

Aus dem Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Prof. Dr. med. J. Fischer

**NSAIDs verhindern die Thrombozytenaggregationshemmung durch
Acetylsalicylsäure: Entwicklung eines enzymkinetischen Modells,
experimentelle Überprüfung und mögliche Konsequenzen für die
klinische Anwendung**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der
Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

vorgelegt von

Saghar Bagheri

2015

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Thomas Hohlfeld

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Artur-Aron Weber

Für meine Familie

non scholæ sed vitæ discimus

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-----|
| 1. Einleitung | |
| 1.1 Bedeutung von Acetylsalicylsäure für die kardiovaskuläre Prognose..... | 1 |
| 1.2 Pharmakologische Wirkung von ASS und anderen NSAIDs auf Thrombozyten..... | 2 |
| 1.3 <i>High on Aspirin Platelet Reactivity</i> (HAPR)..... | 4 |
| 1.3.1 Definition von HAPR..... | 4 |
| 1.3.2 Ursachen von HAPR..... | 4 |
| 1.4 Indikationen für ASS in Kombination mit anderem NSAID..... | 6 |
| 1.5 Prävalenz und klinische Konsequenzen von HAPR..... | 6 |
| 1.6 Fragestellung..... | 7 |
| 2. Material und Methoden | |
| 2.1 Untersuchungsplan..... | 8 |
| 2.1.1 Probanden..... | 8 |
| 2.1.2 Versuchsprotokoll..... | 8 |
| 2.2 Entwicklung eines enzymkinetischen Modells..... | 8 |
| 2.3 Experimenteller Teil..... | 16 |
| 2.3.1 Material..... | 16 |
| 2.3.2 Methoden..... | 19 |
| 3. Ergebnisse | |
| 3.1 Einfluss der reversiblen und irreversiblen Inhibition der Cyclooxygenase im entwickelten Enzymkinetischen Modell..... | 23 |
| 3.1.1 Zusammenfassung der Ergebnisse der Simulation..... | 32 |
| 3.2 Experimentelle Überprüfung des Modells..... | 33 |
| 3.2.1 Celecoxib..... | 33 |
| 3.2.2 Methylaminoantipyrin (MAA)..... | 35 |
| 3.2.3 Piroxicam..... | 37 |
| 3.2.4 SC-560..... | 39 |
| 3.2.5 Zusammenfassung der experimentellen Ergebnisse und Vergleich mit den Ergebnissen der Simulation..... | 41 |
| 3.2.6 Experimentelle Untersuchung zur Aufhebung der Interaktion bei Erhöhung der ASS-Konzentration..... | 42 |
| 4. Diskussion | |
| 4.1 Vergleich des mathematisch enzymkinetischen Modells mit anderen pharmakodynamischen Modellen zur Beschreibung der Medikamenteninteraktion an der COX-1..... | 45 |
| 4.2 Pharmakologischer Mechanismus der Medikamenteninteraktion an der COX-1..... | 47 |
| 4.3 Interaktion von ASS mit NSAIDs verschiedener Klassen..... | 50 |
| 4.4 Abhängigkeit der Interaktion mit ASS von den COX-1-Affinitäten der NSAIDs..... | 53 |
| 4.5 Abhängigkeit der Interaktion mit ASS von den NSAID-Konzentrationen..... | 53 |
| 4.6 Abhängigkeit der Interaktion mit ASS von der Konzentration der freien Fettsäuren..... | 54 |
| 4.7 Möglichkeiten zur Überwindung der HAPR..... | 55 |
| 4.7.1 Änderung der ASS- und NSAID-Dosis..... | 55 |
| 4.7.2 Modifikation des Dosierungsschemas..... | 56 |
| 4.7.3 Modifikation der Wahl der NSAIDs zur Komedikation mit ASS..... | 56 |
| 4.7.4 Alternative antithrombotische Therapie bei HAPR..... | 56 |
| 4.8 Offengebliebene Fragestellungen und notwendige Studien..... | 57 |
| 4.9 Schlussfolgerung..... | 57 |
| 5. Zusammenfassung | 59 |
| 6. Literaturverzeichnis | 60 |
| 7. Danksagung | iii |
| 8. Eidesstattliche Versicherung | iv |

Abkürzungen

| | |
|------------------------|--|
| ARA | Arachidonsäure |
| ASS | Acetylsalicylsäure; Aspirin® |
| COX | Cyclooxygenase |
| COX-1 | Cyclooxygenase 1 |
| COX-2 | Cyclooxygenase 2 |
| E | Enzym, hier: COX-1 |
| HAPR | <i>High On Aspirin Platelet Reactivity</i> |
| I₁ | Inhibitor 1, hier: ASS |
| I₂ | Inhibitor 2, hier: Nicht-ASS-NSAID |
| IC₅₀ | Konzentration, bei der die Enzymaktivität zu 50 % gehemmt ist |
| k | Assoziationsgeschwindigkeitskonstante |
| K_i | Michaelis-Menten-Konstante des Inhibitors |
| K_M | Michaelis-Menten-Konstante |
| l | Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante |
| MAA | Methylaminoantipyrin |
| min | Minute |
| n | Stichprobengröße |
| NSAID | <i>Non-steroidal anti-inflammatory drug</i> |
| PAP | plättchenarmes Plasma |
| PG | Prostaglandin |
| PGH₂ | Prostaglandin H ₂ |
| PGG₂ | Prostaglandin G ₂ |
| PRP | plättchenreiches Plasma |
| TX | Thromboxan |
| TXA₂ | Thromboxan A ₂ |
| TXB₂ | Thromboxan B ₂ |
| vs. | versus |

1. Einleitung

1.1 Bedeutung von Acetylsalicylsäure für die kardiovaskuläre Prognose

Die Prävention kardiovaskulärer Ereignisse durch Acetylsalicylsäure (ASS, Aspirin®), einem Thrombozytenfunktionshemmer und zugleich Nicht-steroidalen Antiphlogistikum (*Non-Steroidal Anti-inflammatory Drug*, NSAID), ist durch zahlreiche experimentelle und klinische Studien belegt (Antithrombotic Trialists' Collaboration, 2002; Hennekens und Schneider, 2008; Antithrombotic Trialists' (ATT) Collaboration et al., 2009). Der Einsatz von ASS in dieser Indikation reicht von der Primär- und Sekundärprävention atherothrombotischer Ereignisse bis hin zur Akuttherapie bei Herzinfarkt und ischämischen Schlaganfall, wobei die Risikoreduktion durch ASS in diesen verschiedenen Bereichen unterschiedlich groß ist. Die wahrscheinlich wichtigste und größte Metaanalyse bezüglich der kardioprotektiven Wirkung von ASS umfasste 287 Studien und 135.000 Patienten und zeigte, dass ASS das Risiko für thrombotische Ereignisse um ein Viertel, für nicht-letale Herzinfarkte um ein Drittel, für nicht-letalen Schlaganfall um ein Viertel und das Risiko des vaskulären Todes um insgesamt ein Sechstel senkt (Antithrombotic Trialists' Collaboration, 2002; Antiplatelet Trialists' Collaboration, 1994). ASS wirkt dabei protektiv sowohl bei akutem Myokardinfarkt oder akutem ischämischen Schlaganfall, als auch bei stabiler und instabiler Angina Pectoris, vorausgegangenem Myokardinfarkt, Schlaganfall oder zerebraler Ischämie, bei der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit, sowie bei Vorhofflimmern. In allen Bereichen überwog dabei die kardiovaskuläre Risikoreduktion gegenüber dem Risiko größerer extrakranieller Blutungen. Die Antithrombotic Trialists' Collaboration untersuchte weiterhin in einer Metaanalyse die Risikoreduktion durch die Langzeit-ASS-Einnahme in der Primärprävention bei 95.000 Patienten und in der Sekundärprävention bei 17.000 Hochrisikopatienten gegenüber einem Placebo (Antithrombotic Trialists' (ATT) Collaboration et al., 2009). Zusammenfassend kommen diese Analysen zu dem Ergebnis, dass ASS sowohl in der Akuttherapie als auch zur Sekundärprävention eingesetzt werden sollte, da dort die Risikoreduktion von thrombotischen Ereignissen die Nebenwirkungen von ASS, wie Blutungen und gastrointestinale Komplikationen, überwiegt. Im Gegensatz dazu würden jedoch in der Primärprävention eher die Risiken von ASS im Vergleich zum Nutzen im Vordergrund stehen. Bei diesen Metaanalysen wurde außerdem festgestellt, dass Dosierungen von 75 bis 100 mg täglich mindestens genauso effektiv wie höhere Dosierungen waren (Antithrombotic Trialists' Collaboration, 2002). Die kardiovaskuläre Prävention durch ASS in Dosierungen unter 75 mg täglich war nicht sicher belegbar.

Verschiedene sehr große Einzelstudien trugen erheblich zum Ergebnis der Metaanalysen bei. So kam z.B. die randomisierte, doppelblinde, Placebo-kontrollierte Physician's Health Studie aus dem Jahr 1989, bei welcher 22.071 Ärzte als Probanden teilnahmen, zu dem Ergebnis, dass *low-dose* ASS (325 mg jeden zweiten Tag) das Risiko für Myokardinfarkt um 44% senkte, wobei diese Risikoreduktion nur bei Probanden mit einem Alter von mindestens 50 Jahren gezeigt werden konnte (Steering Committee of the Physicians' Health Study Research Group, 1989).

Der Nutzen von ASS scheint über die Prävention und Therapie kardiovaskulärer Ereignisse hinauszugehen. Seit einigen Jahren wird vermutet, dass ASS das Risiko für Darmkrebs und möglicherweise anderer Tumoren senkt (Schrör und Rauch, 2013; Andersen und Vogel, 2014; Kim, 2014). ASS könnte in Zukunft daher auch in diesem Gebiet eine wichtige Anwendung finden. Weiterhin wird ASS zur Risikoreduktion bei Präeklampsie verwendet und könnte auch im Rahmen neuropsychiatrischer

Erkrankungen nutzbar werden (Bujold et al. 2009; Jaturapatporn et al. 2012; Berk et al. 2013; Talari, Mesdaghinia und Abedzadeh Kalahroudi 2014). ASS findet insofern weitreichende Anwendung.

1.2 Pharmakologische Wirkung von ASS und anderen NSAIDs auf Thrombozyten

Die Hemmung der Thrombozytenfunktion durch ASS beruht darauf, dass ASS die enzymatische Aktivität der Cyclooxygenase (PGH-Synthase)-1 (COX-1) der Thrombozyten irreversibel hemmt. ASS weist eine ca. 170-fach höhere Affinität zur COX-1 im Vergleich zur induzierbaren Isoform COX-2 auf (Schrör, 1997; Mason, Jacobs und Freedman, 2005; Eikelboom et al., 2012). Die COX katalysiert die Bis-Dioxygenierung von Arachidonsäure (ARA) – einer vierfach ungesättigten Omega-6-Fettsäure mit 20 Kohlenstoff-Atomen (C₂₀:4 ω 6) – in Prostaglandin (PG) G₂, und die anschließende Reduktion zu Prostaglandin H₂ (PGH₂). PGH₂ wird anschließend durch die thrombozytäre Thromboxansynthase zu Thromboxan (TX) A₂ umgesetzt - ein wichtiger *feedback*-Aktivator für die Thrombozytenaggregation (Simmons, Botting und Hla, 2004; Rouzer und Marnett, 2009). Die COX-1 – bestehend aus 576 Aminosäuren – ist wie auch die COX-2 ein homodimeres Enzym bei dem jeweils nur eine Untereinheit vom Substrat gebunden wird (Rouzer und Marnett, 2009; Ricciotti und FitzGerald, 2011) (Abb. 1). Jede der zwei Untereinheiten besteht aus drei Domänen: der Epidermis-Wachstumsfaktor (*Epidermal Growth Factor*, EGF) Domäne, der membranbindenden Domäne (MBD) und der katalytischen Domäne (Rouzer und Marnett, 2009). Die katalytische Domäne beinhaltet die aktiven Zentren der Cyclooxygenase- und Peroxidase-Aktivität, die sich auf jeweils gegenüberliegenden Seiten der Häm-Gruppe befinden (Rouzer und Marnett, 2009).

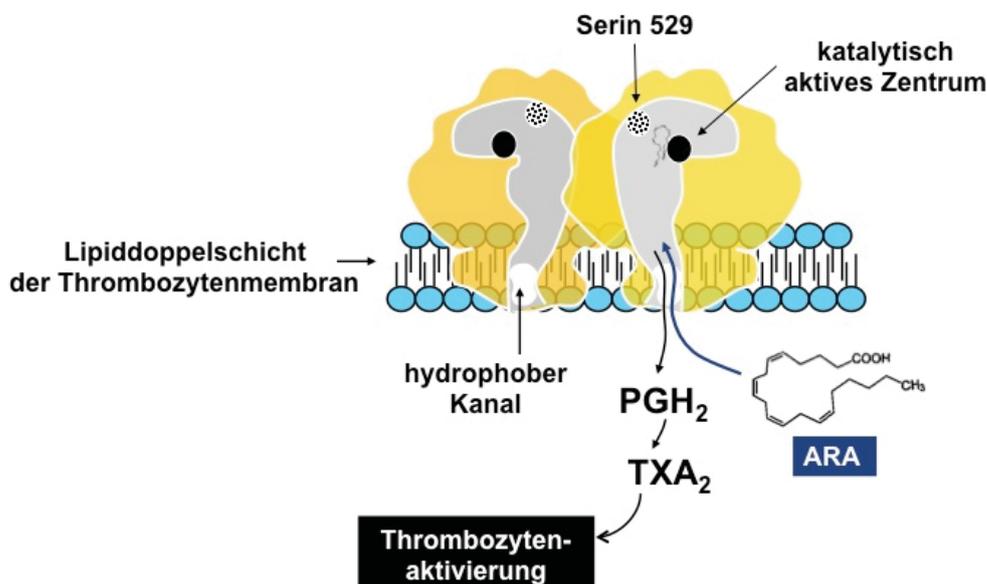


Abb. 1: COX-1, ihre beiden Untereinheiten und ARA als Substrat in einem Thrombozyten. Die COX-1 bindet ARA in L-förmiger Konformation, welche eine ionische Bindung mit Arginin 120 und eine Wasserstoffbrückenbindung mit Tyrosin 355 einhergeht (Simmons, Botting und Hla, 2004).

ASS hemmt die COX durch Blockade des substratbindenden, hydrophoben Kanals, dessen Eingang von der membranbildenden Domäne gebildet wird und in dem sich das aktive Zentrum der COX befindet, infolge der Acetylierung eines Serinrests (Ser529 in COX-1 des Menschen, Ser530 in tierischer COX-1, Ser516 in COX-2), wodurch die ARA durch eine sterische Hinderung nicht mehr an das katalytische Zentrum der COX – der Aminosäure Tyrosin 385 – gelangen kann (Rowlinson et al., 2000; Smith und Song, 2002; Garavito, Malkowski und DeWitt, 2002; Simmons, Botting und Hla, 2004; Gupta et al., 2004; Gupta, Selinsky und Loll, 2006) (Abb. 2). Dabei wird die Synthese von PGH_2 und die nachfolgende Umsetzung zu Thromboxan (TX) A_2 irreversibel verhindert und die Thrombozytenfunktion somit gehemmt (Abb. 3). Angriffspunkte vieler Nicht-ASS-NSAIDs sind die Aminosäuren Arginin 120 und die im substratbindenden Kanal der COX lokalisierten Aminosäuren Glutamat 524 und Tyrosin 355 (Simmons, Botting und Hla, 2004). Durch die Substitution von Isoleucin 523 der COX-1 durch Valin bei der COX-2 ergibt sich hier eine hydrophobe Ausstülpung, die die Bindungsstelle selektiver COX-2-Hemmer – der Coxibe – darstellt (Simmons, Botting und Hla, 2004).

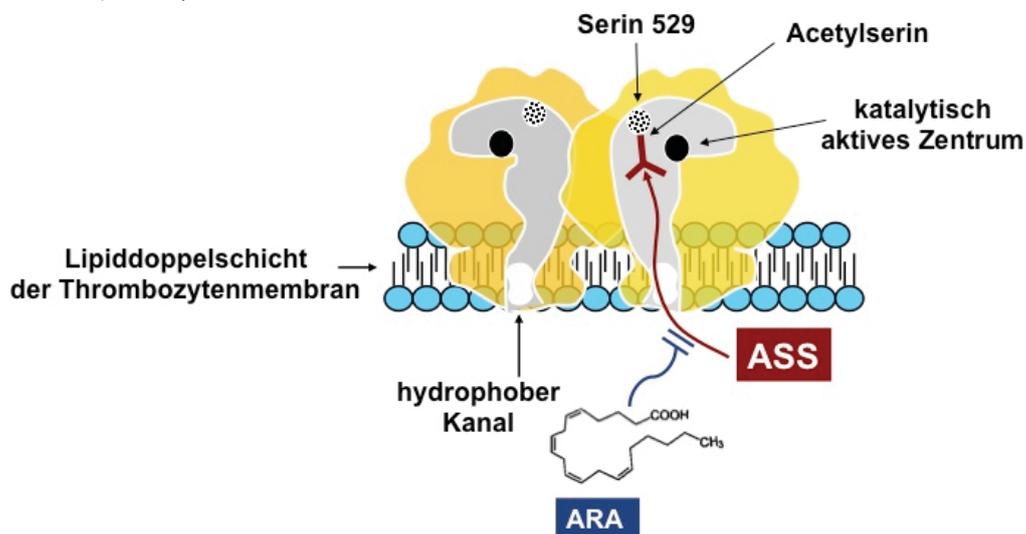


Abb. 2: COX-1-Hemmung durch ASS. ASS hindert durch Acetylierung von Serin 529 den Zugang von Arachidonsäure zum aktiven Zentrum des Enzyms.

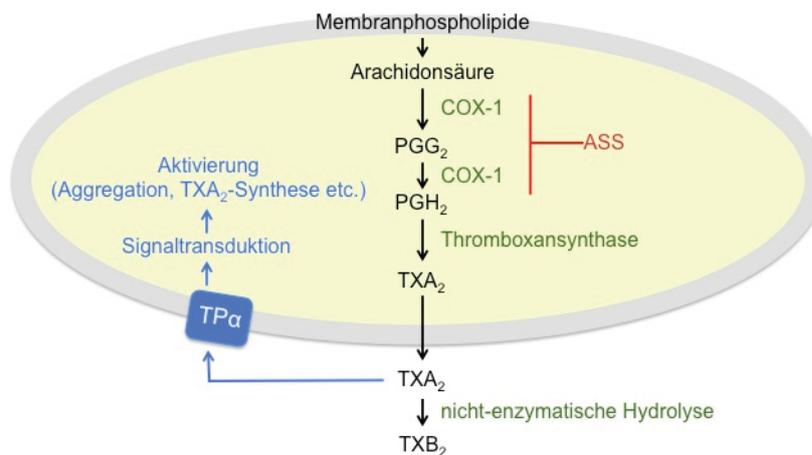


Abb. 3: Thrombozytenaggregationshemmung durch ASS im Thrombozyten. $\text{TP}\alpha$ = Thromboxan-Prostanoid Rezeptor α .

Für eine effektive Prävention kardiovaskulärer Ereignisse durch ASS wird eine nahezu komplette COX-1 Inaktivierung ($\geq 95\%$) vorausgesetzt, da eine nicht-lineare Beziehung zwischen der Hemmung der TXA₂-Synthese und der Hemmung der TXA₂-induzierten Thrombozytenaggregation besteht und Thrombozyten durch eine auf 5-10% herabgesetzte Thromboxansynthese aggregieren können (Reilly und FitzGerald, 1987; Catella-Lawson et al., 2001; Renda et al., 2006). Dies wird im Allgemeinen mit niedrig dosierter ASS erreicht (75-100 mg), die einmal täglich verabreicht wird. Im Gegensatz dazu werden für die Hemmung der COX-2 – z.B. bei entzündungshemmender Indikation – zehn- bis hundertmal höhere ASS-Dosierungen und kürzere Dosierungsintervalle als bei der Thrombozytenaggregationshemmung benötigt, da hier im Unterschied zur irreversiblen Hemmung durch ASS eine aktive Proteinsynthese noch möglich ist und das COX-Enzym relativ rasch (Stunden) resynthetisiert werden kann (Eikelboom et al., 2012). Mit höheren ASS-Dosen steigt jedoch auch die Gastrotoxizität (Eikelboom et al., 2012). Nicht-ASS-NSAIDs hemmen bei üblichen analgetischen Dosierungen die COX zu etwa 70-90%, was aufgrund der hohen TXA₂-Produktion der Thrombozyten für eine Hemmung der Thrombozytenaggregation in vivo nicht ausreicht (Patrono et al., 2001).

1.3 High on Aspirin Platelet Reactivity (HAPR)

1.3.1 Definition von HAPR

Verschiedene Arbeiten haben gezeigt, dass eine Thrombozytenaggregationshemmung durch ASS nicht immer erreicht wird. Dies wird häufig als *High on Aspirin Platelet Reactivity* (HAPR) bezeichnet. HAPR bedeutet, dass unter Behandlung mit niedrig dosierter ASS die oben beschriebene Antiplättchenwirkung nicht erreicht wird, d.h. die COX-1 und damit die Thrombozytenfunktion nicht inhibiert werden. Insofern kann HAPR die Prävention kardiovaskulärer Ereignisse durch ASS in Frage stellen (Weber et al., 2002; Mason, Jacobs und Freedman, 2005; Biondi-Zoccai et al., 2014). Viele Autoren haben hierfür den Begriff „Aspirin-Resistenz“ verwendet, jedoch oft mit unklarer Definition. Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wird daher der Begriff der HAPR vorgezogen. Mit „Aspirin-Resistenz“ wurde sowohl die Unfähigkeit von ASS bezeichnet, sein therapeutisches Ziel – die COX-1 – zu hemmen, als auch kardiovaskuläre Ereignisse unter *low-dose* ASS-Therapie zu verhindern. Der Begriff besagt nichts über andere Faktoren, die zu HAPR führen können, wie zum Beispiel Komorbiditäten (Linden et al., 2012).

1.3.2 Ursachen von HAPR

Es gibt zahlreiche und sehr vielfältige Ursachen für HAPR. Mason et al. teilten diese in vier Kategorien ein: 1) Klinische Ursachen, 2) Pharmakodynamische Ursachen, 3) Biologische Ursachen und 4) Genetische Ursachen (Mason, Jacobs und Freedman, 2005; Weng et al., 2013) (Abb. 4). Darüber hinaus wurden auch pharmakokinetische Ursachen für HAPR identifiziert (Sweeny, Gorog und Fuster, 2009).

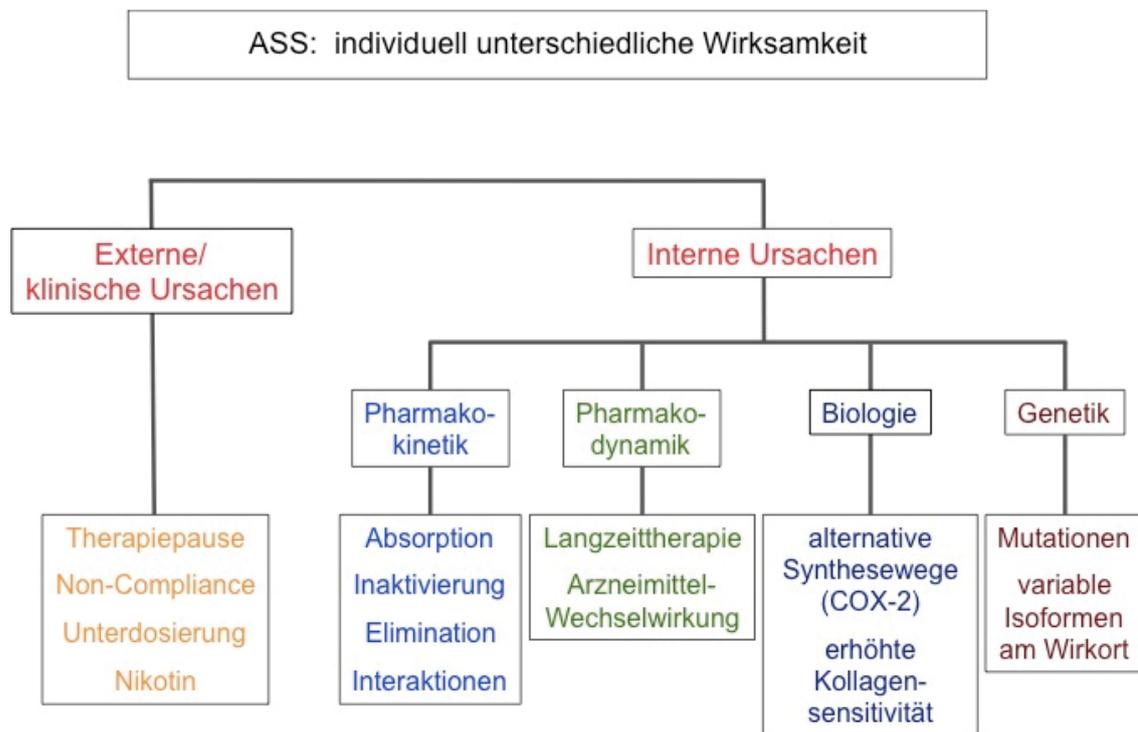


Abb. 4:
Mögliche Ursachen für HAPR.

Viele der diskutierten Mechanismen sind bisher hypothetisch und basieren auf klinischen Studien ohne ausreichende mechanistische Untersuchungen. Auch haben nur wenige Studien HAPR gegen mangelnde Therapie-Adhärenz abgegrenzt.

Der Fokus der vorliegenden Arbeit liegt auf Medikamenteninteraktionen als pharmakodynamische Ursache von HAPR. Sowohl experimentelle als auch klinische Vorarbeiten konnten diese Interaktionen, insbesondere für eine Komedikation von ASS mit anderen NSAIDs, als Ursache für HAPR belegen (Catella-Lawson et al., 2001; Polzin et al., 2013.; Saxena et al., 2013; Hohlfeld, Saxena und Schrör, 2013; Li et al., 2014). Wenn ASS zusammen mit einem NSAID präsent ist, kann es zu einer pharmakodynamischen Wechselwirkung am COX-Enzym kommen. Eine naheliegende Erklärung der Interaktion ist, dass ASS, NSAID und das physiologische Substrat, also ARA, an sich überlappenden Bindungsstellen miteinander konkurrieren (Goltsov et al., 2009). Nach diesem Modell wäre anzunehmen, dass ASS und NSAID kompetitiv interagieren und dass die NSAID- und ASS-Konzentrationen sowie die NSAID-Affinität zur COX-1 Parameter sind, die die Thrombozytenaggregationshemmung durch ASS kritisch beeinflussen. Infolge von Komorbiditäten ist Polymedikation, die unter anderem *low-dose* ASS und NSAIDs einschließt, ein häufiges pharmakologisches Problem bei Menschen im höheren Lebensalter.

Eine andere, ebenfalls aktuelle Hypothese zur Interaktion von ASS und NSAID ist ein *Cross-Talk* zwischen den beiden COX-Untereinheiten. Hiernach könnte die Bindung von NSAIDs an einer Untereinheit der COX eine Konformationsänderung der zweiten Untereinheit induzieren und in Folge dessen die Hemmung durch ASS beeinträchtigt werden (Yuan et al., 2006; Prusakiewicz et al., 2009; Sidhu et al., 2010).

1.4 Indikationen für ASS in Kombination mit anderem NSAID

Patienten mit chronisch-entzündlichen, rheumatologischen Erkrankungen leiden an einem erhöhten kardiovaskulären Risiko (Scott et al., 2012; Liao und Solomon, 2013; van den Oever, van Sijl und Nurmohamed, 2013; Meriño-Ibarra, 2014; Mason und Libby, 2014; Rezuş et al., 2015). Bei diesen werden regelmäßig NSAIDs zur Schmerzreduktion und gleichzeitig – bei kardiovaskulärer Indikation – oft niedrig dosierte ASS in Kombination verabreicht. Da Nicht-ASS-NSAIDs die COX-1 nur reversibel hemmen, wird die thrombozytäre TXA₂-Synthese allenfalls intermittierend gehemmt, so dass es im Dosisintervall zur Plättchenaktivierung und arterieller Thrombusbildung kommen kann (Catella-Lawson et al., 2001; Renda et al., 2006). Wie stark NSAIDs die COX hemmen, hängt dabei von ihrer aktuellen Plasmakonzentration ab. Die Halbwertszeiten gängiger NSAIDs (Ibuprofen etc.) betragen meist nur 2-4 h (Hohlfeld, Saxena und Schrör, 2013). Deshalb sind NSAIDs nicht geeignet, ASS in der Kardioprotektion zu ersetzen.

Eine naheliegende Frage ist, warum überhaupt ASS mit einem anderen NSAID kombiniert wird und nicht ASS in höherer (analgetischer) Dosis eingesetzt wird. Das hängt damit zusammen, dass niedrig dosierte ASS zur Kardioprotektion zu einem 2-fach erhöhten Risiko für gastrointestinale Nebenwirkungen führt - besonders für gastrointestinale Blutungen als Folge der Thrombozytenhemmung - während höhere ASS-Dosierungen im analgetischen und antiinflammatorischen Bereich mit einem 5-6-fach erhöhten Risiko einhergehen (Baigent und Patrono, 2003). Da zudem höhere ASS-Dosen keine stärkere kardiovaskuläre Risikoreduktion als niedrig dosierte ASS bewirkten, wurde die ASS-Dosis auf 75-100 mg reduziert (CURRENT-OASIS 7 Investigators et al., 2010; Eikelboom et al., 2012). Aus diesem Grund werden anstelle einer Dosiserhöhung von ASS andere NSAIDs als Analgetika und Antiphlogistika eingesetzt.

1.5 Prävalenz und klinische Konsequenzen von HAPR

Die Angaben zur Häufigkeit von HAPR variieren in der Literatur. Mason et al. beschrieben, dass etwa 5 % bis 45 % der ASS-Nutzer von HAPR betroffen seien und dass dies aufgrund der hohen Prävalenz atherosklerotischer kardiovaskulärer Erkrankungen große Auswirkungen habe (Mason, Jacobs und Freedman, 2005). Die Autoren schlussfolgerten, dass es aus diesem Grund wichtig sei, ASS-*Non-Responder* zu identifizieren und die antithrombozytäre Therapie entsprechend zu modifizieren. Auch könnten Medikamenteninteraktionen, die zu HAPR führten, klinisch insofern relevant sein, als die dadurch verursachte „Beendigung“ einer Thrombozytenfunktionshemmung zu einem erhöhten thrombotischen Risiko führen. So zeigte eine multizentrische Kohortenstudie eine erhöhte ein-Jahres-Mortalität nach Beenden der ASS-Therapie bei Patienten, die zuvor einen Herzinfarkt erlitten hatten (Ho et al., 2006; Hohlfeld et al., 2008). Breet et al. stellten fest, dass HAPR, die durch ARA-induzierte Lichttransmissionsaggregometrie und einen weiteren Test (*VerifyNow® Aspirin-Assay*) bei 951 Patienten erfasst wurde, signifikant mit kardiovaskulären Ereignissen assoziiert war, die nach perkutaner transluminaler koronarer Angioplastie (PTCA) auftraten (Breet et al., 2010). Ähnliche Ergebnisse wurden kürzlich an einem großen Patientenkollektiv (n=7.090) berichtet, wo HAPR mittels Vollblutaggregometrie (*Multiplate Analyzer*) zum Zeitpunkt der perkutanen koronaren Intervention (PCI) identifiziert wurde. Auch hier ergab sich ein signifikant erhöhtes Risiko für kardiovaskulären Tod und für Stent-Thrombosen von 6,2% in der HAPR-Gruppe vs. 4,5% in der

Vergleichsgruppe ohne HAPR innerhalb des ersten Jahres (Mayer et al., 2014). Siller-Matula et al. konnten zeigen, dass eine unzureichende Hemmung der Thrombozytenaggregation in einem Beobachtungszeitraum von 12 Monaten bei 5,4% der Patienten zu kardiovaskulären Ereignissen führte, während es bei einer Hemmung der Aggregation innerhalb des therapeutischen Bereichs bei nur 2,5% zu Komplikationen kam (Siller-Matula et al., 2015). Diese Arbeitsgruppe kam zu dem Schluss, dass eine personalisierte Therapie zur Thrombozytenaggregationshemmung gerechtfertigt und sogar notwendig sei.

Zusammenfassend ist es nach aktuellem Kenntnisstand wahrscheinlich, dass HAPR zu einer verminderten Risikoreduktion durch ASS führt und mit einer höheren Inzidenz der kardiovaskulären Mortalität einhergeht. Es spricht also vieles dafür, dass HAPR von großer klinischer Relevanz ist.

1.6 Fragestellung

Während die Wechselwirkung von ASS und NSAIDs als solche durch experimentelle und klinische Untersuchungen bestätigt ist, sind Fragen zum pharmakologischen Mechanismus bisher kaum beantwortet. Im Rahmen dieser Dissertation sollen daher folgende bisher offen gebliebene Fragen zu den Interaktionen von ASS und NSAIDs an der COX-1 untersucht werden:

- Führt die kombinierte Inkubation von verschiedenen NSAIDs und ASS zu einer Aufhebung der COX-Hemmung durch ASS und somit zu HAPR?
- Gibt es Unterschiede zwischen verschiedenen NSAIDs bezüglich der Interaktion mit ASS oder handelt es sich um ein „Klassenphänomen“ aller NSAIDs?
- Wird die Interaktion zwischen NSAIDs und ASS hinsichtlich der Hemmung der Thrombozytenfunktion durch die Konzentration des Substrats (Arachidonsäure) oder die *potency* (pharmakologische Wirkstärke) der NSAIDs beeinflusst?
- Gibt es Hinweise dafür, dass NSAID/ASS-Interaktionen auf einer kompetitiven Wechselwirkung an der COX-1 beruhen?
- Kann eine Erhöhung der ASS-Konzentration die Interaktion mit NSAIDs überwinden?

Zur Bearbeitung dieser Fragen soll

1. ein Modell entwickelt und eingesetzt werden, welches die Interaktion mathematisch simuliert und
2. dieses Modell durch gezielte experimentelle Untersuchungen an thrombozytenreichem Plasma gesunder Spender und ausgewählten COX-Inhibitoren (NSAIDs) verifiziert werden.

2. Material und Methoden

2.1 Untersuchungsplan

2.1.1 Probanden

Experimentelle Untersuchungen wurden an thrombozytenreichem Plasma gesunder freiwilliger Spender durchgeführt, welche innerhalb der vorausgegangenen 7 Tage keine Arzneimittel mit Wirkung auf die Thrombozytenfunktion oder Analgetika vom NSAID-Typ eingenommen hatten (Ausschlusskriterium). Nach ausführlicher Aufklärung gab jeder Blutspender seine schriftliche Einverständniserklärung zur Teilnahme. Das Studienprotokoll dieser Arbeit steht in Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki (aktuelle Fassung) und wurde von der Ethikkommission der Universität Düsseldorf zustimmend bewertet (Ethikvotum Nr. 3205). Parallel erfolgten in diesem Projekt auch Untersuchungen an Blutproben von Patienten mit Diabetes mellitus, die jedoch nicht Gegenstand der vorliegenden Dissertation sind.

2.1.2 Versuchsprotokoll

Die vorliegende Arbeit kann in zwei methodisch abgegrenzte Bereiche untergliedert werden:

1. Enzymkinetisches Modell: Entwicklung eines enzymkinetischen Modells zur Simulation der Interaktion von ASS mit einem weiteren NSAID an der thrombozytären Cyclooxygenase.
2. Experimenteller Teil: *In vitro*-Messungen der ARA- und Kollagen-induzierten Thrombozytenaggregation und der thrombozytären Thromboxan-synthese bei unterschiedlichen Konzentrationen von ASS und des zu untersuchenden NSAID. Diese werden mit den Ergebnissen des enzymkinetischen Modells verglichen.

2.2 Entwicklung eines enzymkinetischen Modells

Es existieren verschiedene quantitative Methoden um metabolische Zusammenhänge zu untersuchen. Kinetische Modelle umfassen eine bestimmte Anzahl von Reaktionen und Parametern und können durch Differentialgleichungen beschrieben und gelöst werden. Zu diesen Modellen gehören auch enzymkinetische Modelle, die nur eine beschränkte Anzahl von enzymatischen Reaktionen modellieren können und daher nur einen, jedoch für die jeweilige Fragestellung relevanten Teil aller an diesem Enzym verlaufenden Reaktionen im menschlichen Organismus berücksichtigen. Modelle stellen immer eine Vereinfachung der wirklichen Verhältnisse dar, ermöglichen aber dadurch eine Vertiefung des Verständnisses komplexer Zusammenhänge (Okino und Mavrovouniotis, 1998). Mithilfe eines enzymkinetischen Modells sollte eine rechnerische Methode entwickelt werden, die die Quantifizierung und Vorhersage der effektiven COX-1-Hemmung und deren Analyse in Gegenwart von Inhibitoren dieses Enzyms erlaubt (Teil 1). Die experimentelle Bestätigung des Modells und dessen Parameter erfolgt in Teil 2 (s.u.).

Beschreibung des Modells

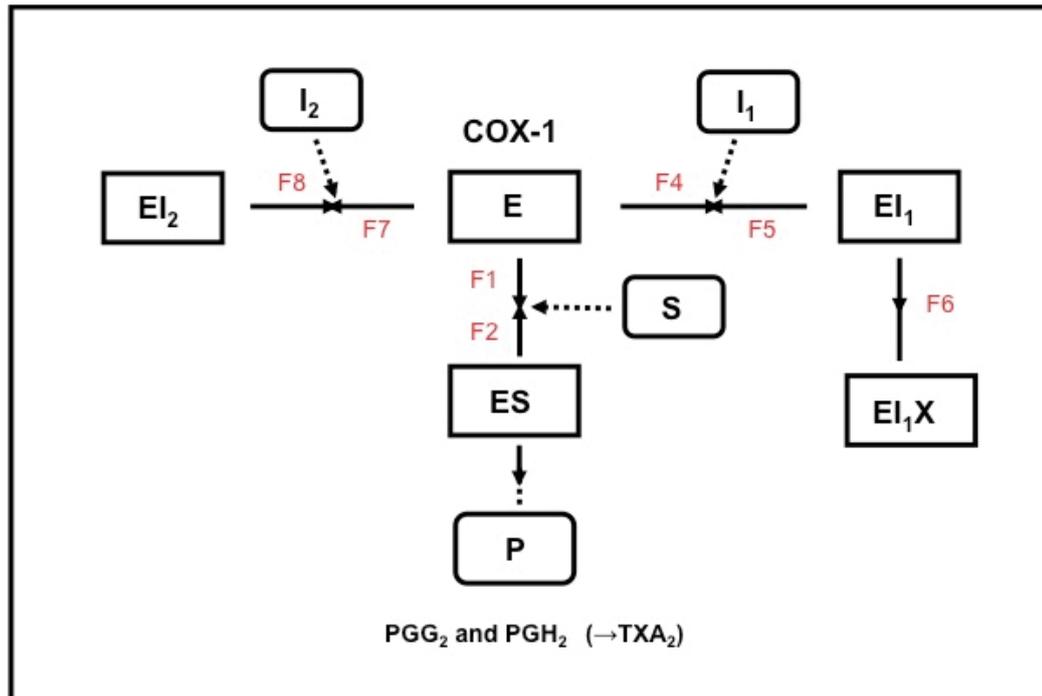


Abb. 5:
Enzymkinetisches Modell mit dem COX-1-Enzym (E) im Zentrum.

Der Entwicklung des Modells (Abb. 5) wurden drei Reaktionen bzw. Teilschritte zugrunde gelegt:

- 1) Im Zentrum des Modells: das physiologische Substrat der COX-1 ist die vierfach ungesättigte Fettsäure Arachidonsäure (ARA), die von diesem Enzym in Prostaglandin H₂ (PGH₂) umgesetzt wird. Dieser Schritt ist geschwindigkeitsbestimmend für die thrombozytäre Thromboxansynthese (Wang, Tsai und Hsu, 2001).

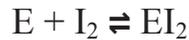


Dabei wird mit E das Enzym, also die COX-1 bezeichnet, S bezeichnet das physiologische Substrat der COX-1, also ARA, und mit P wird das Produkt der enzymatischen Reaktion bezeichnet, in diesem Fall PGH₂. Dieses Modell stellt insofern eine Vereinfachung dar, als die zwei Teilschritte der Cyclooxygenase-Reaktion (Cyclooxygenase- und Peroxidaseaktivität) zusammengefasst wurden. Mit ES wird der Enzym-Substrat Komplex bezeichnet.

- 2) In der Skizze des Modells auf der rechten Seite (Abb. 5) ist die Reaktion unter Zugabe von ASS dargestellt. ASS (I₁=Inhibitor 1) bindet als Enzyminhibitor an die COX (E), was das Enzym aus Schritt 1 entzieht und insofern eine Hemmung ausübt. Eine Besonderheit von ASS ist, dass hier zunächst die Bindung reversibel erfolgt (EI₁). Anschließend, in einer weiteren Bindungsreaktion, folgt eine irreversible Inhibition dadurch, dass in der Nähe des katalytischen Zentrums an der Aminosäure Serin 529 eine kovalente Acetylierung erfolgt (EI₁X). Hierdurch wird ASS zu einem „irreversiblen“ Inhibitor.



- 3) Auf der linken Seite der Modellskizze in Abb. 5 ist die Bindungsreaktion eines weiteren NSAIDs (I_2 =Inhibitor 2) dargestellt. Die Bindung wurde als reversibel angenommen. Da die Bindung von NSAID-Analgetika im Bereich der Substratbindungsstelle der COX-1 und die initiale Bindung von ASS am Enzym überlappen, wurde dem Modell eine kompetitive Interaktion zugrunde gelegt (Hohlfeld, Saxena und Schrör, 2013).



Zusammenfassung der drei Reaktionen an der COX-1:

Die oben dargestellten drei Reaktionen an der COX-1 stehen in Konkurrenz miteinander: ASS, ein weiteres NSAID und ARA als physiologisches Substrat der COX sind Antagonisten bzw. Agonisten am COX-Enzym. Bei der Entwicklung des Modells wurde den unterschiedlichen Hemmtypen Rechnung getragen.

Erläuterung der Modellgleichungen

1) Differentialgleichungen und Flüsse (Tabelle 1)

Um die Reaktionen an der COX mathematisch zu beschreiben, wurden diese als Differentialgleichungen formuliert. Diese Differentialgleichungen stellen die Konzentrationsänderungen während der einzelnen Reaktionen als Funktion der Zeit dar. Auf den linken Seiten der Reaktionsgleichungen, formuliert als $d/dt \times C$ stehen die Zeitableitungen der Konzentrationen C . Die rechte Seite der Gleichungen beschreibt die verschiedenen Flüsse, die bei der Entstehung des jeweiligen Produkts C auf der linken Seite der Gleichung relevant sind. Dabei stellen Flüsse mit einem positiven Vorzeichen Flüsse in Richtung des Produkts dar, wobei Flüsse mit einem negativen Vorzeichen Flüsse in die Gegenrichtung, also in die Richtung der Substrate, ausdrücken. Insgesamt werden in diesem Modell sieben Flüsse F_1 und F_2 sowie F_4 - F_8 benannt, die bei den oben geschilderten drei Reaktionen an der COX relevant sind. Da es sich hier um reversible Reaktionen handelt, mit Ausnahme der Reaktion $EI_1 \rightarrow EI_1X$, gibt es für jede Reaktion einen Fluss von Enzym und Substrat zum Produkt und auch den gegensätzlichen Fluss von dem entstandenen Produkt zu Enzym und Substrat. Mit F_1 wird die Assoziationsreaktion von ARA und COX zu einem Enzym-Substrat-Komplex (ES) beschrieben, welcher anschließend zu dem Produkt Prostaglandin H_2 (P) führt, aus welchem Thromboxan A_2 entsteht. Der Fluss F_2 beschreibt die dazugehörige Dissoziation vom jeweiligen Enzym-Substrat-Komplex zurück zum Enzym, der COX. Die Produktion von P wird im Modell als proportional zu ES angenommen.

Der Fluss F_4 stellt die Assoziation von ASS (I_1) an die COX (E) dar und hat als zugehörige Dissoziationsreaktion den Fluss F_5 , der von EI_1 , also der von ASS reversibel gebundenen COX zu den Substraten COX (E) und ASS (I_1) gerichtet ist. F_6 ist die Reaktion von der reversibel von ASS gebundenen COX zur irreversiblen Verbindung und da diese Reaktion nicht reversibel ist, fehlt hier eine Dissoziation. Die Assoziation des konkurrierenden NSAID (I_2) mit der COX wird durch den Fluss F_7 beschrieben, die zugehörige Dissoziation mit F_8 .

Tabelle 1:

Modellgleichungen der Konzentrationsänderungen der Reaktionsprodukte der COX als Funktion der Zeit.

| Konzentrationsänderung als Funktion der Zeit | Reaktionsprodukte der COX |
|--|---|
| $d/dt \times E = -F1 + F2 - F4 + F5 - F7 + F8$ | Enzym |
| $d/dt \times ES = F1 - F2$ | Enzym-Substrat-Komplex |
| $d/dt \times EI_1 = F4 - F5 - F6$ | Enzym-Inhibitor-1-Komplex |
| $d/dt \times EI_1X = F6$ | Enzym-Inhibitor-1-Komplex (irreversibel) |
| $d/dt \times EI_2 = F7 - F8$ | Enzym-Inhibitor-2-Komplex |

2) Definition der Flüsse (Abb. 6)

Entsprechend der Bedeutung der einzelnen Flüsse wurden diese als Assoziations- oder Dissoziationsvorgang formuliert, Assoziationen mittels einer entsprechenden Geschwindigkeitskonstanten und dem Produkt der Konzentrationen beteiligter Reaktionspartner, Dissoziationen mittels Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante multipliziert mit der Konzentration des entsprechenden Komplexes.

$$F1 = k_e \times E \times S$$

$$F2 = l_e \times ES$$

$$F4 = k_{i1} \times E \times I_1$$

$$F5 = l_{i1} \times EI_1$$

$$F6 = k_{i1x} \times EI_1$$

$$F7 = k_{i2} \times E \times I_2$$

$$F8 = l_{i2} \times EI_2$$

Abb. 6:

Modellgleichungen der Flüsse.

F=Fluss, E=Enzym (COX), S=Substrat (ARA), I_1 =Inhibitor 1 (ASS), I_2 =Inhibitor 2 (NSAID), l =Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante, k =Assoziationsgeschwindigkeitskonstante

Die Assoziationsgeschwindigkeitskonstanten k haben eine Dimension „1/(Zeit x Konzentration)“, die Konstanten der Dissoziationsgeschwindigkeit l eine Dimension „1/Zeit“. Die Michaelis-Menten-Konstanten der COX-Inhibitoren konnten als Quotient der Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten l und der Assoziationsgeschwindigkeitskonstanten k berechnet werden ($K_i=l/k$). Da die Details der einzelnen Reaktionen nicht exakt bekannt waren, wurden die Affinitäten der Reaktionspartner nur mittels variabler Dissoziationsgeschwindigkeitskonstanten realisiert bei auf den Wert 1 festgesetzten Konstanten für die Assoziationsgeschwindigkeit. Um das Modell auf unterschiedliche NSAIDs anwenden zu können, wurden die Differentialgleichungen für verschiedene NSAID-Affinitäten berechnet und daher wurde mit fünf verschiedenen Werten für die

Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante k_{-1} des NSAID gearbeitet ($k_{-1}=0,001$; $k_{-1}=0,01$; $k_{-1}=0,1$; $k_{-1}=1$; $k_{-1}=10$). Damit ergaben sich für die jeweiligen Michaelis-Menten-Konstanten des Nicht-ASS-NSAID: $K_i(\text{NSAID})=0,001 \mu\text{M}$ bzw. $K_i(\text{NSAID})=0,01 \mu\text{M}$; $K_i(\text{NSAID})=0,1 \mu\text{M}$; $K_i(\text{NSAID})=1 \mu\text{M}$; $K_i(\text{NSAID})=10 \mu\text{M}$. Die Werte für ARA und ASS ($K_M(\text{ARA})=9 \mu\text{M}$, $K_i(\text{ASS})=27.000 \mu\text{M}$) wurden aus der Literatur entnommen (Ouellet, Riendeau und Percival, 2001; Liu et al., 2006). Da die Flüsse F4 und F7 zwei Konzentrationen beinhalten (E und I_1 bzw. E und I_2), die abhängig von der Zeit sind, handelt es sich bei diesen beiden Flüssen um nichtlineare Gleichungen wie bei einer Enzymkinetik zweiter Ordnung. Alle anderen Flüsse werden nur durch eine Konzentration beschrieben, die abhängig von der Zeit ist, und stellen daher lineare Differentialgleichungen dar.

3) Anfangsbedingungen (Abb. 7)

Als Anfangsbedingungen sind die Bedingungen definiert, die im Programm vorgegeben wurden, bevor die Iteration (Berechnung) gestartet wurde ($t=0$). Bei diesen wurden alle Reaktionsprodukte der COX (ES, EI_1 , EI_1X , EI_2) auf Null gesetzt. Dies ist damit zu begründen, dass anfangs in der Blutprobe keine ASS und kein anderes NSAID vorhanden ist, da die Probanden, die eine Blutspende gaben, mindestens eine Woche vor der Blutentnahme kein NSAID einschließlich ASS eingenommen haben durften. Auch das physiologische Substrat der COX, die ARA, wurde anfangs auf Null gesetzt, da diese erst bei Stimulation der Phospholipase A_2 aus Membranlipiden der Thrombozyten freigesetzt (bzw. experimentell zugegeben) wird und ohne Stimulation in einer minimalen, vernachlässigbaren Konzentration vorliegt.

| |
|-------------|
| $ES = 0$ |
| $EI_1 = 0$ |
| $EI_1X = 0$ |
| $EI_2 = 0$ |

Abb. 7:

Anfangskonzentrationen der Reaktionsprodukte des COX-Enzyms (E) in μM .
 ES: Enzym-Substratkomplex (Substrat: ARA)
 EI_1 : Enzym-Inhibitor-1-Komplex, EI_1X : Enzym-Inhibitor-1-Komplex (irreversibel)
 EI_2 : Enzym-Inhibitor-2-Komplex

4) Konstanten und Variablen der Berechnungen (Abb. 8-9, Tabelle 2-3)

Die Konzentrationen von ASS (I_1) und des Nicht-ASS-NSAIDs (I_2), wurden variiert. In diesem Beispiel waren $\text{ASS}=300 \mu\text{M}$ und $\text{NSAID}=1000 \mu\text{M}$ vorgesehen (Abb. 8). Der Parameter $\text{Enzym}=4 \mu\text{M}$ zum Zeitpunkt $t=0$ wurde empirisch festgelegt, da das Enzym membrangebunden vorliegt und insofern keine Angabe zur Konzentration möglich ist. Dieser Wert darf selbstverständlich nicht Null sein, da ohne das Vorhandensein des Enzyms keine Reaktion stattfinden würde. Der Wert von $P=ES/\text{ENZYM} \times 100$ als Ergebnisparameter bezieht sich prozentual auf den Ausgangswert von E, daher führen Werte für E zwischen 0,1 und 100 zu nahezu identischen Ergebnissen.

Das Modell geht davon aus, dass zum Zeitpunkt $t=0$ zunächst im untersuchten System kein Substrat (ARA) vorhanden ist ($S=0$). Mit TS wurde die Inkubationszeit ohne ARA benannt und diese wurde auf fünf Minuten festgelegt ($TS=5$). T bezeichnet die gesamte

Inkubationszeit der Thrombozyten, also sowohl ohne ARA als auch mit dieser. Ist T , die gesamte Inkubationszeit, größer als TS , die Inkubationszeit ohne ARA, ($T > TS$) so wird die Menge an ARA von Null ($S=0$) auf die zugegebene Menge, in diesem Fall $30 \mu\text{M}$ geändert ($SO = 30$). Auch SO , also die Menge der ARA konnte variiert werden.

| Name | Value |
|--|-------|
| <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> Main | |
| <input type="checkbox"/> ASS | 300 |
| <input type="checkbox"/> ENZYM | 4 |
| <input type="checkbox"/> NSAID | 1000 |
| <input type="checkbox"/> ke | 1 |
| <input type="checkbox"/> ki1 | 1 |
| <input type="checkbox"/> ki2 | 1 |
| <input type="checkbox"/> kix | 100 |
| <input type="checkbox"/> le | 9 |
| <input type="checkbox"/> li1 | 27000 |
| <input type="checkbox"/> li2 | 0.01 |
| <input type="checkbox"/> SO | 30 |
| <input type="checkbox"/> TS | 5 |

Abb. 8:
Screenshot des Programms *ModelMaker*®.
Parameter, die in die Berechnungen einfließen.

Tabelle 2:
Variablen der Berechnungen.

| | |
|---------------------------------|--|
| K_i (NSAID) | 0,01 [μM] |
| I_{i2} | 0,01 [1/min] |
| k_{i2} | 1 [1/(min x μM)] |

Tabelle 3:
Konstanten der Berechnungen.

| | |
|-------------------------------|--|
| K_i (ASS) | 27.000 [μM] |
| I_{i1} | 27.000 [1/min] |
| k_{i1} | 1 [1/(min x μM)] |
| | |
| K_M (ARA) | 9 [μM] |
| I_e | 9 [1/min] |
| k_e | 1 [1/(min x μM)] |
| | |
| ENZYM | 4 [μM] |

$$\begin{array}{l} S = 0 \text{ für } T < T_S \\ S = S_0 \text{ für } T > T_S \end{array}$$

Abb. 9:
Bedingungen für die Berechnungen.

Das beschriebene mathematisch-enzymkinetische Modell zur Beschreibung der Medikamenteninteraktion an der COX-1 wurde mit der Software *ModelMaker*® Version 4.0 (Cherwell Scientific Ltd.) erstellt. Mit diesem Programm wurden die Differentialgleichungen numerisch nach dem Integrationsverfahren von Runge-Kutta mit einer vorgegebenen Genauigkeit von 0,001 bestimmt und anschließend die berechneten Werte in eine Excel-Tabelle übertragen. Je nach Untersuchung wurde dann eine entsprechende Kurvenschar mit dem Programm "Graph Pad Prism" Version 5.1 erstellt und zu weiteren grafischen Darstellung in "Power-Point" überführt.

2.3 Experimenteller Teil

2.3.1 Material

Blutentnahme

Die Blutentnahme von gesunden Probanden erfolgte über Venenpunktion der Vena mediana cubiti mit einer Butterfly-Kanüle der Größe 21G und einem Innendurchmesser der Nadel von 0,8 mm (BD Vacutainer Safty Lok). Mit Zugabe von *Acid-Citrate-Dextrose* (ACD, 1:10) zur Antikoagulation, wurden je nach Bedarf 30-40 ml Vollblut in 50 ml Perfusor-Spritzen (LuerLock, Braun Melsungen) aufgenommen.

Plasmagewinnung

Unmittelbar nach der Blutentnahme wurde das Zitratblut in 15 ml Falcon-Röhrchen überführt (max. 7 ml Blut pro Falcon) und mittels Zentrifugation (10 min bei Raumtemperatur, 1200 U/min, Minifuge RF Heraeus) plättchenreiches Plasma (PRP) gewonnen. Das PRP im Überstand wurde sorgfältig vom Erythrozytensediment getrennt und in einem Falcon-Röhrchen gesammelt. Anschließend wurde durch die Überprüfung des "Swirl-Phänomens" (Lichtbrechung bei vorsichtigem Schwenken) das Vorhandensein von Thrombozyten im Ruhezustand bestätigt. Proben mit negativem *Swirl* wurden nicht verwendet (unbeabsichtigte Voraktivierung). Zum Eichen des Aggregometers wurde plättchenarmes Plasma verwendet, das durch zehninütige Zentrifugation bei Raumtemperatur bei 3000 U/min (Minifuge RF, Heraeus) hergestellt wurde.

Substanzen und Lösungen

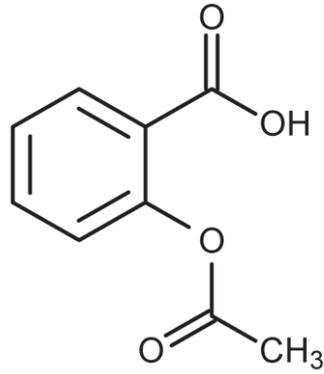
Tabelle 4:
Substanzen und Bezugsquellen.

| Substanzen und Bezugsquellen | |
|--|---|
| Arachidonsäure | NatuTec, Frankfurt |
| Aspisol® (Acetylsalicylsäure), Lysinsalz als Lyophilisat | Bayer, Leverkusen |
| Celecoxib (COX-2 Inhibitor) | CT-Arzneimittel, Berlin |
| DMSO (Dimethylsulfoxid) | Sigma-Aldrich, Steinheim |
| Indomethazinlösung | Sigma, München |
| Kollagen, unspezifisches | Horm, Nycomed, München |
| Methylaminoantipyrin (aktiver Metabolit von Metamizol) | Prof. Dr. H. Weber, Universität Düsseldorf, Institut für Pharmazeutische Chemie |
| Piroxicam | CT-Arzneimittel, Berlin |
| SC-560 | Cayman, Ann Arbor, USA |

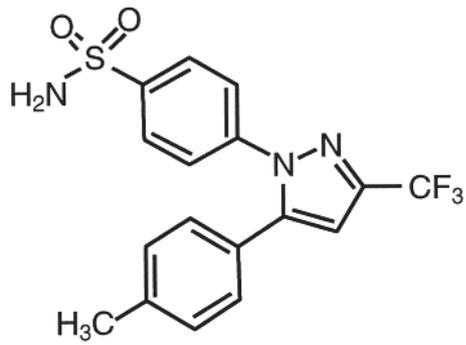
Weitere, hier nicht aufgeführte Standardchemikalien wurden von Merck (Darmstadt, Deutschland), Sigma (Steinheim, Deutschland) oder Boehringer-Mannheim (Mannheim, Deutschland) bezogen.

Strukturformeln

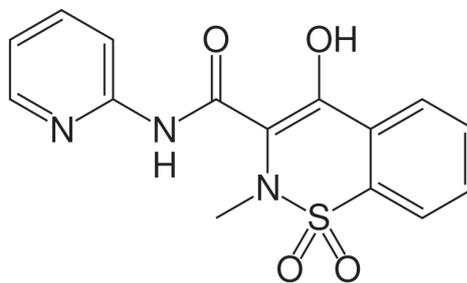
ASS



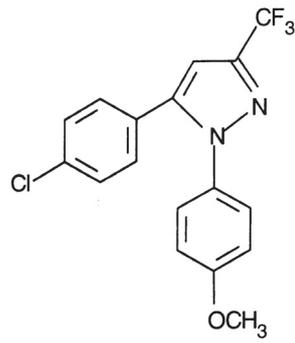
Celecoxib



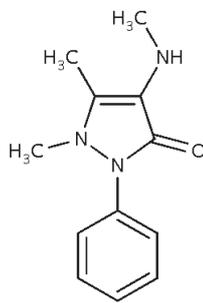
Piroxicam



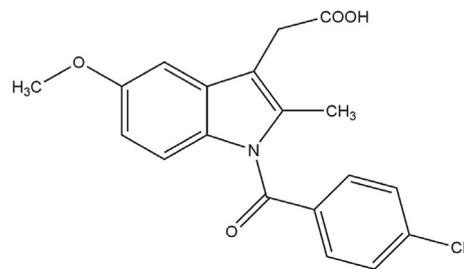
SC-560



Methylaminoantipyrin (MAA)



Indomethazin



Arachidonsäure

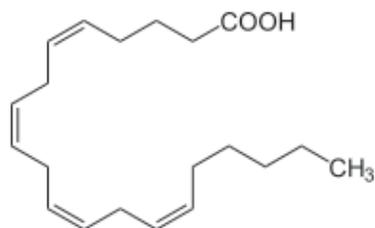


Tabelle 5:

Pufferlösungen und Bezugsquellen.

| Pufferlösungen und Bezugsquellen | |
|---|---|
| ACD | 74,8 mM Trinatriumcitrat, 65 mM Zitronensäure x H ₂ O, 111 mM Glukose x H ₂ O ad 100 ml aqua dest. |
| Alkoholische NaOH | 100 mM NaOH in Ethanol |
| EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure) | Merck, Darmstadt; 77 mM Na-EDTA |
| TM-Puffer (pH 7,4) | 134 mM NaCl, 12 mM NaHCO ₃ , 2,9 mM KCl, 0,36 mM NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O, 1 mM MgCl ₂ x 6H ₂ O, 5 mM HEPES |
| Tris-Puffer (pH 7,4) | Carl Roth GmbH+Co, Karlsruhe; 50 mM Tris-HCl |

2.3.2 Methoden

Messung der Thrombozytenaggregation

Die Thrombozytenaggregation wurde nach dem turbidimetrischen Verfahren nach Born zur Bestimmung der Thrombozytenfunktion gemessen (Born und Hume, 1967; Born, 1970; Michal und Born, 1971). Bei dieser Methode wird die Änderung der Lichttransmission und damit der optischen Dichte einer Thrombozytensuspension kontinuierlich photometrisch erfasst. Die maximale Änderung der Lichttransmission zeigt dabei eine erfolgte Aggregation der Plättchen. Das verwendete Zweikanalaggregometer (Labor AFACT, Labor Biomedical Technologies, Ahrensburg, Deutschland) wurde mit einem Flachbettschreiber (Packard Model 621, Zaventem, Belgien) verbunden, um die Veränderung in der Lichtdurchlässigkeit und damit der Aggregation aufzuzeichnen. Somit sind die aufgezeichneten Aggregationskurven Funktionen der Lichttransmission über der Zeit. Der Papiervorschub des Schreibers betrug 3 cm/min. Vor jeder Messreihe wurde das Aggregometer mit PRP für den Nullwert und mit PAP für den Wert der maximalen Lichttransmission geeicht.

Als Thrombozytensuspension diente plättchenreiches Plasma (PRP) in einer Mikroküvette (500 µl), welches bei 37°C durch einen Magnetrührer bei 1200 U/min ständig in Bewegung gehalten wurde. Wird ARA, Kollagen oder ein anderer aggregatorischer Stimulus zu dieser Suspension hinzugefügt, verändern die Thrombozyten ihre diskoide zu kugelförmiger Form, wodurch die Lichtdurchlässigkeit des Plasmas zunächst abnimmt (als *shape-change* in den Aggregationskurven sichtbar (s. Abb. 10). Danach bilden die Thrombozyten Pseudopodien aus, die sich zu Aggregaten verbinden, wodurch die Lichttransmission immer weiter zunimmt, bis nahezu alle Thrombozyten aggregiert sind und eine maximale Lichttransmission erreicht wird.

Zunächst wurde 100 µl TM-Puffer (Kontrolle) oder 100 µl ASS (30 µM) zusammen mit 400 µl PRP in eine Küvette gegeben und in einem Heizblock des Aggregometers bei 37°C für vier Minuten inkubiert, anschließend für zwei Minuten im Lichtkanal des Aggregometers bei einer Geschwindigkeit von 1200 U/min und einer Temperatur von 37°C gerührt. Die Inkubationszeit war in den experimentellen Versuchen also sechsminütig und wurde etwas länger als die fünf-minütige Inkubationszeit im mathematischen Modell gewählt, um der Diffusionszeit der Substanzen und der Diffusionsbarriere, die mindestens aus der Zellmembran der Thrombozyten besteht, Rechnung zu

tragen. Dass die Bedingungen für die Experimente mit denjenigen des Modells vergleichbar sind, wurde durch eine vergleichbare mittlere Hemmung durch ASS zu Beginn der Versuchsreihen verifiziert. Anschließend wurden die Thrombozyten entweder mit ARA (1 mM; 300 µM) oder mit Kollagen zur Aggregation stimuliert und vier Minuten lang aufgezeichnet. Mit Kollagen wurde die Aggregationsfähigkeit der Thrombozyten unabhängig von der Thromboxansynthese untersucht. Hier wurde mit der jeweils niedrigsten Konzentration gearbeitet, die im individuell verwendeten PRP gerade eine vollständige Aggregation bewirkte (0,5 µg/ml – 6 µg/ml). Diese wurde zu Beginn jeder Versuchsreihe ermittelt. Gestoppt wurde die Aggregation nach insgesamt zehn Minuten (d.h. 4 min nach Zugabe von ARA bzw. Kollagen) mit 30 µl EDTA (4,5 mM) und 4 µl Indomethazin (0,4 mM). Anschließend wurde nach fünf-minütiger Zentrifugation (Minifuge EBA 12, Hettich, 14000 U/min bei Raumtemperatur) der Überstand für die spätere Thromboxanbestimmung bei -20°C eingefroren.

Die auf Interaktion mit ASS zu untersuchende NSAID-Substanz (jeweils 5 µl in entsprechender Konzentration) wurde vor der Stimulierung mit ARA oder Kollagen entweder zu Thrombozytenmedium (TM, 100 µl) oder zu ASS (100 µl) gegeben, je nachdem ob die Substanz alleine, oder dessen Interaktion mit ASS untersucht werden sollte. Je nach Versuchsreihe wurden die ASS-, die ARA- bzw. Kollagenkonzentration und die Konzentration des zu untersuchenden COX-Inhibitors variiert. Bei Messreihen mit ASS wurden parallel Thrombozyten mit TM-Puffer ohne ASS und NSAID inkubiert, so dass sichergestellt wurde, dass die Plättchen weiterhin funktionsfähig und aktivierbar waren.

Eine vollständige Hemmung der Thrombozytenaggregation wurde bei fast allen PRP-Proben mit einer ASS-Konzentration von 30 µM erreicht. In Einzelfällen, wenn mit dieser Konzentration keine vollständige Hemmung der Aggregation erreicht werden konnte, wurde die ASS-Konzentration in Schritten von 10 µM erhöht und die ASS-Konzentration ermittelt, die gerade die Thrombozytenaggregation vollständig hemmt. Mit der ermittelten Konzentration von ASS wurde anschließend die gesamte Messreihe an der jeweiligen PRP-Probe fortgeführt.

Thromboxanbestimmungen zur Verifizierung der Thrombozytenaggregation

Die thrombozytäre Thromboxansynthese wurde in Form des Thromboxan B₂ (TXB₂) gemessen, welches das stabile, inaktive Hydrolyseprodukt des sehr kurzlebigen Thromboxan A₂ ist. Für jede Messreihe wurde anhand der Aggregation die NSAID-Konzentration ermittelt, die zu maximaler Interaktion mit ASS führte. Hier wurde mittels des Cayman TXB₂ EIA Kit die Konzentration von TXB₂ bestimmt. Dieser ist ein kompetitiver Immunoassay, bei dem TXB₂ mit einem TXB₂-Acetylcholinesterase-Konjugat als Tracer um TXB₂-spezifische Bindungsstellen an hoch affinen monoklonalen Kaninchen-Antikörpern konkurrieren. Da die Konzentration des TXB₂-Tracers in jedem Well konstant ist, jedoch die Konzentration des TXB₂ in den einzelnen Proben variiert, ist die Menge an Tracer, die an den Antikörpern binden kann, umgekehrt proportional zu der TXB₂-Konzentration in den Wells. Das sowohl freie als auch als Tracer von den Antikörpern gebundene TXB₂ wird von polyklonalen Immunglobulinen (IgG) gebunden, die gegen die Antikörper gerichtet sind und sich bereits in den Wells befunden haben. Anschließend werden mithilfe des Waschpuffers nicht gebundene Anteile aus den Wells entfernt und Ellman's Reagenz, welches das Substrat der Acetylcholinesterase enthält, wird hinzugegeben. Es entsteht ein gelbliches Produkt, das photometrisch stark bei 412 nm absorbiert. Die Intensität der gelben Farbe, die so im

Photometer bestimmt werden kann, ist proportional zum gebundenen TXB₂-Tracer, welches sich umgekehrt proportional zum freien TXB₂ verhält. Das LLOQ (*lower limit of quantification*) des Thromboxans wurde vom Hersteller mit 1 ng/ml angegeben. Experimentell ermittelte Werte < 1 ng/ml wurden als Null angenommen.

Auswertung der Ergebnisse

Die Auswertung der Thrombozytenaggregation bzw. deren Hemmung erfolgte über Auswertung der Aggregationskurven sowie der Auswertung der dazugehörigen Thromboxanbestimmungen.

1. Aggregationskurven und deren Auswertung (Abb. 10)

Nach Zugabe des proaggregatorischen Stimulus (ARA; Kollagen) erfolgte initial in allen Versuchen eine Abnahme der Lichttransmission (*shape-change*). Bei einer anschließenden Thrombozytenaggregation erfolgte in allen Versuchen eine Zunahme der Lichtdurchlässigkeit in Form einer positiven Steigung der Aggregationskurven. Die Lichtdurchlässigkeit der Proben nach dem Beenden der Aggregation nach zehn Minuten wurde als Amplitude der Kurven angegeben. Die Hemmung der Aggregation durch NSAIDs mit und ohne ASS wurde in Form der maximalen Tangentensteigung der Aggregationskurven angegeben, wobei eine vollständige Aggregationshemmung durch ASS als Nullwert festgelegt wurde (Abb. 10). Bei jeder Messung wurde daher die maximale Tangentensteigung in [cm/min] und Amplitude in [cm] den aufgezeichneten Aggregationskurven bestimmt, diese Werte wurden in eine Excel-Tabelle übertragen und mit dem Programm "Sigma Plot" grafisch dargestellt. Kam es durch eine effektive Hemmung der Thrombozyten zu keiner Thrombozytenaggregation, war gelegentlich noch ein *shape-change* erkennbar, jedoch kam es hier nicht zu einer Aggregation in Form einer Zunahme der Lichttransmission.

2. Auswertung der Thromboxanbestimmungen

Die Thromboxanwerte für die jeweilige Konzentration des untersuchten NSAID, bei der in der entsprechenden Aggregationskurve die stärkste Interaktion mit ASS gezeigt wurde, wurden mit Excel 2011 ausgewertet und die dazugehörigen Diagramme wurden mit SigmaPlot erstellt.

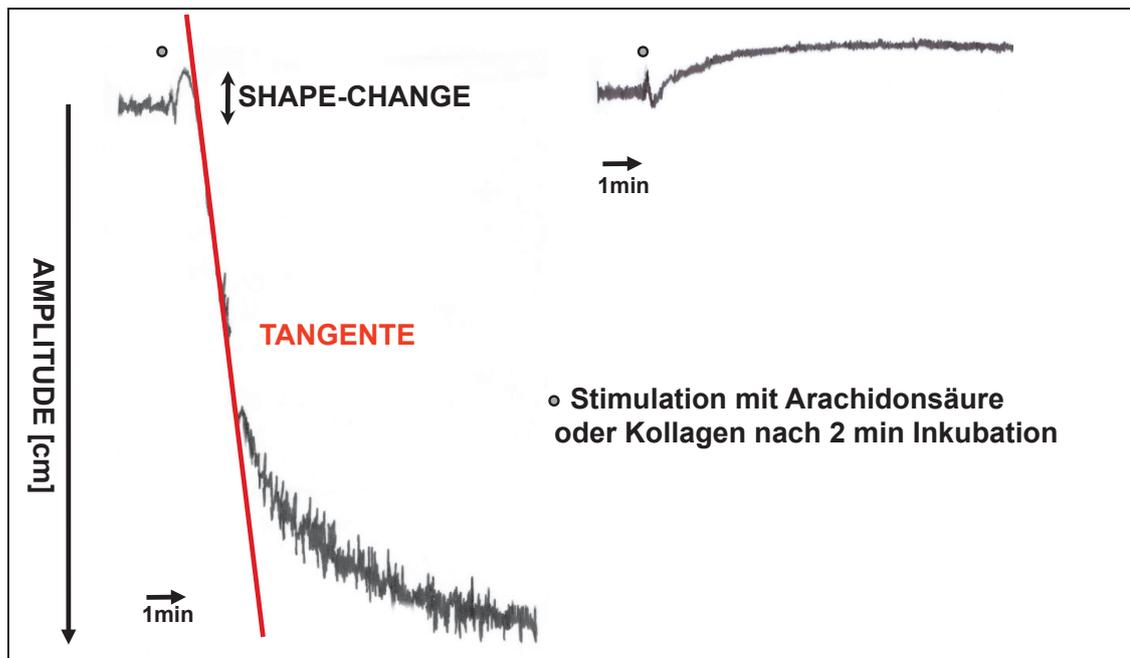


Abb. 10:
Auswertung der Aggregationskurven.

3. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit Excel 2011 und dem Statistikmodul in der Software SigmaPlot. Die Daten wurden jeweils als Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) von n Versuchen angegeben. Prozentuale Angaben beziehen sich auf dieselben Individuen. Unterschiede bei der Aggregationshemmung und der Thromboxankonzentration zwischen ASS in Kombination mit einem anderen NSAID im Vergleich zu ASS alleine wurden hinsichtlich ihrer statistischen Signifikanz in Absprache mit dem Mathematiker am Institut mithilfe des nicht-parametrischen Wilcoxon-Mann-Whitney-Test (U-test) bestimmt. Das Signifikanzniveau für α wurde mit $p < 0,05$ festgelegt.

3. Ergebnisse

3.1 Einfluss von reversibler und irreversibler Inhibition der Cyclooxygenase im entwickelten enzymkinetischen Modell

Mit Hilfe der Differentialgleichungen des enzymkinetischen Modells wurden für insgesamt fünf hypothetische NSAID-Affinitäten die COX-Aktivität berechnet. Hierfür wurden die Michaelis-Menten-Konstanten von $K_i=10 \mu\text{M}$ bis $K_i=0,001 \mu\text{M}$ in Zehnerpotenzen variiert. Die restliche COX-Aktivität (in % von der maximalen Aktivität bei Substratsättigung) wurde für sechs verschiedene ASS-Konzentrationen, von 0 bis $1000 \mu\text{M}$, und für fünf NSAID-Konzentrationen von $0,1 \mu\text{M}$ bis $1000 \mu\text{M}$ ermittelt. Diese Berechnungen wurden für vier ARA-Konzentrationen von $10 \mu\text{M}$ bis $300 \mu\text{M}$ durchgeführt, die zu jedem K_i -Wert vier Kurvenscharen lieferten (Abb. 11-18).

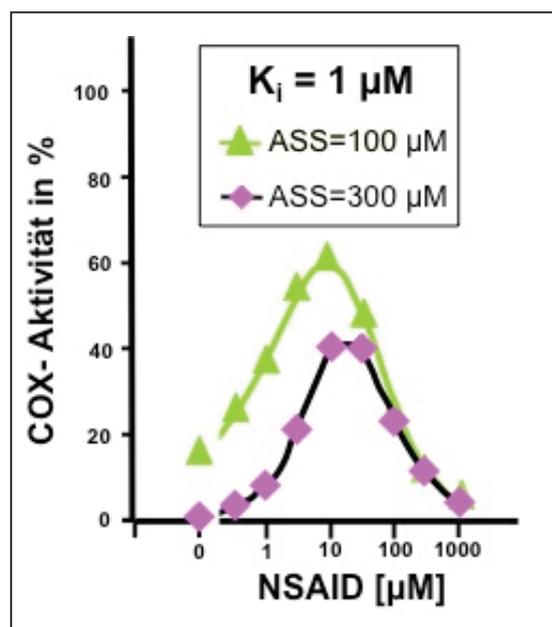


Abbildung 11:

COX-Aktivität in % von der maximalen Aktivität (Substratsättigung). Es liegt ein K_i -Wert des NSAID von $K_i=1 \mu\text{M}$ zugrunde. Als Substratkonzentration (ARA) wurde $300 \mu\text{M}$ gewählt. Diese glockenförmigen Konzentrations-Wirkungskurven verdeutlichen, dass die COX-Hemmung durch ASS bei NSAID-Konzentrationen von $1-100 \mu\text{M}$ am stärksten beeinträchtigt ist und daher hier die Interaktion besonders ausgeprägt ist. Im Vergleich zu $\text{ASS}=100 \mu\text{M}$, ist bei $\text{ASS}=300 \mu\text{M}$ ein ähnlicher, nahezu paralleler Kurvenverlauf bei jedoch insgesamt niedrigerer COX-Aktivität erkennbar.

Zunächst sollen die Ergebnisse für einen konstanten K_i -Wert und einer konstanten ASS- und ARA-Konzentration betrachtet werden. Die berechnete Kurve für $K_i=1 \mu\text{M}$, $\text{ARA}=300 \mu\text{M}$ und $\text{ASS}=100 \mu\text{M}$ (Abb. 11, grüne Kurve) zeigt, dass ASS allein ($\text{NSAID}=0 \mu\text{M}$) die COX-Aktivität bis auf etwa 15 % hemmt. Bei zusätzlicher Anwesenheit von NSAID nimmt die COX-Aktivität bemerkenswerterweise kontinuierlich zu, bis sie bei einer NSAID-Konzentration von $10 \mu\text{M}$ ein Maximum erreicht (etwa 60%). Von diesem Maximalwert aus sinkt die COX-Aktivität bei weiterer Erhöhung der NSAID-Konzentration und fällt schließlich bei $\text{NSAID}=1000 \mu\text{M}$ auf unter 5%. Diese „glockenförmige“ Kurve verdeutlicht, dass bei mittleren NSAID-Konzentrationen ($1-100 \mu\text{M}$) die COX-Hemmung durch ASS am stärksten beeinträchtigt ist und hier somit die stärkste Interaktion zu erwarten wäre.

Betrachtet man den Graphen für die höhere ASS-Konzentration (ASS=300 μM), so sieht man verglichen mit ASS=100 μM einen ähnlichen Verlauf (Abb. 11). Dieser Graph verläuft in etwa parallel zu dem Graph von ASS=100 μM , ist jedoch nach unten, das heißt zu einer niedrigeren COX-Aktivität versetzt, entsprechend stärkerer Hemmung des Enzyms. So ist bei NSAID=0 μM die COX nahezu vollständig gehemmt. Der Maximalwert der Kurve (Scheitelpunkt) für ASS=300 μM beträgt etwa 40% (stärkste Interaktion), während sie bei ASS=100 μM etwa 60% beträgt. Auch bei ASS=300 μM zeigt die mathematische Simulation, dass bei steigenden NSAID-Konzentrationen (1-100 μM) die COX-Aktivität im Vergleich zu ASS allein (NSAID=0 μM) zunächst stark zunimmt und bei weiterer Erhöhung der NSAID-Konzentration (>100 μM) wieder abfällt.

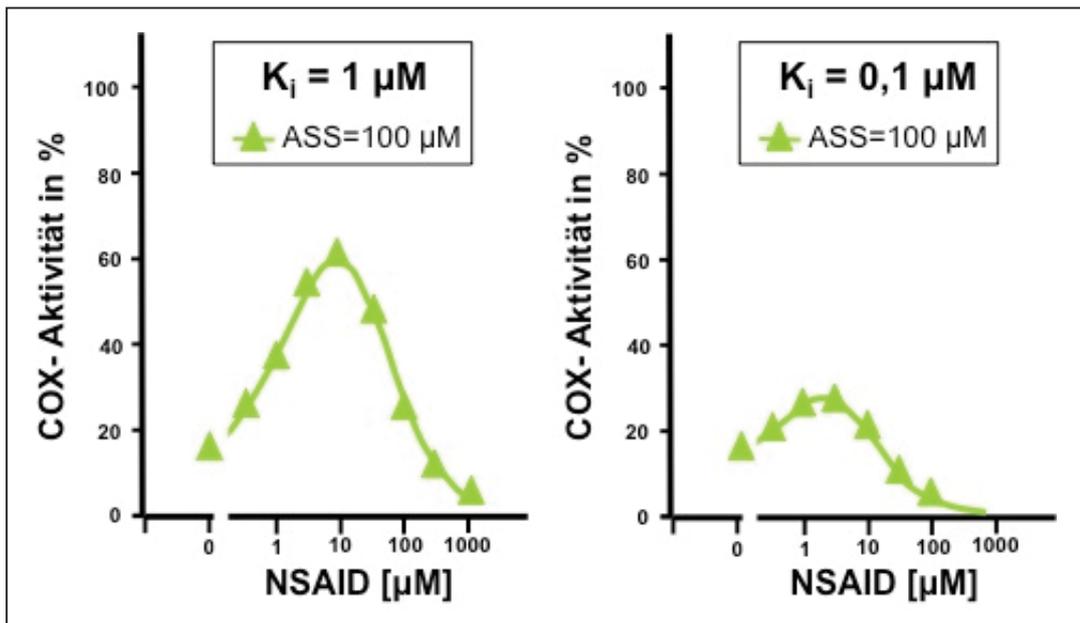


Abbildung 12:

COX-Aktivität in % von der maximalen Aktivität (Substratsättigung). ARA=300 μM und ASS=100 μM . Im Vergleich zum Graphen für $K_i=1 \mu\text{M}$ (links) ergibt sich bei einem NSAID mit höherer Affinität zum Enzym (0,1 μM , rechts) ein zwar ähnlicher, jedoch deutlich flacherer Kurvenverlauf mit niedrigeren COX-Aktivitäten.

Vergleicht man die Kurve für $K_i=1 \mu\text{M}$ mit der Kurve für $K_i=0,1 \mu\text{M}$ bei konstanter ASS- und ARA-Konzentration (Abb. 12), sieht man beim niedrigeren K_i -Wert - also der höheren COX-Affinität des NSAID – einen ähnlichen, jedoch flacheren Kurvenverlauf mit niedrigeren COX-Aktivitäten (Maximalwert etwa 25% bei $K_i=0,1 \mu\text{M}$ vs. 60% bei $K_i=1 \mu\text{M}$). Das mathematische Modell sagt also voraus, dass NSAIDs mit niedriger COX-Affinität die Wirkung von ASS stärker beeinträchtigen würden.

Im Folgenden wurden bei den Berechnungen sowohl die ASS- und NSAID-Konzentrationen als auch der K_i -Wert und die ARA-Konzentration variiert (Abb. 13-18). Die Ergebnisse lieferten 24 Kurvenscharen, die die Abhängigkeit der Interaktion von den zuvor genannten Parametern veranschaulichen. Wie schon die Ergebnisse aus den Abbildungen 11 und 12 verdeutlichen, zeigen auch die Abbildungen 13-17, dass die Interaktion – zu erkennen an der Zunahme der COX-Aktivität – bei Erhöhung der NSAID-Konzentration bis zu einem Maximalwert kontinuierlich zunimmt und bei weiterer Erhöhung der Konzentration schließlich wieder abnimmt. Auch diese Kurven zeigen die Maxima der Interaktion bei NSAID-Konzentrationen von 10-100 μM , während bei unter 1 μM und über 100 μM die COX-Hemmung kaum beeinträchtigt ist

(Abb. 13-17). Auch die Abhängigkeit der Interaktion vom K_i -Wert wird in den Abbildungen 13-17 deutlich. Die stärkste Interaktion besteht bei dem höchsten simulierten K_i -Wert von 10 μM (Abb. 13), während die COX-Hemmung durch ASS bei $K_i=0,001 \mu\text{M}$ kaum beeinträchtigt ist (Abb. 17). Eine weitere interessante Vorhersage des Modells, die anhand dieser Kurvenscharen deutlich wird, ist, dass eine Erhöhung der ARA-Konzentration zu stärkerer Interaktion führt. Vergleicht man die COX-Aktivitäten bei ARA=300, 100, 30 und 10 μM bei konstantem K_i -Wert und konstanter ASS-Konzentration ($K_i=10 \mu\text{M}$; ASS=100 μM), so sieht man einen stetigen Abfall der COX-Aktivität von ca. 60% bei ARA=300 μM auf ca. 40% bei ARA=100 μM , 20% bei ARA=30 μM und ca. 10% bei ARA=10 μM (Abb. 13). Diese Abhängigkeit der ASS/NSAID-Interaktion von der ARA-Konzentration wird auch in den weiteren Kurvenscharen in Abb. 14-18 sichtbar.

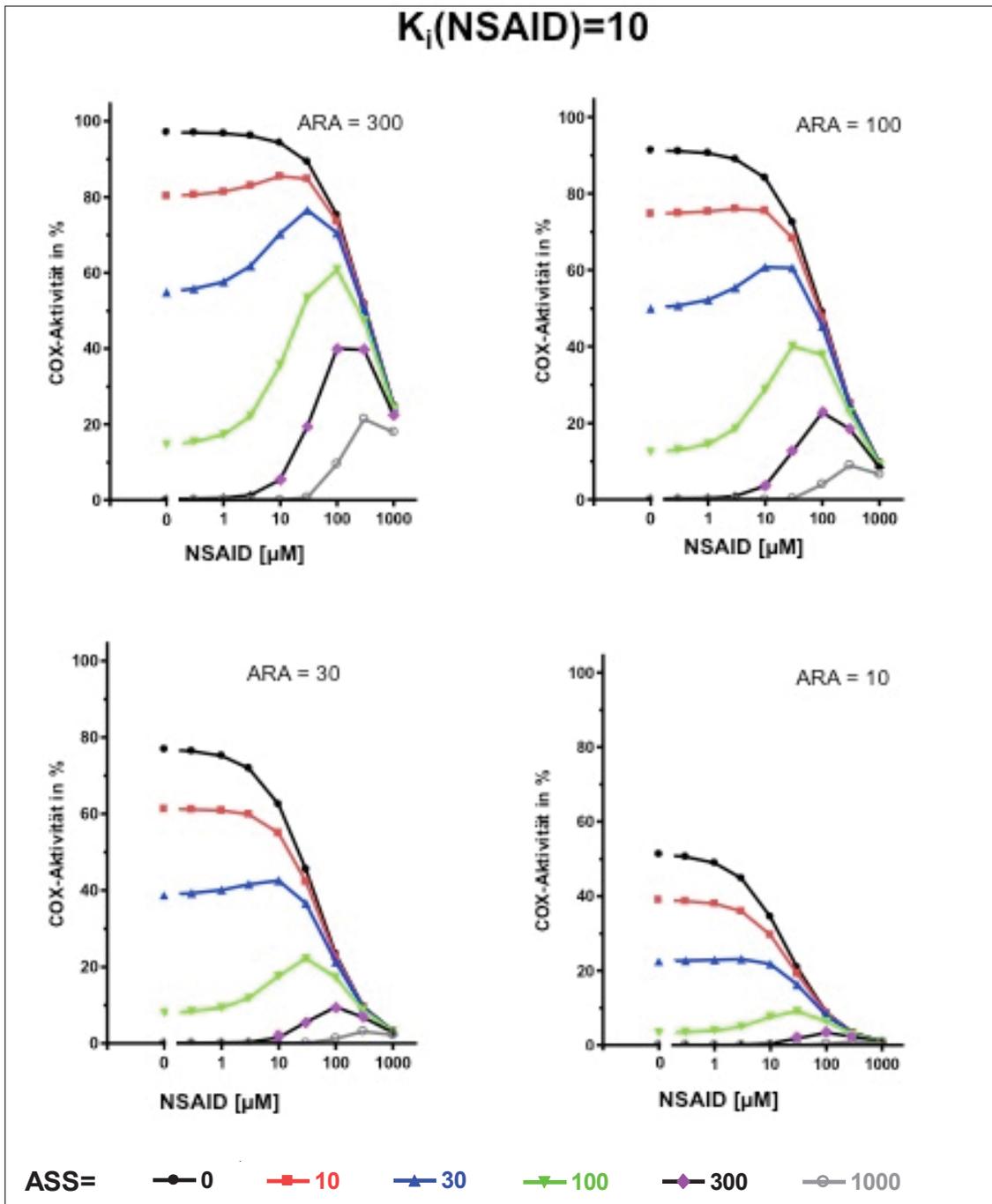


Abbildung 13: COX-Aktivität in % von der maximalen Aktivität (Substratsättigung) in Abhängigkeit von der NSAID-Konzentration bei einer im Modell vorgegebenen Michaelis-Menten-Konstante des NSAID von $K_i = 10 \mu\text{M}$, sechs verschiedenen ASS-Konzentrationen in μM (0; 10; 30; 100; 300; 1000) und ARA-Konzentrationen von 300, 100, 30, 10 μM .

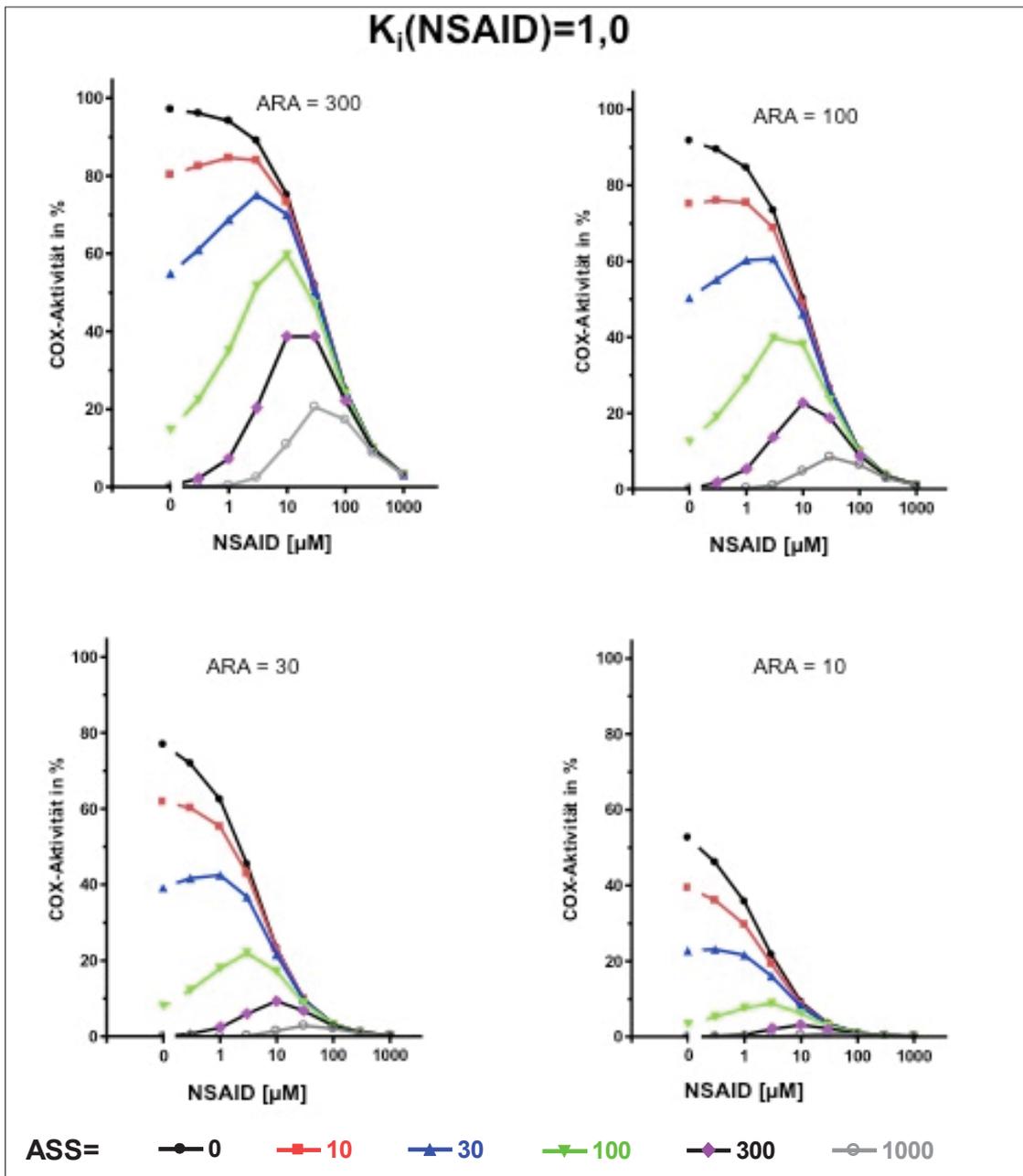


Abbildung 14:
Analog Abbildung 13, jedoch mit $K_i=1 \mu\text{M}$.

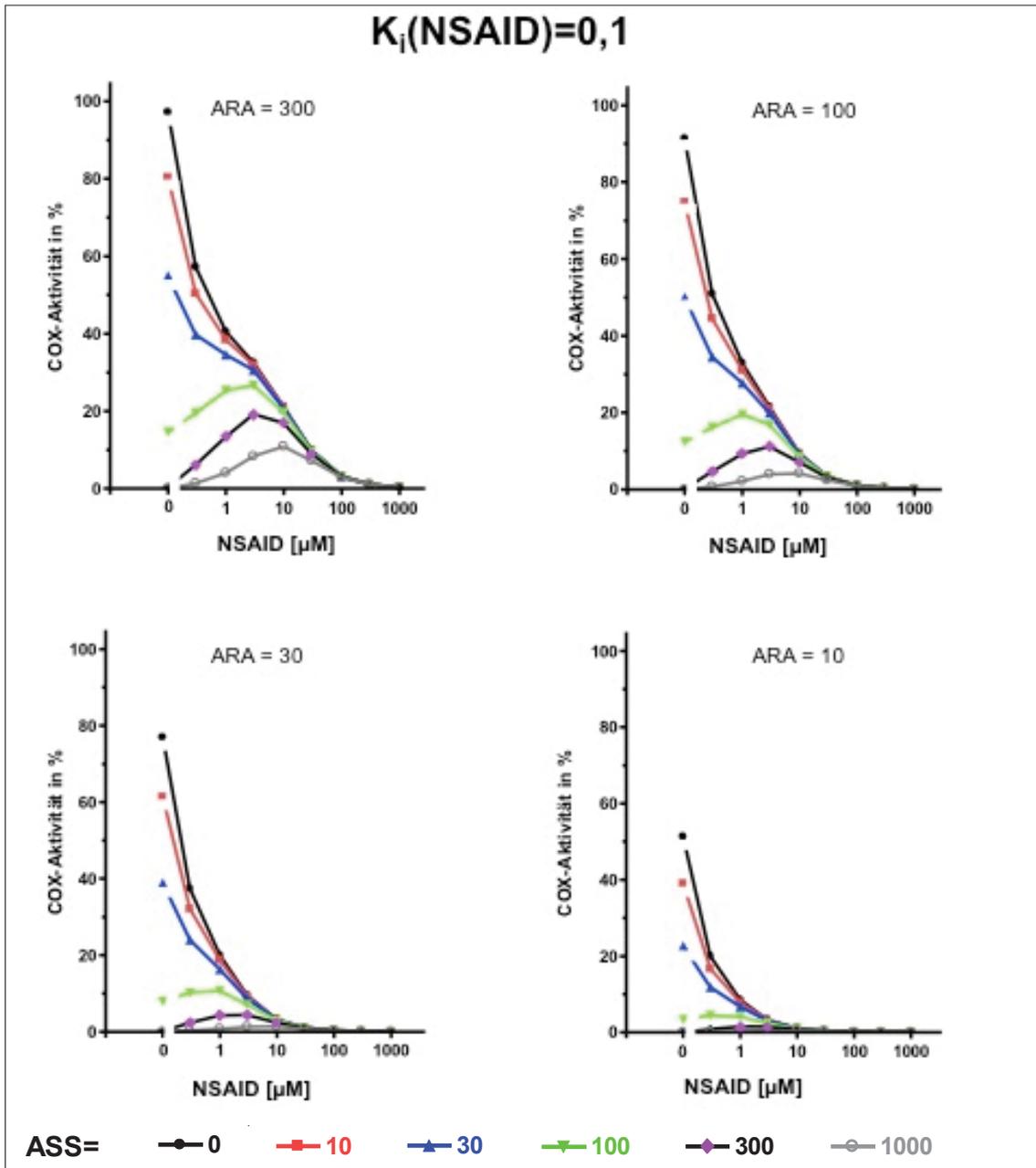


Abbildung 15:
Analog Abbildung 13, jedoch mit $K_i = 0,1 \mu\text{M}$.

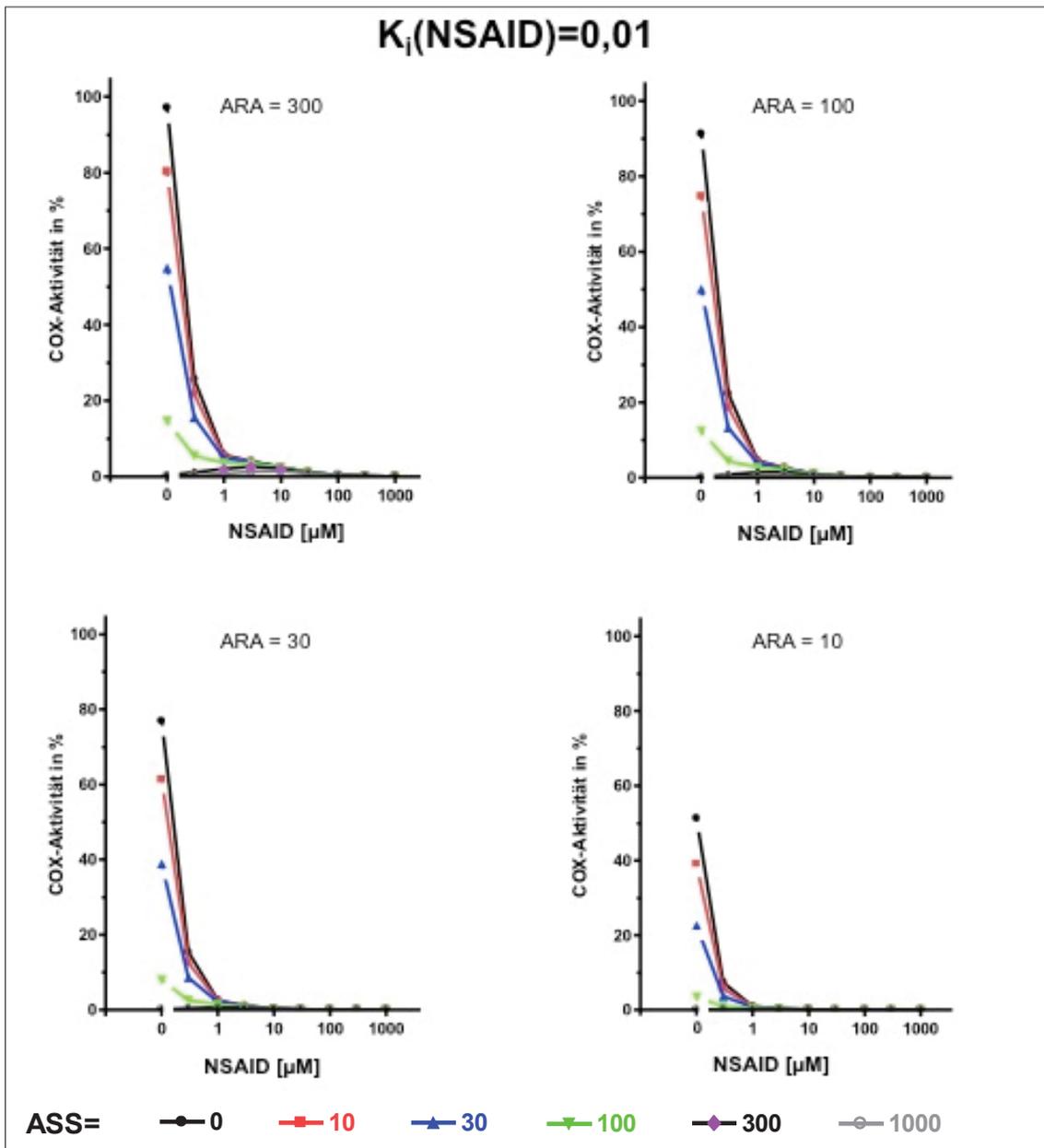


Abbildung 16:
Analog Abbildung 13, jedoch mit $K_i = 0,01 \mu\text{M}$.

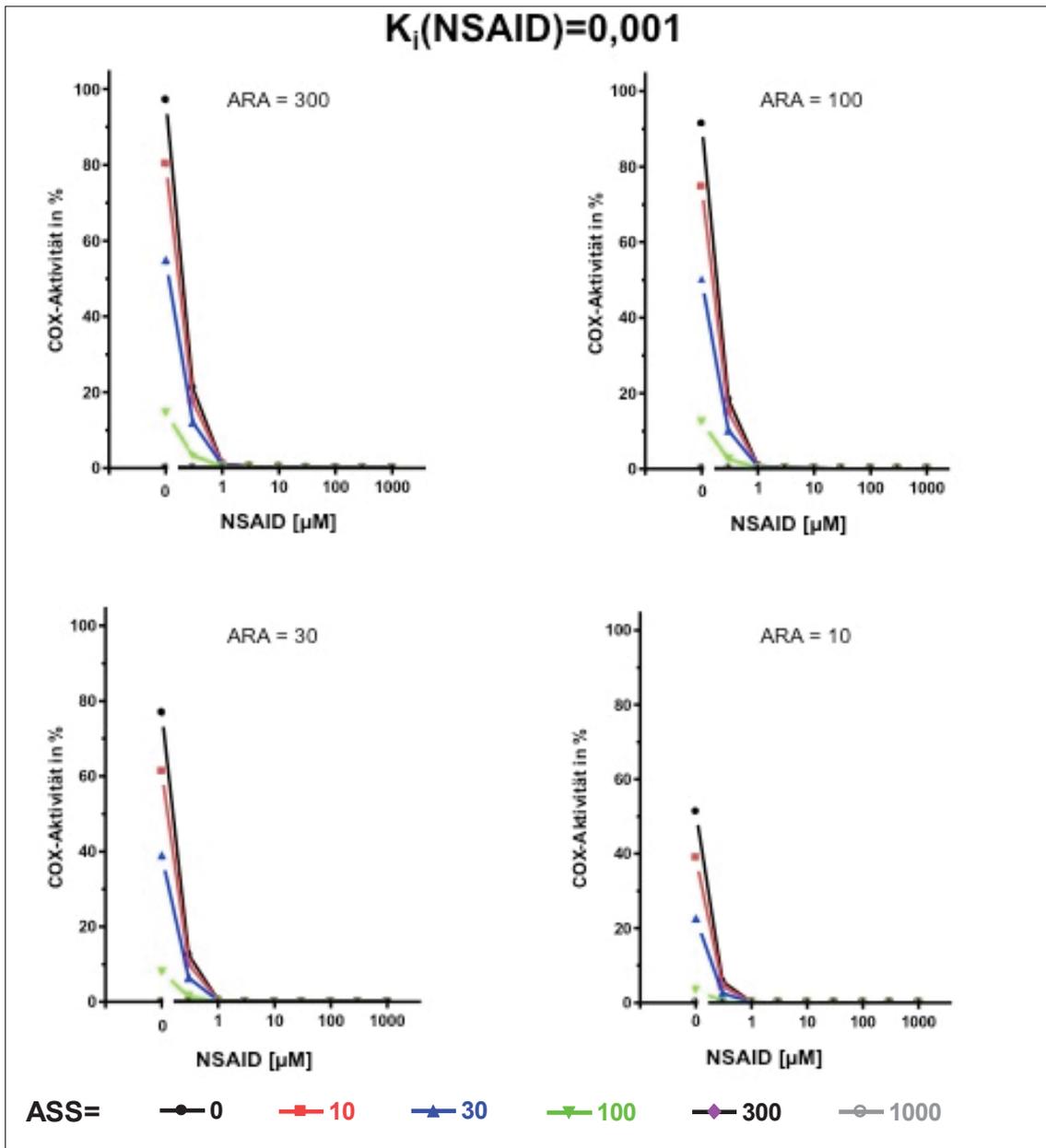


Abbildung 17:
Analog Abbildung 13, jedoch mit $K_i = 0,001 \mu\text{M}$.

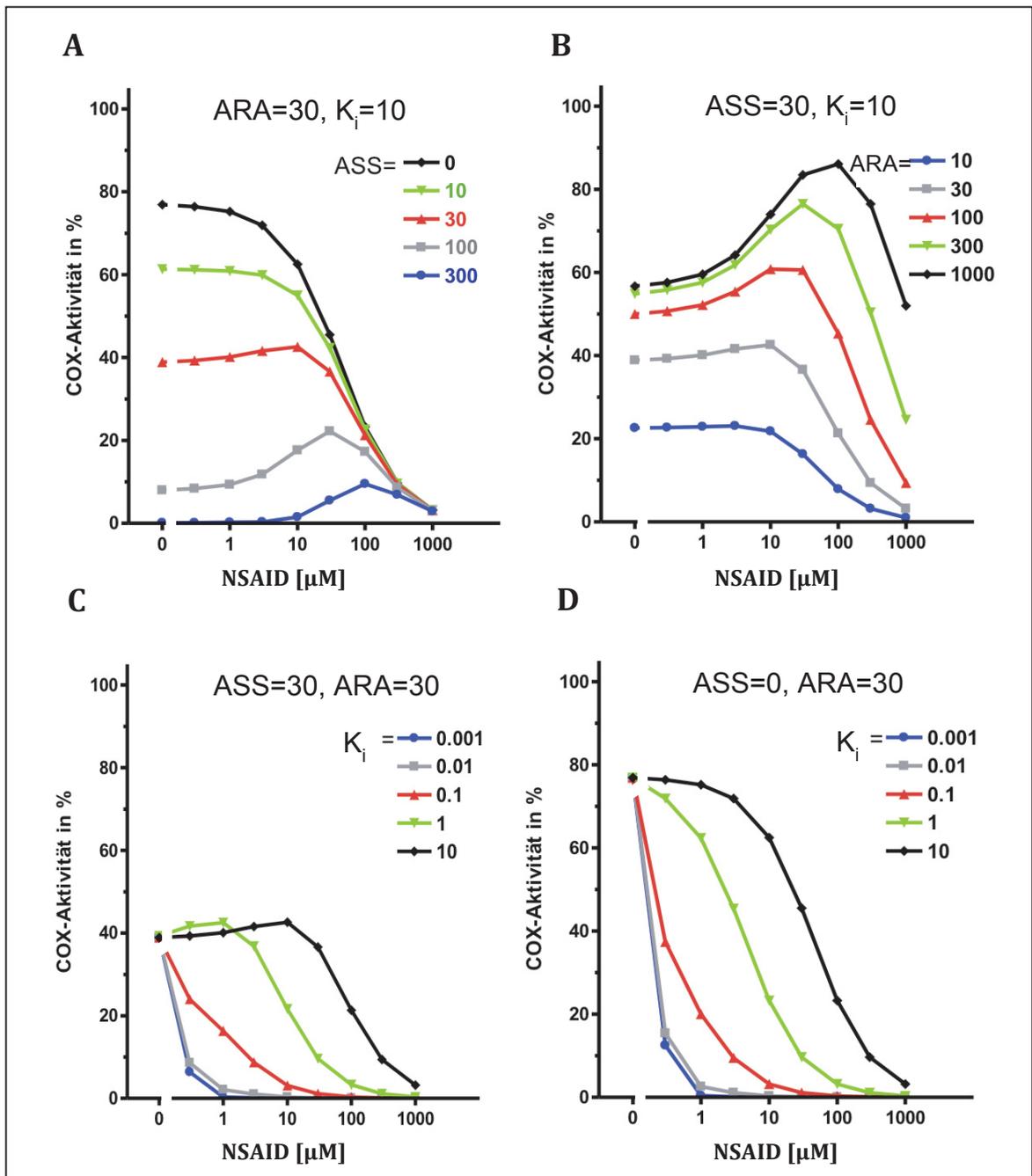


Abbildung 18:

COX-Aktivität in % von der maximalen Aktivität (Substratsättigung) in Abhängigkeit von der NSAID-Konzentration in μM bei verschiedenen

A: ASS-Konzentrationen in μM (0; 10; 30; 100; 300), einer ARA-Konzentration von 30 μM und einer Michaelis-Menten-Konstanten des NSAID von $K_i = 10 \mu\text{M}$.

B: ARA-Konzentrationen in μM (10; 30; 100; 300; 1000), einer ASS-Konzentration von 30 μM und einer Michaelis-Menten-Konstanten $K_i = 10 \mu\text{M}$.

C: Michaelis-Menten-Konstanten K_i in μM (0,001; 0,01; 0,1; 1; 10), einer freien ARA-Konzentration von 30 μM und einer ASS-Konzentration von 30 μM .

D: Michaelis-Menten-Konstanten K_i in μM (0,001; 0,01; 0,1; 1; 10) und einer freien ARA-Konzentration von 30 μM ohne die Zugabe von ASS (ASS=0 μM).

Betrachtet man Abbildung 18A, sieht man deutlich, dass höhere ASS-Konzentrationen eine niedrigere COX-Aktivität und somit eine stärkere COX-Hemmung bewirken. Während bei ASS=0 μM die COX-Aktivität anfänglich bei etwa 78% ist, findet man bei ASS=30 μM zu Beginn eine COX-Aktivität von etwa 39% und bei ASS=300 μM eine zunächst vollständige Hemmung der COX-Aktivität. Weiterhin sieht man an den

simulierten Ergebnissen in Abb. 18, dass die COX-Hemmung durch niedrigere (0,1 μM ; 1 μM) und höhere ($\geq 1000 \mu\text{M}$) NSAID-Konzentrationen nur wenig beeinträchtigt ist, d.h. nahezu der Applikation von ASS alleine entspricht. Bei NSAID-Konzentrationen im Bereich von 1-1000 μM hingegen findet man eine signifikante Zunahme der COX-Aktivität trotz der Anwesenheit von ASS. Dies bedeutet eine fehlende oder verminderte COX-Hemmung durch ASS, die im biologischen System zu einer HAPR führen würde. Betrachtet man die Kurvenscharen für unterschiedliche ARA-Konzentrationen (Abb. 18B), so findet man signifikante Zunahmen der COX-Aktivitäten bei hohen ARA-Konzentrationen (100 μM ; 300 μM ; 1000 μM) und ein Verschwinden dieser Medikamenteninteraktion bei niedrigen ARA-Konzentrationen (10 μM). Bei dem niedrigsten K_i -Wert ($K_i=0,001 \mu\text{M}$) und somit der höchsten hier untersuchten NSAID-Affinität zeigt sich deutlich, dass sowohl bei der alleinigen Gabe des NSAID ohne ASS (Abb. 18D) als auch bei NSAID in Kombination mit ASS 30 μM (Abb. 18C, Abb. 17) eine Hemmung der COX vollständig erzielt wird und damit die COX-Aktivität annähernd Null beträgt. Diese vollständige Hemmung der COX wird bei sehr hoher Affinität des NSAID zur COX bei allen ASS- und NSAID-Konzentrationen erreicht, so dass hier eine Interaktion mit ASS nicht erfolgt (Abb. 17). Bei diesem K_i -Wert ist die COX auch bei hohen ARA-Konzentrationen (ARA=300 μM) vollständig und bei allen NSAID-Konzentrationen gehemmt (Abb. 17).

3.1.1 Zusammenfassung der Ergebnisse der Simulation:

Die numerischen Ergebnisse der Differentialgleichungen des Modells zeigen folgende Charakteristik:

1. die Interaktion zeigt sich bei niedrigeren (0-30 μM) und höheren (100-1000 μM) ASS-Konzentrationen (Abb. 13-15; 18A);
2. die Interaktion ist am stärksten ausgeprägt bei mittleren NSAID-Konzentrationen (1-100 μM) (Abb. 11-17; 18A; 18B);
3. je höher die ARA-Konzentration ist, desto stärker ist die Interaktion (Abb. 18B);
4. je höher der K_i -Wert und somit je niedriger die Affinität des NSAID zur COX-1 ist, desto deutlicher ist die Interaktion ausgeprägt (Abb. 12-17; 18C);
5. bei NSAIDs mit niedrigen K_i -Werten und damit sehr hohen Affinitäten wird die COX schon bei sehr geringen NSAID-Konzentrationen gehemmt und die COX-Hemmung ist in allen untersuchten Konzentrationen vollständig (Abb. 18D).

Medikamenteninteraktionen, die zu HAPR führen können, sind gemäß der Simulation am ehesten zu erwarten bei (1) mittleren (und klinisch relevanten) NSAID-Konzentrationen, (2) allen untersuchten ASS-Konzentrationen, (3) niedrigen NSAID-Affinitäten zur COX-1, sowie (4) hohen ARA-Konzentrationen. Liegen mehrere Bedingungen gleichzeitig vor, führt dies zu einer stärkeren Interaktion mit höherer COX-Aktivität.

3.2 Experimentelle Überprüfung des Modells

Die mit dem Modell simulierten Daten wurden experimentell anhand vier ausgewählter NSAIDs unterschiedlicher Affinität zur COX-1 (Celecoxib, MAA, Piroxicam und SC-560) überprüft. Die IC_{50} -Werte dieser NSAIDs, aus denen eine Berechnung des K_i -Wertes erfolgen kann, wurden in Vorversuchen separat bestimmt. Dabei wurde für Celecoxib ein IC_{50} -Wert von 1 μ M, MAA von 6 μ M und Piroxicam von 2 μ M ermittelt. Die höchste Affinität der verwendeten NSAIDs wies SC-560 mit einer IC_{50} von 30 nM auf.

3.2.1 Celecoxib

ASS alleine in einer Konzentration von 30 μ M bewirkte nach Stimulation durch ARA (300 μ M bzw. 1 mM) oder Kollagen (2-6 μ g/ml) eine vollständige Hemmung der Thrombozytenaggregation (Abb. 19A-C, rote Kurven). Bei gleichzeitiger Anwesenheit von ASS und Celecoxib im PRP und Stimulation mit 1 mM ARA waren die Thrombozytenaktivität und Thromboxansynthese jedoch nicht mehr vollständig gehemmt (Abb. 19A). Wie im Modell simuliert, zeigte sich auch experimentell, dass die Wirkung von ASS durch Celecoxib aufgehoben wurde und die Thrombozytenaggregation, als Maß für die COX-Aktivität, nicht mehr vollständig gehemmt war. Insofern zeigten ASS und Celecoxib eine Interaktion im Sinne einer teilweise aufgehobenen Hemmung durch ASS. Diese Interaktion nahm mit Erhöhung der Celecoxib-Konzentration zu, bis sie ein Maximum bei 0,3 μ M Celecoxib erreichte, und nahm bei weiterer Erhöhung der Celecoxib-Konzentration wieder ab. Wie auch das Modell zeigte, ergab sich also auch hier eine glockenförmige Konzentrations-Wirkungskurve in Bezug auf die Interaktion mit diesem NSAID. Celecoxib allein führte erst ab Konzentrationen > 3 μ M zu signifikanter Thrombozytenaggregationshemmung (Abb. 19A, graue Kurve). Bei ARA-Konzentrationen von 300 μ M wurde diese Interaktion erst bei höherer Celecoxib-Konzentration und quantitativ geringer beobachtet, während sie bei ARA 1 mM schon bei sehr niedriger Celecoxib-Konzentration (0,01 μ M) vorhanden war (Abb. 19A; 19B, rote Kurven). Dies verdeutlicht, dass die Konzentration der ARA die Interaktion beeinflusste. Bei ARA 300 μ M führte Celecoxib allein auch in höheren Konzentrationen zu keiner signifikanten Hemmung der Aggregation (Abb. 19B, graue Kurve). Auch die Versuchsreihe mit Stimulation der Thrombozyten durch Kollagen zeigte bei allen Celecoxib-Konzentrationen Interaktionen, jedoch im Vergleich zur Versuchsreihe mit ARA 1 mM weniger stark ausgeprägt (Abb. 19C, rote Kurve). Ein Unterschied bei der Kollagen-Stimulation im Vergleich zu der Stimulation mit ARA war, dass es keinen kontinuierlichen Anstieg der Interaktion bis zu einem Maximum und einen anschließenden Abfall gab, sondern die Interaktionen mit Erhöhung der Celecoxib-Konzentration relativ stetig zunahmen.

Die thrombozytäre Thromboxansynthese nach Stimulation mit ARA bzw. Kollagen als Maß für die COX-Aktivität war bei alleiniger Verwendung von ASS vollständig gehemmt. Wie bei der Hemmung der Aggregation, resultierten Celecoxib und ASS in Kombination in einer deutlichen Zunahme der Thromboxansynthese, welche auf eine herabgesetzte Hemmung durch ASS infolge einer Interaktion zwischen ASS und Celecoxib hinweist (Abb. 19A-C).

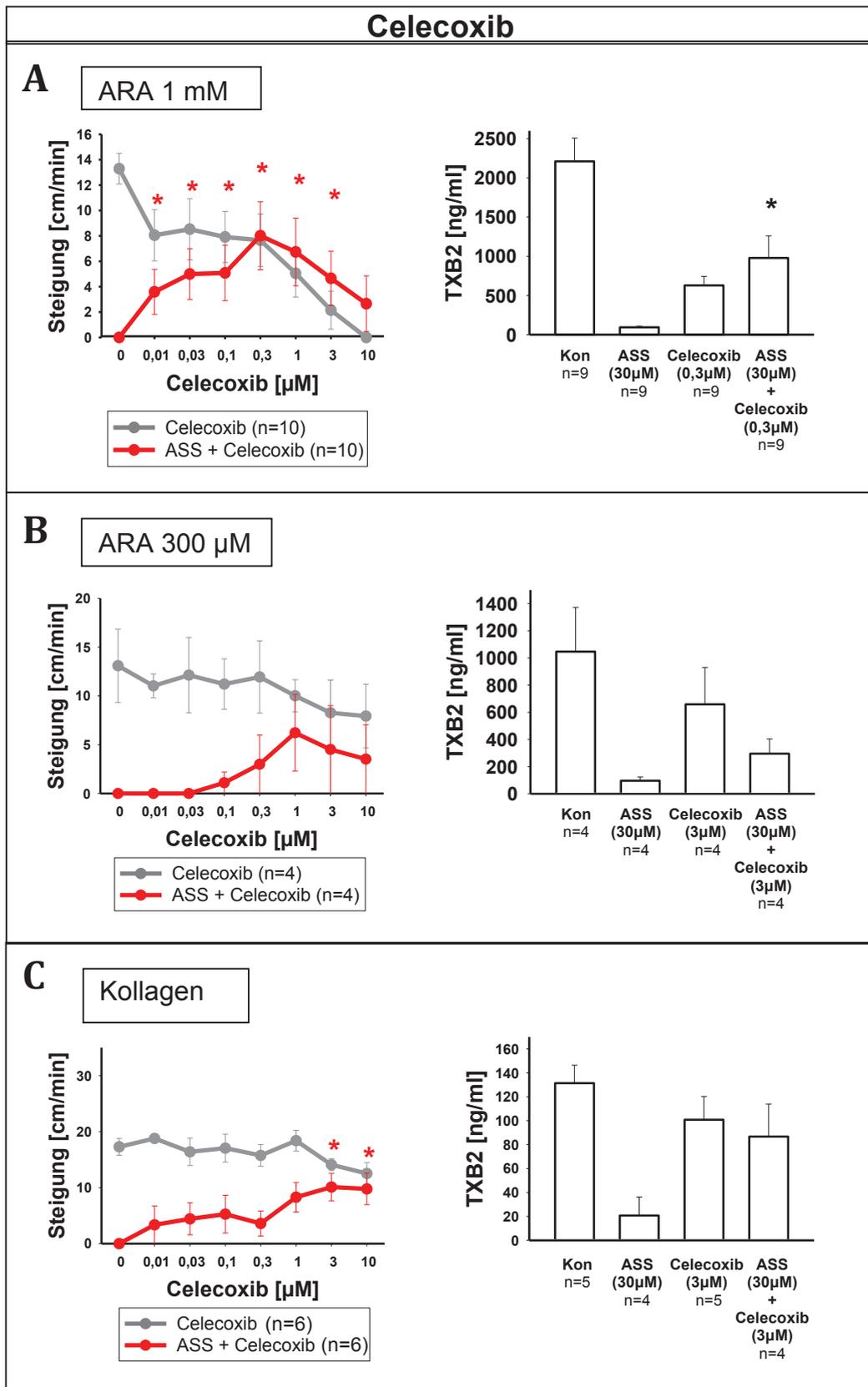


Abbildung 19:

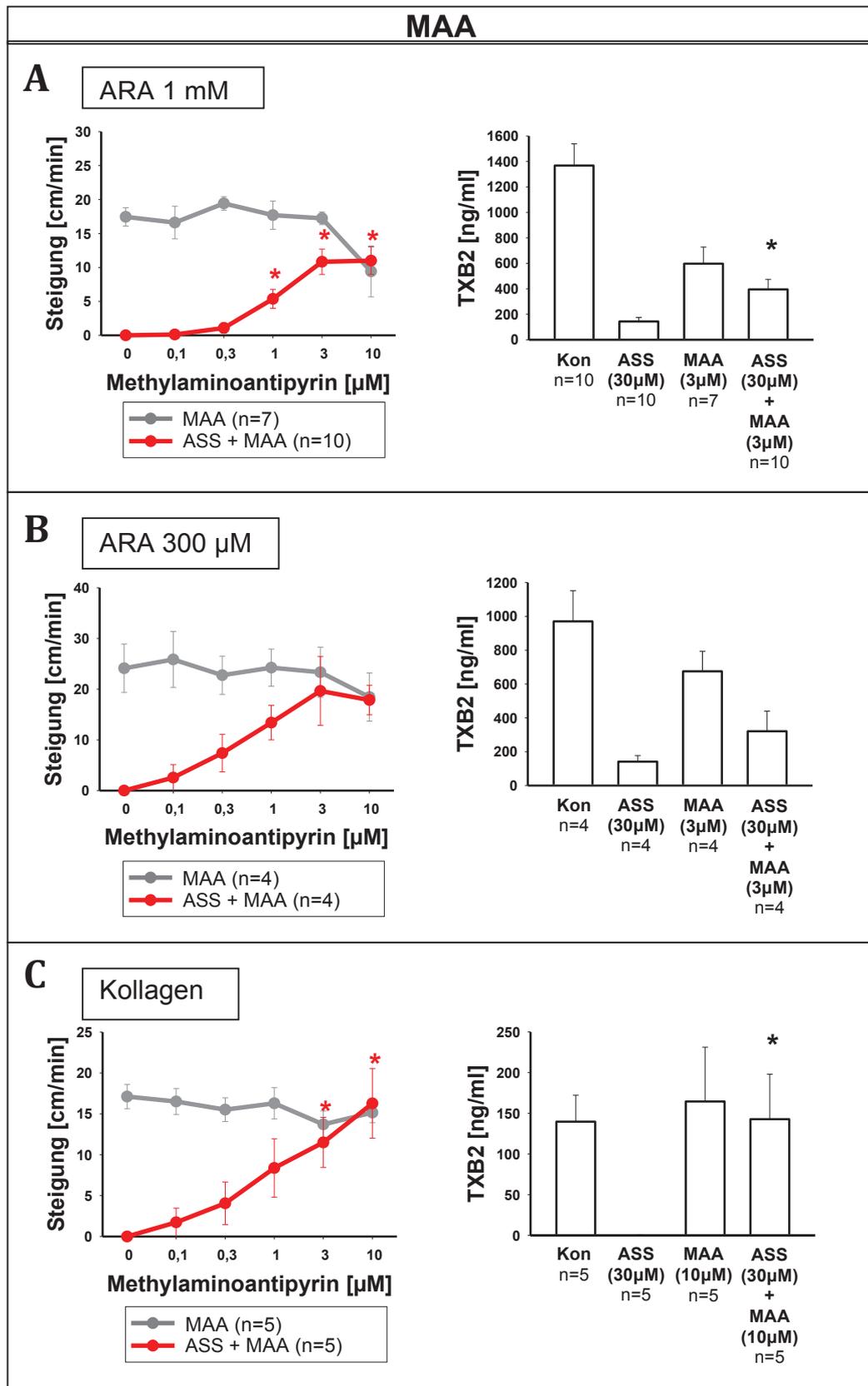
Thrombozytenaggregation *in vitro* nach Stimulation mit ARA (A: 1 mM; B: 300 µM) bzw. Kollagen (C: 2-6 µg/ml, s. Methodik). Linke Seite: Konzentrationsabhängige Hemmung der Aggregation durch Celecoxib allein (graue Kurven) und Effekt von Celecoxib in Gegenwart von 30 µM ASS (rote Kurven). Rechte Seite: Thrombozytäre Thromboxansynthese unter den angegebenen Versuchsbedingungen. KON: Kontrolle ohne Inhibitor. * p<0,05 vs. Celecoxib (0 µM) + ASS (30 µM). Die Hemmung der Aggregation durch Celecoxib allein

(graue Kurven) und die Hemmung der thrombozytären Thromboxansynthese durch ASS allein war statistisch signifikant, wurde der Übersichtlichkeit halber aber nicht markiert.

3.2.2 Methyraminoantipyrin (MAA)

Auch bei der Versuchsreihe mit MAA bewirkte ASS allein in einer Konzentration von 30 μM in Gegenwart von ARA 1 mM, ARA 300 μM oder Kollagen (0,5-4 $\mu\text{g/ml}$) eine vollständige Hemmung der Thrombozytenaggregation (Abb. 20A-C, rote Kurven). Bei der gleichzeitigen Hinzugabe von ASS und MAA zum PRP bei einer ARA-Konzentration von 1 mM und MAA-Konzentrationen $\geq 0,3 \mu\text{M}$ kam es zu einer deutlichen Beeinträchtigung der Hemmung durch ASS (Abb. 20A, rote Kurve). Diese war bei MAA-Konzentrationen $\geq 1 \mu\text{M}$ statistisch signifikant. Auch hier bestätigten die Ergebnisse das Modell. Diese Interaktion nahm mit Erhöhung der MAA-Konzentration zu, mit maximaler Thrombozytenaktivität bei 3-10 μM MAA. Bei ARA-Konzentrationen von 300 μM wurde diese Interaktion schon ab einer MAA-Konzentration von 0,1 μM beobachtet, erreichte ein Maximum bei 3 μM MAA und fiel bei höheren MAA-Konzentrationen entsprechend der Vorhersagen des Modells wieder ab (Abb. 20B, rote Kurve). Insofern deutet sich auch hier eine glockenförmige Konzentrationskurve an, auch wenn der vorab gewählte Bereich der MAA-Konzentrationen dies nicht vollständig erfasste. Auch bei der Stimulation mit Kollagen ergab sich bei allen untersuchten MAA-Konzentrationen eine erhebliche Interaktion, die bei 10 μM MAA die Hemmung durch ASS vollständig aufhob (Abb. 20C, rote Kurve). MAA alleine führte sowohl bei der Stimulation mit ARA 300 μM , ARA 1 mM und Kollagen nur zu einer tendenziellen, nicht signifikanten Hemmung der Aggregation (Abb. 20A-C, graue Kurven).

ASS allein hemmte die thrombozytäre Thromboxansynthese nach Stimulation mit sowohl ARA als auch Kollagen vollständig (Abb. 20A-C). Wie bei der Aggregation, resultierten auch hier MAA und ASS zusammen in einer deutlichen Thromboxanbildung, die bei den Versuchsreihen mit ARA (300 μM und 1 mM) statistisch signifikant war. Die Versuche mit Kollagen bestätigten auch hier die Interaktion, die zuvor mit ARA gezeigt werden konnten. Entsprechend der Versuchsreihe mit Celecoxib zeigten sich auch bei MAA Interaktionen mit ASS – sowohl bei der Hemmung der Thrombozytenaggregation als auch bei der Hemmung der Thromboxansynthese.



C Kollagen

| Methylaminoantipyrin [µM] | MAA (n=5) | ASS + MAA (n=5) |
|---------------------------|-----------|-----------------|
| 0 | 17 | 0 |
| 0,1 | 16 | 2 |
| 0,3 | 15 | 4 |
| 1 | 16 | 8 |
| 3 | 14 | 12* |
| 10 | 15 | 15* |

| Group | n | TXB2 [ng/ml] |
|-------------------------|---|--------------|
| Kon | 5 | 140 |
| ASS (30µM) | 5 | 140 |
| MAA (10µM) | 5 | 165 |
| ASS (30µM) + MAA (10µM) | 5 | 145* |

Abbildung 20:

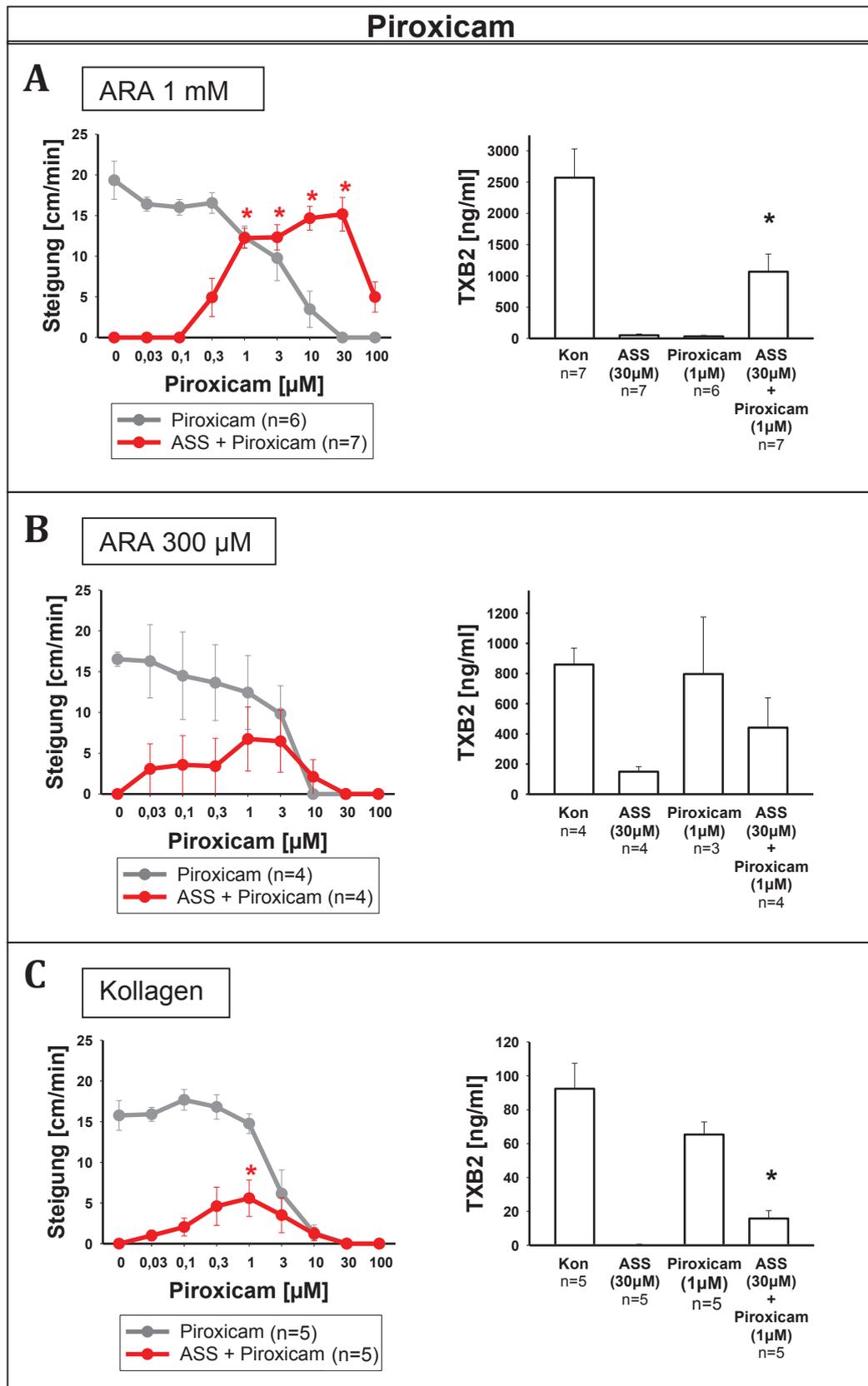
Thrombozytenaggregation *in vitro* nach Stimulation mit ARA (A: 1 mM; B: 300 µM) bzw. Kollagen (C: 0,5-4 µg/ml, s. Methodik). Linke Seite: Konzentrationsabhängige Hemmung der Aggregation durch MAA allein (graue Kurven) und Effekt von MAA in Gegenwart von 30 µM ASS (rote Kurven). Rechte Seite: Thrombozytäre Thromboxansynthese unter den angegebenen Versuchsbedingungen. KON: Kontrolle ohne Inhibitor. * $p < 0,05$ vs. MAA (0 µM) + ASS (30 µM). Die Hemmung der Aggregation durch MAA allein (graue Kurven) und

die Hemmung der thrombozytären Thromboxansynthese durch ASS allein war statistisch signifikant, wurde der Übersichtlichkeit halber aber nicht markiert.

3.2.3 Piroxicam

In der Versuchsreihe mit Piroxicam bewirkte 30 μM ASS allein bei Stimulation durch ARA (300 μM und 1 mM) oder Kollagen (1-2 $\mu\text{g/ml}$) eine vollständige Hemmung der Thrombozytenaggregation (Abb. 21A-C, rote Kurve). Bei ASS (30 μM) in Kombination mit Piroxicam ($\geq 0,3$ μM) und Stimulation durch ARA (1 mM) kam es zu einer deutlichen Zunahme der Aggregation im Sinne einer Interaktion, die bei Piroxicam 1-30 μM gegenüber ASS allein statistisch signifikant war (Abb. 21A, rote Kurve). Diese Interaktion war bei 30 μM Piroxicam maximal. Piroxicam allein (Abb. 21A, graue Kurve) hemmte die Thrombozytenaggregation bei einer Konzentration von 10 μM deutlich und ab Konzentrationen von 30 μM vollständig. Bei Stimulation mit 300 μM ARA ergab sich ebenfalls eine deutliche Interaktion mit 30 μM ASS, wobei eine maximale Aggregation bei 3-10 μM Piroxicam auftrat (Abb. 21B, rote Kurve). Piroxicam allein hemmte die Thrombozytenaggregation nach Stimulation durch 300 μM ARA in Konzentrationen ≥ 10 μM (Abb. 21B, graue Kurve). Auch bei Stimulation mit Kollagen interagierte Piroxicam mit der Hemmung durch ASS (Abb. 21C, rote Kurve). Piroxicam allein hemmte auch bei Stimulation mit Kollagen die Aggregation in Konzentrationen ≥ 10 μM (Abb. 21C, graue Kurve). Insofern bestätigen die Aggregationsversuche mit Piroxicam die Ergebnisse der Modellsimulation ebenfalls.

Die thrombozytäre Thromboxansynthese nach Stimulation mit ARA oder Kollagen wurde durch ASS allein (30 μM) nahezu vollständig gehemmt (Abb. 21A-C). Wie bei der Aggregation, resultierten auch hier Piroxicam und ASS zusammen in einer deutlich höheren Thromboxansynthese, was bei 1 mM und 300 μM ARA gegenüber ASS allein statistisch signifikant war. Bei der Versuchsreihe mit Piroxicam ergab sich, ähnlich wie bei Celecoxib und MAA, eine gute Übereinstimmung mit dem Modell, auch hier mit glockenförmiger Konzentrations-Wirkungskurve.



C Kollagen

| Piroxicam [µM] | Piroxicam (n=5) | ASS + Piroxicam (n=5) |
|----------------|-----------------|-----------------------|
| 0 | 15 | 0 |
| 0,03 | 15 | 1 |
| 0,1 | 17 | 2 |
| 0,3 | 16 | 4 |
| 1 | 14 | 5* |
| 3 | 6 | 3 |
| 10 | 0 | 1 |
| 30 | 0 | 0 |
| 100 | 0 | 0 |

| Group | TXB2 [ng/ml] |
|------------------------------------|--------------|
| Kon (n=5) | 90 |
| ASS (30µM) (n=5) | 10 |
| Piroxicam (1µM) (n=5) | 65 |
| ASS (30µM) + Piroxicam (1µM) (n=5) | 15* |

Abbildung 21:

Thrombozytenaggregation *in vitro* nach Stimulation mit ARA (A: 1 mM; B: 300 µM) bzw. Kollagen (C: 1-2 µg/ml, s. Methodik). Linke Seite: Konzentrationsabhängige Hemmung der Aggregation durch Piroxicam allein (graue Kurven) und Effekt von Piroxicam in Gegenwart von 30 µM ASS (rote Kurven). Rechte Seite: Thrombozytäre Thromboxansynthese unter den angegebenen Versuchsbedingungen. KON: Kontrolle ohne Inhibitor. * p<0,05 vs. Piroxicam (0 µM) + ASS (30 µM). Die Hemmung der Aggregation durch Piroxicam allein

(graue Kurven) und die Hemmung der thrombozytären Thromboxansynthese durch ASS allein war statistisch signifikant, wurde der Übersichtlichkeit halber aber nicht markiert.

3.2.4 SC-560

Im Gegensatz zu Celecoxib, Piroxicam und MAA zeigte der hoch affine und selektive COX-1-Inhibitor SC-560 eine vollständige Aggregationshemmung bei allen Konzentrationen in Kombination mit ASS 30 μM , sowohl bei der Versuchsreihe mit 1 mM als auch 300 μM ARA (Abb. 22A-B, rote Kurven) (Long et al., 2010). SC-560 allein hemmte die Thrombozytenaggregation bei Konzentrationen von 0,3 - 1 μM (Abb. 22A-B, graue Kurven). SC-560 und ASS interagierten also nicht und die Thrombozytenaggregationshemmung blieb auch bei kombinierter Zugabe von SC-560 und ASS zum PRP vollständig erhalten.

Auch bei der thrombozytären Thromboxansynthese nach Stimulation mit 300 μM und 1 mM ARA ergab sich eine vollständige Hemmung durch ASS allein (Abb. 22A-B). Wie bei der Aggregation, blieb auch bei kombinierter Zugabe von ASS und SC-560 die Thromboxansynthese vollständig gehemmt. Von den in dieser Arbeit untersuchten NSAIDs weist SC-560 die höchste Affinität auf. Zugleich war dies die einzige Substanz, die nicht mit ASS interagierte und somit nicht die ASS-Wirkung beeinträchtigte. Da mit SC-560 bei der Aktivierung durch exogene ARA keine Interaktion mit ASS nachweisbar war, wurde auf ergänzende Versuche mit Kollagen verzichtet.

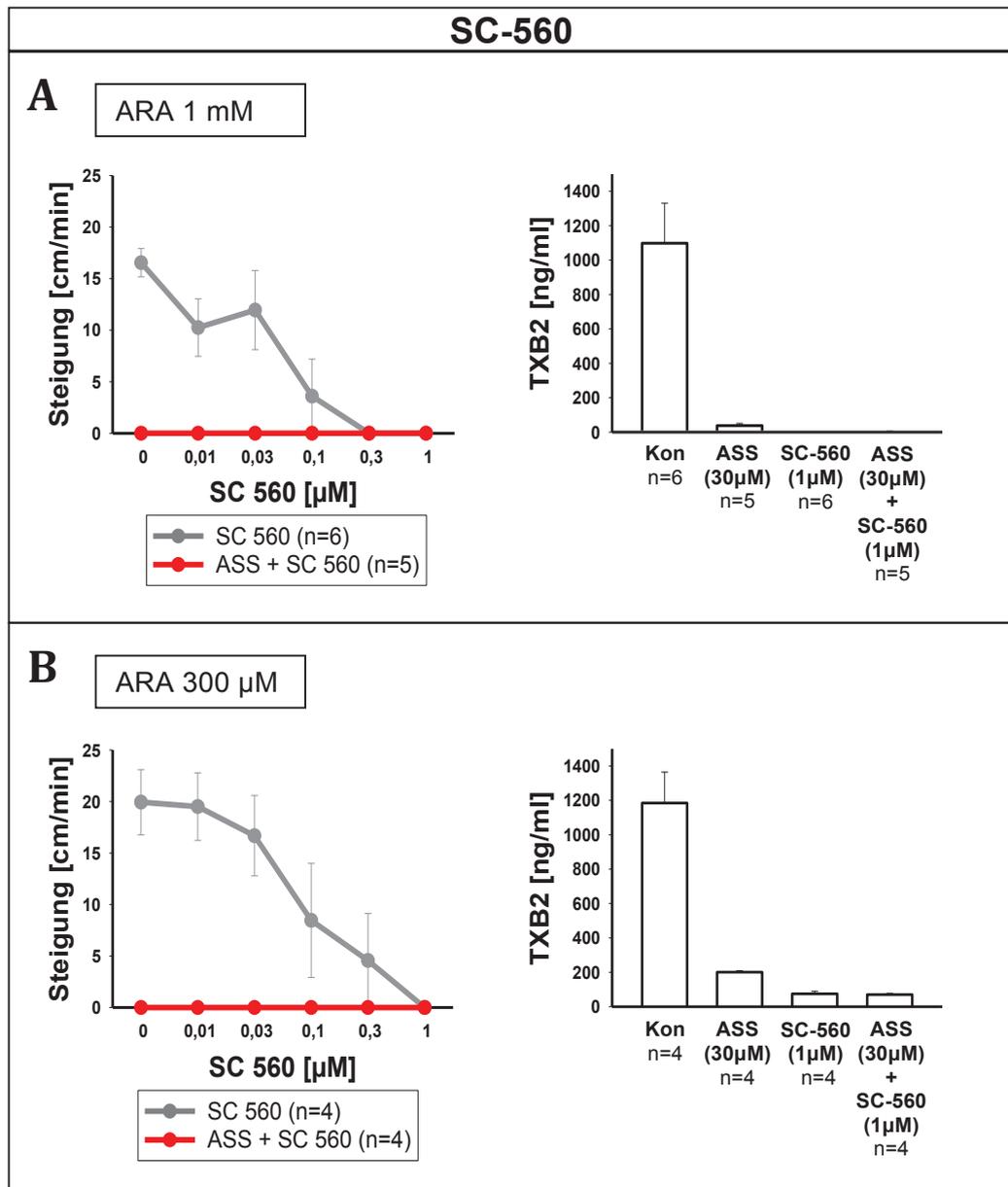


Abbildung 22:

Thrombozytenaggregation *in vitro* nach Stimulation mit ARA (A: 1 mM; B: 300 μM). Linke Seite: Konzentrationsabhängige Hemmung der Aggregation durch SC-560 allein (graue Kurven) und Effekt von SC-560 in Gegenwart von 30 μM ASS (rote Kurven). Rechte Seite: Thrombozytäre Thromboxansynthese unter den angegebenen Versuchsbedingungen. KON: Kontrolle ohne Inhibitor. * $p < 0,05$ vs. SC-560 (0 μM) + ASS (30 μM). Die Hemmung der Aggregation durch SC-560 allein (graue Kurven) und die Hemmung der thrombozytären Thromboxansynthese durch ASS allein war statistisch signifikant, wurde der Übersichtlichkeit halber aber nicht markiert.

3.2.5 Zusammenfassung der experimentellen Ergebnisse und Vergleich mit den Ergebnissen der Simulation

Sowohl die mathematische Simulation als auch die experimentelle Überprüfung zeigten insofern vergleichbare Ergebnisse, als dass es bei ASS und NSAIDs zu deutlicher Interaktion im Sinne einer verminderten Hemmung von Aggregation und Thromboxansynthese durch ASS in Gegenwart von NSAIDs kam.

Zusammenfassend hing die Interaktion von den folgenden drei Faktoren ab:

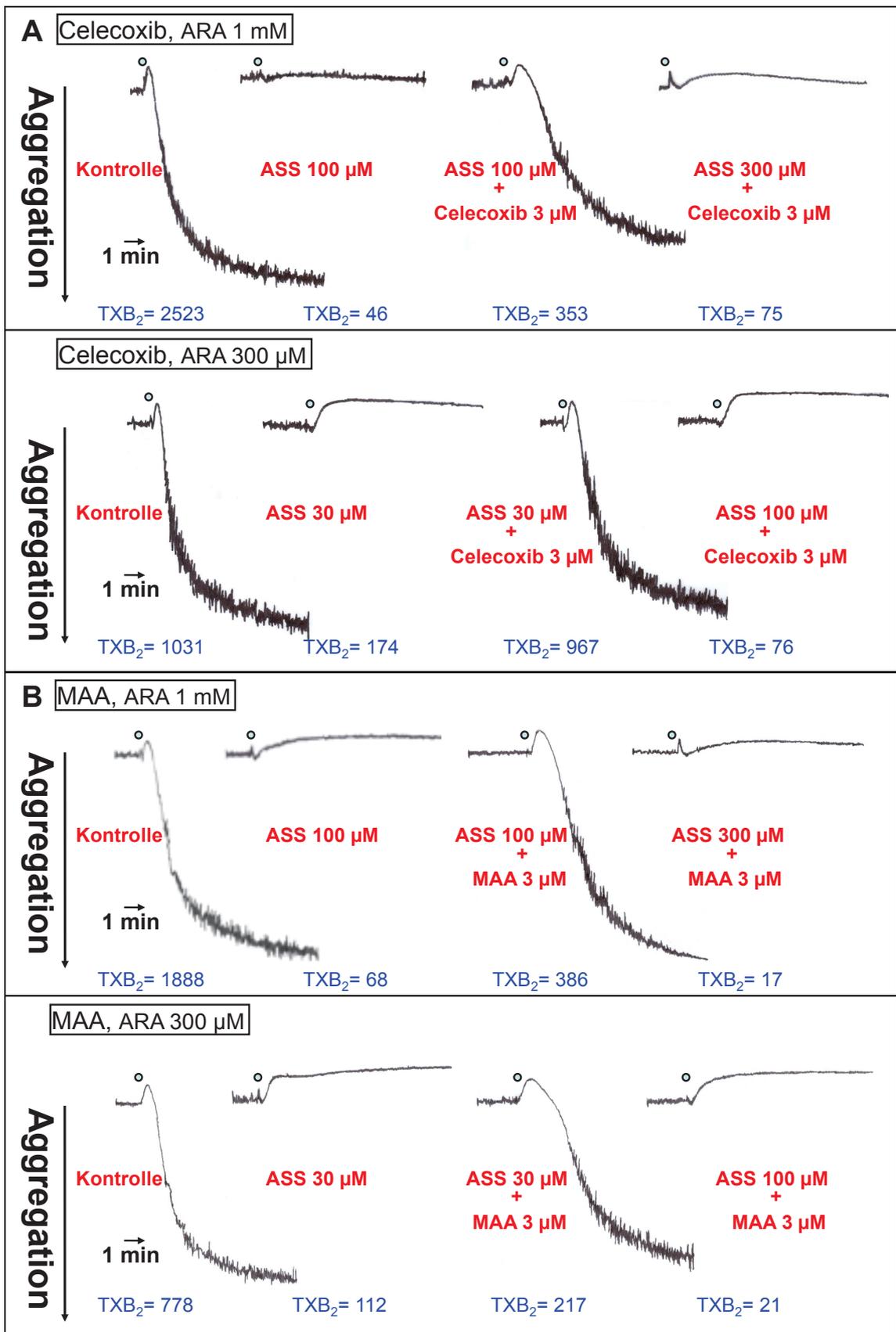
1. Die Konzentration des NSAID beeinflusste das Ausmaß der Interaktion an der COX. Bei niedrigen und hohen NSAID-Konzentrationen fiel die Interaktion geringer aus. Bei mittleren (und klinisch eher zu erwartenden) NSAID-Konzentrationen kam es zu HAPR. Dies zeigten die Konzentrations-Wirkungskurven von Celecoxib, MAA und Piroxicam bei der Thrombozytenstimulation sowohl mit ARA als auch mit Kollagen (Abb. 19-21).
2. Weiterhin ergab sich bei höherer Konzentration der ARA (1 mM) eine stärkere Interaktion. Dies zeigten vor allem die experimentellen Ergebnisse mit Celecoxib und Piroxicam (Abb. 19A-B; 21A-B). Bei niedrigen ARA-Konzentrationen blieb die COX auch bei kombinierter Gabe von ASS mit NSAID nahezu gehemmt (Abb. 18B).
3. Der dritte Faktor, der sowohl in der Simulation als auch im experimentellen Teil die Interaktion stark beeinflusste, war die Affinität des NSAID zur COX. Bei sehr hoher Affinität (SC-560) wurde, entsprechend der Simulation, überhaupt keine Interaktion beobachtet, d.h. die COX blieb durch ASS auch in Gegenwart dieses COX-Inhibitors vollständig gehemmt (Abb. 16, 17, 18C, 22). NSAIDs mit geringerer Affinität (Piroxicam, MAA, Celecoxib) zeigten dagegen ausgeprägte Interaktionen mit ASS und führten zu einer unzureichenden Hemmung der COX durch ASS (Abb. 12-21).

3.2.6 Experimentelle Untersuchung zur Aufhebung der Interaktion bei Erhöhung der ASS-Konzentration

Eine weitere Fragestellung der Arbeit war, ob die Interaktion zwischen NSAIDs und ASS bei Erhöhung der ASS-Konzentration aufgehoben werden kann. In den Ergebnissen der Simulation am Computermodell wurde deutlich, dass je höher die ASS-Konzentration war, desto geringer die COX-Aktivität war. Da die bisher dargestellten Experimente mit jeweils einer einzigen ASS-Konzentration (30 μM) durchgeführt wurden, wurde dieser Fragestellung in einem gesonderten Ansatz nachgegangen. Dazu wurde jeweils Celecoxib, MAA oder Piroxicam mit einer Konzentration von 3 μM bei Stimulation mit ARA 1 mM bzw. 300 μM in Kombination mit unterschiedlichen ASS-Konzentrationen (30 μM , 100 μM , 300 μM) an PRP eines Spenders untersucht. Hier wurden lediglich Einzelversuche durchgeführt, da hier zunächst nur orientierend das Konzept der Überwindung der Interaktion überprüft werden sollte. In einer Nachfolgestudie (außerhalb dieser Dissertation) soll dieser Aspekt detaillierter untersucht werden. Mit SC-560 wurden diese Experimente nicht durchgeführt, da bei dieser Substanz keine Interaktion mit ASS beobachtet wurde (s. 3.2.4).

Alle Versuche mit ARA 300 μM und den drei NSAIDs Celecoxib, MAA und Piroxicam verliefen vom Ergebnis her vergleichbar (Abb. 23A-C). ASS erreichte immer eine vollständige Hemmung der Aggregation. In Gegenwart von 30 μM ASS und 3 μM jedes der untersuchten NSAIDs kam es zur Thrombozytenaggregation im Sinne der vorausgehend gezeigten Interaktion. Wurde jedoch die ASS-Konzentration erhöht (von 30 auf 100 μM), war auch in Kombination mit dem NSAID die Thrombozytenaggregation wieder vollständig gehemmt.

Die Experimente mit 1 mM ARA und jeweils Celecoxib, MAA und Piroxicam verliefen entsprechend (Abb. 23A-C). Hier erreichte ASS in einer Konzentration von 100 μM eine vollständige Thrombozytenfunktionshemmung, die wiederum durch jeweils 3 μM der gewählten NSAIDs weitgehend aufgehoben wurde. Eine Erhöhung der ASS-Konzentration von 100 μM auf 300 μM erzielte jedoch auch hier wieder eine vollständige Hemmung der Thrombozytenaggregation. Unabhängig von der gewählten Konzentration von ARA (300 μM oder 1 mM) führte eine Erhöhung der ASS-Konzentrationen zur effektiven Hemmung der Thrombozytenaggregation. Auch in diesem Punkt wurde insofern das Ergebnis der Simulation bestätigt.



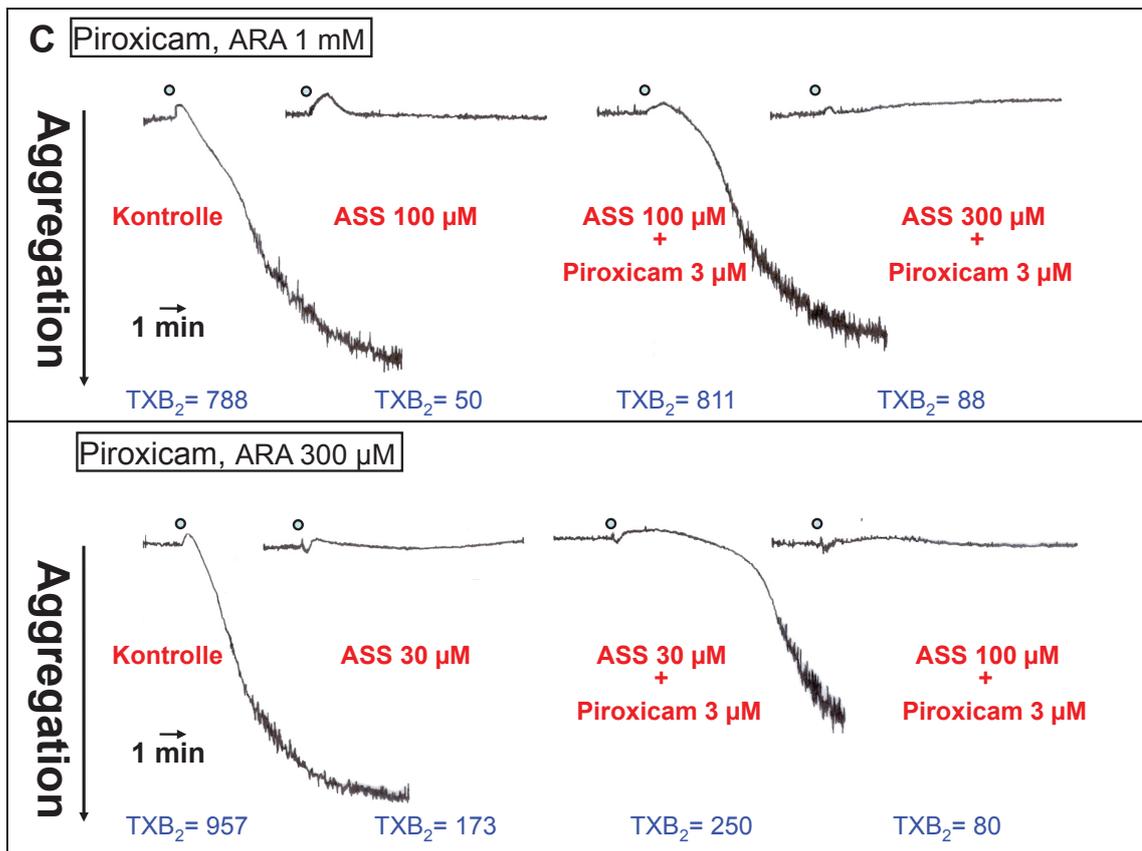


Abb. 23:

Originalkurven der Thrombozytenaggregation an PRP eines gesunden Spenders nach Zugabe unterschiedlicher Konzentrationen von Celecoxib (A), MAA (B), Piroxicam (C) und Stimulation mit ARA (300 µM bzw. 1 mM) in Kombination mit ASS (30 µM, 100 µM, 300 µM). Die im PRP nach Ablauf der Aggregation bestimmten Thromboxankonzentrationen (TXB₂, ng/ml) sind unterhalb der Originalregistrierungen angegeben.

Zusammenfassung:

Die Interaktion von ASS mit NSAIDs konnte bei Erhöhung der ASS-Konzentration aufgehoben werden (Abb. 23). Der Vergleich zwischen den Versuchen mit den zwei verschiedenen ARA-Konzentrationen zeigt, dass bei höheren ARA-Konzentrationen höhere ASS-Konzentrationen zur Thrombozytenhemmung benötigt wurden und dass bei höheren ARA-Konzentrationen daher auch höhere ASS-Konzentrationen zur Aufhebung der Interaktion nötig waren. Die Interaktion von ASS mit anderen NSAIDs hing somit stark von der ARA-Konzentration ab. Diese Ergebnisse bestätigten wiederum die in der mathematischen Simulation ermittelten Ergebnisse (Abb. 18B). Die Anpassung der ASS-Dosis muss also ARA-konzentrationsabhängig erfolgen.

4. Diskussion

Wie im Ergebnisteil dieser Arbeit dargestellt, bestätigten die experimentellen Resultate die mit dem mathematischen Modell simulierten Vorhersagen.

Die wichtigsten Ergebnisse kann man wie folgt zusammenfassen:

- Die kombinierte Inkubation von verschiedenen NSAIDs und ASS kann zu einer Interaktion und somit zur Aufhebung der ASS-Wirkung und zu HAPR führen.
- Verschiedene NSAIDs interagieren unterschiedlich stark mit ASS (Piroxicam, Celecoxib, MAA), einige interagieren hingegen nicht (SC-560), sodass man nicht von einem Klassenphänomen aller NSAIDs ausgehen kann.
- Die Interaktion zwischen NSAIDs und ASS wird hinsichtlich der Hemmung der Thrombozytenfunktion durch die Konzentration der Wirkstoffe (ASS und Nicht-ASS-NSAIDs), der Konzentration des physiologischen Substrats (ARA), und der NSAID-Affinität zur COX-1 beeinflusst. Dabei findet man stärkere Interaktionen bei mittleren NSAID-Konzentrationen, höheren ARA-Konzentrationen und niedrigeren NSAID-Affinitäten zur COX-1.
- Das mathematische enzymkinetische Modell, das auf einem kompetitiven Mechanismus an der COX-1 beruht, konnte experimentell verifiziert werden. Die Medikamenteninteraktion kann insofern durch einen kompetitiven Antagonismus an der COX-1 erklärt werden.
- Eine Erhöhung der ASS-Konzentration kann die Interaktion mit NSAIDs überwinden.

Im Folgenden werden diese Ergebnisse im Detail diskutiert und mit anderen Untersuchungen verglichen.

4.1 Vergleich des mathematisch enzymkinetischen Modells mit anderen pharmakodynamischen Modellen zur Beschreibung der Medikamenteninteraktion an der COX-1

Cyclooxygenasen sind intensiv untersuchte Enzyme, da sie für Hämostase, Schmerz, Inflammation und insbesondere in der Pathophysiologie kardiovaskulärer Erkrankungen eine erhebliche Bedeutung haben. Es überrascht daher nicht, dass Modelle, die die Medikamenteninteraktion an der COX beschreiben, auch von anderen Arbeitsgruppen entwickelt wurden.

Goltsov et al. stellten ein sehr differenziertes enzymkinetisches Modell auf, das zum einen die Wirkung eines NSAIDs an der COX und zum anderen die kombinierte Wirkung von zwei NSAIDs an der COX beschreiben sollte (Goltsov et al., 2009). Die Analyse konzentrierte sich auf ASS und Celecoxib. Die Autoren stellten fest, dass Celecoxib die COX-hemmende Wirkung von ASS vermindern oder sogar ganz aufheben kann, besonders ausgeprägt bei Celecoxib-Konzentrationen von 1- 50 μM mit dem Maximum der Interaktion bei einer Konzentration von 10 μM (nur noch 10%-ige Inhibition der COX durch ASS). Bei höheren sowie bei niedrigeren Celecoxib-Konzentrationen wurde analog zum Modell dieser Dissertation eine relativ unbeeinträchtigte COX-Hemmung durch ASS vorgefunden. Die unbeeinträchtigte COX-Hemmung bei hohen Celecoxib-Konzentrationen (10 - 100 μM) wurde von den Autoren damit erklärt, dass Celecoxib selbst das COX-1 Enzym inhibiert. Eine starke

COX-Hemmung durch ASS bei niedrigen Celecoxib-Konzentrationen ($< 1 \mu\text{M}$) wurde damit begründet, dass die meisten COX-1-Moleküle durch ASS irreversibel acetyliert werden und nicht mehr für die Bindung der ARA zur Verfügung stehen. Im Konzentrationsbereich um $10 \mu\text{M}$ hingegen konkurriert Celecoxib mit der Bindung durch ASS, erlaubt jedoch den Zugang von ARA zum aktiven Zentrum, da diese eine höhere Affinität besitzt. Im Vergleich zu der vorliegenden Arbeit wurden durch die Autoren keine experimentellen Daten erhoben, sondern aus der Literatur entnommen. Weiterhin wurde die Modellierung nur für Celecoxib, aber nicht für andere NSAIDs vorgenommen, so dass die Abhängigkeit der Interaktionen von der NSAID-Affinität weder berechnet noch experimentell untersucht wurde. Es ist aufgrund der unterschiedlichen kinetischen Eigenschaften der verschiedenen NSAID-Klassen wichtig, ein Modell zu entwickeln, das nicht nur für Coxibe anwendbar ist (Hohlfeld, Saxena und Schrör, 2013). Das Modell der vorliegenden Arbeit ist andererseits stärker vereinfacht, was aber auch ein besseres qualitatives Verständnis ermöglicht.

Eine Untersuchung von Hong et al. beschrieb ein pharmakokinetisches/ pharmakodynamisches Modell zur Interaktion von ASS mit Ibuprofen, welches diese Autoren auch experimentell an zehn gesunden Probanden mithilfe der Vollblutaggregometrie überprüften (Hong et al., 2008). Sie fanden, dass Ibuprofen die Thrombozytenhemmung durch ASS sowohl vor der ASS-Gabe als auch bei gleichzeitiger Gabe mit ASS hemmt. Weiterhin stellten sie fest, dass multiple Ibuprofen-Dosen täglich auch bei der Gabe nach ASS deren Wirkung beeinträchtigen können. Lediglich bei der Applikation einer einzigen Dosis von Ibuprofen nach der ASS-Gabe oder bei einer gelegentlichen dreifachen Dosis von Ibuprofen, zum Beispiel nur einmal wöchentlich, blieb die simulierte Thrombozytenhemmung durch ASS erhalten. Im Vergleich zu unserer Arbeit erfolgten die Versuche ausschließlich mit Aggregometrie und es wurden keine TXB_2 -Messungen durchgeführt, einem sehr spezifischen Biomarker für die COX-Hemmung durch ASS. Wie bei Goltsov et al. wurden auch hier nur Berechnungen für ein einziges NSAID in Kombination mit ASS durchgeführt, so dass auch in dieser Arbeit die Bedeutung verschiedener NSAIDs im Vergleich und die Bedeutung der NSAID-Affinität für die Interaktionen nicht weiter untersucht wurde. Dies wäre jedoch wichtig, um unterscheiden zu können, welche NSAIDs mit ASS interagieren könnten, um auf diese Weise NSAIDs zu identifizieren, die potentiell mit ASS kombinierbar sind ohne die Hemmung der Thrombozytenfunktion zu verlieren. Auch die Bedeutung der ARA-Konzentration wurde in den vorher beschriebenen Modellen nicht analysiert oder experimentell überprüft.

Awa et al. untersuchten auf dem Modell von Hong et al. aufbauend die Abhängigkeit der zeitlichen Verabreichung von ASS und Ibuprofen im Bezug zu ihrer Interaktion an der COX, sowohl bei einzelnen Dosen von Ibuprofen und ASS als auch bei mehreren Dosen beider NSAIDs in verschiedenen zeitlichen Intervallen (Awa et al., 2012). Dabei zeigten die modellierten Resultate, dass bei Ibuprofen weniger als eine Stunde nach der ASS-Verabreichung die thrombozytenhemmende Wirkung von ASS massiv reduziert war. Wurde Ibuprofen jedoch mehr als zwei Stunden nach ASS verabreicht, zeigte das Modell keine Interaktion und die Hemmung der Thrombozytenfunktion durch ASS blieb erhalten. Wurde Ibuprofen bis zu zwölf Stunden vor der ASS-Gabe verabreicht, kam es zu einer vollständigen Aufhebung der hemmenden ASS-Wirkung. Selbst bei einer Ibuprofen-Gabe von 18 bis 24 h vor der ASS-Gabe, war die ASS-Wirkung reduziert. Wurde Ibuprofen (200 mg) drei Tage lang dreimal täglich in fünf Stunden-Intervallen mit niedrig-dosierter ASS zwei Stunden nach der ASS-Gabe verabreicht, so kam es erst ab dem zweiten Tag zu einer reduzierten ASS-Wirkung, die auch anhielt. Erst drei Tage nach der Einstellung des Ibuprofens wurde wieder eine vollständige

Thrombozytenaggregationshemmung durch ASS festgestellt. Damit konnte gezeigt werden, dass die Auswirkung von Ibuprofen auf die ASS-Wirkung noch bis zur nächsten ASS-Dosis am darauffolgenden Tag anhält und diese beeinträchtigen und sogar vollständig aufheben kann. Die Empfehlung der Autoren war, bei gleichzeitiger Einnahme von ASS anstelle von Ibuprofen andere NSAIDs wie Diclofenac oder Paracetamol zu verwenden, da diese weniger oder nicht interagieren würden. Allerdings wurde keines dieser NSAIDs von den Autoren selbst untersucht. Sie fügten jedoch hinzu, dass die kinetischen Parameter anderer NSAIDs sich unterscheiden und daher ebenfalls untersucht werden sollten. Ähnliche Ergebnisse erzielten auch Catella-Lawson et al., die zeigen konnten, dass eine multiple Gabe von Ibuprofen, sowie eine Einzeldosis von Ibuprofen zwei Stunden vor der Verabreichung von ASS, im Gegensatz zur Ibuprofen-Gabe nach ASS zu einer Interaktion führte (Catella-Lawson et al., 2001).

Tien et al. entwickelten ein enzymkinetisches Modell für den autokatalytischen COX-1-Synthesemechanismus zur Beschreibung der Regulation der COX-1-Aktivität, gingen jedoch nicht auf Medikamenteninteraktionen an der COX ein (Tien et al., 2005).

4.2 Pharmakologischer Mechanismus der Medikamenteninteraktion an der COX-1

In der Literatur gibt es sehr uneinheitliche Hypothesen zum Mechanismus der Medikamenteninteraktion an der COX. Dabei sind zwei grundsätzlich unterschiedliche Konzepte zu unterscheiden:

1. einen kompetitiven Antagonismus von NSAID und ASS an der COX-1 (Abb. 24)
2. nicht-kompetitive Mechanismen (z.B. *Cross-Talk*) (Abb. 25).

Da die Ergebnisse des mathematischen Modells in der vorliegenden Arbeit, das auf einem kompetitiven Mechanismus der Arzneimittelinteraktion basiert, durch die experimentellen *in vitro*-Versuche bestätigt werden konnten, liegt es nahe, von einem kompetitiven Antagonismus von NSAID, ASS und dem physiologischen Substrat ARA an der COX-1 auszugehen (Abb. 24). Die vorher erläuterten enzymkinetischen Modelle gingen ebenfalls von einem kompetitiven Antagonismus aus und erzielten ebenfalls realistische experimentelle Resultate (Goltsov et al., 2009; Hong et al., 2008; Awa et al., 2012; Pouplana, Lozano und Ruiz, 2002). Diese Autoren gingen davon aus, dass beim kompetitiven Antagonismus NSAIDs an Aminosäuren im hydrophoben Kanal der COX-1 binden und dadurch mit der ASS-Bindung konkurrieren (Llorens et al., 1999; Selinsky et al., 2001; Hohlfeld, Saxena und Schrör, 2013). Weiterhin zeigen sowohl die mathematischen als auch experimentellen Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass durch Erhöhung der ASS-Konzentration die Interaktion überwunden werden kann, was auch für einen kompetitiven Antagonismus spricht. Hinweise darauf äußerten auch Hohlfeld et al. (Hohlfeld et al., 2008). Eine aktuelle Untersuchung der eigenen Arbeitsgruppe beschrieb kürzlich, dass es unter verschiedenen NSAID-Klassen große pharmakodynamische Unterschiede bezüglich ihrer Interaktion mit ASS gibt (Saxena et al., 2013). Die meisten NSAIDs scheinen dabei reversibel entweder direkt am aktiven Zentrum der COX oder im hydrophoben Kanal des Enzyms zu binden und letztendlich könnte das Andocken an verschiedenen Aminosäuren im hydrophoben Kanal ausschlaggebend dafür sein, ob und in welchem Ausmaß ein NSAID mit ASS interagieren würde. Insbesondere Arg 120, Tyr 355 und Ser 530, welches an seinem Hydroxylrest durch ASS acetyliert wird, sollen bei den Interaktionen eine große Rolle

zukommen, und NSAIDs, die mit Seitenketten dieser Aminosäuren Wasserstoffbrückenbindungen eingehen, scheinen auf diese Weise die ASS-Wirkung zu verhindern. Saxena et al. gehen nicht davon aus, dass ihre Ergebnisse die Theorie des *Cross-Talk*-Mechanismus (siehe unten) ausschließen. Eine enzymkinetische Modellierung des *Cross-Talks* ist derzeit allerdings nicht möglich, da dieser Mechanismus zu wenig charakterisiert ist und insofern die Parameter für Modellrechnungen fehlen.

Die Theorien der nicht-kompetitiven Medikamenteninteraktion beruhen hauptsächlich auf einen sogenannten *Cross-Talk*-Mechanismus (Abb. 25). Der Theorie des *Cross-Talk*-Mechanismus liegt zugrunde, dass nur eine der zwei identischen Untereinheiten der COX katalytisch aktiv ist, während die andere eine regulatorische Funktion besitzt (Yuan et al., 2006; Prusakiewicz et al., 2009). Sidhu et al. beschrieben, dass einige NSAIDs die COX hemmen in dem sie nur an einer Untereinheit binden (Sidhu et al., 2010). Diese Untereinheit würde dann zur allosterischen Untereinheit werden und die zweite Untereinheit zur katalytischen. Die Wirksamkeit der katalytischen Untereinheit würde durch die allosterische Untereinheit reguliert werden, abhängig davon welcher Ligand an der allosterischen Untereinheit gebunden ist. Einige Liganden würden die Aktivität der katalytischen Untereinheit erhöhen, andere eher erniedrigen und manche Liganden würden die Katalyse gar nicht beeinflussen. Weiterhin wird diskutiert, dass zeitabhängige COX-Hemmer sowie COX-2-selektive Inhibitoren nur an der allosterischen Untereinheit binden, wo hingegen reversibel und kompetitiv bindende NSAIDs wie Ibuprofen an sowohl der allosterischen als auch der katalytischen Untereinheit binden müssen (Prusakiewicz et al., 2009; Yuan et al., 2009; Sidhu et al., 2010). Andere Arbeitsgruppen vermuteten, dass einige NSAIDs über die regulatorische Untereinheit einen nicht-kompetitiven Antagonismus ausüben, während andere NSAIDs die COX kompetitiv am katalytischen Zentrum inhibierten (Smith, Urade und Jakobsson, 2011). Rimon et al. untersuchten die Interaktion von ASS mit Celecoxib sowohl anhand genauer kristallographischer Messungen als auch tierexperimentell und beschrieben, dass die Bindung eines NSAID an einer Untereinheit der COX eine Konformationsänderung der zweiten, katalytisch aktiven Untereinheit bewirkt, so dass ihre Hemmung durch ASS verlangsamt oder behindert wird (Rimon et al., 2010). Generell sei auch immer nur eine der zwei Untereinheiten katalytisch aktiv, welches als *half-of-the-sites reactivity* bezeichnet wurde (Yuan et al., 2006). Rimon et al. bestätigten durch kristallographische Analysen, dass nur eine COX-Untereinheit während der Katalyse aktiv ist und zeigten, dass viele NSAIDs, besonders zeitabhängige COX-Hemmer (wie Diclofenac), mit der Bindung an nur einer Untereinheit das komplette Enzym hemmen würden (Rimon et al., 2010). Zwar soll Celecoxib mit der Bindung an einer Untereinheit nicht die Umsetzung von ARA durch die zweite Untereinheit beeinträchtigen, jedoch die Hemmung der katalytischen Untereinheit durch ASS verhindern. Dies könnte sogar bei sehr niedriger (submikromolarer) Celecoxib-Konzentration auftreten, die per se die COX-1-Aktivität nicht hemmt. Dazu müsse Celecoxib weniger als die Hälfte der verfügbaren COX-Untereinheiten besetzen – hierfür wären Plasmakonzentrationen von ASS und Celecoxib notwendig, die bei üblicher Dosierung auch durchaus vorkommen. Die Analyse der Interaktion von Celecoxib mit der COX-1 führten die Autoren mittels Röntgenkristallographie durch. Im Ergebnis kamen sie zu dem Schluss, dass Celecoxib auch an der COX-1 wirkt und sogar eine höhere Affinität für die allosterische Untereinheit der COX-1 als die der COX-2 aufweist. Wie bereits oben erwähnt, müssen sich die beiden Erklärungsansätze zur Interaktion an der COX nicht zwingend gegenseitig ausschließen.

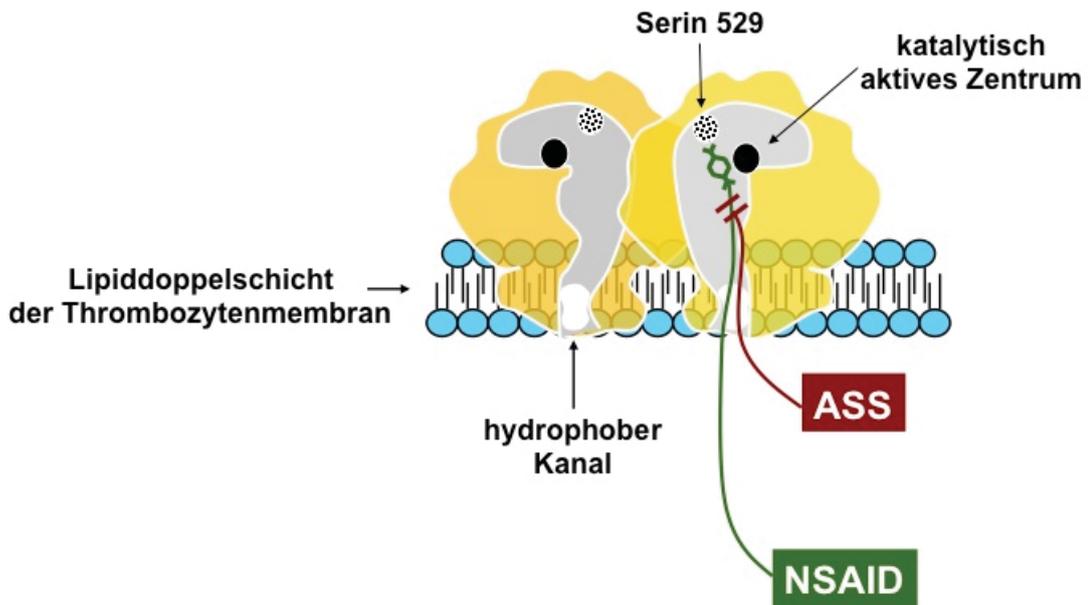


Abb. 24: Kompetitiver Antagonismus zwischen ASS und NSAID an sich überlappenden Bindungsstellen als mögliche Erklärung für die Interaktion von ASS und NSAID an der COX-1.

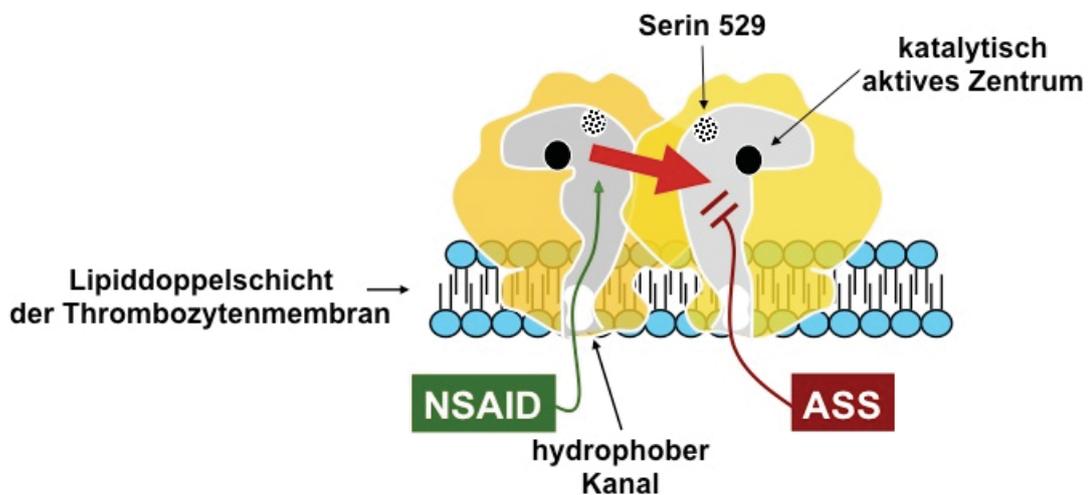


Abb. 25: *Cross-Talk* zwischen den zwei COX-Untereinheiten als weitere mögliche Erklärung für die Interaktion von ASS und einem zweiten NSAID an der COX-1. Die Bindung von NSAID an der allosterischen Untereinheit der COX bewirkt eine Konformationsänderung der zweiten katalytischen Untereinheit, wodurch die Hemmung durch ASS beeinträchtigt wird.

Einige Autoren vermuteten, dass die COX-2 eine Rolle bei den Interaktionen spielen könnte. Dies ist auszuschließen, da bei den hier durchgeführten Experimenten mit dem COX-1-Hemmer ASS sowohl die Thrombozytenaggregation als auch die TXA₂-Synthese zu Beginn nahezu vollständig gehemmt werden konnte und erst bei der Zugabe des zweiten NSAID eine unzureichende COX-Hemmung auftrat. Wäre die COX-2 in Thrombozyten aktiv, hätte keine vollständige Thrombozytenhemmung mit ASS erreicht werden können. Censarek et al. fanden heraus, dass die geringe COX-2-

Expression, die in Thrombozyten nachweisbar war, nicht aktiv zur Thromboxan-synthese beitrug (Censarek et al., 2007).

4.3 Interaktion von ASS mit NSAIDs verschiedener Klassen

NSAIDs zeigen vier verschiedene Arten der COX-1 Hemmung: 1) Kompetitive Hemmung (z.B. Ibuprofen), 2) schwache, zeitabhängige Hemmung (z.B. Naproxen, Oxicam), 3) starke, zeitabhängige Hemmung (z.B. Indomethazin) sowie 4) kovalente Hemmung durch ASS (Gierse et al., 1999). Um zu untersuchen, ob die Interaktion mit ASS nur bei einigen Arten der NSAIDs vorkommt, oder ob alle NSAID-Klassen die ASS-Wirkung beeinträchtigen können, wurden bei der vorliegenden Arbeit vier NSAIDs aus unterschiedlichen chemischen Gruppen ausgewählt. Diese waren Celecoxib, als wenig selektive COX-2-Hemmer aus der Gruppe der Coxibe, Piroxicam als schwacher, zeitabhängiger COX-1-Hemmer aus der Gruppe der Oxicame, Methylaminoantipyrin als Metabolit des Metamizols aus der Gruppe der Pyrazolon-Derivate, und letztlich SC-560, einem hoch affinen COX-1-Hemmer, der als Laborsubstanz eingesetzt wird und mit den Coxiben strukturverwandt ist. Da nicht alle der hier untersuchten NSAIDs mit ASS interagierten, muss man davon ausgehen, dass es sich bei den Interaktionen nicht um ein Klassenphänomen aller NSAIDs handelt, wie auch Saxena et al. und Meek et al. bereits vermuteten (Saxena et al., 2013; Meek et al., 2013). Während Celecoxib, Piroxicam und MAA deutlich die ASS-Wirkung reduzierten, war keine Interaktion von ASS mit SC-560 zu finden. Dabei wurden die Interaktionen nicht nur dann gezeigt, wenn die Thrombozyten durch exogene ARA stimuliert wurden, sondern auch, wenn bei der Kollagen-induzierten Thrombozytenaktivierung endogene ARA freigesetzt wurde (Hohlfeld et al., 2008). Dies verdeutlicht die Bedeutung der Interaktionen auch *in vivo* (Hohlfeld et al., 2008).

Celecoxib

Coxibe als selektive COX-2-Inhibitoren, haben auch eine geringe Affinität zur COX-1 und können diese kompetitiv hemmen. Dies wird nicht nur durch die Experimente und der Modellierung in dieser Arbeit aufgrund der gezeigten Interaktion mit ASS bestätigt, sondern wurde auch schon von Gierse et al. beschrieben (Gierse et al., 1999). Celecoxib ist das am wenigsten COX-2-selektive Coxib (Gladding et al., 2008). Es gibt bereits einige Studien, die die Medikamenteninteraktion von ASS mit Celecoxib untersuchten, jedoch waren ihre Resultate sehr widersprüchlich. Ouellet et al. untersuchten die Interaktion von ASS mit Celecoxib, Valdecoxib, Etoricoxib, und Rofecoxib an isolierten COX-1-Enzymen und anhand von Thrombozytenaggregationen sowie TXB₂-Messungen (Ouellet, Riendeau und Percival, 2001). Sie fanden heraus, dass alle Coxibe die COX-Hemmung durch ASS beeinträchtigen, und zwar Celecoxib mehr als die anderen genannten Coxibe, da es weniger COX-2 selektiv sei. Saxena et al. untersuchten die Interaktion von verschiedenen NSAIDs und ASS *in vitro* bei ARA-induzierten Thrombozytenaggregationen und der Thromboxansynthese und stellten unter anderem auch eine Interaktion von Celecoxib mit ASS fest (Saxena et al., 2013). Docking-Analysen zeigten, dass im Gegensatz zu anderen NSAIDs, die mit ASS interagieren, Celecoxib keine Wasserstoffbrückenbindungen mit Ser530, sondern lediglich mit Tyr355, Ile517 und Ser516 bildete, was auch von der Arbeitsgruppe Rimon et al. beschrieben wurde (Rimon et al., 2010). Es wurde vermutet, dass Celecoxib mit diesen Wasserstoffbrückenbindungen ASS sterisch daran hindert, an das katalytische Zentrum zu gelangen (Saxena et al., 2013). Während auch Goltsov et al. und Rimon et al. von einer pharmakodynamischen Interaktion von ASS und Celecoxib

ausgingen, und einen hypothetischen Mechanismus des *Cross-Talks* beschrieben (siehe oben, Goltsov et al., 2009; Rimon et al., 2010) existieren auch einige Studien, die keine Interaktion von ASS und Celecoxib feststellen konnten (Wilner et al., 2002; Renda et al., 2006; Gladding et al., 2008; Li et al., 2014).

Gladding et al. untersuchten sechs NSAIDs in Kombination mit ASS in einer randomisierten, verblindeten, multiplen Crossover-Studie an 24 gesunden Probanden (Gladding et al., 2008). Zunächst wurde die Thrombozytenfunktion mithilfe des *Platelet Function Analyzers 100* (PFA-100) überprüft. Anschließend wurden drei Dosen eines NSAIDs in zwölf-stündigen Abständen an Probanden verabreicht und zwei Stunden nach der letzten NSAID-Dosis ASS 300 mg gegeben. 24 Stunden später wurde wieder mithilfe des PFA-100 die Thrombozytenfunktion überprüft. Sie stellten fest, dass Ibuprofen 400 mg, Indomethazin 25 mg, Naproxen 550 mg und Tiaprofensäure 300 mg die Wirkung von ASS antagonisieren. Lediglich bei Sulindac 200 mg und Celecoxib 200 mg konnten sie keine Beeinträchtigung der Thrombozytenhemmung durch ASS feststellen, so dass sie diese NSAIDs für die kombinierte Gabe mit ASS empfahlen. Bei dieser Studie wurde die Thromboxanmessung als sensitivste Messung bezüglich der COX-Hemmung durch ASS leider nicht durchgeführt, welches eine mögliche Erklärung dafür sein könnte, dass im Gegensatz zu unseren Resultaten keine Interaktion von Celecoxib und ASS festzustellen war.

Ähnliche Befunde konnten Wilner et al. zeigen. Diese Autoren untersuchten in einer Placebo-kontrollierten Doppelblindstudie mit 16 gesunden Probanden die Fragestellung, ob Celecoxib die Wirkung von ASS auf Thrombozyten beeinträchtigt (Wilner et al., 2002). Die Probanden erhielten über vier Tage entweder Celecoxib 400 mg täglich oder Placebo. Am fünften Tag nahmen sie eine Dosis von ASS 325 mg mit entweder Celecoxib 200 mg oder Placebo ein und das Thromboxan und die Thrombozytenaggregation wurden einmal zu Beginn der Studie als Baseline gemessen, vor der Gabe von Celecoxib am fünften Tag und sowohl zwei als auch acht Stunden nach der letzten Celecoxib-Gabe. Sie konnten keinen Unterschied zwischen Celecoxib und Placebo feststellen bezüglich der Thromboxansynthese und der Thrombozytenaggregation, die von ASS nahezu vollständig gehemmt schienen, so dass sie schlussfolgerten, dass Celecoxib mit ASS kombiniert werden könne. Eine Studie von Renda et al. untersuchte ebenfalls die Interaktion von Celecoxib und ASS 100 mg in 24 Patienten mit Osteoarthritis und ischämischer Herzerkrankung und kam auch zu dem Ergebnis, dass Celecoxib nicht mit ASS interagiert (Renda et al., 2006). Eine mögliche Erklärung dafür, dass COX-2-Inhibitoren nicht mit ASS interagieren, gaben Catella-Lawson et al. Sie vermuteten, dass es damit zusammenhängen würde, dass COX-2-Hemmer an einer Seitentasche (*Side Pocket*) des hydrophoben Kanals binden würden, der nur bei der COX-2 und nicht bei der COX-1 existiert (Catella-Lawson et al., 2001).

Dass COX-2-Hemmer jedoch auch an der COX-1 binden, bewiesen Rimon et al. und widerlegten damit Catella-Lawsons Aussagen (Rimon et al., 2010). Außerdem konnten sowohl wir als auch andere Arbeitsgruppen die Thrombozytenaggregationshemmung durch ASS mit Celecoxib beeinträchtigen – ein Beweis dafür, dass Celecoxib offenbar doch an der COX-1 bindet.

Obwohl die Schlussfolgerungen, ob Celecoxib mit ASS kombiniert werden sollte oder nicht, sehr verschieden sind, bleibt die Frage offen, ob Celecoxib aufgrund der Erhöhung des kardiovaskulären Risikos überhaupt Patienten verabreicht werden darf, die aufgrund eines schon existierenden kardiovaskulären Risikoprofils täglich ASS einnehmen müssen (Fanelli et al., 2013). Es besteht nicht nur die Möglichkeit der

Interaktion mit ASS, die eventuell die kardioprotektive Wirkung von ASS aufhebt, sondern auch kardiovaskuläre Nebenwirkungen der Coxibe selbst sind zu bedenken, die die Einnahme von Coxiben - hier Celecoxib - in Frage stellen (Gislason et al., 2006; Amer et al., 2010). Die Erhöhung des kardiovaskulären Risikos durch Coxibe hängt vermutlich damit zusammen, dass sie durch die COX-2-Hemmung die Synthese von Prostacyclin (Prostaglandin I₂, PGI₂) vermindern, welches antiaggregatorisch wirkt (McAdam et al., 1999; FitzGerald und Patrono, 2001; Baigent und Patrono, 2003). Da Prostacyclin reduziert wird, aber die COX-1-vermittelte TXA₂-Synthese und somit auch die Thrombozytenaggregationen kaum beeinträchtigt werden, kann es so zu thrombotischen Ereignissen kommen (Catella-Lawson et al., 2001; Baigent und Patrono, 2003; Weber et al., 2007). Aus diesem Grund, wurde empfohlen, Coxibe generell in Kombination mit ASS einzunehmen (Patrono et al., 2001), was bei einer möglichen Interaktion dieser NSAIDs andererseits natürlich problematisch wäre. Dennoch haben Coxibe gegenüber nicht-selektiven COX-Hemmern den klaren Vorteil, dass sie weniger gastrointestinale Nebenwirkungen zeigen (Bombardier et al., 2000; Silverstein et al., 2000), so dass man Nutzen und Risiko der Coxibe immer individuell abwägen sollte.

Piroxicam

Saxena et al. untersuchten bereits die Interaktion von ASS und Piroxicam *in vitro* und erhielten Resultate, die eine Aufhebung der ASS-Wirkung zeigten (Saxena et al., 2013). Den hierbei zugrundeliegenden Mechanismus untersuchten sie anhand von Docking-Analysen und fanden heraus, dass Piroxicam Wasserstoffbrücken mit Tyr385 und Ser530 des hydrophoben COX-Kanals bildet und aufgrund dessen wahrscheinlich mit ASS interagiert.

4-Methylaminoantipyrin (aktiver Metabolit des Metamizols)

Hohlfeld et al. zeigten eine Interaktion von ASS mit MAA als aktivem Metaboliten des Metamizols anhand der ARA- und Kollagen-induzierten Thrombozytenaggregationen, der Thromboxansynthese und der P-Selektin Expression (Hohlfeld et al., 2008). Diese Interaktionen waren auch an isolierten COX-1-Enzymen von Thrombozytenmikrosomen nachzuweisen – ein Beleg dafür, dass die Interaktion am COX-Enzym lokalisiert sein muss. Dass MAA die COX-Hemmung durch ASS beeinträchtigen könnte, wurde zuvor nicht vermutet, da Metamizol selbst bisher kaum mit einem erhöhten Blutungsrisiko durch Thrombozytenhemmung in Verbindung gebracht wurde. Docking-Analysen an der COX-1 ergaben, dass MAA mit seinen lipophilen Anteilen die lipophile Tasche des Substratkanals einnimmt, während die Carbonyl-Gruppe der Pyrazolin-Derivate Wasserstoffbrückenbindungen mit Ser530 bildet und wahrscheinlich dadurch die Acetylierung des Serinrests 530 durch ASS verhindert. Auch Tyr355 und Arg120, die mit ASS vor der Acetylierung des Enzyms ein Komplex bilden, sollen laut Hohlfeld et al. von MAA gebunden werden. Interaktionen mit ASS wurden auch bei weiteren Pyrazolin-Derivaten beobachtet, was auch darauf hindeutet, dass die Pyrazolstruktur bei der Interaktion mit ASS an der COX-1 eine wichtige Rolle spielt. Auch Papp et al. zeigten, dass niedrige MAA-Konzentrationen die ASS-Wirkung sowohl *in vitro* als auch *in vivo* aufheben, was von diesen Autoren durch Epinephrin- und Adenosindiphosphat (ADP)-induzierter Thrombozytenaggregation gemessen wurde (Papp et al., 2014). Zum Mechanismus der Interaktion von MAA mit ASS zeigten spätere Docking-Analysen, dass Wasserstoffbrückenbindungen zwischen MAA und Tyr385, Val344 und dem für die Interaktion mit ASS wichtigen Ser530 des COX-Enzyms ausgebildet werden (Saxena et al., 2013).

SC-560

SC-560 ist das hier untersuchte NSAID mit der höchsten COX-1-Affinität und strukturverwandt mit Celecoxib (Supuran und Winum, 2009). Im Vergleich zu den weniger COX-1-affinen NSAIDs Celecoxib, Piroxicam und MAA, beeinträchtigte die Zugabe von SC-560 die Hemmung der Thrombozytenaggregation und der Thromboxan-synthese durch ASS nicht. Dies ist eine weitere Bestätigung der Vorhersagen des in dieser Dissertation entwickelten enzymkinetischen Modells, welches bei hoch affinen COX-Hemmern keine Interaktion mit ASS voraussieht. Eine sorgfältige Recherche in der Literatur ergab keine weiteren Untersuchungen zu Interaktionen von SC-560 und ASS.

4.4 Abhängigkeit der Interaktion mit ASS von den COX-1-Affinitäten der NSAIDs

Nach unserem Kenntnisstand gibt es nur zwei Arbeitsgruppen (Ouellet, Riendeau und Percival, 2001; Meek et al., 2013), die die Interaktionen von NSAIDs mit ASS hinsichtlich der COX-1-Affinitäten der NSAIDs untersucht haben. Ouellet et al. beschrieben, dass eine niedrige Affinität zur COX-1 und eine hohe Selektivität für COX-2 das Risiko einer Interaktion senken würden (Ouellet, Riendeau und Percival, 2001). Diese Aussage steht jedoch im Gegensatz zu den Resultaten der vorliegenden Dissertation, die zeigen, dass weniger affine COX-1-Hemmer (wie Celecoxib) eher stärker mit ASS interagierten und SC-560, welches die höchste COX-1-Affinität von den in dieser Arbeit untersuchten NSAIDs aufweist, die hemmende Wirkung von ASS nicht beeinträchtigte. Auch Meek et al. zeigten, dass die NSAID-Affinität zur COX-1 das Ausmaß der Interaktion mit ASS bestimmte (Meek et al., 2013). Sie stellten fest, dass Ibuprofen und Naproxen, jedoch nicht Etoricoxib und Meloxicam, welches zwei Stunden vor der ASS-Einnahme verabreicht wurde, signifikant die ASS-Wirkung hemmten. Hier sind weitere, detailliertere Untersuchungen zum Mechanismus der Interaktion erforderlich.

4.5 Abhängigkeit der Interaktion mit ASS von den NSAID-Konzentrationen

So wie auch in sowohl den mathematischen als auch den experimentellen Ergebnissen dieser Arbeit feststellbar war, beschrieben einige andere Autoren, dass NSAIDs die ASS-Wirkung bereits ab Konzentrationen, die die COX-1 noch gar nicht hemmen, antagonisieren (Ouellet, Riendeau und Percival, 2001; Gladding et al., 2008). Hohlfeld et al. stellten bei den Interaktionen von MAA und ASS fest, dass diese sogar bei hundertmal niedrigeren MAA-Konzentrationen, als sie für die direkte COX-Hemmung benötigt werden, auftraten (Hohlfeld et al., 2008). Dies hängt wahrscheinlich damit zusammen, dass ASS im Vergleich zur ARA eine weitaus niedrigere Affinität zur COX-1 aufweist, so dass ASS von NSAIDs einfacher und schon bei niedrigeren NSAID-Konzentrationen zu verdrängen ist als die ARA (Ouellet, Riendeau und Percival, 2001; Hohlfeld et al., 2008).

Hohlfeld et al. untersuchten weiterhin die Konzentrationsabhängigkeit der Interaktion von ASS und Piroxicam und stellten fest, dass Piroxicam-Konzentrationen zwischen 0,1 und 30 μM zu einer Aufhebung der ASS-Wirkung führen, jedoch geringere und höhere Konzentrationen die Hemmung der COX-1 nicht beeinträchtigen (Hohlfeld, Saxena und

Schrör, 2013). Sie vermuteten, dass bei sehr hohen Piroxicam-Konzentrationen die COX-1 sehr wahrscheinlich durch Piroxicam selbst gehemmt wird. Diese hohen experimentell untersuchten Piroxicam-Konzentrationen seien jedoch höher als die maximalen Plasmakonzentrationen bei analgetischen Dosierungen, die bei Piroxicam-Dosierungen von 20 mg etwa 3-8 μM betragen würden, so dass sie davon ausgingen, dass Piroxicam in der Routine zu keiner relevanten Hemmung der Thrombozytenaggregation führt, andererseits aber die Thrombozytenaggregationshemmung durch ASS verhindert und somit zu HAPR führt. Dies sei bei Piroxicam besonders bedeutungsvoll, da es eine sehr lange Halbwertszeit von ca. 50 Stunden hätte. Auch Saxena et al. stellten fest, dass die Interaktionen mit ASS konzentrationsabhängig sind und vorwiegend bei therapeutisch relevanten Dosen von NSAIDs vorkommt (Saxena et al., 2013). Sie beschrieben, dass eine Erhöhung der NSAID-Konzentration zu einer Abnahme der Interaktionen führten, während niedrige NSAID-Konzentrationen am stärksten mit ASS interagierten.

Ouellet et al. beschrieben, dass bei höheren ASS-Konzentrationen auch höhere NSAID-Konzentrationen benötigt wurden, um die Wirkung von ASS zu beeinträchtigen und um zu Interaktionen zu führen (Ouellet, Riendeau und Percival, 2001). Hier war eine etwa 10-mal höhere NSAID-Konzentration notwendig, um mit ASS 100 μM zu interagieren, als bei ASS 10 μM benötigt wurden. Dies stimmt mit den Ergebnissen der vorliegenden Dissertation überein (Abb. 23). Die Interaktion von ASS und NSAIDs könnte zudem verdeckt werden, wenn das NSAID auch schon bei alleiniger Gabe die Funktion der COX-1 hemmen würde (Ouellet, Riendeau und Percival, 2001). In der vorliegenden Dissertation wurde aus diesem Grund durchgehend die Thrombozytenaggregation und Thromboxansynthese bei allen NSAID-Konzentrationen in Abwesenheit von ASS bestimmt. Eine vollständige COX-1-Hemmung durch Nicht-ASS-NSAIDs konnte damit bei den hier durchgeführten Versuchen ausgeschlossen werden.

Das enzymkinetische Modell von Goltsov et al. zur Beschreibung der Interaktion von Celecoxib und ASS zeigte eine Reduzierung der COX-Hemmung um 50-90% bei einer ASS-Konzentration von 200 μM und Celecoxib-Konzentrationen von 1-50 μM . Bei höheren Celecoxib-Konzentrationen wurde wieder eine stärkere bis komplette COX-Hemmung erreicht (Goltsov et al., 2009). Diese Ergebnisse stimmen sowohl mit den experimentellen Daten der vorher genannten Publikationen, als auch mit unseren modellierten und experimentellen Ergebnissen überein. Unsere Resultate zeigten die stärkste Interaktion von Celecoxib und ASS bei Celecoxib-Konzentrationen von 0,3 μM bei ASS 30 μM (Abb. 19). Wenn man nach Ouellet et al. annimmt, dass die NSAID-Konzentrationen bei den Interaktionen proportional zur eingesetzten ASS-Konzentration ist (Ouellet, Riendeau und Percival, 2001), dann müsste nach den hier erzielten Ergebnissen bei ASS 200 μM die stärkste Interaktion bei Celecoxib 2 μM zu finden sein (0,3 multipliziert mit 20/3). Dies liegt in dem von Goltsov et al. genannten Bereich (Goltsov et al., 2009).

4.6 Abhängigkeit der Interaktion mit ASS von der Konzentration der freien Fettsäuren

Seit wenigen Jahren richtet sich das Interesse auf die Bedeutung von Fettsäuren bei Medikamenteninteraktionen an der COX. So beschrieben Yuan et al. und Dong et al., dass nicht nur COX-Hemmer, sondern auch Fettsäuren die katalytische Aktivität der COX beeinflussen können. Dies gilt teils auch für Fettsäuren, die keine Substrate der COX sind (Yuan et al., 2009; Dong et al., 2011; Zou et al., 2012). ARA kann sowohl an

der allosterischen als auch an der katalytischen Untereinheit binden, hat aber eine 25-fach höhere Affinität zur allosterischen Untereinheit. Die genannten Arbeitsgruppen schließen daraus, dass die COX-Aktivität stark von der Konzentration und der Komposition der umgebenden Fettsäuren abhängt, welches als *Fatty Acid Tone* bezeichnet wird. Dieses wiederum soll stark von der Ernährung beeinflusst werden. Somit könnte mit der Ernährung die Prostaglandinsynthese und ihre Hemmung durch ASS und durch andere NSAIDs reguliert werden.

In der vorliegenden Dissertation konnte sowohl bei den Vorhersagen des Modells als auch bei den experimentellen Ergebnissen die Bedeutung der ARA-Konzentration bei der Interaktion zwischen ASS und NSAIDs gezeigt werden. Dabei führten höhere ARA-Konzentrationen zu stärkeren Interaktionen. Nur eine einzige andere Arbeitsgruppe untersuchte den Einfluss der ARA-Konzentration auf die COX-Hemmung. Ein Einfluss auf die Hemmung durch ASS wurde nicht festgestellt (Gurbel et al., 2007). Leider untersuchten diese Autoren nicht die Interaktion mit NSAIDs.

4.7 Möglichkeiten zur Überwindung der HAPR

4.7.1 Änderung der ASS- und NSAID-Dosis

Die in der vorliegenden Dissertation untersuchte Wechselwirkung zwischen NSAID-Analgetika und ASS kann, auch wenn Studiendaten noch nicht vorliegen, potentiell das Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse erhöhen. Insofern stellt sich die Frage nach pharmakologischen Möglichkeiten, HAPR zu vermeiden. Eine naheliegende Möglichkeit besteht sicherlich darin die NSAID-Dosis zu reduzieren oder die ASS-Dosis zu erhöhen. Aufgrund des sehr wahrscheinlichen kompetitiven Antagonismus von NSAID und ASS wäre zu erwarten, dass NSAIDs in sehr geringen Konzentrationen nicht mit ASS um die Bindung am COX-1-Enzym konkurrieren. Sowohl die in dieser Arbeit vorgelegten mathematischen als auch die experimentellen Ergebnisse bestätigen diese Annahme. Natürlich stellt sich hier die Frage, ob bei herabgesetzter NSAID-Dosierung noch eine effektive antiphlogistische Schmerztherapie erreichbar ist. Nach Literaturdaten ist dies zumindest fraglich (Hohlfeld, Saxena und Schrör, 2013).

Hohlfeld et al. zeigten andererseits, dass bei Erhöhung der ASS-Konzentration *in vitro* die Interaktion mit MAA verhindert werden konnte (Hohlfeld et al., 2008). Die Überwindung von HAPR durch Erhöhung der ASS-Dosis, konnte auch von der Arbeitsgruppe Wong et al. und Papp et al. bestätigt werden (Wong et al., 2006; Papp et al., 2014). Auch die in der vorliegenden Dissertation erzielten experimentellen Ergebnisse bestätigten dies, da bei jeder Interaktion mit jedem untersuchten NSAID durch eine Erhöhung der ASS-Konzentration wieder eine vollständige COX-Hemmung erreicht werden konnte (Abb. 23). Jedoch wurde in der Literatur empfohlen, bei Komedikation von ASS und NSAIDs wie den Coxiben, aufgrund der gastrointestinalen Nebenwirkungen von ASS, nicht die niedrigste effektive ASS-Dosis von 75-100 mg täglich zu überschreiten (Baigent und Patrono, 2003). Selbstverständlich muss bei Erhöhung der ASS-Dosis mit stärkeren gastrointestinalen und ggf. anderen Nebenwirkungen gerechnet werden.

4.7.2 Modifikation des Dosierungsschemas

Selbst bei der Komedikation mit Ibuprofen bei langfristiger Behandlung mit niedrig dosierter ASS wurden Interaktionen unabhängig von der Reihenfolge der Verabreichung der zwei NSAIDs festgestellt, welches darauf hinweist, dass Ibuprofen die Acetylierung von COX-1 in neu gebildeten Thrombozyten verhindert (Renda et al., 2006). Einzelne Dosen von interagierenden NSAIDs, die kurzfristig zur akuten Schmerzmedikation eingenommen würden, schienen hingegen nicht mit ASS zu interagieren, da die COX-Hemmung durch ASS irreversibel ist und die Regeneration von Thrombozyten mit aktiver Thromboxansynthese eine Latenz von mehreren Tagen benötigt. Wiederholte Dosen von kurz wirksamen NSAIDs (z.B. Ibuprofen) oder Substanzen mit langer Plasmahalbwertszeit (z.B. Piroxicam) können hingegen dazu führen, dass die Thromboxansynthese eines wesentlichen Anteils zirkulierender Thrombozyten nicht durch ASS gehemmt wird. Aktuelle noch unpublizierte Ergebnisse aus Beobachtungsstudien der eigenen Arbeitsgruppe an kardiologischen und neurologischen Patienten bestätigen dies.

Aus den vorstehenden Überlegungen ergibt sich auch, dass NSAIDs nicht innerhalb von zwei Stunden nach der ASS-Einnahme verabreicht werden sollten, da ASS nach etwa 1h seine maximale Plasmakonzentration erreicht, bevor die Substanz relativ schnell mit einer Halbwertszeit von ca. 20 min zur Salicylsäure deacetyliert und damit inaktiviert wird (Hohlfeld, Saxena und Schrör, 2013). Ein ausreichender zeitlicher Abstand der ASS- und NSAID-Dosierungen könnte insofern die HAPR überwinden. Ellison et al. stellten fest, dass ASS mindestens 30 min vor oder 8 h nach der Ibuprofen-Einnahme verabreicht werden sollte (Catella-Lawson et al., 2001; Ellison und Dager, 2007). Ob ein modifiziertes Dosierungsschema von ASS und NSAID die Entstehung von HAPR im klinischen Setting verhindern kann, bleibt im Rahmen zukünftiger klinischer Studien zu verifizieren.

4.7.3 Modifikation der Wahl der NSAIDs zur Komedikation mit ASS

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen deutlich, dass hoch affine NSAIDs weniger stark mit ASS interagieren und daher bevorzugt zur Komedikation mit ASS eingesetzt werden sollten (Beispiel: SC-560). Demnach besteht die Möglichkeit, durch die Wahl von NSAIDs mit hoher Affinität zur COX-1 anstelle solcher mit niedriger Affinität zur COX-1 (Celecoxib, Piroxicam und Metamazol) in Kombination mit ASS die Interaktion zu vermeiden. Selbstverständlich bedarf es klinischer Studien, um diese Schlussfolgerung zu verifizieren. Hoch affine Inhibitoren der COX-1, wie etwa SC-560, stehen derzeit nur experimentell zur Verfügung und sind nicht für die klinische Anwendung zugelassen.

4.7.4 Alternative antithrombotische Therapie bei HAPR

Eine weitere Möglichkeit, die HAPR zu überwinden, wäre ASS durch ein anderes antithrombotisches Medikament wie Clopidogrel zu ersetzen. In der CAPRIE-Studie wurden niedrig dosierte ASS und Clopidogrel im Rahmen der kardiovaskulären Sekundärprävention verglichen. Beide Plättcheninhibitoren waren annähernd vergleichbar mit geringem Vorteil von Clopidogrel bei Patienten mit peripherer arterieller Verschlusskrankheit (CAPRIE Steering Committee, 1996). Allerdings gibt es bisher

keine klinischen Studien, die den Ersatz von ASS durch Clopidogrel bei HAPR befürworten.

Eine weitere Option wäre, ASS in Kombination mit Clopidogrel einzusetzen. Wong et al. zeigten experimentell, dass die kombinierte Gabe von ASS und Clopidogrel HAPR besser überwindet als die Dosiserhöhung von ASS (Wong et al., 2006). Auch Pamukcu et al. zeigten, dass bei ASS-*Non-Respondern* eine zusätzliche Gabe von Clopidogrel zur ASS-Therapie größere kardiovaskuläre Ereignisse reduzieren konnte im Vergleich zu einer alleinigen ASS-Therapie (Pamukcu et al., 2007). Eine weitere Arbeitsgruppe untersuchte ebenfalls diese Fragestellung und stellte fest, dass nur bei adipösen Patientinnen und Patienten, die jünger als 65 Jahre alt waren, ein Vorteil bei zusätzlicher Clopidogrel-Einnahme bestand (Gasparovic et al., 2014). Selbstverständlich ist bei einer derartigen dualen Antiplättchentherapie ein höheres Blutungsrisiko in Kauf zu nehmen. Klinische Daten über Nutzen und potentielle Risiken liegen hierzu bisher nicht vor.

4.8 Offengebliebene Fragestellungen und notwendige Studien

Die Interaktion von ASS mit NSAID-Analgetika ist laboranalytisch überzeugend belegt. Der Nachweis, dass auch klinische *Outcome*-Parameter durch diese Arzneimittelinteraktion beeinflusst werden, ist bisher nicht erbracht. Prospektiv geplante Studien, Beobachtungs- oder Fallkontrollstudien werden diese Frage hoffentlich in Zukunft aufgreifen und beantworten. Welche Modifikation der antithrombotischen Therapie bei HAPR infolge einer ASS/NSAID-Interaktion hinsichtlich Laborparametern oder hinsichtlich der Prävention von atherothrombotischen Ereignissen bestmögliche Ergebnisse liefert, muss ebenfalls in zukünftigen Studien untersucht werden.

Ein weiterer für zukünftige Forschung interessanter Ansatz wäre die Untersuchung des Einflusses von Lipiden und Fettsäuren in der Nahrung – insbesondere des Gehalts an ARA und anderer Fettsäuren, welche als Substrate der COX-1 fungieren, auf die thrombozytäre Sensitivität gegenüber ASS und deren Interaktion mit NSAID-Analgetika.

4.9 Schlussfolgerung

Die experimentell ermittelten Daten bestätigten die Ergebnisse des enzymkinetischen Modells. Ein NSAID mit sehr hoher Affinität zur COX-1 (z.B. SC-560) zeigte keine Interaktion mit ASS. Im Ergebnis könnten solche Substanzen mit ASS kombiniert werden, ohne dass die Hemmung der thrombozytären COX-1 verhindert wird. NSAIDs mit niedriger Affinität zur COX-1 heften dagegen in kombinierter Gabe mit ASS deren Wirkung teilweise oder sogar vollständig auf. Diese Substanzen sollten nicht oder mit Vorsicht in Kombination mit ASS verabreicht werden (z.B. MAA, Piroxicam).

Auch bei zusätzlicher Verabreichung des COX-2-Hemmers Celecoxib konnte die COX-1-Hemmung durch ASS teilweise bis vollständig aufgehoben werden, wahrscheinlich weil diese Substanz eine relativ geringe COX-2-Selektivität besitzt und auch an der thrombozytären COX-1 wirksam ist (Riendeau et al., 2001). Andere Coxibe wie z.B. Etoricoxib weisen deutlich höhere COX-2-Selektivitäten auf (hier 106-fach), so dass keine Interaktion mit ASS zu erwarten ist (Riendeau et al., 2001).

Wie auch im Modell simuliert, zeigten die Versuche an PRP weiterhin, dass die Stärke der Interaktion auch von der zur Stimulation der Thrombozyten eingesetzten Konzentration von ARA abhängt. Bei hohen ARA-Konzentrationen kam es experimentell zu stärkeren Interaktionen zwischen ASS und NSAID, was das mathematische Modell bestätigte. Bei Freisetzung hoher Konzentrationen von ARA ist insofern unter kombinierter Gabe von ASS und einem NSAID mit einer stärkeren Interaktion von NSAIDs mit ASS zu rechnen. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen mit Kollagen als Agonist zeigten eine hohe individuelle Variabilität der Thromboxansynthese, die eine hohe interindividuelle Variabilität der Freisetzung von ARA aus endogenen Phospholipiden rückschließen lässt und potentiell von der Ernährung beeinflusst wird (Sarkadi-Nagy et al., 2004; Tyburczy et al., 2011; Kawabata et al., 2011a; Kawabata et al., 2011b).

5. Zusammenfassung

Nicht-ASS-NSAIDs können die Thrombozytenfunktionshemmung durch ASS verhindern. Jedoch sind viele Details dieser Medikamenteninteraktion noch nicht ausreichend charakterisiert. Sowohl kompetitive als auch nicht-kompetitive Mechanismen der Interaktion an der Cyclooxygenase-1 (COX-1) wurden beschrieben, doch sind die Daten hierzu kontrovers.

Die vorliegende Dissertation untersucht, ob ein kompetitiver Antagonismus die Hemmung der COX-1 durch ASS und HAPR durch kombinierte Gabe von ASS und Nicht-ASS-NSAIDs beschreiben kann und ob ein kompetitiver Mechanismus experimentell wahrscheinlich gemacht werden kann.

Hierzu wurde ein mathematisches, enzymkinetisches Modell der ASS/NSAID-Interaktion an der COX-1 mithilfe einer für pharmakodynamische Modellierung geeigneten Software (*ModelMaker*®) entwickelt, an welchem Auswirkungen einer Variation enzymkinetischer Parameter untersucht wurden. In einem zweiten Schritt wurden die Vorhersagen des Modells anhand von Messungen der thrombozytären Thromboxansynthese (*Immunoassay*) und der Thrombozytenaggregation (Lichttransmission) am plättchenreichen Plasma gesunder Spender überprüft. Hierbei wurden vier ausgewählte NSAIDs aus jeweils verschiedenen Substanzgruppen mit unterschiedlichen pharmakologischen Eigenschaften hinsichtlich ihrer Wechselwirkung mit der Antiplättchenwirkung von ASS analysiert.

Das enzymkinetische Modell zeigte, dass niedrig- und mittelaffine NSAIDs ($K_i \geq 1 \mu\text{M}$), jedoch nicht höher affine NSAIDs mit ASS am COX-1-Enzym interagieren. Die Interaktion war am stärksten ausgeprägt bei hohen Konzentrationen an Substrat (ARA). Die experimentellen Ergebnisse bestätigten das mathematische Modell. Auch hier zeigte sich, dass niedrig- und mittelaffine COX-1-Inhibitoren (Piroxicam, Metamizol, Celecoxib) die Thrombozytenaggregationshemmung und die Hemmung der thrombozytären TX-Synthese durch ASS stark beeinträchtigten. Im Gegensatz dazu ergab sich keine Interaktion mit dem hoch affinen COX-1 Inhibitor SC-560. Ebenfalls in Übereinstimmung mit dem Modell, war die ASS/NSAID-Interaktion bei hoher ARA-Konzentrationen (1 mM) deutlich stärker ausgeprägt als bei niedrigerer Konzentration (0,3 mM).

Im Ergebnis bestätigten die Experimente das entwickelte mathematische Modell und damit die Hypothese, dass ein kompetitiver Antagonismus der Interaktion zwischen ASS und Nicht-ASS-NSAIDs an der COX-1 zugrunde liegt. Darüber hinaus ergeben sich aus der vorliegenden Arbeit interessante Schlussfolgerungen, die vielleicht dazu beitragen können, die untersuchte Arzneimittelinteraktion zwischen ASS und NSAID-Analgetika zu vermeiden.

6. Literaturverzeichnis

1. Amer M, Bead VR, Bathon J, Blumenthal RS, Edwards DN. Use of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs in Patients with Cardiovascular Disease: A Cautionary Tale. *Cardiology in Review* 2010; 18(4): 204–212.
2. Andersen V, Vogel U. Systematic Review: Interactions between Aspirin, and Other Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs, and Polymorphisms in Relation to Colorectal Cancer. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 2014; 40(2):147-59.
3. Antiplatelet Trialists' Collaboration. Collaborative Overview of Randomised Trials of Antiplatelet Therapy--I: Prevention of Death, Myocardial Infarction, and Stroke by Prolonged Antiplatelet Therapy in Various Categories of Patients. *BMJ (Clinical Research Ed.)* 1994; 308(6921): 81–106.
4. Antithrombotic Trialists' (ATT) Collaboration, Baigent C, Blackwell L, Collins R, Emberson J, Godwin J, Peto R, Buring J, Hennekens C, Kearney P, Meade T, Patrono C, Roncaglioni MC, Zanchetti A. Aspirin in the Primary and Secondary Prevention of Vascular Disease: Collaborative Meta-Analysis of Individual Participant Data from Randomised Trials. *Lancet* 2009; 373(9678): 1849–1860.
5. Antithrombotic Trialists' Collaboration. Collaborative Meta-Analysis of Randomised Trials of Antiplatelet Therapy for Prevention of Death, Myocardial Infarction, and Stroke in High Risk Patients. *BMJ (Clinical Research Ed.)* 2002; 324(7329): 71–86.
6. Awa K, Satoh H, Hori S, Sawada Y. Prediction of Time-Dependent Interaction of Aspirin with Ibuprofen Using a Pharmacokinetic/pharmacodynamic Model. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics* 2012; 37(4): 469–474.
7. Baigent C, Patrono C. Selective Cyclooxygenase 2 Inhibitors, Aspirin, and Cardiovascular Disease: A Reappraisal. *Arthritis & Rheumatism* 2003; 48(1): 12–20.
8. Berk M, Dean O, Drexhage H, McNeil JJ, Moylan S, O'Neil A, Davey CG, Sanna L, Maes M. Aspirin: A Review of Its Neurobiological Properties and Therapeutic Potential for Mental Illness. *BMC Medicine* 2013; 11: 74.
9. Biondi-Zoccai G, Wu Y, Serrano CV Jr, Frati G, Agostoni P, Abbate A. Aspirin Underuse, Non-Compliance or Cessation: Definition, Extent, Impact and Potential Solutions in the Primary and Secondary Prevention of Cardiovascular Disease. *International Journal of Cardiology* 2014; 182C: 148–154.
10. 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, VIGOR Study Group. Comparison of Upper Gastrointestinal Toxicity of Rofecoxib and Naproxen in Patients with Rheumatoid Arthritis. *The New England Journal of Medicine* 2000; 343(21): 1520–1528, 2 p following 1528.
11. Born GV. Observations on the Change in Shape of Blood Platelets Brought about by Adenosine Diphosphate. *The Journal of Physiology* 1970; 209(2): 487–511.
12. Born GV, Hume M. Effects of the Numbers and Sizes of Platelet Aggregates on the Optical Density of Plasma. *Nature* 1967; 215(5105): 1027–1029.
13. Breet NJ, van Werkum JW, Bouman HJ, Kelder JC, Ten Berg JM, Hackeng CM. High on-Aspirin Platelet Reactivity as Measured with Aggregation-Based, Cyclooxygenase-1 Inhibition Sensitive Platelet Function Tests Is Associated with the Occurrence of Atherothrombotic Events. *Journal of Thrombosis and Haemostasis: JTH* 2010; 8(10): 2140–2148.
14. Bujold E, Morency AM, Roberge S, Lacasse Y, Forest JC, Giguère Y. Acetylsalicylic Acid for the Prevention of Preeclampsia and Intra-Uterine Growth Restriction in Women with Abnormal Uterine Artery Doppler: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Canada: JOGC = Journal D'obstétrique et Gynécologie Du Canada: JOGC* 2009; 31(9): 818–826.
15. CAPRIE Steering Committee. A Randomised, Blinded, Trial of Clopidogrel versus Aspirin in Patients at Risk of Ischaemic Events (CAPRIE). CAPRIE Steering Committee. *Lancet* 1996; 348(9038): 1329–1339.
16. Catella-Lawson F, Reilly MP, Kapoor SC, Cucchiara AJ, DeMarco S, Tournier B, Vyas SN, FitzGerald GA. Cyclooxygenase Inhibitors and the Antiplatelet Effects of Aspirin. *New England Journal of Medicine* 2001; 345(25): 1809–1817.
17. Censarek P, Steger G, Paolini C, Hohlfeld T, Grosser T, Zimmermann N, Fleckenstein D, Schrör K, Weber AA. Alternative Splicing of Platelet Cyclooxygenase-2 mRNA in Patients after Coronary Artery Bypass Grafting. *Thrombosis and Haemostasis* 2007; 98(6): 1309–1315.
18. CURRENT-OASIS 7 Investigators, Mehta SR, Bassand JP, Chrolavicius S, Diaz R, Eikelboom JW, Fox KA, Granger CB, Jolly S, Joyner CD, Rupprecht HJ, Widimsky P, Afzal R, Pogue J, Yusuf S. Dose Comparisons of Clopidogrel and Aspirin in Acute Coronary Syndromes. *The New England Journal of Medicine* 2010; 363(10): 930–942.

19. Dong L, Vecchio AJ, Sharma NP, Jurban BJ, Malkowski MG, Smith WL. Human Cyclooxygenase-2 is a Sequence Homodimer That Functions as a Conformational Heterodimer. *The Journal of Biological Chemistry* 2011; 286(21): 19035–19046.
20. Eikelboom JW, Hirsh J, Spencer FA, Baglin TP, Weitz JI. Antiplatelet Drugs: Antithrombotic Therapy and Prevention of Thrombosis, 9th Ed: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines. *CHEST Journal* 2012; 141(2_suppl): e89S–e119S.
21. Ellison J, Dager W. Recent FDA Warning of the Concomitant Use of Aspirin and Ibuprofen and the Effects on Platelet Aggregation. *Preventive Cardiology* 2007; 10(2): 61–63.
22. Fanelli A, Romualdi P, Vigano' R, Lora Aprile P, Gensini G, Fanelli G. Non-Selective Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs) and Cardiovascular Risk. *Acta Bio-Medica: Atenei Parmensis* 2013; 84(1): 5–11.
23. FitzGerald GA, Patrono C. The Coxibs, Selective Inhibitors of Cyclooxygenase-2. *The New England Journal of Medicine* 2001; 345(6): 433–442.
24. Flipo RM. Are the NSAIDs able to compromising the cardio-preventive efficacy of aspirin? *Presse médicale (Paris, France: 1983)* 2006; 35(9 Spec No 1): 1S53–60.
25. Garavito RM, Malkowski MG, DeWitt DL. The Structures of Prostaglandin Endoperoxide H Synthases-1 and -2. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators* 2002; 68-69: 129–152.
26. Gasparovic H, Petricevic M, Kopjar T, Djuric Z, Svetina L, Biocina B. Impact of Dual Antiplatelet Therapy on Outcomes among Aspirin-Resistant Patients Following Coronary Artery Bypass Grafting. *The American Journal of Cardiology* 2014; 113(10): 1660–1667.
27. Gierse JK, Koboldt CM, Walker MC, Seibert K, Isakson PC. Kinetic Basis for Selective Inhibition of Cyclo-Oxygenases. *The Biochemical Journal* 1999; 339 (Pt 3): 607–614.
28. Gislason GH, Jacobsen S, Rasmussen JN, Rasmussen S, Buch P, Friberg J, Schramm TK, Abildstrom SZ, Køber L, Madsen M, Torp-Pedersen C. Risk of Death or Reinfarction Associated with the Use of Selective Cyclooxygenase-2 Inhibitors and Nonselective Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs after Acute Myocardial Infarction. *Circulation* 2006; 113(25): 2906–2913.
29. Gladding PA, Webster MW, Farrell HB, Zeng IS, Park R, Ruijne N. The Antiplatelet Effect of Six Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs and Their Pharmacodynamic Interaction with Aspirin in Healthy Volunteers. *The American Journal of Cardiology* 2008; 101(7): 1060–1063.
30. Gladding P, Webster M, Ormiston J, Olsen S, White H. Antiplatelet Drug Nonresponsiveness. *American Heart Journal* 2008; 155(4): 591–599.
31. Goltsov A, Maryashkin A, Swat M, Kosinsky Y, Humphery-Smith I, Demin O, Goryanin I, Lebedeva G. Kinetic Modelling of NSAID Action on COX-1: Focus on in Vitro/in Vivo Aspects and Drug Combinations. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2009; 36(1): 122–136.
32. Gupta K, Selinsky BS, Kaub CJ, Katz AK, Loll PJ. The 2.0 Å Resolution Crystal Structure of Prostaglandin H2 Synthase-1: Structural Insights into an Unusual Peroxidase. *Journal of Molecular Biology* 2004; 335(2): 503–518.
33. Gupta K, Selinsky BS, Loll PJ. 2.0 Å Structure of Prostaglandin H2 Synthase-1 Reconstituted with a Manganese Porphyrin Cofactor. *Acta Crystallographica. Section D, Biological Crystallography* 2006; 62(Pt 2): 151–156.
34. Gurbel PA, Bliden KP, DiChiara J, Newcomer J, Weng W, Neerchal NK, Gesheff T, Chaganti SK, Etherington A, Tantry US. Evaluation of Dose-Related Effects of Aspirin on Platelet Function: Results from the Aspirin-Induced Platelet Effect (ASPECT) Study. *Circulation* 2007; 115(25): 3156–3164.
35. Hennekens CH, Schneider WR. The Need for Wider and Appropriate Utilization of Aspirin and Statins in the Treatment and Prevention of Cardiovascular Disease. *Expert Review of Cardiovascular Therapy* 2008; 6(1): 95–107.
36. Hohlfeld T, Saxena A, Schrör K. High on Treatment Platelet Reactivity against Aspirin by Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs--Pharmacological Mechanisms and Clinical Relevance. *Thrombosis and Haemostasis* 2013; 109(5): 825–833.
37. Hohlfeld T, Zimmermann N, Weber AA, Jessen G, Weber H, Schrör K, Höltje HD, Ebel R. Pyrazolinone Analgesics Prevent the Antiplatelet Effect of Aspirin and Preserve Human Platelet Thromboxane Synthesis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis: JTH* 2008; 6(1): 166–173.
38. Hong Y, Gengo FM, Rainka MM, Bates VE, Mager DE. Population Pharmacodynamic Modelling of Aspirin- and Ibuprofen-Induced Inhibition of Platelet Aggregation in Healthy Subjects. *Clinical Pharmacokinetics* 2008; 47(2): 129–137.
39. Ho PM, Spertus JA, Masoudi FA, Reid KJ, Peterson ED, Magid DJ, Krumholz HM, Rumsfeld JS. Impact of Medication Therapy Discontinuation on Mortality after Myocardial Infarction. *Archives of Internal Medicine* 2006; 166(17): 1842–1847.
40. Jaturapatporn D, Isaac MG, McCleery J, Tabet N. Aspirin, Steroidal and Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs for the Treatment of Alzheimer's Disease. *The Cochrane Database of Systematic Reviews* 2: CD006378, 2012.

41. Kawabata T, Hirota S, Hirayama T, Adachi N, Kaneko Y, Iwama N, Kamachi K, Araki E, Kawashima H, Kiso Y. Associations between Dietary N-6 and N-3 Fatty Acids and Arachidonic Acid Compositions in Plasma and Erythrocytes in Young and Elderly Japanese Volunteers. *Lipids in Health and Disease* 2011; 10: 138.
42. Kawabata T, Hirota S, Hirayama T, Adachi N, Hagiwara C, Iwama N, Kamachi K, Araki E, Kawashima H, Kiso Y. Age-Related Changes of Dietary Intake and Blood Eicosapentaenoic Acid, Docosahexaenoic Acid, and Arachidonic Acid Levels in Japanese Men and Women. *Prostaglandins, Leukotrienes, and Essential Fatty Acids* 2011; 84(5-6): 131–137.
43. Kim S E. The Benefit-Risk Consideration in Long-Term Use of Alternate-Day, Low Dose Aspirin: Focus on Colorectal Cancer Prevention. *Annals of Gastroenterology* 2014; 27(1): 87–88.
44. Liao KP, Solomon DH. Traditional Cardiovascular Risk Factors, Inflammation and Cardiovascular Risk in Rheumatoid Arthritis. *Rheumatology (Oxford, England)* 2013; 52(1): 45–52.
45. Linden MD, Tran H, Woods R, Tonkin A. High Platelet Reactivity and Antiplatelet Therapy Resistance. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* 2012; 38(2): 200–212.
46. Liu W, Cao D, Oh SF, Serhan CN, Kulmacz RJ. Divergent Cyclooxygenase Responses to Fatty Acid Structure and Peroxide Level in Fish and Mammalian Prostaglandin H Synthases. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2006; 20(8): 1097–1108.
47. Li X, Fries S, Li R, Lawson JA, Probert KJ, Diamond SL, Blair IA, FitzGerald GA, Grosser T. Differential Impairment of Aspirin-Dependent Platelet Cyclooxygenase Acetylation by Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2014; 111(47): 16830–16835.
48. Llorens O, Perez JJ, Palomer A, Mauleon D. Structural Basis of the Dynamic Mechanism of Ligand Binding to Cyclooxygenase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 1999; 9(19): 2779–2784.
49. Long S, Theiss KL, Mattei A, Loftin CD, Li T. Solid-State Properties of the Cyclooxygenase-1-Selective Inhibitor, SC-560. *AAPS PharmSciTech* 2010; 11(2): 485–488.
50. Mason JC, Libby P. Cardiovascular Disease in Patients with Chronic Inflammation: Mechanisms Underlying Premature Cardiovascular Events in Rheumatologic Conditions. *European Heart Journal* 2015; 21;36(8):482-9c.
51. Mason PJ, Jacobs AK, Freedman JE. Aspirin Resistance and Atherothrombotic Disease. *Journal of the American College of Cardiology* 2005; 46(6): 986–993.
52. Mayer K, Bernlochner I, Braun S, Schulz S, Orban M, Morath T, Cala L, Hoppmann P, Schunkert H, Laugwitz KL, Kastrati A, Sibbing D. Aspirin Treatment and Outcomes after Percutaneous Coronary Intervention: Results of the ISAR-ASPI Registry. *Journal of the American College of Cardiology* 2014; 64(9): 863–871.
53. McAdam BF, Catella-Lawson F, Mardini IA, Kapoor S, Lawson JA, FitzGerald GA. Systemic Biosynthesis of Prostacyclin by Cyclooxygenase (COX)-2: The Human Pharmacology of a Selective Inhibitor of COX-2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1999; 96(1): 272–277.
54. Meek IL, Vonkeman HE, Kasemier J, Movig KL, van de Laar MA. Interference of NSAIDs with the Thrombocyte Inhibitory Effect of Aspirin: A Placebo-Controlled, Ex Vivo, Serial Placebo-Controlled Serial Crossover Study. *European Journal of Clinical Pharmacology* 2013; 69(3): 365–371.
55. Meriño-Ibarra E. Cardiovascular Risk Assessment in Rheumatoid Arthritis and Other Inflammatory Arthritides. *Seminars in Arthritis and Rheumatism* 2014; pii: S0049-0172(14)00291-1.
56. Michal F, Born GV. Effect of the Rapid Shape Change of Platelets on the Transmission and Scattering of Light through Plasma. *Nature: New Biology* 1971; 231(24): 220–222.
57. Van den Oever IA, van Sijl AM, Nurmohamed MT. Management of Cardiovascular Risk in Patients with Rheumatoid Arthritis: Evidence and Expert Opinion. *Therapeutic Advances in Musculoskeletal Disease* 2013; 5(4): 166–181.
58. Okino MS, Mavrovouniotis ML. Simplification of Mathematical Models of Chemical Reaction Systems. *Chemical Reviews* 1998; 98(2): 391–408.
59. Ouellet M, Riendeau D, Percival MD. A High Level of Cyclooxygenase-2 Inhibitor Selectivity Is Associated with a Reduced Interference of Platelet Cyclooxygenase-1 Inactivation by Aspirin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2001; 98(25): 14583–14588.
60. Pamukcu B, Oflaz H, Onur I, Oncul A, Ozcan M, Umman B, Mercanoglu F, Meric M, Nisanci Y. Clinical Relevance of Aspirin Resistance in Patients with Stable Coronary Artery Disease: A Prospective Follow-up Study (PROSPECTAR). *Blood Coagulation & Fibrinolysis: An International Journal in Haemostasis and Thrombosis* 2007; 18(2): 187–192.

61. Papp J, Sandor B, Vamos Z, Botor D, Toth A, Rabai M, Kenyeres P, Cseplo P, Juricskay I, Mezosi E, Koller A, Toth K. Antiplatelet Effect of Acetylsalicylic Acid, Metamizole and Their Combination - in Vitro and in Vivo Comparisons. *Clinical Hemorheology and Microcirculation* 2014; 56(1): 1–12.
62. Patrono C, Collier B, Dalen JE, FitzGerald GA, Fuster V, Gent M, Hirsh J, Roth G. Platelet-Active Drugs : The Relationships among Dose, Effectiveness, and Side Effects. *Chest* 2001; 119(1 Suppl): 39S–63S.
63. Polzin A, Zeus T, Schrör K, Kelm M, Hohlfeld T. Dipyron (Metamizole) Can Nullify the Antiplatelet Effect of Aspirin in Patients With Coronary Artery Disease. *Journal of the American College of Cardiology* 2013; 62(18):1725-6.
64. Pouplana R, Lozano JJ, Ruiz J. Molecular Modelling of the Differential Interaction between Several Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs and Human Prostaglandin Endoperoxide H Synthase-2 (h-PGHS-2). *Journal of Molecular Graphics & Modelling* 2002; 20(4): 329–343.
65. Prusakiewicz JJ, Duggan KC, Rouzer CA, Marnett LJ. Differential Sensitivity and Mechanism of Inhibition of COX-2 Oxygenation of Arachidonic Acid and 2-Arachidonoylglycerol by Ibuprofen and Mefenamic Acid. *Biochemistry* 2009; 48(31): 7353–7355.
66. Reilly IA, FitzGerald GA. Inhibition of Thromboxane Formation in Vivo and Ex Vivo: Implications for Therapy with Platelet Inhibitory Drugs. *Blood* 1987; 69(1): 180–186.
67. Renda G, Tacconelli S, Capone ML, Sacchetta D, Santarelli F, Sciulli MG, Zimarino M, Grana M, D'Amello E, Zurro M, Price TS, Patrono C, De Caterina R, Patrignani P. Celecoxib, Ibuprofen, and the Antiplatelet Effect of Aspirin in Patients with Osteoarthritis and Ischemic Heart Disease. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 2006; 80(3): 264–274.
68. Rezuş E, Floria M, Grigoriu A, Tamba BI, Rezuş C. Cardiovascular Risk Factors In Chronic Inflammatory Rheumatic Diseases: Modern Assessment And Diagnosis. *Current Vascular Pharmacology* 2015; [Epub ahead of print].
69. Ricciotti E, FitzGerald GA. Prostaglandins and Inflammation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2011; 31(5): 986–1000.
70. Riendeau D, Percival MD, Brideau C, Charleson S, Dubé D, Ethier D, Falguyet JP, Friesen RW, Gordon R, Greig G, Guay J, Mancini J, Ouellet M, Wong E, Xu L, Boyce S, Visco D, Girard Y, Prasit P, Zamboni R, Rodger IW, Gresser M, Ford-Hutchinson AW, Young RN, Chan CC. Etoricoxib (MK-0663): Preclinical Profile and Comparison with Other Agents That Selectively Inhibit Cyclooxygenase-2. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 2001; 296(2): 558–566.
71. Rimon G, Sidhu RS, Lauver DA, Lee JY, Sharma NP, Yuan C, Frieler RA, Trievel RC, Lucchesi BR, Smith WL. Coxibs Interfere with the Action of Aspirin by Binding Tightly to One Monomer of Cyclooxygenase-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2010; 107(1): 28–33.
72. Rouzer CA, Marnett LJ. Cyclooxygenases: Structural and Functional Insights. *Journal of Lipid Research* 2009; 50 Suppl: S29–34.
73. Rowlinson SW, Crews BC, Goodwin DC, Schneider C, Gierse JK, Marnett LJ. Spatial Requirements for 15-(R)-Hydroxy-5Z,8Z,11Z, 13E-Eicosatetraenoic Acid Synthesis within the Cyclooxygenase Active Site of Murine COX-2. Why Acetylated COX-1 Does Not Synthesize 15-(R)-Hete. *The Journal of Biological Chemistry* 2000; 275(9): 6586–6591.
74. Sarkadi-Nagy E, Wijendran V, Diao GY, Chao AC, Hsieh AT, Turpeinen A, Lawrence P, Nathanielsz PW, Brenna JT. Formula Feeding Potentiates Docosahexaenoic and Arachidonic Acid Biosynthesis in Term and Preterm Baboon Neonates. *Journal of Lipid Research* 2004; 45(1): 71–80.
75. Saxena A, Balamnavar VM, Hohlfeld T, Saxena AK. Drug/drug Interaction of Common NSAIDs with Antiplatelet Effect of Aspirin in Human Platelets. *European Journal of Pharmacology* 2013; 721(1-3): 215–224.
76. Schrör K. Aspirin and Platelets: The Antiplatelet Action of Aspirin and Its Role in Thrombosis Treatment and Prophylaxis. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* 1997; 23(4): 349–356.
77. Schrör K, Rauch B. Aspirin in primary and secondary prevention of colorectal carcinomas. *Medizinische Monatsschrift für Pharmazeuten* 2013; 36(11): 411–421.
78. Scott IC, Ibrahim F, Johnson D, Scott DL, Kingsley GH. Current Limitations in the Management of Cardiovascular Risk in Rheumatoid Arthritis. *Clinical and Experimental Rheumatology* 2012; 30(2): 228–232.
79. Selinsky BS, Gupta K, Sharkey CT, Loll PJ. Structural Analysis of NSAID Binding by Prostaglandin H2 Synthase: Time-Dependent and Time-Independent Inhibitors Elicit Identical Enzyme Conformations. *Biochemistry* 2001; 40(17): 5172–5180.
80. Sidhu RS, Lee JY, Yuan C, Smith WL. Comparison of Cyclooxygenase-1 Crystal Structures: Cross-Talk Between Monomers Comprising Cyclooxygenase-1 Homodimers. *Biochemistry* 2010; 49(33): 7069–7079.

81. Siller-Matula JM, Gruber C, Francesconi M, Dechant C, Jilma B, Delle-Karth G, Grohs K, Podczeck-Schweighofer A, Christ G. The Net Clinical Benefit of Personalized Antiplatelet Therapy in Patients Undergoing Percutaneous Coronary Intervention. *Clinical Science (London)* 2015; 128(2): 121–130.
82. 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. 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: The Journal of the American Medical Association* 2000; 284(10): 1247–1255.
83. Simmons DL, Botting RM, Hla T. Cyclooxygenase Isozymes: The Biology of Prostaglandin Synthesis and Inhibition. *Pharmacological Reviews* 2004; 56(3): 387–437.
84. Smith WL, Song I. The Enzymology of Prostaglandin Endoperoxide H Synthases-1 and -2. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators* 2002; 68-69: 115–128.
85. Smith WL, Urade Y, Jakobsson PJ. Enzymes of the Cyclooxygenase Pathways of Prostanoid Biosynthesis. *Chemical Reviews* 2011; 111(10): 5821–5865.
86. Steering Committee of the Physicians' Health Study Research Group. Final Report on the Aspirin Component of the Ongoing Physicians' Health Study. *The New England Journal of Medicine* 1989; 321(3): 129–135.
87. Supuran CT, Winum JY. *Drug Design of Zinc-Enzyme Inhibitors: Functional, Structural, and Disease Applications*. Wiley Series in Drug Discovery and Development. Hoboken, N.J: John Wiley & Sons, 2009.
88. Sweeny JM, Gorog DA, Fuster V. Antiplatelet Drug “Resistance”. Part 1: Mechanisms and Clinical Measurements. *Nature Reviews. Cardiology* 2009; 6(4): 273–282.
89. Talari H, Mesdaghinia E, Abedzadeh Kalahroudi M. Aspirin and Preeclampsia Prevention in Patients with Abnormal Uterine Artery Blood Flow. *Iranian Red Crescent Medical Journal* 2014; 16(8): e17175.
90. Tien JH, Hazelton WD, Sparks R, Ulrich CM. A Michaelis-Menten-Style Model for the Autocatalytic Enzyme Prostaglandin H Synthase. *Bulletin of Mathematical Biology* 2005; 67(4): 683–700.
91. Tyburczy C, Kothapalli KS, Park WJ, Blank BS, Bradford KL, Zimmer JP, Butt CM, Salem N Jr, Brenna JT. Heart Arachidonic Acid Is Uniquely Sensitive to Dietary Arachidonic Acid and Docosahexaenoic Acid Content in Domestic Pigslets. *Prostaglandins, Leukotrienes, and Essential Fatty Acids* 2011; 85(6): 335–343.
92. Wang LH, Tsai AL, Hsu PY. Substrate Binding Is the Rate-Limiting Step in Thromboxane Synthase Catalysis. *The Journal of Biological Chemistry* 2001; 276(18): 14737–14743.
93. Weber AA, Heim HK, Schumacher M, Schrör K, Hohlfeld T. Effects of Selective Cyclooxygenase Isoform Inhibition on Systemic Prostacyclin Synthesis and on Platelet Function at Rest and after Exercise in Healthy Volunteers. *Platelets* 2007; 18(5): 379–385.
94. Weber AA, Przytulski B, Schanz A, Hohlfeld T, Schrör K. Towards a Definition of Aspirin Resistance: A Typological Approach. *Platelets* 2002; 13(1): 37–40.
95. Wenig Z, Li X, Li Y, Lin J, Peng F, Niu W. The Association of Four Common Polymorphisms from Four Candidate Genes (COX-1, COX-2, ITGA2B, ITGA2) with Aspirin Insensitivity: A Meta-Analysis. *PloS One* 2013; 8(11): e78093.
96. Wilner KD, Rushing M, Walden C, Adler R, Eskra J, Noveck R, Vargas R. Celecoxib Does Not Affect the Antiplatelet Activity of Aspirin in Healthy Volunteers. *Journal of Clinical Pharmacology* 2002; 42(9): 1027–1030.
97. Wong S, Morel-Kopp MC, Chen Q, Appleberg M, Ward CM, Lewis DR. Overcoming Aspirin Resistance: Increased Platelet Inhibition with Combination Aspirin and Clopidogrel and High Dose Aspirin Therapy in Aspirin Resistant Patients with Peripheral Vascular Disease. *Thrombosis and Haemostasis* 2006; 95(6): 1042–1043.
98. Yuan C, Rieke CJ, Rimon G, Wingerd BA, Smith WL. Partnering between Monomers of Cyclooxygenase-2 Homodimers. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2006; 103(16): 6142–6147.
99. Yuan C, Sidhu RS, Kuklev DV, Kado Y, Wada M, Song I, Smith WL. Cyclooxygenase Allosterism, Fatty Acid-Mediated Cross-Talk between Monomers of Cyclooxygenase Homodimers. *The Journal of Biological Chemistry* 2009; 284(15): 10046–10055.
100. Zimmermann N, Kurt M, Winter J, Gams E, Wenzel F, Hohlfeld T. Detection and Duration of Aspirin Resistance after Coronary Artery Bypass Grafting. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 2008; 135(4): 947–948.
101. Zou H, Yuan C, Dong L, Sidhu RS, Hong YH, Kuklev DV, Smith WL. Human Cyclooxygenase-1 Activity and Its Responses to COX Inhibitors Are Allosterically Regulated by Nonsubstrate Fatty Acids. *Journal of Lipid Research* 2012; 53(7): 1336–1347.

7. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei denjenigen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit geführt haben.

Mein erster Dank gebührt Herrn Prof. Hohlfeld für die Bereitstellung des Themas, für die jahrelange, hervorragende Betreuung sowohl der Promotion als auch meiner medizinischen Laufbahn, für die Unterstützung bei diversen Vorträgen auf Kongressen und für die kritische Durchsicht der Dissertation.

Ein besonderer Dank gilt auch dem Mathematiker Herrn Dr. Hafner für die große Unterstützung beim Erstellen des Modells und für wertvolle Ratschläge für die statistische Auswertung.

Ein weiterer großer Dank gilt den technischen Mitarbeiterinnen am Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie Frau Kirsten Bartkowski für die freundliche Arbeitsatmosphäre und die großartige Betreuung und Unterstützung im Labor und Frau Irmhild Rüter für die Hilfe bei den Thromboxanbestimmungen.

8. Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt worden ist und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

Saghar Bagheri

Solingen, den 19. April 2015