mg/kg KG, n= 8), TNF α (0,5 μ g/kg KG, n= 7) und der Kombination aus TNF α und Diclofenac (n= 6) ein signifikant verkürzter Gefäßverschluss gegenüber den Kontrolltieren (n= 6). Auch Parecoxib (1 mg/kg KG, n= 6) und eine Kombination aus TNF α und Parecoxib (n= 7) führten zu signifikant verkürzten Gefäßverschlusszeiten. TNF α verstärkte die prothrombotische Wirkung der alleinigen Parecoxibmedikation tendenziell. Signifikant vs. Kontrolle: ** p< 0,01 Rechts oben in horizontaler Richtung beispielhafte Abbildungen aus in vivo Versuchen in der Rückenhautkammer: A Gefäßverschluss einer Kontrolle, B Gefäßverschluss unter Diclofenacmedikation

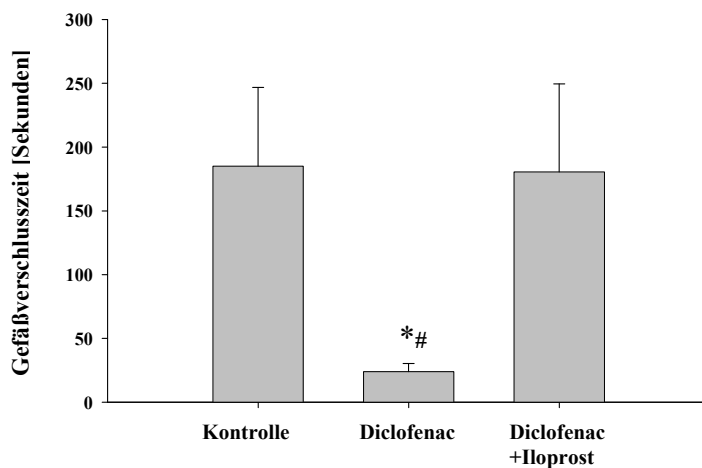


Abb. 11 Die Gefäßverschlusszeit war unter Diclofenacmedikation (1 mg/kg KG, n= 3) gegenüber den Kontrollen (n= 3) in „Black Six“-Mäusen signifikant vermindert. Iloprost (2 ng/kg KG über 15 min, n= 3) verhinderte diesen Effekt

Diclofenac vs. Kontrolle: * p< 0,05; Diclofenac vs. Diclofenac+ Iloprost: # p< 0,05

3.2 Messung der Metabolite von Prostazyklin und Thromboxan A₂

Da sich unter einer Medikation mit Diclofenac oder Parecoxib und nach Applikation von TNF α in vivo eine deutlich erhöhte Thrombozyten-Endothel-Interaktion und eine verkürzte Gefäßverschlusszeit gezeigt hatte, wurden, um die Gleichgewichtstheorie der Prostanoiden als Ursache einer erhöhten Atherothrombosegefährdung zu überprüfen, die 6-keto-PgF_{1 α} - (als Abbauprodukt von PgI₂) und TxB₂-Spiegel (als Abbauprodukt von TxA₂) im Serum behandelter Tiere bestimmt. Obwohl systemisch appliziertes Diclofenac die Menge an zirkulierendem 6-keto-PGF_{1 α} deutlich von 1779 \pm 586 pg/ml (Kontrolle, n= 5) auf 471 \pm 147 pg/ml (Diclofenac, n= 5, p= 0,062 vs. Kontrolle) verminderte, veränderten sich die Spiegel von TxB₂ nicht. Die Menge an TxB₂ betrug 308 \pm 149 pg/ml in den Kontrolltieren (n= 5) und 309 \pm 83 pg/ml in mit Diclofenac behandelten Tieren (n= 5, n.s.). TNF α hingegen erhöhte die Menge an 6-keto-PGF_{1 α} leicht auf 2117 \pm 745 pg/ml (n= 6). TxB₂ stieg unter dem Einfluss von TNF α ebenfalls nur leicht auf 327 \pm 138 pg/ml (n= 6). Die zusätzliche Behandlung der Tiere die TNF α bekommen hatten mit Diclofenac bewirkte eine Verminderung des TNF α bedingten 6-keto-PGF_{1 α} -Anstieges auf 415 \pm 87 pg/ml (n= 6). Die Menge an TxB₂ veränderte sich auch in der Kombination von TNF α mit Diclofenac gegenüber den Kontrollen kaum (278 \pm 49 pg/ml, n= 6, alle Daten Abb. 12). Intraperitoneal appliziertes Parecoxib veränderte den Spiegel von 6-keto-PgF_{1 α} mit 1872 \pm 417 pg/ml (n= 9) sowohl gegenüber den Kontrollen (1779 \pm 586 pg/ml, n= 5) wie auch gegenüber den mit TNF α behandelten Tieren (2117 \pm 745 pg/ml, n= 6) nicht. Eine Verminderung des TNF α -induzierten Effektes bezüglich 6-keto-PgF_{1 α} war in den mit TNF α und Parecoxib behandelten Tieren tendenziell erkennbar (TNF α : 2117 \pm 745 pg/ml, n= 6; TNF α mit Parecoxib: 829 \pm 357 pg/ml, n= 5, n.s.). Die TxB₂-Spiegel waren dagegen in den mit Parecoxib behandelten Tieren mit 1163 \pm 357 pg/ml (n= 10 verschiedene Tiere, p< 0,05 vs. Kontrolle) signifikant gegenüber den Kontrolltieren mit 308 \pm 149 pg/ml (n= 5) erhöht. Hinsichtlich TxB₂ ergab Parecoxib in Kombination mit TNF α (968 \pm 544 pg/ml, n= 5) sowohl gegenüber den Kontrollen wie auch gegenüber den Tieren nach alleiniger TNF α -Applikation (327 \pm 138 pg/ml) keine signifikanten Unterschiede (alle Daten Abb. 13). Ähnliche Effekte fanden sich im Serum behandelter Mäuse (Daten werden nicht gezeigt).

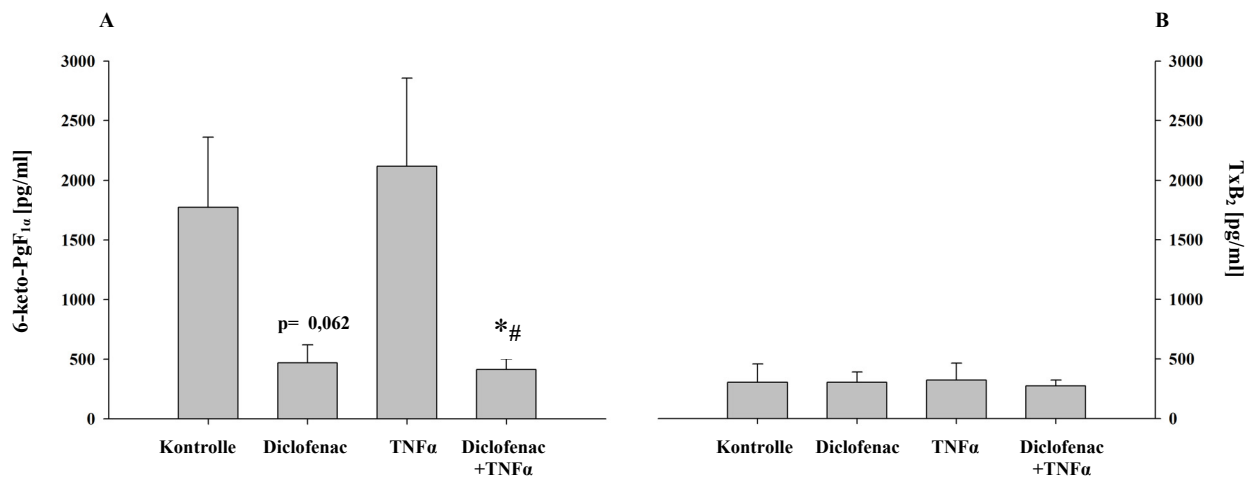


Abb. 12 Serumspiegel von Prostaglandin- und Thromboxanmetaboliten unter Diclofenac-Therapie

A Mit Diclofenac behandelte Tiere (1 mg/kg KG, n= 5) zeigten im Vergleich zu den Kontrolltieren (n= 5) verminderte Serumspiegel des PGI₂-Metaboliten 6-keto-PgF_{1α} (p= 0,062). Der Anstieg von 6-keto-PgF_{1α} in Anwesenheit von TNFα (0,5 μg/kg KG, n= 6) wurde durch Diclofenac verhindert (n= 6). Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied gegenüber TNFα allein und den Kontrolltieren.

B Die Spiegel des TxA₂-Metaboliten TxB₂ unter den verschiedenen Behandlungen zeigten keinen Unterschied zu den Kontrollen.

Signifikant vs. Kontrolle: * p< 0,05, Signifikant vs. TNFα: # p< 0,05

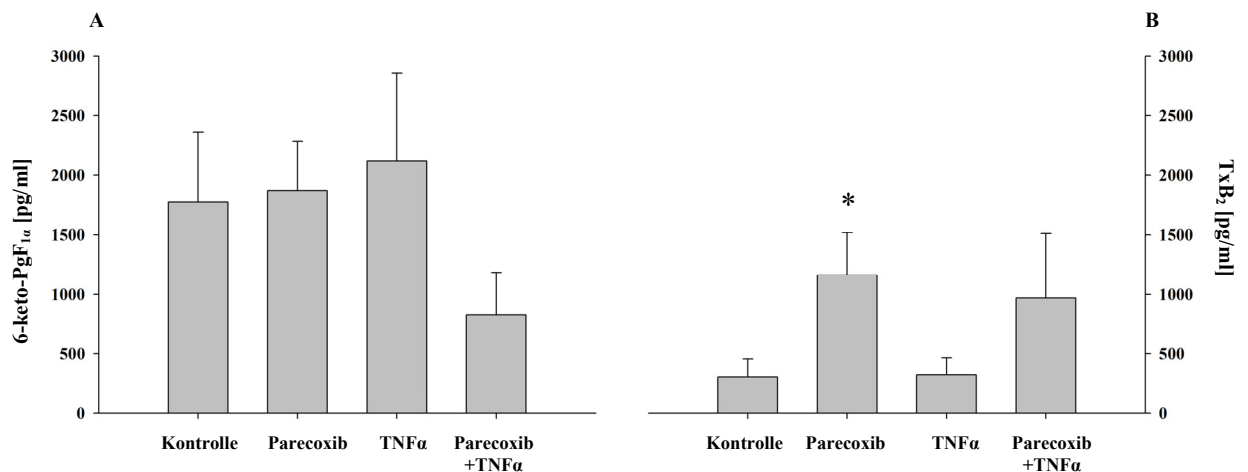


Abb. 13 Paradoxe Wirkung von Parecoxib auf die Prostanoidspiegel nach intraperitonealer Applikation

A Parecoxib (1 mg/kg KG, n= 9) beeinflusste die Menge an 6-keto-PgF_{1α} im Serum der Versuchstiere im Vergleich zu TNFα (0,5 μg/kg KG, n= 6) und den Kontrollen (n= 5) nicht. Lediglich in der Kombination mit TNFα (n= 5) zeigte sich eine tendenzielle, wenn auch nicht signifikante, Reduktion gegenüber den Werten unter alleiniger TNFα-Applikation.

B Der TxA₂-Metabolit TxB₂ war im Vergleich mit den Kontrollen (n= 5) unter Parecoxibmedikation (1 mg/kg KG, n= 10) signifikant erhöht. In der Kombination von Parecoxib mit TNFα (0,5 μg/kg KG, n= 5) ergab sich eine tendenzielle, jedoch nicht signifikante Erhöhung der TxB₂-Werte.

Signifikant vs. Kontrolle: * p< 0,05

Um schließlich herauszufinden wie sich die Veränderungen der Eicosanoidmetabolite auf die Thrombusbildung auswirken könnten, wurde das Verhältnis der Substanzen parallel in den untersuchten Proben bestimmt und als Quotient ausgedrückt. Während der Quotient von TxB_2 zu 6-keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$ in den Kontrolltieren einen Wert von $0,14 \pm 0,02$ ($n=4$) ergab, war dieser in mit Diclofenac behandelten Tieren auf $1,28 \pm 0,57$ ($n=5$, $p < 0,05$ vs. Kontrolle) erhöht. Unter Stimulation mit $\text{TNF}\alpha$ fand sich mit einem Quotienten von $0,17 \pm 0,04$ kein signifikanter Unterschied gegenüber den Kontrollen. In Kombination mit Diclofenac hingegen erhöhte sich der Quotient signifikant auf $0,85 \pm 0,19$ ($p < 0,05$ vs. Kontrolle, $n=6$). Parecoxib allein erbrachte mit $1,22 \pm 0,73$ ($n=9$) eine tendenzielle, wenn auch nicht signifikante Erhöhung der Werte gegenüber den Kontrolltieren. Eine Behandlung mit $\text{TNF}\alpha$ und Parecoxib (Quotient: $1,78 \pm 0,79$; $n=5$) ergab eine ebenfalls tendenzielle Steigerung gegenüber den Kontrollen ($0,14 \pm 0,02$; $n=4$). Die Kombination von Parecoxib mit $\text{TNF}\alpha$ und Diclofenac mit $\text{TNF}\alpha$ war gegenüber $\text{TNF}\alpha$ allein ($0,17 \pm 0,04$; $n=6$) signifikant erhöht ($p < 0,05$ vs. $\text{TNF}\alpha$, alle Daten siehe Abb. 14).

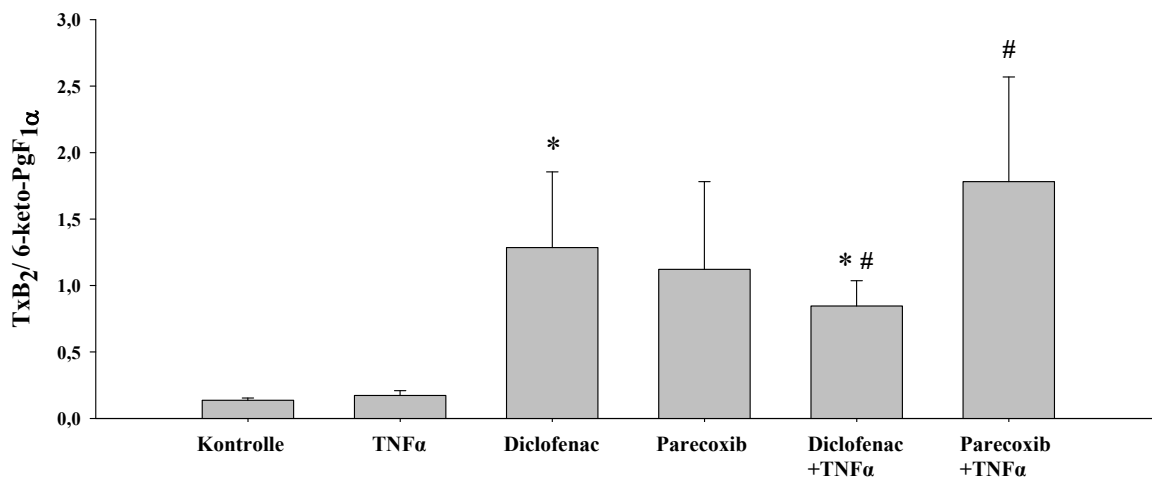


Abb. 14 Einfluss von $\text{TNF}\alpha$, Diclofenac und Parecoxib auf das Verhältnis von TxB_2 /6-keto- $\text{PgF}_{1\alpha}$ in vivo

Die Spiegel der Eicosanoidmetabolite TxB_2 und 6-keto- $\text{PgF}_{1\alpha}$ wurden im Serum der Versuchstiere bestimmt und pro Tier zueinander ins Verhältnis gesetzt. Dieses Verhältnis war unter alleiniger Diclofenactherapie (1 mg/kg KG, $n=5$) und in der Kombination von Diclofenac und $\text{TNF}\alpha$ ($n=6$) gegenüber den Kontrollen ($n=4$) signifikant erhöht. $\text{TNF}\alpha$ allein (0,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ KG, $n=6$) verursachte keine Veränderung des Verhältnisses im Vergleich zu den Kontrollen. Das Verhältnis von TxB_2 zu 6-keto- $\text{PgF}_{1\alpha}$ war unter Parecoxibmedikation (1 mg/kg KG, $n=9$) tendenziell gegenüber den Kontrollen erhöht. In der Kombination von Parecoxib mit $\text{TNF}\alpha$ ($n=5$) stieg dieses weiter auf ein gegenüber $\text{TNF}\alpha$ signifikantes Niveau. Auch die Kombination von Diclofenac und $\text{TNF}\alpha$ bewirkte eine gegenüber $\text{TNF}\alpha$ signifikante Erhöhung des Verhältnisses. Signifikant vs. Kontrolle: * $p < 0,05$; vs. $\text{TNF}\alpha$: # $p < 0,05$

3.3 TNF α erhöht die endotheliale CD61-Expression

Um den verschiedenen Mechanismen die zu einer Thrombusbildung in unserem in vivo Modell beitragen weiter auf den Grund zu gehen, untersuchten wir die Expression der endothelialen Adhäsionsrezeptoruntereinheit β_3 -Integrin (CD61) auf humanen mikrovaskulären Endothelzellen (HMEC) in vitro nach Applikation der Studiensubstanzen. Während Diclofenac allein die CD61-Expression auf HMEC gegenüber der unbehandelten Kontrolle nicht hochregulierte (Kontrolle: $21,6 \pm 1,3$ relative Fluoreszenzeinheiten (RFU), $n=9$; Diclofenac: $18,7 \pm 1,3$ RFU, $n=9$, n.s.), erhöhte TNF α die Expression signifikant ($31,2 \pm 1,6$ RFU, $n=9$, $p < 0,001$ vs. Kontrolle). Diese Steigerung der endothelialen CD61-Expression unter TNF α -Stimulation wurde bei gleichzeitiger Gabe von Diclofenac nicht erreicht ($27,6 \pm 1,7$ RFU, $n=9$). Mit Parecoxib behandelte HMEC zeigten mit $18,2 \pm 1,2$ RFU ($n=9$, $p=0,072$), wie die mit Diclofenac behandelten Zellen, eine verringerte Expression von CD61 gegenüber den Kontrollen. In der Kombination mit TNF α schwächte Parecoxib die Expression von CD61 signifikant gegenüber der alleinigen Behandlung mit TNF α ab ($n=9$, $p < 0,05$). Gegenüber den Kontrollen allerdings war die Expression von CD61 auch nach kombinierter Inkubation mit TNF α und Parecoxib signifikant erhöht.

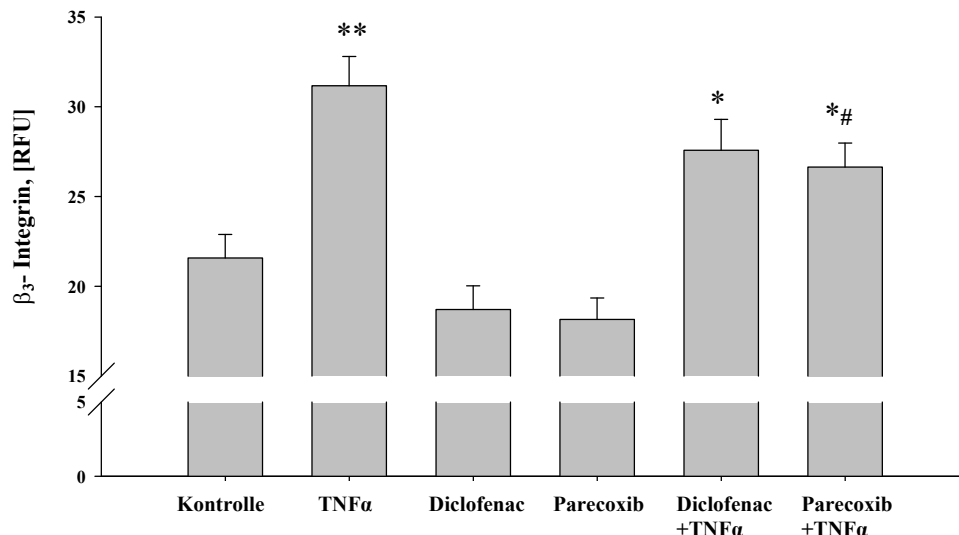


Abb. 15 Einfluss der Studiensubstanzen auf die endotheliale Adhäsionsrezeptorexpression in vitro

Diclofenac (10 $\mu\text{g/ml}$ Medium) allein beeinflusste die Expression der endothelialen Adhäsionsrezeptoruntereinheit CD61 auf HMEC nicht signifikant. TNF α (5 ng/ml Medium) hingegen führte zu einer signifikanten Mehrexpression, die bei Kombination von TNF α mit Diclofenac nur tendenziell vermindert war ($n=9$ pro Versuchsansatz). Nach Inkubation mit Parecoxib (10 $\mu\text{g/ml}$ Medium) zeigte sich eine deutliche Minderexpression von CD61 ($p=0,072$). Die durch TNF α signifikant erhöhte Expression wurde durch Parecoxib zwar nicht verhindert, aber dennoch signifikant vermindert (je $n=9$).

Signifikant vs. Kontrolle: ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$; Signifikant vs. TNF α : # $p < 0,05$

4. Diskussion

4.1 Der Einfluss einer Cyclooxygenasehemmung auf die Thrombozyten-Endothel-Interaktion und eine arterioläre Thrombusbildung in gesunden Gefäßen im Tierversuch

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, zunächst die Auswirkung einer COX-2-Hemmung auf die Thrombozyten-Endothel-Interaktion und eine darauf folgende Thrombusbildung in gesunden Arteriolen zu untersuchen. In klinischen Studien war bereits ein erhöhtes kardiovaskuläres Risiko für die spezifischen COX-2-Hemmer Rofecoxib^{7,8}, Celecoxib⁷⁶ und Valdecoxib⁵⁶ beschrieben worden. Zu diesen Daten kamen in den letzten Jahren Ergebnisse eines erhöhten kardiovaskulären Risikos unter einer Therapie mit NSAR. So wies die mit Ibuprofen behandelte Gruppe im Rahmen des „Therapeutic Arthritis Research and Gastrointestinal Event Trial“ (TARGET), einer Studie an 18.325 Patienten mit Osteoarthritis, ein erhöhtes Risiko eines thrombotischen Ereignisses verglichen mit Lumiracoxib auf⁷⁷. Diclofenac zeigte in der MEDAL-Studie 2006 ein mit Etoricoxib vergleichbares kardiovaskuläres Risiko⁹. Die Frage war nun, ob und wenn ja, über welchen Mechanismus eine vermehrte Thrombozytenaktivität und damit ein erhöhtes Atherothromboserisiko entsteht. Dieser Frage war schon im Vorfeld in unserer eigenen Arbeitsgruppe anhand des selektiven COX-2-Hemmers NS-398 auf den Grund gegangen worden. So konnte im *in vivo* Versuch an Hamsterarteriolen eine vermehrte Thrombozyten-Endothel-Interaktion nach intraperitonealer Applikation von NS-398 gezeigt werden¹². Auch zeigte sich gegenüber den Kontrollen eine deutlich beschleunigte Gefäßverschlusszeit auf die Gabe von NS-398 hin. Es stellte sich nun die Frage ob auch andere COX-2-Hemmer, im Sinne eines Klasseneffektes, eine ähnliche Thrombozyten-Endothel-Interaktion und damit ein erhöhtes Atherothromboserisiko zeigen und ob dies auch unter einer Medikation mit NSAR der Fall sein könnte. Wir wählten aus der Gruppe der COX-2-Hemmer Parecoxib und aus der Gruppe der NSAR Diclofenac aus und untersuchten deren Einfluss auf die Thrombozyten-Endothel-Interaktion und Gefäßverschlusszeit *in vivo* in den Arteriolen der Rückenhaut gesunder Hamster. Hierbei konnten wir zeigen, dass sowohl Parecoxib als auch Diclofenac prothrombotische Verhältnisse schaffen können. Beide Arzneistoffe verursachten eine signifikant verstärkte Thrombozyten-Endothel-Interaktion, ein signifikant verstärktes Rollen von Thrombozyten an der Gefäßwand sowie eine signifikant verkürzte Gefäßverschlusszeit. Unter einer Parecoxibmedikation zeigte sich ein signifikant verstärktes Haften von Thrombozyten an der Gefäßwand, welches unter Diclofenactherapie ebenfalls, wenn auch nur tendenziell, verstärkt war. Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen Borgdorff et al. 2006. In

einem Rattenmodell zeigten sie eine unter Parecoxibmedikation verstärkte Thrombozytenaggregation in einer Stenose eines arteriellen Bypasses⁷⁸. Allerdings war hier eine im Vergleich zu unseren Versuchen 20fach höhere Parecoxibdosis verwendet worden. Bisher gibt es nur wenige experimentelle Daten, die die Wirkung einer COX-Hemmung mittels Diclofenac auf Thrombozyten und deren Aktivierung in vivo untersuchen. Meist werden Thrombozyten in vitro untersucht. So fanden Galliard-Grigioni et al. 2008 nach einer Inkubation mit Diclofenac in einer Konzentration von 0,04 µg pro Milliliter eine ähnlich beeinträchtigte Thrombozytenfunktion im Thrombozytenfunktionstest PFA-100 wie nach einer Inkubation mit 0,5 µg pro Milliliter Aspirin⁷⁹. In dieser Untersuchung wurde eine deutlich geringere Menge Diclofenac eingesetzt als klinisch üblich. Damit könnte ein ähnlicher Effekt wie unter einer Therapie mit niedrig dosiertem Aspirin eintreten. Es würde sich um eine Dosis handeln, die zwar einen antiaggregatorischen Effekt über eine Hemmung der COX-1 hat, in dieser Dosierung allerdings noch nicht ausreicht um über eine Hemmung der COX-2 eine zufriedenstellende Analgesie zu erreichen. Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen Blaicher et al. schon 2004, als sie an 44 Freiwilligen die Wirkung einer Dosis von 75 mg Diclofenac auf den PFA-100 untersuchten. Auch hier trat eine verlängerte Aggregationszeit drei Stunden nach Diclofenaceinnahme auf. Diese normalisierte sich innerhalb von 12 Stunden⁸⁰. In vitro Untersuchungen spiegeln allerdings in keinsten Weise das komplexe Zusammenspiel verschiedener Faktoren im Gefäßsystem wieder, sondern untersuchen isoliert einzelne Mechanismen. Die Thrombozytenfunktion ist nur ein Bestandteil der Thrombogenese. Hinzu kommen Einflüsse durch volatile Substanzen wie Eicosanoide oder NO oder Wechselwirkungen zwischen dem Endothel und zellulären Blutbestandteilen mit der Expression von Oberflächenrezeptoren. Diese werden besonders unter entzündlichen Bedingungen und im Falle einer Gefäßwandverletzung vermehrt freigesetzt, beziehungsweise exprimiert.

4.1.1 Die Rolle der COX-2-Spezifität der Cyclooxygenasehemmstoffe

Cyclooxygenasehemmstoffe bewirken als erwünschte Effekte eine Reduktion von Entzündung und Schmerzempfinden. Dies erfolgt vornehmlich über eine Hemmung der COX-2. Auch ihr Einfluss auf Thrombozyten im Sinne einer Hemmung der thrombozytären COX-1 ist im Falle der Acetylsalicylsäure erwünscht. Um unerwünschte Nebenwirkungen wie eine Beeinträchtigung der gastrointestinalen Prostanoidsynthese und damit ein vermehrtes Auftreten von gastrointestinalen Ulcera und Blutungen durch eine Hemmung der COX-1 zu vermeiden, wurden spezifische Hemmstoffe der COX-2 entwickelt. Infolge dieser Entwicklung kam es in klinischen Studien zu einer erhöhten Rate kardiovaskulärer Ereignisse. Eine Erklärung

dieser Beobachtungen liefert die „Prostanoid-Imbalance-Hypothese“, die eine Beeinträchtigung des Gleichgewichtes zwischen dem die Thrombozytenaktivität hemmenden PGI₂ und dem thrombozytenaktivierenden TxA₂ postuliert. In der Vergangenheit wurde streng zwischen NSAR und Coxiben unterschieden. Hierbei galten die NSAR als bezüglich der COX-1 und -2 nicht selektiv, die Coxibe als gegenüber der COX-2 selektiv. Wie einige Untersuchungen gezeigt haben ist diese Aufteilung nicht zutreffend. So zeigt beispielweise Diclofenac in vitro in einer Dosierung von 150- 200 mg/die, womit es im Konzentrationsbereich einer 50%igen Hemmkonzentration liegt, eine 29fach stärkere Hemmung der COX-2 als der COX-1 und damit die gleiche Selektivität gegenüber den beiden Cyclooxygenasen wie der „spezifische“ COX-2-Hemmer Celecoxib⁵⁹. Die spezifische Selektivität der Cyclooxygenasehemmer ist allerdings in der Literatur deutlich unterschiedlich beschrieben⁸¹. Diese Unterschiede beruhen hauptsächlich auf verschiedenen Analysemethoden in vitro wie der Verwendung aufgereinigter oder mikrosomal rekombinanter Enzyme, homogenisierter oder intakter Zellen⁶⁰. Andere die Wirkung der Pharmaka beeinflussende Bedingungen, wie die Proteinbindung⁸² oder die spezifische Pharmakokinetik des jeweiligen Arzneistoffes, werden oft nicht berücksichtigt⁶⁰.

4.1.2 Bewertung der „Prostanoid-Imbalance-Hypothese“

Unsere Ergebnisse wiesen darauf hin, dass eine Veränderung des Gleichgewichtes zwischen aktivierenden und hemmenden Prostanoiden, wie TxA₂ und PGI₂, eine vermehrte Thrombozytenaktivierung und folgend darauf eine verstärkte Thrombozyten-Endothel-Interaktion bewirken kann. Allerdings sprechen zahlreiche Literaturbefunde und pathophysiologische Zusammenhänge gegen die möglicherweise vereinfachende „Gleichgewichtstheorie“ der Prostanoiden. So hängt beispielsweise das Endprodukt der Cyclooxygenasen stark von der jeweiligen Koppelung an die verschiedenen Prostanoidsynthetasen ab, die in bestimmten Situationen, so auch unter inflammatorischen Bedingungen verändert werden kann⁴². Wie eingangs bereits beschrieben ist die Koppelung der TxS an die jeweilige COX-Isoform von der Menge des Angebotes an Arachidonsäure abhängig. Ist das Substratangebot niedrig erfolgt die Koppelung bevorzugt an die COX-2, bei höheren Substratmengen an die COX-1⁴¹. Eine Infektion, Entzündung oder auch ein Trauma aktivieren die Phospholipase A₂, die wiederum Arachidonsäure aus Zellmembranen freisetzt⁸³. Somit steht unter diesen Bedingungen vermehrt Arachidonsäure zur Bildung von TxA₂ durch die COX-1 zur Verfügung. Es ist außerdem bekannt, dass nicht nur die COX-2 sondern auch die COX-1 über eine Koppelung an die PgIS PGI₂ synthetisieren kann. Die PgIS gekoppelt an die COX-2 benötigt allerdings zur Synthese von

PgI₂ deutlich geringere Arachidonsäurekonzentrationen als die PgIS gekoppelt an die COX-1. Auch befinden sich PgIS und COX-2 in engerer Nachbarschaft als PgIS und COX-1 und die Konversionsreaktion zur Bildung von PgI₂ läuft bei der COX-2 sehr viel schneller ab⁸⁴. Daher ist es nicht verwunderlich, dass im Gefäßsystem die COX-2 das bezüglich der Synthese von PgI₂ dominante Enzym ist. Eine vermehrte Expression der COX-2 wurde besonders auch in atherosklerotischen Läsionen des Gefäßendothels gefunden^{49,85}. Interessanterweise wurde in diesen Untersuchungen in nicht von Atherosklerose betroffenen Gefäßen keine Expression der COX-2 gefunden, dagegen aber eine Expression der COX-1. In atherosklerotischen Plaques hingegen waren beide COX-Isoformen vertreten. Unter entzündlichen Bedingungen wird durch Hypoxie und Entzündungsmediatoren sowohl die Expression der COX-2 als auch der PgIS hochreguliert und damit vermehrt vasodilatierendes und antithrombozytäres PgI₂ gebildet⁸⁶. Hierdurch wird ein Gegengewicht zu einer unter entzündlichen Bedingungen oder im Rahmen einer Gefäßwandverletzung vermehrten Synthese prothrombogenen TxA₂s geschaffen. Wir haben versucht zu ergründen, inwieweit ein durch eine Cyclooxygenasehemmung verursachtes Ungleichgewicht von TxA₂ und PgI₂ an einer intraarteriellen Thrombusbildung beteiligt ist. Nach Injektion von Diclofenac und einstündiger Inkubation wurde im Gefäßverschlussversuch nach traumatischer Gefäßwandverletzung eine signifikant verkürzte Gefäßverschlusszeit beobachtet. Um heraus zu finden ob ein Kippen des Prostanoidgleichgewichtes durch eine Abnahme von PgI₂ zu Gunsten des prothrombogenen TxA₂ ursächlich für diese Beobachtungen ist, wurde versucht diese verkürzte Gefäßverschlusszeit durch ein Ersetzen des, durch Diclofenac induziert, vermindert gebildeten PgI₂ zu verhindern. Hierzu wurde den Tieren nach einer Inkubationszeit von einer Stunde nach intraperitonealer Injektion von Diclofenac über 15 Minuten das Prostazyklinanalogon Iloprost über einen Katheter in der Vena jugularis verabreicht. Diese Therapie führte zu einer den Kontrollen ähnlichen Gefäßverschlusszeit. Erwartungsgemäß reduzierte Diclofenac den Spiegel des PgI₂ im Blut der Versuchstiere. In der hier gewählten Dosis, die einer Tagesdosis von 75mg Diclofenac beim Menschen entspricht, hatte es allerdings keinen Einfluss auf intravasale TxA₂-Spiegel. Somit änderte sich das Verhältnis von PgI₂ und TxA₂ zugunsten des prothrombogenen TxA₂. Hiermit untermauern unsere Ergebnisse die Gleichgewichtstheorie der Prostanoidspiegel als Schlüsselpunkt der Coxib-induzierten Atherothrombosegefährdung.

Unsere Parecoxibdaten zeigten ein signifikant verstärktes Rollen und Haften von Thrombozyten an der Gefäßwand sowie verkürzte Gefäßverschlusszeiten unter einer Parecoxibmedikation. Messungen der Prostanoidspiegel zeigten jedoch keine Verminderung des intravasalen PgI₂, dagegen aber eine Erhöhung von TxA₂. Dies verwundert in Anbetracht der An-

nahme, dass Parecoxib spezifisch die COX-2 hemmen müsste, die ja im Gefäßsystem vornehmlich für die PGI₂-Produktion verantwortlich ist. In einer klinischen Studie von Graff et al. wurde bereits ein ähnlicher Effekt beschrieben. Hier zeigte sich eine Erhöhung der Thromboxanspiegel im Blut gesunder Probanden sechs Stunden nach einer Applikation von Parecoxib verglichen mit den Ausgangswerten⁸⁷. Araujo et al. postulierten ebenfalls eine Induktion der TxA₂-Generation und zusätzlich eine Hemmung der renalen NO-Synthetase in den Nierentubuli durch Parecoxib⁸⁸. Dieser Effekt könnte auch im Gefäßsystem eine Rolle spielen. Borgdorff et al. wiederum konnten im oben erwähnten Modell einer Stenose eines arteriellen Bypasses im Rattenmodell eine signifikante Abnahme des PGI₂-Metaboliten 6-keto-PgF_{1α} unter einer Medikation mit Parcoxib nachweisen. Allerdings wurde in diesen Versuchen mit 20 mg Parecoxib pro Kilogramm Körpergewicht eine 20fach höhere Dosis verwendet als in den vorliegenden Versuchen⁷⁸. Eine von der Dosis abhängige Wirkungszunahme und damit eine Zunahme des kardiovaskulären Risikos wurde für einige Coxibe und NSAR beschrieben⁸⁹⁻⁹². Interessanterweise gibt es bisher keine Untersuchungen einer Dosis-Wirkungsbeziehung von Parecoxib oder seinem Metaboliten Valdecoxib. Es ist aber anzunehmen, dass auch hier eine Wirkungsverstärkung mit ansteigender Dosis vorliegt. Eventuell war in dieser Arbeit die Parecoxibdosis zu gering um eine signifikante Abnahme des 6-keto-PgF_{1α} im Serum der behandelten Tiere zu erreichen, reichte aber dennoch aus um das Gleichgewicht zwischen TxA₂ und PGI₂ zu Gunsten des TxA₂ zu verändern.

4.1.3 Diclofenac – Vergleich mit klinischen Daten

Unsere Beobachtung einer verstärkten Thrombozytenaktivierung in gesunden Gefäßen im Tierversuch könnte eine Erklärung für die klinisch beobachteten erhöhten Raten atherothrombotischer Ereignisse unter einer Therapie mit Diclofenac sowie verwandten NSAR sein. Oft werden in klinischen Studien, meist retrospektiven Kohortenstudien, schon vorerkrankte Populationen untersucht. Diese bringen beispielsweise in Form einer systemischen Entzündung, wie sie im Rahmen einer Osteoarthritis oder rheumatoiden Arthritis auftritt^{9,10}, oder durch myokardiale Ereignisse, wie einen stattgehabten Myokardinfarkt^{91,93} oder eine Herzinsuffizienz⁸⁹, schon Risikofaktoren für weitere myokardiale Ereignisse mit. Unsere Daten weisen darauf hin, dass auch im gesunden Gefäßsystem ein erhöhtes kardiovaskuläres Risiko durch den Gebrauch von Diclofenac entstehen könnte. Fosbøl et al. untersuchten im Zeitraum erster Januar 1997 bis 31ster Dezember 2005 eine gesunde Kohorte der dänischen Bevölkerung bezüglich der Einnahme von NSAR und damit verbundener kardiovaskulärer Ereignisse. In der hier durchgeführten Case-Crossover-Analyse zeigte sich eine signifikante Risikoerhöhung un-

ter Diclofenactherapie bezüglich kardiovaskulär bedingtem Tod im Allgemeinen, nicht tödlichem und tödlichem Herzinfarkt, sowie tödlichem und nicht tödlichem Schlaganfall. Dieses Risiko war besonders hoch, wenn eine Dosis von über 100 mg Diclofenac per die überschritten wurde^{94,95}. Wir verwendeten eine Diclofenacdosis, die etwa einer täglichen Dosis von 75 mg entspricht. Schon unter dieser Dosierung konnten wir eine vermehrte Thrombozyten-Endothel-Interaktion sowie eine verstärkte Thromboseneigung an Stellen verletzten Gefäßendothels feststellen. Da es bei längerer Einnahme von evtl. höheren Dosen Diclofenac zu einer weitreichenden COX-2-Hemmung kommen kann und damit die antithrombozytäre PgI₂-Bildung empfindlich gestört ist, ist es nicht verwunderlich, dass in klinischen Studien mit steigender Dosis auch die Raten fataler Nebenwirkungen wie Herzinfarkt und Schlaganfall steigen. Besonders eine ältere Patientenklientel hat häufig einige Vorerkrankungen wie beispielsweise eine koronare Herzkrankheit oder auch eine Herzinsuffizienz. Im Falle rheumatischer Erkrankungen, die eine Form systemischer Entzündung darstellen, kommt zu einer kardialen Vorerkrankung häufig eine Medikation mit spezifischen COX-Hemmstoffen oder NSAR hinzu. Ob eine systemische, oder im Falle der Atherosklerose, lokale Entzündungsreaktion einen zusätzlichen Risikofaktor für kardiovaskuläre Ereignisse darstellt, wird weiter unten behandelt werden. Schjerning Olsen et al. untersuchten, ebenfalls an einer Kohorte der dänischen Bevölkerung, 2011 das Risiko in Verbindung mit der Einnahmedauer von NSAR nach einem überlebten Myokardinfarkt zu versterben oder einen erneuten Myokardinfarkt zu erleiden⁹³. Hier zeigte sich bezüglich Diclofenac schon in der initialen Einnahmephase von Tag Null bis Sieben eine Hazard Ratio von 3,52 zu versterben und eine Hazard Ratio von 3,26 zu versterben oder einen Myokardinfarkt zu erleiden. Dies steht in Konkordanz mit unseren Beobachtungen, in denen schon eine einmalige Applikation von Diclofenac ausreichend war um das Atherothromboserisiko signifikant zu steigern.

(Die Tabellen 1- 3 geben eine Übersicht über die bisherigen Studien zu Diclofenac und dessen Wirkung im Gefäßsystem)

4.1.4 Parecoxib – Vergleich mit klinischen Daten

Obwohl Parecoxib in den in vivo Versuchen dieser Arbeit eine ähnliche Interaktion von Thrombozyten mit der Gefäßwand hervorrief wie Diclofenac, gibt es hinsichtlich der kardiovaskulären Gefährdung unter Parecoxibmedikation unterschiedliche klinische Daten. In einer retrospektiven Analyse von 17 Studien zu einer perioperativen Parecoxibmedikation und von 15 Studien zu einer Valdecoxibmedikation bei nicht am Herzen operierten Patienten ergab sich im Gegensatz zu den beiden Valdecoxib/Parecoxib-Studien zum postoperativen

Schmerzmanagement nach koronarer Bypassoperation (CABG)^{56,57} kein erhöhtes Risiko kardiovaskulärer Ereignisse im Vergleich mit der Placebogruppe⁹⁶. Einige Cyclooxygenasehemmer scheinen klinisch ähnliche Wirkungen hervorzurufen. Der oft in Frage gestellte Klasseneffekt bezüglich einer Atherothrombosegefährdung oder anderer (Neben-) Wirkungen wird durch die von uns bezüglich Parecoxib im Tierversuch erhobenen Daten unterstützt. Wie unter einer Medikation mit Diclofenac sahen wir ein vermehrtes Rollen und Haften der Thrombozyten an der Gefäßwand, eine signifikant verkürzte Gefäßverschlusszeit, sowie ein Kippen des Prostanoidgleichgewichtes zu Gunsten des prothrombogenen TxA₂. Wir sahen auf eine Parecoxibmedikation hin keine Abnahme der PGI₂-Spiegel, jedoch eine signifikante Zunahme des TxA₂ im Serum der Versuchstiere. Dies ist in klinischen Studien ebenfalls schon beobachtet worden^{87,88}. In diesem Fall ist das beobachtete Kippen des Prostanoidgleichgewichtes zu Gunsten des TxA₂ also nicht durch eine Abnahme des PGI₂-Spiegels bedingt, sondern durch eine Zunahme des TxA₂. Klinisch hat das den gleichen Effekt und somit kann von einem Klasseneffekt gesprochen werden. Eine Unterscheidung der Wirkmechanismen ist jedoch auch zur Risikoevaluation notwendig und bedarf weiterer Forschung.

(Tabelle 4 gibt eine Übersicht über die bisherigen Studien zu Parecoxib und dessen Wirkung im Gefäßsystem)

4.1.5 Vergleich mit anderen NSAR und ASS

Auch andere NSAR wie beispielsweise Ibuprofen oder Indomethacin zeigten in klinischen Studien erhöhte Raten kardiovaskulärer Ereignisse^{93,97}. So traten in der Case-Crossover-Analyse der oben erwähnten Studie von Fosbøl et al. unter einer Medikation mit Ibuprofen signifikant mehr Herzinfarkte und Fälle durch koronare Ischämie bedingten Todes und in hohen Dosierungen auch vermehrt Fälle eines Schlaganfalles auf⁹⁴. Interessanterweise war die kardiovaskulär bedingte Gesamtmortalität nicht erhöht. Auch andere Studien zeigten ein erhöhtes kardiovaskuläres Risiko unter Ibuprofentherapie^{89,91,97,98}. Zum kardiovaskulären Risiko anderer NSAR gibt es unterschiedliche Daten. So zeigten Roumie et al. in einer retrospektiven Kohortenstudie, die 610.001 Antragsteller des „Tennessee Medicaid“ über einen Zeitraum von 1999 bis 2005 einschloss, zwar kein erhöhtes kardiovaskuläres Risiko durch eine Einnahme von Ibuprofen (und auch Diclofenac) bei einer kardial nicht vorerkrankten Population, dafür aber ein erhöhtes Risiko durch die Einnahme von Indomethacin⁹⁹. Van Staa et al. fanden in einer retrospektiven Kohortenstudie, die 1.172.341 Personen der „General practice research database“ Großbritanniens über einen Zeitraum von 1987 bis 2006 untersuchte, unter einer Medikation mit Indomethacin ebenfalls ein erhöhtes kumulatives Risiko einen Myo-

kardinfarkt zu erleiden. Hier war auch ein erhöhtes kumulatives Risiko unter einer Medikation mit Diclofenac beobachtet worden⁹⁰. Für Naproxen gibt es nur wenig Evidenz einer eventuellen kardiovaskulären Gefährdung⁸⁹. Die Mehrzahl der Studien zeigt kein erhöhtes Risiko bezüglich Naproxen^{90,95,97,99-101}. Ein erhöhtes Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse besteht meist bei Einnahme hoher Dosen der jeweiligen Medikamente⁹¹. Paracetamol wirkt wohl, neben anderen Mechanismen, auch über eine Hemmung der COX-2 und der an diese gekoppelten PgES¹⁰² analgetisch. Außerdem hat es eine schwache, wenn auch deutlich stärker hemmende Wirkung auf die COX-1 als auf die COX-2¹⁰³ und wirkt damit in höheren Dosierungen antithrombotisch¹⁰⁴. In niedriger, subanalgetischer Dosis hemmt ASS vornehmlich die COX-1 und damit eine Produktion thrombozytenaggregationsfördernden TxA₂s. Niedrig dosiert wird ASS deshalb seit langem zur kardiovaskulären Protektion bei Patienten mit kardialen Risikofaktoren oder kardiovaskulären Ereignissen in der Anamnese verwendet. Häufig besteht eine Komedikation mit NSAR welche mit der Wirkung von ASS auf die COX konkurrieren können. So ist beispielsweise für Ibuprofen ein kompetitiver Antagonismus mit ASS um den Substratkanal der COX bekannt, der zu einer Abschwächung der TxA₂ reduzierenden und damit thrombozytenaggregationshemmenden Wirkung von ASS führt^{105,106}. Coxibe wiederum scheinen über ihre vornehmliche Wirkung auf die COX-2 keine Interaktion mit ASS bezüglich einer thrombozytenaggregationshemmenden Wirkung des ASS zu haben¹⁰⁶. Auch für Paracetamol ist keine Interaktion mit ASS bekannt. So zeigten Galliard-Grigioni et al. 2009 keine Änderung der PFA-100-Zeit unter einer Medikation mit ASS in Kombination mit Paracetamol im Vergleich zu ASS kombiniert mit Placebo. Diclofenac wiederum scheint in einem ähnlichen Mechanismus wie Ibuprofen ASS den Zugang zu seiner Bindungsstelle im Kanal der COX-1 zu versperren und verhindert damit eine irreversible Hemmung der Bildung von TxA₂ durch ASS¹⁰⁷. Diclofenac hat eine kürzere Halbwertszeit als ASS und somit werden kontinuierlich wieder Substratbindungsstellen für Arachidonsäure und damit für die Bildung von TxA₂ frei. Da allem Anschein nach lediglich Paracetamol (in klinisch gebräuchlicher Dosierung) und die spezifischen COX-2-Hemmer die COX-1 unbeeinflusst lassen, sollte bei Patienten mit Risikofaktoren für ein kardiovaskuläres Ereignis und dem Bedarf einer analgetischen/antirheumatischen Therapie eventuell eine Komedikation mit niedrig dosiertem ASS und einem Coxib oder auch mit Paracetamol erwogen werden.

4.2 Experimentelle Cyclooxygenasehemmung bei akuter Entzündung

Im Gefäßsystem besteht ein komplexes Zusammenspiel verschiedener Faktoren die die zelluläre Hämostase beeinflussen. Diese Faktoren sind unter anderem Stickstoffmonoxid (NO), die Eicosanoide oder auch eine Expression von Oberflächenrezeptoren. NO verhindert die Mehrexpression von COX-2 auf einen inflammatorischen Stimulus wie TNF α hin. Blais et al. konnten zeigen, dass nach intravenöser Applikation rekombinanten TNF α s die Expression der mRNA für COX-2 in Endothelzellen zerebraler Gefäße tendenziell zunimmt. Nach der zusätzlichen Applikation eines Inhibitors der NO-Synthetase (NOS) kam es jedoch zu einer signifikanten Mehrexpression der mRNA für COX-2 verglichen mit der alleinigen TNF α -Gabe¹⁰⁸. Hierbei handelte es sich wohl um die konstitutive, endotheliale Form der NOS. Anders als Blais et al. fanden Said et al. 2002 in humanen pulmonalen mikrovaskulären Endothelzellen keinen Einfluss von TNF α auf die Expression der COX-2. Hier steigerte TNF α lediglich eine durch Interleukin-1 β initiierte Mehrexpression der COX-2. Interessanterweise bewirkte der spezifische COX-2-Hemmer NS-398 hier keine Verminderung der 6-keto-PgF $_{1\alpha}$ -Synthese unter Kontrollbedingungen¹⁰⁹. In unseren Untersuchungen erhöhte TNF α die Bildung von PgI $_2$ und TxA $_2$ ebenfalls nicht signifikant gegenüber den Kontrollen. Damit scheint TNF α für eine steigernde Wirkung auf die COX-Expression auf Kofaktoren angewiesen zu sein. Zusätzlich könnte NO über eine durch TNF α verstärkte Bildung der induzierbaren Form der NOS¹¹⁰, durch eine Hemmung einer Mehrexpression der COX-2, einen PgI $_2$ -Anstieg unter TNF α -Einwirkung verhindert haben. Im Vergleich der Wirkung von Diclofenac ohne und mit dem Entzündungsmediator TNF α auf die Prostazyklinsynthese fällt auf, dass Diclofenac im Entzündungsmodell die Prostazyklinsynthese tendenziell stärker hemmte als im gesunden Organismus. Auch hier könnte NO über eine Hemmung der COX-2-Synthese zusätzlich zu der COX-Hemmung durch Diclofenac beteiligt gewesen sein. Bezüglich Parecoxib fanden sich keine signifikanten Unterschiede der 6-keto-PgF $_{1\alpha}$ -Spiegel im Serum der untersuchten Tiere. Auch eine Behandlung mit TNF α führte zu keinen signifikanten Veränderungen. Allerdings ließ sich wie in den Versuchen mit Diclofenac eine tendenzielle Verminderung der 6-keto-PgF $_{1\alpha}$ -Spiegel nach Kombination von Parecoxib und TNF α beobachten. Wie oben bereits erwähnt scheint die Parecoxibdosis eventuell zu gering gewesen zu sein um die COX-2 ausreichend zu hemmen. TNF α hatte auch hier keinen zusätzlichen Einfluss auf die TxB $_2$ -Spiegel. Die vermehrte Bildung von TxB $_2$ nach Parecoxibapplikation konnte auch im Entzündungsmodell beobachtet werden und wurde wie oben erwähnt bereits in Studien anderer Arbeitsgruppen beschrieben^{87,88}. Wenn auch keine Wirkung des TNF α auf die Prostanoidspiegel ge-

sehen wurde, so bleibt dennoch seine die Thrombozyten-Endothel-Interaktion und die arterielle Thrombusbildung fördernde Wirkung. Als proinflammatorisches Zytokin bewirkt TNF α eine vermehrte Expression von Oberflächenrezeptoren. So zeigten Gao et al. 2002 in einer in vitro Untersuchung an pulmonalen Endothelzellen eine Mehrexpression des $\alpha_v\beta_3$ -Integrins auf eine Stimulation mit TNF α hin¹¹¹. Das $\alpha_v\beta_3$ -Integrin ist ein wesentlicher Bestandteil der Thrombozyten-Endothel-Interaktion. Dies bewiesen Bombeli et al. schon 1998, als sie die Interaktion von Thrombozyten mit humanen Endothelzellen der Umbilikalvene (HUVEC) untersuchten. Sie fanden eine verminderte Adhäsion thrombinaktivierter Thrombozyten nach Blockade der endothelialen Adhäsionsmoleküle interzelluläres Adhäsionsmolekül (ICAM)-1, $\alpha_v\beta_3$ -Integrin sowie GPIb α . Antikörper, die das thrombozytäre Adhäsionsmolekül GPIIb/IIIa und die zwischen dem GPIIb/IIIa und endothelialen Adhäsionsmolekülen verbindenden Proteine Fibrinogen, Fibronectin und vWF hemmten, führten ebenfalls zu einer verminderten Thrombozytenadhäsion. Keinen Einfluss hatte eine Hemmung der thrombozytären Oberflächenmoleküle β_1 -Integrin, GPIb α , GPIV, P-Selektin und des Thrombozyten-Endothelzell-Adhäsionsmoleküls (PECAM)-1 und der endothelialen Moleküle β_1 -Integrin, E-Selektin, P-Selektin, PECAM-1 und des vaskulären Zelladhäsionsmoleküls (VCAM)-1¹¹². Auch in unserer Untersuchung fanden wir eine signifikante Mehrexpression des β_3 -Anteiles der Adhäsionsrezeptordimere, wie beispielweise das $\alpha_v\beta_3$ -Integrin eines ist, auf eine Inkubation von HMEC mit TNF α hin. Somit scheint ein Hauptmechanismus der TNF α -induzierten Thrombozyten-Endothel-Interaktion in unseren in vivo Versuchen dessen Wirkung auf die Expression von Oberflächenrezeptoren zu sein. TNF α führte hingegen nicht zu einer vermehrten Expression von P-Selektin (Daten werden nicht gezeigt). Diclofenac bzw. Parecoxib allein bewirkten eine allenfalls tendenzielle Verminderung des β_3 -Integrins unter Kontrollbedingungen. Parecoxib verminderte jedoch die durch TNF α hochsignifikante Mehrexpression des β_3 -Integrins. In den in vivo Experimenten führte eine Kombination von Parecoxib mit TNF α zu einer im Vergleich mit der Kombination von Diclofenac und TNF α nicht so stark ausgeprägten Verlangsamung der Thrombozytengeschwindigkeiten. Hier könnte eine Hemmung der durch TNF α initiierten Adhäsionsrezeptorexpression durch Parecoxib ursächlich sein. Eine Hemmung der Aktivierung des thrombozytären Oberflächenmoleküls $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Integrin durch einige NSAR wurde von Domínguez-Jiménez et al. 1999 beschrieben¹¹³. Diclofenac hatte hier keinen Einfluss auf das $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Integrin. Hinsichtlich einer Wirkung auf Integrine im Gefäßsystem durch Parecoxib gibt es bislang keine Daten. Dies könnte dennoch eine zusätzliche Rolle spielen und erfordert weitere Forschung.

4.2.1 Thrombozytenaktivierung unter entzündlichen Bedingungen

Wie im obigen Abschnitt beschrieben kommt es unter entzündlichen Bedingungen zu starken intravaskulären Veränderungen. Diese haben auch Auswirkungen auf die Zellen des Blutes wie beispielsweise auf Thrombozyten. Thrombozyten enthalten verschiedene Formen von Speichergranula, in denen Moleküle und Proteine enthalten sind. Diese tragen, werden sie auf eine Stimulation der Thrombozyten hin freigesetzt, zu einer weiteren Aktivierung von Thrombozyten und Endothelzellen sowie zu inflammatorischen Prozessen im Gefäßsystem bei. Die dichten Granula enthalten beispielsweise unter anderem die thrombozytenaktivierenden Faktoren Ca^{2+} , Adenosindiphosphat und Serotonin, die α -Granula Adhäsionsmoleküle wie P-Selektin, vWF, $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ -Integrin, $\alpha_v\beta_3$ -Integrin und Gerinnungsfaktoren¹¹⁴. Thrombozyten besitzen Rezeptoren für $\text{TNF}\alpha$ (TNFR-1 und -2)¹¹⁵. Die unter inflammatorischen Bedingungen erhöhten Spiegel an $\text{TNF}\alpha$ können über diese Rezeptoren zu einer vermehrten Sekretion der in Thrombozyten gespeicherten aktivierenden Faktoren und Adhäsionsmoleküle führen und somit eine Thrombozytenaktivierung und -adhäsion fördern. Die Expression des CD40-Liganden (CD40L), einem Subtyp der Tumornekrosefaktorligandensuperfamilie, der von Thrombozyten ebenfalls exprimiert wird, wird durch $\text{TNF}\alpha$ gefördert¹¹⁵. CD40L bewirkt eine Hochregulation von Adhäsionsmolekülen auf Endothel- und anderen vaskulären Zellen, von weiteren proinflammatorischen Chemokinen, Matrixmetalloproteinasen (diese können Peptidbindungen in Proteinen spalten) und von Tissue Factor (Faktor III der Blutgerinnungskaskade). Des Weiteren kann er an das thrombozytäre Adhäsionsmolekül $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ -Integrin binden und dadurch die Thrombozytenaktivierung und -vernetzung weiter verstärken¹¹⁶. Die endotheliale Synthese von NO wird durch Bindung von CD40L an den endothelialen Oberflächenrezeptor CD40 vermindert und es kommt zu einer vermehrten Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS)¹¹⁷. Auch ROS können eine verstärkte Thrombozytenaktivierung hervorrufen¹¹⁸⁻¹²⁰. Es werden also unter entzündlichen Bedingungen auch von thrombozytärer Seite Mechanismen in Gang gesetzt, die dem antithrombozytären Effekt des Pgl_2 entgegenwirken und damit das Atherothromboserisiko steigern. $\text{TNF}\alpha$ scheint allerdings in den in unseren Untersuchungen verwendeten Dosen keinen direkten Einfluss auf die Thrombozytenaktivierung zu haben. In Aggregometeruntersuchungen zur Thrombozytenaktivierung konnten wir keine erhöhte Aktivierbarkeit nach Inkubation der Thrombozyten mit $\text{TNF}\alpha$ in humanem PRP nachweisen (die Daten werden in dieser Arbeit nicht gezeigt). Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen Cambien et al. 2003 ebenfalls in Aggregometeruntersuchungen¹²¹. Es sind demnach, neben den durch Thrombozyten freigesetzten oder auf deren Oberfläche präsentier-

ten Faktoren, weitere Faktoren für eine Thrombusbildung notwendig. Wird nun durch Atherosklerose oder eine Manipulation an den Koronararterien wie bei koronaren Katheterinterventionen das Endothel zusätzlich beansprucht, was beispielsweise zu freiliegenden Kollagenfasern an atheromatösen Plaques führen kann, so können dort in einem durch die intravasale Entzündung prothrombogenen Milieu Thrombozyten verstärkt aktiviert werden. Hierdurch steigt das Atherothromboserisiko weiter.

4.2.2 Klinische Bedeutung für die Anwendung von Cyclooxygenasehemmstoffen bei entzündlichen Erkrankungen

Die ersten Berichte eines erhöhten kardiovaskulären Risikos durch spezifische Cyclooxygenasehemmstoffe (VIGOR 2000⁶, APPROVe 2004^{7,8}) führten nicht nur zu einer Rücknahme des spezifischen COX-2-Hemmers Rofecoxib vom Weltmarkt und einer „Black Box“-Warnung für Celecoxib¹²² sondern sogar zu einer allgemeinen Warnung der US Food and Drug Administration (FDA) und der European Medicine Agency (EMA) bezüglich eines unreflektierten Gebrauches von Cyclooxygenasehemmern. Gemäß den Empfehlungen der EMA sind alle COX-2-Inhibitoren bei Patienten mit einer ischämischen Herzerkrankung oder einem stattgehabten zerebralen Insult kontraindiziert. Etoricoxib sollte bei Patienten mit nicht eingestelltem Hypertonus nicht verschrieben werden. Des Weiteren sollte eine besondere Vorsicht bezüglich einer Medikation mit COX-2-Inhibitoren geboten sein, wenn die Patienten Risikofaktoren für eine Herzerkrankung bieten. Diese wären beispielsweise ein Bluthochdruck, eine Hyperlipidämie, ein Diabetes mellitus, das Rauchen oder auch eine periphere arterielle Verschlusskrankheit. Da das kardiovaskuläre Risiko mit der Dauer und Dosis der Medikamenteneinnahme steigt, sollte außerdem versucht werden mit der geringstmöglichen Dosis und Therapiedauer auszukommen^{123,124}. Wir konnten zeigen, dass schon eine einmalige intravenöse Medikamentenapplikation in einer Dosis von einem Milligramm Diclofenac bzw. Parecoxib pro Kilogramm Körpergewicht zu einer signifikant verstärkten Thrombozyten-Endothel-Interaktion und einer signifikant verkürzten Gefäßverschlusszeit nach traumatischer Gefäßwandverletzung führt. Allerdings kam es nicht spontan zu einem thrombotischen Gefäßverschluss. Übertragen auf den klinischen Gebrauch von Diclofenac bzw. Parecoxib bedeutet dies, dass eine einmalige Applikation der Medikamente die Atherothrombosebereitschaft im Gefäßsystem steigert. Es bedarf aber scheinbar einer länger andauernden Wirkung der Medikamente auf das Endothel und die Zellen des Blutes und zusätzlich einer prothrombogenen Prädisposition des arteriellen Gefäßsystems, beispielsweise durch Gefäßwandverletzungen, um letztlich zu einer Thrombusbildung zu führen. Eine intravasale Entzündung, in unseren

Untersuchungen hervorgerufen durch intravenös verabreichtes TNF α , trägt wie oben beschrieben und in unseren Versuchen beobachtet ebenfalls zu einer vermehrten Thrombozyten-Endothel-Interaktion bei. Auch hier kam es nicht zu einer spontanen Thrombusbildung. Eine intravasale Entzündung ist somit ebenfalls lediglich als Kofaktor einer arteriellen Thrombusbildung zu verstehen. Im Falle des Krankheitsbildes der Arthrosklerose, das oft Ursache einer Einnahme von NSAR und spezifischen COX-2-Hemmern ist, kommen nun mehrere Faktoren zusammen. Bei den meist älteren Patienten besteht oft zusätzlich eine Atherosklerose in mehr oder weniger ausgeprägter Form, durch die Gelenkentzündung finden sich intravasal erhöhte Spiegel von Entzündungsmediatoren und nun trägt eine Einnahme von Cyclooxygenasehemmstoffen (häufig Diclofenac) zusätzlich zu einer Steigerung des Atherothromboserisikos bei. Aufbrechende atheromatöse Plaques oder eine mechanische Verletzung des Endothels wie im Falle der arteriellen Bypass-Graft-Studie (CABG)⁵⁶ sind dann in der Folge Auslöser der definitiven Thrombusbildung. Im perioperativen Bereich werden ebenfalls häufig Cyclooxygenasehemmer zur analgetischen Therapie verwendet. Hier kann es bei vorbestehender Atherosklerose und damit häufig einhergehender Koronarsklerose, durch ein zusätzliches Kippen des Gleichgewichtes der Prostanoidspiegel zugunsten von TxA₂, durch den Gebrauch von Cyclooxygenasehemmern zu einer verstärkten Thrombozytenaktivierung und damit zu kardiovaskulären Ereignissen kommen. Des Weiteren gehen viele der chirurgisch zu behandelnden Erkrankungen mit einer lokalen bis systemischen Entzündungsreaktion einher. Ein hierdurch bedingter prothrombogener Status kann durch eine zusätzliche Cyclooxygenasehemmung weiter verstärkt werden.

Tabelle 1: Metaanalysen von Beobachtungsstudien über das kardiovaskuläre Risiko unter Diclofenacmedikation

RR= risk ratio, OR= Odds ratio, HR= hazard ratio, (A)MI= (akuter) Myokardinfarkt, CV= kardiovaskulär, CVE= kardiovaskuläre Erkrankung, HF= Herzversagen, GI= gastrointestinal, CI= Konfidenzintervall

Autor, Datum, Studienart	Teilnehmer n=	Studienpopulation/ eingeschlossene Studien	Hypothese/ Gegenstand der Untersuchung	CV-Risiko untersuchte Medikamente	OR/RR (95 % CI)
Trelle 2011 ¹²⁵ Netzwerk Meta-analyse	116.429	31 randomisierte, kontrollierte Studien, die sieben verschiedene NSAR untersuchten, davon sieben mit Diclofenac vergleichend	Primäres Outcome: fataler oder nichtfataler MI	RR vs. Placebo für MI/CV-Tod	
				Naproxen	0,82/0,98
				Ibuprofen	1,61/2,39
				Diclofenac	0,82/3,98
				Celecoxib	1,35/2,07
				Etoricoxib	0,75/4,07
Rofecoxib	2,12/1,58				
Lumiracoxib	2,00/1,89				
Chen 2007 ¹²⁶ Systematisches Review und Metaanalyse randomisierter, kontrollierter Untersuchungen	99.087	MEDLINE (1966- 2006) EMBASE (1980- 2006) „Cochrane Database of systematic reviews“ und „Cochrane central register of controlled trials“ (Issue 2, 2006) 55 Studien, davon 12 mit Diclofenac vergleichend	Risiko eines MI verbunden mit der Einnahme von Coxiben, im Vergleich zu Placebo, NSAR und den Coxiben untereinander	OR, Vergleich COX-2-Hemmer/Diclofenac	
				Rofecoxib vs. Diclofenac	0,42
				Celecoxib vs. Diclofenac	1,28
				Etoricoxib vs. Diclofenac	1,61
				Valdecoxib vs. Diclofenac	0,14
Singh 2006 ¹⁰⁰ Metaanalyse von Beobachtungsstudien		Elektronische Datenbanken (Jan 1980- Juni 2005) Fünf Studien zu Diclofenac ¹²⁷⁻¹³¹ , neun zu Ibuprofen, 12 zu Naproxen	Primäres Outcome: objektiv diagnostizierter AMI in Verbindung mit einer Einnahme von NSAR	zusammengefasste RR für AMI	
				alle NSAR	1,19
				Diclofenac	1,38
				Ibuprofen	1,11
				Naproxen	0,99
McGettigan 2006 ¹⁰¹ Systematisches Review und Metaanalyse	<u>Fallkontrollstudien:</u> CV-Ereignisse n= 86.193 Kontrollen n= 528.000 <u>Kohortenstudien:</u> selektive COX-2-Inhibitoren n= 75.520 NSAR n= 375.619 Kontrollen n= 594.720	Elektronische Datenbanken (1985- Jan 2006) Wissenschaftliche Sitzungen, epidemiologische Wissenschaftsseiten, Bibliographien ausgewählter Studien 17 Fallkontroll-, sechs Kohortenstudien	Systematisches Review und Metaanalyse kontrollierter Beobachtungsstudien um das Risiko schwerer CV-Ereignisse mit NSAR und Coxiben zu vergleichen	zusammengefasste RR	
				Rofecoxib ≤ 25 mg/d	1,35
				Rofecoxib > 25 mg/d	1,33
				Celecoxib	2,19
				Celecoxib	1,06
				Diclofenac	1,40
				Naproxen	0,97
				Piroxicam	1,06
				Ibuprofen	1,07
				Indomethacin	1,30
Kearney 2006 ⁹⁷ Metaanalyse randomisierter Studien	145.373	138 Studien die eine selektive COX-2-Hemmer-Einnahme > 4 Wochen mit Placebo oder NSAR vergleichen (Jan 1966- Apr 2005)	Auswirkung selektiver COX-2-Hemmer und NSAR auf das kardiovaskuläre Risiko	Zusammengefasste RR für CV-Ereignisse im Vergleich zu Placebo:	
				Coxibe	1,42
				Diclofenac	1,63
				Ibuprofen	1,51
				Naproxen	0,92

Tabelle 2: Retrospektive Kohortenstudien mit der Fragestellung ob NSAR das Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse erhöhen

RR= risk ratio, OR= Odds ratio, HR= hazard ratio, IRR= incidence rate ratio, RD= Risikodifferenz, (A)MI= (akuter) Myokardinfarkt, CV= kardiovaskulär, CVE= kardiovaskuläre Erkrankung, HF= Herzversagen, GI= gastrointestinal, KHK= koronare Herzkrankheit, AP= Angina pectoris

Autor, Datum, Studienart	Teilnehmer n=	Studienpopulation	Hypothese/Gegenstand der Untersuchung	CV-Risiko untersuchte Medikamente	Adj. RR/HR/OR/IRR (95 % CI)
Schjerning Olsen 2011 ⁹³ Retrospektive Kohortenstudie	83.675	Krankenhausaufnahme mit einem Erstereignis eines MI und Überleben des MI; „Danish National Patient Registry“, „Danish Registry of Medicinal Product Statistics“ und „Central Person Registry“ Alter: ≥ 30Jahre (Jan 1997- Dez 2006)	Risiko von Tod oder erneutem MI in Verbindung mit der Dauer einer NSAR-Einnahme	HR in Abhängigkeit der Einnahmedauer	
				<u>0- 7/ 7- 14 Tage</u>	
				alle NSAR	1,34/1,82
				Rofecoxib	1,04/2,57
				Celecoxib	1,10/1,39
				Ibuprofen	0,92/1,57
				Diclofenac	3,52/2,57
				Naproxen	1,63/1,60
				andere NSAR	1,01/1,51
				<u>14- 30/ 30- 90 Tage</u>	
				alle NSAR	1,58/1,86
				Rofecoxib	2,11/1,97
				Celecoxib	2,33/1,74
				Ibuprofen	1,43/1,91
				Diclofenac	2,08/2,61
Naproxen	1,22/1,31				
andere NSAR	1,40/1,69				
<u>≥ 90 Tage</u>					
alle NSAR	1,56				
Rofecoxib	1,57				
Celecoxib	1,71				
Ibuprofen	1,52				
Diclofenac	2,02				
Naproxen	1,55				
andere NSAR	1,53				
Ray 2009 ¹³² Retrospektive Kohortenstudie	48.566	Krankenhauseinweisung aufgrund eines AMI, zur koronararteriellen Revascularisierung oder bei instabiler AP; „Tennessee’s expanded medicaid program“, „Saskatchewan health databases“ in Kanada, „UK General Practice Research Database“ Alter: 40- 89 Jahre (Jan 1999- Dez 2004)	Kardiovaskuläres Risiko von NSAR unter Patienten die aufgrund einer schweren KHK stationär aufgenommen wurden; Primärer Endpunkt: AMI oder kardiovaskulärer Tod	IRR bzgl. eines AMI oder kardiovaskulären Todes vs. keiner Medikamenteneinnahme/Naproxen	
				Naproxen	0,88/1,00
				Ibuprofen	1,18/1,34
				Diclofenac	1,27/1,44
				Celecoxib	1,03/1,16
				Rofecoxib	1,19/1,35
				<u>IRR Dosisabhängigkeit</u>	
				Naproxen < 1000 mg	1,22
				≥ 1000 mg	0,78/1,00
				Ibuprofen ≤ 1600 mg	0,99/1,27
				> 1600 mg	1,35/1,73
				Diclofenac < 150 mg	1,65/2,12
				≥ 150 mg	0,97/1,24
				Celecoxib ≤ 200 mg	0,94/1,20
				> 200 mg	1,26/1,61
Rofecoxib ≤ 25 mg	1,12/1,44				
> 25 mg	1,79/2,29				
Roumie 2009 ⁹⁹ Retrospektive Kohortenstudie	610.001 davon ohne CVE n= 525.249 mit CVE n= 84.752	Antragsteller des „Tennessee Medicaid“ Alter: 35- 94 Jahre (Jan 1999- Dez 2005)	Verbindung von NSAR mit einem erhöhten Risiko für MI, Schlaganfall oder Tod aufgrund einer KHK	angepasste HR für CV-Ereignisse keine CVE/mit CVE:	
				Rofecoxib	1,21/1,21
				Celecoxib	1,00/0,92
				Valdecoxib	1,30/0,99
				Diclofenac	1,02/1,01
				Ibuprofen	1,03/1,02
				Naproxen	1,00/0,88
				Indomethacin	1,36/0,97

Autor, Datum, Studienart	Teilnehmer n=	Studienpopulation	Hypothese/ Gegenstand der Untersuchung	CV-Risiko untersuchte Medikamente	Adj.HR/ HR/OR (95 % CI)
Gislason 2009⁸⁹ Retrospektive Kohortenstudie	107.092	Überlebende einer ersten Krankenhaus- einweisung aufgrund eines Herzversagens zwischen Jan 1995 und Dez 2004	Risiko von Tod und Kranken- hauswiederein- weisung aufgrund von MI oder Herzversagen in Verbindung mit NSAR; Dosisab- hängig-keit	HR für Tod/HF/MI Rofecoxib alle Dosen ≤ 25 mg/d > 25 mg/d Celecoxib alle Dosen ≤ 200 mg/d > 200 mg/d Diclofenac alle Dosen ≤ 100 mg/d > 100 mg/d Ibuprofen alle Dosen ≤ 1200 mg/d > 1200 mg/d Naproxen alle Dosen ≤ 500 mg/d > 500 mg/d andere NSAR	1,70/1,40/1,30 1,42/1,33/1,26 3,54/1,86/1,59 1,75/1,24/1,38 1,34/1,24/1,33 2,72/1,26/1,50 2,08/1,35/1,36 1,31/1,34/1,14 5,54/1,42/2,43 1,31/1,16/1,33 0,99/1,16/1,31 2,83/1,18/1,47 1,22/1,18/1,52 0,88/1,18/1,47 1,97/1,18/1,62 1,28/1,27/1,32
Fosbøl 2009^{94,95} Retrospektive Kohortenstudie	1.028.437	Gesunde dänische Bevölkerung	Risiko für Tod und MI in Ver- bindung mit einer NSAR-Einnahme	HR für Tod/MI ⁹⁵ Rofecoxib Celecoxib Diclofenac Ibuprofen Naproxen dosisabhängiger Risikoanstieg unter selektiven Coxiben und Diclofenac	2,13 2,01 1,63 1,01 0,97
van der Linden 2009⁹⁸ Fallkontroll- studie	>2 Millionen Fälle:Kontrolle n= 1:4	Einwohner der Niederlande mit ei- ner ersten Kranken- hauseinweisung auf- grund eines AMI, ei- ner CVE oder eines GI-Ereignisses (Jan 2001- Dez 2004)	Inzidenz von AMI, CVE und GI-Ereignissen bei Personen mit länger zurücklie- gendem, kürz- lichem und mo- mentanem Ge- brauch von Coxi- ben und NSAR	Vergleich zu vergangener Einnahme von NSAR; OR für AMI/CVE Rofecoxib Celecoxib Diclofenac Ibuprofen Naproxen	1,60/1,41 2,53/1,64 1,51/1,26 1,56/1,18 1,21/1,18

Autor, Datum, Studienart	Teilnehmer n=	Studien-population	Hypothese/ Gegenstand der Untersuchung	CV-Risiko untersuchte Medikamente	Adj.HR/ HR/OR (95 % CI)
van Staa 2008 ⁹⁰ Retrospektive Kohortenstudie	1.172.341 Konsumenten von NSAR n= 729.294 Kontrollen n= 443.047	„General practice research database“, UK Alter > 40 Jahre (1987- 2006)	Risiko eines MI mit Diclofenac, Ibuprofen und Naproxen; Abhängigkeit von der Anzahl der Verschreibungen/ Tagesdosis	RR für MI: Zahl der NSAR-Verschreibungen 0-4 ≥ 30 Diclofenac: < 150 mg ≥ 300 mg Ibuprofen: < 1200 mg ≥ 2400 mg Naproxen < 1000 mg ≥ 1000 mg Kumulatives Risiko: Diclofenac Ibuprofen Naproxen Indomethacin Piroxicam	1,05 1,49 1,13 2,03 1,05 1,96 0,99 0,92 1,21 1,04 1,03 1,27 1,01
Jick 2007 ¹³³ Fallkontrollstudien	<u>Diclofenac</u> 806 Fälle 3216 Kontrollen <u>Ibuprofen</u> 928 Fälle 3703 Kontrollen <u>Naproxen</u> 312 Fälle 1228 Kontrollen	„General Practice research Database“, UK Alter: 30- 79 Jahre (Jan 1993- Dez 2000)	Fälle von AMI verbunden mit Diclofenac, Ibuprofen und Naproxen	bereinigte RR >/= 2 Verschreibungen mit nur einer vergleichend Diclofenac Ibuprofen Naproxen Risiko verbunden mit der Zahl der Diclofenacverschreibungen 2- 4 5- 9 > 20	1,30 1,10 1,10 1,20 1,40 2,00
Rahme 2007 ¹³⁴ Retrospektive Kohortenstudie	283.784 Rofecoxib n= 91.062 Celecoxib n= 127.928 Diclofenac n= 49.193 Ibuprofen n= 15.601	„Government of Quebec health insurance data base“ Alter 65-80 Jahre Verschreibung der Studienmedikation 1999- 2002	Assoziation des Risikos einer Krankenhausaufnahme aufgrund eines AMI mit der Einnahme von Rofecoxib, Celecoxib, Diclofenac und Ibuprofen in einer älteren Population	bereinigte HR für AMI: niedrige/hohe Dosen; kurze/lange Einnahmedauer Rofecoxib vs. Diclofenac Celecoxib vs. Diclofenac Ibuprofen vs. Diclofenac	0,93/1,08/ 1,02/0,98 0,89/0,60/ 0,92/0,87 0,94/0,62/ 0,79/1,04
Rahme 2007 ¹³⁵ Retrospektive Kohortenstudie	Personenjahre einer Exposition: Keine Einnahme/Einnahme von Aspirin: Paracetamol 75.761/38.048 Rofecoxib 42.671/14.671 Celecoxib 65.860/22.875 NSAR 37.495/9832	„Government of Quebec health insurance data base“ Alter > 65 Jahre Verschreibung der Studienmedikation 1999-2002	Risiko einer Krankenhausaufnahme aufgrund eines AMI oder einer GI-Blutung unter Älteren mit Cox-2-Hemmer-, NSAR- oder Paracetamoleinnahme	HR einer stationären Aufnahme <u>Keine Aspirinkomedikation:</u> Rofecoxib Celecoxib Diclofenac Ibuprofen Naproxen Paracetamol <u>Aspirinkomedikation:</u> Rofecoxib Celecoxib Diclofenac Ibuprofen Naproxen Acetaminophen	Referenz 1,14 0,97 1,17 1,04 1,16 1,28 1,17 1,25 1,39 1,03 1,18

Autor, Datum, Studienart	Teilnehmer n=	Studienpopulation	Hypothese/ Gegenstand der Untersuchung	CV-Risiko untersuchte Medikamente	Adj.HR/ HR/OR (95 % CI)
Schneeweiss 2006 ¹³⁶ Instrumentelle variable Analyse	49.711 Rofecoxib n= 12.232 Celecoxib n= 19.842 Diclofenac n= 1817 Ibuprofen n= 5353 Naproxen n= 4139	„Medicare and drug benefit program“, Pennsylvania Alter ≥ 65 Jahre Jan 1999- Dez 2002	Risikoerhöhung für GI-Komplikationen und MI innerhalb von 180 Tagen nach Beginn einer NSAR-Therapie	AMI-RD pro 100:	
				Celecoxib Rofecoxib Diclofenac Ibuprofen Naproxen	Referenz 1,40 6,07 -0,01 -0,30
Gislason 2006 ⁹¹ multivariable „proportional hazard modell, case crossover“ Analyse	58.432 Rofecoxib n= 3022 Celecoxib n= 2489 Diclofenac n= 6172 Ibuprofen n= 10.230 andere NSAR n= 7449	„Danish administrative registers“ 1995- 2002 Klinikwiederaufnahme n= 9773 Tod n= 16.573	Risiko für eine Wiederaufnahme in eine Klinik oder für Tod verbunden mit der Einnahme von NSAR bei Patienten mit vorrangegangenem MI	HR für Tod/Re-MI	
				Rofecoxib ≤ 25mg/d > 25mg/d Celecoxib ≤ 200mg/d > 200mg/d Diclofenac ≤ 100mg/d > 100mg/d Ibuprofen ≤ 1200mg/d > 1200mg/d Andere NSAR	2,80/1,63 2,49/1,68 5,26/1,27 2,57/1,50 1,92/1,47 4,69/1,64 2,40/1,54 0,89/1,27 4,44/1,89 1,50/1,25 0,75/1,28 2,20/1,22 1,29/1,27
Solomon 2006 ¹³⁷ Retrospektive Kohortenstudie	98.370 Einnahme von NSAR/Coxiben n= 74.838 Kontrollen n= 23.532	„Medicare and drug benefit program beneficiaries for low-to-moderate-income older adults in Pennsylvania“ Neueinnahme von NSAR/Coxiben Jan 1999- 2003	CV-Risiko, Zeitverlauf des Risikos und Abhängigkeit vom Ausgangsrisiko verbunden mit Coxiben, NSAR und kombinierter Medikation	Bereinigte RR für MI/Apoplex	
				Celecoxib Rofecoxib Valdecoxib Diclofenac Ibuprofen Naproxen Andere NSAR Keine Einnahme	0,99/1,00 1,16/1,15 1,06/0,93 1,43/0,98 1,02/0,95 0,67/0,83 0,77/1,02 Referenz
Andersohn 2006 ⁹² Vielschichtige Fall-Kontroll-Studie	486.378 n= 3643 Fälle n= 13.918 Kontrollen	„UK General practice database“, mindestens eine NSAR-Verschreibung zwischen Juni 2000- Okt 2004	Risiko eines MI mit Erst- und Zweitgenerations COX-2-Inhibitoren	Multivariate Rate Ratio für AMI:	
				Etoricoxib ≤ 60mg/d > 60mg/d Rofecoxib < 25 mg/d ≥ 25mg/d Celecoxib ≤ 200mg/d > 200mg/d Valdecoxib Diclofenac ≤ 100mg/d > 100mg/d Ibuprofen ≤ 1200mg/d > 1200mg/d Naproxen ≤ 750mg/d > 750mg/d	2,09 1,51 2,80 1,29 1,01 1,58 1,56 1,44 2,46 4,60 1,37 1,31 1,35 1,04 0,99 1,14 1,15 1,19 1,05

Tabelle 3: Randomisierte, doppelblinde Studien über das kardiovaskuläre Risiko von Diclofenac

Autor, Datum, Studienart	Teilnehmer n=	Studienpopulation	CV-Risiko	HR (95 % CI)
Combe 2009 ¹⁰ Randomisierte, doppel verblindete Studie	23.504 Etoricoxib 60 mg/d; n= 6769 90 mg/d; n= 5012 Diclofenac n= 11.717	MEDAL durchschnittliches Alter ≥ 50 Jahre Etoricoxib 60mg/d und 90mg/d Diclofenac 150mg/d durchschnittliche Behandlungsdauer 19,4- 20,8 Monate	Atherothrombotische Ereignisse, Analyse gemäß Protokoll:	
			Etoricoxib/Diclofenac	0,99
			Blutdruckerhöhung/mmHg	
			Etoricoxib	3,4- 3,6
			Diclofenac	0,9- 1,9
Krueger 2008 ¹³⁸ Randomisierte, doppel verblindete Studie	4086 Etoricoxib n= 2032 Diclofenac n= 2054	EDGE II durchschnittliches Alter 60,8 Jahre mit RA Etoricoxib 90mg/d, Diclofenac 2x 75mg/d durchschnittliche Behandlungsdauer 19,1/19,3 Monate (Etoricoxib/Diclofenac)	Rate kardialer Ereignisse:	
			Etoricoxib	0,83
			Diclofenac	1,14
			AMI:	
			Etoricoxib	0,43
			Diclofenac	0,68
Baraf 2007 ¹³⁹ Randomisierte, doppel verblindete Studie	7111 Etoricoxib n= 3593 Diclofenac n= 3518	EDGE durchschnittliches Alter 64 Jahre mit OA Etoricoxib 90mg/d, Diclofenac 3x 50mg/d durchschnittliche Behandlungsdauer 9,3/8,9 Monate (Etoricoxib/Diclofenac)	Rate thrombotischer Ereignisse/100 Patientenjahre:	
			Etoricoxib	1,25
			Diclofenac	1,15
			Therapieabbruch aufgrund eines Hypertonus:	
			Etoricoxib	2,3 %
			Diclofenac	0,7 %
Cannon 2006 ^{9,10 138,139} Randomisierte, doppel verblindete Studie	34.701 (MEDAL, EDGE I, II)	„MEDAL program“ 24.917 Patienten mit OA 9787 Patienten mit RA Etoricoxib 90/60mg/d Diclofenac 2x 75mg/d durchschnittliche Behandlungsdauer 18 Monate	Atherothrombotische Ereignisse, Analyse gemäß Protokoll:	
			Etoricoxib/Diclofenac	0,95
			Rate/100 Patientenjahre:	
			Etoricoxib	1,24
			Diclofenac	1,30

MEDAL program- „Multinational Etoricoxib and Diclofenac Arthritis Long-term program“; primärer Endpunkt: keine Unterlegenheit von Etoricoxib vs. Diclofenac bzgl. eines Risikos kardiovaskulärer Ereignisse
EDGE- „Etoricoxib versus Diclofenac Sodium Gastrointestinal Tolerability and Effectiveness Study“

Tabelle 4: Studien zur Effektivität und zu Nebenwirkungen einer Parecoxib und/oder Valdecoxibmedikation

Autor, Datum, Studienart	Teilnehmer n=	Studienpopulation/ eingeschlossene Studien	Hypothese/ Gegenstand der Untersuchung	CV-Risiko untersuchte Medikamente	OR/RR/HR (95 % CI)
Schug 2009 ⁹⁶ gepoolte post hoc Analyse	17 Parecoxibstudien Gesamt n= 4881 Parecoxib n= 2966 Placebo n= 1915 15 Valdecoxibstudien gesamt n= 3630 Valdecoxib n= 2319 Placebo n= 1311 Sekundäranalyse aller 32 Studien n= 8511 Parecoxib+ Valdecoxib n= 5285 Placebo n= 3226	17 Parecoxibstudien, 15 Valdecoxibstudien Cutoff-Datum 31. Dez 2004	Erhöhen Parecoxib und Valdecoxib das CV-Risiko bei nicht kardiologischen Patienten?	Inzidenz CV-Ereignisse 17 Parecoxibstudien Parecoxib Placebo Sekundäranalyse aller 32 Studien Parecoxib/ Valdecoxib Placebo	0,44 % 0,37 % 0,40 % 0,50 %
Riest, 2008 ¹⁴⁰ Randomisierte, Placebo kontrollierte Studie	n= 320		Effektivität prä-/postoperativen Parecoxibs bei post Diskektomie-Schmerzen	Keine Unterschiede bezüglich Blutdruck, Myokardinfarkt, Schlaganfall, Lungenembolie, TVT oder GI-Blutung von Parecoxib/Valdecoxib vs. Placebo	
Borgdorff 2006 ⁷⁸ experimentelle Studie			Auswirkung von Parecoxib auf Schehrstress induzierte Thrombozytenaggregation in vivo in einem Rattenmodell eines Bypasses mit fokaler Engstelle	Thrombozytenaggregation vs. Kontrolle Parecoxib 20 mg/kg 150 mg/kg low dose Aspirin 25 mg/kg Parecoxib+ Clopidogrel Parecoxib+ Aspirin	188 % 146 % 68 % 92 % 177 %
Nussmeier 2006 ¹⁴¹ sponsoreninitiiert, randomisiert, doppelt verblindet	n= 1062 Parecoxib/ Valdecoxib n= 533 Placebo n= 529	113 Zentren in 14 Ländern Alter 18- 80 Jahre, ASA I- III, BMI ≤ 40 ≥ 55kg KG Sept 2002 bis Feb 2003	Untersuchung der Sicherheit und analgetischen Effizienz von Parecoxib und Valdecoxib bei Patienten mit einer nicht kardialen Operation	RR CV-Ereignis Parecoxib/Valdecoxib vs. Placebo: 1,0	
Aldington 2005 ¹⁴² systematisches Review und Metaanalyse randomisierter, kontrollierter Studien	Placebo/ Parecoxib+ Valdecoxib n= 1224/1380	Ott, CABG, 2003 Nussmeier, CABG, 2005 Pfizer, general surgery, 2005	Doppeltverblindete, randomisierte, placebokontrollierte Studien zu Parecoxib i.v., gefolgt von Valdecoxib oral, für ≥ 7d nach einer Operation	Gesamt-OR bzgl. eines Risikos für ein größeres CV-Ereignis: 2,3	
Nussmeier 2005 ⁵⁶ sponsorinitiierte, randomisierte, doppelt verblindete, parallelgruppierte multipl dosierte, Placebo-kontrollierte Studie	n= 1671 Parecoxib+ Valdecoxib n= 555 Placebo+ Valdecoxib n= 556 Placebo n= 560	Elektive primäre koronare Bypassoperation, Alter 18- 80 Jahre, NYHA I- III, EF ≥ 35 % BMI ≤ 40 ≥ 55kg KG	Komplikationen assoziiert mit Parecoxib- und Valdecoxibeinnahme nach einer Herzoperation	RR für ein CV-Ereignis Placebo vs. Parecoxib Placebo vs. Placebo+ Valdecoxib Placebo vs. beide Coxibe	3,70 (p= 0,03) 2,0 (n.s.) 2,9 (n.s.)

4.3 Limitationen dieser Untersuchung

Diese Untersuchung muss mit einigen Einschränkungen betrachtet werden. Die Daten wurden in einem Tiermodell erhoben, das möglicherweise nicht die Situation im menschlichen Organismus widerspiegelt. Allerdings hat sich dieses Modell schon früher bewährt um den klinischen Verdacht prothrombotischer Eigenschaften der selektiven COX-2-Hemmer experimentell zu bestätigen¹². Derartige Effekte waren schon seit der Veröffentlichung der VIGOR-Studie⁶ vermutet und später durch große klinische Studien belegt worden (siehe auch Tabelle 1-4). Messungen von Prostanoidmetaboliten lassen nur indirekt Rückschlüsse auf intrakorporale Prostanoidspiegel zu. Prostanoiden sind aber so kurzlebig, dass eine direkte Messung nicht möglich ist. Bei der kardialen Punktion zur Blutgewinnung in unserem Modell können allein schon durch das Trauma Prostanoiden freigesetzt worden sein. Um diese Störgröße möglichst zu minimieren wurden 20 Gauge messende und damit große Kanülen für die Punktion eingesetzt und die Probe wurde schon in der Spritze mit dem Cyclooxygenasehemmstoff Indomethacin versetzt. Eine andere Möglichkeit wäre eine Sammlung von Urin über 24 Stunden in metabolischen Käfigen und eine Messung der Prostanoidmetabolite in diesem gewesen. Allerdings wird Pgl_2 in zahlreichen Organen produziert und so übersteigen im Urin ausgeschiedene Abbauprodukte des Pgl_2 die nicht endothelialer Herkunft sind schnell die Menge derer endothelialer Herkunft¹⁴³. Uns interessierte jedoch in dieser Fragestellung nicht die Produktion von Prostanoiden im Gesamtorganismus im Allgemeinen sondern deren Vorhandensein und deren Wirkung im Gefäßsystem im Speziellen. Aus diesem Grund wurde die Messung von 6-keto- $\text{Pgf}_{1\alpha}$ und TxB_2 im Hamsterserum vorgenommen. Die im Serum gemessenen Prostanoiden sind allerdings ebenfalls nicht exklusiv endothelialer oder thrombozytärer Herkunft, sondern können zusätzlich von anderen intra- und paravasalen Zellen wie z.B. Makrophagen stammen¹⁴³. Da es in der vorliegenden Arbeit um die intravaskuläre Wirkung der Prostanoiden ging und nicht um die genaue Untersuchung der Herkunft, lassen die Ergebnisse nach systemischer Medikamentenapplikation Rückschlüsse auf ähnliche Mechanismen im menschlichen Organismus zu. Auch im Menschen wirken Cyclooxygenasehemmstoffe nicht spezifisch auf Endothelzellen und Thrombozyten und trotzdem gab es klinische Hinweise auf eine prothrombotische Wirkung. Eine systemische Applikation von $\text{TNF}\alpha$ ist schließlich vielleicht ein zu einfaches Modell für die Induktion von entzündlichen Bedingungen, da diese durch verschiedene Faktoren und pathophysiologische Vorgänge verursacht werden. Es gibt Studien in ähnlichen Tiermodellen, die sogar eine Verlängerung der Zeit bis zur Bildung einer Atherothrombose nach $\text{TNF}\alpha$ -Applikation gezeigt haben. Allerdings fanden die Beobachtun-

gen hier 30 Minuten nach einer Behandlung mit TNF α statt¹²¹ und diese Ergebnisse konnten von uns im Rahmen anderer Projekte der Arbeitsgruppe nicht nachvollzogen werden. Für eine transkriptionelle Regulation beispielsweise einer Adhäsionsrezeptorexpression ist diese Zeit zu kurz. Diese Ergebnisse stellen damit keinen Widerspruch zu unseren Ergebnissen dar. Eine verstärkte Expression der COX-2 und damit eine intravasale Erhöhung der einer Thrombozytenaktivierung entgegenwirkenden Prostanoiden PGI₂ und P_gD₂ sowie eine vermehrte Freisetzung von NO ist in dieser Zeit jedoch möglich. Für Rückschlüsse auf chronische entzündliche Prozesse, wie sie bei einer Atherosklerose vorliegen, ist der Zeitraum von vier Stunden nach TNF α -Gabe und die einmalige Administration der Substanz dennoch nicht ausreichend. Auch dies stellt somit eine Momentaufnahme der Reaktion auf einen inflammatorischen Stimulus dar. In den klinischen Studien zu den Auswirkungen einer Therapie mit Cyclooxygenasehemmern wurden längere Einnahmezeiträume untersucht und nicht wie in dieser Studie die Folgen einer Einmalapplikation. Die vorliegenden Ergebnisse sind deshalb lediglich als Hinweise auf eine mögliche Pathogenese der klinisch beobachteten atherothrombotischen Ereignisse zu verstehen. In unseren Beobachtungen führte eine intraperitoneale Injektion von 0,5 μ g TNF α pro kg KG zwar zu einer tendenziellen Erhöhung der PGI₂-Spiegel, die Menge des durch Thrombozyten freigesetzten TxA₂s blieb im Vergleich zu den Kontrollen hingegen unbeeinflusst. Dies kann mehrere Gründe haben. Die COX-2 ist schon durch geringere Mengen Hydroperoxid, wie es unter inflammatorischen Bedingungen freigesetzt wird, induzierbar als die COX-1¹⁴⁴. Bei der intraperitonealen Injektion ist es möglich, dass letzten Endes ein bedeutend kleinerer Teil der Substanz in den Blutkreislauf gelangt. Somit reichte die Menge an TNF α zwar aus um die Expression der COX-2 geringfügig zu steigern, die der COX-1 hingegen blieb unbeeinflusst. Aus technischen Gründen war es nicht möglich den Tieren die für die Blutentnahmen verwendet wurden und nicht den intravitalmikroskopischen Versuchen unterzogen wurden TNF α und Parecoxib intravenös zu applizieren. Daher wurden diesen die Substanzen intraperitoneal verabreicht. Leider lässt dies nur eingeschränkt Rückschlüsse auf eine intravaskuläre Wirkung zu. Allerdings stehen die Messungen der PGI₂- und TxA₂-Spiegel nach Applikation von TNF α und Parecoxib damit auch in keinem Widerspruch zu den intravitalmikroskopisch gewonnenen Beobachtungen.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Dissertationsarbeit wurden in einem Tiermodell Ursachen einer klinisch beobachteten Atherothrombosegefährdung unter Cyclooxygenasehemmung experimentell untersucht. Hierbei fand sich unter Medikation mit dem bisher als nicht selektiv die COX-1 und die COX-2 hemmend bekannten NSAR Diclofenac in klinisch gebräuchlicher Dosierung eine signifikant erhöhte Thrombozyten-Endothel-Interaktion und eine verkürzte Gefäßverschlusszeit nach Gefäßwandverletzung. Die PGI₂-Spiegel im Serum behandelter Tiere waren tendenziell erniedrigt, was zu einem Kippen des Gleichgewichtes von PGI₂ und TxA₂ in Richtung prothrombotischer Verhältnisse führte. Diese Effekte konnten durch das PGI₂-Analogon Iloprost verhindert werden. Dadurch wurde wiederum die Hypothese einer Beeinflussung des Prostanoidgleichgewichtes als Ursache der klinisch beobachteten kardiovaskulären Vorfälle unterstützt. Das als spezifischer COX-2-Hemmer vermarktete Parecoxib erwies sich als im Tierversuch ebenfalls prothrombotisch wirksam. Allerdings waren entgegen den Erwartungen die PGI₂-Spiegel nicht beeinflusst. TxA₂ hingegen wurde unter einer Medikation mit Parecoxib sogar verstärkt freigesetzt. Im Gegensatz zu Diclofenac gibt es bezüglich einer Atherothrombosegefährdung unter Parecoxibtherapie uneinheitliche klinische Daten. Unter durch TNF α induzierten, niedrigschwelligen entzündlichen Bedingungen kam es ebenfalls zu einer verstärkten Thrombozyten-Endothel-Interaktion. Hier scheint die Ursache in einer vermehrten Expression von Adhäsionsrezeptoren zu liegen und nicht in einer Beeinflussung der Prostanoiden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich die verschiedenen Cyclooxygenasehemmer bezüglich ihrer Wirkung stark voneinander unterscheiden und wenn sie prothrombotisch wirksam sind auch in einem gesunden Gefäßsystem eine arterioläre Thrombosegefährdung darstellen können. Dies ist möglicherweise unabhängig von einem vorbestehenden kardiovaskulären Risiko, kann dieses allerdings durchaus verstärken. Um das Risiko eines kardiovaskulären Vorfalles für die einzelnen Cyclooxygenasehemmer abzuschätzen, müssten diese einzeln in experimentellen und klinischen Studien weiter untersucht werden. Bis dahin bleibt davon auszugehen, dass die meisten Cyclooxygenasehemmer mit Ausnahme von Acetylsalicylsäure ein gewisses kardiovaskuläres Risiko bergen.

6. Anhang

6.1 Abkürzungsverzeichnis

ASS	Acetylsalicylsäure
Ca ²⁺	Calcium
CD40L	CD40 Ligand
CO ₂	Kohlendioxid
COX	Cyclooxygenase
D-Glucose	rechtsdrehende Glucose
EMA	European Medicine Agency
FACS	fluorescence activated cell sorting
FCS	fetal calf serum
FDA	Food and Drug Administration
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HMEC	humane mikrovaskuläre Endothelzellen
HUVEC	humane Endothelzellen der Umbilikalvene
IL-1	Interleukin-1
IP	Prostaglandin I ₂ Rezeptor
KCl	Kaliumchlorid
KG	Körpergewicht
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
M199	Medium 199
MEDAL	multinational etoricoxib and diclofenac arthritis longterm program
Mg ²⁺	Magnesium
mM	millimolar (Millimol pro Liter)
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NO, NOS	Stickstoffmonoxid, NO-Synthetase
NSAR	nicht-steroidales Antirheumatikum
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline solution)
PFA-100	platelet function analyzer (Thrombozytenfunktionstest)
PgDS, PgES, PgFS, PgIS, TxAS	Prostanoidsynthetasen
PgG ₂ , PgH ₂ , PgD ₂ , PgE ₂ , PgF ₂ , PgI ₂	Prostaglandin G ₂ , H ₂ , D ₂ , E ₂ , F ₂ , Prostazyklin
PLP/PRP	Platelet low/rich plasma
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
TNF α	Tumornekrosefaktor α
TP	Thromboxanrezeptor
TxA ₂	Thromboxan A ₂
U/min	Umdrehungen pro Minute
VIGOR	Vioxx gastrointestinal outcomes and research
vWF	von Willebrand Faktor

6.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Interaktion thrombozytärer Adhäsionsmoleküle mit Liganden wie dem Kollagen der vaskulären Matrix und dem von Willebrand Faktor oder Fibrinogen des Plasmas und mit endothelialen Adhäsionsmolekülen	3
Abb. 2	Der Arachidonsäurestoffwechsel	9
Abb. 3	Die Rückenhautkammer.....	12
Abb. 4	Das Intravitalmikroskop	16
Abb. 5	Die Interaktion von Thrombozyten mit dem Endothel wird durch TNF α , Diclofenac, Parecoxib und einer Kombination aus COX-2-Inhibitoren und TNF α verstärkt	23
Abb. 6	Die Zahl der an der Gefäßwand entlang rollenden Thrombozyten wird durch TNF α , Diclofenac und Parecoxib erhöht	25
Abb. 7	TNF α und Parecoxib verstärken eine feste Thrombozytenadhäsion an die Gefäßwand	25
Abb. 8	Die durch Diclofenac verursachte Verstärkung der Thrombozyten-Endothel-Interaktion wurde im Gefäßverschluss durch Iloprost teilweise verhindert	26
Abb. 9	Die durch Diclofenac verstärkte Thrombozyten-Endothel-Interaktion nach FeCl $_3$ -induzierter Gefäßwandverletzung kann durch Iloprost verhindert werden	27
Abb. 10	Beschleunigung eines Gefäßverschlusses durch TNF α , Diclofenac, Parecoxib und der Kombination aus COX-2-Inhibitoren und TNF α im Hamster	29
Abb. 11	Die Gefäßverschlusszeit war unter Diclofenacmedikation gegenüber den Kontrollen in „Black Six“-Mäusen signifikant vermindert. Iloprost verhinderte diesen Effekt.....	29
Abb. 12	Serumspiegel von Prostazyklin- und Thromboxanmetaboliten unter Diclofenactherapie	31
Abb. 13	Die Wirkung von Parecoxib auf die Prostanoidspiegel nach intraperitonealer Applikation.....	31
Abb. 14	Einfluss von TNF α , Diclofenac, Parecoxib auf das Verhältnis von TxB $_2$ /6-keto-PgF $_{1\alpha}$ in vivo	32
Abb. 15	Einfluss der Studiensubstanzen auf die endotheliale Adhäsionsrezeptorexpression in vitro.....	33

6.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Metaanalysen von Beobachtungsstudien über das kardiovaskuläre Risiko unter Diclofenac-medikation	47
Tabelle 2: Retrospektive Kohortenstudien mit der Fragestellung ob NSAR das Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse erhöhen	48
Tabelle 3: Randomisierte, doppelblinde Studien über das kardiovaskuläre Risiko von Diclofenac	52
Tabelle 4: Studien zur Effektivität und zu Nebenwirkungen einer Parecoxib und/oder Valdecoxib-medikation	53

6.4 Referenzen

1. Silverstein, F.E., *et al.* Gastrointestinal toxicity with celecoxib vs nonsteroidal anti-inflammatory drugs for osteoarthritis and rheumatoid arthritis: the CLASS study: A randomized controlled trial. Celecoxib Long-term Arthritis Safety Study. *JAMA* **284**, 1247-1255 (2000).
2. Hippisley-Cox, J., Coupland, C. & Logan, R. Risk of adverse gastrointestinal outcomes in patients taking cyclo-oxygenase-2 inhibitors or conventional non-steroidal anti-inflammatory drugs: population based nested case-control analysis. *BMJ* **331**, 1310-1316 (2005).
3. Murata, T., *et al.* Altered pain perception and inflammatory response in mice lacking prostacyclin receptor. *Nature* **388**, 678-682 (1997).
4. Hatazawa, R., *et al.* Cyclooxygenase-2/prostaglandin E2 accelerates the healing of gastric ulcers via EP4 receptors. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **293**, G788-797 (2007).
5. Nishio, H., Terashima, S., Nakashima, M., Aihara, E. & Takeuchi, K. Involvement of prostaglandin E receptor EP3 subtype and prostacyclin IP receptor in decreased acid response in damaged stomach. *J Physiol Pharmacol* **58**, 407-421 (2007).
6. Bombardier, C., *et al.* Comparison of upper gastrointestinal toxicity of rofecoxib and naproxen in patients with rheumatoid arthritis. VIGOR Study Group. *N Engl J Med* **343**, 1520-1528, 1522 p following 1528 (2000).
7. Bresalier, R.S., *et al.* Cardiovascular events associated with rofecoxib in a colorectal adenoma chemoprevention trial. *N Engl J Med* **352**, 1092-1102 (2005).
8. Baron, J.A., *et al.* Cardiovascular events associated with rofecoxib: final analysis of the APPROVe trial. *Lancet* **372**, 1756-1764 (2008).
9. Cannon, C.P., *et al.* Cardiovascular outcomes with etoricoxib and diclofenac in patients with osteoarthritis and rheumatoid arthritis in the Multinational Etoricoxib and Diclofenac Arthritis Long-term (MEDAL) programme: a randomised comparison. *Lancet* **368**, 1771-1781 (2006).
10. Combe, B., *et al.* Cardiovascular safety and gastrointestinal tolerability of etoricoxib vs diclofenac in a randomized controlled clinical trial (The MEDAL study). *Rheumatology (Oxford)* **48**, 425-432 (2009).
11. Radomski, M.W., Palmer, R.M. & Moncada, S. The anti-aggregating properties of vascular endothelium: interactions between prostacyclin and nitric oxide. *Br J Pharmacol* **92**, 639-646 (1987).
12. Buerkle, M.A., *et al.* Selective inhibition of cyclooxygenase-2 enhances platelet adhesion in hamster arterioles in vivo. *Circulation* **110**, 2053-2059 (2004).
13. Andrews, R.K., Berndt, M.C., López, J.A. The Glycoprotein Ib-IX-V Complex. in *Platelets*, Vol. 2 (ed. Michelson, A.D.) 145-163 (Elsevier, 2007).
14. Wei, A.H., Schoenwaelder, S.M., Andrews, R.K. & Jackson, S.P. New insights into the haemostatic function of platelets. *Br J Haematol* **147**, 415-430 (2009).
15. Struthmann, L., *et al.* Prothrombotic effects of diclofenac on arteriolar platelet activation and thrombosis in vivo. *J Thromb Haemost* **7**, 1727-1735 (2009).
16. Lindemann, S., Kramer, B., Seizer, P. & Gawaz, M. Platelets, inflammation and atherosclerosis. *J Thromb Haemost* **5 Suppl 1**, 203-211 (2007).
17. Mantovani, A., Garlanda, C., Introna, M. & Vecchi, A. Regulation of endothelial cell function by pro- and anti-inflammatory cytokines. *Transplant Proc* **30**, 4239-4243 (1998).
18. Blair, P. & Flaumenhaft, R. Platelet alpha-granules: basic biology and clinical correlates. *Blood Rev* **23**, 177-189 (2009).

19. Andrews, R.K. & Berndt, M.C. Platelet physiology and thrombosis. *Thromb Res* **114**, 447-453 (2004).
20. Vane, J.R. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nat New Biol* **231**, 232-235 (1971).
21. Lafont, O. [From the willow to aspirin]. *Rev Hist Pharm (Paris)* **55**, 209-216 (2007).
22. Hemler, M. & Lands, W.E. Purification of the cyclooxygenase that forms prostaglandins. Demonstration of two forms of iron in the holoenzyme. *J Biol Chem* **251**, 5575-5579 (1976).
23. Van Der Ouderaa, F.J., Buytenhek, M., Nugteren, D.H. & Van Dorp, D.A. Acetylation of prostaglandin endoperoxide synthetase with acetylsalicylic acid. *Eur J Biochem* **109**, 1-8 (1980).
24. Roth, G.J., Machuga, E.T. & Ozols, J. Isolation and covalent structure of the aspirin-modified, active-site region of prostaglandin synthetase. *Biochemistry* **22**, 4672-4675 (1983).
25. DeWitt, D.L. & Smith, W.L. Primary structure of prostaglandin G/H synthase from sheep vesicular gland determined from the complementary DNA sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 1412-1416 (1988).
26. Rosen, G.D., Birkenmeier, T.M., Raz, A. & Holtzman, M.J. Identification of a cyclooxygenase-related gene and its potential role in prostaglandin formation. *Biochem Biophys Res Commun* **164**, 1358-1365 (1989).
27. Kujubu, D.A., Fletcher, B.S., Varnum, B.C., Lim, R.W. & Herschman, H.R. TIS10, a phorbol ester tumor promoter-inducible mRNA from Swiss 3T3 cells, encodes a novel prostaglandin synthase/cyclooxygenase homologue. *J Biol Chem* **266**, 12866-12872 (1991).
28. Xie, W.L., Chipman, J.G., Robertson, D.L., Erikson, R.L. & Simmons, D.L. Expression of a mitogen-responsive gene encoding prostaglandin synthase is regulated by mRNA splicing. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 2692-2696 (1991).
29. Picot, D., Loll, P.J. & Garavito, R.M. The X-ray crystal structure of the membrane protein prostaglandin H2 synthase-1. *Nature* **367**, 243-249 (1994).
30. Luong, C., *et al.* Flexibility of the NSAID binding site in the structure of human cyclooxygenase-2. *Nat Struct Biol* **3**, 927-933 (1996).
31. Serhan, C.N. & Oliw, E. Unorthodox routes to prostanoid formation: new twists in cyclooxygenase-initiated pathways. *J Clin Invest* **107**, 1481-1489 (2001).
32. Kurumbail, R.G., *et al.* Structural basis for selective inhibition of cyclooxygenase-2 by anti-inflammatory agents. *Nature* **384**, 644-648 (1996).
33. Gierse, J.K., *et al.* A single amino acid difference between cyclooxygenase-1 (COX-1) and -2 (COX-2) reverses the selectivity of COX-2 specific inhibitors. *J Biol Chem* **271**, 15810-15814 (1996).
34. Yokoyama, C., Takai, T. & Tanabe, T. Primary structure of sheep prostaglandin endoperoxide synthase deduced from cDNA sequence. *FEBS Lett* **231**, 347-351 (1988).
35. Merlie, J.P., Fagan, D., Mudd, J. & Needleman, P. Isolation and characterization of the complementary DNA for sheep seminal vesicle prostaglandin endoperoxide synthase (cyclooxygenase). *J Biol Chem* **263**, 3550-3553 (1988).
36. Bryant, C.E., Appleton, I. & Mitchell, J.A. Vascular endothelial growth factor upregulates constitutive cyclooxygenase 1 in primary bovine and human endothelial cells. *Life Sci* **62**, 2195-2201 (1998).
37. Okahara, K., Sun, B. & Kambayashi, J. Upregulation of prostacyclin synthesis-related gene expression by shear stress in vascular endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **18**, 1922-1926 (1998).

38. Baumgartner, H.K., Starodub, O.T., Joehl, J.S., Tackett, L. & Montrose, M.H. Cyclooxygenase 1 is required for pH control at the mouse gastric surface. *Gut* **53**, 1751-1757 (2004).
39. O'Banion, M.K., Sadowski, H.B., Winn, V. & Young, D.A. A serum- and glucocorticoid-regulated 4-kilobase mRNA encodes a cyclooxygenase-related protein. *J Biol Chem* **266**, 23261-23267 (1991).
40. Morita, I. Distinct functions of COX-1 and COX-2. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **68-69**, 165-175 (2002).
41. Ueno, N., *et al.* Coupling between cyclooxygenase, terminal prostanoid synthase, and phospholipase A2. *J Biol Chem* **276**, 34918-34927 (2001).
42. Ueno, N., Takegoshi, Y., Kamei, D., Kudo, I. & Murakami, M. Coupling between cyclooxygenases and terminal prostanoid synthases. *Biochem Biophys Res Commun* **338**, 70-76 (2005).
43. McAdam, B.F., *et al.* Systemic biosynthesis of prostacyclin by cyclooxygenase (COX)-2: the human pharmacology of a selective inhibitor of COX-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 272-277 (1999).
44. Yamagata, K., Andreasson, K.I., Kaufmann, W.E., Barnes, C.A. & Worley, P.F. Expression of a mitogen-inducible cyclooxygenase in brain neurons: regulation by synaptic activity and glucocorticoids. *Neuron* **11**, 371-386 (1993).
45. Therland, K.L., *et al.* Cyclooxygenase-2 is expressed in vasculature of normal and ischemic adult human kidney and is colocalized with vascular prostaglandin E2 EP4 receptors. *J Am Soc Nephrol* **15**, 1189-1198 (2004).
46. Schildknecht, S., Bachschmid, M., Baumann, A. & Ullrich, V. COX-2 inhibitors selectively block prostacyclin synthesis in endotoxin-exposed vascular smooth muscle cells. *FASEB J* **18**, 757-759 (2004).
47. Topper, J.N., Cai, J., Falb, D. & Gimbrone, M.A., Jr. 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 U S A* **93**, 10417-10422 (1996).
48. Binion, D.G., Otterson, M.F. & Rafiee, P. Curcumin inhibits VEGF-mediated angiogenesis in human intestinal microvascular endothelial cells through COX-2 and MAPK inhibition. *Gut* **57**, 1509-1517 (2008).
49. Baker, C.S., *et al.* Cyclooxygenase-2 is widely expressed in atherosclerotic lesions affecting native and transplanted human coronary arteries and colocalizes with inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine particularly in macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **19**, 646-655 (1999).
50. Hla, T. & Neilson, K. Human cyclooxygenase-2 cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 7384-7388 (1992).
51. Wu, G., *et al.* Involvement of COX-2 in VEGF-induced angiogenesis via P38 and JNK pathways in vascular endothelial cells. *Cardiovasc Res* **69**, 512-519 (2006).
52. Miyata, A., *et al.* Molecular cloning and expression of human prostacyclin synthase. *Biochem Biophys Res Commun* **200**, 1728-1734 (1994).
53. Hara, S., *et al.* Isolation and molecular cloning of prostacyclin synthase from bovine endothelial cells. *J Biol Chem* **269**, 19897-19903 (1994).
54. Copeland, R.A., *et al.* Mechanism of selective inhibition of the inducible isoform of prostaglandin G/H synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 11202-11206 (1994).
55. Solomon, S.D., *et al.* Cardiovascular risk associated with celecoxib in a clinical trial for colorectal adenoma prevention. *N Engl J Med* **352**, 1071-1080 (2005).
56. Nussmeier, N.A., *et al.* Complications of the COX-2 inhibitors parecoxib and valdecoxib after cardiac surgery. *N Engl J Med* **352**, 1081-1091 (2005).

57. Ott, E., *et al.* Efficacy and safety of the cyclooxygenase 2 inhibitors parecoxib and valdecoxib in patients undergoing coronary artery bypass surgery. *J Thorac Cardiovasc Surg* **125**, 1481-1492 (2003).
58. Hinz, B., Dormann, H. & Brune, K. More pronounced inhibition of cyclooxygenase 2, increase in blood pressure, and reduction of heart rate by treatment with diclofenac compared with celecoxib and rofecoxib. *Arthritis Rheum* **54**, 282-291 (2006).
59. Capone, M.L., *et al.* Pharmacodynamic of cyclooxygenase inhibitors in humans. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **82**, 85-94 (2007).
60. Huntjens, D.R., Danhof, M. & Della Pasqua, O.E. Pharmacokinetic-pharmacodynamic correlations and biomarkers in the development of COX-2 inhibitors. *Rheumatology (Oxford)* **44**, 846-859 (2005).
61. Needleman, P., *et al.* Identification of an enzyme in platelet microsomes which generates thromboxane A₂ from prostaglandin endoperoxides. *Nature* **261**, 558-560 (1976).
62. Ohashi, K., Ruan, K.H., Kulmacz, R.J., Wu, K.K. & Wang, L.H. Primary structure of human thromboxane synthase determined from the cDNA sequence. *J Biol Chem* **267**, 789-793 (1992).
63. Ohkubo, S., Nakahata, N. & Ohizumi, Y. Thromboxane A₂-mediated shape change: independent of Gq-phospholipase C--Ca²⁺ pathway in rabbit platelets. *Br J Pharmacol* **117**, 1095-1104 (1996).
64. Hunt, J.A., Merritt, J.E., MacDermot, J. & Keen, M. Characterization of the thromboxane receptor mediating prostacyclin release from cultured endothelial cells. *Biochem Pharmacol* **43**, 1747-1752 (1992).
65. Palmer, M.A., Piper, P.J. & Vane, J.R. The release of rabbit aorta contracting substance (RCS) from chopped lung and its antagonism by anti-inflammatory drugs. *Br J Pharmacol* **40**, 581P-582P (1970).
66. Yamamoto, K., Ebina, S., Nakanishi, H. & Nakahata, N. Thromboxane A₂ receptor-mediated signal transduction in rabbit aortic smooth muscle cells. *Gen Pharmacol* **26**, 1489-1498 (1995).
67. Ishizuka, T., *et al.* Thromboxane A₂ receptor blockade suppresses intercellular adhesion molecule-1 expression by stimulated vascular endothelial cells. *Eur J Pharmacol* **312**, 367-377 (1996).
68. Ishizuka, T., *et al.* Stimulation with thromboxane A₂ (TXA₂) receptor agonist enhances ICAM-1, VCAM-1 or ELAM-1 expression by human vascular endothelial cells. *Clin Exp Immunol* **112**, 464-470 (1998).
69. Boie, Y., *et al.* Cloning and expression of a cDNA for the human prostanoid IP receptor. *J Biol Chem* **269**, 12173-12178 (1994).
70. Nakagawa, O., *et al.* Molecular cloning of human prostacyclin receptor cDNA and its gene expression in the cardiovascular system. *Circulation* **90**, 1643-1647 (1994).
71. Rucker, W. & Schror, K. Evidence for high affinity prostacyclin binding sites in vascular tissue: radioligand studies with a chemically stable analogue. *Biochem Pharmacol* **32**, 2405-2410 (1983).
72. Tsai, A.L., Hsu, M.J., Vijjeswarapu, H. & Wu, K.K. Solubilization of prostacyclin membrane receptors from human platelets. *J Biol Chem* **264**, 61-67 (1989).
73. Wise, H., Wong, Y.H. & Jones, R.L. Prostanoid signal integration and cross talk. *Neurosignals* **11**, 20-28 (2002).
74. Menger, M.D., Laschke, M.W. & Vollmar, B. Viewing the microcirculation through the window: some twenty years experience with the hamster dorsal skinfold chamber. *Eur Surg Res* **34**, 83-91 (2002).
75. Ades, E.W., *et al.* HMEC-1: establishment of an immortalized human microvascular endothelial cell line. *J Invest Dermatol* **99**, 683-690 (1992).

76. Solomon, S.D., *et al.* Effect of celecoxib on cardiovascular events and blood pressure in two trials for the prevention of colorectal adenomas. *Circulation* **114**, 1028-1035 (2006).
77. Farkouh, M.E., *et al.* Cardiovascular outcomes in high risk patients with osteoarthritis treated with ibuprofen, naproxen or lumiracoxib. *Ann Rheum Dis* **66**, 764-770 (2007).
78. Borgdorff, P., Tangelder, G.J. & Paulus, W.J. Cyclooxygenase-2 inhibitors enhance shear stress-induced platelet aggregation. *J Am Coll Cardiol* **48**, 817-823 (2006).
79. Galliard-Grigioni, K.S., Fehr, M. & Reinhart, W.H. Influence of combinations of acetylsalicylic acid, acetaminophen, and diclofenac on platelet aggregation. *Eur J Pharmacol* **595**, 65-68 (2008).
80. Blaicher, A.M., *et al.* Effect of non-selective, non-steroidal anti-inflammatory drugs and cyclo-oxygenase-2 selective inhibitors on the PFA-100 closure time. *Anaesthesia* **59**, 1100-1103 (2004).
81. Fries, S., *et al.* Marked interindividual variability in the response to selective inhibitors of cyclooxygenase-2. *Gastroenterology* **130**, 55-64 (2006).
82. Warner, T.D., Vojnovic, I., Bishop-Bailey, D. & Mitchell, J.A. Influence of plasma protein on the potencies of inhibitors of cyclooxygenase-1 and -2. *FASEB J* **20**, 542-544 (2006).
83. Linkous, A. & Yazlovitskaya, E. Cytosolic phospholipase A2 as a mediator of disease pathogenesis. *Cell Microbiol* **12**, 1369-1377 (2010).
84. Ruan, C.H., So, S.P. & Ruan, K.H. Inducible COX-2 dominates over COX-1 in prostacyclin biosynthesis: mechanisms of COX-2 inhibitor risk to heart disease. *Life Sci* **88**, 24-30 (2011).
85. Belton, O., Byrne, D., Kearney, D., Leahy, A. & Fitzgerald, D.J. Cyclooxygenase-1 and -2-dependent prostacyclin formation in patients with atherosclerosis. *Circulation* **102**, 840-845 (2000).
86. Camacho, M., *et al.* Hypoxia up-regulates PGI-synthase and increases PGI2 release in human vascular cells exposed to inflammatory stimuli. *J Lipid Res* (2011).
87. Graff, J., Arabmotlagh, M., Cheung, R., Geisslinger, G. & Harder, S. Effects of parecoxib and dipyron on platelet aggregation in patients undergoing meniscectomy: a double-blind, randomized, parallel-group study. *Clin Ther* **29**, 438-447 (2007).
88. Araujo, M. & Welch, W.J. Cyclooxygenase 2 inhibition suppresses tubuloglomerular feedback: roles of thromboxane receptors and nitric oxide. *Am J Physiol Renal Physiol* **296**, F790-794 (2009).
89. Gislason, G.H., *et al.* Increased mortality and cardiovascular morbidity associated with use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in chronic heart failure. *Arch Intern Med* **169**, 141-149 (2009).
90. van Staa, T.P., Rietbrock, S., Setakis, E. & Leufkens, H.G. Does the varied use of NSAIDs explain the differences in the risk of myocardial infarction? *J Intern Med* **264**, 481-492 (2008).
91. Gislason, G.H., *et al.* 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**, 2906-2913 (2006).
92. Andersohn, F., Suissa, S. & Garbe, E. Use of first- and second-generation cyclooxygenase-2-selective nonsteroidal antiinflammatory drugs and risk of acute myocardial infarction. *Circulation* **113**, 1950-1957 (2006).
93. Schjerning Olsen, A.M., *et al.* Duration of treatment with nonsteroidal anti-inflammatory drugs and impact on risk of death and recurrent myocardial infarction in patients with prior myocardial infarction: a nationwide cohort study. *Circulation* **123**, 2226-2235 (2011).

94. Fosbol, E.L., *et al.* Cause-specific cardiovascular risk associated with nonsteroidal antiinflammatory drugs among healthy individuals. *Circ Cardiovasc Qual Outcomes* **3**, 395-405 (2010).
95. Fosbol, E.L., *et al.* Risk of myocardial infarction and death associated with the use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) among healthy individuals: a nationwide cohort study. *Clin Pharmacol Ther* **85**, 190-197 (2009).
96. Schug, S.A., Joshi, G.P., Camu, F., Pan, S. & Cheung, R. Cardiovascular safety of the cyclooxygenase-2 selective inhibitors parecoxib and valdecoxib in the postoperative setting: an analysis of integrated data. *Anesth Analg* **108**, 299-307 (2009).
97. Kearney, P.M., *et al.* Do selective cyclo-oxygenase-2 inhibitors and traditional non-steroidal anti-inflammatory drugs increase the risk of atherothrombosis? Meta-analysis of randomised trials. *BMJ* **332**, 1302-1308 (2006).
98. van der Linden, M.W., van der Bij, S., Welsing, P., Kuipers, E.J. & Herings, R.M. The balance between severe cardiovascular and gastrointestinal events among users of selective and non-selective non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Ann Rheum Dis* **68**, 668-673 (2009).
99. Roumie, C.L., *et al.* Non-aspirin NSAIDs, cyclooxygenase-2 inhibitors and risk for cardiovascular events-stroke, acute myocardial infarction, and death from coronary heart disease. *Pharmacoepidemiol Drug Saf* (2009).
100. Singh, G., Wu, O., Langhorne, P. & Madhok, R. Risk of acute myocardial infarction with nonselective non-steroidal anti-inflammatory drugs: a meta-analysis. *Arthritis Res Ther* **8**, R153 (2006).
101. McGettigan, P. & Henry, D. Cardiovascular risk and inhibition of cyclooxygenase: a systematic review of the observational studies of selective and nonselective inhibitors of cyclooxygenase 2. *JAMA* **296**, 1633-1644 (2006).
102. Duggan, S.T. & Scott, L.J. Intravenous paracetamol (acetaminophen). *Drugs* **69**, 101-113 (2009).
103. Mitchell, J.A., Akarasereenont, P., Thiemermann, C., Flower, R.J. & Vane, J.R. Selectivity of nonsteroidal antiinflammatory drugs as inhibitors of constitutive and inducible cyclooxygenase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 11693-11697 (1993).
104. Munsterhjelm, E., *et al.* Dose-dependent inhibition of platelet function by acetaminophen in healthy volunteers. *Anesthesiology* **103**, 712-717 (2005).
105. Catella-Lawson, F., *et al.* Cyclooxygenase inhibitors and the antiplatelet effects of aspirin. *N Engl J Med* **345**, 1809-1817 (2001).
106. Akagi, Y., Nio, Y., Shimada, S. & Aoyama, T. Influence of Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs on the Antiplatelet Effects of Aspirin in Rats. *Biol Pharm Bull* **34**, 233-237 (2011).
107. Galliard-Grigioni, K.S. & Reinhart, W.H. A randomized, controlled study on the influence of acetaminophen, diclofenac, or naproxen on aspirin-induced inhibition of platelet aggregation. *Eur J Pharmacol* **609**, 96-99 (2009).
108. Blais, V. & Rivest, S. Inhibitory action of nitric oxide on circulating tumor necrosis factor-induced NF-kappaB activity and COX-2 transcription in the endothelium of the brain capillaries. *J Neuropathol Exp Neurol* **60**, 893-905 (2001).
109. Said, F.A., *et al.* TNF-alpha, inefficient by itself, potentiates IL-1beta-induced PGHS-2 expression in human pulmonary microvascular endothelial cells: requirement of NF-kappaB and p38 MAPK pathways. *Br J Pharmacol* **136**, 1005-1014 (2002).
110. Zulueta, J.J., *et al.* Modulation of inducible nitric oxide synthase by hypoxia in pulmonary artery endothelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* **26**, 22-30 (2002).
111. Gao, B., Saba, T.M. & Tsan, M.F. Role of alpha(v)beta(3)-integrin in TNF-alpha-induced endothelial cell migration. *Am J Physiol Cell Physiol* **283**, C1196-1205 (2002).

112. Bombeli, T., Schwartz, B.R. & Harlan, J.M. Adhesion of activated platelets to endothelial cells: evidence for a GPIIb/IIIa-dependent bridging mechanism and novel roles for endothelial intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), alpha5beta1 integrin, and GPIIalpha. *J Exp Med* **187**, 329-339 (1998).
113. Dominguez-Jimenez, C., Diaz-Gonzalez, F., Gonzalez-Alvaro, I., Cesar, J.M. & Sanchez-Madrid, F. Prevention of alphaII(b)beta3 activation by non-steroidal antiinflammatory drugs. *FEBS Lett* **446**, 318-322 (1999).
114. Reed, G.L. Platelet secretory mechanisms. *Semin Thromb Hemost* **30**, 441-450 (2004).
115. Pignatelli, P., *et al.* Tumour necrosis factor alpha upregulates platelet CD40L in patients with heart failure. *Cardiovasc Res* **78**, 515-522 (2008).
116. Nurden, A.T. Platelets, inflammation and tissue regeneration. *Thromb Haemost* (2011).
117. Chen, C., *et al.* Soluble CD40 ligand induces endothelial dysfunction in human and porcine coronary artery endothelial cells. *Blood* **112**, 3205-3216 (2008).
118. Krotz, F., *et al.* NAD(P)H oxidase-dependent platelet superoxide anion release increases platelet recruitment. *Blood* **100**, 917-924 (2002).
119. Krotz, F., *et al.* Depolarization of endothelial cells enhances platelet aggregation through oxidative inactivation of endothelial NTPDase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **22**, 2003-2009 (2002).
120. Krotz, F., Sohn, H.Y. & Pohl, U. Reactive oxygen species: players in the platelet game. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **24**, 1988-1996 (2004).
121. Cambien, B., Bergmeier, W., Saffaripour, S., Mitchell, H.A. & Wagner, D.D. Antithrombotic activity of TNF-alpha. *J Clin Invest* **112**, 1589-1596 (2003).
122. Pfizer. Celebrex, Highlights of prescribing information. http://pfizer.com/files/products/uspi_celebrex.pdf (2011).
123. FDA. Analysis and recommendations for Agency action regarding non-steroidal anti-inflammatory drugs and cardiovascular risk. http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/06/briefing/2006-4202B2001_2009_FDA-Tab2009.pdf (2005).
124. EMEA. European Medicines Agency concluded action on COX-2 inhibitors. <http://www.emea.europa.eu/pdfs/human/press/pr/20776605en.pdf> (London, 2005).
125. Trelle, S., *et al.* Cardiovascular safety of non-steroidal anti-inflammatory drugs: network meta-analysis. *BMJ* **342**, c7086 (2011).
126. Chen, Y.F., *et al.* Cyclooxygenase-2 selective non-steroidal anti-inflammatory drugs (etodolac, meloxicam, celecoxib, rofecoxib, etoricoxib, valdecoxib and lumiracoxib) for osteoarthritis and rheumatoid arthritis: a systematic review and economic evaluation. *Health Technol Assess* **12**, 1-278, iii (2008).
127. Hippisley-Cox, J. & Coupland, C. Risk of myocardial infarction in patients taking cyclo-oxygenase-2 inhibitors or conventional non-steroidal anti-inflammatory drugs: population based nested case-control analysis. *BMJ* **330**, 1366 (2005).
128. Watson, D.J., Rhodes, T., Cai, B. & Guess, H.A. Lower risk of thromboembolic cardiovascular events with naproxen among patients with rheumatoid arthritis. *Arch Intern Med* **162**, 1105-1110 (2002).
129. Fischer, L.M., Schlienger, R.G., Matter, C.M., Jick, H. & Meier, C.R. Current use of nonsteroidal antiinflammatory drugs and the risk of acute myocardial infarction. *Pharmacotherapy* **25**, 503-510 (2005).
130. Garcia Rodriguez, L.A., Varas-Lorenzo, C., Maguire, A. & Gonzalez-Perez, A. Nonsteroidal antiinflammatory drugs and the risk of myocardial infarction in the general population. *Circulation* **109**, 3000-3006 (2004).

131. Schlienger, R.G., Jick, H. & Meier, C.R. Use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs and the risk of first-time acute myocardial infarction. *Br J Clin Pharmacol* **54**, 327-332 (2002).
132. Ray, W.A., *et al.* Cardiovascular risks of nonsteroidal antiinflammatory drugs in patients after hospitalization for serious coronary heart disease. *Circ Cardiovasc Qual Outcomes* **2**, 155-163 (2009).
133. Jick, S.S., Kaye, J.A. & Jick, H. Diclofenac and acute myocardial infarction in patients with no major risk factors. *Br J Clin Pharmacol* **64**, 662-667 (2007).
134. Rahme, E., Watson, D.J., Kong, S.X., Toubouti, Y. & LeLorier, J. Association between nonnaproxen NSAIDs, COX-2 inhibitors and hospitalization for acute myocardial infarction among the elderly: a retrospective cohort study. *Pharmacoepidemiol Drug Saf* **16**, 493-503 (2007).
135. Rahme, E. & Nedjar, H. Risks and benefits of COX-2 inhibitors vs non-selective NSAIDs: does their cardiovascular risk exceed their gastrointestinal benefit? A retrospective cohort study. *Rheumatology (Oxford)* **46**, 435-438 (2007).
136. Schneeweiss, S., Solomon, D.H., Wang, P.S., Rassen, J. & Brookhart, M.A. Simultaneous assessment of short-term gastrointestinal benefits and cardiovascular risks of selective cyclooxygenase 2 inhibitors and nonselective nonsteroidal antiinflammatory drugs: an instrumental variable analysis. *Arthritis Rheum* **54**, 3390-3398 (2006).
137. Solomon, D.H., *et al.* Cardiovascular outcomes in new users of coxibs and nonsteroidal antiinflammatory drugs: high-risk subgroups and time course of risk. *Arthritis Rheum* **54**, 1378-1389 (2006).
138. Krueger, K., *et al.* Gastrointestinal tolerability of etoricoxib in rheumatoid arthritis patients: results of the etoricoxib vs diclofenac sodium gastrointestinal tolerability and effectiveness trial (EDGE-II). *Ann Rheum Dis* **67**, 315-322 (2008).
139. Baraf, H.S., *et al.* Gastrointestinal side effects of etoricoxib in patients with osteoarthritis: results of the Etoricoxib versus Diclofenac Sodium Gastrointestinal Tolerability and Effectiveness (EDGE) trial. *J Rheumatol* **34**, 408-420 (2007).
140. Riest, G., *et al.* Preventive effects of perioperative parecoxib on post-discectomy pain. *Br J Anaesth* **100**, 256-262 (2008).
141. Nussmeier, N.A., *et al.* Safety and efficacy of the cyclooxygenase-2 inhibitors parecoxib and valdecoxib after noncardiac surgery. *Anesthesiology* **104**, 518-526 (2006).
142. Aldington, S., Shirtcliffe, P., Weatherall, M. & Beasley, R. Increased risk of cardiovascular events with parecoxib/valdecoxib: a systematic review and meta-analysis. *N Z Med J* **118**, U1755 (2005).
143. Flavahan, N.A. Balancing prostanoid activity in the human vascular system. *Trends Pharmacol Sci* **28**, 106-110 (2007).
144. Kulmacz, R.J. & Wang, L.H. Comparison of hydroperoxide initiator requirements for the cyclooxygenase activities of prostaglandin H synthase-1 and -2. *J Biol Chem* **270**, 24019-24023 (1995).

6.5 Publikationen

Krötz F, Struthmann L

A Review on the risk of myocardial infarction associated with the NSAID diclofenac.
Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets. 2010 Mar;10(1):53-65.PMID: 20092437

Struthmann L, Hellwig N, Pircher J, Sohn HY, Buerkle MA, Klauss V, Mannell H, Pohl U,
Krötz F

Prothrombotic effects of diclofenac on arteriolar platelet activation and thrombosis in vivo.
J Thromb Haemost. 2009 Oct; 7(10):1727-35. Epub 2009 Aug 19.PMID: 19691487

Struthmann L, Günthner-Biller M, Bergauer F, Friese K, Mylonas I

Complete hydatidiform mole in a perimenopausal woman with a subsequent severe thyro-
toxicosis.

Arch Gynecol Obstet. 2009 Mar; 279(3):411-3. Epub 2008 Jul 19.PMID: 18642009