

**Das vaskuläre Risikoprofil von Rofecoxib
im tierexperimentellen Ansatz**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf



vorgelegt von

Dana Baumgärtel-Allekotte
aus Gera

Düsseldorf
Juni 2007

Aus dem Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie
Universitätsklinikum Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität

Referent: Prof. Dr. Karsten Schrör

Koreferent: Prof. Dr. Hans-Dieter Höltje

Tag der mündlichen Prüfung: 6. Juli 2007

Für meine Eltern

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACh	Acetylcholin
AE	Arbeitseinheiten
ALCAM	<i>activated leucocyte adhesion molecule</i>
AMI	akuter Myokardinfarkt
APS	Ammoniumpersulfat
ASS	Acetylsalicylsäure
BfArM	Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte
b.i.d.	zweimal am Tag (<i>bis in die</i>)
COX	Cyclooxygenase
CFV	zyklische Flussveränderungen
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle medium</i>
FCS	fetales Kälberserum
GAPDH	Glycerol-Aldehyd-Phosphat-Dehydrogenase
ICAM-1	<i>intercellular adhesion molecule-1</i>
KON	Kontrolle
LDL	<i>low density lipoprotein</i>
m/v	Gewichtsprozent
M β -CD	Methyl- β -Cyclodextrin
MMP	Matrix-Metalloproteinase
mRNA	<i>messenger-RNA</i>
NO	Stickstoffmonoxid
NSAID	nichtsteroidales Antiphlogistikum
OD	optische Dichte
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PG	Prostaglandin
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PGHS	Prostaglandin G/H-Synthase
PGI ₂	Prostaglandin I ₂ , Prostazyklin
PMA	Phorbol-Myristat-Acetat
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion

SDS	Natrium-Dodecylsulfat
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
SMC	glatte Gefäßmuskelzelle(n)
Tab.	Tabelle
TBS	Trisgepufferte Kochsalzlösung
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
TF	<i>tissue factor</i>
tNSAIDs	traditionelle nichtsteroidale Antiphlogistika
Tris	Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan
TX	Thromboxan
TXA ₂	Thromboxan A ₂
TXB ₂	Thromboxan B ₂
v/v	Volumenprozent
VCAM-1	<i>vascular cell adhesion molecule-1</i>

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Cyclooxygenasen und Prostaglandine	1
1.2	Synthese von Prostaglandinen	2
1.3	Wirkungen der Prostaglandine im Gefäßsystem	2
1.4	Cyclooxygenase-Inhibitoren	4
1.4.1	Selektive Cyclooxygenase-2-Inhibitoren	5
1.4.1.1	Kardiovaskuläres Risiko von selektiven Cyclooxygenase-2-Inhibitoren	5
1.5	Einfluss COX-abhängig gebildeter Prostaglandine auf die Atherosklerose	9
1.5.1	Einsatz von ASS für die Sekundärprophylaxe von kardiovaskulären Ereignissen	10
1.6	Fragestellung	11
2	MATERIAL UND METHODEN	13
2.1	Substanzen und Lösungen	13
2.2	<i>In-Vivo</i> -Untersuchungen am Kaninchen	15
2.2.1	Versuchsplan	15
2.2.2	Blutuntersuchungen	16
2.2.2.1	Messung der Serumspiegel von Cholesterol und Triglyzeriden	16
2.2.2.2	Bestimmung von Thromboxan B ₂ als Maß für die COX-1-Aktivität	16
2.2.2.3	Bestimmung von PGE ₂ und PGI ₂ als Maß für die COX-2-Aktivität	16
2.2.3	Quantifizierung der Plaquebedeckung in der Aorta	17
2.2.4	Arteriell-thrombosemodell nach Folts	17
2.2.5	Untersuchung der Tonusänderung der Gefäßpräparate	18
2.2.6	Isolierung der Gesamt-RNA aus Gewebe der Aorta	19
2.2.7	Quantifizierung der RNA	19
2.3	<i>In-vitro</i> -Untersuchungen	20
2.3.1	Isolation und Kultivierung glatter Gefäßmuskelzellen	20
2.3.2	Kultivierung der monozytären Zelllinie U937	20
2.3.3	Beladung humaner SMC mit Cholesterol	21
2.3.4	Isolierung der Gesamt-RNA aus humanen Zellen	21
2.4	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)	22
2.4.1	RT-PCR mit Qiagen® One-Step RT-PCR Kit	23
2.4.2	Visualisierung und densitometrische Auswertung der RT-PCRs	23
2.5	Präparation und Analyse von Proteinen im Western-Blot	24
2.5.1	Auftrennung der Proteine im Polyacrylamid-Gel (SDS-PAGE)	24
2.5.2	Proteintransfer	24
2.5.3	Hybridisierung und Detektion von Proteinen	24
2.5.4	„Strippen“ von Western-Blot-Membranen	25
2.6	Öl-Rot-Färbung humaner glatter Gefäßmuskelzellen	25
2.7	Bestimmung des Cholesterolgehaltes in humanen glatten Gefäßmuskelzellen	26

2.8 Bestimmung der Konzentration von PGE₂ und PGI₂ im Zellüberstand	27
2.9 Durchflusszytometrie (FACS)	27
2.10 Adhäsion von U937-Zellen an vorbehandelte SMC unter Flussbedingungen	28
2.11 Statistik	28
3 ERGEBNISSE	29
<hr/>	
3.1 Auswirkungen der cholesterolhaltigen atherogenen Diät	29
3.1.1 Plasmalipide	29
3.1.2 Plaqueentwicklung in der Aorta	30
3.1.3 Aufregulation der COX-2 nach Cholesterolfütterung	30
3.1.4 Untersuchung des prothrombotischen Potentials im arteriellen Thrombosemodell	32
3.1.5 Endothelabhängige Relaxation der Aorta	33
3.2 Langzeiteffekte von Rofecoxib und Acetylsalicylsäure bei Standardfutter und atherogener Diät	34
3.2.1 Plasmalipide	34
3.2.2 Plaqueentwicklung in der Aorta	35
3.2.3 Aufregulation der COX-2 nach Cholesterolfütterung	36
3.2.4 Untersuchung des prothrombotischen Potentials im arteriellen Thrombosemodell	40
3.2.5 Endothelabhängige Relaxation der Aorta	42
3.3 In-vitro-Versuche zur Übertragbarkeit der tierexperimentellen Ergebnisse auf humane Zellen	43
3.3.1 Kontrolle der Cholesterolanreicherung in humanen SMC	43
3.3.1.1 Öl-Rot-Färbung	43
3.3.1.2 Bestimmung des Cholesterolgehaltes in SMC	44
3.3.2 Regulation der COX-2-Expression in SMC	45
3.3.2.1 COX-2-mRNA-Expression	45
3.3.2.2 COX-2-Protein-Expression	46
3.3.2.3 Induktion der PGI ₂ -Synthese	46
3.3.3 Adhäsion von Monozyten (U937-Zellen) an SMC unter Flussbedingungen	48
3.3.4 Expression von Adhäsionsmolekülen	49
3.3.4.1 Untersuchung der Genexpression von ICAM-1, VCAM-1 und ALCAM auf SMC	50
3.3.4.2 Oberflächenexpression von Adhäsionsmolekülen in der Durchflusszytometrie	50
3.4 Zusammenfassung der Ergebnisse	53
4 DISKUSSION	54
<hr/>	
4.1 Parameter des erhöhten kardiovaskulären Risikos durch Hypercholesterolämie	55
4.2 Einfluss einer Langzeittherapie mit Rofecoxib oder ASS auf die Gefäßfunktion	60
4.3 Einfluss einer Langzeittherapie mit Rofecoxib auf die Wirkungen von ASS	67
5 ZUSAMMENFASSUNG	70
<hr/>	
6 LITERATURVERZEICHNIS	72
<hr/>	

7 VERÖFFENTLICHUNGEN	83
7.1 Veröffentlichungen in Fachzeitschriften	83
7.2 Kurzartikel (Abstracts)	83
8 DANKSAGUNG	85
9 EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	86
10 LEBENSLAUF	87

1 EINLEITUNG

Bei ihrer Markteinführung Ende der 1990er Jahre wurden die Coxibe, wie beispielsweise Rofecoxib (Vioxx[®]), als die neuen „Super-Aspirine“ angesehen (DeWitt, 1999). Sie versprachen eine effiziente Schmerztherapie, vor allem bei rheumatischen Erkrankungen, ohne dabei die gastrointestinalen Nebenwirkungen der traditionellen nichtsteroidalen Antiphlogistika (tNSAIDs) zu verursachen (Bombardier et al., 2000). Allerdings zeigte sich bereits innerhalb weniger Jahre nach der Zulassung, dass unter Therapie mit den selektiven COX-2-Inhibitoren vermehrt Herzinfarkte auftraten.

Auf den folgenden Seiten wird erläutert, dass dieser zunächst überraschende Befund bei näherer Betrachtung möglicherweise eine Folge des besonderen Wirkmechanismus' dieser Substanzen ist.

1.1 Cyclooxygenasen und Prostaglandine

Cyclooxygenasen (COX) spielen eine bedeutende Rolle im Arachidonsäure-Stoffwechsel. In Gegenwart freier Arachidonsäure katalysieren sie die geschwindigkeitsbestimmende Reaktion in der Synthese von Prostanoiden. Seit Anfang der 1990er Jahre sind zwei verschiedene Isoenzyme bekannt: COX-1 und COX-2 (Jones et al., 1993; Kujubu et al., 1991; Xie et al., 1991).

Die COX-1 wird als so genanntes *housekeeping gene* konstitutiv exprimiert und ist hauptsächlich für die physiologischen Wirkungen der Prostanoiden verantwortlich (Otto und Smith, 1995). Das Enzym ist unter anderem in der Niere, im Magen, in Thrombozyten und im Endothel der Blutgefäße vorhanden. Das COX-1-abhängig gebildete Prostaglandin E₂ (PGE₂) fördert z.B. die Produktion des Magenschleims sowie die Magendurchblutung und wirkt dadurch magenprotektiv (Miller, 1983).

Die COX-2 ist dagegen in den meisten Geweben nicht konstitutiv exprimiert. Wichtige Ausnahmen sind beispielsweise das ZNS (Yamagata et al., 1993), die Niere (Komers und Epstein, 2002), der Magen (Zimmermann et al., 1998) und das Endothel der Blutgefäße. Hier übernimmt auch die COX-2 physiologisch wichtige Funktionen (einen Überblick liefern Lipsky et al., 2000). Zahlreiche Stimuli können die COX-2 u.a. in Endothelzellen (Jones et al., 1993), glatten Gefäßmuskelzellen (Ost et al., 1998) und Monozyten (O'Sullivan et al., 1992) induzieren. Dazu gehören inflammatorische Zytokine (Mitchell et al., 1994), Wachstumsfaktoren (DeWitt und Meade, 1993) und Endotoxine wie Lipopolysaccharid (Lee et

al., 1992). Die COX-2 spielt daher vor allem bei inflammatorischen Prozessen und bei der Mitogenese eine Rolle (Murata et al., 1997; Seibert et al., 1995).

1.2 Synthese von Prostaglandinen

Das Ausgangssubstrat für alle Prostanoiden ist die Arachidonsäure (all-cis-5,8,11,14-Eikosatetraensäure). Produkte, die im Arachidonsäure-Stoffwechsel entstehen, werden daher als Eikosanoide bezeichnet. Die Arachidonsäure wird mit Hilfe der Phospholipase A₂ aus Phospholipiden der Zellmembran freigesetzt. Der weitere Stoffwechsel erfolgt über Cyclooxygenasen, Lipoxygenasen und Epoxygenasen.

Die COX ist Teil des bifunktionalen Enzymsystems Prostaglandin G/H-Synthase (PGHS). Arachidonsäure wird mit Hilfe der COX zum Prostaglandin G₂ (PGG₂) oxidiert, woraus durch die Peroxidase der PGHS das Prostaglandin-Endoperoxid PGH₂ entsteht (Needleman et al., 1986; Smith, 1992). PGH₂ ist die gemeinsame Vorstufe der Prostanoiden, die zell- bzw. gewebespezifisch mit Hilfe spezieller Synthasen gebildet werden. Zu den wichtigsten Prostanoiden gehören die Prostaglandine (PG) PGD₂, PGE₂, PGF_{2α} und PGI₂ (Prostazyklin), sowie das Thromboxan A₂ (TXA₂) (Abb. 1.1).

Die so synthetisierten Prostaglandine verlassen die Zellen entweder über passive Diffusion oder mit Hilfe von Transportern (Reid et al., 2003) und üben ihre Wirkungen sowohl autokrin als auch parakrin über verschiedene G-Protein-gekoppelte Rezeptoren aus (Narumiya et al., 1999).

1.3 Wirkungen der Prostaglandine im Gefäßsystem

Im Gefäßsystem spielen vor allem die Prostanoiden Prostazyklin (PGI₂), PGE₂, PGF_{2α} und Thromboxan A₂ (TXA₂) eine Rolle .

TXA₂ wird mit Hilfe der COX-1 und der TXA₂-Synthase in Thrombozyten und COX-2-abhängig in Monozyten gebildet. Es aktiviert Thrombozyten und wirkt aggregationsfördernd sowie vasokonstriktorisch (Ellis et al., 1976; Hamberg et al., 1975). In SMC fördert TXA₂ die Proliferation (Grosser et al., 1997; Zucker et al., 1998) und Migration (Ratti et al., 1998).

Der funktionale Gegenspieler von TXA₂ ist PGI₂, das überwiegend über die COX-2 im Endothel der Blutgefäße gebildet wird (McAdam et al., 1999). PGI₂ gilt als der wichtigste endogene Inhibitor der Plättchenaggregation und wirkt dilatierend auf die Blutgefäße

(Moncada et al., 1976; Weiss und Turitto, 1979). Zusätzlich hemmt PGI_2 die Proliferation und Migration von SMC und trägt so zur Erhaltung des differenzierten, kontraktiven Phänotyps von SMC bei (Cheng et al., 2002; Schrör und Weber, 1997).

Neben PGI_2 ist PGE_2 das quantitativ dominierende Prostaglandin im Gefäßsystem. PGE_2 verursacht an vielen Geweben und Zellen gegensätzliche Effekte. Es kann z.B. SMC kontrahieren oder relaxieren und die Sekretion von Neurotransmittern und Hormonen sowohl stimulieren als auch hemmen. Diese konträren Wirkungen von PGE_2 sind auf seine verschiedenen Rezeptor-Subtypen (EP_1 - EP_4) zurückzuführen, die an unterschiedliche Signaltransduktionswege gekoppelt sind (Sugimoto und Narumiya, 2007).

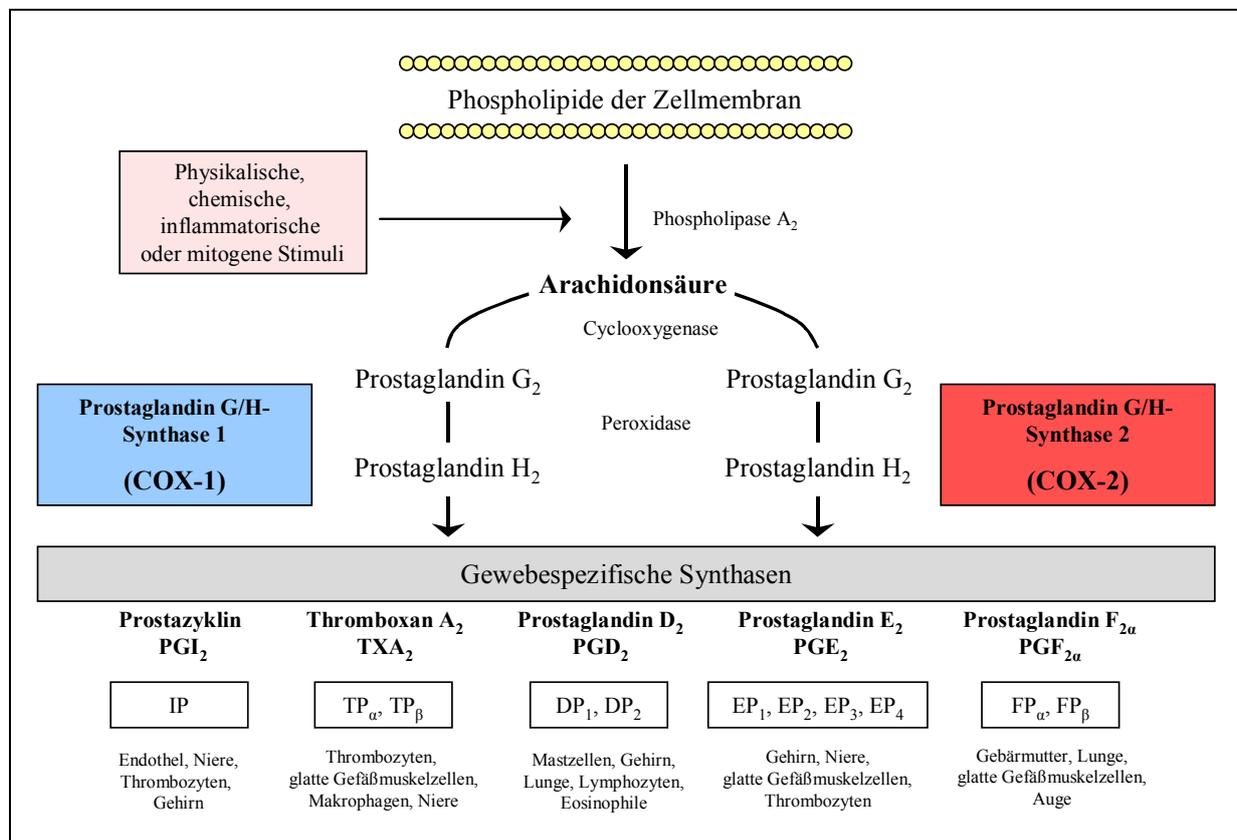


Abbildung 1.1

Biosynthese der Prostaglandine (nach FitzGerald, 2003)

Aus Phospholipiden und anderen Fetten wird Arachidonsäure freigesetzt, die mit Hilfe der Prostaglandin G/H-Synthasen zum Prostaglandin-Endoperoxid (PGH_2) metabolisiert wird. Aus dieser Vorstufe werden mittels verschiedener Synthesen die einzelnen Prostanoiden gebildet (PGD_2 , PGE_2 , $\text{PGF}_{2\alpha}$, PGI_2 , TXA_2), die über ihre jeweiligen Rezeptoren gewebespezifische Wirkungen ausüben.

1.4 Cyclooxygenase-Inhibitoren

Traditionelle nichtsteroidale antiinflammatorische Substanzen (tNSAIDs) wie z.B. Indometacin, aber auch Diclofenac oder Ibuprofen, hemmen die Prostaglandinsynthese (Vane, 1971) und wirken dadurch analgetisch, antiphlogistisch und antipyretisch.

Durch die Hemmung der COX-1 wird weniger aggregationsförderndes TXA₂ gebildet, so dass tNSAIDs aufgrund ihrer COX-1-Inhibition zusätzlich die Plättchenfunktion hemmen. Eine besondere Stellung nimmt hier die Acetylsalicylsäure (ASS) ein. Sie acetyliert das aktive Zentrum der COX-1 am Ser⁵³⁰ und hemmt das Enzym irreversibel (Roth et al., 1975; Roth und Majerus, 1975). Thrombozyten besitzen keinen Zellkern und können daher die COX-1 nicht neu synthetisieren, wodurch die Thrombozytenfunktion für die gesamte Lebensdauer der Blutplättchen (ca. 7 Tage) gehemmt ist. Acetylsalicylsäure eignet sich aus diesem Grunde zur Prophylaxe von thrombotischen Gefäßverschlüssen und wird auch nach Herzinfarkten zur Vermeidung von Rezidiven eingesetzt (Willard et al., 1992, siehe 1.5.1).

Da Prostaglandine nicht nur inflammatorische Mediatoren sind, sondern ebenfalls physiologisch wichtige Funktionen vermitteln, treten bei der Therapie mit tNSAIDs auch unerwünschte Wirkungen auf. Diese beruhen vor allem auf der Hemmung der COX-1, da dieses Isoenzym so genannte *housekeeping*-Funktionen besitzt. Eine der wichtigsten Nebenwirkungen der tNSAIDs ist in diesem Zusammenhang das Auftreten von Ulzerationen im Gastrointestinaltrakt. Der Magenschutz wird über PGE₂ vermittelt, da dies die Schleimbildung im Magen fördert, die Säuresekretion hemmt und gleichzeitig eine direkte Schutzwirkung auf die Magenmukosa ausübt ("Zytoprotektion", Miller, 1983; Robert et al., 1983). Lange Zeit galt die Theorie, dass PGE₂ im Magen nur COX-1-abhängig gebildet wird (Kargman et al., 1996).

Basierend auf dieser Annahme startete die Entwicklung von selektiven COX-2-Inhibitoren, um möglichst nur „proinflammatorische“ Prostaglandine zu hemmen und die COX-1-abhängig gebildeten Prostaglandine unbeeinflusst zu lassen. Die zugrunde liegende Arbeitshypothese, dass COX-2-abhängig gebildete Prostaglandine nur nachteilige Wirkungen haben, gilt heute als überholt. Z.B. haben Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe gezeigt, dass sich die COX-2 auch im Magen findet und dort für die Bildung gastroprotektiver Mediatoren verantwortlich ist (Zimmermann et al., 1998).

1.4.1 Selektive Cyclooxygenase-2-Inhibitoren

Die Proteinstruktur der beiden COX-Isoformen ist nahezu identisch. Beide haben einen hydrophoben Kanal, der den Zugang des Substrates zum aktiven Zentrum im Inneren des Enzyms erlaubt. Das aktive Zentrum der COX-2 ist etwas leichter zugänglich und hat eine zusätzliche Seitentasche, die es in der COX-1 nicht gibt (Abb 1.2). Die Existenz dieser Seitentasche ist die strukturelle Basis für die selektive COX-2-Inhibition (Kurumbail et al., 1996). Die relativ großen Moleküle der Coxibe haben nur im aktiven Zentrum der COX-2 ausreichend Raum, sich als „Pseudo“-Substrat einzulagern.

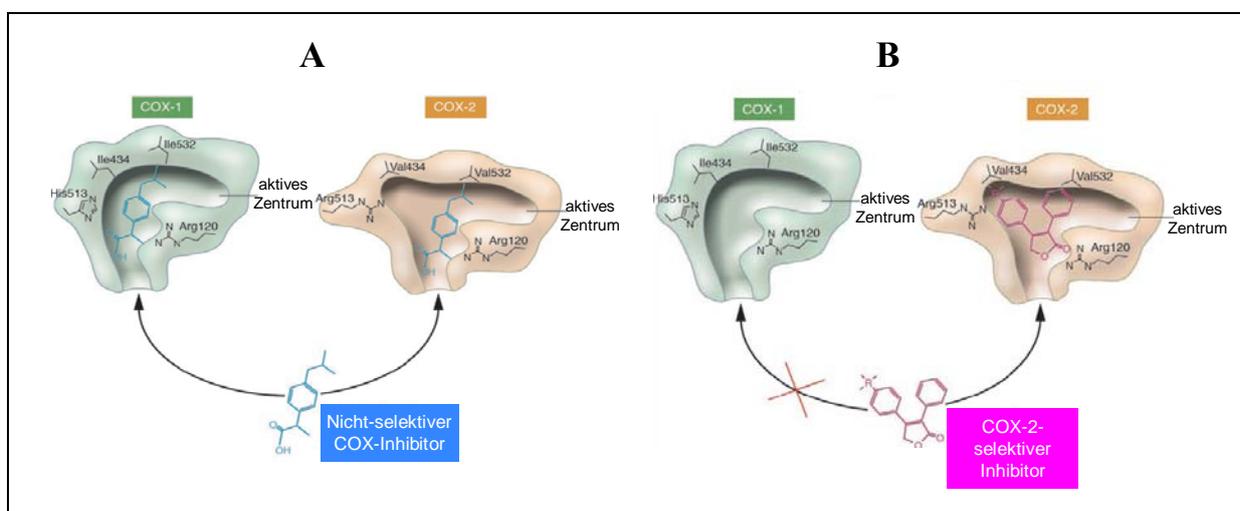


Abbildung 1.2

Unterschied im aktiven Zentrum der COX-1 und -2 (nach Grosser et al., 2006)

A: Bindung eines nicht selektiven COX-Inhibitors B: Bindung eines selektiven COX-2-Inhibitors

1.4.1.1 Kardiovaskuläres Risiko von selektiven Cyclooxygenase-2-Inhibitoren

Theoretisch betrachtet können selektive COX-2-Inhibitoren antiatherosklerotisch und damit kardioprotektiv wirken, weil sie die Synthese inflammatorischer Mediatoren, die die Progression der Atherosklerose vorantreiben (Ross, 1999), hemmen. Auf der anderen Seite inhibieren sie die PGI₂-Synthese und verschieben damit das Gleichgewicht zwischen PGI₂ und TXA₂. Bei Patienten mit fortgeschrittener Atherosklerose sind sowohl die PGI₂-Synthese im Endothel als auch die TXA₂-Synthese in den Thrombozyten deutlich erhöht (Belton et al., 2000; FitzGerald et al., 1984). Da die COX-2 als eine der Hauptquellen für PGI₂ gilt (McAdam et al., 1999), wird durch die selektive COX-2-Hemmung die Bildung des vasodilatierenden und aggregationshemmenden Prostazyklins gehemmt, während die COX-1-abhängige Synthese von TXA₂ unbeeinträchtigt bleibt. Die Folge ist eine Verschiebung des PGI₂-TXA₂-

Gleichgewichtes auf die Seite des aggregationsfördernden und vasokonstriktorischen Thromboxans (Catella-Lawson et al., 1999; McAdam et al., 1999, Abb. 1.3). Dieser Mechanismus würde auch erklären, warum es sich bei den kardiovaskulären Nebenwirkungen sehr wahrscheinlich um einen Klasseneffekt der Coxibe handelt.

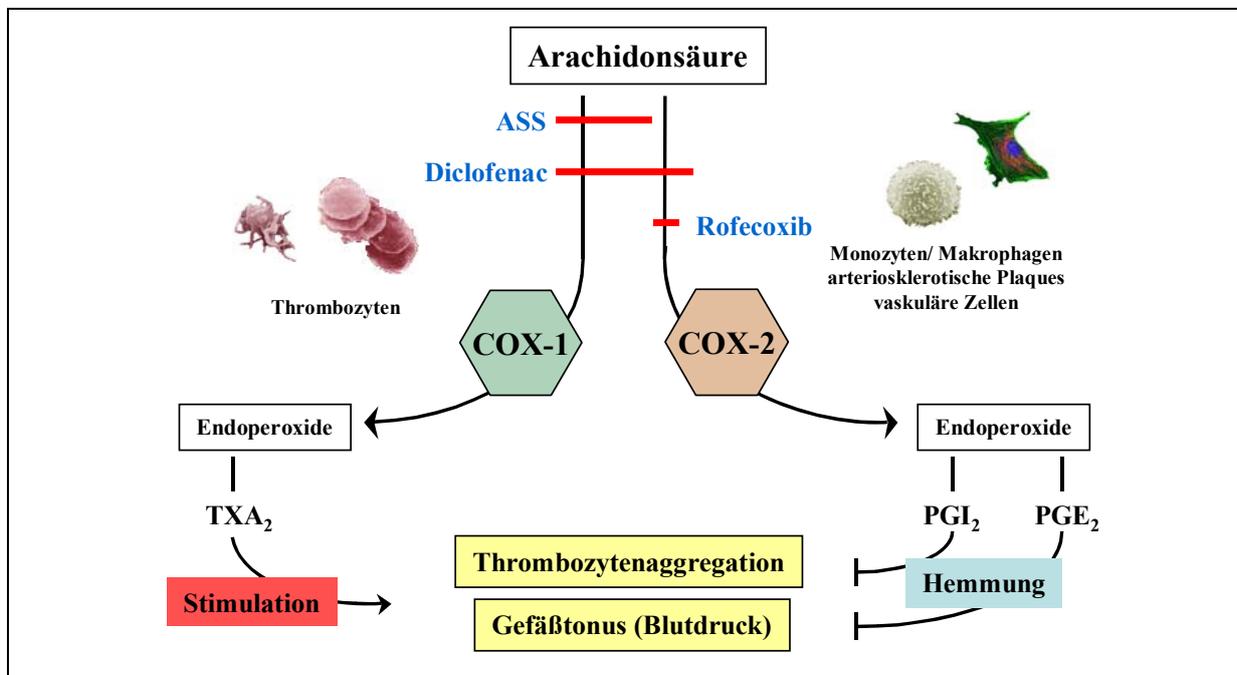


Abbildung 1.3

Arachidonsäure-Stoffwechsel im kardiovaskulären System (nach Schrör, 2004)

Arachidonsäure wird mit Hilfe der COX-1 und COX-2 zu Endoperoxiden verstoffwechselt. Aus den Endoperoxiden entstehen Thromboxan A₂ (TXA₂), Prostazyklin (PGI₂) und Prostaglandin E₂ (PGE₂). TXA₂ fördert die Thrombozytenaggregation und wirkt über eine Vasokonstriktion blutdrucksteigernd. PGI₂ und PGE₂ hemmen die Thrombozytenaggregation und wirken über eine Vasodilatation blutdrucksenkend. Acetylsalicylsäure (ASS) hemmt hauptsächlich die COX-1, Diclofenac hemmt beide Isoenzyme, Rofecoxib ist ein selektiver COX-2-Inhibitor.

Im Jahr 2000 wurde die VIGOR-Studie (*VIOXX[®] gastrointestinal outcomes research*) veröffentlicht (Bombardier et al., 2000). Darin wurde in Patienten mit rheumatoider Arthritis die gastrointestinale Langzeitverträglichkeit von Rofecoxib (50 mg/d) im Vergleich zu Naproxen (500 mg b.i.d.) untersucht. Rofecoxib führte zu einem fünffach erhöhten Risiko für einen akuten Myokardinfarkt oder plötzlichen Herztod (Curfman et al., 2006). Der Hersteller argumentierte, dass nicht Rofecoxib schädlich, sondern Naproxen protektiv auf das kardiovaskuläre System gewirkt habe. Zahlreiche Studien haben sich mit dieser Thematik beschäftigt und konnten überwiegend keine kardioprotektive Wirkung von Naproxen feststellen (Graham et al., 2005; Juni et al., 2004; Mukherjee et al., 2002; Ray et al., 2002).

Der Höhepunkt in der Diskussion um die kardiovaskulären Nebenwirkungen von Rofecoxib war im September 2004 erreicht, als Rofecoxib vom Markt genommen wurde. Anlass war die Veröffentlichung der Ergebnisse der APPROVe-Studie (*Adenomatous Polyp Prevention on VIOXX[®]*). Diese auf 3 Jahre angelegte Placebo-kontrollierte Studie musste vorzeitig abgebrochen werden, weil sich nach 18-monatiger Therapie eine Verdopplung des Herzinfarkt-Risikos durch Rofecoxib gezeigt hatte (Bresalier et al., 2005). In den ersten 18 Monaten war das kardiovaskuläre Risiko vergleichbar zur Placebo-Gruppe.

Auch für andere Coxibe konnte gezeigt werden, dass unter deren Anwendung die Rate kardiovaskulärer Nebenwirkungen ansteigt. So konnte in zwei Placebo-kontrollierten Studien (CABG I/ II; *Coronary Artery Bypass Grafting*) gezeigt werden, dass Valdecoxib und sein Prodrug Parecoxib in Hochrisikopatienten bereits nach 10-tägiger Anwendung zu einer vermehrten Anzahl an Schlaganfällen und Herzinfarkten führen (Nussmeier et al., 2005; Ott et al., 2003). Die Probanden erhielten die Coxibe als Analgetikum gegen postoperative Schmerzen nach einer Koronar-Bypass-Chirurgie.

Andere Studien konnten dagegen keinen Risikoanstieg durch COX-2-Inhibitoren feststellen. Beispielsweise beschäftigte sich die CLASS-Studie (*Celecoxib Long-term Arthritis Safety Study*) mit der gastrointestinalen Langzeitverträglichkeit von Celecoxib (Silverstein et al., 2000). Dabei zeigte sich kein erhöhtes Herzinfarkt-Risiko im Vergleich zu Ibuprofen oder Diclofenac. Allerdings besaßen die Patienten in dieser Studie auch nur ein relativ geringes basales Risiko und im Gegensatz zur VIGOR-Studie war die Einnahme von niedrig-dosierter ASS erlaubt. Außerdem besitzt Celecoxib auch nur eine relativ geringe COX-2-Selektivität, die etwa im Bereich von Diclofenac liegt. Der Wert für die COX-2-Selektivität beträgt für Celecoxib 7.6, für Diclofenac 3.0 und für Rofecoxib 35.0 (Riendeau et al., 2001). Die TARGET-Studie (*Therapeutic Arthritis Research & Gastrointestinal Event Trial*) zeigte einen nicht signifikanten Anstieg kardiovaskulärer Ereignisse nach Langzeittherapie mit Lumiracoxib gegenüber Naproxen und Ibuprofen. Bei alleiniger Auswertung der Risikopatienten zeigte sich eine signifikant höhere Inzidenz für kardiovaskuläre Ereignisse durch Lumiracoxib im Vergleich zu Naproxen (Farkouh et al., 2007). Die groß angelegte MEDAL-Studie untersuchte die kardiovaskulären Nebenwirkungen von Etoricoxib im Vergleich zu Diclofenac. Das Studienkollektiv umfasste Patienten mit rheumatoider Arthritis oder Arthrose und enthielt auch kardiovaskuläre Risikopatienten. Allerdings waren auch hier Hochrisikopatienten (Herzinfarkt oder CABG innerhalb der letzten 6 Monate) ausgeschlossen. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied bezüglich der thromboembolischen Ereignisse zwischen den beiden Gruppen. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass auch Diclofenac ein thromboembolisches

Risiko in sich birgt und damit als Vergleichssubstanz wenig geeignet ist (Hernandez-Diaz et al., 2006).

Insgesamt betrachtet steigt das Risiko für thromboembolische Nebenwirkungen mit dem basalen kardiovaskulären Risiko der Patienten und der Therapiedauer an (FitzGerald, 2004, siehe auch Tab. 1.1). Eine gewisse Ausnahme zu dieser Relation stellt die VIGOR-Studie dar. Hier traten die Nebenwirkungen schon nach 9-monatiger Therapie auf. Eine mögliche Erklärung ist das Verbot einer Komedikation von ASS, wobei Patienten mit erhöhtem kardiovaskulären Risiko in dieser Studie nicht enthalten sein sollten. Die Auswertung der Daten zeigte allerdings, dass solche Risikopatienten doch vorhanden waren und dass 38 % der Herzinfarkte bei diesen Risikopatienten auftraten. Daraufhin veranlasste der Hersteller von Rofecoxib (Vioxx[®]), dass in zukünftigen Studien ASS als Komedikation erlaubt wurde.

Studie	Medikation	Therapiedauer	basales KV Risiko	Risiko für KV Nebenwirkungen
CLASS	Celecoxib vs. Diclofenac oder Ibuprofen	1 Jahr	gering ASS erlaubt	Originaldaten (nur 6 Monate) kein erhöhtes Risiko; retrospektiv tendenziell erhöhtes Risiko
TARGET	Lumiracoxib vs. Ibuprofen oder Naproxen	1 Jahr	gering (2 % d. Patienten erhöhtes Risiko, Hochrisikopatienten ausgeschlossen); ASS erlaubt	nur tendenzieller Anstieg des Risikos
MEDAL	Etoricoxib vs. Diclofenac	18 Monate	mittel (40 % d. Patienten erhöhtes Risiko, Hochrisikopatienten ausgeschlossen); ASS erlaubt	kein erhöhtes Risiko
APPROVe	Rofecoxib vs. Placebo	3 Jahre	mittel (30 % d. Patienten erhöhtes Risiko, Hochrisikopatienten ausgeschlossen); ASS erlaubt	ca. 2x erhöhtes AMI-Risiko nach > 18 Monaten Therapie
VIGOR	Rofecoxib vs. Naproxen	9 Monate	mittel (Hochrisikopatienten ausgeschlossen); ASS nicht erlaubt	5x erhöhtes AMI-Risiko
CABG I/II	Pare-/ Valdecoxib vs. Placebo	10 Tage	sehr hoch (Patienten nach Koronarby-pass-OP) alle Pat. erhielten ASS	ca. 4x erhöhtes Risiko

Tabelle 1.1

Übersicht über klinische Studien mit selektiven COX-2-Inhibitoren

Das Risiko für kardiovaskuläre Nebenwirkungen steigt mit dem basalen Risiko der Patienten und der Therapiedauer (KV – kardiovaskulär, AMI – akuter Myokardinfarkt, Hochrisikopatienten hatten innerhalb der letzten 6 Monate vor Studienbeginn einen AMI oder andere akute thrombotische Ereignisse).

1.5 Einfluss COX-abhängig gebildeter Prostaglandine auf die Atherosklerose

Die Atherosklerose gehört zu den chronisch entzündlichen Erkrankungen (Ross, 1999). Daher stellt sich die Frage, welche Rolle die COX-2 in der Pathogenese der Atherosklerose spielt.

Im gesunden Gefäßendothel ist die COX-2 nur sehr schwach exprimiert. Sie kann aber durch laminaren Scherstress (Topper et al., 1996) und in atherosklerotischen Läsionen (Schönbeck et al., 1999) adaptiv aufreguliert werden. Außerdem ist die COX-2-abhängige PGI₂-Synthese unter inflammatorischen Bedingungen gesteigert (Belton et al., 2000). Die erhöhten PGI₂-Spiegel führen unter anderem zur verminderten Proliferation von SMC und zur Inhibierung der Thrombozytenaggregation. Beides wirkt der Progression der Atherosklerose entgegen (Kowala et al., 1993).

Die einzelnen COX-2-abhängig gebildeten Prostanoiden haben einen unterschiedlichen Einfluss auf die Entwicklung der Atherosklerose. Da sie je nach Zelltyp verschieden stark synthetisiert werden, hängt es vom vorherrschenden Zelltyp ab, welchen Einfluss die COX-2 auf die Progression der Atherosklerose hat.

Beispielsweise unterdrückt PGE₂ über die Bindung an den EP₄-Rezeptor die monozytäre Zytokin-Produktion (Takayama et al., 2002). Zusätzlich hemmt es die Proliferation und Migration von SMC (Goncharova et al., 2003; Wong et al., 2001) und verlangsamt somit das Fortschreiten der Atherosklerose. Andererseits wurde gezeigt, dass PGE₂ in der Schulterregion von atherosklerotischen Plaques zur Aufregulation von Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) führt (Cipollone et al., 2001) und damit die Ruptur von instabilen Plaques begünstigt.

PGI₂ wirkt antiadhäsiv (Kobayashi et al., 2004) und stabilisiert den differenzierten, kontraktilen Phänotyp der SMC. Es konnte gezeigt werden, dass der Verlust des IP-Rezeptors zu einer Beschleunigung der Atherosklerose führt (Egan et al., 2004; Kobayashi et al., 2004). Der Verlust des IP-Rezeptors führt zudem zu einer erhöhten Sensibilität für thrombogene Stimuli, wobei das Risiko für spontane Thrombosen nicht erhöht ist (Murata et al., 1997).

Das vorrangig COX-1-abhängig gebildete TXA₂ hat proatherosklerotische Wirkungen. Der Verlust des TP-Rezeptors verlangsamt die Entwicklung der Atherosklerose (Kobayashi et al., 2004) und auch die Blockade von Thromboxan-Rezeptoren hemmt die Atherogenese (Cayatte et al., 2000; Worth et al., 2005). Möglicherweise spielen dabei neben TXA₂ auch andere Liganden des TP-Rezeptors (z.B. Isoprostane) eine Rolle, indem sie die Expression von Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule-1*) vermindern (Egan et al., 2005).

1.5.1 Einsatz von ASS für die Sekundärprophylaxe von kardiovaskulären Ereignissen

TXA₂ ist der wichtigste Stimulus für die Plättchenaktivierung und -aggregation und trägt damit signifikant zur Thrombusbildung und Progression der Atherosklerose bei. Da TXA₂ überwiegend COX-1-abhängig gebildet wird, stellt sich die Frage, inwieweit COX-Hemmer zur Prophylaxe bzw. zum Aufhalten der Atherogenese geeignet sind.

Die TXA₂-Synthesekapazität der Plättchen muss zu mindestens 95 % gehemmt sein, damit eine Hemmung der TXA₂-abhängigen Thrombozytenaggregation erreicht werden kann (Reilly und FitzGerald, 1987). Die meisten tNSAIDs erreichen nur kurzfristig eine vollständige Hemmung der TXA₂-Synthese, da sie reversibel an das Enzym binden und ihre Halbwertszeit das Dosierungsintervall nicht abdeckt. Das bedeutet, dass die COX-1 wieder TXA₂ bilden kann, bevor die nächste Dosis appliziert wird. Diese tNSAIDs sind daher nicht für die Hemmung der Plättchenaggregation und zur Kardioprotektion geeignet (Garcia Rodriguez et al., 2000).

Genau hier liegt der Vorteil von ASS. ASS hat zwar auch nur eine Halbwertszeit von wenigen Minuten, diese reicht aber aus, um die COX-1 zu acetylieren und damit irreversibel zu hemmen. Die Acetylierung erfolgt am Ser⁵³⁰, wodurch der Zugang der Arachidonsäure zum aktiven Zentrum sterisch blockiert wird (Loll et al., 1995). Aufgrund der irreversiblen Bindung kann die Funktion der COX nur durch Neusynthese des Enzymproteins wiederhergestellt werden.

Da Thrombozyten über keinen Zellkern verfügen und sie die COX daher nicht neu bilden können, ist die TXA₂-Synthese und damit die Möglichkeit zur Aggregation für die gesamte Lebensdauer von ca. 7 Tagen blockiert. Mit der chronischen Applikation von ASS kann somit eine nahezu komplette Hemmung der TXA₂-Synthese erreicht werden (Patrignani et al., 1982; Patrono et al., 2005). Für diesen Effekt reichen im experimentellen Ansatz mit 30 mg ASS/Tag schon Dosierungen aus, die weit unterhalb der analgetischen und antiphlogistischen Dosierung liegen.

Der aggregationshemmende Effekt von ASS führte dazu, dass ASS heute das am breitesten genutzte Medikament zur Sekundärprophylaxe von Myokardinfarkten ist (Gonzalez, 1998). Metaanalysen haben ergeben, dass ASS das Risiko, einen zweiten Myokardinfarkt oder Schlaganfall zu erleiden, um ca. 25 % reduziert (*Antithrombotic trialists*, 2002).

Catella-Lawson et al. haben gezeigt, dass die aggregationshemmende Wirkung von ASS durch die gleichzeitige Therapie mit anderen tNSAIDs, vor allem Ibuprofen, vermindert werden kann (Catella-Lawson et al., 2001). Dieser Effekt beruht auf einer durch Ibuprofen verursachten sterischen Blockade des Zugangs zum Ser⁵³⁰. Damit kann die COX-1 nicht mehr acetyliert werden und der antiaggregatorische Effekt von ASS unterbleibt.

1.6 Fragestellung

Nach aktueller Studienlage ist wahrscheinlich, dass es unter Therapie mit selektiven COX-2-Inhibitoren verstärkt zu Herzinfarkten und möglicherweise auch Schlaganfällen kommt. Dabei spielt das schon vorhandene kardiovaskuläre Risikoprofil eine entscheidende Rolle. Je höher das basale Risiko des Patienten ist, desto größer ist das Risiko für vaskuläre Nebenwirkungen von Coxiben (Fries und Grosser, 2005; Grosser et al., 2006). Bisher ist aber noch nicht vollständig geklärt, welcher Mechanismus für diese Nebenwirkungen verantwortlich ist. Einerseits ist die potentiell prothrombotische Wirkung der Coxibe aus ihrem pharmakologischen Wirkprofil ableitbar, da sie das Gleichgewicht zwischen PGI₂ und TXA₂ beeinflussen. Ob die Langzeitbehandlung mit Rofecoxib darüber hinaus auch direkte Wirkungen auf die Atheroskleroseentwicklung hat, ist im einzelnen nicht bekannt und sollte in dieser Arbeit näher untersucht werden.

Zu diesem Zweck wurden Weiße Neuseeland Kaninchen 12 Wochen lang mit einer cholesterolreichen Diät gefüttert. Zusätzlich wurden die COX-Inhibitoren ASS und/oder Rofecoxib appliziert. Um zu prüfen, inwieweit die Ergebnisse des Tierversuches auf den Menschen übertragbar sind, wurden im zweiten Teil der Arbeit humane aortale glatte Gefäßmuskelzellen mit Cholesterol und COX-Inhibitoren inkubiert.

Folgende Fragestellungen sollten untersucht werden:

1. Hat der antiinflammatorische COX-2-Inhibitor Rofecoxib einen Einfluss auf die Entwicklung der Atherosklerose?
Folgende Parameter waren dabei von Interesse: die Plaqueentwicklung in der Aorta, die endothelabhängige Relaxation als Maß für die endotheliale Dysfunktion und die Thrombusbildung nach experimenteller Endothelschädigung.
2. Der COX-Inhibitor ASS wird erfolgreich zur Prophylaxe vaskulär thrombotischer Ereignisse eingesetzt. Daneben ist bekannt, dass andere tNSAIDs, v.a. Ibuprofen, die Wirkung von ASS beeinträchtigen können. Daher war es von großem Interesse, ob die Langzeittherapie mit Rofecoxib einen Einfluss auf die antiatherosklerotischen Eigenschaften von ASS hat.

3. Unter kontrollierten *in-vitro*-Bedingungen sollte die Wirkung von Rofecoxib auf Surrogatparameter der Atherosklerose untersucht und damit die Übertragbarkeit der tierexperimentellen Befunde auf humane Zellen überprüft werden. Hierfür war die Adhäsion von Monozyten an glatte Gefäßmuskelzellen, sowie die Expression von Adhäsionsmolekülen von Interesse.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Substanzen und Lösungen

Alle nicht gesondert aufgeführten Chemikalien und Lösungsmittel wurden in höchster verfügbarer Qualität von den Firmen Merck (Darmstadt), Sigma-Aldrich (Deisenhofen) oder Roth (Karlsruhe) bezogen. Die verwendeten Puffer und Lösungen sind in Tab. 2.1 dargestellt.

Tabelle 2.1: Zusammensetzungen der verwendeten Puffer und Lösungen

Blaumarker (10x)	30 % Glycerol; 0.04 % Bromphenolblau
Blot-Puffer	190 mM Glycin; 25 mM Tris; 20 % (v/v) Methanol
Krebs-Henseleit-Puffer	118.3 mM NaCl; 4.7 mM KCl; 2.5 mM CaCl ₂ ; 1.2 mM MgSO ₄ ; 1.2 mM KH ₂ PO ₄ ; 5.0 mM Glukose; 24.9 mM NaHCO ₃
Laemmli-Puffer (2x)	125 mM NaHPO ₄ / NaH ₂ PO ₄ (pH 7.0); 100 mM DL-Dithiothreitol; 20 % (v/v) Glycerin; 4 % (m/v) SDS; 0.002 % Bromphenolblau
Laufpuffer	190 mM Glycin; 25 mM Tris; 0.1 % SDS
Öl-Rot-Färbelösung	1 % (m/v) Öl-Rot in 50 %igem (v/v) Isopropanol
Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS)	137 mM NaCl; 9.6 mM Na ₂ HPO ₄ ; 2.7 mM KCl; 1.5 mM KH ₂ PO ₄ (pH 7.4)
Sammelgelpuffer	0.5 mM Tris/HCl (pH 6.8)
“Stripping”-Puffer	100 mM Glycin (pH 2.85); 1 % (v/v) Tween™ 20; 0.1 % (m/v) SDS
TBST	150 mM NaCl; 10 mM Tris/HCl (pH 7.4); 0.1 % (v/v) Tween™ 20
TBSTM	TBST; 5 % (m/v) Milchpulver
Trenngelpuffer	1.5 mM Tris/HCl (pH 8.8)

Folgende Substanzen wurden im Gefäßbadversuch und in der Zellkultur eingesetzt (Tab. 2.2 und 2.3).

Tabelle 2.2: Im Gefäßbad verwendete Substanzen

Substanz	Wirkung	Hersteller
Acetylcholin	endothelabhängige NO-Freisetzung	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid	rezeptorunabhängige Gefäßkontraktion	Merck, Darmstadt
Phenylephrin	α_1 -Sympathomimetikum (Vasokontraktion)	Boehringer Ingelheim, Ingelheim
Prostaglandin F _{2α}	FP-Agonist (Vasokontraktion)	Minprostin [®] F _{2α} Ampullen, Pharmacia, Karlsruhe

Tabelle 2.3: Im Zellversuch verwendete Substanzen

Substanz	Wirkung	Hersteller
Aspirin [®] i.v.	COX-Inhibitor (COX-1 > COX-2)	Bayer, Leverkusen
Cholesterol, „wasserlöslich“ (Komplex mit Methyl- β - Cyclodextrin)	Cholesterolanreicherung in Zellen	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Methyl- β -Cyclodextrin	Lösungsvermittler und „Transporter“ für Cholesterol	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
PMA	PKC-Aktivator	Alexis, Grünberg
Rofecoxib	selektiver COX-2-Inhibitor	WITEGA Laboratorien Berlin-Adlersdorf GmbH

2.2 *In-Vivo*-Untersuchungen am Kaninchen

2.2.1 Versuchsplan

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Tierversuche wurden Weiße Neuseeland Kaninchen verwendet. Die Tiere (n=54) wurden randomisiert in 7 Gruppen eingeteilt und erhielten für 12 Wochen entweder Standardpellets (Artikelnummer 2023, Altromin, Lage) oder Pellets, in die zusätzlich 1 % Cholesterol einpelletiert wurde. Zusätzlich erhielten die Tiere, je nach Gruppenzugehörigkeit, zweimal täglich verschiedene COX-Inhibitoren: Acetylsalicylsäure (ASS), Rofecoxib oder eine Kombination aus ASS und Rofecoxib. ASS wurde dem Trinkwasser zugesetzt. Zur Gewährleistung einer besseren Substanzaufnahme wurde den Tieren über Nacht das Trinkwasser entzogen und die Substanz am nächsten Morgen einer geringen Menge Trinkwasser zugefügt, die die Tiere innerhalb kurzer Zeit aufgebraucht hatten. Anschließend erhielten die Tiere bis zum Abend Wasser *ad libitum*. Rofecoxib wurde morgens und abends in Form einer Suspension zugefüttert.

Tabelle 2.4: Einteilung der Versuchsgruppen

Gruppe	Diätform	Substanz	Dosierung
KON	Standardfutter	-	-
ROFE	Standardfutter	Rofecoxib (Vioxx [®])	25 mg/kg (b.i.d.)
CHOL	atherogene Diät	-	-
CHOL ASS	atherogene Diät	Acetylsalicylsäure (Aspisol [®])	5 mg/kg (b.i.d.)
CHOL Rofe	atherogene Diät	Rofecoxib (Vioxx [®])	25 mg/kg (b.i.d.)
CHOL Kombi	atherogene Diät	Acetylsalicylsäure + Rofecoxib	5 mg/kg (b.i.d.) + 25 mg/kg (b.i.d.)

Die relativ hohe Dosierung für Rofecoxib ergab sich aus Blutspiegelkurven im Kaninchen, die dem BfArM vorlagen und von diesem übernommen wurden (Information: Dr. H.-K. Heim). Mit den eingesetzten Substanzmengen sollten Plasmaspiegel erreicht werden, die auch beim Menschen unter Rofecoxib-Therapie (25-50 mg/Tag) zu erwarten sind.

Die letzte Substanzgabe erfolgte spätestens 3 Stunden vor Versuchsbeginn.

Alle tierexperimentellen Versuche (Fütterung und Akutversuche) sind vom Thüringer Landesamt für Lebensmittelsicherheit und Verbraucherschutz, Abteilung 2: Gesundheitlicher

Verbraucherschutz, Veterinärwesen, Dezernat 22: Fachgebiet Tierschutz, unter der Reg.Nr. 02-22-02 genehmigt worden und wurden in Erfurt im „Institut für Vaskuläre Medizin der Medizinischen Fakultät der FSU Jena“ durchgeführt.

2.2.2 Blutuntersuchungen

2.2.2.1 Messung der Serumspiegel von Cholesterol und Triglyzeriden

Die Messung der Lipidkonzentrationen im Serum der Tiere wurde im Institut für Klinische Chemie der FSU Jena an einem Synchron LX[®] 20 (Beckman Coulter Inc., Fullerton/USA) durchgeführt.

2.2.2.2 Bestimmung von Thromboxan B₂ als Maß für die COX-1-Aktivität

Die Messung der Thromboxan-(TX)-Synthese erfolgte durch Bestimmung der Thromboxan-B₂-(TXB₂)-Konzentration im Serum. TXB₂ ist der stabile Metabolit von TXA₂. Mit dem hier verwendeten Verfahren wird die TX-Synthesekapazität der Thrombozyten erfasst. Frisch gewonnenes Blut wurde bis zur vollständigen Koagulation 60 min bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die zellulären Bestandteile durch Zentrifugation (10 min, 1000 g) abgetrennt und das Serum abpipettiert. Nach Zugabe von Indometacin (10 µg/ml) wurde das Serum bei -20 °C bis zur TXB₂-Messung eingefroren. Die TXB₂-Messung erfolgte mittels Radio-Immuno-Assay (RIA) unter Verwendung selbst hergestellter Antikörper (Schrör und Seidel, 1988).

2.2.2.3 Bestimmung von PGE₂ und PGI₂ als Maß für die COX-2-Aktivität

Die Messung der monozytären PGE₂-Synthese erfolgte mittels ELISA (R&D Systems, Wiesbaden) im Blutplasma der Tiere *ex vivo* nach 24-stündiger Lipopolysaccharid-Stimulation (10 µg/ml). Die Konzentration von 6-Keto-PGF_{1α}, dem stabilen Hydrolyseprodukt von PGI₂, wurde mittels RIA im Serum bestimmt (Panara et al., 1995).

2.2.3 Quantifizierung der Plaquerbedeckung in der Aorta

Nach der Präparation der Aorta wurde diese mit PBS gespült und anschließend mit Formalin fixiert. Die Aorta wurde longitudinal geöffnet, aufgeklappt und auf einer glatten Unterlage fixiert. Die cholesterolhaltigen Plaques wurden mit Sudan IV gefärbt (Paigen et al., 1987) und die plaquebedeckten Flächen planimetrisch ausgewertet.

2.2.4 Arteriell-thrombotisches Modell nach Folts

Das von Folts an der Koronararterie des Hundes entwickelte Modell einer arteriellen Thrombose nach experimenteller Endothelschädigung (Folts, 1991) wurde auf die Verhältnisse an der *Arteria carotis communis* des Kaninchens adaptiert.

Die Tiere wurden mit Pentobarbital-Natrium narkotisiert (35 mg/kg als Bolusinjektion, gefolgt von einer Infusion mit 6 mg/kg/h), bevor die rechte *A. carotis* präpariert wurde. Die Messung des Blutflusses erfolgte mit Hilfe einer Doppler-Strömungssonde, die am Blutgefäß angebracht wurde. Distal zur Sonde wurde die *A. carotis* mit einer Gummi-ummantelten Gefäßklemme abgeklemmt, um einen Schaden am Endothel zu erzeugen. Danach wurde in diesem Bereich ein zylindrischer Plastikring um das Gefäß gelegt, wodurch eine Stenose erzeugt und der Blutfluss in der *A. carotis* um ca. 30 - 40 % reduziert wurde. Die Aufzeichnung des Blutflusses erfolgte kontinuierlich für 60 min. In Vorversuchen hatte sich diese Messperiode als optimal erwiesen. Für die unten beschriebene Auswertung wurde jeweils die Fläche unter der aufgezeichneten Kurve des Blutflusses (AUC) ermittelt (Leica Q500/W Software, Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland). Die Ergebnisse werden als Arbeitseinheiten (AE) dargestellt. Je größer die AUC, desto weniger Thromben führten zu einem Verschluss des Gefäßes. Ein Sistieren des Blutflusses für mehr als eine Minute wurde als kompletter Gefäßverschluss durch einen okkludierenden Thrombus gewertet.

Dieser Teil der Versuche wurde von Frau PD Dr. Brigitte Kaiser (Institut für Vaskuläre Medizin, Universität Jena) durchgeführt.

2.2.5 Untersuchung der Tonusänderung der Gefäßpräparate

Die mit Pentobarbital narkotisierten Tiere wurden mit 1000 I.E./kg Heparin (Liquemin[®]) antikoaguliert und über die *Arteria carotis communis* entblutet. Nach Öffnung des Brustkorbes wurden jeweils 1-2 cm lange Stücke der *Aorta abdominalis* entnommen und in kalten Krebs-Henseleit-Puffer überführt. Die Gefäße wurden in ca. 3 mm breite Ringe geschnitten und die Hälfte der Ringe mit Hilfe eines Pfeifenreinigers mechanisch vom Endothel befreit. Die Gefäßringe wurden zwischen zwei feinen Wolframdrähten gespannt, so dass eine isometrische Messung der Kraftentwicklung möglich wurde.

Einer der beiden Wolframdrähte war als Widerlager fest montiert, wohingegen der andere über einen Nylonfaden mit einem Transducer zur isometrischen Messung der Kraftentwicklung (Statham Transducer U2; Statham Instruments, Oxnard, CA, USA) verbunden war. Die mechanischen Kräfte wurden in elektrische Signale umgewandelt, verstärkt und kontinuierlich auf einem 6-Kanalschreiber (Watanabe, Mark V, HSE Freiburg) mit einer Papiervorschubgeschwindigkeit von 1 mm/min registriert.

Die Aortenringe wurden mit einer Vorlast von 20 mN vorgedehnt. Der Krebs-Henseleit-Puffer im Gefäßbad hatte eine konstante Temperatur von 37 °C und wurde kontinuierlich mit Carbogen (95 % O₂, 5 % CO₂) begast. Während der 80-90-minütigen Equilibrierung wurde der Puffer in Abständen von 30 min gewechselt, um eine Akkumulation von Metaboliten zu verhindern. Falls erforderlich, wurde die Vorlast nachreguliert.

Zwischen den einzelnen Experimenten wurden die zugesetzten Substanzen durch mehrfaches Auswaschen mit 37 °C warmem, begastem Krebs-Henseleit-Puffer aus dem Gefäßbad entfernt.

Zunächst wurden die Gefäßsegmente mit 67 mM Kaliumchlorid (KCl) kontrahiert, um die Maximalkontraktion zu bestimmen. Nach dem Auswaschen erfolgte die Vorkontraktion der Gefäße mit 10 µM Prostaglandin F_{2α} (PGF_{2α}) oder 1 µM Phenylephrin und die Messung der endothelabhängigen Relaxation mit 0.1 µM Acetylcholin (ACh).

Alle hier angegebenen Konzentrationen entsprechen der Endkonzentration im Gefäßbad.

2.2.6 Isolierung der Gesamt-RNA aus Gewebe der Aorta

Aortenabschnitte wurden für die RNA-Isolierung zunächst in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und anschließend in einer ebenfalls in flüssigem Stickstoff gekühlten Form pulverisiert und in sterile Eppendorf-Gefäße überführt. Die Präparation der Gesamt-RNA erfolgte durch Zugabe von 1 ml Tri-Reagent (Sigma-Aldrich, Deisenhofen) pro 100 mg Gewebe. Nach 30-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Gewebe-Lysate mit 200 µl Chloroform/ml Tri-Reagent versetzt, ausgeschüttelt, 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 10 min bei Raumtemperatur zentrifugiert (10.000 g). Die Fällung der RNA aus dem wässrigen Überstand erfolgte mit 400 µl Isopropanol/ml Tri-Reagent bei 4 °C über Nacht und anschließender Zentrifugation für 20 min (12.000 g, 4 °C). Das erhaltene RNA-Pellet wurde mit 500 µl Ethanol (70 %, v/v) gewaschen und erneut für 10 min zentrifugiert (12.000 g, 4 °C). Danach wurde das RNA-Pellet an der Luft getrocknet, in RNase-freiem Wasser gelöst und bei -80 °C aufbewahrt.

2.2.7 Quantifizierung der RNA

Die Konzentration und Reinheit der isolierten RNA wurde durch Messung der Absorption bei 260 nm und 280 nm in einem Genequant II DNA/RNA Calculator (Amersham, Pharmacia Biotech, Freiburg) bestimmt. Der Quotient aus den beiden Absorptionswerten (ratio 260 nm/280 nm) bietet eine Abschätzung der RNA-Reinheit und sollte zwischen 1,5 und 2 liegen. 1 OD₂₆₀ = 40 µg/ml RNA.

2.3 *In-vitro*-Untersuchungen

Die für die Zellkultur verwendeten Substanzen wurden von Gibco BRL Life Technologies (Invitrogen, Karlsruhe), Zellkulturgefäße von den Firmen Becton-Dickinson (Heidelberg) und Greiner (Solingen) bezogen.

2.3.1 Isolation und Kultivierung glatter Gefäßmuskelzellen

Glatte Gefäßmuskelzellen des Menschen (SMC) wurden uns freundlicherweise aus dem Labor von Alexander Clowes (University of Washington, Seattle) zur Verfügung gestellt. Die Kultivierung erfolgte in DMEM mit 15 % FCS, 100 U/ml Penicillin, 0.1 mg/ml Streptomycin und Glukosezusatz (gesamt 4.5 g/l) bei 37 °C unter Begasung mit 5 % CO₂. Nach Erreichen von Subkonfluenz wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA (0.05 % /0.5 mM) passagiert. Für die Versuche wurden SMC der Passagen 5-9 verwendet.

Vor der Stimulation mit den angegebenen Substanzen wurden alle Zellen, soweit nicht anders vermerkt, nach einmaligem Waschen mit PBS für 48 h in serumfreiem DMEM mit 100 U/ml Penicillin und 0.1 mg/ml Streptomycin, sowie Glukosezusatz (gesamt 4.5 g/l) inkubiert. Das serumfreie DMEM wurde nach 24 h erneuert.

2.3.2 Kultivierung der monozytären Zelllinie U937

Die Kultivierung der U937-Zellen (1593, ATCC, LGC Promochem, Wesel) erfolgte in *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) Glutamax Medium (Gibco, Invitrogen, Karlsruhe), supplementiert mit 10 % FCS, 100 U/ml Penicillin und 0.1 mg/ml Streptomycin, bei 37 °C und unter Begasung mit 5 % CO₂.

2.3.3 Beladung humaner SMC mit Cholesterol

Da Cholesterol nicht wasserlöslich ist und somit nicht direkt zur *in-vitro*-Stimulation eingesetzt werden kann, wurde der in der Literatur beschriebene Komplex aus Methyl- β -Cyclodextrin (M β -CD) und Cholesterol genutzt (Rong et al., 2003), um die Zellen mit Cholesterol anzureichern. M β -CD dient dabei zum einen als Lösungsvermittler und hat zum anderen auch die Funktion, das Cholesterol durch die Zellmembran in das Zytosol zu transportieren.

Für die folgenden Versuche wurde der M β -CD-Cholesterol-Komplex in einer Konzentration eingesetzt, die der Cholesterolkonzentration von 10 μ g/ml entspricht. Als Kontrolle wurde M β -CD in einer der eingesetzten Komplexmenge entsprechenden Konzentration (~ 22 mg/ml) mitgeführt.

2.3.4 Isolierung der Gesamt-RNA aus humanen Zellen

Die Isolierung der Gesamt-RNA aus kultivierten humanen Zellen erfolgte mittels Tri-Reagent (Sigma-Aldrich, Deisenhofen). Die Zellen wurden direkt nach Abnahme des Mediums in der Kulturschale durch Zugabe von Tri-Reagent (100 μ l/cm²) lysiert. Alle folgenden Schritte erfolgten wie unter 2.2.6 und 2.2.7 beschrieben. Die Proben wurden bei -20 °C gelagert.

2.4 Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Die RT-PCRs erfolgten in einem TRIO-Thermo-Cycler (Biometra, Göttingen). Die für die Amplifizierung der cDNA verwendeten Oligonukleotid-Primer wurden von Invitrogen (Karlsruhe) synthetisiert. Alle gezeigten RT-PCRs wurden mit dem Qiagen[®] One-Step RT-PCR Kit (Qiagen, Hilden) durchgeführt. Als interner Standard diente die Expression des Enzyms Glycerol-Aldehyd-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH).

Folgende Primer wurden für die RT-PCRs eingesetzt:

Tabelle 2.5: verwendete RT-PCR-Primer

Gen	Primer-Sequenz	Größe des PCR-Fragmentes (bp)	Annealing-Temperatur (°C)
rGAPDH	<i>s</i> 5'-AAGTTCCACGGCACGGTCAAGG-3' <i>as</i> 5'-GTTGGTGGTGCAGGATGCGTTG-3'	302	58
rCOX-2	<i>s</i> 5'-CCACGCCGGAATTTCTGACC-3' <i>as</i> 5'-TGGGTGAAGTGCTGGGCAAAG-3'	414	58
hGAPDH	<i>s</i> 5'-TGATGACATCAAGAAGGTGGTGAA-3' <i>as</i> 5'-TCCTTGGAGGCCATGTAGGCCAT-3'	238	55-58
hCOX-2	<i>s</i> 5'-AATGAGTACCGCAAACGCTTTATG-3' <i>as</i> 5'-CATCTAGTCCGGAGCGGGAAGAAC-3'	421	55
hICAM-1	<i>s</i> 5'-GCAAGAAGATAGCCAACCAA-3' <i>as</i> 5'-GAGAAGGAGTCGTTGCCATA-3'	561	58
hVCAM-1	<i>s</i> 5'-ATGGGAAGGTGACGAATGAG-3' <i>as</i> 5'-TTCTTGCAGCTTTGTGGATG-3'	512	58
hALCAM	<i>s</i> 5'-CAAGACAACCAAGGCTGACA-3' <i>as</i> 5'-CGCAGACATAGTTTCCAGCA-3'	557	58

(s – sense; as – antisense; r – rabbit; h – human; bp – Basenpaare)

2.4.1 RT-PCR mit Qiagen® One-Step RT-PCR Kit

Als Template für die RT-PCR dienten jeweils 250 ng RNA. Die jeweiligen RT-PCR-Bedingungen hinsichtlich Primer-Verhältnis, Annealing-Temperatur und Zyklenzahl sind in Tab. 2.6 angegeben.

Tabelle 2.6: Primerbedingungen

PCR-Name	Primer GAPDH	Primer Gen	Annealing-Temperatur	Zyklenzahl
rabbit COX-2	0.2 µM	0.6 µM	58 °C	30
human COX-2	0.2 µM	0.6 µM	55 °C	30
human VCAM-1	0.3 µM	0.6 µM	58 °C	33
human ICAM-1	0.3 µM	0.6 µM	58 °C	33
human ALCAM	0.4 µM	0.6 µM	58 °C	30

2.4.2 Visualisierung und densitometrische Auswertung der RT-PCRs

Zur Visualisierung wurden jeweils 10 µl des RT-PCR-Ansatzes mit 2 µl Blaumarker versetzt und in 1.5 %igen Agarose-Gelen unter Zusatz von Ethidiumbromid (0.4 µg/ml) elektrophoretisch aufgetrennt. Die DNA-Banden wurden durch Bestrahlung mit UV-Licht (312 nm) sichtbar gemacht. Die densitometrische Auswertung der Intensitäten der DNA-Banden erfolgte mit einer Geldoc™ 1000 Apparatur und der Software Quantity One® Version 4.1.0/Geldoc (BioRad, München). Für jede Probe wurde der Quotient aus den Intensitäten des zu untersuchenden Gens und der GAPDH als internem Standard gebildet. Der Wert nicht-stimulierter Zellen wurde als „1“ festgesetzt und die Werte der stimulierten Zellen auf diese Kontrolle bezogen. In den Abbildungen sind diese Werte als relative mRNA-Expression angegeben.

2.5 Präparation und Analyse von Proteinen im Western-Blot

2.5.1 Auftrennung der Proteine im Polyacrylamid-Gel (SDS-PAGE)

Die Auftrennung der Proteine aus dem Zell-Lysat erfolgte nach dem Prinzip der diskontinuierlichen Gelelektrophorese (Laemmli, 1970). Dazu wurde zunächst ein Trenngel (10 % Polyacrylamid) gegossen, das dann mit einem Sammelgel (2.5 % Polyacrylamid) überschichtet wurde. Der Gellauf erfolgte mit Laufpuffer bei 120 - 200 V in einer BioRad Elektrophoresekammer (BioRad, München). Als Molekulargewichtsmarker diente ein Proteinstandard (~ 10 - 180 kDa; Fermentas, St. Leon-Roth).

2.5.2 Proteintransfer

Die aufgetrennten Proteine wurden mittels einer „*Semi-Dry*“-Blotting Apparatur (BioRad, München) auf eine Polyvinyliden-Difluorid-Membran (PVDF, Millipore, Immobilon-P, Sigma, Deisenhofen) transferiert. Die PVDF-Membran wurde vor dem Transfer mit Methanol aktiviert. Der Transfer aus den 1.5 mm dicken Gelen erfolgte mit Blotpuffer bei 13 V für ca. 45 min.

2.5.3 Hybridisierung und Detektion von Proteinen

Zur Absättigung der unspezifischen Bindungsstellen wurde die Membran 1 h bei Raumtemperatur in TBSTM prähybridisiert. Anschließend erfolgte die Hybridisierung mit dem Primärantikörper gegen COX-2 oder β -Aktin (1:1000 bzw. 1:15000 in TBSTM) bei 4 °C über Nacht. Nach dreimaligem Waschen (je 20 s in TBST) erfolgte die Hybridisierung mit Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörpern (1:3000 in TBSTM) für 45 min bei Raumtemperatur. Nach erneutem dreimaligen Waschen (je 20 min in TBST) wurden die Proteine mittels Lumi-Light Western Blotting Substrate (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) nach Angaben des Herstellers detektiert.

Um zu prüfen, ob in allen Proben eine vergleichbare Menge Protein aufgetragen war, wurde der COX-2-Antikörper-Komplex mittels eines SDS-haltigen Waschpuffers entfernt („*stripping*“, siehe Kapitel 2.5.4) und die Membran anschließend mit dem β -Aktin-Antikörper rehybridisiert. Für jede Probe wurde der Quotient aus den Intensitäten der COX-2- und der β -Aktin-Bande als internem Standard gebildet. Für die Auswertung wurde der Quotient von unbehandelten Zellen als „1“ definiert und die Quotienten der anderen Proben dazu in Relation gesetzt.

Folgende Antikörper wurden für Western-Blot-Experimente verwendet:

Tabelle 2.7: Antikörper für Western-Blot

Bezeichnung	Hersteller	Verdünnung
COX-2, monoklonal	Cayman Chemical Company, Ann Arbor, USA	1:1000 in TBSTM
β -Aktin, monoklonal (Klon AC-74)	Sigma, Deisenhofen	1:15000 in TBSTM
goat anti-mouse IgG, HRP-konjugiert, polyklonal	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA	Sekundärantikörper 1:3000 in TBSTM

2.5.4 „Strippen“ von Western-Blot-Membranen

Um die PVDF-Membran erneut mit einem Primärantikörper hybridisieren zu können, muss der vorher verwendete Primärantikörper von der Membran entfernt werden. Dieser Vorgang wird als „Strippen“ bezeichnet. Die getrocknete Membran wurde zunächst in Methanol aktiviert und anschließend zweimal mit „Stripping“-Puffer bei Raumtemperatur behandelt (jeweils 30 min). Anschließend wurde die Membran viermal für 15 min mit TBST gewaschen und für 1 h bei Raumtemperatur mit TBSTM inkubiert, bevor die Hybridisierung mit dem neuen Primärantikörper erfolgte.

2.6 Öl-Rot-Färbung humaner glatter Gefäßmuskelzellen

Öl-Rot ist ein stark lipophiler Farbstoff, der sich sehr gut zur Anfärbung lipophiler Strukturen in der Zelle eignet.

Die SMC wurden einmal mit PBS gewaschen und anschließend mit einer 4 %igen Paraformaldehyd-Lösung für 20 min bei Raumtemperatur fixiert. Anschließend wurden die Zellen einmal mit destilliertem Wasser gewaschen, bevor sie für 10 min mit der frisch filtrierten Öl-Rot-Färbelösung behandelt wurden. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit destilliertem Wasser gewaschen, mit Hämalaun gefärbt und mit Hilfe einer ColorView // - Kamera (Soft Imaging System GmbH, Münster) und der Bildanalyse-Software analySIS[®] 3.2 (Soft Imaging System GmbH, Münster) ausgewertet.

2.7 Bestimmung des Cholesterolgehaltes in humanen glatten Gefäßmuskelzellen

Die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und anschließend mit Trypsin/EDTA abgelöst. Die erhaltene Zellsuspension wurde 5 min bei Raumtemperatur zentrifugiert (300 g) und der Überstand verworfen. Danach erfolgte die Resuspendierung der Zellen in 150 μ l Reaktionspuffer und die Zelllyse mittels Ultraschall. Die Cholesterolmessung wurde mit Hilfe des *Amplex[®] Red Cholesterol Assay Kit* (Molecular Probes, Paisley, Großbritannien) durchgeführt.

Die Cholesterolester werden mit Hilfe der Cholesterol-Esterase zu freiem Cholesterol und der entsprechenden Fettsäure hydrolysiert. Freies Cholesterol reagiert anschließend mit Hilfe der Cholesterol-Oxidase zu Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und 4-Cholesten-3-on. Das entstandene H_2O_2 reagiert in Gegenwart einer Meerrettich-Peroxidase mit dem Farbstoff *Amplex[®] Red* zu Resorufin (Abb. 2.1), welches stark fluoresziert und photometrisch detektiert werden kann ($\lambda_{Anr.} = 538 \text{ nm}$, $\lambda_{Em.} = 590 \text{ nm}$, Fluoroskan Ascent[®], Thermo Labsystems, Helsinki, Finnland). Bevor die fluorometrische Messung erfolgt, werden die Reaktionsansätze 30 min bei 37 °C inkubiert. Durch Messung der Probe in An- und Abwesenheit von Cholesterol-Esterase kann der Anteil freien Cholesterols in der Probe ermittelt werden.

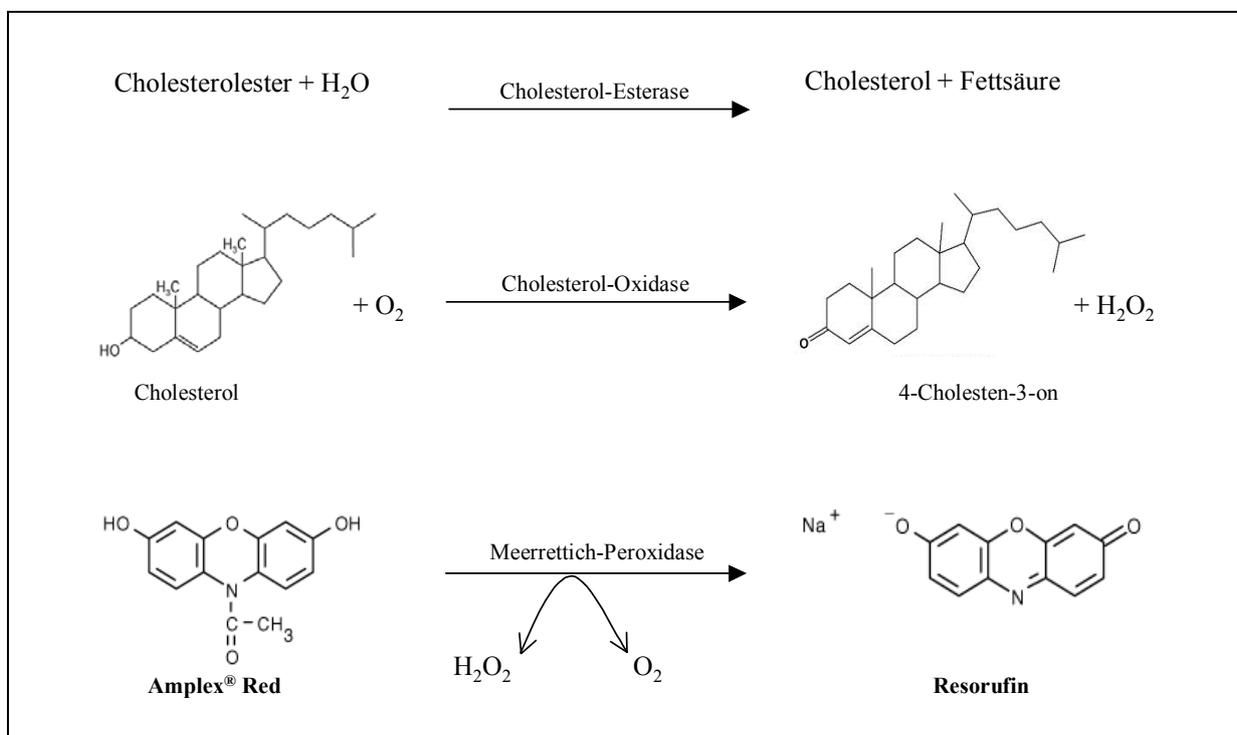


Abbildung 2.1

Schematische Darstellung der Reaktionsabläufe während der Cholesterolbestimmung

2.8 Bestimmung der Konzentration von PGE₂ und PGI₂ im Zellüberstand

Der Zellüberstand stimulierter SMC wurde abgenommen und bis zur Messung bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren. Die Konzentrationsbestimmung von PGE₂ und 6-keto-PGF_{1 α} , dem stabilen Metaboliten von PGI₂, erfolgte mittels ACETM EIA (Acetylcholinesterase Competitive Enzyme Immunoassay, Cayman Chemical Company, Ann Arbor, USA).

2.9 Durchflusszytometrie (FACS)

Die durchflusszytometrische Messung der Isotyp- und Antikörperfluoreszenzen erfolgte in einem EPICS[®] XLTM Durchflusszytometer (Beckman Coulter, Krefeld). Dabei wurden die Zellpopulationen anhand ihrer Streulichteigenschaften eingegrenzt. Um eine unspezifische Bindung der Antikörper auszuschließen, wurden Isotyp-Kontrollen mit fluoreszenzmarkierten Immunglobulinen durchgeführt. Die jeweilige Isotyp-Kontrolle stammte von der gleichen Spezies (Maus) und war an den gleichen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt wie der jeweils eingesetzte Antikörper. Die Detektion erfolgte bei logarithmischer Amplifikation. Es wurden jeweils 5000 Zellen mit der System II-Software analysiert und die „Mittlere Fluoreszenzintensität“ (MnI) bestimmt. Die nachfolgend aufgeführten Adhäsionsmoleküle wurden nach 30-minütiger Inkubation der fluoreszenzmarkierten Antikörper mit jeweils 50 μl Zellsuspension detektiert. Dabei wurden die folgenden Antikörper verwendet (Tab. 2.8):

Table 2.8: Antikörper für die Durchflusszytometrie

Adhäsionsmolekül	Antikörper	[μl] Antikörper/ 50 μl Zellsuspension U937	[μl] Antikörper/ 50 μl Zellsuspension SMC
ALCAM	IOTest [®] CD166 (ALCAM)-PE; PN A22361, Beckman Coulter, Krefeld	1	1
ICAM-1	IOTest [®] CD54-PE; PN IM1239, Beckman Coulter, Krefeld	2	5
VCAM-1	CELL LAB Rat Anti-Mouse CD106/VCAM-1-FITC; 731964, Beckman Coulter, Krefeld	2	2
IgG ₁ -PE	IOTest [®] IgG ₁ (Mouse)-PE; PN IM0670, Beckman Coulter, Krefeld	1 bzw. 2	1 bzw. 5
IgG ₁ -FITC	IOTest [®] IgG ₁ (Mouse)-FITC; A07795, Beckman Coulter, Krefeld	2	2

2.10 Adhäsion von U937-Zellen an vorbehandelte SMC unter Flussbedingungen

Für die Adhäsionsexperimente wurden SMC der Passagen 5-7 auf Glasplättchen (24 x 60 mm, 10.000 Zellen/cm²) kultiviert.

Die Glasplättchen wurden in die Durchflusskammer eingesetzt und mit einer U937-Zellsuspension (ca. 1 Mio. Zellen/ml) perfundiert. Für die Perfusion der SMC wurde eine Flussrate von 12 ml/h (0.0033 cm³/s) gewählt, woraus eine Scherrate von $\gamma = 58 \text{ s}^{-1}$ resultiert. Die U937-Zellen wurden vor Versuchsbeginn durch Inkubation mit Calcein-AM (1 μM , 30 min; Calbiochem, Schwalbach) fluoreszenzmarkiert. Calcein-AM ist ein Lebendfarbstoff, der als nicht-fluoreszierender, zellpermeabler Ester durch seine hohe Lipophilie via Diffusion in das Zytoplasma der Zellen gelangt. Dort wird Calcein-AM durch Esterasen zum negativ geladenen, fluoreszierenden Calcein hydrolysiert ($\lambda_{\text{Anr.}} = 495 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{Em.}} = 517 \text{ nm}$), das aufgrund der so erlangten Lipophobie in der Zelle verbleibt. Die Adhäsion der U937-Zellen an SMC wurde fluoreszenzmikroskopisch detektiert (Mikroskop: IX50, Olympus, Hamburg).

2.11 Statistik

Alle Ergebnisse sind Mittelwerte \pm Standardfehler ($\bar{x} \pm \text{SEM}$) von mindestens drei voneinander unabhängigen Versuchen. Bei Abweichungen ist dies im jeweiligen Ergebnisteil vermerkt. Das Signifikanzniveau p für α wurde mit 0.05 festgelegt. Signifikanzunterschiede zwischen einzelnen Versuchsgruppen wurden mittels One Way ANOVA und nachgeschaltetem Bonferroni-Test überprüft. Die statistische Berechnung erfolgte mit GraphPad Prism[®], Version 4.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

3 ERGEBNISSE

Im ersten Teil werden die Auswirkungen der experimentellen Hypercholesterolämie auf vaskuläre Veränderungen und thrombotische Ereignisse dargestellt.

Im zweiten Abschnitt werden dann die Ergebnisse der oralen Langzeittherapie mit den COX-Inhibitoren Rofecoxib und ASS bei atherogener und Standarddiät präsentiert.

Im dritten Abschnitt werden Untersuchungen an humanen glatten Muskelzellen der Aorta zusammengefasst.

3.1 Auswirkungen der cholesterolhaltigen atherogenen Diät

3.1.1 Plasmalipide

Zu Beginn der Versuche wiesen alle Kaninchen einen normalen Gesamtcholesterolspiegel auf (1.6 ± 0.1 mM). Die 12-wöchige atherogene Diät führte zu einem signifikanten Anstieg der Cholesterolkonzentration im Plasma (KON 2.2 ± 0.5 mM; CHOL 47.9 ± 4.9 mM; $p < 0.001$ vs. KON; Abb. 3.1).

Die Triglyzeridspiegel stiegen während der 12-wöchigen Fütterungsperiode ebenfalls an, wobei der Unterschied nur bei der atherogenen Diät signifikant war.

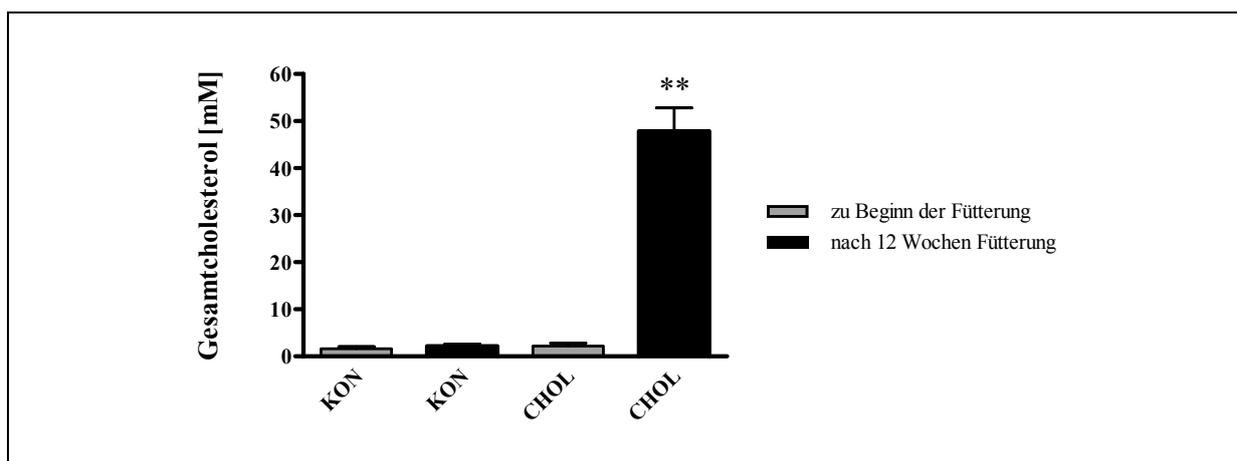


Abbildung 3.1

Plasmakonzentration von Gesamtcholesterol (n=3-14)

(KON – Standardfutter; CHOL – Cholesterolfütterung) ** $p < 0.001$ vs. KON nach 12 Wochen

3.1.2 Plaqueentwicklung in der Aorta

Kaninchen unter Standardfutter zeigten keinerlei Plaquebildung in der Aorta. Cholesterolfütterung über 12 Wochen führte zu einer starken Entwicklung atherosklerotischer Plaques auf der gesamten Aorteninnenfläche, vom Aortenursprung bis zur Bifurkation. Insgesamt waren $72 \pm 5 \%$ der Aortenfläche mit Plaques bedeckt (Abb. 3.2).

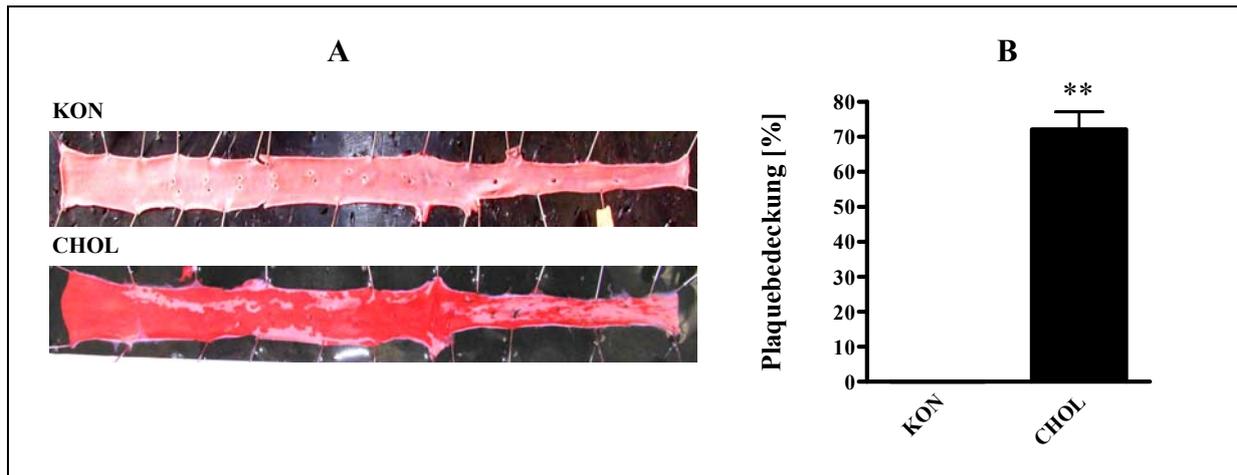


Abbildung 3.2

Plaquebedeckung der Aorta (n=6-11)

A: Aortenfärbung mit Sudan IV B: Plaquebedeckte Fläche der Aorta als prozentualer Anteil an der Gesamtläche, ermittelt durch Planimetrie nach Sudan-IV-Färbung.

(KON – Standardfutter; CHOL – atherogene Diät) ** p < 0.001 vs. KON

3.1.3 Aufregulation der COX-2 nach Cholesterolfütterung

Bei der Atherosklerose handelt es sich um eine chronisch entzündliche Erkrankung. Daher war es von Interesse, ob es durch die experimentelle Hypercholesterolämie auch zur Aufregulation der COX-2 kommt.

Dazu wurde zunächst die Genexpression der COX-2 in der Aorta untersucht. Die 12-wöchige Fütterung mit 1 % Cholesterol führte zu einem signifikanten Anstieg der aortalen COX-2-mRNA-Expression um den Faktor 3.3 ± 0.7 vs. Standardfutter ($p < 0.01$; Abb 3.3 A).

Zusätzlich erfolgte die Bestimmung der COX-2-Aktivität, um zu prüfen ob die auf mRNA-Ebene induzierte COX-2 auch zur vermehrten Bildung von PGI_2 führte. Kaninchen mit atherogener Diät wiesen deutlich höhere 6-Keto-PGF_{1 α} -Serumspiegel auf (13.3 ± 3.2 ng/ml) als Kaninchen mit Standardfutter (5.5 ± 0.8 ng/ml; $p < 0.05$; Abb. 3.3 B).

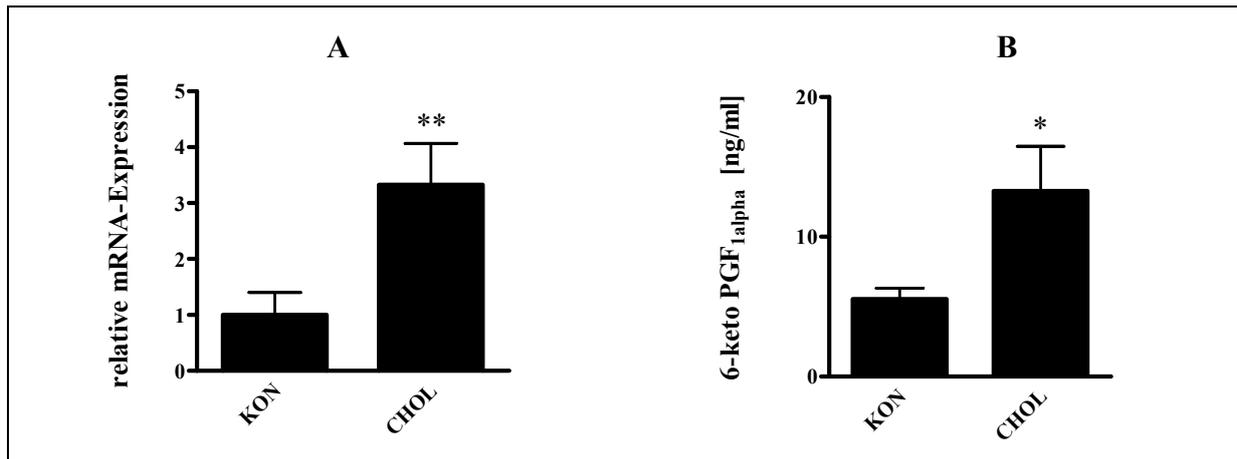


Abbildung 3.3

Induktion der COX-2 in hypercholesterolämischen Kaninchen

A: Regulation der COX-2-mRNA-Expression in der Aorta (n=5). Gezeigt ist die relative mRNA-Expression im Vergleich zum Standardfutter B: Bildung von PGI₂ im Serum (n=7-11), gemessen als Serum-Konzentration des stabilen PGI₂-Metaboliten 6-keto-PGF_{1α}.

(KOV – Standardfutter; CHOL – Cholesterolfütterung) * p < 0.05 ** p < 0.01

Im Gegensatz zur COX-2-Aktivität blieb die COX-1-Aktivität durch die atherogene Diät unbeeinflusst. Dies konnte durch Bestimmung der Thromboxan B₂-Spiegel gezeigt werden (KOV 415 ± 70 ng/ml vs. CHOL 498 ± 32 ng/ml).

3.1.4 Untersuchung des prothrombotischen Potentials im arteriellen Thrombosemodell

Nach der initialen Gefäßwandverletzung kommt es in der *A. carotis* entweder zu kleineren Thromben, die mit dem Blutfluss wieder weggeschwemmt werden können und zu zyklischen Flussveränderungen (CFVs) führen, oder zum kompletten Verschluss des Gefäßes durch einen okkludierenden Thrombus (Abb 3.4).

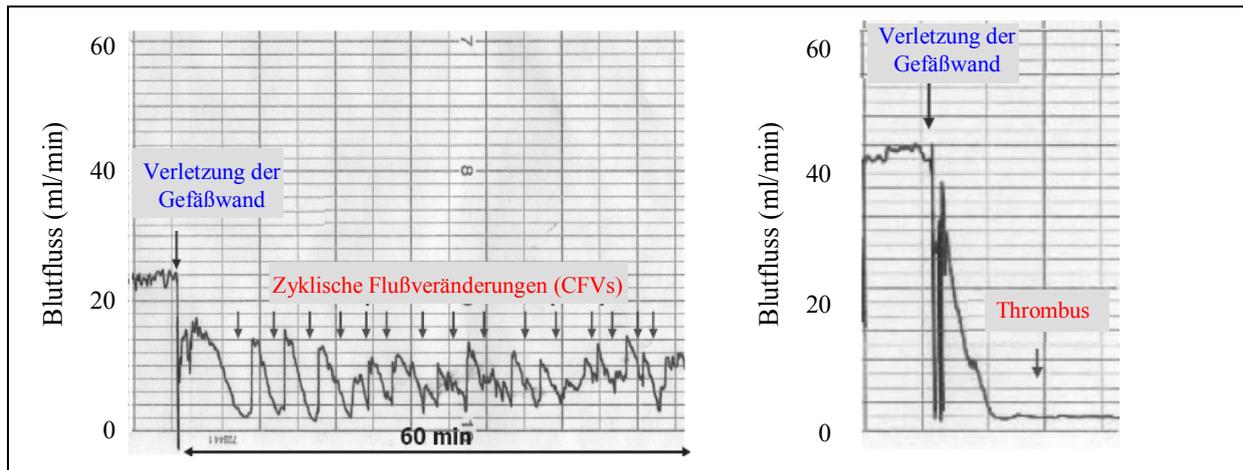


Abbildung 3.4

Repräsentative Aufzeichnungen des Blutflusses (ml/min)

Veränderungen des Blutflusses in der *A. carotis communis dextra* nach mechanisch induzierter Schädigung der Gefäßwand bei Kaninchen mit Standardfutter.

Bei allen Kaninchen sowohl der Kontrollgruppe als auch der Cholesterolgegruppe kam es zu Thrombenbildungen. Wahrscheinlich konnte deswegen durch die atherogene Diät weder eine Zunahme der Anzahl temporärer Thromben, die in CFVs resultierten, noch der Anzahl okkludierender Thromben gefunden werden. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.5 tabellarisch aufgeführt.

Gruppe	n	Thrombotisches Ereignis [n]			Thrombotisches Ereignis [%]	
		CFV	Thrombotische Okklusion	keine Thrombusbildung	Auftreten	Verhinderung
KON	13	5	8	0	100	0
CHOL	11	3	8	0	100	0

Abbildung 3.5

Thrombotische Ereignisse im modifizierten Folts-Modell

(CFV – Zyklische Flussveränderungen; KON – Standardfutter; CHOL – Cholesterolfütterung)

3.1.5 Endothelabhängige Relaxation der Aorta

In Abbildung 3.6 sind zwei Originalaufzeichnungen der Gefäßbadversuche dargestellt, die den unterschiedlichen Verlauf des Gefäßtonus' bei Gefäßen mit und ohne Endothel nach Zugabe steigender Konzentrationen von Acetylcholin zeigen.

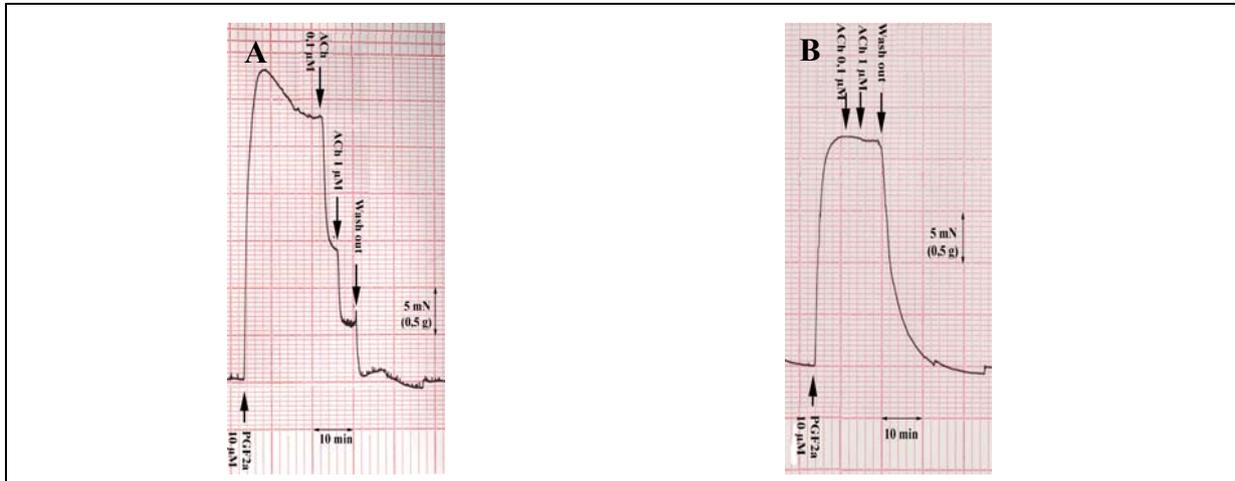


Abbildung 3.6

Originalabbildungen vom Verlauf des Gefäßtonus nach Zugabe von Acetylcholin

A: *Aorta abdominalis* mit Endothel B: *Aorta abdominalis* ohne Endothel

Die endotheliale Dysfunktion ist unter anderem dadurch gekennzeichnet, dass entweder weniger oder gar kein NO mehr gebildet werden kann. Acetylcholin (ACh) setzt nur an gesunden Endothelzellen über muskarinerge Rezeptoren NO frei, so dass die ACh-abhängige Relaxation als Marker für die Endothelfunktion genutzt werden kann.

Durch die atherogene Diät wurde die endothelabhängige Relaxation im Vergleich zum Standardfutter um ca. 50 % reduziert (Abb. 3.7 ; KON 53.0 ± 8.9 % vs. CHOL 27.1 ± 4.9 %; $p < 0.01$).

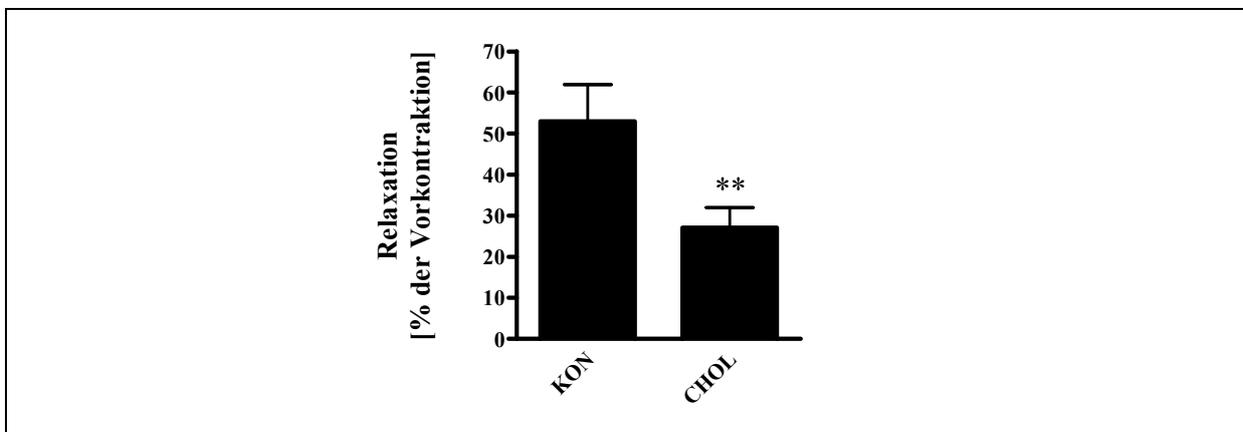


Abbildung 3.7

Einfluss von Cholesterolfütterung auf die endothelabhängige Relaxation mit $0.1 \mu\text{M}$ ACh ($n=6-10$) (KON – Standardfutter; CHOL – Cholesterolfütterung) ** $p < 0.01$

3.2 Langzeiteffekte von Rofecoxib und Acetylsalicylsäure bei Standardfutter und atherogener Diät

3.2.1 Plasmalipide

Die Cholesterolkonzentrationen im Serum hypercholesterolämischer Kaninchen wurden sowohl von ASS (ASS 51.1 ± 5.6 mM vs. CHOL 47.9 ± 4.9 mM) als auch von Rofecoxib (42.7 ± 5.1 mM) und der Kombination aus beiden Substanzen (45.4 ± 4.8 mM) nicht signifikant beeinflusst.

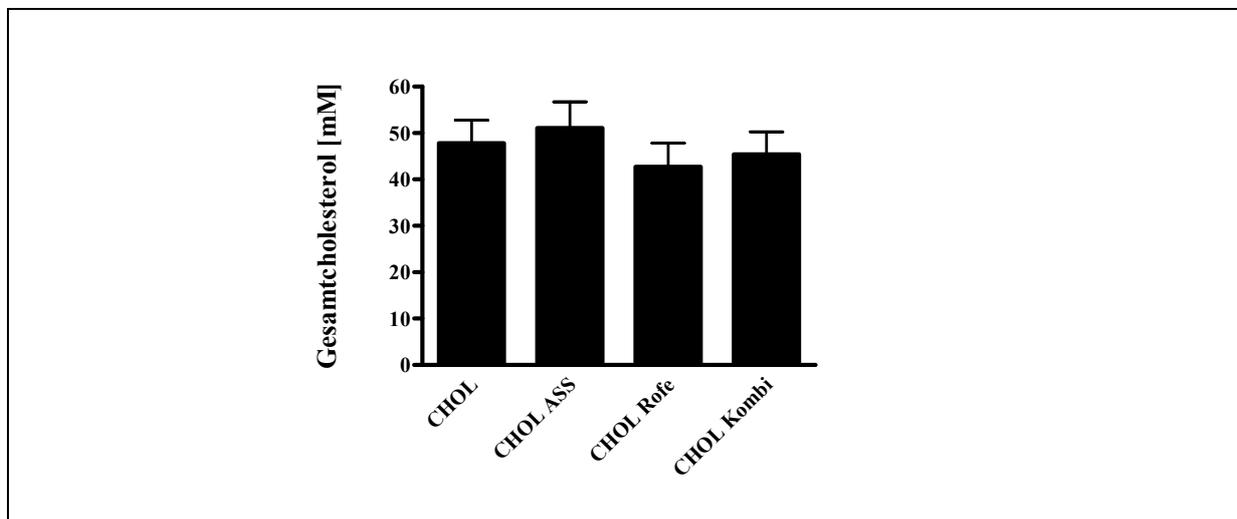


Abbildung 3.8

Plasmakonzentration von Gesamtcholesterol (n=3-14)

(CHOL – Cholesterolfütterung; ASS – Acetylsalicylsäure; Rofe – Rofecoxib; Kombi – Kombination aus ASS und Rofe)

3.2.2 Plaquetentwicklung in der Aorta

Durch Fütterung der cholesterolhaltigen Diät über 12 Wochen entstanden atherosklerotische Plaques, die 72 % der Aortenfläche bedeckten (siehe 3.1.2). Die Gabe von ASS reduzierte die plaquebedeckte Fläche signifikant auf 25 ± 8 % ($p < 0.001$). Tendenziell reduzierte Rofecoxib die Größe und Menge der Plaques ebenfalls, aber nur auf 48 ± 10 % ($p < 0.01$). Bemerkenswert ist, dass Rofecoxib in der Kombination mit ASS den antiatherosklerotischen Effekt von ASS weitgehend aufhob ($p < 0.01$ vs. ASS). Der Plaquesbesatz erreichte wieder 59 ± 10 % der Aortenfläche (Abb. 3.9).

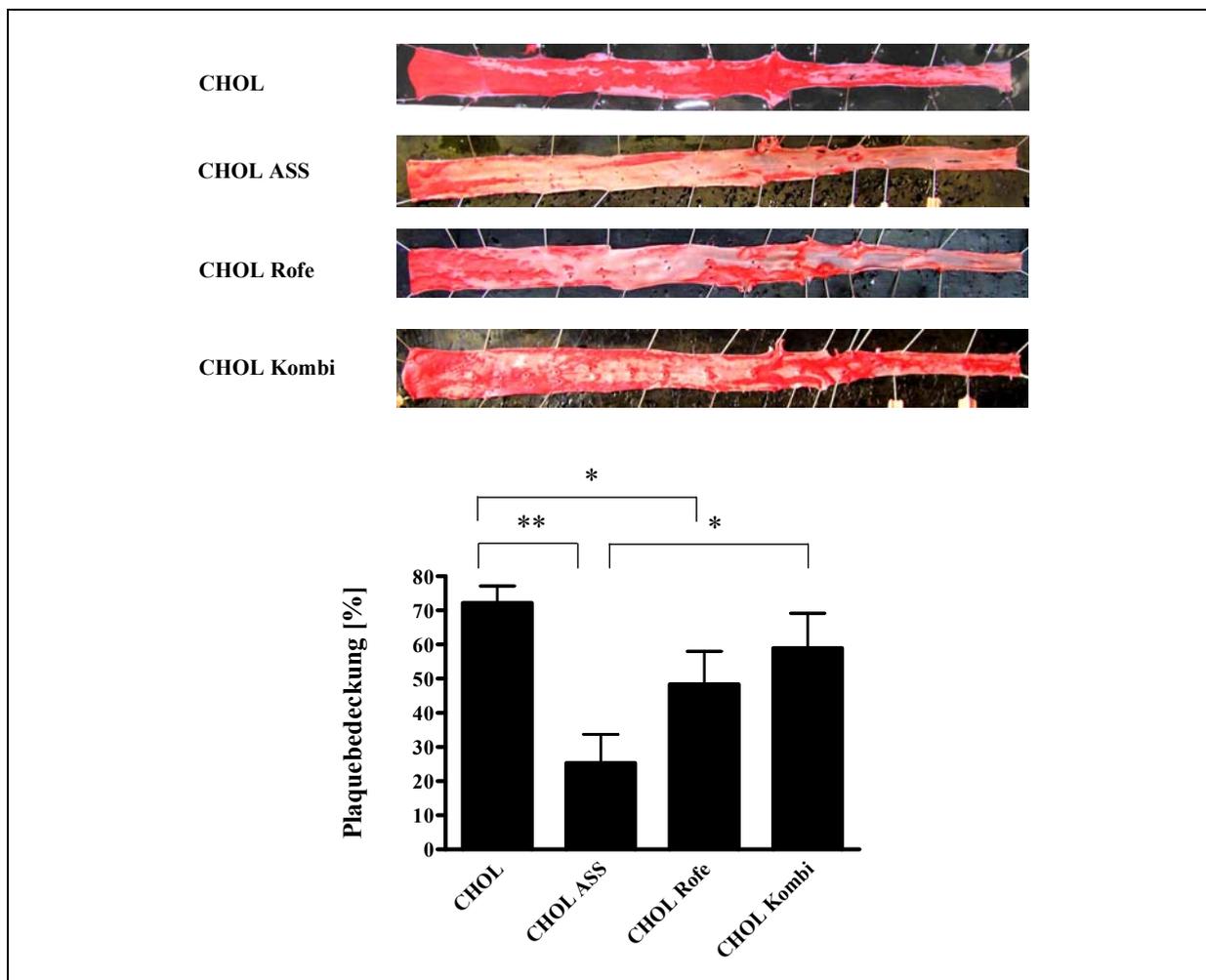


Abbildung 3.9

Einfluss von ASS und Rofecoxib auf die Plaquetbedeckung der Aorta (n=5-11)

Gezeigt sind repräsentative Abbildungen der Sudan-IV-Färbung und die planimetrische Auswertung der plaquebedeckten Fläche der Aorta als prozentualer Anteil der Gesamtfläche.

(CHOL – Cholesterolfütterung; ASS – Acetylsalicylsäure; Rofe – Rofecoxib; Kombi – Kombination aus ASS und Rofe) * $p < 0.01$ ** $p < 0.001$

3.2.3 Aufregulation der COX-2 nach Cholesterolfütterung

Die COX-2-Expression in der Aorta wurde untersucht, um die Beteiligung von COX-2-abhängig gebildeten Prostaglandinen an den potentiell prothrombotischen Wirkungen von Rofecoxib zu klären.

Die 12-wöchige Fütterung der atherogenen Diät führte zu einem signifikanten Anstieg der COX-2-Genexpression um den Faktor 3.3 ± 0.7 vs. Standardfutter ($p < 0.01$; Abb. 3.10).

In den Tieren, die das Standardfutter erhielten, hatte Rofecoxib keinen Einfluss auf die Regulation der COX-2. Im Gegensatz dazu senkte Rofecoxib in den cholesterolfütterten Tieren die cholesterolinduzierte COX-2-Expression signifikant auf Kontrollniveau (CHOL 3.3 ± 0.7 vs. CHOL Rofe 1.1 ± 0.3 ; $p < 0.01$). ASS hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Genexpression der COX-2. Die Kombination aus ASS und Rofecoxib führte, wie Rofecoxib allein, zu einer Herabregulation der COX-2-mRNA-Expression (Abb. 3.10).

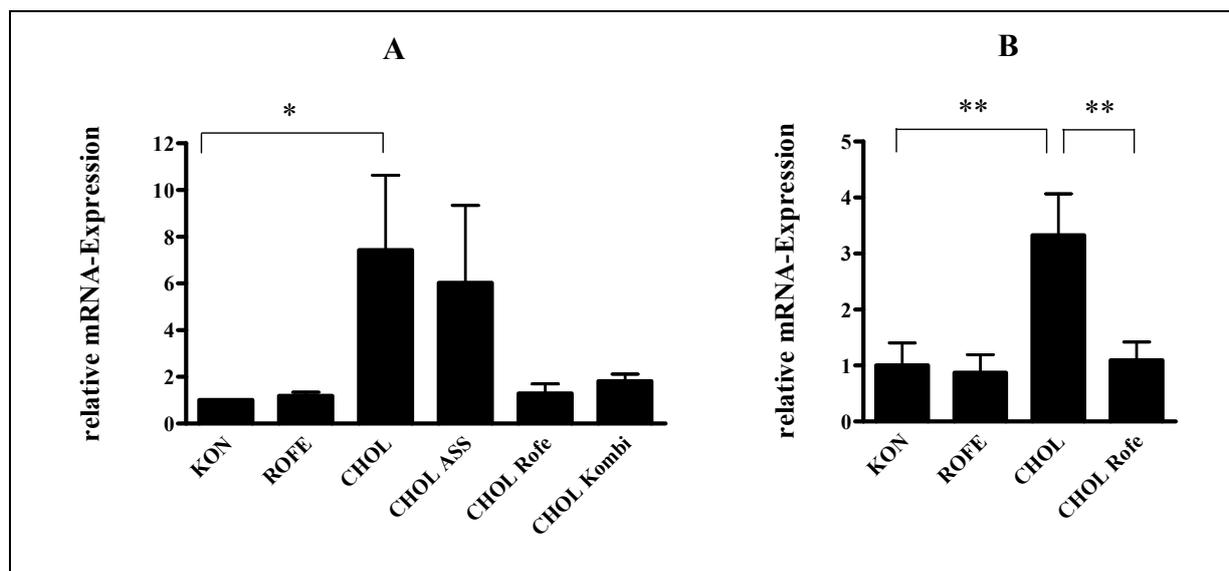


Abbildung 3.10

Regulation der COX-2-Genexpression durch Langzeitbehandlung mit verschiedenen COX-Inhibitoren
 A: Übersicht über alle verwendeten COX-Inhibitoren (n=3) B: detaillierte Ansicht zu Rofecoxib (n=5)
 Gezeigt sind die relativen mRNA-Expressionen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (KON).
 (KON – Standardfutter; Chol – Cholesterolfütterung; ASS – Acetylsalicylsäure; ROFE – Rofecoxib;
 Kombi – Kombination aus ASS und Rofe) * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$

Die Effekte von Rofecoxib können mit einer PGE₂-abhängigen Autoregulation der COX-2 erklärt werden (Debey et al., 2003). PGE₂ wird mit Hilfe der COX-2 gebildet und führt im Sinne einer positiven Rückkopplung zur Aufregulation des Enzyms. Der COX-2-Hemmer Rofecoxib verhindert die Bildung von PGE₂, so dass die Autoregulation unterbunden wird.

Diese Theorie wird durch die gemessenen PGE₂-Spiegel gestützt. PGE₂ wurde nach 24-stündiger LPS-Stimulation im Plasma gemessen. Im Blutplasma der cholesterolfütterten Kontrolltiere zeigte sich ein relativ hoher PGE₂-Spiegel (835 ± 45 ng/ml), der durch Behandlung mit Rofecoxib allein (343 ± 95 ng/ml) oder in Kombination mit ASS (370 ± 64 ng/ml) jeweils um die Hälfte sank ($p < 0.001$; Abb. 3.11).

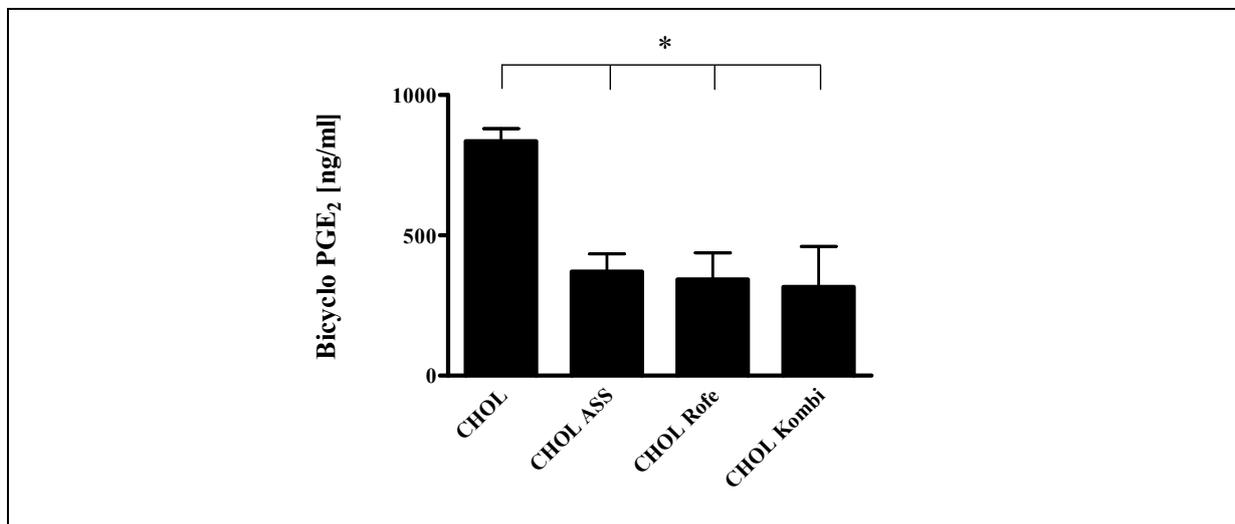


Abbildung 3.11

Einfluss von ASS und Rofecoxib auf die PGE₂-Synthese (n= 4-11)

Gemessen wurde die Konzentration des stabilen PGE₂-Metaboliten Bicyclo-PGE₂. (CHOL – Cholesterolfütterung; ASS – Acetylsalicylsäure; Rofe – Rofecoxib; Kombi – Kombination aus ASS und Rofe) * $p < 0.001$

Zusätzlich zur COX-2-mRNA-Expression erfolgte die Bestimmung der COX-Aktivität mit Hilfe der PGI₂-Konzentration im Serum.

Nach Cholesterolfütterung und der dadurch induzierten COX-2-Expression stieg auch die COX-2-Aktivität signifikant an (siehe 3.1.3). Der selektive COX-2-Inhibitor Rofecoxib führte sowohl unter Standardfutter (ROFE 2.5 ± 0.6 ng/ml vs. KON 5.5 ± 0.8 ng/ml) als auch unter atherogener Diät (CHOL Rofe 4.5 ± 0.9 ng/ml vs. CHOL 13.3 ± 3.2 ng/ml; $p < 0.05$) zu einer Hemmung der PGI₂-Synthese. Die zusätzliche Gabe von ASS senkte die PGI₂-Spiegel nicht weiter. Auch ASS allein (15.0 ± 4.3 ng/ml) hatte keinen Einfluss auf die COX-2-Aktivität in hypercholesterolämischen Kaninchen (Abb. 3.12).

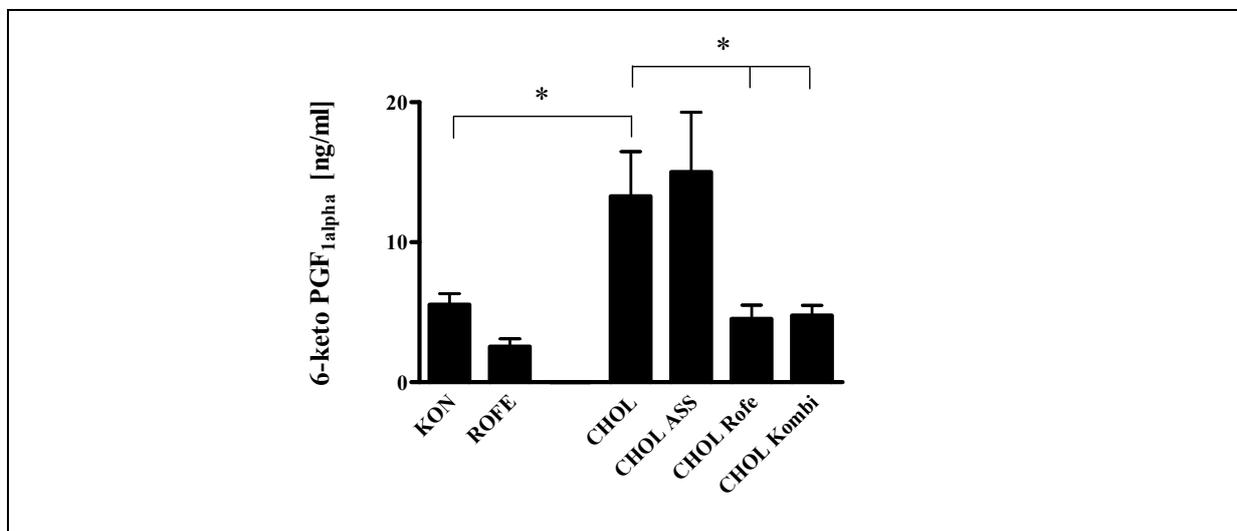


Abbildung 3.12

Einfluss verschiedener COX-Inhibitoren auf die PGI₂-Biosynthese (n=4-11)

Gemessen wurde die Serum-Konzentration des stabilen PGI₂-Metaboliten 6-keto-PGF_{1α}.

(KON – Standardfutter; CHOL – Cholesterolfütterung; ASS – Acetylsalicylsäure; Rofe – Rofecoxib; Kombi – Kombination aus ASS und Rofe) * $p < 0.05$

Zur Kontrolle der Wirksamkeit von ASS wurde mit Hilfe der TXB₂-Serumkonzentration auch die COX-1-Aktivität bestimmt. Die atherogene Diät allein hatte keinen signifikanten Einfluss auf die COX-1-Aktivität (siehe 3.1.3).

Die Messergebnisse zeigen, dass die TX-Bildung in den hypercholesterolemischen Kaninchen nur durch ASS gehemmt wurde (CHOL 498 ± 32 ng/ml vs. CHOL ASS 309 ± 45 ng/ml; $p < 0.05$), nicht aber durch den selektiven COX-2-Inhibitor Rofecoxib (553 ± 82 ng/ml). Die unvollständige Hemmung der TX-Synthese durch ASS lässt sich wahrscheinlich damit erklären, dass durch den inflammatorischen Atheroskleroseprozess die Zahl der Monozyten steigt und diese Zellen COX-2-abhängig zur TX-Produktion beitragen. Die TX-Synthese der Monozyten wird durch ASS nicht dauerhaft gehemmt, weil diese Zellen, im Gegensatz zu Thrombozyten, das Enzym nachsynthetisieren können.

Rofecoxib hatte auch bei Standardfutter keinen Einfluss auf die TX-Biosynthese (KON 415 ± 70 ng/ml vs. ROFE 444 ± 116 ng/ml). Durch die Kombination von ASS und Rofecoxib kam es bei atherogener Diät zu einem Anstieg der TX-Synthese (695 ± 11 ng/ml; $p < 0.05$).

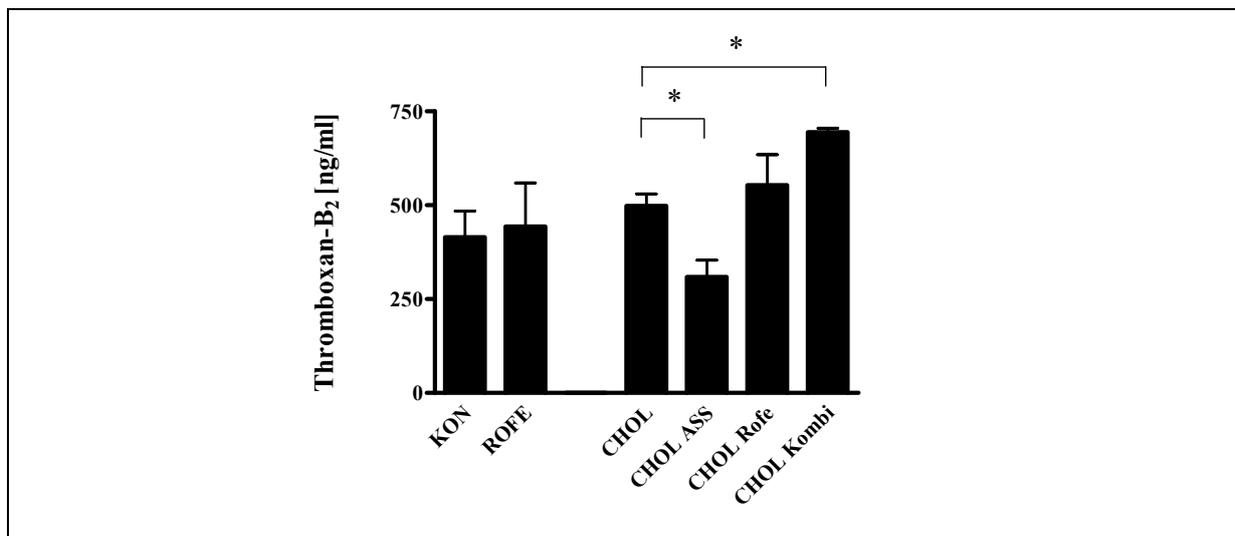


Abbildung 3.13

Einfluss von ASS und Rofecoxib auf die TXB₂-Synthese (n=4-11)

(KON – Standardfutter; CHOL – Cholesterolfütterung; ASS – Acetylsalicylsäure; Rofe – Rofecoxib; Kombi – Kombination aus ASS und Rofe) * $p < 0.05$

Anhand der Ergebnisse der Thromboxan- und Prostazyklin-Bestimmung konnte gezeigt werden, dass die gewählten Dosierungen ausreichten, um die jeweiligen COX-Isoenzyme zu hemmen. Die Ergebnisse bestätigen zudem die Selektivität der einzelnen COX-Inhibitoren: ASS hemmt nur die Aktivität der COX-1, Rofecoxib dagegen hemmt nur die COX-2-Aktivität.

3.2.4 Untersuchung des prothrombotischen Potentials im arteriellen Thrombosemodell

Die Langzeitbehandlung mit Rofecoxib unter Standardfutter hatte im hier verwendeten modifizierten Folts-Modell keinen signifikanten pro- oder antithrombotischen Effekt. Für die Auswertung der AUC wurden daher nur die Tiere berücksichtigt, die die atherogene Diät bekommen hatten. Im Vergleich zur cholesterolfütterten Kontrolle vergrößerte die zusätzliche Gabe von ASS die AUC signifikant (CHOL 8.2 ± 1.9 AE vs. CHOL ASS 20.0 ± 3.4 AE; $p < 0.05$). Dies bedeutet, dass die Therapie mit ASS die Thrombenbildung signifikant reduzierte und damit antithrombotisch wirkte. Die Rofecoxib-Behandlung hatte ebenfalls einen schwachen antithrombotischen Effekt, der das Signifikanzniveau aber nicht erreichte (14.3 ± 3.5 AE). Bei der Kombination von ASS mit Rofecoxib hob Rofecoxib den antithrombotischen Effekt von ASS vollständig auf (CHOL Kombi 7.2 ± 2.5 AE vs. CHOL ASS 20.0 ± 3.4 AE; $p < 0.05$), so dass die AUC wieder der der cholesterolfütterten Kontrolle entsprach.

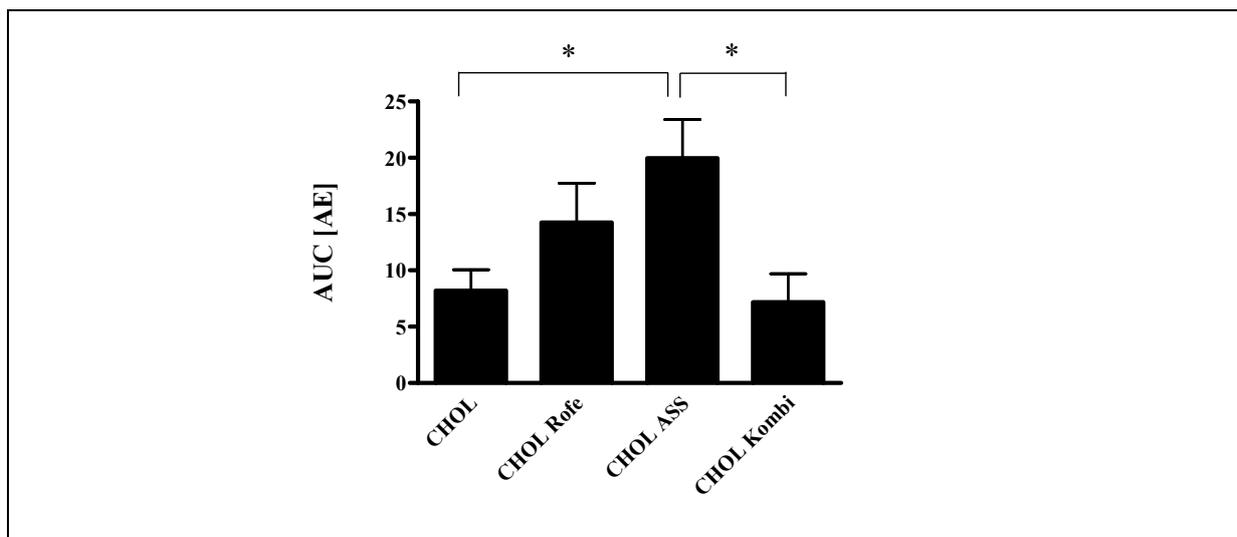


Abbildung 3.14

Vergleich der Flächen unter den sich ergebenden Blutflusskurven (AUCs)

(CHOL – Cholesterolfütterung; ASS – Acetylsalicylsäure; Rofe – Rofecoxib; Kombi – Kombination aus ASS und Rofe) * $p < 0.05$

Neben dem Blutfluss wurde auch die Anzahl der thrombotischen Ereignisse in den einzelnen Versuchsgruppen untersucht. In Abb. 3.15 sind die Ergebnisse tabellarisch dargestellt.

Bei allen cholesterolgefütterten Kontrolltieren waren Thrombenbildungen zu beobachten. In der Mehrzahl der Fälle handelte es sich dabei um einen kompletten thrombotischen Gefäßverschluss (siehe auch 3.1.4). Auch die zusätzliche Gabe von Rofecoxib führte in allen Versuchstieren zu einem thrombotischen Ereignis, wobei es sich etwa jeweils zur Hälfte um CFVs und thrombotische Okklusionen handelte. Rofecoxib zeigte demnach einen schwachen antithrombotischen Effekt, in dem Sinne, dass die gebildeten Thromben kleiner waren und nicht regelmäßig zum Gefäßverschluss führten. In keinem der Fälle kam es aber zu einer Verhinderung der Thrombusbildung.

Die Therapie mit ASS konnte die Thrombenbildung in 62 % der Fälle verhindern ($p < 0.005$). Nur in einem von acht Kaninchen kam es zu einer thrombusbedingten Gefäßstenose, bei zwei Versuchstieren traten CFVs auf. ASS weist dementsprechend eine deutliche antithrombotische Wirkung auf. Wurden ASS und Rofecoxib in der Therapie kombiniert, hob Rofecoxib den positiven Effekt von ASS weitgehend auf. Die Thrombenbildung wurde nur noch um 20 % reduziert, im Vergleich zu 62 % bei der Monotherapie mit ASS. Dieser Effekt war nicht signifikant. Bei den thrombotischen Ereignissen handelte es sich hier hauptsächlich um vollständige Gefäßokklusionen.

Gruppe	n	Thrombotisches Ereignis [n]			Thrombotisches Ereignis [%]	
		CFV	Thrombotische Okklusion	keine Thrombusbildung	Auftreten	Verhinderung
CHOL	11	3	8	0	100	0
CHOL-Rofe	7	4	3	0	100	0
CHOL-ASS	8	2	1	5	38	62*
CHOL Kombi	5	1	3	1	80	20

Abbildung 3.15

Thrombotische Ereignisse im modifizierten Folts-Modell bei cholesterolgefütterten Kaninchen (CFV – Zyklische Flussveränderungen; n – n-Zahl; CHOL – Cholesterolfütterung; ASS – Acetylsalicylsäure; Rofe – Rofecoxib; Kombi – Kombination aus ASS und Rofe)

* $p < 0.005$ vs. CHOL

3.2.5 Endothelabhängige Relaxation der Aorta

Die Gefäße der cholesterolfütterten Tiere relaxierten infolge einer endothelialen Dysfunktion nach Zugabe von ACh nicht mehr so stark wie die Gefäße der Kontrollgruppe (siehe 3.1.5). Durch die atherogene Diät wurde die endothelabhängige Relaxation um ca. 50 % reduziert (KON 53.0 ± 8.9 % vs. CHOL 27.1 ± 4.9 %; $p < 0.01$). Eine ähnliche Funktionsstörung des Endothels wurde durch Rofecoxib auch unter Standardfutter (ROFE 22.3 ± 3.3 %; $p < 0.001$) beobachtet. In der Kombination von Cholesterolfütterung und Rofecoxib kam es aber nicht zu einer weiteren Reduktion der endothelabhängigen Relaxation (CHOL Kombi 26.3 ± 7.7 %).

Die Cholesterolfütterung über 12 Wochen schädigte die Endothelfunktion möglicherweise schon maximal, so dass keine weitere Steigerung durch Rofecoxib erkennbar war. Auch ASS (16.3 ± 6.5 %) und die Kombination aus Rofecoxib und ASS (26.3 ± 7.7 %) führten zu keiner weiteren signifikanten Veränderung der endothelabhängigen Relaxation.

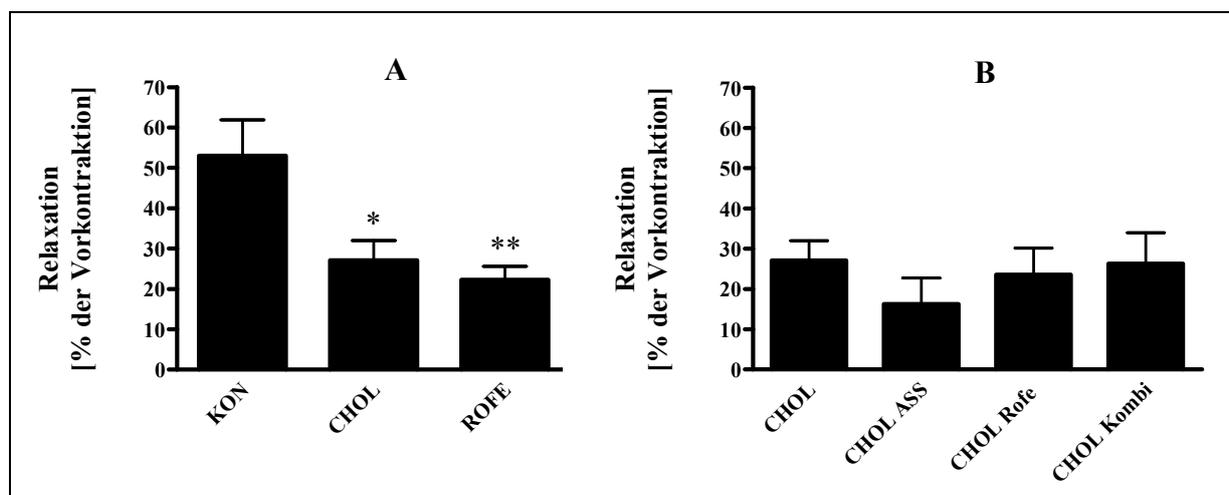


Abbildung 3.16

Endothelabhängige Relaxation mit 0.1 µM ACh

A: Einfluss von Cholesterolfütterung und Rofecoxib (n=6-10) B: Einfluss von ASS und Rofecoxib auf die cholesterolfütterung induzierte Endothelschädigung (n=5-10)

(KON – Standardfutter; CHOL – Cholesterolfütterung; ASS – Acetylsalicylsäure; Rofe – Rofecoxib; Kombi – Kombination aus ASS und Rofe)

* $p < 0.01$ ** $p < 0.001$

3.3 *In-vitro*-Versuche zur Übertragbarkeit der tierexperimentellen Ergebnisse auf humane Zellen

Die Cholesterolfütterung führte bei den Kaninchen zu einer stark ausgeprägten Atherosklerose, u.a. erkennbar an der starken Plaqueentwicklung und der endothelialen Dysfunktion. Um diese Bedingungen zu simulieren, wurden humane glatte Gefäßmuskelzellen (SMC) der Aorta und monozytäre Zellen (U937) mit Cholesterol angereichert.

3.3.1 Kontrolle der Cholesterolanreicherung in humanen SMC

3.3.1.1 Öl-Rot-Färbung

Die SMC wurden zunächst für 48 h mit serumfreien Medium inkubiert, bevor die 24-stündige Stimulation mit dem M β -CD-Cholesterol-Komplex erfolgte. In den cholesterol-behandelten Zellen zeigten sich deutlich rot angefärbte Strukturen, die das eingelagerte Cholesterol darstellen. In den Kontrollzellen und auch in den Zellen, die nur mit M β -CD stimuliert wurden, konnten diese Strukturen nicht gefunden werden (Abb. 3.17).

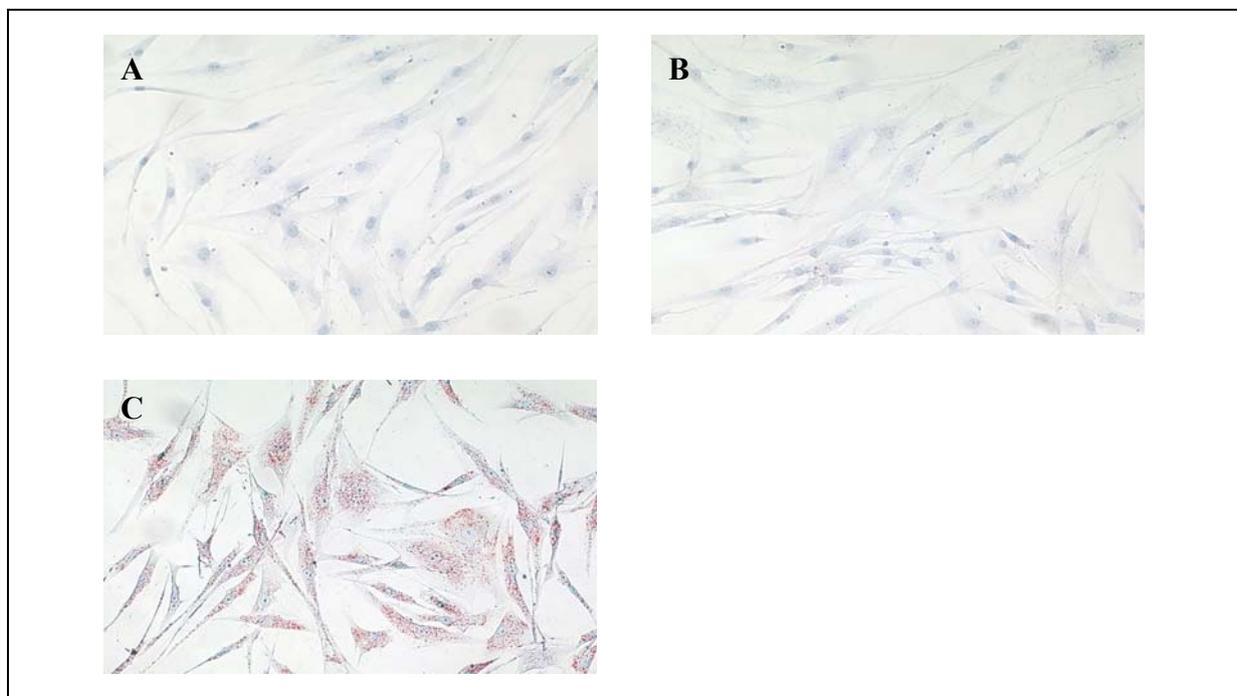


Abbildung 3.17

Öl-Rot-Färbung glatter Gefäßmuskelzellen nach 24 h Stimulation mit dem M β -CD-Cholesterol-Komplex (entsprechend 10 μ g/ml Cholesterol) (n=5) A: Kontrolle, unstimulierte Zellen; B: Stimulation mit M β -CD; C: Stimulation mit dem M β -CD-Cholesterol-Komplex

3.3.1.2 Bestimmung des Cholesterolgehaltes in SMC

Die Cholesterobeladung der Zellen führte zu einem signifikanten Anstieg der Gesamtcholesterolemie (KON $6.5 \pm 0.5 \mu\text{g}$ vs. Chol $11.8 \pm 0.8 \mu\text{g}$; $p < 0.001$). M β -CD, das als Kontrolle mitgeführt wurde, führte zu keinem signifikanten Anstieg der Cholesterolemie in den Zellen. Im Gegenteil, M β -CD führte tendenziell eher zu einer Abnahme der Cholesterolemie ($5.0 \pm 0.3 \mu\text{g}$; Abb. 3.18 A). Während das Cholesterolemie in den Kontrollzellen nahezu vollständig in freier Form vorliegt, wird das Cholesterolemie in den cholesterobeladenen Zellen vermehrt in Form von Cholesterolemie gespeichert (Abb. 3.18 B).

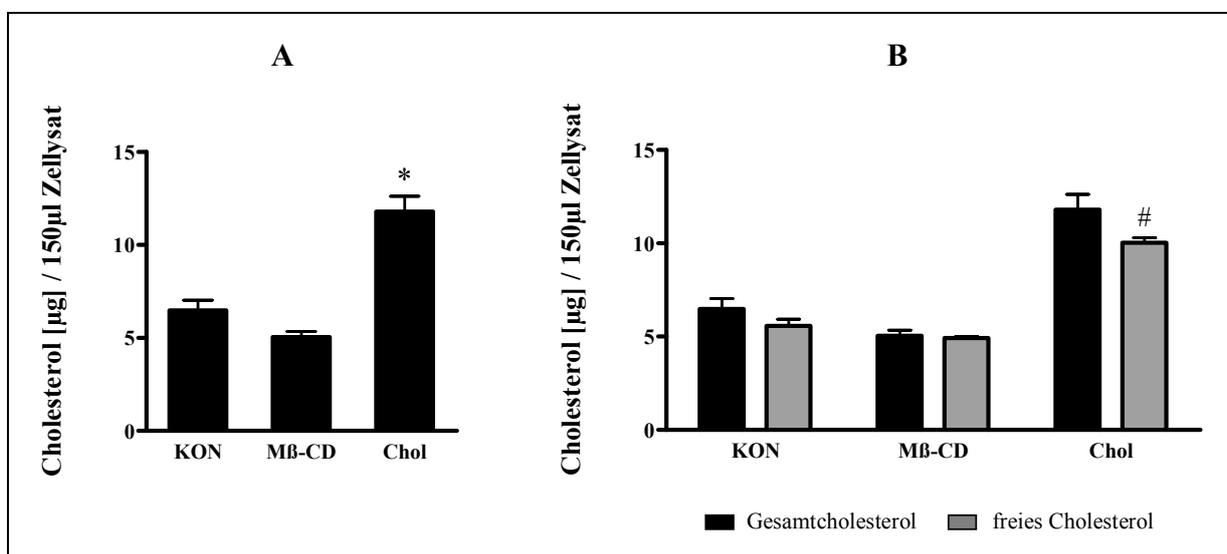


Abbildung 3.18

Bestimmung der Cholesterolemie in glatten Gefäßmuskelzellen (n=6)

A: Gesamtcholesterolemie in 150 μl Zellysat B: freies und Gesamtcholesterolemie im Vergleich (KON – unbehandelte SMC; M β -CD – Methyl- β -Cyclodextrin; Chol – 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Cholesterolemie)

* $p < 0.001$ vs. KON # $p < 0.05$ freies Cholesterolemie vs. Gesamtcholesterolemie

Die Ergebnisse aus der Öl-Rot-Färbung und der Cholesterolemiebestimmung zeigen, dass das „wasserlösliche“ Cholesterolemie tatsächlich in die Zelle aufgenommen und dort gespeichert wurde.

3.3.2 Regulation der COX-2-Expression in SMC

3.3.2.1 COX-2-mRNA-Expression

Aus den Fütterungsversuchen am Kaninchen war bekannt, dass die experimentelle Hypercholesterolämie zu einer vermehrten COX-2-Genexpression in der Aorta führt. Daher war auch die COX-2-Expression in cholesterobeladenen SMC von Interesse.

Die Induktion der COX-2 wurde in SMC untersucht, die 48 h in serumfreiem Medium vorinkubiert wurden. Die Zellen wurden anschließend über 12-48 h mit verschiedenen Cholesterolkonzentrationen (1-30 µg/ml) angereichert, um die optimale Konzentration und Zeitspanne für nachfolgende Versuche zu ermitteln. Für die COX-2-mRNA-Induktion erwies sich eine Cholesterolkonzentration von 10 µg/ml über eine Zeitspanne von 24 h als optimal. Höhere Konzentrationen wurden von den SMC schlecht toleriert, niedrigere Cholesterolmengen hatten nur einen sehr schwachen Effekt auf die COX-2-mRNA-Expression.

Abbildung 3.19 zeigt, dass die Aufregulation der COX-2-mRNA nach 24 h ihr Maximum erreichte (Faktor 3.0 ± 0.8 vs. KON). Eine Stimulation für 48 h führte zu keiner weiteren Induktion (Faktor 2.2 ± 0.5 vs. KON). M β -CD zeigte nur eine sehr leichte Tendenz zur Induktion der COX-2, die aber keinen Anteil am Gesamteffekt der COX-2-Aufregulation durch Cholesterol hat.

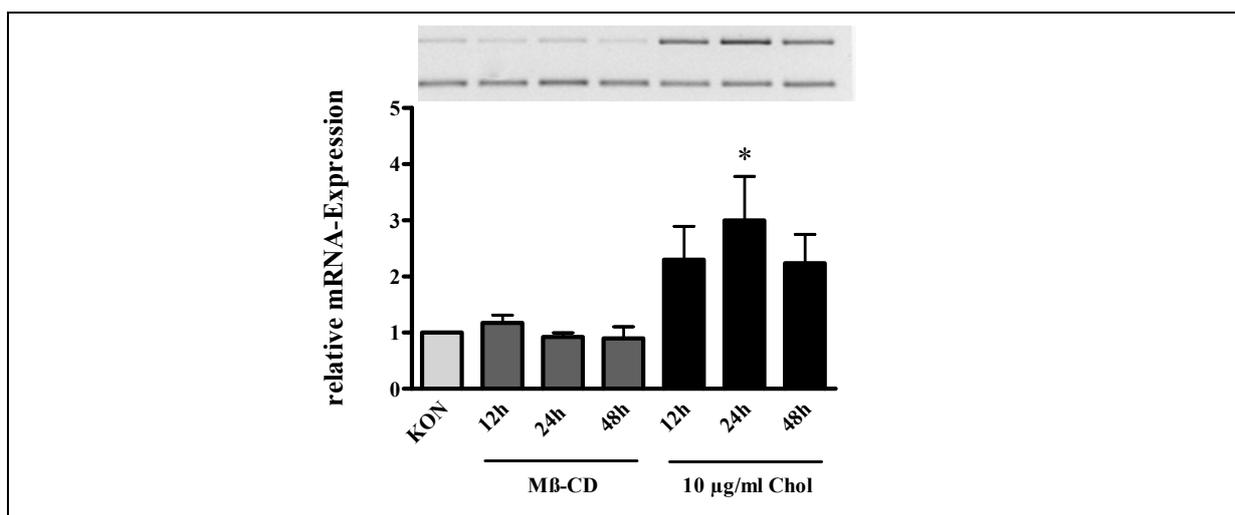


Abbildung 3.19

Zeitverlauf der Induktion der COX-2-Genexpression durch Cholesterol (10 µg/ml)

Dargestellt ist ein repräsentatives RT-PCR-Experiment und die densitometrische Auswertung von n=4 Versuchen.

(KON – unbehandelte SMC; M β -CD – Methyl- β -Cyclodextrin; Chol – 10 µg/ml Cholesterol)

* $p < 0.05$ vs. KON

3.3.2.2 COX-2-Protein-Expression

Aufgrund der gezeigten COX-2-mRNA-Induktion war es von Interesse, ob auch das COX-2-Protein aufreguliert wird. Dazu wurden SMC für 48 h in serumfreiem Medium vorinkubiert und anschließend für 12-48 h mit Cholesterol (10 µg/ml) angereichert.

Wie in Abb. 3.20 dargestellt, wurde auch das COX-2-Protein tendentiell bereits nach 12 h aufreguliert (Faktor 2.3 ± 0.7 vs. KON). Das Maximum der Protein-Induktion wurde nach 24-stündiger Cholesterolbeladung erreicht (Faktor 3.0 ± 0.5 vs. KON).

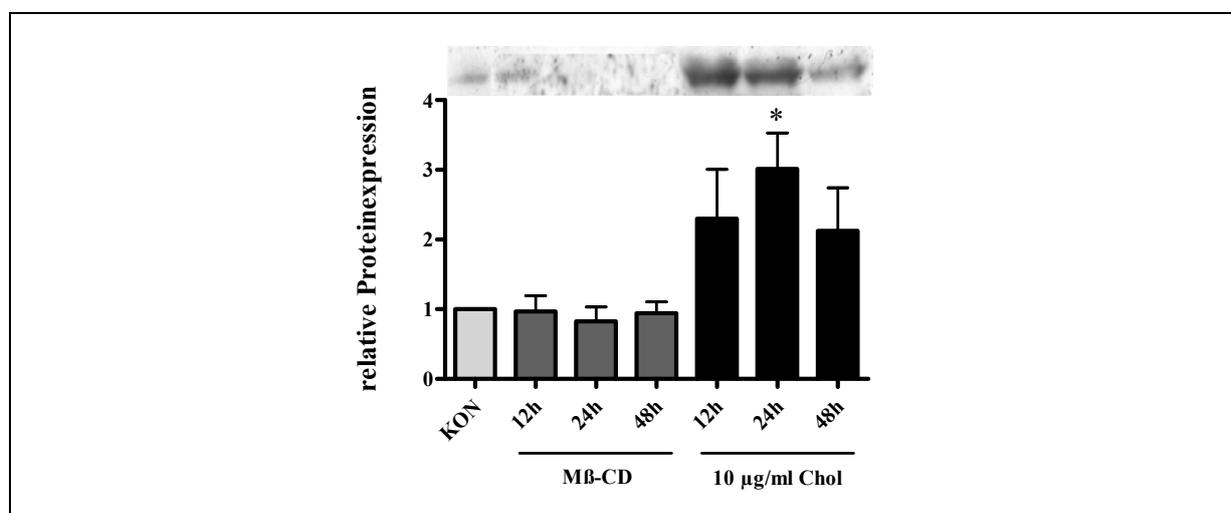


Abbildung 3.20

COX-2-Proteinexpression nach Cholesterolbeladung im Zeitverlauf von 12-48 h Stimulation

Dargestellt ist ein repräsentativer Western Blot und die densitometrische Auswertung von n=6 Versuchen. Dabei wurde für jede Probe die COX-2-Bande zur β -Aktin-Bande als internem Standard in Relation gesetzt.

(KON – unbehandelte SMC; M β -CD – Methyl- β -Cyclodextrin; Chol – Cholesterol)

* $p < 0.05$ vs. KON

3.3.2.3 Induktion der PGI₂-Synthese

Die Western-Blot-Analysen ergaben, dass die Cholesterolbeladung der SMC zur Aufregulation des COX-2-Proteins führt. Im folgenden wurde untersucht, ob damit auch eine gesteigerte Prostaglandin-Synthese verbunden ist und ob diese durch Zugabe spezifischer COX-2-Inhibitoren vermindert werden kann. Dazu wurden SMC in serumfreiem Medium mit 10 µg/ml Cholesterol behandelt. Nach 24 h erfolgte die Zugabe von Rofecoxib (5 µM). Gleichzeitig wurden 3 % FCS zur Verbesserung der Zellfunktionen zugegeben. Nach einer Gesamtkubationsdauer von 48 h wurde das Inkubationsmedium abgenommen und bis zur Messung eingefroren.

Die Messergebnisse zeigen, dass die Cholesterolanreicherung in den SMC nur zu einer sehr schwachen Induktion der PGI₂-Synthese führte (KON 600 ± 76 pg/ml vs. Chol 879 ± 129 pg/ml). Die leicht gesteigerte Syntheseleistung konnte durch Rofecoxib wieder auf Kontrollniveau gesenkt werden (Rofecoxib 695 ± 118 pg/ml). In den unbehandelten Zellen (ohne Cholesterol) führte Rofecoxib dagegen nicht zu einer Abnahme der PGI₂-Konzentration (Rofecoxib 547 ± 117 pg/ml).

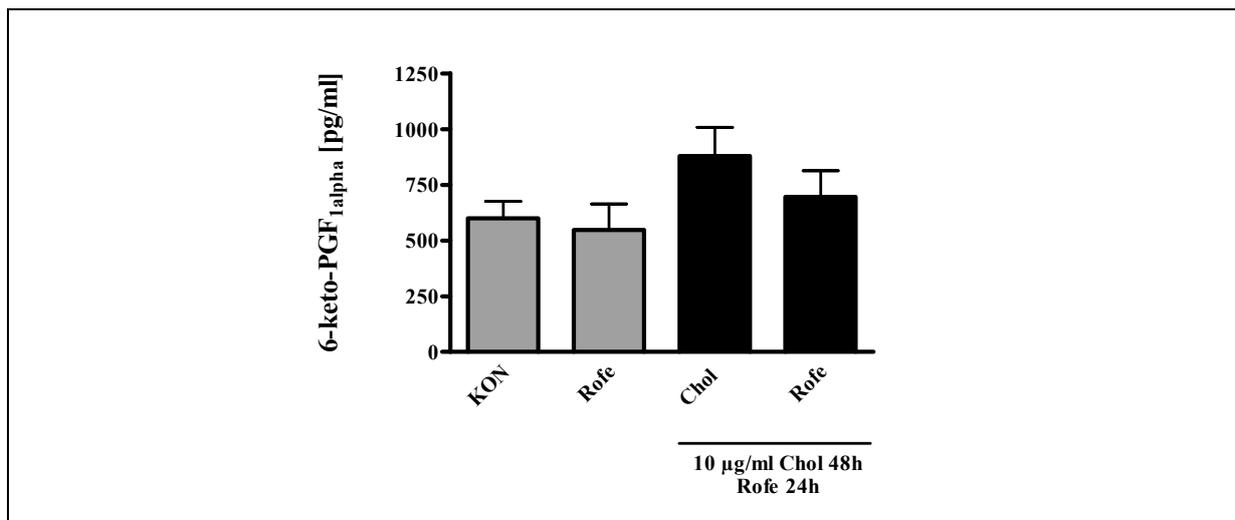


Abbildung 3.21

Einfluss von Cholesterol und Rofecoxib auf die PGI₂-Synthese (n=6)

SMC wurden in serumfreiem Medium mit 10 µg/ml Cholesterol stimuliert. 24 h später erfolgte die Zugabe von 5 µM Rofecoxib und 3 % FCS. Nach weiteren 24 h wurde das Inkubationsmedium abgenommen. Gemessen wurde die Konzentration des stabilen PGI₂-Metaboliten 6-keto-PGF_{1α}. (KON – Kontrolle; Chol – Cholesterol; Rofe – 5 µM Rofecoxib)

3.3.3 Adhäsion von Monozyten (U937-Zellen) an SMC unter Flussbedingungen

In Anlehnung an die tierexperimentellen Ergebnisse zur Atherokleroseentwicklung wurden *in-vitro*-Versuche zur Adhäsion von U937-Zellen (monozytäre Zelllinie) an SMC durchgeführt. Die Adhäsion wurde im Durchflussexperiment untersucht, um die Bedingungen im Gefäßbett zu simulieren. Bei Flussraten, wie sie auch in der Aorta vorkommen (Scherrate ca. 500/s), konnten kaum adherente U937-Zellen beobachtet werden. Atherosklerotische Plaques entstehen hauptsächlich im Bereich von Gefäßverästelungen, da dort der Blutstrom durch Verwirbelungen stark reduziert ist. Durch Reduktion der Scherrate auf 58/s wurden Bedingungen geschaffen, die den Verhältnissen in diesen Bereichen besser entsprechen.

Die SMC wurden für diesen Versuch auf Deckgläschen ausgesät und in serumfreiem Medium mit 10 µg/ml Cholesterol inkubiert, ohne vorher serumfrei vorbehandelt zu werden. Nach 24 h erfolgte die Zugabe von ASS 50 µM und Rofecoxib 5 µM, sowie 3 % FCS für weitere 24 h. Die U937-Zellen wurden im Gegensatz zu den SMC nicht serumfrei mit Cholesterol inkubiert, da die Kombination aus serumfreiem Medium und dem Mβ-CD-Cholesterol-Komplex von den Zellen nicht toleriert wurde. Aus dem gleichen Grund erfolgte die Cholesterolbeladung nur für 24 h.

Die Beladung der Zellen mit dem Mβ-CD-Cholesterol-Komplex führte zu einer signifikant verminderten Adhäsion von Monozyten an die SMC (Chol 100.0 % vs. KON 155. ± 32.1 %). Die Rofecoxib-Behandlung führte nur in den cholesterolbeladenen Zellen zu einer verstärkten Monozytenadhäsion (Chol 100.0 % vs. Chol + Rofe 166.5 ± 22.0 %, $p < 0.05$). In den Kontrollzellen hatte Rofecoxib dagegen keinen Einfluss (KON 100.0 % vs. Rofe 101.0 ± 5.4 %).

Ein weiterer interessanter Befund war, dass Rofecoxib in den Kontrollzellen (ohne Cholesterol) den antiadhäsiven Effekt von ASS wieder aufgehoben hat (ASS 50.5 ± 9.3 % vs. ASS + Rofe 94.7 ± 15.9 %; $p < 0.05$; Abb. 3.22).

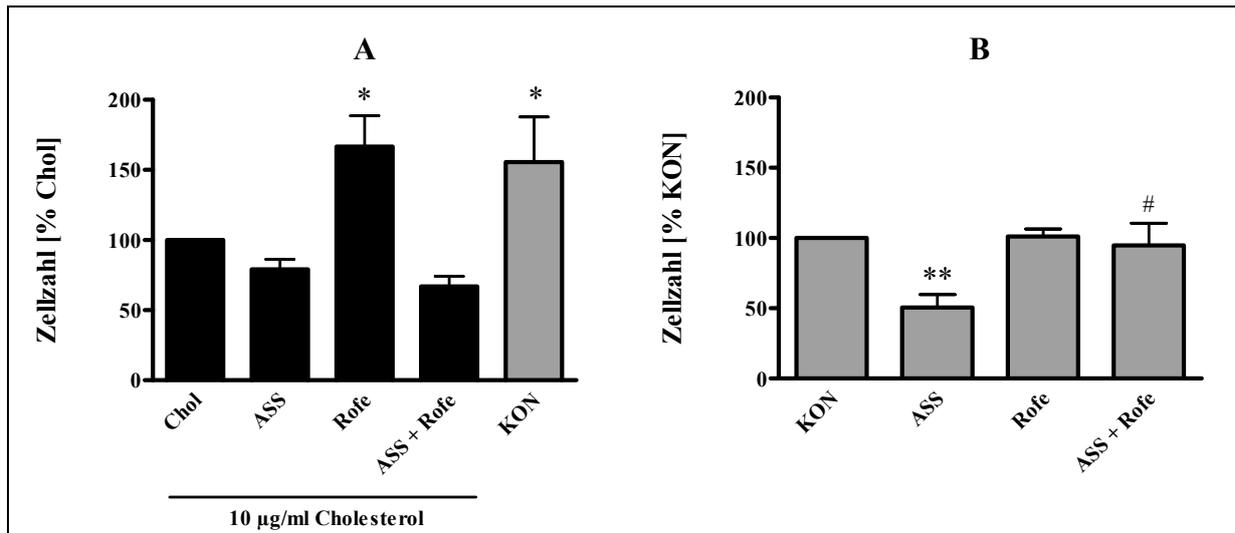


Abbildung 3.22

Einfluss von ASS und Rofecoxib auf die Adhäsion von Monozyten an SMC

A: Inkubation der SMC (48 h) und U937-Zellen (24 h) mit 10 µg/ml Cholesterol (n=3-6)

B: SMC und U937 ohne Cholesterolbelastung (n=3-5)

Dargestellt sind die durchschnittlichen Zellzahlen, die sich nach Auszählung von 4 Arealen des Deckgläschens ergaben, in Relation gesetzt zu Chol bzw. KON.

(KON – Kontrolle; Chol – Cholesterol 10 µg/ml; ASS – Acetylsalicylsäure 50 µM; Rofe – Rofecoxib 5 µM) * p < 0.05 vs. Chol ** p < 0.01 vs. KON # p < 0.05 vs. ASS

3.3.4 Expression von Adhäsionsmolekülen

Die Versuche zur Adhäsion von Monozyten an SMC haben gezeigt, dass ASS und Rofecoxib einen Einfluss auf die Anzahl der adherenten Monozyten haben. Aus diesem Grund wurden Analysen zur Gen- und Oberflächenexpression von Adhäsionsmolekülen durchgeführt, um molekulare Strukturen zu identifizieren, die für das veränderte Adhäsionsverhalten verantwortlich sein können. Von besonderem Interesse waren vor allem ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule-1*, CD54), VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule-1*, CD106) und ALCAM (*activated leucocyte cell adhesion molecule*, CD166).

ICAM-1 und VCAM-1 sind die wichtigsten Adhäsionsmoleküle für die Adhäsion von Immunzellen am Endothel und deren Migration ins Gewebe (Blankenberg et al., 2003). ALCAM wird von aktivierten Monozyten und Endothelzellen exprimiert und spielt eine Rolle bei der transendothelialen Migration aktivierter Leukozyten (Masedunskas et al., 2006).

3.3.4.1 Untersuchung der Genexpression von ICAM-1, VCAM-1 und ALCAM auf SMC

Die mRNA-Expression von ICAM-1, VCAM-1 und ALCAM wurde nur moderat reguliert. Die Cholesterolanreicherung allein hatte keinen Einfluss auf die Genexpression dieser drei Adhäsionsmoleküle. Rofecoxib führte tendentiell zu einer Downregulation der mRNA von ICAM-1 und VCAM-1 (Abb. 3.23). Damit liefert die Regulation der mRNA-Expression der untersuchten Adhäsionsmoleküle keine Erklärung für die Ergebnisse der Adhäsionsversuche.

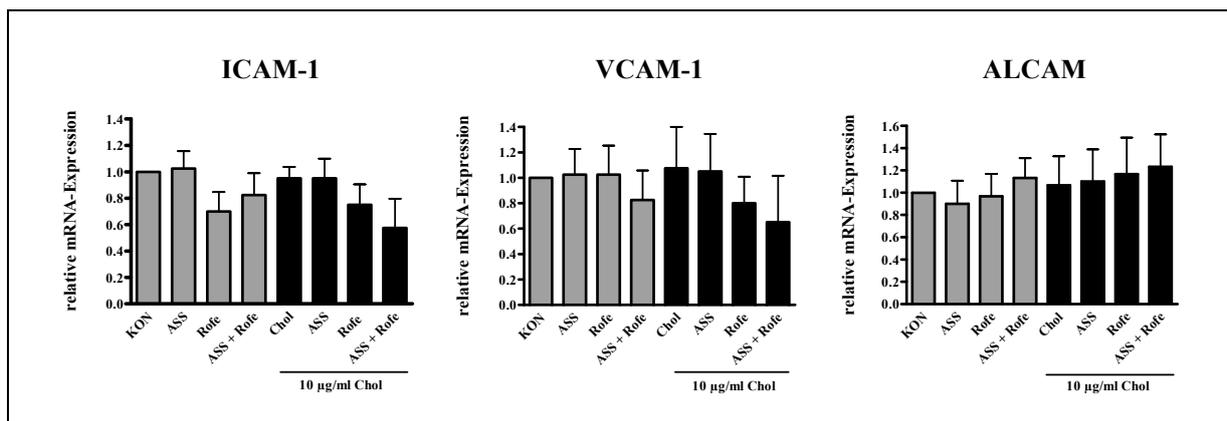


Abbildung 3.23

Einfluss von Cholesterolemie und verschiedenen COX-Inhibitoren auf die mRNA-Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM-1, VCAM-1 und ALCAM.

Dargestellt ist die densitometrische Auswertung von n=3-4 Versuchen. (KON – Kontrolle; Chol – Cholesterolemie 10 µg/ml; ASS – Acetylsalicylsäure 50 µM; Rofe – Rofecoxib 5 µM)

3.3.4.2 Oberflächenexpression von Adhäsionsmolekülen in der Durchflusszytometrie

Nachdem die Genexpressionsanalysen keine signifikanten Veränderungen in der Expression von ICAM-1, VCAM-1 und ALCAM ergaben, wurde im folgenden untersucht, ob die COX-Inhibitoren zu Veränderungen der Oberflächenexpression dieser Adhäsionsmoleküle führen. Diese Versuche wurden sowohl an SMC als auch an U937-Zellen durchgeführt.

Oberflächenexpression von ICAM-1, VCAM-1 und ALCAM auf SMC

Bisher ist nur wenig über die Expression von ALCAM auf SMC bekannt. ALCAM ist vielmehr auf der Oberfläche von aktivierten Leukozyten und auf embryonalen Endothelzellen zu finden (Levesque et al., 1998; Ohneda et al., 2001). Interessant ist daher der Befund, dass die Oberflächenexpression von ALCAM auf SMC stärker induziert wurde als auf den monozytären U937-Zellen (siehe unten).

Sowohl ASS als auch Rofecoxib führten zu einer signifikant verstärkten Expression von ALCAM auf der Zellmembran. In der Kombination beider COX-Inhibitoren verstärkte sich der Effekt noch. Da die mRNA-Expression nicht beeinflusst war, könnte eine Umverteilung des Proteins für diese Oberflächenexpression verantwortlich sein. Die Cholesterobeladung hatte keinen Einfluss auf die ALCAM-Expression auf SMC.

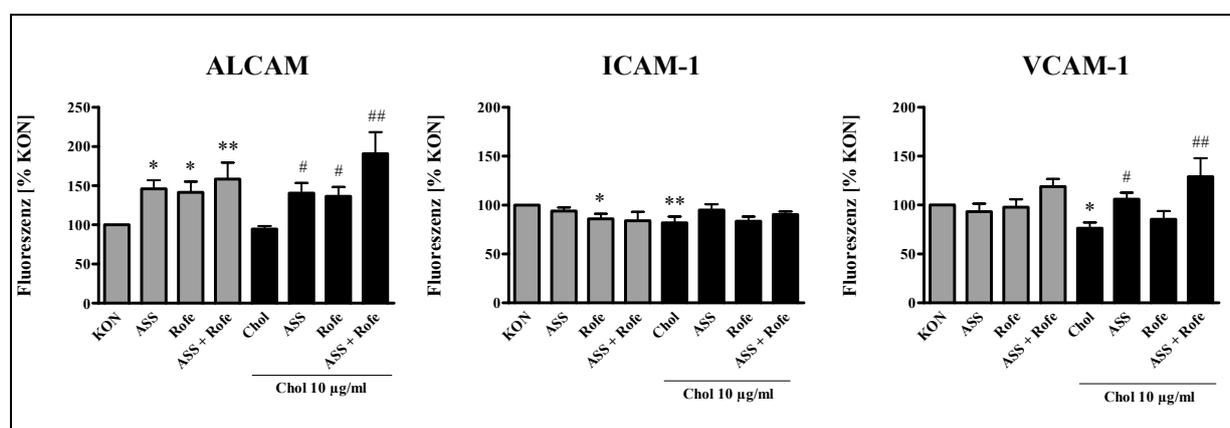


Abbildung 3.24

Einfluss von Cholesterol und Rofecoxib auf die Oberflächenexpression von ICAM-1, VCAM-1 und ALCAM auf SMC (n=4-11). Dargestellt ist die prozentuale Auswertung der mittleren Fluoreszenzintensitäten (KON – Kontrolle; Chol – Cholesterol 10 µg/ml; ASS – Acetylsalicylsäure 50 µM; Rofe – Rofecoxib 5 µM)

* p < 0.05 vs. KON ** p < 0.01 vs. KON # p < 0.05 vs. Chol ## p < 0.01 vs. Chol

ICAM-1 wurde nur schwach reguliert. Cholesterol führte zu einer signifikant verminderten Oberflächenexpression. Auch Rofecoxib und ASS regulierten die ICAM-1-Expression auf der Zellmembran, zumindest tendentiell, herab. In den cholesterobeladenen Zellen hob ASS den expressionsmindernden Effekt von Cholesterol nur tendentiell auf.

VCAM-1 wurde nach Cholesterobeladung signifikant schwächer auf der Zelloberfläche exprimiert. Rofecoxib hatte allein keinen Einfluss, führte aber in Kombination mit ASS zu einer verstärkten Expression von VCAM-1 auf der Zelloberfläche. In den cholesterobeladenen Zellen hob ASS auch hier den expressionsmindernden Effekt von Cholesterol auf.

Oberflächenexpression von ICAM-1, VCAM-1 und ALCAM auf U937-Zellen

ALCAM wurde auf den Monozyten deutlich weniger reguliert als auf den SMC. Aber auch hier zeigte sich eine Verstärkung der Oberflächenexpression nach Inkubation mit ASS und Rofecoxib, wobei der Effekt nur in den Rofecoxib-Gruppen signifikant ist.

ICAM-1 wurde auf der Zelloberfläche sowohl durch Cholesterolbeladung als auch nach Inkubation mit den COX-Inhibitoren verstärkt exprimiert. Besonders ausgeprägt ist dieser Effekt in den Zellen, die mit ASS und Rofecoxib behandelt wurden.

Diese Beobachtung trifft auch auf die Oberflächenexpression von VCAM-1 zu. Auch hier verstärkte die Kombination aus ASS und Rofecoxib die Oberflächenexpression signifikant. Auch ASS allein führte zu einer signifikant induzierten Expression von VCAM-1 auf der Oberfläche von Monozyten.

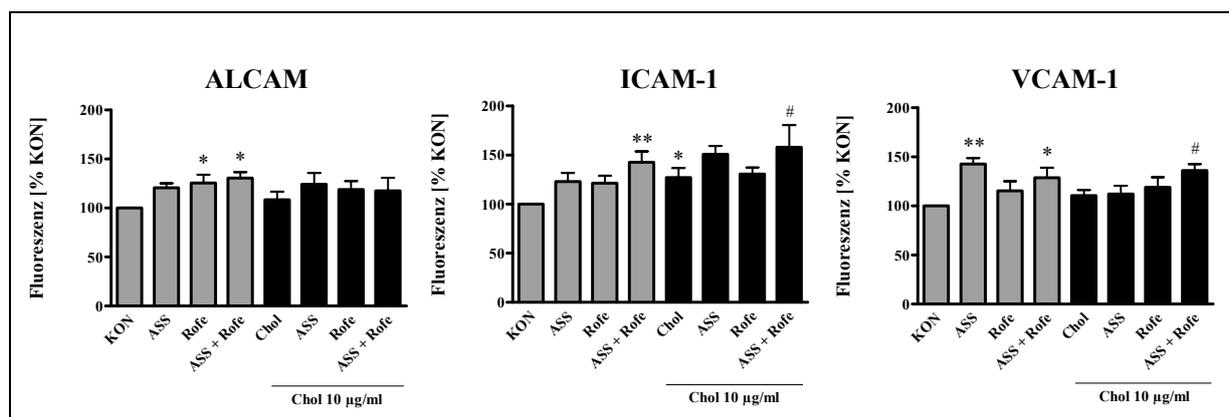


Abbildung 3.25

Einfluss von Cholesterol und Rofecoxib auf die Oberflächenexpression von ICAM-1, VCAM-1 und ALCAM auf U937-Zellen (n=5-11). Dargestellt ist die prozentuale Auswertung der mittleren Fluoreszenzen

(KON – Kontrolle; Chol – Cholesterol 10 µg/ml; ASS – Acetylsalicylsäure 50 µM; Rofe – Rofecoxib 5 µM)

* $p < 0.05$ vs. KON, ** $p < 0.01$ vs. KON, # $p < 0.05$ vs. Chol

3.4 Zusammenfassung der Ergebnisse

1. Die orale Langzeittherapie von hypercholesterolämischen Kaninchen mit Rofecoxib antagonisierte die antiatherosklerotischen und antithrombotischen Effekte von ASS. ASS konnte im Tiermodell sowohl die Entstehung atherosklerotischer Plaques in der Aorta als auch die Thrombenbildung in der *A. carotis* signifikant verhindern. Beide Effekte wurden durch gleichzeitige Behandlung mit Rofecoxib weitestgehend aufgehoben.

Auch in den *in-vitro*-Versuchen zur Adhäsion von Monozyten an humane SMC verhinderte Rofecoxib signifikant den antiadhäsiven Effekt von ASS.

2. Die durch die alleinige Behandlung mit Rofecoxib ausgelöste Endothelschädigung entspricht in ihrem Ausmaß der der Hypercholesterolämie. Daneben reduzierte Rofecoxib tendentiell die cholesterolabhängige Plaquebildung, wenn auch weniger stark ausgeprägt als ASS.

Im arteriellen Thrombosemodell nach Folts hatte Rofecoxib einen leichten antithrombotischen Effekt.

3. Das Adhäsionsmolekül ALCAM wurde durch Rofecoxib und ASS sowohl auf SMC als auch auf Monozyten verstärkt exprimiert. Die Oberflächenexpression von ICAM-1 und VCAM-1 wurde in Abhängigkeit vom Zelltyp unterschiedlich reguliert. Auf glatten Gefäßmuskeln wurde ICAM-1 durch Stimulation mit Rofecoxib herunterreguliert. Die Oberflächenexpression von VCAM-1 wurde durch Rofecoxib allein nicht beeinflusst, aber in Kombination mit ASS verstärkt. Auf Monozyten wurde die Oberflächenexpression von ICAM-1 und VCAM-1 durch Stimulation mit Rofecoxib, vor allem in Kombination mit ASS, verstärkt.

4 DISKUSSION

Als Ende der 1990er Jahre mit Celecoxib und Rofecoxib die ersten selektiven COX-2-Inhibitoren auf den Markt kamen, wurden sie als die neuen „Super-Aspirine“ angesehen (DeWitt, 1999). Sie versprachen die gleichen antiinflammatorischen, antipyretischen und analgetischen Effekte wie die traditionellen nichtsteroidalen Antiphlogistika (tNSAIDs) zu haben, ohne deren typische Nebenwirkungen zu verursachen. Die Entwicklung der selektiven COX-2-Inhibitoren beruhte auf der Entdeckung einer zweiten COX-Isoform 10 Jahre zuvor (Kujubu et al., 1991; Simmons et al., 1989; Xie et al., 1991). In den nachfolgenden Jahren wurde gezeigt, dass die COX-1 in den meisten Geweben konstitutiv exprimiert wird und vor allem physiologische Funktionen („housekeeping“-Funktionen) erfüllt (Otto und Smith, 1995). Die COX-2 stellt dagegen die induzierbare Isoform des Enzyms dar und ist in den meisten Geweben nicht konstitutiv exprimiert. Sie kann aber unter anderem in Endothelzellen (Jones et al., 1993), glatten Gefäßmuskelzellen (Ost et al., 1998) und Monozyten (O'Sullivan et al., 1992) mit Hilfe inflammatorischer Stimuli wie Lipopolysaccharid (LPS) oder Zytokinen induziert werden. Die COX-2 spielt daher vor allem bei inflammatorischen Prozessen eine Rolle (Murata et al., 1997; Seibert et al., 1995).

Diese „schwarz-weiß“-Sicht der Funktionen der beiden Isoformen ist allerdings unvollständig. Es wurde gezeigt, dass auch die COX-2 physiologisch wichtige Funktionen übernimmt (einen Überblick liefern Lipsky et al., 2000) und beispielsweise im Gehirn (Yamagata et al., 1993) und in der Niere (Komers und Epstein, 2002) konstitutiv exprimiert wird. Daneben wird die COX-2 in Endothelzellen durch Scherstress auch unter physiologischen Bedingungen induziert (Topper et al., 1996).

Die Definition der COX-2 als proinflammatorisches Enzym führte zur Entwicklung der selektiven COX-2-Inhibitoren. Da COX-2-abhängig gebildete Prostaglandine aber nicht nur Schmerz und Entzündung vermitteln, sondern unter anderem auch den Vasotonus, den Blutdruck und die Thrombusbildung beeinflussen, können die selektiven COX-2-Inhibitoren auch kardiovaskuläre Nebenwirkungen hervorrufen. Erste Hinweise darauf lassen sich schon aus dem pharmakologischen Profil der selektiven COX-2-Inhibitoren ableiten. Durch die alleinige Hemmung der COX-2 unterbleibt die Synthese des antithrombotischen und vasodilatierenden Prostazyklins (PGI₂), während die COX-1 ungehemmt bleibt und das prothrombotische, vasokonstriktorische Thromboxan A₂ (TXA₂) weiter synthetisieren kann

(McAdam et al., 1999). Das dabei resultierende Ungleichgewicht zwischen PGI_2 und TXA_2 zugunsten des prothrombotischen TXA_2 ist mit einem erhöhten Risiko für kardiovaskuläre, thrombotische Ereignisse verbunden (FitzGerald, 2003).

Obwohl es schon sehr früh Stimmen gab, die vor diesem möglichen Risiko warnten (McAdam et al., 1999; Mukherjee et al., 2001), wurden die „Super-Aspirine“ nach ihrer Markteinführung in erheblichem Maße verschrieben (Sawicki et al., 2006). Auch die Ergebnisse der groß angelegten VIGOR-Studie zeigten bereits ein fünffach erhöhtes kardiovaskuläres Risiko nach Behandlung mit Rofecoxib im Vergleich zu Naproxen (Bombardier et al., 2000; Curfman et al., 2005). Der Hersteller führte dies aber auf einen schützenden Effekt von Naproxen zurück. Die vorliegenden Warnungen und Hinweise auf ein erhöhtes kardiovaskuläres Risiko von selektiven COX-2-Inhibitoren blieben weltweit weitgehend ungehört. Erst die Ergebnisse der APPROVe-Studie (Bresalier et al., 2005) und die damit verbundene Marktrücknahme von Rofecoxib führten zu einem anderen Blickwinkel auf die Coxibe.

Diese Arbeit beschäftigt sich damit, Erklärungsansätze für das Auftreten der kardiovaskulären Nebenwirkungen von Rofecoxib zu finden, die neben dem PGI_2 - TXA_2 -Ungleichgewicht eine Rolle spielen.

4.1 Parameter des erhöhten kardiovaskulären Risikos durch Hypercholesterolämie

Die Auswertung der klinischen Studien, die sich mit dem kardiovaskulären Risiko von selektiven COX-2-Inhibitoren beschäftigt haben, ergab, dass die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse unter Therapie mit selektiven COX-2-Inhibitoren mit dem Ausgangsrisiko der Patienten steigt (FitzGerald, 2004).

Thromboembolische Ereignisse wie Myokardinfarkt und Schlaganfall sind die Folge einer ausgeprägten Atherosklerose, deren Entstehung durch zahlreiche endogene und exogene Noxen bzw. Krankheiten begünstigt wird. Dazu gehören das Alter, männliches Geschlecht und eine positive Familienanamnese (Frohlich und Lear, 2002). Daneben gibt es weitere Risikofaktoren, die durch eine gesunde Lebenshaltung verringert werden können. Zu diesen zählen Hypercholesterolämie, Diabetes mellitus (Typ II), Rauchen, Adipositas und Hypertonie (Paoletti et al., 2006). Eine besondere Bedeutung kommt dabei der Hypercholesterolämie zu (1984a; 1984b; Choi et al., 2006). Da Cholesterol nicht in den Gefäßwänden synthetisiert werden kann und dort üblicherweise auch nicht vorkommt, musste

eine Aufnahme aus der Blutbahn angenommen werden. Den Beweis dafür lieferte schon Anitschkow 1913 (Anitschkow, 1913), als er an Kaninchen zeigen konnte, dass durch Fütterung mit Cholesterol eine Atherosklerose ausgelöst wird.

Dieses Modell wurde auch in der hier vorliegenden Arbeit genutzt, um das kardiovaskuläre Ausgangsrisiko der Kaninchen zu erhöhen. Weiße Neuseeland Kaninchen wurden 12 Wochen mit einer atherogenen Diät (1 % Cholesterol) gefüttert, woraus eine deutlich ausgeprägte Hypercholesterolämie resultierte (CHOL 47.8 mM Cholesterol, KON 2.2 mM Cholesterol).

In der frühen Phase der Atherosklerose, lange bevor sichtbare Plaques entstehen, kommt es im Gefäß zu einer endothelialen Dysfunktion (Ross, 1999). Das gesunde Endothel setzt unter anderem vasodilatierende Substanzen wie NO und PGI₂, aber auch vasokonstriktorische Stoffe wie Endothelin-1, Angiotensin-II, TXA₂ und reaktive Sauerstoffspezies (ROS) frei. Unter physiologischen Bedingungen reguliert die Freisetzung und Interaktion dieser Substanzen zahlreiche Funktionen wie die Homöostase von Zellwachstum und Apoptose, Zellmigration, Zusammensetzung der extrazellulären Matrix, Angiogenese und Gefäßpermeabilität (Raij, 2006). Freigesetztes NO führt zur Relaxation von vaskulären SMC und damit zur Vasorelaxation (Furchgott und Zawadzki, 1980; Palmer et al., 1987). Außerdem wirkt es den vasokonstriktorischen, thrombotischen und inflammatorischen Effekten von Endothelin-1 und Angiotensin-II entgegen. NO hemmt zusätzlich die Adhäsion und Aggregation von Thrombozyten und wirkt auf diesem Weg antithrombotisch (Bassenge, 1991; Lüscher, 1989).

Die endotheliale Dysfunktion ist vor allem durch eine verminderte Bioverfügbarkeit von NO gekennzeichnet. Es ist bekannt, dass eine verminderte NO-Aktivität aufgrund der zahlreichen physiologischen Wirkungen von NO eng mit der Entstehung der Atherosklerose verbunden ist (Reddy et al., 1994).

Mit Hilfe von Gefäßbadversuchen zur endothelabhängigen Relaxation kann die Verfügbarkeit von NO getestet werden. Die Zugabe von Acetylcholin (ACh) zum Gefäß führt über muskarinerge Rezeptoren auf Endothelzellen zur Freisetzung von NO (Furchgott und Zawadzki, 1980; Palmer et al., 1987), welches via Diffusion zur Gefäßmuskelzelle gelangt und dort die lösliche Guanylatzyklase aktiviert. Daraufhin steigt die Konzentration des intrazellulären cGMPs, welches zur Vasodilatation der Gefäße führt (Ignarro und Kadowitz, 1985; Murad et al., 1985). Die ACh-abhängige Relaxation von Blutgefäßen kann daher als Marker für die Endothelfunktion genutzt werden.

In den Versuchen zur Endothelfunktion zeigte sich, dass die Aorten der cholesterolgefütterten Kaninchen nach Zugabe von $0.1 \mu\text{M}$ Acetylcholin eine im Vergleich zur Kontrolle um ca. 50 % verminderte Relaxation aufwiesen. Daraus lässt sich schließen, dass die Hypercholesterolämie zur Entwicklung einer endothelialen Dysfunktion führte. Dieser Befund deckt sich mit den Ergebnissen anderer Studien, die sich mit dem Einfluss der Hypercholesterolämie auf die Atherogenese beschäftigt haben. Beispielsweise konnte ebenfalls in Kaninchen gezeigt werden, dass Lovastatin, ein Hemmstoff der Cholesterolsynthese, die Cholesterolspiegel im Blutplasma senkte, atherosklerotische Läsionen reduzierte und die endothelabhängige Vasodilatation zumindest teilweise wieder herstellte (Galle et al., 1991). Auch klinische Studien an hypercholesterolämischen Patienten haben gezeigt, dass Hypercholesterolämie die Verfügbarkeit von NO reduziert und damit die Endothelfunktion beeinträchtigt (Casino et al., 1993).

Wie lässt sich die verminderte Bioverfügbarkeit von NO erklären?

Die Bioverfügbarkeit von NO wird durch das Zusammenspiel von Synthese und Abbau bestimmt. NO hat als Radikal eine sehr kurze Halbwertszeit und wird durch Superoxid-Anionen (O_2^-) sehr schnell inaktiviert. Dabei reagiert NO mit O_2^- zu Peroxynitrit (ONOO^-), einem hochreaktiven, zytotoxischen Anion (Squadrito und Pryor, 1995). Die Bildung von Superoxid-Anionen wird durch Hypercholesterolämie begünstigt (Ohara et al., 1993) und in fortgeschrittenen Stadien der Atherosklerose wird die Bildung von O_2^- durch die Akkumulation von Leukozyten in der Gefäßwand noch verstärkt (Ross, 1993).

Peroxynitrit ist unter anderem für die Oxidation von LDL („*low density lipoprotein*“) verantwortlich und hat damit proatherogene Wirkungen (Griendling und FitzGerald, 2003). Daneben fördert es die Entkopplung der eNOS, wodurch die Reduktase-Funktion der eNOS aktiviert wird und sie anstelle von NO vermehrt reaktive Sauerstoffspezies (ROS) produziert. Dies verstärkt den oxidativen Stress und damit auch die endotheliale Dysfunktion (Landmesser et al., 2003).

Daneben kann auch eine verminderte Biosynthese zur geringeren Bioverfügbarkeit von NO beitragen. Möglicherweise spielt dabei Caveolin-1 eine wichtige Rolle.

Erhöhte Cholesterolspiegel verursachen unter anderem die mRNA-Induktion von Caveolin-1 (Bist et al., 1997). Caveolin-1 ist an der Regulation der Aktivität der endothelialen eNOS beteiligt. Unter basalen Bedingungen liegt die eNOS in Caveolae an Caveolin-1 gebunden vor und ist dadurch inaktiv. Durch einen Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration kommt

es zur Aktivierung von Calmodulin und zur Bildung von Calmodulin-eNOS-Komplexen. Diese Komplexbildung führt zu einer Konformationsänderung der eNOS, wodurch diese aktiviert wird. Aktiviertes Calmodulin konkurriert mit Caveolin-1 um die eNOS-Bindung und reguliert damit, abhängig vom intrazellulären Calciumspiegel, die Aktivität des Enzyms (Michel et al., 1997). Die cholesterolvermittelte Induktion von Caveolin-1 kann über diesen Mechanismus zu einer Stabilisierung der inaktiven eNOS führen (Feron et al., 1999) und damit die Bioverfügbarkeit von NO reduzieren.

Neben der endothelialen Dysfunktion ließen sich in der Aorta außerdem stark ausgeprägte atherosklerotische Läsionen nachweisen, die auf eine fortgeschrittene Atherosklerose hindeuten. Die Aorta cholesterolgefütterter Kaninchen war zu ca. 72 % mit Plaques bedeckt, während die Kontrolltiere keinerlei Plaquentwicklung zeigten.

Da die Atherosklerose vor allem durch eine starke vaskuläre Inflammation gekennzeichnet ist, kommt es zur Aufregulation der COX-2 (Schönbeck, 1999) und einer verstärkten PGI₂-Synthese (Belton et al., 2000). In dieser Untersuchung war die COX-2-mRNA-Expression in den Aorten der cholesterolgefütterten Kaninchen um den Faktor 3 erhöht. Damit verbunden war eine erhöhte 6-Keto-PGF_{1 α} -Konzentration im Blutserum der Tiere (KON 5.5 ng/ml vs. Chol 13.3 ng/ml; $p < 0.05$). Die COX-1-Aktivität, gemessen anhand der TXB₂-Spiegel, blieb durch die atherogene Diät nahezu unbeeinflusst (KON 415 ng/ml vs. Chol 498 ng/ml). Der tendentiell vorhandene Anstieg in der TX-Biosynthese lässt sich damit erklären, dass es infolge der Atherosklerose zu einer verstärkten Plättchenaktivierung kam, die mit einer erhöhten TX-Bildung verbunden ist (Fitzgerald et al., 1986).

Die akute Inflammation in der fortgeschrittenen atherosklerotischen Läsion führt zur Aktivierung der Gerinnungskaskade und damit verbunden zu einem erhöhten Thromboserisiko. Aus diesem Grund wurde untersucht, ob die Hypercholesterolämie im Folts-Modell zu einer verstärkten Thrombusbildung nach experimentell induzierter Endothelverletzung führt. Da es in ausnahmslos allen Tieren, sowohl in der Kontrollgruppe als auch in der Cholesterolgegruppe, zur Ausbildung von Thromben kam, ist nicht sicher zu beurteilen, ob die atherogene Diät das thrombotische Potential noch zusätzlich erhöht hat.

Um die genauen Mechanismen für die vaskulär-thrombotischen Nebenwirkungen von Rofecoxib aufzuklären, wurde versucht, das Kaninchenmodell in die Zellkultur zu übertragen. Zu diesem Zweck wurden humane glatte Gefäßmuskelzellen (SMC) der Aorta mit Cholesterol beladen, um die Auswirkungen einer Hypercholesterolämie zu simulieren.

Cholesterol selbst ist nicht wasserlöslich und für die Anwendung in der Zellkultur daher nicht geeignet. Für die Stimulation glatter Gefäßmuskelzellen wurde aus diesem Grund ein Komplex aus Methyl- β -Cyclodextrin (M β -CD) und Cholesterol verwendet. β -Cyclodextrine sind zyklische Oligosaccharide, deren äußere Oberfläche hydrophil ist. Im Inneren des Moleküls liegen aufgrund zahlreicher CH₃-Gruppen hydrophobe Bedingungen vor, so dass β -Cyclodextrine zum Einschluss hydrophober Moleküle genutzt werden können. β -Cyclodextrine haben eine besonders hohe Affinität zu Sterolen, wodurch sie sich sehr gut für die zelluläre Anreicherung oder Deletion von Cholesterol verwenden lassen (Christian et al., 1997). In murinen aortalen SMC konnte gezeigt werden, dass die Verwendung des M β -CD-Cholesterol-Komplexes zur Anreicherung von Cholesterol in den Zellen und damit verbunden zur Ausbildung Makrophagen-ähnlicher Schaumzellen führte (Rong et al., 2003).

Die Öl-Rot-Färbung zeigte, dass das Cholesterol nach der Stimulation tatsächlich in den Zellen angereichert wird. Auch quantitativ ließen sich in den behandelten Zellen signifikant höhere Cholesterolmengen nachweisen (KON 6.5 μ g vs. Chol 11.8 μ g; $p < 0.001$). Der Komplex aus M β -CD und Cholesterol ist also dafür geeignet, Cholesterol aus dem Inkubationsmedium in die humanen SMC zu transportieren (Rauch et al., 2007). M β -CD, das als Kontrolle mitgeführt wurde, reduzierte durch Aufnahme von intrazellulärem Cholesterol den zellulären Cholesterolgehalt tendentiell (M β -CD 5.0 μ g).

Um zu prüfen, ob durch die Cholesterolbeladung der Zellen ein Atherosklerose-ähnlicher Zustand erreicht werden konnte, wurde zunächst die Expression der COX-2 untersucht. Auf mRNA-Ebene führte die 24-stündige Anreicherung der SMC mit Cholesterol zu einer um den Faktor 3 gesteigerten COX-2-Expression. Auch das COX-2-Protein wurde dreifach aufreguliert. Im folgenden wurde untersucht, ob mit der Aufregulation des COX-2-Proteins auch eine gesteigerte Enzymaktivität verbunden war. Allerdings führte die Cholesterolbeladung nur zu einem sehr schwachen Anstieg der PGI₂-Konzentration im Inkubationsmedium (KON 600 pg/ml vs. Chol 879 pg/ml).

In aortalen SMC des Kaninchens führte die Inkubation mit LDL zu einer verminderten PGI₂-Synthese (Pomerantz und Hajjar, 1989). Begründet wird dies mit einer Hemmung der Phospholipase A₂, wodurch weniger Arachidonsäure aus Phospholipiden freigesetzt wird.

Dementsprechend steht für die COX-2 weniger Substrat zur Verfügung, so dass dieser Mechanismus möglicherweise dazu beiträgt, dass die Induktion des COX-2-Proteins nicht mit einem proportionalen Anstieg der PGI₂-Synthese verbunden war.

Während atherosklerotischer Prozesse verändern SMC ihren Phänotyp. Er wechselt vom differenzierten kontraktilen Phänotyp zum dedifferenzierten, sekretorischen (Gorski und Walsh, 1995). Dieser veränderte Phänotyp ist durch eine gesteigerte Proliferation gekennzeichnet und auch dies konnte für die cholesterobeladenen SMC gezeigt werden (Rauch et al., 2007).

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass die Cholesterobeladung der SMC zu Veränderungen führte, die den Bedingungen einer experimentellen Atherosklerose durch Cholesterolfütterung entsprechen.

4.2 Einfluss einer Langzeittherapie mit Rofecoxib oder ASS auf die Gefäßfunktion

Die Behandlung mit Rofecoxib führte unter Standarddiät zu einer ähnlich stark eingeschränkten ACh-abhängigen Relaxation wie die Hypercholesterolämie. Dieser Befund steht in Kontrast zu einer Studie an gesunden Menschen. Hier verursachte die COX-2-Hemmung durch Rofecoxib im Vergleich zu Naproxen keine endotheliale Dysfunktion (Verma et al., 2001). Allerdings war in dieser Studie eine Komedikation von ASS erlaubt, wodurch der Rofecoxib-Effekt möglicherweise verschleiert wurde. Auch der Vergleich gegen Naproxen statt gegen Placebo erschwert die Auswertung, da möglicherweise auch Effekte von Naproxen eine Rolle spielen. Hierbei ist auch zu berücksichtigen, dass Naproxen, im Vergleich zu anderen tNSAIDs, mit ca. 13 h die mit Abstand längste Halbwertszeit aufweist, so dass bei wiederholter Gabe mit einer „pseudo-irreversiblen“ COX-Hemmung zu rechnen ist (Kearney et al., 2006).

Die deutlich verminderte Gefäßrelaxation durch Rofecoxib kann zum einen auf einer verminderten Bioverfügbarkeit von NO beruhen oder eventuell auf Prostaglandinwirkungen zurückgeführt werden. Die vasodilatierend wirkenden Prostaglandine PGI₂ und PGE₂ werden hauptsächlich mit Hilfe der COX-2 synthetisiert (Caughey et al., 2001). Durch deren Hemmung wird weniger PGI₂ und PGE₂ gebildet, wodurch die verminderte Gefäßrelaxation erklärt werden kann.

In den hypercholesterolämischen Kaninchen hatte Rofecoxib, wie auch ASS, keinen Einfluss auf die Endothelfunktion. Möglicherweise war die durch die Hypercholesterolämie verursachte Endothelschädigung schon maximal, so dass keine weitere Verschlechterung beobachtet werden konnte.

Neben der Endothelfunktion wurde auch der Einfluss der Langzeittherapie mit Rofecoxib und/oder ASS auf die Thrombogenität untersucht. Dazu wurde im modifizierten Folts-Modell der Blutfluss durch die *A. carotis* gemessen. ASS verhinderte in den cholesterolgefütterten Tieren die Thrombusbildung signifikant ($p < 0.005$). Außerdem kam es zu einem signifikanten Anstieg der Fläche unter der aufgezeichneten Blutflusskurve. Dies bedeutet, dass nach experimentell induzierter Endothelschädigung deutlich weniger bzw. kleinere Thromben entstanden als in den cholesterolgefütterten Kontrolltieren und der Blutfluss durch die *A. carotis* verbessert wurde.

Rofecoxib konnte das Auftreten von Thromben dagegen nicht verhindern. Alle behandelten Tiere entwickelten im Laufe der Zeit einen Thrombus, wobei es sich jeweils hälftig um einen okkludierenden Thrombus bzw. um zyklische Flussvariationen handelte. Tendenziell hatte auch Rofecoxib einen schwach antithrombotischen Effekt, in dem Sinne, dass die gebildeten Thromben kleiner waren als in den Kontrolltieren und somit nicht notwendigerweise zum kompletten Verschluss des Gefäßes führten. Dafür spricht ebenfalls, dass die Fläche unter der Blutflusskurve auch durch Rofecoxib tendenziell vergrößert war.

Dieser Befund steht in gewissem Gegensatz zu zwei weiteren tierexperimentellen Studien. Darin wurde gezeigt, dass die PGI₂-Hemmung selbst zwar keine Thromben induziert, aber die Wirkung anderer thrombogener Stimuli verstärkt (Cheng et al., 2006; Murata et al., 1997). Dies spricht für eine erhöhte Thrombogenität durch Rofecoxib in den cholesterolbehandelten Tieren. Da bei dieser Untersuchung auch in allen Kontrolltieren Thromben aufgetreten sind, war eine Verschlechterung nicht feststellbar. Insofern ergibt sich kein Widerspruch zu den hier vorgestellten Befunden.

Als weiterer Parameter für die Progression der Atherosklerose wurde die Plaqueentwicklung in der Aorta untersucht. Durch Fütterung der atherogenen Diät entwickelten sich in der Aorta Plaques, die ca. 72 % der gesamten Aortenfläche bedeckten. Die Behandlung mit ASS reduzierte die plaquebedeckte Fläche signifikant auf ca. 25 %. Ein vergleichbarer Effekt konnte bei LDL-Rezeptor-defizienten Mäusen gezeigt werden. Hier führte die Behandlung

mit ASS (90-100 mg/d, entsprechend 3-4 mg/kg) zu einer ca. 65 %igen Reduktion der Plaquefläche (Cyrus et al., 2002).

Die Behandlung mit Rofecoxib reduzierte Größe und Anzahl der atherosklerotischen Plaques in der Aorta um ca. 35 %. Dieser Effekt war nicht signifikant. Der Einfluss der COX-2 auf die Entwicklung einer atherosklerotischen Läsion wird kontrovers diskutiert. Es liegen Studien an hypercholesterolämischen Mäusen vor, die für die COX-2 sowohl einen antiatherosklerotischen Effekt zeigen (Rott et al., 2003), als auch Hinweise auf eine proatherosklerotische Wirkung der COX-2 (Burleigh et al., 2005) liefern. In ApoE-*knockout*-Mäusen führte die Behandlung mit Celecoxib und Rofecoxib in der Aorta zu einer tendentiellen Reduktion der Plaquegröße um ca. 30 % (Metzner et al., 2007). Der gleiche Effekt konnte in der hier vorliegenden Studie gezeigt werden.

Neben den direkten Wirkungen auf das Gefäßsystem, wurde auch der Einfluss der COX-Inhibitoren auf die COX-2-mRNA-Expression und die Synthese von PGI₂ und TXA₂ untersucht. Rofecoxib senkte die durch Cholesterolfütterung induzierte COX-2-Expression signifikant auf Kontrollniveau ab. Dies kann mit der Autoregulation der COX-2 erklärt werden. PGE₂ wird COX-2-abhängig gebildet und führt im Sinne einer positiven Rückkopplung zur Aufregulation des Enzyms (Debey et al., 2003) Durch Rofecoxib wurde die Bildung von PGE₂ gehemmt und damit die Autoregulation der COX-2 unterbunden. ASS hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Genexpression der COX-2.

Des Weiteren wurde anhand der Serum- bzw. Plasmakonzentrationen von TXB₂ und 6-Keto-PGF_{1α} untersucht, ob die applizierten Arzneistoffmengen für die Hemmung der Aktivität von COX-1 bzw. COX-2 ausreichend waren. Die PGI₂-Synthese wurde in den Kaninchen nur durch den selektiven COX-2-Inhibitor Rofecoxib signifikant gesenkt. ASS hemmt überwiegend die COX-1 und hatte daher keinen Einfluss auf die 6-Keto-PGF_{1α}-Spiegel, während die COX-1-abhängige TXB₂-Synthese um ca. 30 % reduziert wurde.

Unter inflammatorischen Bedingungen tragen auch Makrophagen zur TX-Synthese bei (Maclouf et al., 1998; Nüsing und Ullrich, 1990). Damit kann die unvollständige TX-Hemmung durch ASS erklärt werden. Die COX-1 wird zwar auch in diesen Zellen irreversibel gehemmt, aber Makrophagen können im Gegensatz zu Thrombozyten das COX-1-Protein nachsynthetisieren und damit auch unter ASS-Behandlung zur vermehrten TX-Produktion beitragen. Daneben können Makrophagen TXA₂ auch über die COX-2 synthetisieren (Cipollone et al., 1997). Eine verstärkte COX-2-Expression in der

Atherosklerose (Belton et al., 2000) könnte damit unter Umgehung der thrombozytären COX-1 dafür verantwortlich sein, dass die ASS-Konzentration für eine vollständige Hemmung nicht ausreichte.

Rofecoxib hat einen tendentiell stimulierenden Effekt auf die TX-Biosynthese. Es wurde gezeigt, dass TXA₂ und PGI₂ im Bereich der Thrombozyten-Aggregation als funktionale Gegenspieler fungieren. Hohe TXA₂-Spiegel bewirken eine PGI₂-Freisetzung aus dem Endothel, um das hämostatische Gleichgewicht aufrecht zu erhalten (Cheng et al., 2002). Gleichzeitig bewirken hohe PGI₂-Spiegel eine verminderte TXA₂-Bildung, was zur aggregationshemmenden Wirkung von PGI₂ beiträgt. Ist die COX-2-abhängige PGI₂-Bildung durch Rofecoxib gehemmt, fällt auch der hemmende Effekt von PGI₂ auf die TXA₂-Synthese weg. Deshalb ist in den Tieren, die die Kombination aus ASS und Rofecoxib bekommen haben, der TXA₂-Spiegel im Vergleich zur Cholesterolgegruppe signifikant erhöht.

Ein ähnlicher Befund zeigte sich auch in hypercholesterolemischen Mäusen. Die Deletion des IP-Rezeptors führte zu einer gesteigerten Synthese von TXA₂ (Egan et al., 2004). Ähnliche Bedingungen liegen vor, wenn die Bildung von PGI₂ durch Rofecoxib gehemmt ist.

Die *in-vitro*-Versuche zur Adhäsion von Monozyten an SMC bestätigen teilweise die tierexperimentellen Ergebnisse. So führte ASS auch in diesem Versuchsansatz zu einer verminderten Monozyten-Adhäsion, was den Daten der Plaqueentwicklung entspricht. Auf der anderen Seite führte Rofecoxib in cholesterobeladenen Zellen aber zu einer verstärkten Adhäsion von Monozyten an SMC. In Kontrollzellen (ohne Cholesterol) hatte Rofecoxib keinen Effekt auf die Monozytenadhäsion. Dies steht im Gegensatz zu den antiatherosklerotischen Wirkungen von Rofecoxib im Tiermodell, wird aber durch Daten aus der Literatur gestützt.

Metzner und Kollegen konnten zeigen, dass in ApoE-*knockout*-Mäusen die Behandlung mit Celecoxib oder Rofecoxib unter atherogener Diät zu einer reduzierten Plaquebildung führte. Wurden die Mäuse dagegen mit einer nicht atherogenen Standarddiät gefüttert, induzierten Celecoxib und Rofecoxib die Bildung atherosklerotischer Plaques (Metzner et al., 2007). Dies deutet darauf hin, dass selektive COX-2-Inhibitoren die Entstehung einer Atherosklerose zwar begünstigen, aber in fortgeschrittenen Stadien aufgrund ihrer antiinflammatorischen Wirkung der Progression der Erkrankung entgegen wirken können.

Daneben ist bekannt, dass die Adhäsion von Leukozyten und Thrombozyten durch PGI₂ gehemmt wird (Bunting et al., 1983). Die COX-2-Hemmung würde unter dieser Annahme die Adhäsion von Leukozyten begünstigen und unsere Ergebnisse zur Monozyten-Adhäsion

bestätigen. Dieser Effekt wurde auch in *ApoE-knockout*-Mäusen gezeigt. Diskutiert wird hierbei, dass es durch Hemmung der COX-2 zur Akkumulation von Arachidonsäure kommt, wodurch die mitochondriale Atmungskette gehemmt ist. Infolge dessen entstehen vermehrt reaktive Sauerstoffspezies, die die endotheliale Dysfunktion und damit die Adhäsion von Leukozyten und Thrombozyten an das Endothel begünstigen (Fosslien, 2005).

Für die Interaktion von Endothelzellen und SMC mit Leukozyten spielen verschiedene Adhäsionsmoleküle eine wichtige Rolle. Diese werden unter anderem bei einer vorliegenden endothelialen Dysfunktion induziert.

Die Aktivierung von Endothelzellen durch inflammatorische Reize führt innerhalb kurzer Zeit zur *de novo*-Synthese von P- und E-Selektin. Diese binden zirkulierende Leukozyten aus dem Blutstrom und vermitteln einen ersten Kontakt zwischen Leukozyten und Endothelzellen. Daraufhin „rollen“ die Leukozyten über das Endothel und werden dabei aktiviert. Aufgrund dieser Aktivierung werden Integrine induziert und es erfolgt die feste Bindung über Integrin-CAM-Wechselwirkungen an das Endothel. Besonders wichtig sind in diesem Zusammenhang ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule-1*) und VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule-1*). Letztendlich folgen die Leukozyten proinflammatorischen Chemokinen, wie z.B. MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein-1*) und transmigrieren durch das Endothel (Gonzalez-Amaro et al., 1998). Dabei spielt neben PECAM (*platelet-endothelial cell adhesion molecule*, Muller et al., 1993) auch ALCAM (*activated leucocyte adhesion molecule*) eine wichtige Rolle. ALCAM wird sowohl auf Leukozyten als auch auf Endothelzellen exprimiert und fördert über homophile ALCAM-ALCAM-Wechselwirkungen die Einwanderung von Leukozyten in die Gefäßwand (Masedunskas et al., 2006).

Untersuchungen zur Adhäsion werden häufig an Endothelzellen vorgenommen. Daneben spielen aber auch SMC eine bedeutende Rolle, da sie im atherosklerotischen Geschehen durch Migration an die Plaqueoberfläche gelangen können. SMC können z.B. ICAM-1 und VCAM-1 exprimieren und darüber Interaktionen mit anderen Zellen, wie z.B. Leukozyten eingehen (Jang et al., 1994). ICAM-1 ist oft basal exprimiert, kann aber, wie VCAM-1 auch, durch proinflammatorische Stimuli induziert werden (Couffinhal et al., 1994; Ikeda et al., 1993). ICAM-1 und VCAM-1 sind beispielsweise auch in der Neointima auf SMC exprimiert (O'Brien et al., 1993; Poston et al., 1992)

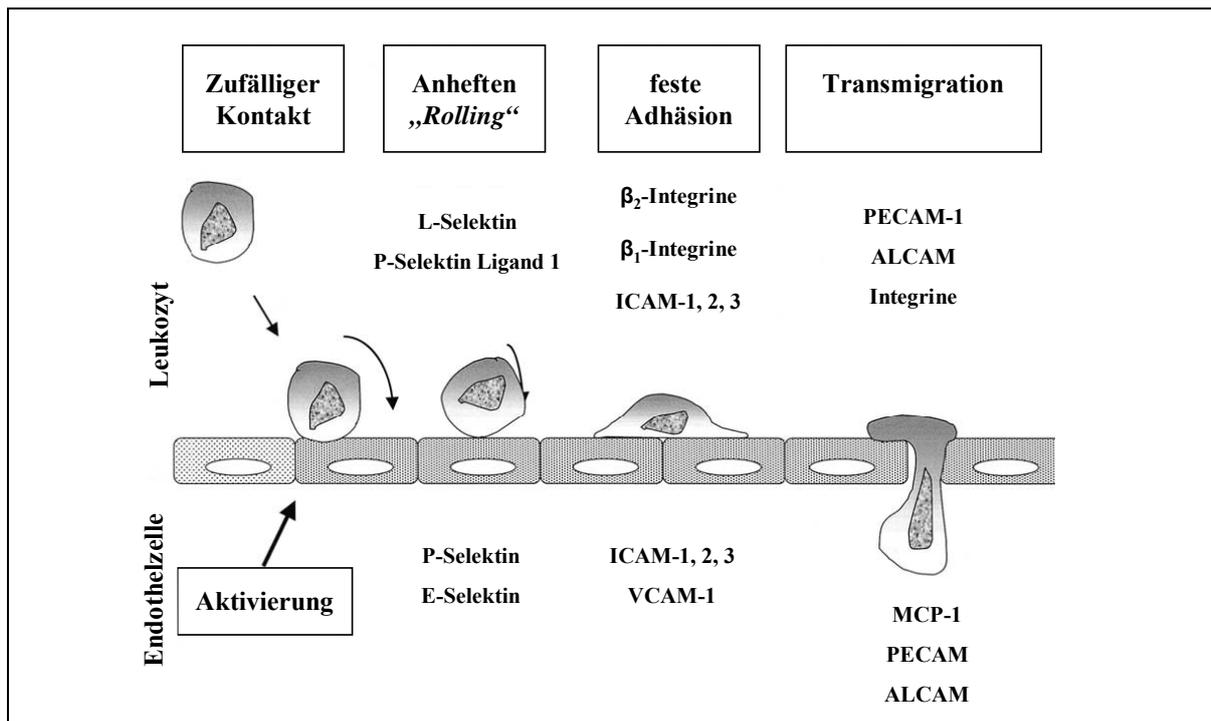


Abbildung 4.1

Adhäsion von Leukozyten an das Endothel (nach Blankenberg et al., 2003)

Die COX-2 spielt eine wichtige Rolle in der Regulation dieser Adhäsionsmoleküle. So konnte gezeigt werden, dass PGE_2 die Expression von ICAM-1 und VCAM-1 verhindert (Bishop-Bailey et al., 1998). In unseren Analysen zur Oberflächenexpression von ICAM-1 auf SMC führte die Cholesterobeladung zur Induktion der COX-2 und wahrscheinlich über eine gesteigerte PGE_2 -Synthese zu einer verminderten Expression von ICAM-1 auf der Zelloberfläche. Da ICAM-1 für die Adhäsion von Monozyten an die Gefäßwand wichtig ist, korrelieren diese Ergebnisse auch mit der verminderten Adhäsion von Monozyten nach Cholesterobeladung.

Für ASS ist bekannt, dass es in hohen Konzentrationen COX-unabhängig die $\text{NF}\kappa\text{B}$ -Aktivierung durch Interaktion mit I κ B hemmt (Kopp und Ghosh, 1994). Dadurch wird die $\text{NF}\kappa\text{B}$ -vermittelte VCAM-1-Expression verhindert und die Adhäsion von Monozyten verringert (Weber et al., 1995). Eine verminderte Adhäsion von Monozyten wurde in diesen Versuchen bestätigt und auch eine Abnahme der Oberflächenexpression von VCAM-1 auf SMC gefunden. Auf den U937-Zellen war ein gegenteiliger Effekt zu beobachten. ASS führte hier zu einem Anstieg der Oberflächenexpression. Wahrscheinlich hat dies aber keine physiologische Bedeutung, da VCAM-1 auf Monozyten nur sehr schwach exprimiert wird.

Wichtiger wäre hier die Betrachtung des VCAM-Bindungspartners auf Leukozyten ($\alpha_4\beta_1$ -Integrin (VLA-4)). Dies ist in weiterführenden Untersuchungen geplant.

Interessant ist außerdem die starke Regulation von ALCAM auf SMC. Bisher ist wenig darüber bekannt, ob ALCAM auch auf SMC exprimiert wird und in welchem Zusammenhang ALCAM mit Prostaglandinen steht. Umso interessanter erscheint unser Befund, dass ALCAM durch beide COX-Inhibitoren aufreguliert wird, wobei sich der Effekt bei Kombination der Substanzen noch verstärkt. Auch auf den Monozyten ist in etwas abgeschwächter Form erkennbar, dass Rofecoxib zur Aufregulation von ALCAM führt.

ALCAM spielt weniger in der Vermittlung der Adhäsion von Leukozyten eine Rolle, als vielmehr in der Transmigration von Leukozyten in den subendothelialen Raum. Aufgrund der stark induzierten Oberflächenexpression von ALCAM, sowohl auf SMC als auch auf Monozyten, können letztere vermehrt in die atherosklerotischen Plaques migrieren. Dort sezernieren sie unter anderem Matrix-Metalloproteinasen (MMPs), die die extrazelluläre Matrix innerhalb atherosklerotischer Plaques abbauen und damit die Entwicklung instabiler Plaques begünstigen (Galis et al., 1994).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die vaskulär-thrombotischen Nebenwirkungen von Rofecoxib nicht nur auf die Beeinflussung des PGI₂-TXA₂-Gleichgewichtes zurückzuführen sind, sondern dass Rofecoxib auch über andere Mechanismen in die Progression der Atherosklerose eingreifen kann. So führt es u.a. zu einer ähnlich starken endothelialen Dysfunktion wie eine Hypercholesterolämie. Daneben wird die Oberflächenexpression von ALCAM gesteigert, woraus möglicherweise die vermehrte Transmigration von Leukozyten in atherosklerotische Läsionen und die damit verbundene Veränderung zu instabilen Plaques resultiert.

ASS wirkt in diesem Tiermodell antiatherosklerotisch und antithrombotisch. Sowohl die Entwicklung von Plaques in der Aorta, als auch die Thrombenbildung nach initialer Endothelschädigung war nach Langzeitbehandlung mit ASS signifikant reduziert.

4.3 Einfluss einer Langzeittherapie mit Rofecoxib auf die Wirkungen von ASS

In einigen Publikationen wird empfohlen, durch gleichzeitige Gabe von ASS die kardiovaskulären Nebenwirkungen von Rofecoxib zu antagonisieren, da dann das Gleichgewicht zwischen PGI₂ und TXA₂ wieder hergestellt wäre (Silverstein et al., 2000). Aber PGI₂ antagonisiert nicht nur TXA₂, sondern alle endogenen Mediatoren, die die Thrombozyten stimulieren, den Blutdruck erhöhen oder die Atherosklerose beschleunigen (Grosser et al., 2006). Somit ist es fraglich, ob eine alleinige TXA₂-Hemmung die PGI₂-Hemmung aufwiegt. Außerdem stellt sich die Frage, ob dann der Magenschutz noch gegeben ist, der ja der Vorteil der selektiven COX-2-Inhibitoren sein soll (Chan, 2006). In der TARGET-Studie war Lumiracoxib nur dann hinsichtlich der gastrointestinalen Nebenwirkungen überlegen, wenn nicht gleichzeitig ASS eingenommen wurde (Schnitzer et al., 2004).

Auch die Befunde dieser Arbeit sprechen gegen eine Kombination von ASS und Rofecoxib, allerdings im umgekehrten Sinn. Nicht ASS hebt die Vorteile der COX-2-Inhibitoren auf, sondern Rofecoxib antagonisiert sowohl die antiatherosklerotischen als auch die antithrombotischen Wirkungen von ASS!

Während ASS die plaquebedeckte Fläche von ca. 72 % auf ca. 25 % reduzierte, waren durch zusätzliche Gabe von Rofecoxib wieder ca. 60 % der Aorta mit Plaques bedeckt. Auch im Folts-Modell hob Rofecoxib die antithrombotischen Effekte von ASS weitgehend auf. Die ASS-Behandlung konnte die Thrombusbildung in 62 % der Fälle verhindern. In der Kombination mit Rofecoxib gelang dies nur noch in 20 % der Fälle. Dieser Effekt war aufgrund der geringen Tierzahlen nicht signifikant. Mit Hilfe statistischer Verfahren konnte aber ermittelt werden, dass durch Verdopplung der n-Zahl eine Signifikanz von $p < 0.05$ erreicht werden könnte.

Die Adhäsionsversuche an humanen aortalen SMC zeigten ebenfalls, dass Rofecoxib die antiadhäsiven Wirkungen von ASS wieder aufhob. Einen Erklärungsansatz für diesen Befund liefern Fiorucci und Kollegen. ASS acetyliert nicht nur die COX-1, sondern auch die COX-2. Die COX-2 wird daraufhin in ihrer Funktion zwar nicht gehemmt, synthetisiert aber anstelle von PGE₂ 15-epi-Lipoxin (Claria und Serhan, 1995). Dieses wirkt der Adhäsion von Leukozyten entgegen. Durch gleichzeitige Gabe von selektiven COX-2-Inhibitoren wird die

Bildung dieses antiadhäsiven Moleküls unterbunden und die positive Wirkung von ASS antagonisiert (Fiorucci et al., 2003). Andere tNSAIDs können die acetylierte Form der COX-2 nicht oder nur schwach hemmen, so dass diese Interaktion hier nicht gegeben ist (Mancini et al., 1997).

Hennan und Kollegen haben ähnliche Befunde an Koronararterien des Hundes erhalten. Sie konnten zeigen, dass Celecoxib die antithrombotischen Effekte von ASS aufhebt (Hennan et al., 2001). Dieser Effekt wurde aber nur beobachtet, wenn ASS früh genug vor Celecoxib gegeben wurde, um die endotheliale COX-2 durch ASS zu hemmen. Daraus lässt sich schließen, dass die vaskuläre COX-2 an den antithrombotischen Wirkungen von ASS beteiligt ist.

Neben den von uns beobachteten Effekten hat die Kombination von ASS mit Rofecoxib auch einen Einfluss auf die Plaquestabilität. Eine Studie hat gezeigt, dass der Thromboxan-Rezeptor-(TP)-Antagonismus den Effekt von niedrig dosierter ASS imitiert und dass die gleichzeitige Behandlung von TP-Antagonisten mit COX-2-Hemmern den Effekt des TP-Antagonisten untergräbt. Die gleichzeitige Hemmung der COX-2 und des TP führte dabei zur Plaquestabilisierung (Egan et al., 2005). Mit diesem Befund korrelieren auch die Oberflächenexpressionsanalysen von ALCAM. ALCAM wird besonders stark induziert, wenn ASS und Rofecoxib gemeinsam gegeben werden. Durch die ALCAM-vermittelte Transmigration gelangen mehr Leukozyten in die atherosklerotische Läsion und können dort mit Hilfe von MMPs die Plaqueruptur begünstigen (siehe 4.2).

Die hier aufgeführten Wechselwirkungen zwischen ASS und Rofecoxib spielen vor allem deshalb eine Rolle, weil ASS das am breitesten genutzte Medikament in der Sekundärprophylaxe von Myokardinfarkten und Schlaganfällen ist (Gonzalez, 1998). Metaanalysen haben gezeigt, dass ASS das Risiko für einen zweiten Myokardinfarkt, Schlaganfall oder andere wichtige vaskuläre Ereignisse um ca. 25 % reduziert (Antithrombotic trialists, 2002). Selektive COX-2-Inhibitoren werden bzw. wurden hauptsächlich zur Therapie verschiedener Erkrankungen des rheumatoiden Formenkreises verwendet. Patienten, die unter diesen Erkrankungen leiden, haben häufig auch ein erhöhtes kardiovaskuläres Risiko (Watson et al., 2003). Unter diesen Aspekten sollten Patienten, die mit selektiven COX-2-Inhibitoren behandelt werden und eine Sekundärprophylaxe benötigen, diese mit Clopidogrel betreiben. Studien haben gezeigt, dass Clopidogrel mindestens so

effektiv ist wie ASS, aber weniger gastrointestinale Nebenwirkungen aufweist (CAPRIE-Studie, 1996).

Eine weitere Alternative für die antiinflammatorische Therapie von kardiovaskulären Risikopatienten ist die Kombination eines tNSAID mit ASS und einem Protonenpumpenhemmer für den Schutz der Magenschleimhaut (Chan, 2006).

Dabei muß der zeitliche Abstand zwischen tNSAID (v.a. Ibuprofen) und ASS beachtet werden. Wird Ibuprofen vor ASS eingenommen, verhindert dies die kardioprotektive Wirkung von ASS in Risikopatienten. Dieser Effekt beruht darauf, dass Ibuprofen den Zugang von ASS zum Ser⁵³⁰ sterisch blockiert. Damit kann die COX-1 nicht mehr acetyliert werden und der antiaggregatorische Effekt von ASS unterbleibt (Catella-Lawson et al., 2001). In einer retrospektiven Studie konnte zudem gezeigt werden, dass die kardiovaskulär bedingte Mortalität ansteigt, wenn Ibuprofen zusätzlich zu ASS eingenommen wird (MacDonald und Wei, 2003). Ähnliche Ergebnisse wurden in der Subanalyse der „*Physicians Health Study*“ beobachtet (Kurth et al., 2003). Auch hier war die Kombination von tNSAIDs und ASS im Vergleich zur alleinigen ASS-Therapie mit einem erhöhten Herzinfarkt-Risiko verbunden.

Um die aus der COX-2-Hemmung resultierenden kardiovaskulären Nebenwirkungen zu vermeiden, sollte die klinische Entwicklung in Richtung von Zielstrukturen gehen, die in der Prostaglandin-Synthese-Kaskade distal der COX liegen. Dazu gehören z.B. Inhibitoren der mikrosomalen PGE-Synthase (mPGE1) (Cheng et al., 2006; Trebino et al., 2003) sowie spezifische Prostaglandin-Rezeptor-Antagonisten.

Beispielsweise vermittelt PGE₂ u.a. inflammatorische Reaktionen und Fieber. Durch Hemmung der spezifischen PGE₂-Synthase anstatt der COX-2, bleiben die Wirkungen von PGI₂ erhalten, so dass weniger kardiovaskuläre Nebenwirkungen zu erwarten sind.

Bis die klinische Entwicklung dieser Substanzen abgeschlossen ist, sollten Coxibe unter genauer Risiko-Nutzen-Abwägung nur verordnet werden, wenn tNSAIDs aufgrund gastrointestinaler Nebenwirkungen nicht vertragen werden und die Patienten ein geringes kardiovaskuläres Risikoprofil aufweisen. Die Herz-Kreislaufparameter sollten während der Therapie regelmäßig überwacht werden, um die Therapie rechtzeitig umstellen zu können. Patienten mit einem hohen kardiovaskulären Risiko sollten Coxibe nicht erhalten.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Bei ihrer Markteinführung Ende der 1990er Jahre wurden die Coxibe als „Super-Aspirine“ angesehen (DeWitt, 1999). Sie versprachen eine effiziente Schmerztherapie, vor allem bei rheumatischen Erkrankungen, ohne dabei die gastrointestinalen Nebenwirkungen der traditionellen nichtsteroidalen Antiphlogistika (tNSAIDs; Whittle et al., 1980) zu verursachen (Bombardier et al., 2000). Heute ist es unumstritten, dass bei prädisponierten Patienten ein erhöhtes Risiko für kardiovaskuläre Nebenwirkungen unter Langzeittherapie mit selektiven COX-2-Inhibitoren vorliegt (FitzGerald, 2004). Es gibt verschiedene Hypothesen, wie COX-2-Inhibitoren das Risiko für Thrombosen und renale Hypertonie in prädisponierten Patienten verursachen. Die genauen Mechanismen, die diesem Nebenwirkungsprofil zugrunde liegen, sind aber noch nicht vollständig aufgeklärt.

Diese Arbeit beschäftigt sich daher in einem tierexperimentellen Ansatz mit der Frage, ob der antiinflammatorische COX-2-Inhibitor Rofecoxib einen Einfluss auf die Entwicklung der Atherosklerose hat und ob es Wechselwirkungen mit dem COX-Inhibitor ASS gibt, der seit langem erfolgreich zur Prophylaxe vaskulär-thrombotischer Ereignisse eingesetzt wird. Zu diesem Zweck wurden Weiße Neuseeland Kaninchen 12 Wochen lang mit einer cholesterolreichen Diät gefüttert. Zusätzlich wurden die COX-Inhibitoren ASS und/oder Rofecoxib appliziert. Um zu prüfen, inwieweit die Ergebnisse des Tierversuches auf den Menschen übertragbar sind, wurden im zweiten Teil der Arbeit humane aortale glatte Gefäßmuskelzellen mit Cholesterol und COX-Inhibitoren inkubiert.

ASS konnte in diesem Tiermodell sowohl die Entstehung atherosklerotischer Plaques in der Aorta als auch die Thrombenbildung in der *A. carotis* signifikant verhindern. Beide Effekte wurden durch die orale Langzeittherapie mit Rofecoxib weitestgehend aufgehoben.

Die alleinige Behandlung mit Rofecoxib löste eine endotheliale Dysfunktion aus, die in ihrem Ausmaß der Endothelschädigung durch Hypercholesterolämie entsprach. Dies ist ein Hinweis darauf, dass Rofecoxib die frühe Entstehung der Atherosklerose begünstigen kann.

Die *in-vitro*-Versuche an humanen SMC lieferten zudem Hinweise darauf, dass Rofecoxib möglicherweise die Bildung instabiler Plaques begünstigt. Das Adhäsionsmolekül ALCAM wird durch Rofecoxib und ASS verstärkt exprimiert. Da ALCAM für die transendotheliale Migration von Monozyten verantwortlich ist, können durch die Behandlung mit COX-Inhibitoren möglicherweise vermehrt Monozyten in die atherosklerotischen Plaques einwandern und somit eine Plaqueruptur begünstigen.

Diese Arbeit stellt Mechanismen vor, über die selektive COX-2-Inhibitoren in prädisponierten Patienten zu kardiovaskulären Nebenwirkungen führen können. Außerdem konnte gezeigt werden, dass eine Langzeitbehandlung mit Rofecoxib die protektiven Effekte von ASS sowohl *in vivo* als auch *in vitro* weitgehend aufhebt.

SUMMARY

The coxibs were first marketed in the late 1990s as the „super-aspirins“ (DeWitt, 1999). They promised effective pain relief, especially from rheumatic disease, without the gastrointestinal side-effects of traditional nonsteroidal antiinflammatory drugs (Bombardier et al., 2000). Today it is indisputable that long-term therapy with selective COX-2 inhibitors poses an increased risk for adverse cardiovascular effects in predisposed patients (FitzGerald, 2004). Several hypotheses have been proposed as to how COX-2 inhibitors increase the risk for thrombosis and renal hypertension in predisposed patients, but the precise mechanisms associated with such adverse events have yet to be elucidated.

The work described here has examined the potential influence of the antiinflammatory COX-2 inhibitor rofecoxib on the development of atherosclerosis in experimental models both *in vivo* and *in vitro*. Also investigated were the possible interactions of rofecoxib with the non-selective COX inhibitor aspirin (ASA), which effectively protects against cardiovascular events such as myocardial infarction.

The *in vivo* atherosclerosis model utilised New Zealand White rabbits fed a cholesterol-rich diet for 12 weeks, with and without the COX inhibitors ASA and/or rofecoxib. To determine whether the findings of such animal studies could be extrapolated to man, the second component of the work examined the effects of COX inhibitors in cultured human aortic smooth muscle cells (SMC) which were enriched with cholesterol.

In cholesterol-fed rabbits, ASA significantly suppressed both the development of aortic atherosclerotic plaques as well as thrombus formation in the carotid artery. Concomitant long-term treatment with rofecoxib near completely abolished these protective effects of ASA. Rofecoxib alone induced endothelial dysfunction, to a degree comparable to hypercholesterolaemia. This may indicate that rofecoxib contributes to the early initiation of atherogenesis.

The *in vitro* studies in human cultured SMC suggested that rofecoxib may promote formation of unstable plaques. Both rofecoxib and ASA enhanced expression of the adhesion molecule ALCAM. Given that ALCAM is responsible for the transendothelial monocyte migration, it is possible that COX inhibitor therapy may allow for monocyte infiltration into atherosclerotic plaque and thereby increase the risk of plaque rupture.

In conclusion, findings from the present study provide further insight into the mechanisms by which selective COX-2 inhibitors may promote adverse cardiovascular events in predisposed patients. In addition, the work described here provides first evidence that selective COX-2 inhibition can attenuate the beneficial effects of aspirin in human vascular smooth muscle cells.

6 LITERATURVERZEICHNIS

1. The Lipid Research Clinics Coronary Primary Prevention Trial results. I. Reduction in incidence of coronary heart disease (1984a), *JAMA* 251:351-364
2. The Lipid Research Clinics Coronary Primary Prevention Trial results. II. The relationship of reduction in incidence of coronary heart disease to cholesterol lowering (1984b), *JAMA* 251:365-374
3. A randomised, blinded, trial of clopidogrel versus aspirin in patients at risk of ischaemic events (CAPRIE, 1996). CAPRIE Steering Committee, *Lancet* 348:1329-1339
4. Collaborative meta-analysis of randomised trials of antiplatelet therapy for prevention of death, myocardial infarction, and stroke in high risk patients(2002), *BMJ* 324:71-86
5. Anitschkow N (1913), Über die Veränderungen der Kaninchenaorta bei experimenteller Cholesterinsteatose. *Beitr Path Anat* 1913 56:379-404
6. Bassenge E (1991), Hemmung der Plättchenaktivierung durch Endothelium-derived relaxant factor EDRF/NO und NO-freisetzende Dilator-Substanzen. *Z Kardiol* 80 Suppl 5:17-21
7. Belton O, Byrne D, Kearney D, Leahy A, Fitzgerald DJ (2000), Cyclooxygenase-1 and -2-dependent prostacyclin formation in patients with atherosclerosis. *Circulation* 102:840-845
8. Bishop-Bailey D, Burke-Gaffney A, Hellewell PG, Pepper JR, Mitchell JA (1998), Cyclooxygenase-2 regulates inducible ICAM-1 and VCAM-1 expression in human vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 249:44-47
9. Bist A, Fielding PE, Fielding CJ (1997), Two sterol regulatory element-like sequences mediate up-regulation of caveolin gene transcription in response to low density lipoprotein free cholesterol. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:10693-10698
10. Blankenberg S, Barboux S, Tiret L (2003), Adhesion molecules and atherosclerosis. *Atherosclerosis* 170:191-203
11. 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 (2000a), Comparison of upper gastrointestinal toxicity of rofecoxib and naproxen in patients with rheumatoid arthritis. VIGOR Study Group. *N Engl J Med* 343:1520-8, 2
12. Bresalier RS, Sandler RS, Quan H, Bolognese JA, Oxenius B, Horgan K, Lines C, Riddell R, Morton D, Lanus A, Konstam MA, Baron JA (2005), Cardiovascular Events Associated with Rofecoxib in a Colorectal Adenoma Chemoprevention Trial. *N Engl J Med* 352:1092-1102
13. Bunting S, Moncada S, Vane JR (1983), The prostacyclin--thromboxane A2 balance: pathophysiological and therapeutic implications. *Br Med Bull* 39:271-276
14. Burleigh ME, Babaev VR, Yancey PG, Major AS, McCaleb JL, Oates JA, Morrow JD, Fazio S, Linton MF (2005), Cyclooxygenase-2 promotes early atherosclerotic lesion formation in ApoE-deficient and C57BL/6 mice. *J Mol Cell Cardiol* 39:443-452
15. Casino PR, Kilcoyne CM, Quyyumi AA, Hoeg JM, Panza JA (1993), The role of nitric oxide in endothelium-dependent vasodilation of hypercholesterolemic patients. *Circulation* 88:2541-2547

16. Catella-Lawson F, McAdam B, Morrison BW, Kapoor S, Kujubu D, Antes L, Lasseter KC, Quan H, Gertz BJ, FitzGerald GA (1999), Effects of specific inhibition of cyclooxygenase-2 on sodium balance, hemodynamics, and vasoactive eicosanoids. *J Pharmacol Exp Ther* 289:735-741
17. Catella-Lawson F, Reilly MP, Kapoor SC, Cucchiara AJ, DeMarco S, Tournier B, Vyas SN, FitzGerald GA (2001), Cyclooxygenase inhibitors and the antiplatelet effects of aspirin. *N Engl J Med* 345:1809-1817
18. Caughey GE, Cleland LG, Penglis PS, Gamble JR, James MJ (2001), Roles of cyclooxygenase (COX)-1 and COX-2 in prostanoid production by human endothelial cells: selective up-regulation of prostacyclin synthesis by COX-2. *J Immunol* 167:2831-2838
19. Cayatte AJ, Du Y, Oliver-Krasinski J, Lavielle G, Verbeuren TJ, Cohen RA (2000), The thromboxane receptor antagonist S18886 but not aspirin inhibits atherogenesis in apo E-deficient mice: evidence that eicosanoids other than thromboxane contribute to atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20:1724-1728
20. Chan FK (2006), Management of high-risk patients on non-steroidal anti-inflammatory drugs or aspirin. *Drugs* 66 Suppl 1:23-28
21. Cheng Y, Austin SC, Rocca B, Koller BH, Coffman TM, Grosser T, Lawson JA, FitzGerald GA (2002), Role of prostacyclin in the cardiovascular response to thromboxane A₂. *Science* 296:539-541
22. Cheng Y, Wang M, Yu Y, Lawson J, Funk CD, FitzGerald GA (2006), Cyclooxygenases, microsomal prostaglandin E synthase-1, and cardiovascular function. *J Clin Invest* 116:1391-1399
23. Choi BG, Vilahur G, Viles-Gonzalez JF, Badimon JJ (2006), The role of high-density lipoprotein cholesterol in atherothrombosis. *Mt Sinai J Med* 73:690-701
24. Christian AE, Haynes MP, Phillips MC, Rothblat GH (1997), Use of cyclodextrins for manipulating cellular cholesterol content. *J Lipid Res* 38:2264-2272
25. Cipollone F, Patrignani P, Greco A, Panara MR, Padovano R, Cuccurullo F, Patrono C, Rebuzzi AG, Liuzzo G, Quaranta G, Maseri A (1997), Differential suppression of thromboxane biosynthesis by indobufen and aspirin in patients with unstable angina. *Circulation* 96:1109-1116
26. Cipollone F, Prontera C, Pini B, Marini M, Fazio M, de Cesare D, Iezzi A, Uchino S, Boccoli G, Saba V, Chiarelli F, Cuccurullo F, Mezzetti A (2001), Overexpression of functionally coupled cyclooxygenase-2 and prostaglandin E synthase in symptomatic atherosclerotic plaques as a basis of prostaglandin E(2)-dependent plaque instability. *Circulation* 104:921-927
27. Claria J, Serhan CN (1995), Aspirin triggers previously undescribed bioactive eicosanoids by human endothelial cell-leukocyte interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:9475-9479
28. Couffinhal T, Duplaa C, Moreau C, Lamaziere JM, Bonnet J (1994), Regulation of vascular cell adhesion molecule-1 and intercellular adhesion molecule-1 in human vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 74:225-234
29. Curfman GD, Morrissey S, Drazen JM (2005), Expression of concern: Bombardier et al., "Comparison of upper gastrointestinal toxicity of rofecoxib and naproxen in patients with rheumatoid arthritis," *N Engl J Med* 2000;343:1520-8. *N Engl J Med* 353:2813-2814

30. Curfman GD, Morrissey S, Drazen JM (2006), Expression of concern reaffirmed. *N Engl J Med* 354:1193
31. Cyrus T, Sung S, Zhao L, Funk CD, Tang S, Pratico D (2002), Effect of low-dose aspirin on vascular inflammation, plaque stability, and atherogenesis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice. *Circulation* 106:1282-1287
32. Debey S, Meyer-Kirchrath J, Schrör K (2003), Regulation of cyclooxygenase-2 expression by iloprost in human vascular smooth muscle cells. Role of transcription factors CREB and ICER. *Biochem Pharmacol* 65:979-988
33. DeWitt DL (1999), Cox-2-selective inhibitors: the new super aspirins. *Mol Pharmacol* 55:625-631
34. DeWitt DL, Meade EA (1993), Serum and glucocorticoid regulation of gene transcription and expression of the prostaglandin H synthase-1 and prostaglandin H synthase-2 isozymes. *Arch Biochem Biophys* 306:94-102
35. Egan KM, Lawson JA, Fries S, Koller B, Rader DJ, Smyth EM, FitzGerald GA (2004), COX-2-derived prostacyclin confers atheroprotection on female mice. *Science* 306:1954-1957
36. Egan KM, Wang M, Lucitt MB, Zukas AM, Pure E, Lawson JA, FitzGerald GA (2005), Cyclooxygenases, thromboxane, and atherosclerosis: plaque destabilization by cyclooxygenase-2 inhibition combined with thromboxane receptor antagonism. *Circulation* 111:334-342
37. Ellis EF, Oelz O, Roberts LJ, Payne NA, Sweetman BJ, Nies AS, Oates JA (1976), Coronary arterial smooth muscle contraction by a substance released from platelets: evidence that it is thromboxane A₂. *Science* 193:1135-1137
38. Farkouh ME, Greenberg JD, Jeger RV, Ramanathan K, Verheugt FW, Cheseboro JH, Kirshner H, Hochman JS, Lay CL, Ruland S, Mellein B, Matchaba PT, Fuster V, Abramson SB (2007), Cardiovascular outcomes in high-risk patients with osteoarthritis treated with Ibuprofen, Naproxen, or Lumiracoxib. *Ann Rheum Dis* 66:764-70
39. Feron O, Dessy C, Moniotte S, Desager JP, Balligand JL (1999), Hypercholesterolemia decreases nitric oxide production by promoting the interaction of caveolin and endothelial nitric oxide synthase. *J Clin Invest* 103:897-905
40. Fiorucci S, Distrutti E, Mencarelli A, Morelli A, Lauffer SA, Cirino G, Wallace JL (2003), Evidence that 5-lipoxygenase and acetylated cyclooxygenase 2-derived eicosanoids regulate leukocyte-endothelial adherence in response to aspirin. *Br J Pharmacol* 139:1351-1359
41. Fitzgerald DJ, Roy L, Catella F, FitzGerald GA (1986), Platelet activation in unstable coronary disease. *N Engl J Med* 315:983-989
42. FitzGerald GA (2003), COX-2 and beyond: Approaches to prostaglandin inhibition in human disease. *Nat Rev Drug Discov* 2:879-890
43. FitzGerald GA (2004a), Coxibs and cardiovascular disease. *N Engl J Med* 351:1709-1711
44. FitzGerald GA, Smith B, Pedersen AK, Brash AR (1984), Increased prostacyclin biosynthesis in patients with severe atherosclerosis and platelet activation. *N Engl J Med* 310:1065-1068
45. Folts J (1991), An in vivo model of experimental arterial stenosis, intimal damage, and periodic thrombosis. *Circulation* 83:IV3-14

46. Fosslien E (2005), Cardiovascular complications of non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Ann Clin Lab Sci* 35:347-385
47. Fries S, Grosser T (2005), The Cardiovascular Pharmacology of COX-2 Inhibition. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)* 445-451
48. Frohlich J, Lear SA (2002), Old and new risk factors for atherosclerosis and development of treatment recommendations. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 29:838-842
49. Furchgott RF, Zawadzki JV (1980), The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288:373-376
50. Galis ZS, Sukhova GK, Lark MW, Libby P (1994), Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest* 94:2493-2503
51. Galle J, Busse R, Bassenge E (1991), Hypercholesterolemia and atherosclerosis change vascular reactivity in rabbits by different mechanisms. *Arterioscler Thromb* 11:1712-1718
52. Garcia Rodriguez LA, Varas C, Patrono C (2000), Differential effects of aspirin and non-aspirin nonsteroidal antiinflammatory drugs in the primary prevention of myocardial infarction in postmenopausal women. *Epidemiology* 11:382-387
53. Goncharova EA, Billington CK, Irani C, Vorotnikov AV, Tkachuk VA, Penn RB, Krymskaya VP, Panettieri RA, Jr. (2003), Cyclic AMP-mobilizing agents and glucocorticoids modulate human smooth muscle cell migration. *Am J Respir Cell Mol Biol* 29:19-27
54. Gonzalez ER (1998), Antiplatelet therapy in atherosclerotic cardiovascular disease. *Clin Ther* 20 Suppl B:B18-B41
55. Gonzalez-Amaro R, Diaz-Gonzalez F, Sanchez-Madrid F (1998), Adhesion molecules in inflammatory diseases. *Drugs* 56:977-988
56. Gorski DH, Walsh K (1995), Mitogen-responsive nuclear factors that mediate growth control signals in vascular myocytes. *Cardiovasc Res* 30:585-592
57. Graham DJ, Campen D, Hui R, Spence M, Cheetham C, Levy G, Shoor S, Ray WA (2005), Risk of acute myocardial infarction and sudden cardiac death in patients treated with cyclooxygenase 2 selective and non-selective non-steroidal anti-inflammatory drugs: nested case-control study. *Lancet* 365:475-481
58. Griendling KK, FitzGerald GA (2003), Oxidative stress and cardiovascular injury: Part I: basic mechanisms and in vivo monitoring of ROS. *Circulation* 108:1912-1916
59. Grosser T, Fries S, FitzGerald GA (2006), Biological basis for the cardiovascular consequences of COX-2 inhibition: therapeutic challenges and opportunities. *J Clin Invest* 116:4-15
60. Grosser T, Zucker TP, Weber AA, Schulte K, Sachinidis A, Vetter H, Schrör K (1997), Thromboxane A2 induces cell signaling but requires platelet-derived growth factor to act as a mitogen. *Eur J Pharmacol* 319:327-332
61. Hamberg M, Svensson J, Samuelsson B (1975), Thromboxanes: a new group of biologically active compounds derived from prostaglandin endoperoxides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72:2994-2998

62. Hennen JK, Huang J, Barrett TD, Driscoll EM, Willens DE, Park AM, Crofford LJ, Lucchesi BR (2001), Effects of selective cyclooxygenase-2 inhibition on vascular responses and thrombosis in canine coronary arteries. *Circulation* 104:820-825
63. Hernandez-Diaz S, Varas-Lorenzo C, Garcia Rodriguez LA (2006), Non-steroidal antiinflammatory drugs and the risk of acute myocardial infarction. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 98:266-274
64. Ignarro LJ, Kadowitz PJ (1985), The pharmacological and physiological role of cyclic GMP in vascular smooth muscle relaxation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 25:171-191
65. Ikeda U, Ikeda M, Seino Y, Takahashi M, Kasahara T, Kano S, Shimada K (1993), Expression of intercellular adhesion molecule-1 on rat vascular smooth muscle cells by pro-inflammatory cytokines. *Atherosclerosis* 104:61-68
66. Jang Y, Lincoff AM, Plow EF, Topol EJ (1994), Cell adhesion molecules in coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 24:1591-1601
67. Jones DA, Carlton DP, McIntyre TM, Zimmerman GA, Prescott SM (1993), Molecular cloning of human prostaglandin endoperoxide synthase type II and demonstration of expression in response to cytokines. *J Biol Chem* 268:9049-9054
68. Juni P, Nartey L, Reichenbach S, Sterchi R, Dieppe PA, Egger M (2004), Risk of cardiovascular events and rofecoxib: cumulative meta-analysis. *Lancet* 364:2021-2029
69. Kargman S, Charleson S, Cartwright M, Frank J, Riendeau D, Mancini J, Evans J, O'Neill G (1996), Characterization of Prostaglandin G/H Synthase 1 and 2 in rat, dog, monkey, and human gastrointestinal tracts. *Gastroenterology* 111:445-454
70. Kearney PM, Baigent C, Godwin J, Halls H, Emberson JR, Patrono C (2006), Do selective cyclo-oxygenase-2 inhibitors and traditional non-steroidal anti-inflammatory drugs increase the risk of atherothrombosis? Meta-analysis of randomised trials. *BMJ* 332:1302-1308
71. Kobayashi T, Tahara Y, Matsumoto M, Iguchi M, Sano H, Murayama T, Arai H, Oida H, Yurugi-Kobayashi T, Yamashita JK, Katagiri H, Majima M, Yokode M, Kita T, Narumiya S (2004), Roles of thromboxane A(2) and prostacyclin in the development of atherosclerosis in apoE-deficient mice. *J Clin Invest* 114:784-794
72. Komers R, Epstein M (2002), Cyclooxygenase-2 expression and function in renal pathophysiology. *J Hypertens Suppl* 20:S11-S15
73. Kopp E, Ghosh S (1994), Inhibition of NF-kappa B by sodium salicylate and aspirin. *Science* 265:956-959
74. Kowala MC, Mazzucco CE, Hartl KS, Seiler SM, Warr GA, Abid S, Grove RI (1993), Prostacyclin agonists reduce early atherosclerosis in hyperlipidemic hamsters. Octimibate and BMY 42393 suppress monocyte chemotaxis, macrophage cholesteryl ester accumulation, scavenger receptor activity, and tumor necrosis factor production. *Arterioscler Thromb* 13:435-444
75. Kujubu DA, Fletcher BS, Varnum BC, Lim RW, Herschman HR (1991), TIS10, a phorbol ester tumor promoter-inducible mRNA from Swiss 3T3 cells, encodes a novel prostaglandin synthase/cyclooxygenase homologue. *J Biol Chem* 266:12866-12872
76. Kurth T, Glynn RJ, Walker AM, Chan KA, Buring JE, Hennekens CH, Gaziano JM (2003), Inhibition of clinical benefits of aspirin on first myocardial infarction by nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Circulation* 108:1191-1195

77. Kurumbail RG, Stevens AM, Gierse JK, McDonald JJ, Stegeman RA, Pak JY, Gildehaus D, Miyashiro JM, Penning TD, Seibert K, Isakson PC, Stallings WC (1996), Structural basis for selective inhibition of cyclooxygenase-2 by anti-inflammatory agents. *Nature* 384:644-648
78. Laemmli UK (1970), Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685
79. Landmesser U, Dikalov S, Price SR, McCann L, Fukai T, Holland SM, Mitch WE, Harrison DG (2003), Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension. *J Clin Invest* 111:1201-1209
80. Lee SH, Soyoola E, Chanmugam P, Hart S, Sun W, Zhong H, Liou S, Simmons D, Hwang D (1992), Selective expression of mitogen-inducible cyclooxygenase in macrophages stimulated with lipopolysaccharide. *J Biol Chem* 267:25934-25938
81. Levesque MC, Heinly CS, Whichard LP, Patel DD (1998), Cytokine-regulated expression of activated leukocyte cell adhesion molecule (CD166) on monocyte-lineage cells and in rheumatoid arthritis synovium. *Arthritis Rheum* 41:2221-2229
82. Lipsky PE, Brooks P, Crofford LJ, DuBois R, Graham D, Simon LS, van de Putte LB, Abramson SB (2000), Unresolved issues in the role of cyclooxygenase-2 in normal physiologic processes and disease. *Arch Intern Med* 160:913-920
83. Loll PJ, Picot D, Garavito RM (1995), The structural basis of aspirin activity inferred from the crystal structure of inactivated prostaglandin H2 synthase. *Nat Struct Biol* 2:637-643
84. Lüscher TF (1989), Endothelium-derived relaxing and contracting factors: potential role in coronary artery disease. *Eur Heart J* 10:847-857
85. MacDonald TM, Wei L (2003), Effect of ibuprofen on cardioprotective effect of aspirin. *Lancet* 361:573-574
86. Maclouf J, Folco G, Patrono C (1998), Eicosanoids and iso-eicosanoids: constitutive, inducible and transcellular biosynthesis in vascular disease. *Thromb Haemost* 79:691-705
87. Mancini JA, Vickers PJ, O'Neill GP, Boily C, Falgoutyret JP, Riendeau D (1997), Altered sensitivity of aspirin-acetylated prostaglandin G/H synthase-2 to inhibition by nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Mol Pharmacol* 51:52-60
88. Masedunskas A, King JA, Tan F, Cochran R, Stevens T, Sviridov D, Ofori-Acquah SF (2006), Activated leukocyte cell adhesion molecule is a component of the endothelial junction involved in transendothelial monocyte migration. *FEBS Lett* 580:2637-2645
89. McAdam BF, Catella-Lawson F, Mardini IA, Kapoor S, Lawson JA, FitzGerald GA (1999), Systemic biosynthesis of prostacyclin by cyclooxygenase (COX)-2: the human pharmacology of a selective inhibitor of COX-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:272-277
90. Metzner J, Popp L, Marian C, Schmidt R, Manderscheid C, Renne C, Fisslthaler B, Fleming I, Busse R, Geisslinger G, Niederberger E (2007), The effects of COX-2 selective and non-selective NSAIDs on the initiation and progression of atherosclerosis in ApoE(-/-) mice. *J Mol Med* Epub ahead of print
91. Michel JB, Feron O, Sacks D, Michel T (1997), Reciprocal regulation of endothelial nitric-oxide synthase by Ca²⁺-calmodulin and caveolin. *J Biol Chem* 272:15583-15586
92. Miller TA (1983), Protective effects of prostaglandins against gastric mucosal damage: current knowledge and proposed mechanisms. *Am J Physiol* 245:G601-G623

93. Mitchell JA, Belvisi MG, Akarasereenont P, Robbins RA, Kwon OJ, Croxtall J, Barnes PJ, Vane JR (1994), Induction of cyclo-oxygenase-2 by cytokines in human pulmonary epithelial cells: regulation by dexamethasone. *Br J Pharmacol* 113:1008-1014
94. Moncada S, Gryglewski R, Bunting S, Vane JR (1976), An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. *Nature* 263:663-665
95. Mukherjee D, Nissen SE, Topol EJ (2001), Risk of cardiovascular events associated with selective COX-2 inhibitors. *JAMA* 286:954-959
96. Mukherjee D, Nissen SE, Topol EJ (2002), Lack of cardioprotective effect of naproxen. *Arch Intern Med* 162:2637-2639
97. Muller WA, Weigl SA, Deng X, Phillips DM (1993), PECAM-1 is required for transendothelial migration of leukocytes. *J Exp Med* 178:449-460
98. Murad F, Rapoport RM, Fiscus R (1985), Role of cyclic-GMP in relaxations of vascular smooth muscle. *J Cardiovasc Pharmacol* 7 Suppl 3:S111-S118
99. Murata T, Ushikubi F, Matsuoka T, Hirata M, Yamasaki A, Sugimoto Y, Ichikawa A, Aze Y, Tanaka T, Yoshida N, Ueno A, Oh-ishi S, Narumiya S (1997), Altered pain perception and inflammatory response in mice lacking prostacyclin receptor. *Nature* 388:678-682
100. Narumiya S, Sugimoto Y, Ushikubi F (1999), Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. *Physiol Rev* 79:1193-1226
101. Needleman P, Turk J, Jakschik BA, Morrison AR, Lefkowitz JB (1986), Arachidonic acid metabolism. *Annu Rev Biochem* 55:69-102
102. Nüsing R, Ullrich V (1990), Immunoquantitation of thromboxane synthase in human tissues. *Eicosanoids* 3:175-180
103. Nussmeier NA, Whelton AA, Brown MT, Langford RM, Hoelt A, Parlow JL, Boyce SW, Verburg KM (2005), Complications of the COX-2 Inhibitors Parecoxib and Valdecoxib after Cardiac Surgery. *N Engl J Med* 352:1081-1091
104. O'Brien KD, Allen MD, McDonald TO, Chait A, Harlan JM, Fishbein D, McCarty J, Ferguson M, Hudkins K, Benjamin CD, . (1993), Vascular cell adhesion molecule-1 is expressed in human coronary atherosclerotic plaques. Implications for the mode of progression of advanced coronary atherosclerosis. *J Clin Invest* 92:945-951
105. O'Sullivan MG, Chilton FH, Huggins EM, Jr., McCall CE (1992), Lipopolysaccharide priming of alveolar macrophages for enhanced synthesis of prostanoids involves induction of a novel prostaglandin H synthase. *J Biol Chem* 267:14547-14550
106. Ohara Y, Peterson TE, Harrison DG (1993), Hypercholesterolemia increases endothelial superoxide anion production. *J Clin Invest* 91:2546-2551
107. Ohneda O, Ohneda K, Arai F, Lee J, Miyamoto T, Fukushima Y, Dowbenko D, Lasky LA, Suda T (2001), ALCAM (CD166): its role in hematopoietic and endothelial development. *Blood* 98:2134-2142
108. Ost M, Uhl E, Carlsson M, Gidlof A, Soderkvist P, Sirsjo A (1998), Expression of mRNA for phospholipase A2, cyclooxygenases, and lipoxygenases in cultured human umbilical vascular endothelial and smooth muscle cells and in biopsies from umbilical arteries and veins. *J Vasc Res* 35:150-155

109. Ott E, Nussmeier NA, Duke PC, Feneck RO, Alston RP, Snabes MC, Hubbard RC, Hsu PH, Saidman LJ, Mangano DT (2003), Efficacy and safety of the cyclooxygenase 2 inhibitors parecoxib and valdecoxib in patients undergoing coronary artery bypass surgery. *J Thorac Cardiovasc Surg* 125:1481-1492
110. Otto JC, Smith WL (1995), Prostaglandin endoperoxide synthases-1 and -2. *J Lipid Mediat Cell Signal* 12:139-156
111. Paigen B, Morrow A, Holmes PA, Mitchell D, Williams RA (1987), Quantitative assessment of atherosclerotic lesions in mice. *Atherosclerosis* 68:231-240
112. Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S (1987), Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327:524-526
113. Panara MR, Greco A, Santini G, Sciulli MG, Rotondo MT, Padovano R, di Giamberardino M, Cipollone F, Cuccurullo F, Patrono C, . (1995), Effects of the novel anti-inflammatory compounds, N-[2-(cyclohexyloxy)-4-nitrophenyl] methanesulphonamide (NS-398) and 5-methanesulphonamido-6-(2,4-difluorothio-phenyl)-1-inda none (L-745,337), on the cyclooxygenase activity of human blood prostaglandin endoperoxide synthases. *Br J Pharmacol* 116:2429-2434
114. Paoletti R, Poli A, Cignarella A (2006), The emerging link between nutrition, inflammation and atherosclerosis. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 4:385-393
115. Patrignani P, Filabozzi P, Patrono C (1982), Selective cumulative inhibition of platelet thromboxane production by low-dose aspirin in healthy subjects. *J Clin Invest* 69:1366-1372
116. Patrono C, Garcia Rodriguez LA, Landolfi R, Baigent C (2005), Low-dose aspirin for the prevention of atherothrombosis. *N Engl J Med* 353:2373-2383
117. Pomerantz KB, Hajjar DP (1989), Eicosanoid metabolism in cholesterol-enriched arterial smooth muscle cells: reduced arachidonate release with concomitant decrease in cyclooxygenase products. *J Lipid Res* 30:1219-1231
118. Poston RN, Haskard DO, Coucher JR, Gall NP, Johnson-Tidey RR (1992), Expression of intercellular adhesion molecule-1 in atherosclerotic plaques. *Am J Pathol* 140:665-673
119. Raij L (2006), Nitric oxide in the pathogenesis of cardiac disease. *J Clin Hypertens (Greenwich)* 8:30-39
120. Ratti S, Quarato P, Casagrande C, Fumagalli R, Corsini A (1998), Picotamide, an antithromboxane agent, inhibits the migration and proliferation of arterial myocytes. *Eur J Pharmacol* 355:77-83
121. Rauch BH, Scholz GA, Baumgärtel-Allekotte D, Censarek P, Fischer JW, Weber AA, Schrör K (2007), Cholesterol enhances thrombin-induced release of fibroblast growth factor-2 in human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27:e20-e25
122. Ray WA, Stein CM, Hall K, Daugherty JR, Griffin MR (2002), Non-steroidal anti-inflammatory drugs and risk of serious coronary heart disease: an observational cohort study. *Lancet* 359:118-123
123. Reddy KG, Nair RN, Sheehan HM, Hodgson JM (1994), Evidence that selective endothelial dysfunction may occur in the absence of angiographic or ultrasound atherosclerosis in patients with risk factors for atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol* 23:833-843

124. Reid G, Wielinga P, Zelcer N, van dH, I, Kuil A, de Haas M, Wijnholds J, Borst P (2003), The human multidrug resistance protein MRP4 functions as a prostaglandin efflux transporter and is inhibited by nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:9244-9249
125. Reilly IA, FitzGerald GA (1987), Inhibition of thromboxane formation in vivo and ex vivo: implications for therapy with platelet inhibitory drugs. *Blood* 69:180-186
126. Riendeau D, Percival MD, Brideau C, Charleson S, Dube D, Ethier D, Falguyret 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 (2001), Etoricoxib (MK-0663): preclinical profile and comparison with other agents that selectively inhibit cyclooxygenase-2. *J Pharmacol Exp Ther* 296:558-566
127. Robert A, Nezamis JE, Lancaster C, Davis JP, Field SO, Hanchar AJ (1983), Mild irritants prevent gastric necrosis through "adaptive cytoprotection" mediated by prostaglandins. *Am J Physiol* 245:G113-G121
128. Rong JX, Shapiro M, Trogan E, Fisher EA (2003), Transdifferentiation of mouse aortic smooth muscle cells to a macrophage-like state after cholesterol loading. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:13531-13536
129. Ross R (1993), The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 362:801-809
130. Ross R (1999), Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* 340:115-126
131. Roth GJ, Majerus PW (1975), The mechanism of the effect of aspirin on human platelets. I. Acetylation of a particulate fraction protein. *J Clin Invest* 56:624-632
132. Roth GJ, Stanford N, Majerus PW (1975), Acetylation of prostaglandin synthase by aspirin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72:3073-3076
133. Rott D, Zhu J, Burnett MS, Zhou YF, Zalles-Ganley A, Ogunmakinwa J, Epstein SE (2003), Effects of MF-tricyclic, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, on atherosclerosis progression and susceptibility to cytomegalovirus replication in apolipoprotein-E knockout mice. *J Am Coll Cardiol* 41:1812-1819
134. Sawicki PT, Bender R, Selke GW, Klauber J, Gutschmidt S (2006), Schätzung der unter Rofecoxib (Vioxx) in Deutschland in den Jahren 2001-2004 aufgetretenen kardio- und zerebrovaskulären Ereignisse. *Med Klin (München)* 101:191-197
135. Schnitzer TJ, Burmester GR, Mysler E, Hochberg MC, Doherty M, Ehram E, Gitton X, Krammer G, Mellein B, Matchaba P, Gimona A, Hawkey CJ (2004), Comparison of lumiracoxib with naproxen and ibuprofen in the Therapeutic Arthritis Research and Gastrointestinal Event Trial (TARGET), reduction in ulcer complications: randomised controlled trial. *Lancet* 364:665-674
136. Schönbeck U, Sukhova GK, Graber P, Coulter S, Libby P (1999), Augmented expression of cyclooxygenase-2 in human atherosclerotic lesions. *Am J Pathol* 155:1281-1291
137. Schrör K (2004), Kardiovaskuläre Risiken von COX-2-Hemmern. *Dtsch Med Wochenschr* 129:2653-2656
138. Schrör K, Seidel H (1988), Blood-vessel wall arachidonate metabolism and its pharmacological modification in a new in vitro assay system. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 337:177-182

139. Schrör K, Weber AA (1997), Roles of vasodilatory prostaglandins in mitogenesis of vascular smooth muscle cells. *Agents Actions Suppl* 48:63-91
140. Seibert K, Masferrer J, Zhang Y, Gregory S, Olson G, Hauser S, Leahy K, Perkins W, Isakson P (1995), Mediation of inflammation by cyclooxygenase-2. *Agents Actions Suppl* 46:41-50
141. Silverstein FE, Faich G, Goldstein JL, Simon LS, Pincus T, Whelton A, Makuch R, Eisen G, Agrawal NM, Stenson WF, Burr AM, Zhao WW, Kent JD, Lefkowitz JB, Verburg KM, Geis GS (2000), Gastrointestinal toxicity with celecoxib vs nonsteroidal anti-inflammatory drugs for osteoarthritis and rheumatoid arthritis: the CLASS study: A randomized controlled trial. Celecoxib Long-term Arthritis Safety Study. *JAMA* 284:1247-1255
142. Simmons DL, Levy DB, Yannoni Y, Erikson RL (1989), Identification of a phorbol ester-repressible v-src-inducible gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:1178-1182
143. Smith WL (1992), Prostanoid biosynthesis and mechanisms of action. *Am J Physiol* 263:F181-F191
144. Squadrito GL, Pryor WA (1995), The formation of peroxynitrite in vivo from nitric oxide and superoxide. *Chem Biol Interact* 96:203-206
145. Sugimoto Y, Narumiya S (2007), Prostaglandin e receptors. *J Biol Chem* 282:11613-11617
146. Takayama K, Garcia-Cardena G, Sukhova GK, Comander J, Gimbrone MA, Jr., Libby P (2002), Prostaglandin E2 suppresses chemokine production in human macrophages through the EP4 receptor. *J Biol Chem* 277:44147-44154
147. Topper JN, Cai J, Falb D, Gimbrone MA, Jr. (1996), Identification of vascular endothelial genes differentially responsive to fluid mechanical stimuli: cyclooxygenase-2, manganese superoxide dismutase, and endothelial cell nitric oxide synthase are selectively up-regulated by steady laminar shear stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:10417-10422
148. Trebino CE, Stock JL, Gibbons CP, Naiman BM, Wachtmann TS, Umland JP, Pandher K, Lapointe JM, Saha S, Roach ML, Carter D, Thomas NA, Durtschi BA, McNeish JD, Hambor JE, Jakobsson PJ, Carty TJ, Perez JR, Audoly LP (2003), Impaired inflammatory and pain responses in mice lacking an inducible prostaglandin E synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:9044-9049
149. Vane JR (1971), Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nat New Biol* 231:232-235
150. Verma S, Raj SR, Shewchuk L, Mather KJ, Anderson TJ (2001), Cyclooxygenase-2 blockade does not impair endothelial vasodilator function in healthy volunteers: randomized evaluation of rofecoxib versus naproxen on endothelium-dependent vasodilatation. *Circulation* 104:2879-2882
151. Watson DJ, Rhodes T, Guess HA (2003), All-cause mortality and vascular events among patients with rheumatoid arthritis, osteoarthritis, or no arthritis in the UK General Practice Research Database. *J Rheumatol* 30:1196-1202
152. Weber C, Erl W, Pietsch A, Weber PC (1995), Aspirin inhibits nuclear factor-kappa B mobilization and monocyte adhesion in stimulated human endothelial cells. *Circulation* 91:1914-1917
153. Weiss HJ, Turitto VT (1979), Prostacyclin (prostaglandin I2, PGI2) inhibits platelet adhesion and thrombus formation on subendothelium. *Blood* 53:244-250

154. Whittle BJ, Higgs GA, Eakins KE, Moncada S, Vane JR (1980), Selective inhibition of prostaglandin production in inflammatory exudates and gastric mucosa. *Nature* 284:271-273
155. Willard JE, Lange RA, Hillis LD (1992), The use of aspirin in ischemic heart disease. *N Engl J Med* 327:175-181
156. Wong ST, Baker LP, Trinh K, Hetman M, Suzuki LA, Storm DR, Bornfeldt KE (2001), Adenylyl cyclase 3 mediates prostaglandin E(2)-induced growth inhibition in arterial smooth muscle cells. *J Biol Chem* 276:34206-34212
157. Worth NF, Berry CL, Thomas AC, Campbell JH (2005), S18886, a selective TP receptor antagonist, inhibits development of atherosclerosis in rabbits. *Atherosclerosis* 183:65-73
158. Xie WL, Chipman JG, Robertson DL, Erikson RL, Simmons DL (1991), Expression of a mitogen-responsive gene encoding prostaglandin synthase is regulated by mRNA splicing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:2692-2696
159. Yamagata K, Andreasson KI, Kaufmann WE, Barnes CA, Worley PF (1993), Expression of a mitogen-inducible cyclooxygenase in brain neurons: regulation by synaptic activity and glucocorticoids. *Neuron* 11:371-386
160. Zimmermann KC, Sarbia M, Schrör K, Weber AA (1998), Constitutive cyclooxygenase-2 expression in healthy human and rabbit gastric mucosa. *Mol Pharmacol* 54:536-540
161. Zucker TP, Bönisch D, Muck S, Weber AA, Bretschneider E, Glusa E, Schrör K (1998), Thrombin-induced mitogenesis in coronary artery smooth muscle cells is potentiated by thromboxane A2 and involves upregulation of thromboxane receptor mRNA. *Circulation* 97:589-595

7 VERÖFFENTLICHUNGEN

7.1 Veröffentlichungen in Fachzeitschriften

Rauch BH, Scholz GA, **Baumgärtel-Allekotte D**, Censarek P, Fischer JW, Weber AA, Schrör K

Cholesterol enhances thrombin-induced release of fibroblast growth factor-2 in human vascular smooth muscle cells

Atheroscler Thromb Vasc Biol. 2007 April; 27(4):e20-5

Kaiser B*, **Baumgärtel-Allekotte D***, Kaber G, Rauch BH, Heim HK, Weber AA, Habenicht AJ, Schrör K (* equally contributed)

Antagonism of the antithrombotic and antiatherosclerotic actions of aspirin by rofecoxib in the cholesterol-fed rabbit

(in Vorbereitung)

Baumgärtel-Allekotte D*, Kaber G*, Kaiser B, Heim HK, Schrör K (* equally contributed)

Long-term effect of Rofecoxib on endothelial function in rabbits

(in Vorbereitung)

7.2 Kurzartikel (Abstracts)

Baumgärtel D, Kaber G, Heim HK, Kaiser B, Schrör K

Long-term effects of rofecoxib on endothelium-dependent relaxation in cholesterol-fed rabbits

Hämostaseologie 25 (2005)

49. Jahrestagung der Gesellschaft für Thrombose- und Hämostaseforschung, 23.-26. Feb. 2005, Mannheim

Baumgärtel D, Kaiser B, Kaber G, Rauch BH, Heim HK, Weber AA, Habenicht AJ, Schrör K

Antagonism of the antithrombotic and antiatherosclerotic actions of aspirin by rofecoxib in the cholesterol-fed rabbit

Circulation 112, 17 (Suppl) (2005)

American Heart Association, Scientific Sessions, 13.-16. Nov. 2005, Dallas, USA

Baumgärtel-Allekotte D, Rauch BH, Schrör K

Cholesterol-enrichment in human aortic SMC induces COX-2-expression

Hämostaseologie 1 (2007)

51. Frühjahrstagung der Gesellschaft für Thrombose- und Hämostaseforschung, 21.-24. Februar 2007, Dresden

Baumgärtel-Allekotte D, Rauch BH, Schrör K

Enrichment of human vascular smooth muscle cells with cholesterol in vitro induces expression of Cyclooxygenase-2

Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology 375 (Suppl.1) (2007)

48. Frühlingstagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie, 13.-15. März 2007, Mainz

Baumgärtel-Allekotte D, Schrör K, Rauch BH

Faktor Xa antagonisiert Thrombin-induzierte Endothelpermeabilität durch Induktion der Sphingosinkinase-1 in humanen Gefäßmuskelzellen

Clin Res Cardiol 96 (Suppl 1) (2007)

73. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie, 12.-14. April 2007, Mannheim

Kaiser B, **Baumgärtel D**, Kaber G, Noßmann S, Habenicht A, Heim HK, Schrör K

Evaluation of the prothrombotic potential of the selective COX-2 inhibitor rofecoxib in a modified Folts model in rabbits

Hämostaseologie 25 (2005)

49. Jahrestagung der Gesellschaft für Thrombose- und Hämostaseforschung, 23.-26. Feb. 2005, Mannheim

Kaber G, **Baumgärtel D**, Heim HK, Kaiser B, Schrör K

Long-term effects of rofecoxib on myocardial ischemia/ reperfusion injury in cholesterol-fed rabbits

Hämostaseologie 25 (2005)

49. Jahrestagung der Gesellschaft für Thrombose- und Hämostaseforschung, 23.-26. Feb. 2005, Mannheim

Scholz GA, **Baumgärtel-Allekotte D**, Weber AA, Schrör K, Rauch BH

Intrazelluläre Mechanismen der Thrombin-induzierten Freisetzung von basischem Fibroblastenwachstumsfaktor und Beeinflussung durch Cholesterol

Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology 372 (Suppl. 7) (2006)

47. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie, 4.-6. April 2006, Mainz

Rauch BH, **Baumgärtel-Allekotte D**, Schrör K

Protease-activated receptor-2 modulates mitogenesis in human vascular smooth muscle cells by a peroxisome proliferator-activated receptor- γ -dependent pathway

Circulation 114, 18 (Suppl) (2006)

American Heart Association, Scientific Sessions, 12.-15. Nov. 2006, Chicago, USA

Rauch BH, **Baumgärtel-Allekotte D**, Wingendorf K, Scholz GA, Fischer JW, Weber AA, Schrör K

Thrombin induces release of fibroblast growth factor-2 via the rho pathway which is enhanced in cholesterol-enriched human vascular smooth muscle cells

Circulation 114, 18 (Suppl) (2006)

American Heart Association, Scientific Sessions, 12.-15. Nov. 2006, Chicago, USA

Rauch BH, **Baumgärtel-Allekotte D**, Schrör K

Factor-Xa antagonizes thrombin-induced endothelial permeability by inducing sphingosine kinase-1 expression and S1P production in human vascular smooth muscle cells

Hämostaseologie 1 (2007)

51. Jahrestagung der Gesellschaft für Thrombose- und Hämostaseforschung, 21.-24. Februar 2007, Dresden

Rauch BH, **Baumgärtel-Allekotte D**, Wingendorf K, Fischer JW, Schrör K

Thrombin-induzierte Freisetzung von Fibroblastenwachstumsfaktor-2 in cholesterol-angereicherten humanen Gefäßmuskelzellen

Clin Res Cardiol 96 (Suppl 1) (2007)

73. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie, 12.-14. April 2007, Mannheim

8 DANKSAGUNG

Zuallererst möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Karsten Schrör für die herzliche Aufnahme in das Institut und die Unterstützung bei dieser Arbeit bedanken. Danke auch für die Möglichkeit, an verschiedenen wissenschaftlichen Kongressen teilnehmen zu können und die damit verbundene großzügige Unterstützung.

Prof. Höltje danke ich für die freundliche Übernahme des Koreferates und die sehr schnelle Anfertigung des Gutachtens trotz der extremen Kürze der Zeit.

Dr. Bernhard Rauch danke ich für die Mitbetreuung dieser Arbeit. Zahlreiche Diskussionen haben zur Lösung vieler Probleme beigetragen.

Erika Lohman und Karin Montag danke ich herzlich für die Organisation des Institutslebens und die stetige Hilfsbereitschaft bei Dienstreiseanträgen und Materialbestellungen. Danke auch für das immer offene Ohr während der hektischen Einreichphase dieser Arbeit und darüber hinaus für zahlreiche Kekse.

Frau Dr. Brigitte Kaiser und Silke Noßmann möchte ich für die Unterstützung bei den Kaninchenversuchen und die angenehme Zeit in Erfurt danken.

Dem gesamten Institut danke ich für die kollegiale Zusammenarbeit und das freundliche Arbeitsklima. Bei Petra Kuger möchte ich mich für die Einweihung in die Geheimnisse der Molekularbiologie bedanken. Bei ihr, sowie Kerstin Freidel, Bärbel Reupert und Beate Weyrauther neben der tatkräftigen Unterstützung im Labor auch für manch aufmunterndes und motivierendes Wort. Ein besonderer Dank geht auch an Jürgen Springer, der so manches Gerät wieder zum Laufen brachte.

Melanie Martin, Anke Rosenkranz, Tina Schooss und Gernot Kaber möchte ich für viele schöne Stunden inner- und außerhalb des Institutes danken. Ich sage nur, die „wilden Hühner“... Anke möchte ich darüber hinaus für die englische Übersetzung der Zusammenfassung danken und Tina für viele Abende und Nächte, die sie mit dem Korrekturlesen dieses Werkes verbracht hat. Gernot Kaber danke ich auch für viele nette Abende in den diversen Biergärten Erfurts.

Mein letzter Dank gilt jenen, denen ich am meisten zu verdanken habe, nämlich meiner Familie. Meinem Mann Stefan, der meine Launen ausgehalten hat und viele Abende und Wochenenden ohne mich verbringen musste. Und nicht zuletzt meinen Eltern, Dietmar und Bettina Baumgärtel, für ihre vielfältige Unterstützung während meines Studiums und der Promotion. Danke für die vielen aufbauenden Worte und Finanzspritzen. Euch sei diese Arbeit von ganzem Herzen gewidmet.

9 EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Ich versichere an Eides Statt, dass ich die vorliegende Doktorschrift selbständig und ohne fremde Hilfe angefertigt, andere als von mir angegebene Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt, den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommene Stellen als solche kenntlich gemacht habe, und dass diese Doktorschrift an keiner anderen Fakultät eingereicht worden ist. Ich habe bisher noch keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, den 5. Juni 2007

10 LEBENSLAUF

Dana Baumgärtel-Allekotte

Saarstrasse 25

46045 Oberhausen

geboren am 10.11.1979 in Gera/ Thüringen

Schulbildung

September 1986 – August 1991

Werner-Seelenbinder-Oberschule Gera

September 1991 – Juli 1998

Karl-Theodor-Liebe Gymnasium Gera

9. Juli 1998 Abitur

Studium und Promotion

Oktober 1998 – September 2002

Studium der Pharmazie

Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald,

Abschluss mit dem Staatsexamen

Dezember 2003

Approbation zum Apotheker

Januar 2004 – Juni 2007

Promotionsarbeit am Institut für Pharmakologie
und Klinische Pharmakologie der Heinrich-
Heine-Universität bei Prof. Dr. K. Schrör
(Thema: Das vaskuläre Risikoprofil von
Rofecoxib im tierexperimentellen Ansatz)

Düsseldorf, den 5. Juni 2007