

Aus dem Walter-Brendel-Zentrum der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Leiter: Prof. Dr. med. Ulrich Pohl  
und  
Medizinische Klinik und Poliklinik IV der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Direktor: Prof. Dr. med. Martin Reincke

Die Rolle des selektiven COX-2 Inhibitors NS-398 in der  
Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion in vivo.

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

vorgelegt von  
Selim Lehrer

aus  
München

Jahr  
2014

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Privatdozent Dr. med. Florian Krötz

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Michael Spannagl  
Prof. Dr. med. Shahnaz Christina Azad

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. Martin Bürkle

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

Tag der mündlichen Prüfung: 13.3.2014

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Buerkle MA, **Lehrer S**, Sohn HY, Conzen P, Pohl U, Kroetz F (2004) Selective inhibition of cyclooxygenase-2 enhances platelet adhesion in hamster arterioles *in vivo*. *Circulation*, 110, 2053-2059.

**Lehrer S**, Hellwig N, Buerkle MA, Sohn HY, Kroetz F, Pohl U (2005) EDHF is a potent inhibitor of platelet adhesion *in vivo*. Abstract. *J Vasc Biol*, 42(2), 49-50.

Krötz F, Hellwig N, Bürkle MA, **Lehrer S**, Riexinger T, Mannell H, Sohn HY, Klauss V, Pohl U (2010) A sulfaphenazol-sensitive EDHF opposes platelet-endothelium interactions *in vitro* and in the hamster microcirculation *in vivo*. *Cardiovasc Res*, 85(3), 542-550.

## Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	I
Tabellenverzeichnis	II
1. Einleitung	1
1.1 Arteriosklerose	1
1.2 Die Thrombozyten-Endothel-Interaktion (PVWI)	3
1.3 Die Cyclooxygenase (COX)	5
1.4 Nicht-steroidale Antiphlogistika (NSAIDs)	8
2. Zielsetzung der Arbeit	11
3. Material und Methoden	12
3.1 Die experimentelle Anordnung der <i>in vivo</i> Rückenhautkammer	12
3.1.1 Modell der Rückenhautkammer des syrischen Goldhamsters	12
3.1.2 Versuchstiere	12
3.1.3 Implantation der Rückenhautkammer	12
3.1.4 In vivo Monitoring der Mikrozirkulation	14
3.1.5 Anlage eines zentralen venösen Katheters	15
3.2 Isolierung und Fluoreszenzfärbung humaner Thrombozyten	16
3.2.1 Gewinnung von Thrombozytenkonzentrat	16
3.2.2 Verwendete Substanzen	18
3.2.2.1 Wirksubstanzen	18
3.2.2.2 Applikation der Wirksubstanzen	19
3.3 Versuchsprotokoll zum Einsatz der Wirksubstanzen	20
3.3.1 Kontrollversuch	20
3.3.2 Versuche mit ASS	20
3.3.3 Versuche mit NS-398	20
3.3.4 Versuche mit NS-398 und ASS	20
3.3.5 Versuche mit L-NA	21
3.3.6 Versuche mit NS-398 und Iloprost	21
3.3.7 Versuche mit NS-398 und L-NA	21
3.3.8 Arterieller Verschluss <i>in vivo</i>	21
3.3.9 Kollektiv der 6-keto-Prostaglandin F $1\alpha$ –Immunoassays	23
3.4 Fluoreszenzmikroskopie	23
3.4.1 Technische Methodik	23
3.4.2 Analyse der Thrombozyten-Endothel-Interaktion (PVWI)	24

3.4.2.1 Plättchen-Geschwindigkeit	24
3.4.2.2 Frei fließende und transient haftende Thrombozyten	25
3.4.2.3 Stabil adhärenente Thrombozyten	25
3.5 Statistische Analyse	26
4. Ergebnisse	27
4.1 Basisparameter des Versuchsprotokolls	27
4.2 Thrombozytengeschwindigkeit	29
4.3 Induktion der Thrombozytenanhaftung an die Gefäßwand durch NS-398	31
4.4 Prothrombotische Wirkung von NS-398 <i>in vivo</i>	32
4.5 Messungen von 6-Keto-PGF <sub>1α</sub> im Serum	34
5. Diskussion	36
5.1 Diskussion der Methodik	36
5.1.1 Das Rückenhautkammer-Modell am syrischen Goldhamster	36
5.1.2 Intravitalmikroskopie fluoreszenzmarkierter Thrombozyten	37
5.1.3 Der PVWI Effekt als Parameter der COX-Inhibition	38
5.2 Diskussion der Daten	38
5.3 Klinische Relevanz und Ausblick	40
6. Zusammenfassung	47
7. Literaturverzeichnis	48
8. Danksagung	60

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Arachidonsäureabbau und Prostaglandinsyntheseweg (modifiziert aus Simmons 2004).....	7
Abbildung 2: Syrischer Goldhamster mit transparenter Rückenhautkammer (Bürkle 2002) ..	13
Abbildung 3: Makroskopische Aufnahme der transparenten Rückenhautkammer (Bürkle 2002).....	14
Abbildung 4: Versuchsaufbau der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie an der Rückenhautkammer des Hamsters (A: Gesamtansicht, B: Hamster in der Röhre).....	16
Abbildung 5: Graphische Darstellung des Versuchsablaufs. FeCl <sub>3</sub> -induzierter arterieller Verschluss wurde als Plättchen-Aktivierungsparameter untersucht. ....	22
Abbildung 6: Thrombozyten-Endothel-Interaktion dargestellt an Hand der relativen Flussgeschwindigkeiten.....	30
Abbildung 7: Verstärkung der festen Anheftung von Plättchen an die Gefäßwand <i>in vivo</i> durch die selektive Hemmung von Cox-2 mit NS-398 (* = p < 0.05).....	31
Abbildung 8: Kameraaufnahmen von im Fettgewebe eingebetteten Arteriolen.....	32
Abbildung 9: Beschleunigung des Gefäßverschlusses nach Gefäßwandschädigung.....	33
Abbildung 10: Serum-Konzentrationen von 6-keto-PGF <sub>1α</sub> in NS-398 und Aspirin.....	34
Abbildung 11: 6-keto-PGF <sub>1α</sub> -Konzentrationen im Überstand von HUVEC-Kulturen .....	35

## **Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: Prostaglandine und ihre Wirkung im Rezeptorkomplex (nach Mutschler 2001)....	10
Tabelle 2: Basis- und Vergleichsparameter des Versuchsprotokolls .....	28

# 1. Einleitung

## 1.1 Arteriosklerose

Im Allgemeinen bezeichnet das Krankheitsbild der Arteriosklerose eine chronische Entzündung der arteriellen Gefäßwand, die zu einer pathologischen Verengung des Gefäßlumens führt, bedingt durch atherogene Plaquebildung (Ross 1999). Im Finalstadium kommt es zu einer Intimarruptur gefolgt von forcierter Thrombenbildung bis hin zum kompletten Verschluss des jeweiligen Gefäßes. Krankheitsbilder wie Schlaganfall und Myokardinfarkt sind die Folge (Libby 2002). Die Arteriosklerose ist in den westlichen Industrienationen die häufigste Ursache für frühe Invalidität aufgrund peripherer arterieller Verschlusskrankheit, chronischer kardialer Ischämien oder Herzinsuffizienzen. Sie hinterlässt dabei hohe finanzielle Kosten in den Gesundheitskassen mit einem nicht minder zu beurteilenden volkswirtschaftlichen Schaden (Millonig 2002).

Als eine von vielen Ursachen für die Entstehung von Arteriosklerose gilt die endotheliale Dysfunktion, welche durch verschiedene Faktoren (Hämodynamik, Nikotin, Immunmechanismen, Hyperlipidämie) begünstigt wird (Roessner 1987). Die endotheliale Dysfunktion begünstigt den Einstrom von Lipoproteinen in die Intima, vor allem von LDL-Cholesterin, welches beim Einstrom oxidiert wird, während zugleich durch die endotheliale Dysfunktion und/oder Expression von Adhäsionsmolekülen Monozyten einwandern. Die migrierten Makrophagen nehmen über Scavenger-Rezeptoren das LDL-gebundene und auch das  $\beta$ -VLDL-gebundene Cholesterin auf und transportieren es in die Lysosomen, wo es durch Esterhydrolyse freigesetzt wird. Das Cholesterin wird bei einem Überangebot in Cytoplasmavakuolen gespeichert. Die zu Schaumzellen transformierten Makrophagen kumulieren zu einem Fettstreifen auf der Intima. Die Plaque-Bildung der Makrophagen führt zu einer zusätzlichen Schädigung des Endothels und begünstigt die Adhäsion von Thrombozyten.

Thrombozyten stammen von Megakaryozyten ab. Etwa 1.000 Thrombozyten bilden sich aus einem Megakaryozyt (Hartwig 2003). Nach einer Verletzung bilden Thrombozyten die zelluläre Phase der Blutstillung als schneller und determinierter Verschluss des Blutgefäßes. Es wird frei liegendes Kollagen erkannt, wodurch sich zunächst einzelne Thrombozyten anheften. In den haftenden Thrombozyten wird Thromboxan synthetisiert, das die weitere

Thrombozytenaggregation induziert, was folglich wiederum die weitere Thromboxansynthese bedingt. Bekannt ist der Signaltransduktionsweg, der über Kontaktaktivierung, Kollagen, von-Willebrand-Faktor, Adrenalin etc. abläuft. Dies ist der IP3-Weg, der über Arachidonsäure ebenfalls wiederum zur Bildung bestimmter Prostaglandine führt, in Thrombozyten insbesondere zu Thromboxan TxA<sub>2</sub>, welches im Thrombozyt nur über die Cox-1 Isoform hergestellt wird. Thromboxan TxA<sub>2</sub> induziert zusammen mit anderen Faktoren, wie Plättchenfaktor 3 und 4, Fibronektin, ADP etc., eine hochgradig verstärkte Aggregation von insbesondere noch nicht aktivierten Thrombozyten aus dem Blutstrom und bildet schliesslich auch die Grundlage für den makroskopisch sichtbaren Blutpfropf (Thrombus).

Ferner lagern sich durch die von Makrophagen sezernierten Stoffe (PDGF, IL-1 und TNF), Leukozyten und Fibroblasten im Endothel an, während die vaskulären glatten Muskelzellen proliferieren. Die Muskelzellen proliferieren zu sekretorisch aktiven Zellen, die Kollagen und Proteoglykan sezernieren, so dass die Plaque wächst. Es lagern sich vermehrt Cholesterinkristalle, Fibrinplättchen, Thrombozyten etc. an. Die Dysfunktion der Intima löst zusätzlich eine Kaskade von Entzündungsreaktionen aus, wobei spezielle Transkriptionsfaktoren wie der nuclear factor kappa-B (NF-κB) ausgeschüttet werden und in nächster Instanz zu einer Expression von pro-inflammatorischen Proteinen wie der Cyclooxygenase (COX), der induzierten Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) oder des Tumor-Nekrose-Faktors α (TNFα) führen. Adhäsionsproteine heften sich an das geschädigte Endothel, wobei das P-Selektin die Anhaftung von Mono-, Granulo-, T-Lympho- und Thrombozyten begünstigt (Bogen 1994).

Auf der extrazellulären Ebene löst die geschädigte Intima die pro-thrombotische Kaskade aus, wobei die Anhaftung von Thrombozyten durch eine Verlangsamung des Blutstromes begünstigt wird. Die Initialisierung der Gerinnungskaskade erfolgt über die Ausschüttung des Gewebefaktors TF (tissue-factor) und dem sich an die Intima anheftenden aktivierten Hagemann-Faktor, während zeitgleich Glykoproteine die Adhäsion von Thrombozyten an die verletzte Intima unterstützen. Die Thrombozyten werden durch die Freisetzung von Thromboxan A<sub>2</sub> (TXA-2), Adenosindiphosphat (ADP) und Serotonin aus den Plättchengranula aktiviert, wobei die Aggregation über die Bindung an den Glykoprotein (GP)-IIb/IIIa-Rezeptor erfolgt. Der hierbei primär entstehende Abscheidungsthrampus heftet sich an die Plaque und kann zu einem akuten Verschluss des arteriellen Gefäßes führen (Mutschler 2001).

Die auswandernden Cytokine und Wachstumsfaktoren wie der vascular-endothelial-growth-factor (VEGF) aktivieren die Proliferation der glatten Muskelzellen der Media und deren Infiltration in die Intima. Dies führt zu einer Verdickung des Gefäßendothels und unterstützt die Entwicklung weiterer atherogener Plaque (Celletti 2001). Durch die aktivierte Caspase-1 unterliegen die Endothelzellen der Apoptose, wobei das nekrotische Gewebe in ein fibröses „Cap“ transformiert wird, was zu einer Stabilisierung der atherogenen Plaque führt. Die schleichende Einwanderung proteolytischer Enzyme und spezieller Metallo-Proteinasen rupturiert die Plaque. Es kommt zu einem akuten kardiovaskulären Ereignis. Die proteolytische Ruptur des fibrösen „Caps“ löst erneut die Gerinnungskaskade aus, die zu einem akuten kompletten Verschluss des Gefäßes führen kann. Sind hierbei auch noch die Media versorgenden Kapillaren geschädigt, so kommt es zur internen Bildung eines Thrombus, der bei Ruptur der Plaque in die Blutbahn freigesetzt wird und zu einem Verschluss des arteriellen Gefäßes oder durch intravasalen Transport zu einer Embolie führen kann.

## **1.2 Die Thrombozyten-Endothel-Interaktion (PVWI)**

Betrachtet man das Endothel als ein eigenständiges Organ, so besitzt es eine Austauschfläche von knapp 1000m<sup>2</sup> und ein Gewicht von 1,5 kg, was dem dreifachen Herzgewicht entspricht (Devlin 1997, Griebenow 1999). Da das Endothel im Zentrum der Blutendfunktionen steht, verwundert es nicht, dass sehr viele verschiedene Einflüsse seine Aktivität regulieren - sowohl passiv als auch aktiv, sowohl chemisch, als auch physikalisch. Nach innen besitzt es eine hochsensible Kontaktfläche zum Blut, die mechanisch auf Blutdruck und Flussgeschwindigkeit sowie systemisch auf Hormone, Entzündungsmediatoren und Sauerstoffgehalt reagiert.

Die äußere Schicht des Endothels bildet die Effektorschicht, in der die glatte Muskulatur der Media liegt, mit deren Hilfe das Endothel auch mechanisch agieren kann. Zu der direkten Gewebsumgebung, letztlich zu den nur noch kapillarisierten Endverbrauchern, bestehen wiederum vielfältige lokal-metabolische Beziehungen. Zu den systemischen Faktoren, die sich allerdings nicht bis zum völligen Ende der Strombahn erstrecken, gehören Blutdruck, Flussgeschwindigkeit, Gefäßinnervation, gefäßbezogene neuronale Transmitter und

verschiedene Hormone. In der Endstrombahn hingegen, wirken sich hauptsächlich Scherkräfte des Blutstroms und zahlreiche Stimuli der Umgebung aus.

Zu diesen gehören lokalchemische Einflüsse wie pH-Wert, Kalium, Adenosin, Histamin, Serotonin, Neuropeptide Y, sowie die Gewebshormone Bradykinine und weitere Zytokine. Bei Stimulation reagiert das Endothel mit der Freisetzung mit einer Reihe von hochaktiven, kurz- bis mittelfristig und lokal bis retrograd wirkenden Faktoren, die allgemein als Autakoide bezeichnet werden. Autakoide wirken auf die luminalen Blutbestandteile, welche wichtig sind für die traumatische Blutgerinnung und bei Entzündungsprozessen. Die wichtigsten Autakoide des Endothels sind NO, Prostacyclin, EDHF und die Endotheline (Quilley 1997, Rubanyi 1991).

Weiterhin erfolgt eine Aktivierung der plasmatischen Gerinnungsphase durch die Faktoren der Blutgerinnungskaskade mit letztlichem Fibrinverschluss (Cattaneo 2003). Treten die Thrombozyten in Interaktion mit dem Endothel, so wird dies als Plättchen-Gefäßwand-Interaktion (platelet vessel wall interaction, PVWI) bezeichnet, wobei hier in eine vorübergehende und eine stationäre Adhäsion unterschieden wird. Bei intakter Mikrozirkulation tritt der PVWI Effekt nicht auf. Die Adhäsion ist nur bei endothelialer Dysfunktion, Verletzung oder Entzündungsprozessen in der endothelialen Umgebung möglich.

Physiologisch wird normalerweise die Aggregation von Thrombozyten u.a. durch Prostacyclin oder Stickstoffmonoxid (NO) aus dem Endothel gehemmt. Im geschädigten Endothel werden diese Faktoren vermindert gebildet. NO (Stickstoffmonoxid) wird unter Verbrauch von NADPH durch NO-Synthasen (NOS) aus L-Arginin und Sauerstoff hergestellt. Es diffundiert gasförmig ungerichtet über Entfernungen von Zentimetern hinweg und bewirkt eine Vasodilatation der Gefäßwand sowie eine Thrombozyten-Aggregationshemmung (TAH) im Blutgefäß (Radomski und Salas 1995). Zur Hemmung der NOS wurde in dieser Arbeit N $\omega$ -nitro-L-Arginin (L-NA) (Woodman und Dusting 1991) eingesetzt.

Die bicyklische Verbindung Prostacyclin 2 (PGI<sub>2</sub>) wird, wie auch alle anderen Prostaglandine (PGs), aus Arachidonsäure gebildet (Davidge 2001). Prostacyclin bewirkt ebenfalls

Vasodilatation und Thrombozyten-Aggregationshemmung (Cheng 2002). Als stabiles Prostacyclin-Analog wurde in dieser Arbeit Iloprost (Schrör 1981) verwendet.

### **1.3 Die Cyclooxygenase (COX)**

Die COX katalysiert die Synthese von Prostaglandin und Thromboxan durch die Umwandlung von Arachidonsäure (Catella-Lawson 1999). Die Abbildung 1 zeigt den Prostaglandinsyntheseweg. Der erste Schritt in der Prostaglandinsynthese ist die Freisetzung von Eicosatetraensäure (Arachidonsäure) und Eicopentansäure aus den membranständigen Glykophospholipiden durch Phospholipase A. Die COX zyklisiert die freigesetzte Arachidonsäure an fünf zentralen Kohlenstoffatomen durch Oxidation, wobei eine Intermediärform entsteht, das Prostaglandin G<sub>2</sub> (PGG-2). Die Bifunktionalität des COX Enzyms erlaubt es, dass die Peroxidasefunktion von COX das PGG-2 in einer Folgereaktion zum instabilen Prostaglandin H<sub>2</sub> (PGH-2) konvertiert und schließlich in ein biologisch aktives Prostaglandin durch unterschiedliche COX assoziierte Prostaglandinsynthesen umwandelt (Diaz 2003). Im Verlauf des Prostanoidsyntheseweges wird Arachidonsäure alternativ von Lipoxygenasen oder durch COX zu Prostaglandin (PG), Prostacyclin (PGI-2) und Thromboxan (TXA<sub>2</sub>, TXB<sub>2</sub>) umgewandelt.

Die Cyclooxygenase kommt als Isoenzym in zwei Formen vor: als COX-1 und COX-2. Die Expression von COX-1 geschieht konstitutiv in nahezu allen Geweben und katalysiert wichtige physiologische Reaktionen und Funktionen, wie die Regulierung der Thrombozytenaggregation. Die COX-2 Isoform hingegen wird konstitutiv in den Geweben von Gehirn, Niere und im Rückenmark exprimiert, spielt jedoch nach heutigem Erkenntnisstand in Entzündungsprozessen eine entscheidende Rolle.

COX-1 und COX-2 besitzen die gleiche Substrataffinität zu Arachidonsäure, um diese katalytisch zu Prostaglandin umzusetzen. Im menschlichen Körper wird die COX-1-Isoform gemäß den physiologischen Konditionen und der genetischen Disposition überall exprimiert. Dabei erfüllt sie homöostatische Aufgaben. Die COX-1 katalysiert als konstitutiv exprimiertes Enzym die Biosynthese von Prostaglandinen, z. B. im Magen, in der Niere oder in den Thrombozyten wo Thromboxan A<sub>2</sub> gebildet und die Thrombozytenaggregation stimuliert wird. Das COX-Isoenzym spielt ferner eine entscheidende Rolle bei der Erhaltung des renalen

Blutflusses und der glomerulären Filtrationsrate (FitzGerald 2001). Das Isoenzym COX katalysiert die Synthese von Prostaglandin und Thromboxan durch die Umwandlung von Arachidonsäure (Catella-Lawson 1999). Die COX rekombiniert sich für die Prostanoid-Synthese mit der Peroxidase zu einer Prostaglandin Endoperoxidase Synthase (PGHS), (Brater 2001).

Raz und Mitarbeiter konnten 1989 die induzierbare Aktivität und katalytische Qualität von COX Isoenzymen darstellen. Sie beweisen die Existenz einer COX-2 Isoform am *in vitro*-Modell humaner dermaler Fibroblasten. Dabei führte die Stimulation der Zellen mit dem Cytokin Interleukin 1 (IL-1) zu einer signifikanten Förderung der COX Synthese (Raz 1989). Die über IL-1 und nachfolgend COX induzierte Synthese der PG Synthase wird als Prozess einer frühen transkriptionalen Phase (hemmbar durch Actinomycin D) und der nachfolgenden translationalen Phase (hemmbar durch Cycloheximid, nicht aber durch Actinomycin D) beschrieben. IL-1 wirkt dabei als Aktivator in der transkriptionalen, d.h. der frühen Phase. Inhibitoren der Proteinkinase C (PKC) wirken dem stimulatorischen Effekt von IL-1 entgegen.

Besonders an der Isoform COX-1 findet die Acetylierung des Serinrestes im aktiven Zentrum statt, was zu einer irreversiblen Inhibition der Thrombozytenaggregation führt. Thrombozyten sind kernlose Zellfragmente, so dass es ihnen molekularbiologisch unmöglich ist, das blockierte Enzym zu regenerieren. Der Austausch von Iso523 (COX-1) und Val523 (COX-2) eröffnet einen direkten Zugang zur hydrophoben Seitentasche des Enzyms in welcher der Phenylsulfonamidrest des Celecoxib hineinpasst. Die Sulfonamid-Gruppierung von Celecoxib ist zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zu Aminosäureseitenketten in der Seitentasche von COX-2 befähigt. Der resultierende Komplex besitzt keine kovalenten Bindungen zwischen Enzym und Ligand und ist zeitlich instabil. Die Hemmung ist daher reversibel.

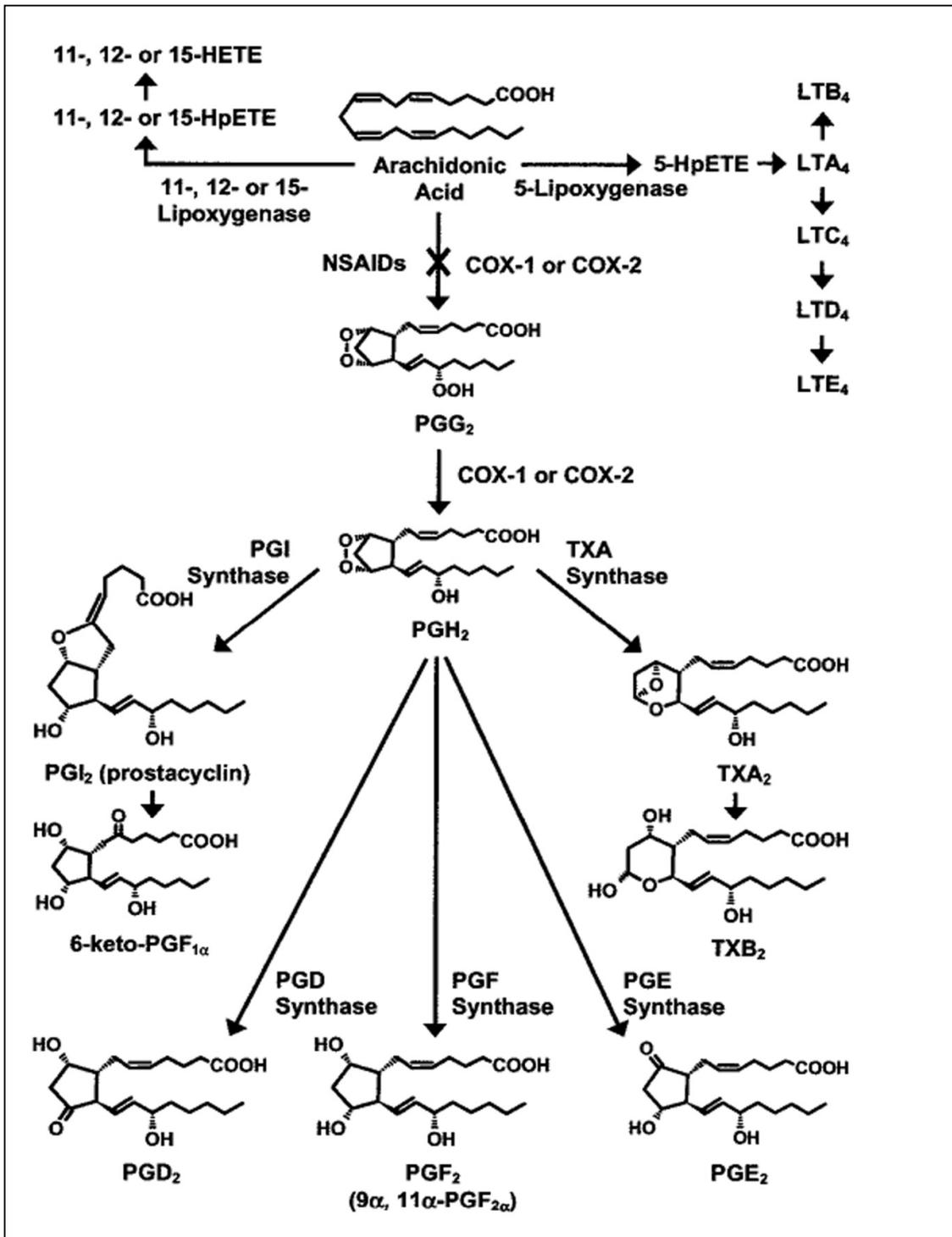


Abbildung 1: Arachidonsäureabbau und Prostaglandinsyntheseweg (modifiziert aus Simmons 2004)

#### 1.4 Nicht-steroidale Antiphlogistika (NSAIDs)

Die klassischen nichtsteroidalen Antiphlogistika (non steroidal anti inflammatory drugs, NSAIDs) werden gezielt in der Schmerztherapie bei Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises angewandt. Ihre entzündungshemmende Wirkung in Kombination mit analgetischen Effekten lässt sie u.a. zum Mittel der Wahl bei Patienten mit rheumatischen Erkrankungen werden, wie beispielsweise Acetylsalicylsäure (ASS), Arylpropionsäurederivate (Ibuprofen, Flurbiprofen, Naproxen, Ketoprofen, Tiaprofensäure), Arylessigsäurederivate (Diclofenac, Indometacin). Eine neue Generation von NSAIDs sind die so genannten selektiven Cyclooxygenase-2 Inhibitoren, die auch kurz Coxibe genannt werden. Im Gegensatz zu den klassischen Antirheumatika wie Diclofenac oder Ibuprofen, welche sowohl die COX-1 als auch die COX-2 hemmen, beeinflussen Coxibe wie NS-398 (Futaki 1994) in pharmakologisch relevanten Konzentrationen die COX-1 nicht. Ihre pharmakologische Wirkung beruht auf der Synthesehemmung von Prostaglandinen durch die Inhibition des Iso-Enzyms Cyclooxygenase 2 (COX-2). Dies führt zu einer Reduktion von Entzündungsmediatoren und lindert die Symptome von Entzündungen, Schwellung und Schmerz. Die Funktion von COX-1 jedoch, bleibt hiervon weitgehend unbeeinflusst.

Die klassischen NSAIDs zeigten eine nichtselektive inhibitorische Wirkung beider Isoformen der COX. Somit haben sie auf die physiologischen Wirkungen von COX ebenfalls unerwünschte Nebenwirkungen, wie beispielsweise auf die des Gastro-Intestinaltraktes (Bombardier 2000, Silverstein 2000). Die Entwicklung selektiver COX-Inhibitoren zeigte eine Veränderung des Thromboxan A<sub>2</sub> - Prostacyclin-Gleichgewichtes. Coxibe verschieben das Prostacyclin-Thromboxan-A<sub>2</sub> Gleichgewicht zugunsten des Thromboxan A<sub>2</sub>. Die Biosynthese des potenten Thrombozyten-Aktivators und -Aggregators Thromboxan A<sub>2</sub> erfolgt in Thrombozyten ausschließlich durch die COX-1, während die Biosynthese des Prostacyclins, welches aggregationshemmende und vasodilatierende Wirkungen aufweist, im Gefäßbett vor allem im Endothel mit signifikanter Beteiligung der COX-2 stattfindet. Selektive COX-1-Hemmer, wie niedrig dosierte Acetylsalicylsäure, verschieben das Prostacyclin-Thromboxan-A<sub>2</sub>-Gleichgewicht zugunsten des Prostacyclins und hemmen so die Thrombozyten-Aggregation. Coxibe wie Rofecoxib, Lumiracoxib, Celecoxib oder Valdecoxib beeinflussen die Thromboxan-Biosynthese in Thrombozyten nicht, hemmen aber die COX-2-vermittelte Prostacyclin-Biosynthese im Endothel und verschieben somit das Gleichgewicht zugunsten des Thromboxan A<sub>2</sub>, was zu einer erhöhten Aggregationsneigung

der Thrombozyten führt (Steinhilber und Laufers 2004). Einer der wichtigsten Thrombozytenaggregationshemmer ist der COX-Hemmer Acetylsalicylsäure. Die pharmakologische Funktionsweise der Acetylsalicylsäure (ASS, Aspirin) beruht auf der Hemmung der Prostaglandin-Biosynthese (Bergström 1963, Bergström 1983, Vane 1971, Vane und Botting 1998). Dabei erfolgt die irreversible Hemmung der Prostaglandin-H<sub>2</sub>-Synthase, genauer der Cyclooxygenase-Isoformen COX-1 und COX-2. Diese Enzyme katalysieren die Bildung von entzündungsverstärkenden Prostaglandinen und Thromboxan A<sub>2</sub>, das u. a. thrombozytenaktivierend wirkt. Der Hemmmechanismus besteht in der Übertragung eines Acetylrests von ASS auf die OH-Gruppe von Serin 530 im Bereich des katalytischen Zentrums der COX. Dies verhindert die Bindung des natürlichen Enzymsubstrats Arachidonsäure und bedingt eine dauerhafte Inaktivierung (Loll 1995). COX-1 wird durch ASS etwa 10-100-mal stärker gehemmt als COX-2.

Konservative NSAIDs wie Diclofenac oder Ibuprofen wirken durch Inhibition sowohl der COX-1 als auch der COX-2 Aktivität. Bei diesen besteht der Wirkmechanismus darüber hinaus in der kompetitiven Inhibition, wobei hier Wirkstoff und Arachidonsäure um die Bindung im aktiven Zentrum konkurrieren (Analog-Substrat-Hemmung). Die einzelnen Wirkstoffe der konventionellen NSAIDs variieren in ihren Eigenschaften um eine effiziente Bindung im aktiven Zentrum des Isoenzym sowie in ihrer Fähigkeit, die Enzym-Wirkstoff-Bindung im Zentrum schneller oder langsamer zu lösen (Selinsky 2001).

Diclofenac ist das wohl am häufigsten verwendete Antiphlogistikum und gilt als Mittel der Wahl bei akuten Erkrankungszuständen. Das Phenylelessigsäure-Derivat hemmt effektiv das COX-Isoenzym mit einer gering ausgeprägten molekularen Affinität zu COX-1. Die Wirkstoffe Ibuprofen und Naproxen sind arylierte Derivate der Propionsäure, wobei Naproxen vorrangig die COX-1 Isoform inhibiert (Van Hecken 2000). Die neue Generation von NSAIDs, die so genannten COX-2 selektiven Inhibitoren (Coxibe) wirken durch eine hohe Bindungsaffinität an die Arachidonsäure-spezifischen Aminosäurereste im aktiven Zentrum des Enzyms und blockieren den COX-2 charakteristischen Serinrest als Andockstelle für die Arachidonsäure. Die Interaktion des Coxibs mit dem Enzym ist in einer für die COX-2 charakteristischen Bindungstasche lokalisiert, welche die COX-1 nicht besitzt.

Klassische NSAIDs inhibieren daher beide Isoformen von COX, während die Coxibe selektiv nur die COX-2 hemmen. Da Prostaglandine aus lipiden Autacoiden entstehen, können sie sich

an vielerlei Systeme adaptieren, wie das ZNS, gastrointestinal, urogenital, endokrin, kardiovaskulär, respiratorisch und an das Immunsystem (Tab. 1). Die einzelnen Prostaglandinliganden lösen durch die Bindung an ihren spezifischen Rezeptor ein Signal in der Zelle aus (Tab.1). Für diese Arbeit interessant sind die Prostaglandineffekte auf die Thrombozytenaggregation. Der DP-Rezeptor löst bei Bindung des Liganden PGD-2 einen vermehrten Einstrom von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) und Calcium (Ca<sup>2+</sup>) aus.

**Tabelle 1: Prostaglandine und ihre Wirkung im Rezeptorkomplex (nach Mutschler 2001)**

Rezeptor	Signaltransduktion	Liganden	Prostaglandineffekt
DP	cAMP <sup>↑</sup> , Ca <sup>2+</sup> ↑	PGD-2	Vasodilatation. Inhibition der Thrombozytenaggregation. Stimulation der Zytokinfreisetzung. Relaxation der glatten Muskulatur im Gastrointestinaltrakt
CRTH2	cAMP <sup>↓</sup> , Ca <sup>2+</sup> ↑	PGD-2	Stimulation der Chemotaxis von T-Helferzellen und eosinophilen Granulozyten. Bronchokonstriktion
EP1	IP <sub>3</sub> <sup>↑</sup> , Ca <sup>2+</sup> ↑	PGE, PGF	Kontraktion der glatten Muskulatur im Gastrointestinaltrakt und in der Lunge, Schmerzüberleitung
EP2	IP <sub>3</sub> <sup>↑</sup>	PGE, PGF	Relaxation der glatten Muskulatur im Gastrointestinaltrakt, Lungen und dem vaskulären System, fortschreitende Zellproliferation
EP3	cAMP <sup>↓</sup> , IP <sub>3</sub> <sup>↑</sup>	PGE	Inhibition der Säuresekretion im Magen, verstärkte Uteruskontraktion während der Schwangerschaft, Inhibition der Lipolyse und der Transmitterfreisetzung, Schmerzüberleitung
EP4	IP <sub>3</sub> <sup>↑</sup> , cAMP <sup>↑</sup>	PGE	Verstärkte Sekretion der Magenschleimhaut, lässt den Ductus Arteriosus botalli offen
FP	IP <sub>3</sub> <sup>↑</sup>	PGF	Unteruskontraktion, Schmerzüberleitung, verstärkte Zellproliferation
IP	IP <sub>3</sub> <sup>↑</sup> , cAMP <sup>↑</sup>	PGI	Vasodilatation, Inhibition der Thrombozytenaggregation, Reninfreisetzung, Natriurese
TP	IP <sub>3</sub> <sup>↑</sup> , cAMP <sup>↑</sup>	TXA, PGD	Verstärkte Thrombozytenaggregation, Bronchokonstriktion, Modulation der T-Zellaktivität

## 2. Zielsetzung der Arbeit

Basierend auf den Ergebnissen der kontrovers diskutierten VIGOR-Studie (Mukherjee et al. 2001, Mukherjee 2002, Bing und Lomnicka 2002, Hankey und Eikelboom 2003) aus welcher der Verdacht einer adversen Wirkung von selektiven COX-2 Hemmern auf die Thrombozyten-Endothel-Interaktion entstanden ist, formulierten wir die Hypothese der hier vorliegenden Arbeit:

Selektive COX-2 Hemmer erhöhen die Thrombozyten-Endothel-Interaktion (platelet-vessel-wall-interaction = PVWI) und vermitteln in intakten Gefäßen somit prothrombotische Effekte im Tiermodell.

Dies wurde an Hand von einem experimentellen selektiven COX-2 Hemmer (NS-398), (=Agonist der PVWI) und einem unspezifischen Hemmer der beiden COX-Isoformen 1 und 2 (Acetylsalicylsäure) (=Antagonist der PVWI) im transparenten Rückenhautkammermodell des Hamsters in vivo untersucht.

Die in vivo Versuchsbedingungen erfolgten unter gezielter Hemmung von NO (=Stickstoffmonoxid) (=Antagonist der PVWI) mittels L-NA (=N $\omega$ -nitro-L-Arginin) (=Agonist der PVWI) sowie unter Zugabe von Iloprost (=Antagonist der PVWI), von denen bekannt ist, dass sie einen entscheidenden Einfluss auf die Thrombozyten-Endothel-Interaktion ausüben.

Diese Arbeit soll die Ergebnisse der VIGOR-Studie zur klinischen Untersuchung von selektiven COX-2 Hemmern im Tiermodell in vivo unter gezielten Bedingungen nachuntersuchen und mit der aktuellen Literatur kritisch diskutieren.

### **3. Material und Methoden**

#### **3.1 Die experimentelle Anordnung der *in vivo* Rückenhautkammer**

##### 3.1.1 Modell der Rückenhautkammer des syrischen Goldhamsters

Die im Folgenden dargestellten tierexperimentellen Untersuchungen erfolgten im Zeitraum Juni 2003 bis Oktober 2005 am Physiologischen Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München unter Leitung von Prof. Dr. med. U. Pohl. Als Tiermodell diente die transparente Rückenhautkammer, welche am Institut für Chirurgische Forschung der LMU München entwickelt wurde (Endrich et al. 1980, Endrich et al. 1982). Für detaillierte Informationen zu diesem Modell sei auf die Dissertation von A.E. Goetz bzw. nachfolgende Publikationen der Arbeitsgruppen am Institut für Chirurgische Forschung verwiesen (Dellian et al. 1995, Bürkle et al. 2004).

##### 3.1.2 Versuchstiere

Als Versuchstiere dienten Syrische Goldhamster (*Mesocricetus aureatus*) beiden Geschlechts mit einem durchschnittlichen Körpergewicht von 100 g (90-120 g) aus dem Inzuchtstamm der Firma Charles River, Sulzfeld. Die Tiere wurden jeweils zu mehreren in einem Käfig im Tierstall des Physiologikums bei Raumtemperatur und einem 12stündigen Licht/Dunkel-Rhythmus mit freiem Zugang zu Futter und Wasser gehalten. Zur Gewöhnung an die später folgenden Versuchsbedingungen wurden den Tieren transparente Plexiglasröhren in die Käfige gelegt. Tiere, die die Röhren konstant mieden, wurden von den Versuchen ausgeschlossen.

##### 3.1.3 Implantation der Rückenhautkammer

Für jede Versuchsanordnung wurden 3-4 Tiere dem Laborstall entnommen, gewogen und anschließend in Einzelhaltung gesetzt. Die Anästhesie der Tiere wurde durch die intraperitoneale Applikation von einer Lösung (250 µl/70g Hamstergewicht) aus 1 ml Ketamin (Ketavet® 10 %, Pfizer) und 600 µl Xylazin (Rompun® 2%, Bayer Vital GmbH) in

1 ml 0,9 % NaCl (Braun) eingeleitet und konnte durch zusätzliche Injektionen von 50  $\mu$ l dieser Lösung aufrecht gehalten werden. Die Rasur des Rückens zur Implantation der Kammer erfolgte mit einem Langhaarrasierer der FA. Aeskulap. Anschließend wurde die Rückenhaut der Tiere chemisch epiliert (Pilcamed, Schwarzkopf) und feucht gereinigt. Zur Vermeidung von Unterkühlung wurde der Hamster anschließend mit Papiertüchern abgetrocknet und unter einer Wärmelampe präpariert.

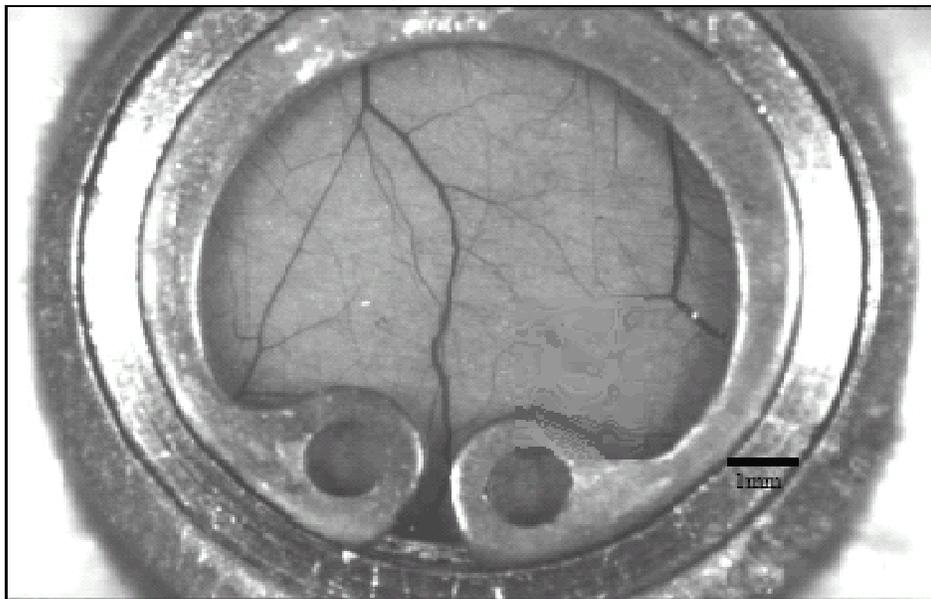


**Abbildung 2: Syrischer Goldhamster mit transparenter Rückenhautkammer (Bürkle 2002)**

Mittels Diaphanoskopie wurde eine Beurteilung der subkutanen Arteriolen und Venolen vorgenommen, um die darauf folgende Implantation der transparenten Rückenhautkammer (Werkstatt, Institut für Chirurgische Forschung) aus zwei gleichgroßen konvexen Titanplatten mit mikrochirurgischem Instrumentarium durchzuführen. Die Rückenhautkammer, sowie die Instrumente wurden vor der Implantation mit 70%iger Ethanollösung desinfiziert. Die Mittellinie wurde markiert und anschließend unter Durchleuchtung die Gefäßversorgung in der Rückenhaut ermittelt. Dann wurde der Implantationsbereich freigelegt. Dabei wurde eine Kammerhälfte am oberen Rand der Hamsterrückenhaut über der Mittellinie mit zwei Haltefäden fixiert. In Seitenlage wurde der noch freie Rückenhautbereich zum Präparator ausgerichtet. Das runde Beobachtungsfenster der anderen Kammerhälfte wurde auf der zugewandten Rückenhautseite angebracht, nachdem die Resektion der Cutis und Subcutis mikrochirurgisch erfolgte. Dabei wurden die intakte Schicht der gegenüberliegenden

Epidermis mit subkutanem Gewebe, die versorgenden Gefäße und der Hautmuskel dargestellt. Die zweite Kammerhälfte wurde aufgesetzt und mit drei Schrauben und Muttern an der gegenüberliegenden Platte befestigt. Hierbei betrug der Abstand zwischen den Platten 450 µm und wurde durch eine entsprechende Unterlegscheibe gewährleistet.

Aufgrund von Adhäsionskräften schmiegte sich die subkutane Schicht der gegenüberliegenden Seite an das runde Beobachtungsfenster an. Die Hautfalte wurde durch vier Haltefäden (Ethibond, 5-0, Fa. Ethikon, Norderstedt) in den vorgegebenen Kammerrandbohrlöchern fixiert. Das Kammerfenster wurde mit einem Deckglas (Ø 11,7 mm, Fa. Menzel, Braunschweig) und einem Sprengring fixiert. Die anliegenden Gefäße des Musculus cutaneus maximus konnten so makro- und mikroskopisch beobachtet werden (Bürkle et al. 2002, siehe Abbildung: 2 und 3).



**Abbildung 3: Makroskopische Aufnahme der transparenten Rückenhautkammer (Bürkle 2002)**

#### 3.1.4 In vivo Monitoring der Mikrozirkulation

Die syrischen Goldhamster wurden nach Anlage der dorsalen Rückenhautkammer am Versuchstag (24 Stunden nach Erstanlage) auf die optionalen Protokollbedingungen einer intakten Mikrozirkulation untersucht. Jedes Tier wurde auf Eignung für den Versuch hin

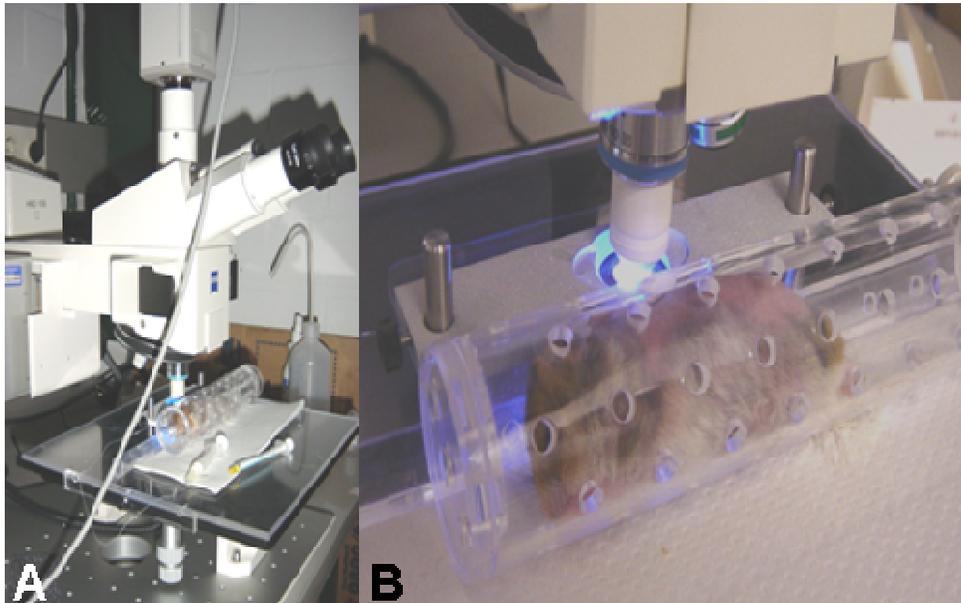
überprüft. Geeignete Tiermodelle zeigten nach der Präparation die Kriterien für eine intakte Mikrozirkulation. Diese Kriterien sind eine Unversehrtheit der Blutgefäße, ausreichende Sauerstoffsättigung, keine Freisetzung von Entzündungsmediatoren und optimale Blutdruckbedingungen (Gonzen et al. 1987). Die Eignungsprüfung begann mit der Überprüfung des korrekten Sitzes der Rückenhautkammer. Zur visuellen Überprüfung wurde mit einem Photomakroskop (Leitz) und einer daran angeschlossenen Videokamera (XC-77, Sony®) der Gewebebereich und das Gefäßsystem des Beobachtungsfensters betrachtet und dokumentiert. Die Übersichtsaufnahmen wurden vor jedem Versuch angefertigt. Zeigte sich 24 Stunden post operationem eine intakte Mikroziurkulation (Gonzen et al. 1987), so wurde das Tiermodell für die weitere Untersuchung in die Versuchsreihe aufgenommen.

Zur Ruhigstellung wurden die Tiere in eine durchsichtige Plexiglasröhre eingeführt, an die sie bereits gewöhnt waren. Die Röhre war mit Luftlöchern und einem Schlitz bis auf halbe Länge, in den die aus der Röhre herausstehende Rückenhautkammer geschoben wurde, versehen. Die Röhre war eine Spezialanfertigung der Werkstatt des Physiologikums, mit einem Durchmesser, der an die Größe der verwendeten Hamster angepasst war. Die Kammer wurde am Objektisch des Mikroskops mittels einer Platte fixiert, um starke ruckartige Bewegungen zu verhindern (Abbildung 3). Die Versuchstiere, welche die oben genannten Kriterien einer intakten Mikrozirkulation erfüllten, erhielten einen zentralen Venenkatheter in einem weiteren Schritt.

### 3.1.5 Anlage eines zentralen venösen Katheters

Die Versuchstiere, die die Kriterien erfüllten, erhielten einen zentralen Venenkatheter in Kurzzeitnarkose. Hierzu wurden die Tiere 24 Stunden nach Anlage der dorsalen Rückenhautkammer narkotisiert, wie oben beschrieben. Unter mikroskopischer Sicht wurde ein mit isotoner Kochsalzlösung gefüllter, 20 cm langer Polyethylenkatheter (0,28 mm ID, 0,61 mm OD; SIMS Portex, U.K.) in die Vena jugularis dexter eingebracht. Der Katheter wurde ca. 10 mm bis kurz vor das rechte Herz geschoben. Der zentrale Venenkatheter wurde mit Seide (Perma-Handseide 6-0, Ethicon GmbH, Norderstedt) an der Vena jugularis und an das subkutane Gewebe fixiert. Die subkutane Katheterausleitung in den Rücken der Tiermodelle sollte einen nachhaltigen Schutz vor mechanischer Manipulation und vor Entzündungen gewährleisten. Jedes Tier wurde nur für einen Versuch verwendet und direkt

im Anschluss an den Versuch mit einer letalen Dosis der Narkoselösung (ca. 200-250  $\mu$ l) über den Verweilkatheter eingeschlüpfert.



**Abbildung 4: Versuchsaufbau der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie an der Rückenhautkammer des Hamsters (A: Gesamtansicht, B: Hamster in der Röhre)**

### 3.2 Isolierung und Fluoreszenzfärbung humaner Thrombozyten

#### 3.2.1 Gewinnung von Thrombozytenkonzentrat

Die Gewinnung von Thrombozytenkonzentrat (platelet rich plasma, PRP) wurde wie beschrieben (Krötz et al. 2002 a, b) durchgeführt: Gesunden Spendern, die sich freiwillig zur Blutentnahme bereit erklärt und mindestens 10 Tage keine Medikamente eingenommen hatten, wurde venöses Blut entnommen. Alle Spender wurden über die wissenschaftliche Verwendung ihres Blutes informiert und erklärten sich schriftlich einverstanden. Das Blut wurde mit 3,13 % (w/v = Gewicht pro Volumen) Natriumcitrat-Lösung antikoaguliert und auf Kunststoff-Zentrifugenröhrchen (Fa. Quadrolab) verteilt. Dann wurde das Vollblut 15 min bei 1300 rpm (mit Bremse) bei Raumtemperatur zentrifugiert. Dadurch trennten sich in den Röhrchen drei Phasen: die untere Phase der roten Erythrozyten (ca. die Hälfte des Röhrchenvolumens), in der Mitte eine dünne Phase mit den Leukozyten (Buffy Coat) und in der oberen Phase das klare, leicht gelbliche Plasma (thrombozytenreiches Plasma, platelet rich

plasma (PRP)). Dieser Überstand wurde abgenommen und 10 min mit Prostacyclin (Iloprost, Fa. Schering) inkubiert, um eine Voraktivierung der Thrombozyten zu verhindern. Anschließend wurde der Überstand vorsichtig auf weitere Kunststoff-Zentrifugenröhrchen verteilt und 10 min mit 1500 rpm (mit Bremse) bei Raumtemperatur zentrifugiert. Die Thrombozyten waren als weißlicher Niederschlag (Pellet) am Boden des Röhrchens sichtbar.

Zur Fluoreszenzmarkierung wurde Calcein aus dem Tiefkühlraum auf Raumtemperatur aufgetaut und dabei aufgrund seiner UV-Empfindlichkeit vor Licht geschützt. Der Überstand der letzten Zentrifugation wurde abgenommen und aufgehoben. Damit weiterhin keine Aktivierung der Thrombozyten eintrat, wurde zum Resuspendieren dieser Überstand wegen seines noch vorhandenen Prostacyclingehalts verwendet. Das Pellet wurde mittels Eppendorfpipette in zunächst nur 1 ml Überstand resuspendiert, da bei Resuspension in einem grösseren Volumen zu hohe Scherkräfte auftreten können, die eine Schädigung der empfindlichen Blutplättchen zur Folge hätten. Dann wurden nochmals 3 ml Überstand zugegeben und suspendiert. Dazu wurden 20 µl Calceinlösung (Calcein-AM, 5 µMol/l, Fa. Molecular Probes, 1 mM in DMSO) sowie 1 µl Ilomedinlösung gegeben und 30 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert.

Die Flüssigkeit wurde auf 4 Zentrifugenröhrchen verteilt, mit Überstand aufgefüllt und 10 min bei Raumtemperatur mit 1.500 rpm (ohne Bremse) zentrifugiert. Der Calcium-freie Thrombozyten-Resuspensionspuffer wurde hergestellt mit 4,03 g NaCl (138 mMol/l); 0,1 g KCl (2,7 mMol/l); 0,5 g NaHCO<sub>3</sub> (12 mMol/l); 0,03 g Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (400 µMol/l); 0,1 g MgCl<sub>2</sub> x 6 H<sub>2</sub>O (1 mMol/l); 0,45 g D-Glucose (5 mMol/l) und 0,6 g Hepes (5 mMol/l) auf 500 ml Aqua dest.. Der pH wurde auf 7,35 eingestellt. Der Puffer wurde im Kühlschrank gelagert und vor der Zugabe auf Raumtemperatur gebracht.

Das Thrombozyten-Pellet der letzten Zentrifugation wurde mit 1 ml Thrombozytenpuffer resuspendiert und in einem Reagenzglas lichtgeschützt bei Raumtemperatur gelagert. Die Thrombozytenkonzentration wurde mithilfe einer Zählkammer für Widerstands-Partikel gezählt (Coulter Counter Z2, Fa. Beckman Coulter). Diese war so eingestellt, dass sie Partikel zählte, welche einen Durchmesser von 1,8 - 3,5 µm hatten. Hierfür wurden 5 µl der zu zählenden Thrombozytenlösung mit 20 ml azidfreier stabilisierter Elektrolytlösung (Isopan II, Fa. Beckman Coulter) verdünnt und in Plastik-Küvetten gefüllt. Die Zählkammer wurde dreimal mit Isoton II-Lösung gespült. Anschließend wurde zur Bestimmung des Leerwertes

zunächst Isoton II-Lösung gemessen, um dann die verdünnten Thrombozyten zu messen. Abschliessend wurde das Gerät noch dreimal gespült. Abzug des Leerwertes und Multiplikation mit dem Verdünnungsfaktor ergab die Konzentration der Thrombozyten pro  $\mu\text{l}$  Lösung. Das Resultat war calceingefärbtes Thrombozytenkonzentrat mit einer Konzentration von ca. 400.000 Plättchen pro  $\mu\text{l}$ .

### 3.2.2 Verwendete Substanzen

#### 3.2.2.1 Wirksubstanzen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden vier unterschiedliche Substanzen hinsichtlich ihres Einflusses auf die Thrombozyten-Endothel-Interaktion untersucht.

*ASS* = Aspirin (Fa. Bayer, Aspisol)

Die Flasche mit Trockensubstanz enthält 0,9 g DL-Lysinmono(acetylsalicylat), entsprechend 0,5 g Acetylsalicylsäure und Glycin. 1 Ampulle mit Lösungsmittel enthält 5 ml Wasser für Injektionszwecke. Es wurde zur Hemmung der Synthese von Prostaglandin sowohl über COX-1 als auch über COX-2 eingesetzt.

*Ilo* = Iloprost (Fa. Schering)

Iloprost wurde von der Fa. Schering, Berlin, bezogen, wobei Substanz und Trägerlösung in getrennten Ampullen geliefert wurden. Eine Ampulle der Wirksubstanz enthält Iloprost-Trometamol, Ethanol 96 % (v/v), Natriumchlorid, Salzsäure 3,65% und Wasser für Injektionszwecke. Es wurde zur Simulierung der Wirkung von Prostacyclin eingesetzt.

*L-NA* = N $\omega$ -nitro-L-Arginin (Fa. Sigma)

1,095 mg wurden in 50 ml MOPS gelöst (100  $\mu\text{Mol/l}$ ). Es wurde zur Hemmung der Synthese von NO eingesetzt.

*NS-398* = selektiver Cox-2 Inhibitor (Fa. Sigma)

1 mg wurde in 1 ml DMSO (Fa. Sigma) gelöst. Es wurde zur selektiven Hemmung der Synthese von Prostaglandin über COX-2 eingesetzt.

MOPS = 145 mM NaCl (Fa. Applichem); 4,7 mM KCl (Fa. Applichem); 3,0 mM CaCl<sub>2</sub> x 2 H<sub>2</sub>O (Fa. Fluka); 1,17 mM MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O (Fa. Fluka); 1,2 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Fa. Fluka); 2,0 mM Pyruvat (Fa. Sigma); 0,02 mM EDTA (Fa. Applichem); 3,0 mM MOPS (Fa. Applichem); 5 mM Glucose (Fa. Applichem); Zugabe von CaCl<sub>2</sub> x 2 H<sub>2</sub>O zuletzt in klare Lösung, sonst Ausfällung durch EDTA. Die Puffersubstanzen wurden in Aqua dest. gelöst und die Pufferlösung mit NaOH auf pH 7,4 eingestellt (ca. 7 ml 2 N NaOH für 5 l Pufferlösung).

### 3.2.2.2 Applikation der Wirksubstanzen

#### *Intravenös (i.v.)*

Die jeweilige Wirkstofflösung wurde nach dem experimentellen Protokoll intravenös über den Verweilkatheter injiziert. Danach wurden definierte Wartezeiten bis zur Injektion des Thrombozytenkonzentrats eingehalten.

#### *Intraperitoneal (i.p.)*

Die Wirkstofflösungen wurden nach der Implantation des Verweilkatheters intraperitoneal injiziert. Bis zum Versuchsbeginn wurden 2 Stunden Wirkzeit eingehalten.

#### *Thrombozytenkonzentrat-Inkubation (plt):*

Die Lösungen der Wirksubstanzen wurden direkt zum Thrombozytenkonzentrat gegeben. Nach 5-10 min Inkubationszeit wurden davon 100 µl injiziert. Darauf erfolgte unmittelbar die Messung. Nach Bedarf (Abnahme der sichtbaren Thrombozyten im Blut) wurden während der Messung 20-30 µl PRP nachinjiziert.

#### *Superfusion (superf.):*

Das vordere Sichtfenster der Rückenhautkammer wurde abgenommen und ein kleiner Plexiglaszylinder (Laboranfertigung) aufgesetzt, der die Wirksubstanzlösung am Abfließen über das Sichtfenster hinderte und einen definierten Ableitungsschlauch zu einer kleinen Pumpe hatte. Auf das nun freiliegende Beobachtungsgebiet der Rückenhautkammer im Inneren dieses Zylinders wurden 50 ml Wirksubstanzlösung aus einer 50 ml-Spritze mit einem Infusomat (Fa. Braun Melsungen) innerhalb von 30 min aufgeträufelt und im Zylinder überstehende Lösung gleichzeitig abgesaugt. Jede Superfusion endete mit einer Spülung von 5-10 ml MOPS. Darauf erfolgte unmittelbar die Messung.

### **3.3 Versuchsprotokoll zum Einsatz der Wirksubstanzen**

#### 3.3.1 Kontrollversuch

Kontrollversuche wurden wie in 2.1.4 und 2.1.5 beschrieben durchgeführt. Im Anschluss wurden vor Bildaufnahme 100 µl fluoreszenzgefärbtes humanes Thrombozytenkonzentrat (platelet rich plasma = PRP) i.v. appliziert. Darauf wurden unmittelbar die Bilder mit Mikroskop und Kamera aufgenommen.

#### 3.3.2 Versuche mit ASS

Die Versuche wurden analog des Kontrollversuchs durchgeführt, wobei 2 h zuvor zusätzlich Aspirin (5 mg/kg) intravenös appliziert wurde. Erst dann wurde das fluoreszenzgefärbte PRP verabreicht. Anschließend erfolgten die Aufnahmen mit Mikroskop und Kamera.

#### 3.3.3 Versuche mit NS-398

Die Versuche mit NS-398 wurden analog des Kontrollversuchs durchgeführt, jedoch erhielten die Versuchstiere 2 h vor Bildaufnahme mit Mikroskop und Kamera NS-398 i.p. (5 mg/kg) injiziert.

#### 3.3.4 Versuche mit NS-398 und ASS

Die Versuche mit NS-398 und ASS wurden analog des Kontrollversuchs durchgeführt, jedoch erhielten die Versuchstiere 2 h vor Bildaufnahme mit Mikroskop und Kamera NS-398 i.p. (5 mg/kg). Anschließend erhielten sie eine Injektion von 100 µl PRP, das vorab 5 Minuten mit ASS in einer Konzentration von (10 µg/ml) inkubiert wurde.

### 3.3.5 Versuche mit L-NA

Die Versuche mit L-NA wurden analog des Kontrollversuchs durchgeführt, wobei anschließend 30 Minuten eine Superfusion mit L-NA (100  $\mu$  Molar) appliziert wurde. Danach erfolgten eine Spülung mit 5 ml MOPS [4-(N-Morpholino)butansulfon-säure] und im Anschluss die Filmaufnahmen mit Mikroskop und Kamera.

### 3.3.6 Versuche mit NS-398 und Iloprost

Die Versuche mit NS-398 und Iloprost wurden analog des NS-398 Versuchs durchgeführt. Weiterhin wurden die Fluoreszenz-gefärbten Thrombozyten mit Iloprost für 5 Minuten (Endkonzentration 1 nmol/l) inkubiert, zum Versuch appliziert und dann Filmaufnahmen mit Mikroskop und Kamera durchgeführt.

### 3.3.7 Versuche mit NS-398 und L-NA

Die Versuche mit NS-398 und L-NA wurden analog des NS-398 Versuchs durchgeführt. 30 Minuten vor Experimentbeginn wurde die Superfusion mit L-NA verabreicht und eine Spülung mit MOPS durchgeführt. Im Anschluss erfolgte die Filmaufnahme mit Mikroskop und Kamera.

### 3.3.8 Arterieller Verschluss in vivo

Zur Darstellung eines Gefäßverschlusses wurden zunächst 50  $\mu$ l einer 5%igen mit Fluorescein-Isothiocyanat markiertem Dextranlösung (FITC-Dextran, Molekulargewicht 150.000, Fa. Sigma) über den zentralen Venenkatheter injiziert. Nachdem ein normaler Blutfluss in den untersuchten Arteriolen sichergestellt war, wurden zur chemischen Schädigung der Gefäßwand mittels Radikalbildung 30  $\mu$ l einer FeCl<sub>3</sub>-Lösung (25 mmol/l) direkt auf die Arteriolen pipettiert. Dazu wurde zuvor das Deckglas entfernt. Danach erfolgten die Filmaufnahmen bis zum Eintritt des Gefäßverschlusses oder von mindestens 6 min Länge. Zur Dokumentation des Eintrittszeitpunktes des Gefäßverschlusses wurden Bilder nach 2 min,

5 min, und falls nötig auch 6.5 und 10 min analysiert (Denis et al. 1998). Abbildung 5 zeigt den Versuchsablauf.

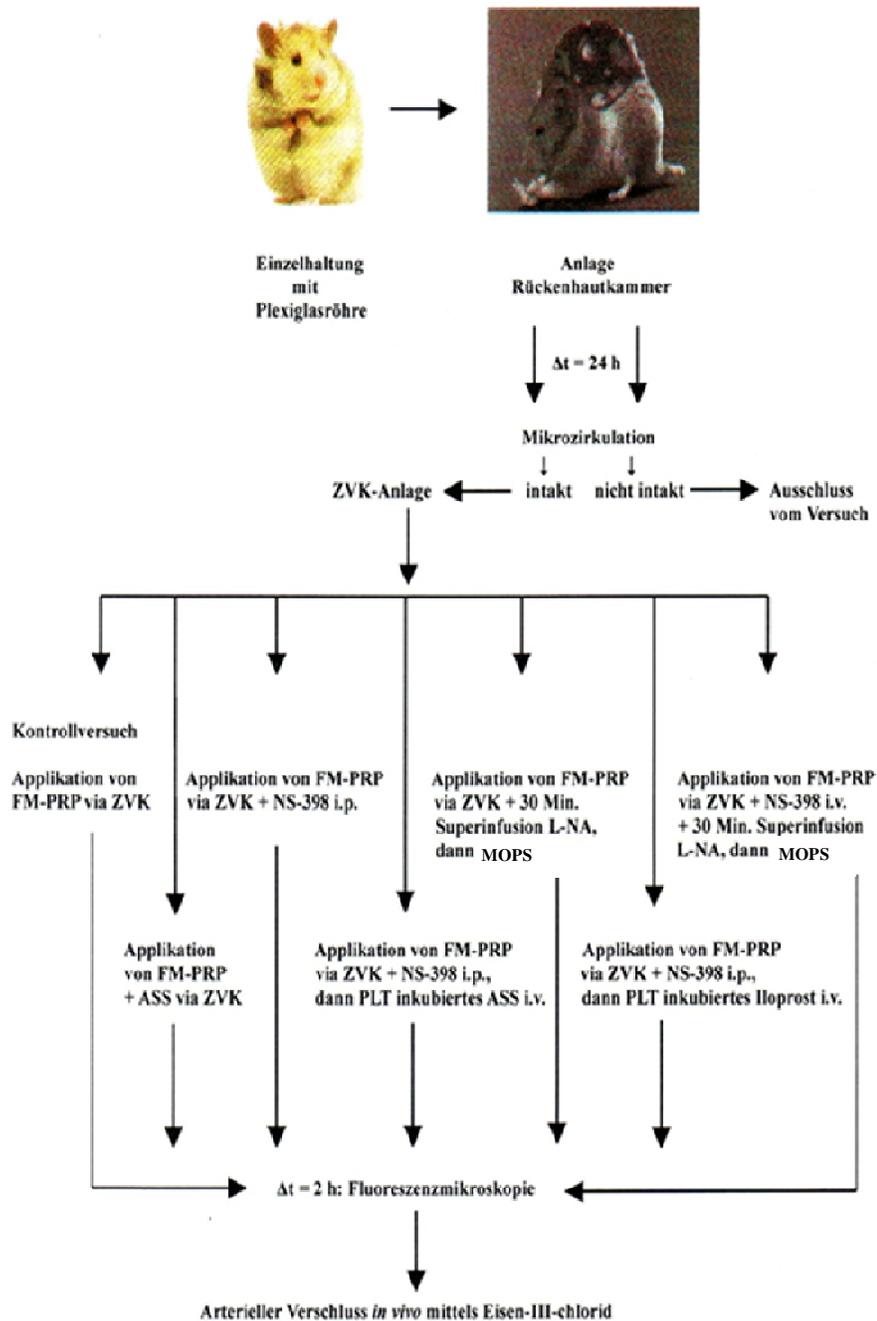


Abbildung 5: Graphische Darstellung des Versuchsablaufs. FeCl<sub>3</sub>-induzierter arterieller Verschluss wurde als Plättchen-Aktivierungsparameter untersucht.

### 3.3.9 Kollektiv der 6-keto-Prostaglandin F<sub>1α</sub> –Immunoassays

Zur Messung der Aktivität der Cyclooxygenasen wurde die 6-keto-Prostaglandin F<sub>1α</sub> Konzentration *in vitro* im Überstand von HUVEC-Zellkulturen und *in vivo* im Hamsterserum bestimmt. Die 6-keto-Prostaglandin F<sub>1α</sub>-(6-keto-PGF<sub>1α</sub>) Immunoassays wurden mit kommerziell erhältlichen Immunoassay Kits (ELISA) nach Herstellerangaben (R&D Systems, Deutschland) durchgeführt. Für die *in vivo* Messung wurden ca. 300 µl Blut durch kardiale Punktion abgenommen. Die geronnenen Blutproben wurden in Anwesenheit von Indometacin zentrifugiert (1 Uµg/ml, 1000 rpm, 2 Min). Die Überstände wurden gesammelt und bei -80°C bis zum 6-keto-PGF<sub>1α</sub>- Immunoassay gelagert. Die HUVEC Zellkulturen wurden zum Anwachsen auf Kollagen beschichtete 24-Well Mikrotiterplatten aufgetragen. NS-398 (100-500 µmol/l), Aspirin (50-500 µg/ml) und eine Blindlösung wurden für 2 Stunden vorinkubiert, bevor Histamin (10 µmol/l) für 5 Minuten hinzu gegeben wurde.

## 3.4 Fluoreszenzmikroskopie

### 3.4.1 Technische Methodik

Zur Beobachtung der fluoreszierenden Thrombozyten und ihrer Wechselwirkung mit dem Endothel diente ein modifiziertes Mikroskop Axiotech Vario (Fa. Zeiss) mit verschiedenen Filtern (Filterset 9 für FITC und 14 für Rhodamin). Zur Orientierung wurde das Beobachtungsfeld in der Rückenhautkammer direkt beobachtet und dazu mit einer weißen Lampe beleuchtet, die ein normales farbiges Bild ergab. Zur Aufnahme wurde das Beobachtungsfeld mit einer Quecksilberlampe beleuchtet. Die Aufnahmen erfolgten mit einer Digitalkamera C8484 (Fa. Hamamatsu) mit einer aufsteckbaren Vergrößerungsoptik („Video-Zoom 44 C 1/3“, Zeiss) als Zusatzgerät. Die Bildfrequenz war 14,5 Bilder/sec bei einer Belichtungszeit von 0,069539 Sekunden. Die Steuerung der Kamera, die Messung und die Speicherung der Filme erfolgten mit dem Programm Simple PCI (Fa. Compix Inc., Imaging Systems, Cranberry. Township, PA, USA). Als Rechner wurde von der Firma Hamamatsu eine Sequoia mit 200 Gbyte Festplatte zur Verfügung gestellt. Ein Film hatte 4 Gbyte, bei 4 min Länge. Nach dem Versuch wurden die Filme auf eine Speicherfestplatte überspielt und von dort aus analysiert.

### 3.4.2 Analyse der Thrombozyten-Endothel-Interaktion (PVWI)

#### 3.4.2.1 Plättchen-Geschwindigkeit

Innerhalb des vorbezeichneten Rückenhautkammerareals wurde zunächst mit direkter optischer Beobachtung eine Arteriole identifiziert. Aus diesem Bereich wurde ein spezielles Areal mit einem unverzweigten oder verzweigten Arteriolenabschnitt (Gefäßabschnitt) betrachtet, wobei pro Gefäß bis zu 10 einzelne Gefäßsegmente untersucht wurden. Jedes Gefäßsegment wurde 30 sec lang in 500facher Vergrößerung auf einem Areal von 200  $\mu\text{m}$  x 100  $\mu\text{m}$  belichtet, so dass insgesamt eine Filmlänge von 30 sec bei 470 Bildern aufgezeichnet wurde. Zur Vermeidung einer Mehrfachzählung von Thrombozyten wurden die Filme chronologisch aufgenommen, bei einem Filmmaterial von 4 Minuten pro Gefäß durch 8 Aufnahmen zu je 30 Sekunden Länge. Die Belichtungszeit wurde so gewählt, dass der einzelne Thrombozyt in den aufeinander folgenden Aufnahmen verfolgt werden konnte. Aus den 470 Bildern eines Films wurden für die Messung 10 Bilder so ausgesucht, dass mobile Thrombozyten nicht doppelt gemessen wurden.

In der Filmanalyse wurde die Länge der Fluoreszenzspuren aller Thrombozyten auf einem Film-Einzelbild gemessen, wobei die Spurlänge jedes einzelnen Thrombozyten in  $\mu\text{m}$  vom optischen Anfang bis zum Ende der Leuchtspur digital erfasst wurde. Daher wurden pro Versuchsreihe ca. 4.000 bis 40.000 Spurlängen von Thrombozyten identifiziert, validiert und analysiert. Alle Bilder wurden aufgenommen und durch das computerassistierte Programm Cap Image 7.1 (Simple PCI, Fa. Compix Inc., Imaging Systems, Cranberry Township, PA, USA) analysiert.

Die resultierende Länge der Thrombozytenspuren in den einzelnen Bildern lässt eine Berechnung der Geschwindigkeit der jeweiligen Thrombozyten über die Belichtungszeit (0,7 sec) des Bildes zu. Bei der Auswertung eines Bildes entspricht die Spurlänge demnach einem Zeitraum von 0,7 Sekunden. Die Geschwindigkeit berechnet sich folglich aus der Spurlänge der Thrombozyten in  $\mu\text{m}$  dividiert durch 0,7 Sekunden. Die Thrombozyten wurden nach ihrem Fließverhalten in stabil adhärent, transient haftend oder frei fließend eingeteilt.

### 3.4.2.2 Frei fließende und transient haftende Thrombozyten

Als frei fließende Thrombozyten wurden solche charakterisiert, die auf den Bildern eine Linie durch ihre Fluoreszenzspur hinterließen und nicht als Punkte in Erscheinung traten, so dass sie auf allen Bildern in Bewegung waren. Transient haftende Thrombozyten erscheinen auf manchen Bildern als Punkt, auf anderen als kurzer Strich, so dass sie eine Adhäsion über eine Filmdauer von mindestens 20 Sekunden eingehen mussten und ihre Geschwindigkeit signifikant kleiner war als die Durchschnittsgeschwindigkeit. Die Thrombozytengeschwindigkeiten wurden auf *eine* Maximalgeschwindigkeit normalisiert (die Geschwindigkeit des schnellsten Thrombozyten), um die systematische Abweichung durch den Einfluss der veränderten Blutflussgeschwindigkeit auszuschließen. Um den Einfluss der zu untersuchenden Substanzen auf die Gesamtgeschwindigkeit des Blutflusses zu validieren, wurden die gemessenen Spurlängen der mobilen und der transient haftenden Thrombozyten auf die Blutflussgeschwindigkeit normiert, wobei jede gemessene Spurlänge eines Thrombozyten auf die jeweils längste ermittelte Spurlänge dieses Tieres normiert wurde. Der erhaltene Wert der normierten Spurlänge lag in einem Intervall zwischen 0 und 100. Aus den normierten Spurlängen wurden Histogramme der Häufigkeitsverteilung (Lange und Bender 2001) erstellt, indem die ermittelte Anzahl von Thrombozyten mit einer bestimmten normierten Spurlänge gegen diese Spurlänge aufgetragen wurde. Eine Linksverschiebung der Geschwindigkeitsverteilung, im Vergleich zur Kontrolle, weist auf einen größeren Anteil von Thrombozyten mit langsameren Geschwindigkeiten, eine Rechtsverschiebung auf einen größeren Anteil an Thrombozyten mit höheren Geschwindigkeiten hin.

### 3.4.2.3 Stabil adhärente Thrombozyten

Thrombozyten verhielten sich stabil adhärent, wenn sie sich für 30 Sekunden nicht bewegten (Massberg et al. 1998) und auf allen untersuchten Bildern als Punkt an gleicher Lokalisation auftraten. Fest haftende Thrombozyten wurden nicht in die Geschwindigkeitshistogramme aufgenommen, sondern separat beschrieben durch ihre Anzahl pro Gefäßfläche. Als Vergleichsparameter wurde zu jedem Versuch auch die Geschwindigkeit des Blutflusses (Volumenfluss) charakterisiert als Länge der längsten Thrombozytenspur aus einem Tier, geteilt durch die Belichtungszeit, um aus dem schnellen Blutfluss in der Mitte des Gefäßes die durchschnittliche Blutgeschwindigkeit zu errechnen.

### 3.5 Statistische Analyse

Unter intravitaler Mikroskopie wurden die Anzahl der Gefäße (N), die Gefäßlänge (Mikrometer), des jeweils untersuchten Gefäßabschnittes, die Anzahl der Thrombozyten (N) und deren Fluggeschwindigkeit (Milimeter pro Sekunde) bestimmt. Die Analyse der Flussgeschwindigkeit erfolgte nach der Formel: Flussgeschwindigkeit = Länge des Gefäßabschnittes (Strecke) / benötigte Zeit zum Durchfluss durch einen definierten Abschnitt (Zeit). Die gemessenen Werte (absolut) wurden in Relation zur höchsten gemessenen Geschwindigkeit gesetzt (relativ) und angegeben bzw. abgebildet. Es wurde weiterhin die Messung der Anzahl des fest adhärenen Thrombozyten und die benötigte Zeit (in Sekunden) bis zum vollständigen Gefäßverschluss durchgeführt. Zusätzlich wurde die Messung der Serumkonzentration von 6-keto-Prostaglandin  $F_{1\alpha}$  (6-keto-PGF $_{1\alpha}$ ) bestimmt. Diese Werte wurden in unbehandelten Hamstern (Kontrollen) und in Hamstern mit Behandlung von den beschriebenen Wirkstoffen (NS-3898, Aspirin, Iloprost, L-NA) gemessen.

Es erfolgte ein statistischer Vergleich zwischen den Kontrollen und den verschiedenen Wirkstoffgruppen. Hierzu wurde bei dem Vergleich zwischen mehreren Versuchsgruppen bei normalverteilten Parametern ein ANOVA-Test, bei gepaarten Versuchsgruppen und normalverteilten Parametern ein Student's  $t$  Test und bei dem Vergleich zwischen nicht normalverteilten Flussdiagrammen ein Kolmogorov-Smirnov-Test angewendet. Alle statistischen Tests wurden zweiseitig und allgemein explorativ auf einem 5% Signifikanzniveau durchgeführt. Die Ergebnisse in dieser statistischen Auswertung wurden als signifikant gewertet, wenn das 5%ige Signifikanzniveau unterschritten wurde.

Die Angaben der deskriptiven Statistik sind, wenn nicht anders spezifiziert, als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung angegeben. Die verwendeten Testverfahren sind jeweils im Text explizit benannt. Zur Veranschaulichung wurden zusätzlich ausgewählte Testergebnisse in Graphen dargestellt.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Basisparameter des Versuchsprotokolls

Der arithmetische Durchschnitt der Durchmesser aller untersuchten Arteriolen lag bei  $54.8 \pm 1.1 \mu\text{m}$ , wobei der durchschnittliche Durchmesser in der Kontrollgruppe (38 untersuchte Arteriolen in 7 Tieren) bei  $54.9 \pm 2.5 \mu\text{m}$  lag.

In der NS-398 behandelten Gruppe (42 Arteriolen von 7 Tieren) betrug der durchschnittliche Durchmesser  $58.6 \pm 2.4 \mu\text{m}$  und in der mit Aspirin versorgten Gruppe bei  $57.8 \pm 2.2 \mu\text{m}$  (24 Arteriolen in 4 Tieren). In der mit NS-398 behandelten Gruppe, dem anschließend Aspirin-behandelte Thrombozyten infundiert wurden (21 Arteriolen von 4 Tieren), konnte ein durchschnittlicher Durchmesser von  $47.8 \pm 1.8 \mu\text{m}$  gemessen werden.

Die NS-398 versorgte Gruppe, dem anschließend Iloprost-behandelte Thrombozyten infundiert worden waren, zeigte einen durchschnittlichen Durchmesser von  $51.4 \pm 2.4 \mu\text{m}$  (21 Arteriolen von 4 Tieren) (Tabelle 2). Eine Verringerung des mittleren Arterioldurchmessers um mehr als  $6 \mu\text{m}$  wurde in der NS-398+Aspirin behandelten Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe gemessen.

Die Thrombozytengeschwindigkeit sowohl im NS-398+Aspirin als auch im NS-398+Iloprost behandelten Kollektiv war geringer als im Kontrollkollektiv. Interessanterweise zeigte sich in allen mit NS-398 behandelten Gruppen, die anschließend mit Aspirin oder Iloprost inkubierten Thrombozyten infundiert wurden, eine Reduzierung der Flussgeschwindigkeit.

**Tabelle 2: Basis- und Vergleichsparameter des Versuchsprotokolls**

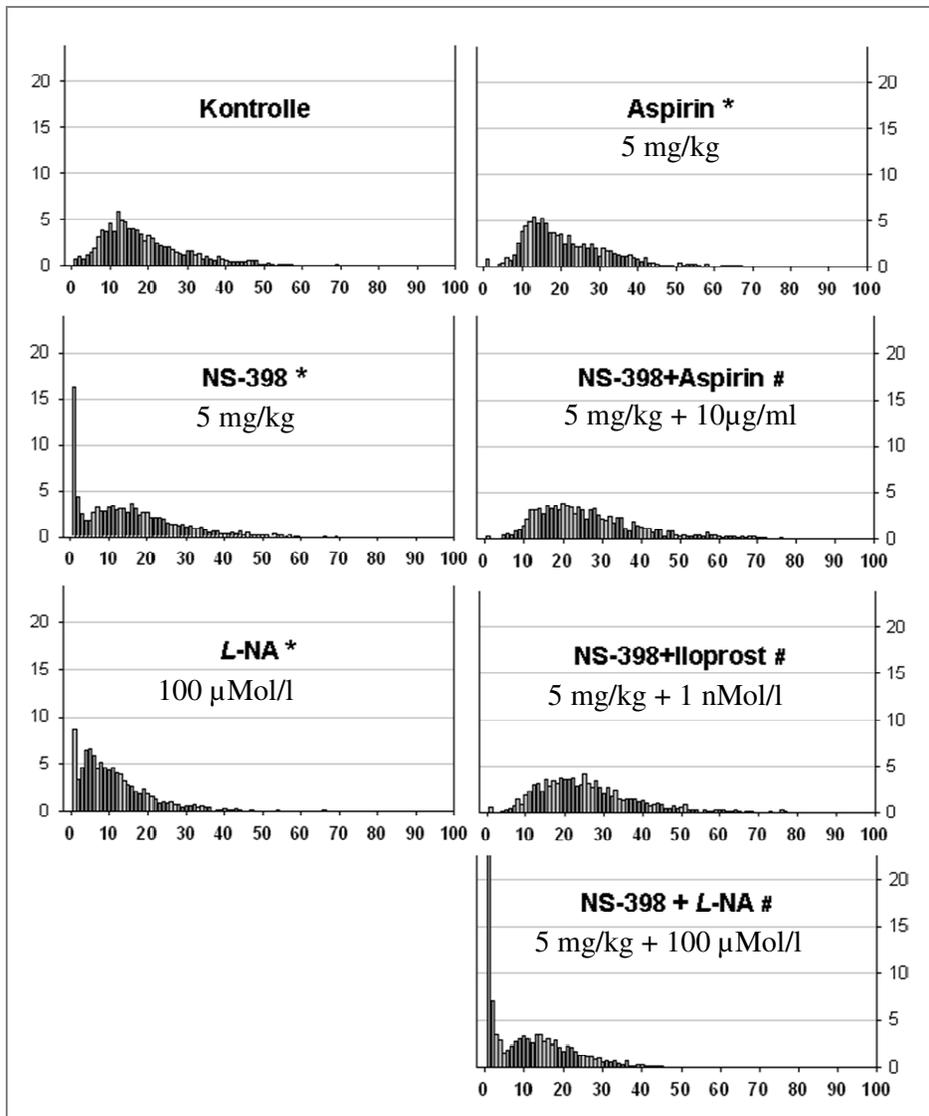
	<b>Kontrolle</b>	<b>NS-398</b>	<b>Aspirin</b>	<b>NS-398 + Aspirin</b>	<b>NS-398 + Iloprost</b>
<b>Anzahl der Tiere (n)</b>	7	7	4	4	4
<b>Anzahl der analysierten Gefäße</b>	38	42	24	21	23
<b>Mittlerer Gefäßdurchmesser (µm)</b>	54.7 ± 2.5	58.6 ± 2.4	57.8 ± 2.2	47.8 ± 1.8	51.4 ± 2.4
<b>Mittlere Thrombozytengeschwindigkeit (mm/s)</b>	0.83 ± 0.5	0.67 ± 6.0	0.84 ± 0.5	0.61 ± 0.3	0.60 ± 0.3
<b>Maximale Thrombozytengeschwindigkeit (mm/s)</b>	2.0 ± 0.13	1.7 ± 0.09	1.9 ± 0.15	1.4 ± 0.08*	1.3 ± 0.08*
<b>Relative Maximalgeschwindigkeit (mm/s)</b>	41.5	39.4	44.0	43.6	46.2

Die Werte sind als Anzahl bzw. Mittelwerte ± Standardfehler angegeben. Unterschiede zwischen den jeweiligen Gruppen und den Kontrollen werden markiert wenn signifikant mit \* =  $p < 0.05$ .

## 4.2 Thrombozytengeschwindigkeit

In der mit NS-398 behandelten Gruppe konnte eine signifikante Linksverschiebung im Vergleich zur Kontrollgruppe ( $p < 0.05$ ) der Thrombozytengeschwindigkeit beobachtet werden. Dies spricht für eine gesteigerte und verlängerte Thrombozyten-Endothel-Interaktion. Die mit Aspirin behandelte Gruppe zeigte eine signifikante Rechtsverschiebung im Verteilungsmuster der Thrombozyten-Endothel-Interaktion ( $p < 0.05$ ) verglichen mit der Kontrollgruppe.

Wurden den NS-398 behandelten Tieren anschließend mit Aspirin oder Iloprost inkubierte Thrombozyten appliziert, konnte eine Linksverschiebung der Thrombozyten-Endothel-Interaktions-Muster verhindert werden (in beiden Fällen  $p < 0.05$  vs. NS-398). Bei den mit NS-398, L-NA und NS-398+L-NA behandelten Kollektiven zeigt sich eine Linksverschiebung der Thrombozytengeschwindigkeit. Eine graphische Darstellung dieser Ergebnisse erfolgt in Abbildung 6.



**Abbildung 6: Thrombozyten-Endothel-Interaktion dargestellt an Hand der relativen Flussgeschwindigkeiten.**

Die Abszisse kennzeichnet die Unterteilung nach % der maximalen Flussgeschwindigkeit. Die Ordinate stellt den prozentualen Anteil an Thrombozyten dar. Die Ergebnisse sind als signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe \* =  $p < 0.05$  sowie im Vergleich zur NS-398 Gruppe # =  $p < 0.05$  entsprechend markiert.

#### 4.3 Induktion der Thrombozytenanhaftung an die Gefäßwand durch NS-398

Im Folgenden wurde beobachtet, inwiefern eine feste Anhaftung von Thrombozyten an die Gefäßwand durch NS-398 induziert werden konnte.

Eine Behandlung der Tiere mit NS-398 bewirkte eine signifikante Verstärkung der dauerhaften Anheftung von Plättchen im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 7). Im Kontrollkollektiv wurden keine ( $0.9 \pm 0.9$  Plättchen/mm<sup>2</sup>) in den Arteriolen fest haftende Plättchen beobachtet.

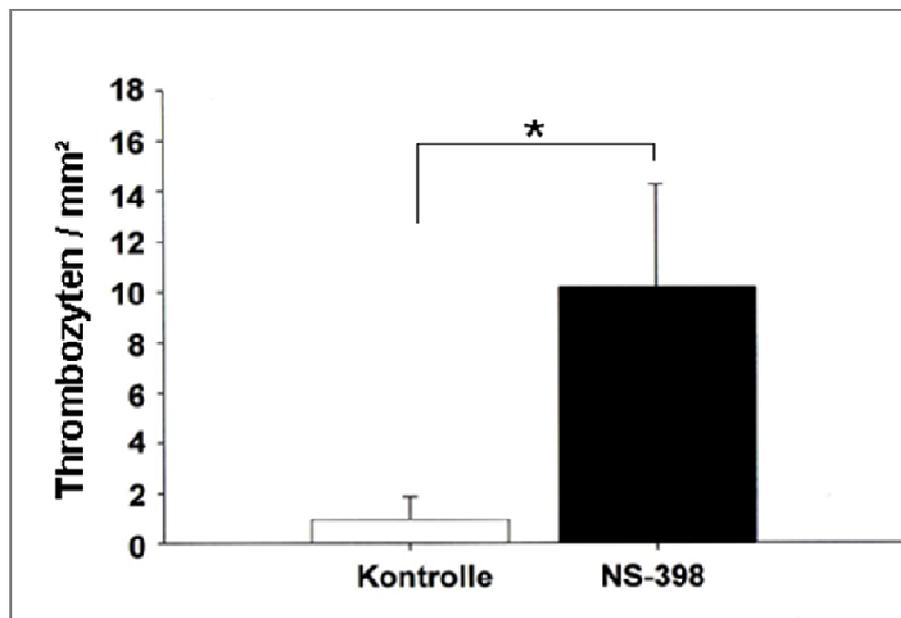


Abbildung 7: Verstärkung der festen Anheftung von Plättchen an die Gefäßwand *in vivo* durch die selektive Hemmung von Cox-2 mit NS-398 (\* =  $p < 0.05$ )

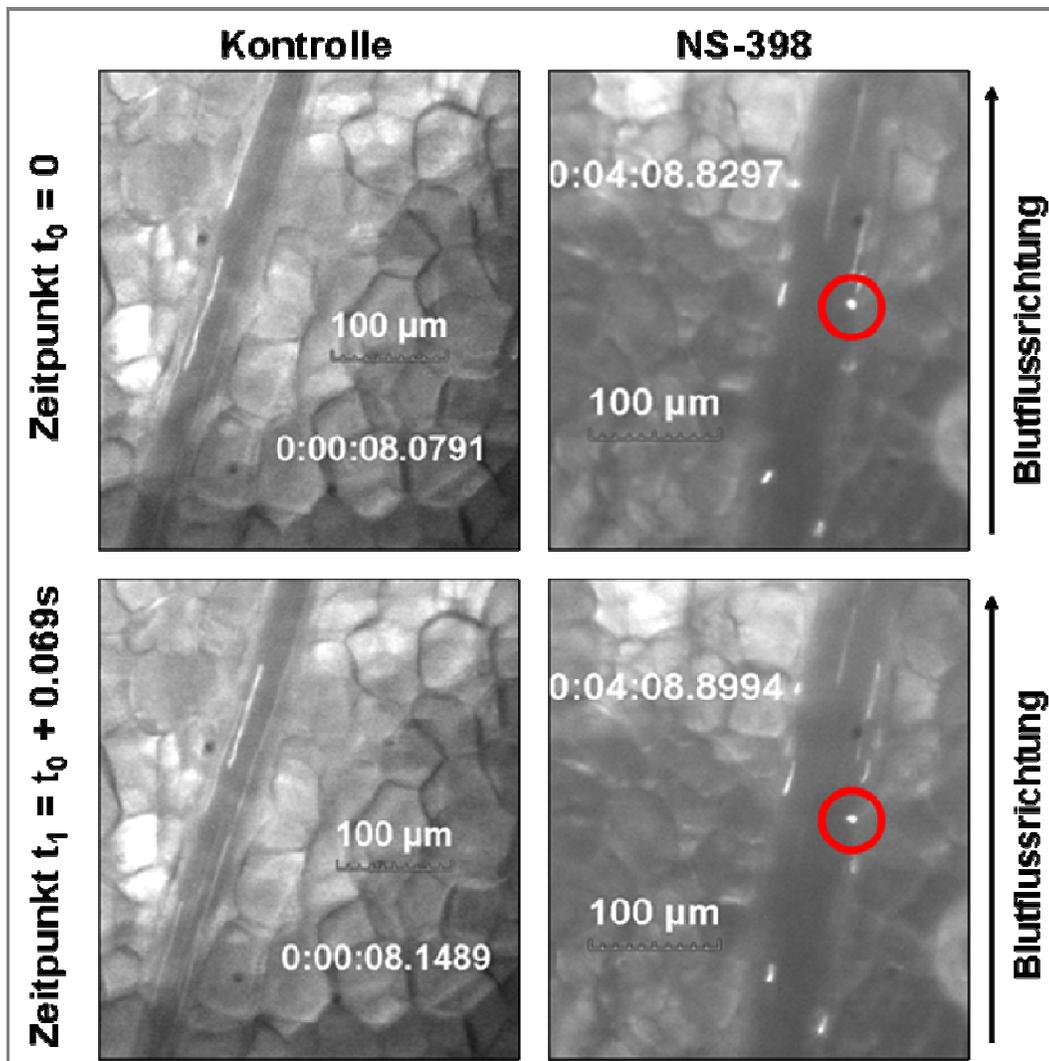


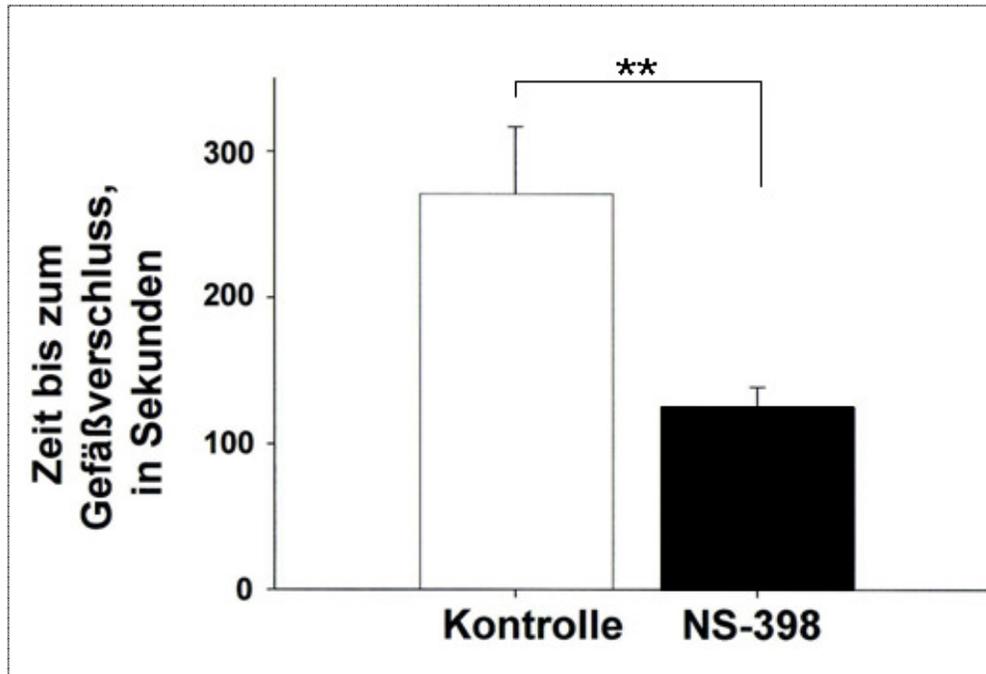
Abbildung 8: Kameraaufnahmen von im Fettgewebe eingebetteten Arteriolen.

Abgebildet sind Kontrollen (linke Spalte) und NS-398 positive (rechte Spalte) Modelle bei Zeitpunkt  $t_0 = 0$  (obere Zeile) und  $t_1 = 0 + 0.069\text{sec}$  (untere Zeile) später. Die Kreise zeigen einen bei beiden Zeitpunkten anhaftenden (fluoreszenz-markierten) humanen Thrombozyten

#### 4.4 Prothrombotische Wirkung von NS-398 *in vivo*

Zur *in vivo* Charakterisierung der prothrombotischen Wirkung von NS-398 wurde untersucht, ob die Steigerung der Thrombozyten-Endothel-Interaktion letztlich zu einer Beschleunigung des thrombotischen Gefäßverschlusses führen kann, wenn die Gefäßwand durch andere Noxen vorgeschädigt ist. Dazu wurde das Plasma mit Fluoreszenzfarbstoff markiert und die freiliegende Haut der Rückenhautkammer mit  $\text{FeCl}_3$ -Lösung lokal vorgeschädigt. Die Kontrollgruppe umfasste 4 Hamster und die mit NS-398 behandelte Gruppe 6 Hamster.

Abbildung 8 zeigt eine starke Zunahme an fest haftenden Thrombozyten in der NS-398 behandelten Gruppe, wobei als fest haftende Thrombozyten nur jene galten, die mindestens 30 sec an derselben Stelle der Gefäßwand adhären sind. Abbildung 9 verdeutlicht die signifikante Beschleunigung des Gefäßverschlusses nach Gefäßwandschädigung durch selektive Hemmung von COX-2 mit NS-398.



**Abbildung 9: Beschleunigung des Gefäßverschlusses nach Gefäßwandschädigung durch selektive Hemmung von COX-2 mit NS-398 (\*\* =  $p < 0.001$ )**

Plasma wurde mit Fluorescein-Isothiocyanat-markiertem Dextran gefärbt. Nach Schädigung der Gefäßwand mittels Eisen-III-Chlorid war die Zeit bis zum Eintritt des Gefäßverschlusses in NS-398 behandelten Tieren signifikant kürzer als in der Kontrollgruppe (wobei nur 3 der 6 Tiere in der Kontrollgruppe überhaupt einen Gefäßverschluss zeigten). Im 6-minütigen Beobachtungszeitraum fand in allen Hamstern, die mit NS-398 behandelt wurden, ein Gefäßverschluss statt (nach 91.5, 96.0, 106.0, 137.0, 146.0 und 176.0 sec, durchschnittlich nach  $125.4 \pm 15$  sec). Dagegen zeigten nur 3 Tiere der Kontrollgruppe überhaupt einen Gefäßverschluss (nach 182.0, 201.0 und 340.0 sec, durchschnittlich nach  $241.8 \pm 50$  sec). Das vierte Tier zeigte während des gesamten Beobachtungszeitraums von 6 min weder

Gefäßverengung noch Verschluss. Demnach induziert NS-398 eine signifikante Steigerung und Beschleunigung des Gefäßverschlusses im untersuchten Tiermodell.

#### 4.5 Messungen von 6-Keto-PGF<sub>1α</sub> im Serum

6-Keto-PGF<sub>1α</sub> wurde im Hamsterserum und in den Überständen von HUVEC-Zellkulturen gemessen. *In vivo* konnte eine signifikante Senkung der 6-Keto-PGF<sub>1α</sub>-Konzentration im Serum nach Behandlung der Tiere mit NS-398 nachgewiesen werden (974.9 ± 193.0 pg/ml in den Kontrollen, n = 4; 416.6 ± 60 pg/ml in NS-398 behandelten Tieren, n = 4; p < 0.05 vs. Kontrolle). Dagegen wurde mit Aspirin keine signifikante Verringerung der 6-Keto-PGF<sub>1α</sub>-Produktion erreicht (Abbildung 10).

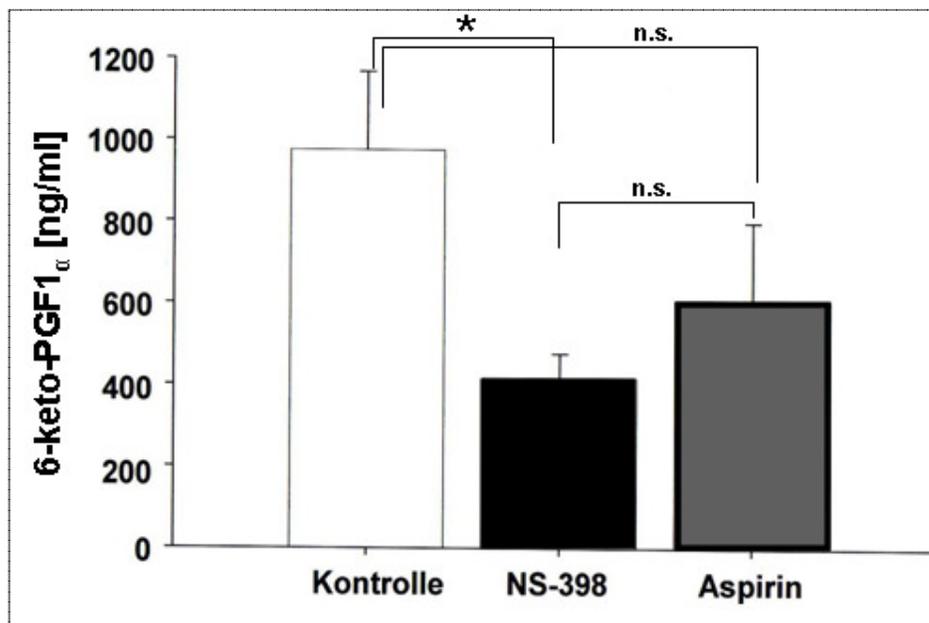
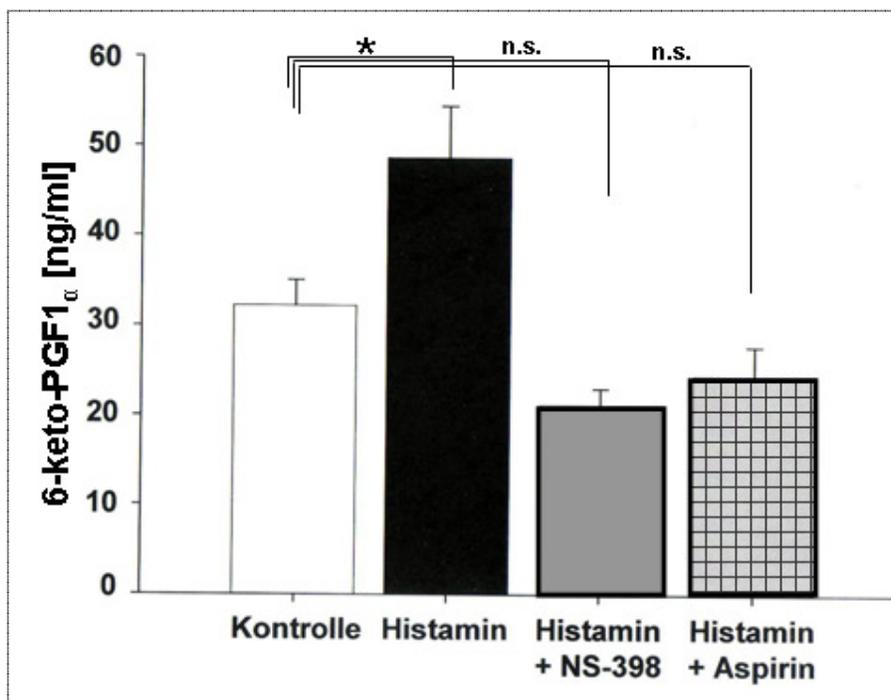


Abbildung 10: Serum-Konzentrationen von 6-keto-PGF<sub>1α</sub> in NS-398 und Aspirin

behandelten Tieren im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, n.s. = nicht signifikanter Unterschied; \* = p < 0.05.

In den HUVEC-Kulturen stieg die 6-Keto-PGF<sub>1α</sub>-Konzentration im Überstand nach Inkubation der Zellen mit Histamin (10 μmol/l, 5 min) im Vergleich zur Kontrolle (32.2 ± 3 ng/ml) signifikant auf 48.7 ± 6 ng/ml an (p < 0.05; n = 7). Die Vorinkubation der HUVEC's, sowohl mit NS-398 (100 μmol/l, 2h, n = 4) als auch mit Aspirin (50 μg/ml, 2h, n = 5), inhibierte nicht nur den Histamin-induzierten Anstieg der 6-Keto-PGF<sub>1α</sub>-Konzentration, sondern bewirkte auch eine Verringerung von 6-Keto-PGF<sub>1α</sub> gegenüber den unbehandelten Kontrollen (NS-398, 21.2 ± 2 ng/ml; p < 0.01 vs. Histamin, p < 0.05 vs. Kontrolle; Aspirin, 24.4 ± 3 ng/ml; p < 0.01 vs. Histamin, NS vs. Kontrolle; Abbildung 11).



**Abbildung 11: 6-keto-PGF<sub>1α</sub>-Konzentrationen im Überstand von HUVEC-Kulturen nach Inkubation der Zellen mit Histamin, Histamin + NS-398 und Histamin + Aspirin im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, n.s. = nicht signifikanter Unterschied; \* = p < 0.05.**

## **5. Diskussion**

### **5.1 Diskussion der Methodik**

#### 5.1.1 Das Rückenhautkammer-Modell am syrischen Goldhamster

Die experimentelle Zugänglichkeit von Blutgefäßen in der Atheroskleroseforschung beruht auf verschiedenen biologischen Modellen. Dabei wurden Gesamtorganismen untersucht. Dies sind insbesondere Teilstromgebiete von Maus (Denis 1998), Ratte, Kaninchen (Shinmura 2000), Hamster, Hund (Oltman 1998, Hennan 2001), Rind und Mensch (Passauer 2003).

Darunter wurden unter anderem auch Koronar-Arterien (Vanhoutte und Shimokawa 1989, Pohl 1994), Aa. radiales, Aa. cremastericae sowie Hirngefäße beobachtet. Das hier angewandte Modell verwendet den Syrischen Goldhamster (Hoepfl 2002) mit dem Rückenhautkammer-Modell. Dabei werden die oberflächlichen Arterien, Arteriolen, Kapillaren, Venolen und Venen sichtbar dargestellt. Es wurde am Institut für Chirurgische Forschung der LMU München entwickelt (Endrich 1980, Endrich 1982). Dieses Modell wird seit ca. 20 Jahren für Untersuchungen in der Mikrozirkulation verwendet (Menger 2002). Es diente bisher verschiedenen wissenschaftlichen Fragestellungen, aus dem Bereich Angiogenese, Mikrozirkulation, Wachstum und Metastasierung bei Tumoren, der Mikrozirkulationsforschung in der Chirurgie, Sepsis, Inflammation, Schock, Ischämie etc. (Gonzen et al. 1987, Dellian 1995, Meßmer und Krombach 1998, Bürkle 2002).

Das Modell der Rückenhautkammer des Hamsters ist besonders geeignet, um die Wirkung von COX-1- und COX-2-Hemmern auf das Endothel und die Thrombozyten über den PVWI Effekt zu untersuchen. Der Hamster kann mit verschiedenen Medikamenten und Inhibitoren behandelt werden. Dabei wird eine gezielte Manipulation der Endothelseite angestrebt. Die Thrombozyten werden ebenfalls vor der Zugabe mit verschiedenen Effektoren inkubiert. Das Endothel selbst kann in keinem Tiermodell selektiv erreicht werden, sondern nur über den Gesamtorganismus. Dies betrifft das Lumen oder das angrenzende Gewebe.

### 5.1.2 Intravitalmikroskopie fluoreszenzmarkierter Thrombozyten

In der vorliegenden Arbeit wurden fluoreszenzmarkierte Thrombozyten mit Hilfe der Intravitalmikroskopie direkt beobachtet. Die Färbungen wurden mit Calcein durchgeführt. Mit dieser Methode konnte schon gezeigt werden, dass sich Plättchen damit darstellen lassen (Krötz 2004, Bürkle 2004). Hämodynamisch unauffällige Endstromgebiete mit Arteriolenästen wurden ausgewählt und über ein Bildaufzeichnungssystem dokumentiert. Das aus der chirurgischen Forschung stammende Rückenhautkammermodell des Syrischen Goldhamsters wurde auf physiologisch-biochemische Fragestellungen im Zusammenhang mit der Mikrozirkulation ausgeweitet. Dieses experimentelle Modell fand erstmalig zur Untersuchung des Thrombozytenverhaltens *in vivo* an der Maus Verwendung (Massberg 1998). In der hier vorliegenden Arbeit wurde hingegen der syrische Goldhamster verwendet. Dies wurde nach einem modifizierten Versuchsprotokoll durchgeführt, welches erstmalig in seiner Form von Verheul und Kollegen (Verheul 2000) beschrieben wurde und weitere Verwendung bei Krötz und Mitarbeiter (Krötz 2004) fand.

Hierbei werden die Thrombozyten mit Calcein gefärbt, um eine spezifische Charakterisierung der Thrombozyten ausschließlich zu erreichen. Bei Massberg und Mitarbeitern erfolgte in dessen Modell ursprünglich eine Färbung mit Rhodamin, welches allerdings zu einer unspezifischen Färbung von Blutzellen (Thrombozyten, Leukozyten) führte (Massberg 1998). In dem hier vorliegenden Modell liegt das Augenmerk ausschließlich auf der Intravitalmikroskopie der Thrombozyten.

Isolierte Thrombozyten sind weitgehend gezielt experimentell modifizierbar. Sie können einfach mit Wirksubstanzen „gewaschen“ werden. Durch Markierung mit Fluoreszenzfarbstoff sind sie in der hier verwendeten Intravitalmikroskopie gut sichtbar darzustellen und ihre Bewegungen mit Bildaufzeichnungstechniken dokumentierbar. In eigenen Kontrolluntersuchungen zeigten die so behandelten Thrombozyten ein normales Aggregationsverhalten.

### 5.1.3 Der PVWI Effekt als Parameter der COX-Inhibition

Die humanen Thrombozyten konnten vielfältig manipuliert werden, insbesondere durch Färbung und Stimulierung. Sowohl die intermediäre Rolle entlang der Gefäßwand als auch das feste Anhaften am Endothel ist experimentell beobachtbar (Siegel-Axel 2006).

Der in dieser Arbeit hauptsächlich untersuchte Parameter ist die PVWI (platelet vessel wall interaction), d. h. die Interaktion von Thrombozyten mit der Gefäßwand. Diese lässt sich durch die Intravitalmikroskopie fluoreszenzmarkierter Thrombozyten beobachten und in Histogrammen mit der Geschwindigkeitsverteilung der Thrombozyten quantitativ und qualitativ darstellen (Siegel-Axel 2006, Langer und Gawaz 2008, McClellanda 2009). Insgesamt konnten für etwa 20 Versuchsreihen ca. 400.000 Thrombozyten vermessen werden. Am eingesetzten Untersuchungsmodell wurden die prothrombotischen Reaktionsmuster, die Verlangsamung von wandnahen Thrombozyten, d. h. molekular vermittelte Verstärkung der Adhäsion, "Rollen" entlang der Gefäßwand (transiente PVWI, molekular vermittelt über Selektine), "Sticken" an der Gefäßwand (feste PVWI, vermittelt u. a. über Integrine) und Beginn der Aggregation der Thrombozyten untereinander (vermittelt über Thromboxan, Glycoproteine etc.) erfasst (Croner et al. 2006). In unserem Modell bedeutete eine vermehrte Adhäsion von Thrombozyten mit der Gefäßwand eine Linksverschiebung der Messpunkte in den von uns dargestellten Histogrammen.

## 5.2 Diskussion der Daten

NO ist seit langem bekannt als Inhibitor der Thrombozytenaggregation (Radomski 1995). Auch in dieser Untersuchung führte die Applikation von L-NA, welches die endogene Produktion von NO bewirkt, zur gesteigerten Adhäsion von Thrombozyten (Abbildung 6). Prostacyclin entsteht durch die Aktivität der Cyclooxygenasen (COX-1 und COX-2) oder die Prostaglandin-H-Synthasen. Als klassischer Inhibitor dieser Enzyme wirkt ASS auf beide Isoenzyme nahezu gleichermaßen effektiv. In dieser Untersuchung führte Aspirin zu einer der von L-NA entgegengesetzten Verschiebung der Plättchengeschwindigkeiten (Abbildung 6).

Als Vertreter eines selektiven COX-2 Inhibitors wurde NS-398 verwendet, das ähnliche enzyminhibitorische Eigenschaften wie Rofecoxib (Vioxx, Pfizer) aufweist, welches klinisch

nicht mehr zugelassen ist (Greenberg 2000). Über Prostacyclin hat das Endothel einen hemmenden Einfluss auf die Thrombozytenaggregation. Dieser Einfluss wurde durch Behandlung der Thrombozyten mit Iloprost simuliert, einem künstlichen Prostacyclin, das nicht metabolisiert wird.

Von den drei Autakoiden Prostacyclin, NO und EDHF war zu Beginn dieser Untersuchung von den ersten beiden bekannt, dass sie aggregationshemmend auf Thrombozyten wirken. Ein analoger Einfluss durch EDHF wurde vermutet und in den zwischenzeitlich von uns durchgeführten Untersuchungen konnte ebenfalls gezeigt werden, dass EDHF *in vivo* antithrombotisch im gesunden Endothel wirkt (Krötz 2010). Zur selektiven Untersuchung der Wirkung von EDHF musste die gleichgerichtete Wirkung von Prostacyclin und NO experimentell ausgeschlossen werden. Daher wurde in der Arbeit anfangs versucht, die Synthese von Prostacyclin und NO mittels NS-398 bzw. L-NA zu unterbinden. Jedoch haben NS-398 und auch L-NA einen deutlichen Effekt auf die PVWI, wenn sie alleine verabreicht werden, ohne die anderen Effektoren zu berücksichtigen. Darüber hinaus verhielten sich bei gemeinsamer Applikation von Effektoren bzw. ihren Synthesehemmern in ihrer Wirkung nicht additiv und auch nicht, wie erwartet, überadditiv.

Dies steht im Widerspruch zu Annahmen aus der obigen Modellvorstellung. Danach sollten die weiterhin vorhandenen beiden Effektoren den Verlust des einen ausgleichen. Auf der Grundlage dieser Beobachtung wurde davon ausgegangen, dass bei den Experimenten zur Rolle von EDHF auf eine gleichzeitige Hemmung der Prostaglandinsynthese durch NS-398 und eine zusätzliche Ausschaltung von NO nicht erforderlich ist, wenn der Einfluss von EDHF auf die Plättchen-Gefäßwand-Interaktion zu untersuchen ist. Der Versuch zur Induktion eines früheren Eintritts des Gefäßwandverschlusses durch die NS-398 Behandlung zeigte dann, dass der Einsatz von selektiven COX-2 Inhibitoren bei einem vorgeschädigten Endothel (z. B. bei Atherosklerose) schneller zu einem Gefäßverschluss führt.

Die Aktivität der Cyclooxygenasen wurden ebenfalls über die Bestimmung der 6-keto-PGF<sub>1α</sub>-Konzentration *in vitro* im Überstand von HUVEC-Zellkulturen und *in vivo* im Hamsterserum bestimmt. *In vivo* wurde eine signifikante Senkung der 6-keto-PGF<sub>1α</sub>-Konzentration im Serum nach selektiver COX-2 Inhibition durch NS-398 Gabe, jedoch nicht nach Aspirin Gabe beobachtet. *In vitro* stieg die 6-keto-PGF<sub>1α</sub>-Konzentration im Überstand nach Inkubation der

Zellen mit Histamin signifikant. Die Vorinkubation der HUVECs mit NS-398 und auch mit Aspirin inhibierte den Histamin-induzierten Anstieg der 6-keto-PGF<sub>1α</sub>-Konzentration und bewirkte sogar eine Verringerung von 6-keto-PGF<sub>1α</sub> gegenüber den unbehandelten Kontrollen. Die Inhibierung der 6-keto-PGF<sub>1α</sub> Synthese nach COX-2 Inhibitor Gabe wurde bereits in vorhergehenden *in vitro* Studien gezeigt (FitzGerald 2001, Syeda 2006). Die Inhibierung der 6-keto-PGF<sub>1α</sub> Freisetzung nach Histaminstimulation im Überstand durch selektive als auch die unspezifische Inhibition der endothelialen COX unterstreicht die bedeutende Rolle der COX-2 in der endothelialen Prostazyklinsynthese.

### **5.3 Klinische Relevanz und Ausblick**

Die vorliegende Arbeit konnte darlegen, dass die selektive Inhibition von COX-2 *in vivo* eine Vermehrung von transient haftenden Thrombozyten an das Endothel induziert, die natürlicherweise nicht in intakten Arteriolen vorkommt. Vermutlich ist sie auf die verminderte Freisetzung von endothelialen Prostazyklinen zurückzuführen, wie der verminderte 6-keto-PGF<sub>1α</sub> Serumspiegel nach COX-2 Inhibition zeigte. Diese vermehrten Interaktionen begünstigen einen thrombotischen Verschluss im verletzten Gefäß, wie dies die vorliegende Arbeit mit einem durch Eisen-III-Chlorid induzierten Gefäßschaden zeigen konnte.

Die hier im Tiermodell gewonnenen *in vivo* Daten bestätigen die Ergebnisse über den prothrombotischen und okklusionsfördernden Effekt der selektiven COX-2 Inhibition am Tiermodell Hund (Hennan 2001) und bekräftigen die Hypothesen, die bislang aus humanen Versuchsprotokollen generiert werden konnten (Mukherjee 2001, Hennan 2001, Bombardier 2000, de Gaetano 2003, Shinmura 2000). Auch der verminderte 6-keto-PGF<sub>1α</sub> Serumspiegel nach COX-2 Inhibitor-Gabe wurde bereits in vorhergehenden humanen Studien gezeigt (McAdam 1999, Bombardier 2000). Eine systemische Erniedrigung des 6-keto-PGF<sub>1α</sub>-Serumspiegel im Menschen, als auch im Tiermodell, gibt jedoch keinen Aufschluss über die Quelle der Prostazyklinsynthese, da neben einer Inhibierung der COX-2 im Endothelium die COX-2 ebenso in anderen Geweben inhibiert wird, wie beispielsweise im Nierenmark (Qi 2002).

In der vorliegenden Arbeit führte sowohl die selektive als auch die unspezifische Inhibition der endothelialen COX zu einer signifikanten Verminderung der 6-keto-PGF<sub>1α</sub> Freisetzung durch Histaminstimulation im Überstand der kultivierten Endothelzellen. Dies unterstreicht die bedeutende Rolle der COX-2 in der endothelialen Prostazyklinsynthese. Die intravenöse Gabe von Aspirin beeinflusst die COX Wirkung sowohl im Thrombozyten als auch in der Gefäßwand, da Aspirin nur bei oraler Applikation in niedriger Dosis ein relativ spezifischer COX-1 Inhibitor am Plättchen ist (Cerletti 1986).

Da selektive COX-2 Inhibitoren weder einen inhibitorischen noch einen vergrößernden Effekt auf die Thrombozytenaggregation *ex vivo* haben, scheint der pro-adhäsive Effekt der COX-2 Inhibition über die Verringerung der endothelialen Prostazyklinsynthese wahrscheinlich. Diese Ergebnisse suggerieren, dass eine verstärkte Thrombozytenadhäsion, wie wir sie in der vorliegenden Studie beobachteten, nicht durch die Verabreichung von NS-398 ausgelöst werden kann, worauf auch das Fehlen eines NS-398 Effektes nach einer Vorbehandlung der Thrombozyten mit Iloprost hindeutet. Anscheinend übt jedoch die Inhibition der COX-2 abhängigen Prostazyklin-Biosynthese einen prothrombotischen Einfluss aus, worauf die fehlende Hemmung der Thrombozyten induzierten TxA<sub>2</sub>-Synthese durch die selektiven Inhibitoren hindeuten. Das daraus resultierende Ungleichgewicht von vaskulären Prostazyklin- und TxA<sub>2</sub> Effekten induziert eine erhöhte Exkretion von Thromboxan B<sub>2</sub> im Harn und eine gesteigerte Ausbildung der Intima nach einer Ballon-induzierten Verletzung in Mäusen, die keinen Prostazyklinrezeptor exprimieren (Cheng 2002).

Unter diesem Blickwinkel erniedrigt Aspirin die Thrombozyten-Endothel-Interaktion signifikant und verhindert eine feste Anheftung unter COX-2 Inhibition, was darauf hinweist, dass der prothrombotische Effekt der sinkenden endothelialen Prostazyklinfreisetzung durch eine zeitgleiche Inhibition der COX-1 abhängigen TxA<sub>2</sub> Thrombozytenformation kompensiert werden kann. Diese gegensätzlichen Effekte der selektiven COX-2 Inhibition treten vor allem bei gestörter endothelialer Funktion in Erscheinung.

Die in unserer Studie gewonnenen Ergebnisse einer gesteigerten Thrombozytenaktivierung könnten die Grundlage für weitergehende Studien mit dem Fokus eines erhöhten Herzinfarkttrisikos nach COX-2 Inhibition sein, wie es in einer Subanalyse der VIGOR Studie schon geäußert wurde. In der VIGOR Studie wurde das Risiko von gastrointestinalen Blutungen bei Patienten untersucht, die als sekundäre kardiovaskuläre Prophylaxe Aspirin

einzunehmen hatten, dies jedoch bis zu Studienbeginn noch nicht taten und unter randomisierten Bedingungen auch Rofecoxib statt des nicht-selektiven Inhibitors Aspirin erhielten (Bombardier 2000). Zwischenzeitlich wurde Rofecoxib aufgrund der erhöhten kardiovaskulären Risiken vom Markt genommen („Vioxx-Skandal“). In der mit selektivem COX-2 Inhibitor behandelten Gruppe wurde anschließend ein Herzinfarktisiko von 4,89% als statistisch wahrscheinlich berechnet (Mukherjee 2002). Es bleibt jedoch unklar, ob dieses erhöhte Herzinfarktisiko durch eine ineffiziente Inhibition der Thrombozytenaggregation der selektiven COX-2 Hemmer bedingt ist, oder ob die Unterschiede in den Gruppen, die zum einen den nicht-selektiven Cyclooxygenasehemmer Naproxen oder Rofecoxib erhielten, durch eine zusätzliche Verringerung der anti-adhäsiven Eigenschaften des vaskulären Endotheliums verursacht wurden (Mukherjee 2001, 2002).

Es ist von Interesse, die Effizienz und Selektivität der in unserer Studie untersuchten selektiven COX-2 Inhibitoren mit den COX-2 Hemmern zu vergleichen, die in der täglichen Praxis angewendet werden. In Anbetracht der Effizienz wird die Vergleichbarkeit durch den Grad der Reduktion an Prostaglandinmetaboliten im Serum oder Urin belegt. Die klinischen Dosen von Rofecoxib (50mg/Tag), so wie sie in der VIGOR Studie verabreicht wurden, führten zu einer 74%-igen Inhibition der Exkretion von Prostazyklinmetaboliten im Harn von Menschen, was den gemessenen Wert von 54%-iger Inhibition im Hamsterserum durch die Verabreichung von NS-398 um ein Vielfaches übersteigt (Catella-Lawson 1999). Geringere Dosen von Rofecoxib erreichten hier immer noch eine 70%-ige Inhibition von COX-2 abhängiger Prostanoidsynthese (van Hecken 2000). Celecoxib verringert bei einer Dosis von 400 mg die Exkretion von Prostazyklinmetaboliten um bis zu 80% bis zu 12 Stunden nach Verabreichung (McAdam 1999). Betrachtet man die Selektivität der erwähnten Substanzen, so zeigten *ex vivo* Assays, dass die Selektivität von Rofecoxib und die von NS-398 ähnlich sind, wobei beide gegenüber COX-2 100-fach inhibitorisch wirkungsvoller waren im Vergleich zu COX-1, während die Selektivität von Celecoxib nur um ein Zehnfaches niedriger ist (FitzGerald 2001, 2002, Patrigniani 1997).

In den Untersuchungen zeigte sich auch, dass nicht alle Coxibe die gleichen Nebenwirkungen ausbilden. In einer Untersuchung von Johnson (1994) konnte sogar bei nicht-selektiven NSAIDs eine Relation mit kardiovaskulären Ereignissen beobachtet werden. *In vitro* wurde nachgewiesen, dass hochdosierte Acetylsalicylsäure-Applikation zu einer Proliferation der glatten Muskelzellen in den Gefäßen führt, da die Blockade des Zellzyklus durch Inhibition

nicht induziert wurde (Marra 2000). In Mäusen mit einer APO-E Defizienz konnte hierbei die Arteriosklerose Genese reduziert werden (Paul 2008).

Celecoxib inhibierte in einer *in vitro* Studie die Proliferation und reduzierte Hyperplasien in der Gefäßintima (Conolly 2002, Koo et al. 2007) nach Schädigung der glatten Muskelzellen in der Gefäßwand durch Ballondilatation oder Stentanlage. Auch in den arteriellen Gefäßen von Nagern nach Angioplastik konnte durch Applikation von Celecoxib eine Reduktion der Hyperplasien in der Intima beobachtet werden, wobei Acetylsalicylsäure keine Wirkung zeigte. Biochemische Analysen zeigten, dass die Wirkung von Celecoxib auf der Hemmung der Proteinkinase B beruht, die COX- unabhängig inhibiert wird (Yang 2004). Weiterhin hemmte Celecoxib die Expression von MCP-1, so dass Celecoxib die Infektionsprozesse der glatten Gefäßmuskelzellen determinierte (Wang 2005), was zu einer Hemmung der Monozytenmigration durch Gefäßwände und anschließende Transformation in stimulierte Makrophagen führt (Boring 1998).

Celecoxib hemmte auch die Expression von Tissue factor (TF), dem Gewebefaktor, der eine wichtige Rolle in der traumatischen Auslösung der Blutgerinnungskaskade und in der Arteriogenese trägt. Diese Wirkungen sind jedoch COX unabhängig und werden durch die Hemmung der N-terminalen Kinase induziert (Steffel 2005). Weiterhin führte Celecoxib in humanen Endothelzellen zu einer Inhibition der Zellproliferation und löste eine Apoptose in Abhängigkeit zur Dosis aus (Niederberger 2004). Die beschriebenen Prozesse können *in vivo* zu einer Dysfunktion der Endothelzellen führen, was eine Arteriogenese begünstigt (Ross 1999).

In Studien führte Celecoxib bei täglicher oraler Applikation von zweimal 200 mg zu einer signifikanten Reduktion des Proteinspiegels an C-reaktivem Protein (CRP) und des oxidierten LDLs im Plasma nach nur 14 Tagen Einnahme (Chenevard 2003). Die Studienergebnisse lassen zunächst auf Mechanismen schließen, die unabhängig von einer COX Inhibition ablaufen. NSAIDs können demnach sowohl positive als auch negative Wirkungen auf das Risiko kardiovaskulärer Ereignisse haben, wobei die substanzspezifischen Wirkungen allein von der chemischen Struktur des Wirkstoffes abhängen. Welche Mechanismen der *in vitro* dargestellten und beobachteten Mechanismen *in vivo* durchlaufen werden, bleibt bislang noch nicht völlig geklärt.

Es gibt zahlreiche Hinweise aus klinischen Studien, die die Beobachtung stützen, dass die COX-2 Isoform der Cyclooxygenase eine intrinsische Kompetenz zu arteriosklerotischen Komplikationen in sich birgt. Diese Beweiskette entspringt einer Vielzahl von klinischen und experimentellen Studien, die deutlich für eine verstärkte *in vivo* Thrombozyten-Aktivität während einer COX-2 Inhibition sprechen (Stichtenoth 2004). Dies führt zu einer verstärkten vaskulären Thrombusbildung durch die selektive Inhibition von COX-2 (Brune 2001, Lyseng-Williamson 2004), wobei letzteres nicht im Fall einer nicht selektiven COX-Inhibition eintritt. Seit Erscheinen der VIGOR Studie werden die selektiven COX-2 Inhibitoren als Ursache für eine Reihe vaskulärer Thrombosen angesehen (Brune 2001). Die VIGOR Studie sollte die Wirkung eines selektiven COX-2 Inhibitors, des Rofecoxibs, mit der eines NSAID wie Naproxen auf gastrointestinale Nebenwirkungen und Langzeiteffekte in 8076 Patienten mit rheumatoider Arthritis untersuchen. Hierbei zeigte sich eine signifikante bis zu 5-fache Erhöhung des Myokardinfarkt-Risikos bei Patienten mit einer kardiovaskulären Anamnese, welche eine Einnahme von Aspirin als Sekundärprophylaxe nötig gemacht hätte, die Patienten jedoch durch das randomisierte Studienprotokoll eine tägliche Dosis Rofecoxib erhielten (Burleigh 2002). Es konnte im Rahmen der Studie eine 50%ige Minderung der gastrointestinalen Nebenwirkungen beobachtet werden, bei gleichzeitigem Auftreten eines prothrombotischen Nebeneffekts des Rofecoxibs. In der statistischen Auswertung stand daher die Kontroverse im Raum, ob nun diese Ergebnisse durch den prothrombotischen Effekt von Rofecoxib entstanden oder ob es sich hierbei um die kardioprotektiven Eigenschaften des Naproxens handelte. Dies hätte die divergierenden wissenschaftlichen Ergebnisse der Autoren erklären können (Burleigh 2002).

Obwohl Folgestudien den antithrombotischen Effekt von Naproxen bestätigten, konnten ausgedehnte klinische Studien die kardioprotektiven Eigenschaften von Naproxen nicht signifikant beweisen (Hoepfl 2002, McAdam 1999). Trotz der häufig anzutreffenden unterschiedlichen Ergebnisse respektive der prothrombotischen Wirkung von Naproxen lassen sich dennoch die Studien in ihrer Aussagekraft determinieren, da sie alle protokollarisch *in vitro* durchgeführt wurden (Chenevard 2003, Stichtenoth 2004, Sikes 2002).

Wie bereits eingangs erwähnt, hemmen NSAIDs wie Naproxen nicht nur die Thrombozyten induzierte  $TxA_2$  Produktion, sondern auch die PGI<sub>2</sub> Freisetzung aus dem Endothelium (Hoepfl 2002). Daher erscheint es vom deterministischen und wissenschaftlichen Standpunkt aus ungewöhnlich, dass das erhöhte Myokardinfarkttrisiko in der mit Rofecoxib behandelten

Gruppe der VIGOR Studie durch den antithrombotischen Effekt des Naproxens ausgelöst worden sei. Spätere Studien konnten den prothrombotischen Effekt von Rofecoxib *in vivo* unabhängig von Naproxen bestätigen und leiteten somit eher die allgemeine Fragestellung ein, ob nicht alle selektiv wirkenden COX-2 Hemmer ein arterielles Thromboserisiko implizieren. Nachdem Rofecoxib vom Markt genommen wurde, zeigte sich in einer Vielzahl von Studien ein prothrombotischer Effekt durch die Einnahme von selektiven COX-2-Inhibitoren, wobei hierzu sowohl langdauernde klinisch randomisierte Studien als auch Studien mit einer 6-stelligen Probandenzahl zählten. Und eigene Untersuchungen bestätigten, dass zahlreiche COX-Inhibitoren wie z. B. Diclofenac prothrombotisch wirken können (Struthmann et al. 2009). Zahlreiche Übersichtsarbeiten bestätigen, dass diverse NSAIDs erhöhte kardiovaskuläre Risiken beinhalten, welche möglicherweise auch durch prothrombotische Effekte erklärbar wären (Schjerning-Olsen et al. 2013, Krötz und Struthmann 2010).

Abseits der Frage, ob Naproxen nun einen kardioprotektiven Effekt auf den menschlichen Organismus hat oder nicht, wurde durch die klinischen Studien zunehmend deutlicher, dass Rofecoxib intrinsische atherothrombotische Qualität birgt. So konnte eine Korrelation zwischen einem Myokardinfarkt und Rofecoxib auch in der APPROVe Studie beobachtet werden, wobei sich die atherothrombotischen Komplikationen erst nach einer 18 monatigen Einnahme von Rofecoxib zeigten. Die Ergebnisse anderer randomisierter Studien ergaben ähnliche Resultate in der Auswertung (Stichtenoth 2004, Title 2003). Der Fokus all dieser Studien, induziert durch die Nebenwirkungen von Rofecoxib, lehnt sich an die generelle Frage an, ob selektive COX-2 Hemmer ein ähnliches kardiovaskuläres Risiko darstellen oder nicht. Ferner ist bislang noch ungeklärt, inwiefern die kardiovaskulären Ereignisse durch eine längere Rofecoxib-Einnahme oder durch die Einnahme von Einzeldosen ausgelöst wurden.

Ebenso ist es wichtig zu erwähnen, dass wir keine Thrombose in den intakten Arteriolen der gesunden Hamster beobachten konnten, was Metaanalysen von klinischen Studien an selektiven COX-Hemmern bestätigten. Zudem konnten diese Studien zeigen, dass durch die Einnahme von selektiven COX-2 Hemmern kein erhöhtes Risiko für thrombotische Ereignisse in vorwiegend gesunden Populationen besteht (Mukherjee 2002, Konstam 2001a,b). Die proadhäsiven Effekte von selektiven COX-2 Hemmern in intakten Arteriolen selbst in gesunden Tieren und der schnelle Verschluss in den Gefäßen geben dennoch Grund

zu einem sehr vorsichtigen Gebrauch dieser Substanzen bei Patienten mit bestehendem kardiovaskulären Risiko.

Die Extrapolation der erhaltenen Ergebnisse dieser Studie hinsichtlich einer Übertragung der Daten auf den menschlichen Organismus ist eingeschränkt und Schlussfolgerungen aus den Ergebnissen sollten sorgfältig abgewogen werden, insbesondere in Anbetracht der geringen Zahl an Untersuchungen an Tiermodellen, wie hier vorliegend. Diese Daten können nicht per se mit den Daten von groß angelegten klinischen Studien an Patienten verglichen werden. Unabhängig davon, ob der prothrombotische Effekt der selektiven COX-2 Inhibitoren, den wir in unseren Untersuchungen beobachtet haben, neben einer eingeschränkten kardiovaskulären Sicherheit der angewandten Substanzen in der klinischen Anwendung besteht oder nicht, kann diese Hypothese nur in einer prospektiven klinischen Studie gestützt werden. Die Bedeutung der Umsetzung solcher Studien ist wiederholt in anderen Untersuchungen geäußert worden (Hankey und Eicheboom 2003, Mukherjee 2003, Konstam 2002, Konstam 2001a,b).

## 6. Zusammenfassung

In der hier vorliegenden Arbeit wurde erstmals in vivo untersucht, ob selektive COX-2 Hemmer die Thrombozyten-Endothel-Interaktion (platelet-vessel-wall-interaction = PVWI) erhöhen und damit das Thromboserisiko steigern. Es wurde die Bewegung fluoreszenzmarkierter humaner Thrombozyten in Hamsterarteriolen in der Versuchsanordnung des Rückenhautkammermodells mittels Intravitalmikroskopie gemessen.

Transiente und dauerhafte Adhäsion der Thrombozyten an die Gefäßwand, sowie Gefäßverschluss nach induzierter Gefäßwandschädigung dienten als Parameter der Thrombozyten-Endothel-Interaktion.

Die selektive Hemmung von COX-2 mit NS-398 erhöhte die dauerhafte Plättchenadhäsion an die Gefäßwand in vivo. Weiterhin war die transiente PVWI in NS-398 behandelten Tieren signifikant erhöht. Dieser Effekt wurde durch Vorbehandlung der Plättchen mit ASS oder Iloprost aufgehoben. Die Zeit bis zum Eintritt des Gefäßverschlusses nach Gefäßwandschädigung mit FeCl<sub>3</sub> wurde durch NS-398 signifikant verkürzt. Die selektive Hemmung von COX-2 mittels NS-398 verstärkt sowohl die transiente Plättchen-Gefäßwand-Interaktion, als auch das dauerhafte Anheften von Thrombozyten an die Gefäßwand. Dabei kann es zu einem schnelleren Verschluss vorgeschädigter Gefäße kommen, was höchstwahrscheinlich durch eine Verminderung des antithrombotischen Prostaglandin-Effektes verursacht sein könnte.

Klinische Relevanz hat die vorliegende Studie dahingehend, dass es zu einer adversen Wirkung von selektiven COX-2 Hemmern auf die Thrombozyten-Endothel-Interaktion kommen kann, wodurch das vaskuläre Thromboserisiko gesteigert wird, mit all seinen konsekutiven klinischen Erscheinungsbildern wie z. B. Herzinfarkt, Embolie und Schlaganfall.

## 7. Literaturverzeichnis

Bergström S, Ryhage R, Samuelsson B, Sjövall J (1963) Prostaglandines and Related Factors. *J. Biol. Chem*, 238, 3555-3564.

Bergström S (1983) Prostaglandine: Vom Labor zur Klinik (Nobel-Vortrag). *Angew. Chem*, 95, 865-873.

Bing RJ, Lomnicka M (2002) Why do cyclo-oxygenase-2 inhibitors cause cardiovascular events? *J Am Coll Cardiol*, 39(3), 521-522.

Bogen S, Pak J, Garifallou M, Deng X, WA Muller WA (1994) Monoclonal antibody to murine PECAM-1 (CD31) blocks acute inflammation in vivo. *J Exp Med*, 179,(3), 1059-1064.

Bombardier C, Laine L, Reicin A, Shapiro D, Burgos-Vargas R, Davis B, Day R, Ferraz MB, Hawkey CJ, Hochberg MC, Kvien TK, Schnitzer, TJ (2000) Comparison of upper gastrointestinal toxicity of rofecoxib and naproxen in patients with rheumatoid arthritis. VIGOR Study Group. *N Engl J Med*, 343, 1520-1528.

Boring L, Gosling J, Cleary M, Charo IF (1998). Decreased lesion formation in CCR2<sup>-/-</sup> mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. *Nature*, 394(6696), 894-897.

Brater DC, Harris C, Redfern JS, Gertz BJ (2001) Renal effects of COX-2-selective inhibitors. *Am J Nephrol* 21, 1-15.

Brune K, Neubert A (2001) Pharmacokinetic and pharmacodynamic aspects of the ideal COX-2 inhibitor: a pharmacologist's perspective. *Clin Exp Rheumatol*, 19, 51-71.

Bürkle MA (2002) Effekt einer Antagonisierung der  $\alpha_v$ -Integrine auf Angiogenese, Wachstum und Metastasierung solider Tumoren. Dissertationsschrift, Ludwigs-Maximilians-Universität München, 2002.

Buerkle MA, Pahernik SA, Sutter A, Jonczyk A, Messmer K, Dellian M (2002) Inhibition of the alpha-v integrins with a cyclic RGD peptide impairs angiogenesis, growth and metastasis of solid tumours *in vivo*. *Br J Cancer*, 86, 788-795.

Buerkle MA, Lehrer S, Sohn HY, Conzen P, Pohl U, Krötz F (2004) Selective inhibition of cyclooxygenase-2 enhances platelet adhesion in hamster arterioles *in vivo*. *Circulation*, 110, 2053-2059.

Burleigh ME, V. R. Babaev, et al. (2002) Cyclooxygenase-2 promotes early atherosclerotic lesion formation in LDL receptor-deficient mice. *Circulation* 105(15), 1816-23.

Catella-Lawson F, McAdam B, Morrison BW, Kapoor S, Kujubu D, Antes L, Lasseter, KC, Quan H, Gertz BJ, FitzGerald GA (1999) Effects of specific inhibition of cyclooxygenase-2 on sodium balance, hemodynamics, and vasoactive eicosanoids. *J Pharmacol Exp Ther*, 289, 735-741.

Cattaneo M (2003) Inherited platelet-based bleeding disorders. *J Thromb Hemost*, 1, 1628-1636

Celletti FL, Waugh JM, Amabile PG, Brendola A, Hilfiker PR, Dake MD (2001) Vascular endothelial growth factor enhances atherosclerotic plaque progression. *Nature Medicine*, 7, 425-429.

Cerletti C, Gambino MC, Garattini S, de Gaetano G (1986) Biochemical selectivity of oral versus intravenous aspirin in rats: inhibition by oral aspirin of cyclooxygenase activity in platelets and presystemic but not systemic vessels. *J Clin Invest.*, 78, 323-326.

Chenevard R, Hürlimann D, Béchir M, Enseleit F, Spieker L, Hermann M, Riesen W, Gay S, Gay RE, Neidhart M, Michel B, Lüscher TF, Noll G, Ruschitzka F (2003) Selective COX-2 inhibition improves endothelial function in coronary artery disease. *Circulation*. 107(3), 405-409.

Cheng Y, Austin SC, Rocca B, Koller BH, Coffman TM, Grosser T, Lawson JA, FitzGerald GA (2002) Role of prostacyclin in the cardiovascular response to thromboxane A<sub>2</sub>. *Science*, 296, 539-541.

Cohen RA (2005) The endothelium-derived hyperpolarizing factor puzzle: a mechanism without a mediator? *Circulation*, 111(6), 724-727.

Connolly E, Bouchier-Hayes DJ, Kaye E, Leahy A, Fitzgerald D, Belton O (2002) Cyclooxygenase isozyme expression and intimal hyperplasia in a rat model of balloon angioplasty. *J Pharmacol Exp Ther*, 300(2), 393-398.

Croner RS, Hoerer E, Kulu Y, Hackert T, Gebhard MM, Herfarth C, Klar E (2006) Hepatic platelet and leukocyte adherence during endotoxemia. *Critical Care* 10, R15.

Davidge ST (2001) Prostaglandin H synthase and vascular function. *Circ Res*, 89, 650-660.

De Gaetano G, Donati MB, Cerletti C (2003) Prevention of thrombosis and vascular inflammation: benefits and limitations of selective or combined COX-1, COX-2 and 5-LOX inhibitors. *Trends Pharmacol Sci*, 24, 245-252.

Dellian M, Abels C, Kuhnle GE, Goetz AE (1995) Effects of photodynamic therapy on leucocyte-endothelium interaction: differences between normal and tumour tissue. *Br J Cancer*, 72,1125-1130.

Denis C, Methia N, Frenette PS, Rayburn H, Ullmann-Culleré M, Hynes RO, Wagner DD (1998) A mouse model of severe von Willebrand disease: defects in hemostasis and thrombosis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95, 9524-9529.

Devlin TM (1997) *Textbook of biochemistry with clinical correlations*. Wiley-Liss, Inc., New York. 1997.

Diaz BL, Arm JP (2003) Phospholipase A(2). Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 69, 87-97.

Endrich B, Asaishi K, Götz A, Messmer K (1980) Technical report – a new chamber technique for microvascular studies in unanesthetized hamsters. Res Exp Med (Berl), 177(2), 125-134.

Endrich B, Hamersen F, Götz A, Messmer K (1982) Microcirculatory blood flow, capillary morphology and local oxygen pressure of the hamster amyloidotic melanoma A-Mel 3. J Natl Cancer Inst, 68, 475-485.

FitzGerald GA, Patrono C (2001) The coxibs, selective inhibitors of cyclooxygenase-2. N Engl J Med, 345, 433- 442.

FitzGerald A (2002) Nonsteroidal anti-inflammatory drugs, coxibs, and cardio-renal physiology: a mechanism-based approach. Am J Cardiol 89(6A):1D-2D.

Futaki N, Takahashi S, Yokoyama M, Arai I, Higuchi S, Otomo S. (1994) NS-398, a new anti-inflammatory agent, selectively inhibits prostaglandin G/H synthase/cyclooxygenase (COX-2) activity in vitro. Prostaglandins, 47(1), 55-59.

Gonzen PF, Goetz AE, Deininger F, Brendel W (1987) The dorsal skin-fold preparation of awake Syrian golden hamsters for assessment of microvascular permeability and microhaemodynamics with leukotriene C4. Int J Tissue React, 9, 485-91.

Greenberg HE, Gottesdiener K, Huntington M, Wong P, Larson P, Wildonger L, Gillen L, Dorval E, Waldman SA (2000) A new cyclooxygenase-2 inhibitor, rofecoxib (VIOXX), did not alter the antiplatelet effects of low-dose aspirin in healthy volunteers. J Clin Pharmacol, 40, 1509-1515.

Griebenow R, Gülker H, Dominiak P, Piper HM (1999) Autonomes Nervensystem und Koronare Herzkrankheit. Novartis Pharma GmbH, Nürnberg, 1999, 413-433.

Hankey GJ, Eikelboom JW (2003) Cyclooxygenase-2 inhibitors: are they really atherothrombotic, and if not, why not? *Stroke*, 34, 2736-2740.

Hartwig J (2003) The birth of the platelet. *J Thromb Hemost*, 1, 1580-1586.

Hennan JK, Huang J, Barrett TD, Driscoll EM, Willens DE, Park AM, Crofford LJ, Lucchesi BR (2001) Effects of selective Cyclooxygenase-2 inhibition on vascular responses and thrombosis in canine coronary arteries. *Circulation*, 104, 820-825.

Hoepfl B, Rodenwaldt B, Pohl U, de Wit C (2002) EDHF, but not NO or prostaglandins, is critical to evoke a conducted dilation upon ACh in hamster arterioles. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 283, 996-1004.

Johnson AG, Nguyen TV, Day RO (1994) Do nonsteroidal anti-inflammatory drugs affect blood pressure? A meta-analysis. *Ann Intern Med*, 121, 289-300.

Konstam MA, Weir MR, Reicin A, Shapiro D, Sperling RS, Barr E, Gertz BJ (2001a) Cardiovascular thrombotic events in controlled, clinical trials of rofecoxib. *Circulation*, 104(19), 2280-2288.

Konstam MA, Demopoulos LA (2001b) Cardiovascular events and COX-2 inhibitors. *JAMA*, 286(22), 2809, author reply 2811-2812.

Konstam MA, Weir MR (2002) Current perspective on the cardiovascular effects of coxibs. *Cleve Clin J Med*, 69(1), 47-52.

Koo BK, Kim YS, Park KW, Yang HM, Kwon DA, Chung JW, et al. (2007) Effect of celecoxib on restenosis after coronary angioplasty with a Taxus stent (COREA-TAXUS trial): an open-label randomised controlled study. *Lancet* 370(9587), 567-74.

Krötz F, Sohn HY, Gloe T, Zahler S, Riexinger T, Schiele TM, Becker BF, Theisen K, Krauss V, Pohl U (2002a) NAD(P)H oxidase-dependent platelet superoxide anion release increases platelet recruitment. *Blood*, 100(3), 917-924.

Krötz F, Sohn HY, Keller M, Gloe T, Bolz SS, Becker BF, Pohl U (2002b) Depolarization of endothelial cells enhances platelet aggregation through oxidative inactivation of endothelial NTPDase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 22(12), 2003-2009.

Krötz F, Riexinger T, Buerkle MA, Nithipatikom K, Gloe T, Sohn HY, Campbell WB, Pohl U (2004) Membrane potential-dependent inhibition of platelet adhesion to endothelial cells by epoxyeicosatrienoic acids. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, 24(3), 565-600.

Krötz F, Hellwig N, Bürkle MA, Lehrer S, Riexinger T, Mannell H, Sohn HY, Klauss V, Pohl U (2010) A sulfaphenazole-sensitive EDHF opposes platelet-endothelium interactions in vitro and in the hamster microcirculation in vivo. *Cardiovasc Res*, 85, 542-550.

Krötz F, Struthmann L (2010) A Review on the risk of myocardial infarction associated with the NSAID diclofenac. Review. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets*, 10(1), 53-65

Lange S, Bender R (2001) Histogramm. *Dtsch med Wochenschr*, 126(Suppl. Statistik); T 31 T 32.

Langer HF, Gawaz M (2008) Platelet-vessel wall interactions in atherosclerotic disease. *Thrombosis and Haemostasis*, 99(3), 457-645.

Libby P, Ridker PM, Maseri A (2002) Inflammation and Atherosclerosis. *Circulation*, 105(9), 1135-1143.

Loll PJ, Picot D, Garavito RM (1995) The structural basis of aspirin activity inferred from the crystal structure of inactivated prostaglandin H2 synthase. *Nat Struct Biol* 8, 637-43.

Lyseng-Williamson KA, Curran MP (2004) Lumiracoxib. *Drugs*, 64(19), 2237-2248.

Marra DE, Simoncini T, Liao JK (2000) Inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation by sodium salicylate mediated by upregulation of p21(Waf1) and p27(Kip1). *Circulation* 102(17), 2124-2130.

Massberg S, Enders G, Leiderer R, Eisenmenger S, Vestweber D, Krombach F, Messmer K (1998) Platelet-Endothelial Cell Interactions During Ischemia/Reperfusion: The Role of P-Selectin. *Blood*, 92(2), 507-515.

McAdam BF, Catella-Lawson F, Mardini IA, Kapoor S, Lawson JA, FitzGerald GA (1999) Systemic biosynthesis of prostacyclin by cyclooxygenase (COX)-2: the human pharmacology of a selective inhibitor of COX-2. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96(1), 272-277.

McClellanda S, Gawaz M, Kennerknecht E, Konrad CSI, Sauer S, Schuerzinger K, Massberg S, Fitzgerald DJ, Beltona O (2009) Contribution of cyclooxygenase-1 to thromboxane formation, platelet-vessel wall interactions and atherosclerosis in the ApoE null mouse. *Atherosclerosis*, 202 (1), 84-91.

Menger MD, Laschke MW, Vollmar B (2002) Viewing the microcirculation through the window: some twenty years experience with the hamster dorsal skinfold chamber. *Eur Surg Res*, 34(1-2), 83-91.

Meßmer K, Krombach F (1998) Mikrozirkulationsforschung in der experimentellen Chirurgie. *Der Chirurg*, 69(4), 333-338.

Millonig G (2002) Early inflammatory-immunological lesions in juvenile atherosclerosis from the Pathobiological Determinants of Atherosclerosis in Youth (PDAY)-study. *Atherosclerosis*, 160(2), 441-448.

Mukherjee D, Nissen SE, Topol EJ (2001) Risk of cardiovascular events associated with selective COX-2 inhibitors. *JAMA*, 286, 954-959.

Mukherjee D (2002) Selective cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors and potential risk of cardiovascular events. *Biochem Pharmacol*, 63, 817-821.

Mukherjee D, Topol EJ (2003) Pharmaceutical advertising versus research spending: are profits more important than patients? *Am Heart J*, 146, 563-564.

Mutschler E, Geisslinger G, Kroemer H, Schäfer-Korting M (2001) Mutschler Arzneimittelwirkungen. Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie, 8. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart 2001.

Niederberger E, Manderscheid C, Grosch S, Schmidt H, Ehnert C, Geisslinger G (2004) Effects of the selective COX-2 inhibitors celecoxib and rofecoxib on human vascular cells. *Biochem Pharmacol*, 68, 341–350.

Oltman CL, Weintraub NL, VanRollins M, Dellsperger KC (1998) Epoxyeicosatrienoic acids and dihydroxyeicosatrienoic acids are potent vasodilators in the canine coronary microcirculation. *Circ Res*, 83(9), 932-939.

Passauer J, Büssemaker E, Lässig G, Pistrosch F, Fauler J, Gross P, Fleming I (2003) Baseline blood flow and bradykinin-induced vasodilator responses in the human forearm are insensitive to the cytochrome P450 2C9 (CYP2C9) inhibitor sulfaphenazole. *Clin Sci (Lond)*, 105(4), 513-518.

Patrignani P, Panara MR, Sciulli MG et al. (1997) Differential inhibition of human prostaglandine endoperoxide synthase-1 and -2 by nonsteroidal anti-inflammatory drug. *J Physiol Pharmacol* 48, 623-631.

Paul A, Chang BH, Li L, Yechoor VK, Chan L (2008) Deficiency of adipose differentiation-related protein impairs foam cell formation and protects against atherosclerosis. *Circ Res* 102(12),1492-501.

Pohl U, Nolte C, Bunse A, Eigenthaler M, Walter U (1994) Endothelium-dependent phosphorylation of vasodilator-stimulated protein in platelets during coronary passage. *Am J Physiol*, 266, 606-612.

Qi Z, Hao CM, Langenbach RI, Breyer RM, Redha R, Morrow JD, Breyer MD (2002) Opposite effects of cyclooxygenase-1 and -2 activity on the pressor response to angiotensin II. *J Clin Invest*, 110(1), 61-69.

Quilley J, Fulton D, McGiff JC (1997) Hyperpolarizing factors. *Biochem Pharmacol*, 54(10), 1059-1070.

Radomski MW, Salas E (1995) Nitric Oxide - biological mediator, modulator and factor of injury: its role in the pathogenesis of arteriosclerosis. *Artherosclerosis*, 118, 69-80.

Raz A, Wyche A, Fagan D, Needleman P (1989) The cell biology of fibroblast cyclooxygenase. *Adv Exp Med Biol*, 259, 1-21.

Roessner A, Schmitz G, Sorg C (1987) What's new in the pathology of atherosclerosis? *Pathol Res Pract* 182(5) ,694-8.

Ross R, Sloop GD, Williams KJ, Tabas I, Weissberg PL, Bennett MR (1999) Atherosclerosis - An Inflammatory Disease. *N Engl J Med*, 340, 1928-1929.

Rubanyi GM (1991) Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *J Cell Biochem*, 46(1), 27-36.

Schjerning-Olsen AM, Fosbol E, Lindhardsen J, Anderson C, Folkel F, Køber L, Hansen PR, Torp-Pedersen C, Gislason GH (2013) Cause-Specific Cardiovascular Risk Associated with Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs among Myocardial Infarction Patients - A Nationwide Study. *PLoS ONE* 8(1):e54309, doi:10.1371/journal.pone.0054309.

Schrör K, Darius H, Matzky R, Ohlendorf R. (1981) The antiplatelet and cardiovascular actions of a new carbacyclin derivative (ZK 36 374)--equipotent to PGI<sub>2</sub> in vitro. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 316(3):252-255.

Selinsky BS, Gupta K, Sharkey CT, Loll PJ (2001) Structural analysis of NSAID binding by prostaglandin H<sub>2</sub> synthase: time-dependent and time-independent inhibitors elicit identical enzyme conformations. *Biochemistry*, 40(17), 5172-5180.

Shinmura K, Tang XL, Wang Y, Xuan YT, Liu SQ, Takano H, Bhatnagar A, Bolli R (2000) Cyclooxygenase-2 mediates the cardioprotective effects of the late phase of ischemic preconditioning in conscious rabbits. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97(18), 10197-10202.

Siegel-Axel D, Langer H, Lindemann S, Gawaz M (2006) Die Rolle von Thrombozyten bei Entzündungs- und Atheroskleroseprozessen. *Medizinische Klinik*, 101(6), 467-475.

Silverstein FE, Faich G, Goldstein JL, Simon LS, Pincus T, Whelton A, Makuch R, Eisen G, Agrawal NM, Stenson WF, Burr AM, Zhao WW, Kent JD, Lefkowitz JB, Verburg KM, Geis GS (2000) 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.

Sikes DH, Agrawal NM, Zhao WW, Kent JD, Recker DP, Verburg KM (2002) Incidence of gastroduodenal ulcers associated with valdecoxib compared with that of ibuprofen and diclofenac in patients with osteoarthritis. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 14(10), 1101-1111.

Simmons DL, Botting RM, Hla T (2004) Cyclooxygenase Isoenzymes: The Biology of Prostaglandin Synthesis and Inhibition. *Pharmacological Reviews*, 56(3), 387-437.

Steffel J, Hermann M, Greutert H, Gay S, Lüscher TF, Ruschitzka F, Tanner FC (2005). Celecoxib decreases endothelial tissue factor expression through inhibition of c-Jun terminal NH2 kinase phosphorylation. *Circulation*, 111(13), 1685-1689.

Steinhilber D, Laufer S (2004) Vioxx ® und die anderen Coxibe. *Pharm. Unserer Zeit*, 33(6), 500-501.

Stichtenoth DO, Frolich JC (2004) The second generation of COX-2 inhibitors: what advantages do the newest offer? *Drugs*, 63, 33-45.

Struthmann L, Günthner-Biller M, Bergauer F, Friese K, Mylonas I (2009) Complete hydatidiform mole in a perimenopausal woman with a subsequent severe thyrotoxicosis. *Arch Gynecol Obstet* 279(3), 411-3.

Syeda F, Crosjean J, Houliston RA, Keogh RJ, Carter TD, Paleolog E, Wheeler-Jones CP (2006) Cyclooxygenase-2 induction and prostacyclin release by protease-activated receptors in endothelial cells require cooperation between mitogen-activated protein kinase and NF-kappaB pathways. *J Biol Chem* 281(17), 11792-804.

Title LM, Giddens K, McInerney MM, McQueen MJ, Nassar BA (2003) Effect of cyclooxygenase-2 inhibition with rofecoxib on endothelial dysfunction and inflammatory markers in patients with coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol*, 42(10), 1754-1756.

Vane JR, (1971) Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nat New Biol*, 231, 232-235.

Vane JR, Botting RM (1998) Mechanism of action of nonsteroidal anti inflammatory drugs. *Am J Med*, 104, 2-22.

Van Hecken A, Schwartz JI, Depré M, De Lepeleire I, Dallob A, Tanaka W, Wynants K, Buntinx A, Arnout J, Wong PH, Ebel DL, Gertz BJ, De Schepper PJ (2000) Comparative inhibitory activity of rofecoxib, meloxicam, diclofenac, ibuprofen, and naproxen on COX-2 versus COX-1 in healthy volunteers. *J Clin Pharmacol*, 40(10), 1109-1120.

Vanhoutte PM, Shimokawa H (1989) Endothelium-derived relaxing factor and coronary vasospasm. *Circulation*, 80(1), 1-9.

Verheul HM, Jorna AS, Hoekman K, Broxterman HJ, Gebbink MF, Pinedo HM (2000) Vascular endothelial growth factor-stimulated endothelial cells promote adhesion and activation of platelets. *Blood*, 96(13), 4216-21.

Woodman OL, Dusting GJ (1991) N-nitro L-arginine causes coronary vasoconstriction and inhibits endothelium-dependent vasodilatation in anaesthetized greyhounds. *Br J Pharmacol*, 103(2), 1407-1410.

Wang K, Tarakji K, Zhou Z, Zhang M, Forudi F, Zhou X (2005) Celecoxib, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, decreases monocyte chemoattractant protein-1 expression and neointimal hyperplasia in the rabbit atherosclerotic balloon injury model. *J Cardiovasc Pharmacol* 45(1):61-7.

Yang HM, Kim HS, Park KW, You HJ, Jeon SI, Youn SW, Kim SH, Oh BH, Lee MM, Park YB, Walsh K (2004) Celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor, reduces neointimal hyperplasia through inhibition of Akt signaling. *Circulation*, 110, 301-308.

## **8. Danksagung**

Ich danke denen, die Geduld mit mir hatten.

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. U. Pohl, der mich seit meinem 3. Semester begleitet hat, für die Überlassung des vorgestellten Themas und die intensive Betreuung meiner Arbeit. Er hatte jederzeit ein offenes Ohr für mich. Ebenso danke ich seinen Mitarbeitern für die großartige Unterstützung.

Ich danke PD Dr. med. F. Krötz, der mein Interesse an diesem Thema geweckt hat und mir mit vielen konstruktiven Hinweisen zur Seite stand. Seinen Mitarbeitern danke ich für die freundliche Aufnahme und Zusammenarbeit an dieser Arbeit.

Insbesondere danke ich Dr. med. Martin A. Bürkle, der mir als Ansprechpartner, Betreuer, Instruktor und zuletzt als Freund zur Seite stand.

Mein besonderer Dank gilt N. Hellwig für die lebhaften Diskussionen und das geteilte Interesse an dieser Forschungsarbeit.