

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

**Arbeitsgruppenleiter: Univ.-Prof. Dr. med. Thomas Hohlfeld**

**Untersuchungen zur Pharmakodynamik der Interaktion von NSAID-Analgetika  
mit der Hemmung der humanen thrombozytären Cyclooxygenase (COX-1)  
durch Acetylsalicylsäure**

Dissertation

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

vorgelegt von

Anna Botzem

2022

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

gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Univ.-Prof. Dr. med. Thomas Hohlfeld

Zweitgutachter: Univ.-Prof. Dr. med. Hubert Schelzig

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht als Beitrag auf dem Symposium der medRSD  
am 18.10.2017

## Zusammenfassung deutsch

Acetylsalicylsäure (ASS, Handelsname Aspirin<sup>R</sup>, zahlreiche Generika) wird häufig zur Sekundärprävention atherothrombotischer Ereignisse wie z.B. Herzinfarkt und Schlaganfall eingesetzt. Verschiedene experimentelle Studien haben für Inhibitoren der Cyclooxygenase (COX)-1 verschiedene Hemmtypen (zeitabhängig bzw. zeitunabhängig) aufzeigen können und eine mögliche Bedeutung des Hemmtyps für die Interaktion von Analgetika aus der Gruppe der NSAIDs mit der Thrombozytenhemmung durch ASS nahegelegt. Diese Dissertation geht der Frage nach, ob NSAIDs auch an der humanen thrombozytären COX-1 in entsprechende Hemmtypen unterteilt werden können und ob dies einen Einfluss darauf hat, ob NSAID-Analgetika im Sinne einer unerwünschten Arzneimittelinteraktion die Thrombozytenhemmung durch ASS abschwächen oder aufheben können.

Hierzu wurde mittels Aggregation humaner Thrombozyten und Chemilumineszenz die Inhibition der Umsetzung von Arachidonsäure in PGG<sub>2</sub> in der COX-1 durch die verschiedenen NSAIDs quantifiziert sowie die Inhibitionszeit gemessen und die Interaktion der NSAIDs mit ASS dargestellt. Untersucht wurden die NSAIDs 4-Aminoantipyrin, Celecoxib, Diclofenac, Flurbiprofen, Flufenamat, Indometazin, S-(+)-Ibuprofen, S-(+)-Ketoprofen, Ketorolac, Meclofenamat, Meloxicam, Methylaminoantipyrin, Mefenamat, 6-MNA, Naproxen, Nimesulid, NS-398, O-Desmethyl-Indometazin, Oxaprozin, Piroxicam und SC-560. Die Ergebnisse bestätigen erstmals an der humanen thrombozytären COX-1 die vorbeschriebene Einteilung der NSAIDs in zeitabhängig und zeitunabhängig und zeigen, dass zeitunabhängige NSAIDs die Inhibition der COX-1 durch ASS ganz oder teilweise aufheben (und damit mit ASS interagieren), während zeitabhängige NSAIDs keinen Einfluss auf die Inhibition der COX-1 durch ASS haben.

Ob das jeweilige NSAID mit ASS interagiert, ist insofern weder ein „Klasseneffekt“ aller NSAIDs noch abhängig von der chemisch definierten NSAID-Untergruppe. Nach den Ergebnissen dieser Dissertation hängt die Interaktion eher vom jeweiligen Hemmtyp des NSAID ab. Mögliche Erklärungen für die Zeitabhängigkeit der Hemmung der COX im Zusammenhang mit dem molekularen Bindungsmechanismus der NSAIDs an das aktive Zentrum der COX-1 sowie der Interaktion der NSAIDs mit der Hemmung der COX-1 durch ASS werden in dieser Arbeit diskutiert. Ob die gezeigte Interaktion der NSAIDs vom zeitunabhängigen Hemmtyp mit der Antiplättchenwirkung von ASS auch in der klinischen Praxis relevant ist, bedarf weiterer klinischer Forschung.

## Summary English

Acetylsalicylic acid (ASA) is commonly used for secondary prevention of atherothrombotic events, such as myocardial infarction or stroke. Previous experimental studies analysed the inhibition of the constitutional cyclooxygenase (COX)-1 enzyme by NSAID analgesic drugs and classified them into time-dependent and time-independent inhibitors. A relationship of the time-dependency of inhibition with the interaction of some NSAIDs with COX-inhibition by ASA has been suggested. The present thesis analyses whether such distinct types of inhibition by NSAIDs can be observed with the human platelet COX-1 enzyme and whether the type of inhibition may determine whether an NSAID prevents platelet inhibition by ASA or not.

The following NSAIDs were studied: 4-aminoantipyrine, celecoxib, diclofenac, flurbiprofen, flufenamic acid, indomethacin, S-(+)-ibuprofen, S-(+)-ketoprofen, ketorolac, meclofenamic acid, meloxicam, 4-methyl-amino-antipyrine, mefenamic, 6-methoxy-2-naphthyl acetic acid, naproxen, nimesulide, NS-398, O-desmethyl-indomethacin, oxaprozol, piroxicam and SC-560. We used aggregation of human platelets and luminol-dependent chemiluminescence to examine the time-dependent metabolism of arachidonic acid to PGG<sub>2</sub> in absence and presence of these NSAIDs, as well as to study whether the respective NSAIDs may interfere with platelet inhibition by ASA.

The results show that it is possible to reproduce the classification into time-dependent and time-independent as far as we know for the first time at the human COX-1 enzyme. It is also shown that time-independent NSAIDs do not interfere with the inhibition of COX-1 by ASA, while time-dependent NSAIDs have no impact on that.

It is concluded that time-dependent enzyme kinetics, rather than the structural NSAID subgroups, are important for NSAID interaction with platelet inhibition by ASA. Whether there is an interaction between the NSAID and ASA at the COX-1 and consequently whether the drug shows a time-dependent or time-independent inhibition seems to be, at least partly, a result of the structural mechanism of inhibition of the active tunnel of the COX-1 by the respective NSAID. This is discussed in the present thesis.

Whether the interactions between certain NSAIDs and ASA, as shown in this thesis, are relevant in the clinical setting will have to be answered by future clinical research.

## Abkürzungsverzeichnis

6-MNA:	6-Methoxy-2-Naphthylelessigsäure
ACD:	Ascorbinsäure, Citronensäure, Dextran
AChE:	Acetylcholinesterase
ADP:	Adenosindiphosphat
Ala:	Alanin
ARA:	Arachidonsäure
Arg:	Arginin
ASS:	Acetylsalicylsäure
bzw.:	beziehungsweise
COX:	Cyclooxygenase
EGF:	epidermal-growth-factor
EK:	Endkonzentration
ER:	Endoplasmatisches Retikulum
Fe <sup>3+</sup> :	Dreiwertiges Eisen-Ion
Glu:	Glutaminsäure
GP:	Glykoprotein
IgG:	Immunglobulin G
IL-1/-2:	Interleukin 1 / 2
Ile:	Isoleucin
kDa:	Kilodalton
KWK:	Konzentrations-Wirkungs-Kurve
Leu:	Leucin
MAA:	Methylaminoantipyrin
MEP:	Membrane electric potential
mM/L:	Millimol/Liter
μM/L:	Mikromol/Liter
NSAID:	Non-steroidal anti-inflammatory drug
PAF:	Plättchenaktivierender Faktor
PAP:	Plättchenarmes Plasma
PGD <sub>2</sub> , -E <sub>2</sub> , -F <sub>2</sub> , -G <sub>2</sub> , -I <sub>2</sub> :	Prostaglandin D <sub>2</sub> , -E <sub>2</sub> , -F <sub>2</sub> , -G <sub>2</sub> , -I <sub>2</sub>
PGHS:	Prostaglandinsynthase
PGI <sub>2</sub> :	Prostazyklin
Phe:	Phenylalanin

PRP:	Plättchenreiches Plasma
RLU:	Relative light units
rpm:	Rounds per minute
RT:	Raumtemperatur
SEM:	Standardfehler
Ser:	Serin
TM:	Thrombozytenmedium
Trp:	Tryptophan
TXA <sub>2</sub> :	Thromboxan A <sub>2</sub>
Tyr:	Tyrosin
Val:	Valin
vWF:	von-Willebrand-Faktor

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>V</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Hintergrund.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1.1 Rolle der Thrombozyten bei der Hämostase .....</b>	<b>2</b>
<b>1.1.2 Biochemische Basisdaten der humanen Cyclooxygenase-1.....</b>	<b>4</b>
<b>1.1.3 Cyclooxygenase-Unterformen.....</b>	<b>4</b>
<b>1.2 Molekularer Aufbau der COX-1 .....</b>	<b>5</b>
<b>1.2.1 Quartärstruktur der COX-1.....</b>	<b>5</b>
<b>1.2.2 Umsetzung von Arachidonsäure zu Thromboxan A<sub>2</sub> durch die thrombozytäre COX-1 .....</b>	<b>6</b>
<b>1.2.3 Pharmakologische Hemmung der COX-1.....</b>	<b>10</b>
1.2.3.1 Liste der verwendeten NSAIDs mit ihren Eigenschaften .....	11
1.2.3.2 Acetylsalicylsäure und ihre Derivate.....	14
1.2.3.3 Arylpropionsäurederivate (Ibuprofen, Naproxen, Flurbiprofen, Ketoprofen).....	15
1.2.3.4 Arylessigsäurederivate (Diclofenac, Ketorolac).....	17
1.2.3.5 Indolessigsäurederivate (Indometazin, O-Desmethyl-Indometazin)	17
1.2.3.6 Anthranilsäurederivate (Meclofenamat, Flufenamat, Mefenamat)	18
1.2.3.7 Pyrazolderivate (4-Aminoantipyrin, Methylaminoantipyrin (MAA))	19
1.2.3.8 Propionsäurederivate (Oxaprozin).....	20
1.2.3.9 Naphthylalkanone (Nabumeton und 6-Methoxy-2-naphthylelessigsäure (6-MNA)).....	20
1.2.3.10 Oxicame (Piroxicam, Meloxicam) .....	20
1.2.3.11 COX-2-Inhibitoren: Coxibe (Celecoxib) sowie NS-398 .....	21

1.2.3.12	COX-1 selektiver Inhibitor SC-560.....	22
<b>1.3</b>	<b>Ziele der Arbeit .....</b>	<b>23</b>
<b>2</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>25</b>
<b>2.1</b>	<b>Material.....</b>	<b>25</b>
<b>2.1.1</b>	<b>Substanzen und Lösungen .....</b>	<b>25</b>
2.1.1.1	Auflistung der verwendeten NSAIDs .....	27
<b>2.1.2</b>	<b>Geräte .....</b>	<b>29</b>
<b>2.1.3</b>	<b>Blutgewinnung.....</b>	<b>30</b>
<b>2.1.4</b>	<b>Plasmagewinnung .....</b>	<b>30</b>
<b>2.1.5</b>	<b>Herstellung von Thrombozytenmikrosomen.....</b>	<b>30</b>
<b>2.2</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>31</b>
<b>2.2.1</b>	<b>Chemilumineszenz .....</b>	<b>31</b>
2.2.1.1	Prinzip der Messung der COX-Aktivität mittels Chemilumineszenz	31
2.2.1.2	Durchführung.....	32
2.2.1.3	Konzentrations-Wirkungs-Kurven mit der Chemilumineszenz .....	33
2.2.1.4	Zeitkinetik in der Chemilumineszenz .....	33
<b>2.2.2</b>	<b>Thrombozytenaggregometrie .....</b>	<b>33</b>
2.2.2.1	Prinzip der Thrombozytenaggregometrie .....	33
2.2.2.2	Arachidonsäure-induzierte Aggregation .....	34
2.2.2.3	NSAID-Interaktionen in der Aggregation .....	35
2.2.2.4	Auswertung der Aggregationskurven.....	35
<b>2.2.3</b>	<b>Thromboxan B<sub>2</sub>-Quantifizierung.....</b>	<b>36</b>
2.2.3.1	Prinzip der Thromboxan B <sub>2</sub> -Quantifizierung .....	36
2.2.3.2	Untersuchtes Material.....	36
<b>2.2.4</b>	<b>Datenverarbeitung.....</b>	<b>37</b>
2.2.4.1	Chemilumineszenz .....	37

2.2.4.2	Thrombozytenaggregation.....	37
2.2.4.3	Thromboxan B <sub>2</sub> -Quantifizierung .....	38
2.2.4.4	Gegenüberstellung der k-Werte und der Interaktion.....	38
<b>2.3</b>	<b>Ethikvotum.....</b>	<b>38</b>
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>40</b>
<b>3.1</b>	<b>Arachidonsäureinduzierte thrombozytäre Aggregation .....</b>	<b>40</b>
<b>3.2</b>	<b>COX-Aktivität an Mikrosomen humaner Thrombozyten .....</b>	<b>42</b>
<b>3.2.1</b>	<b>Hemmung der COX-1 durch ASS .....</b>	<b>43</b>
3.2.1.1	Konzentrations-Wirkungs-Kurve von ASS .....	43
3.2.1.2	Zeitkinetik von ASS .....	43
<b>3.2.2</b>	<b>Hemmung der COX-1 durch Ketorolac .....</b>	<b>44</b>
<b>3.2.3</b>	<b>Hemmung der COX-1 durch Ketoprofen.....</b>	<b>45</b>
<b>3.2.4</b>	<b>Hemmung der COX-1 durch Diclofenac.....</b>	<b>45</b>
<b>3.2.5</b>	<b>Hemmung der COX-1 durch Flurbiprofen.....</b>	<b>46</b>
<b>3.2.6</b>	<b>Hemmung der COX-1 durch Meclofenamat.....</b>	<b>47</b>
<b>3.2.7</b>	<b>Hemmung der COX-1 durch Indometazin .....</b>	<b>47</b>
<b>3.2.8</b>	<b>Hemmung der COX-1 durch O-Desmethyl-Indometazin.....</b>	<b>48</b>
<b>3.2.9</b>	<b>Hemmung der COX-1 durch S-(+)-Ibuprofen .....</b>	<b>49</b>
<b>3.2.10</b>	<b>Hemmung der COX-1 durch Naproxen .....</b>	<b>50</b>
<b>3.2.11</b>	<b>Hemmung der COX-1 durch Celecoxib.....</b>	<b>50</b>
<b>3.2.12</b>	<b>Hemmung der COX-1 durch Oxaprozin .....</b>	<b>51</b>
<b>3.2.13</b>	<b>Hemmung der COX-1 durch 6-Methoxy-2-Naphthylelessigsäure (6-MNA) 52</b>	
<b>3.2.14</b>	<b>Hemmung der COX-1 durch Methylaminoantipyrin (MAA) .....</b>	<b>52</b>
<b>3.2.15</b>	<b>Hemmung der COX-1 durch SC-560 .....</b>	<b>53</b>
<b>3.2.16</b>	<b>Hemmung der COX-1 durch Meloxicam .....</b>	<b>54</b>
<b>3.2.17</b>	<b>Hemmung der COX-1 durch Flufenamat .....</b>	<b>54</b>

3.2.18	Hemmung der COX-1 durch NS-398 .....	55
3.2.19	Hemmung der COX-1 durch Mefenamat.....	56
3.2.20	Hemmung der COX-1 durch Nabumeton.....	56
3.2.21	Hemmung der COX-1 durch Piroxicam .....	57
3.2.22	Hemmung der COX-1 durch 4-Aminoantipyrin .....	58
3.2.23	Auswertung der k-Werte .....	58
3.2.24	Auswertung des HillSlopes und logIC <sub>50</sub> (KWK) .....	61
3.3	Interaktion der untersuchten NSAID-Substanzen mit der Hemmung der Thrombozytenaggregation durch ASS .....	61
3.4	Interaktion der untersuchten NSAID-Substanzen mit ASS, gemessen mittels Thromboxan B <sub>2</sub> -Quantifizierung (EIA Kit) .....	62
3.5	Zusammenhang zwischen k-Werten und Interaktion.....	64
4	Diskussion .....	68
4.1	Wahl des Versuchsaufbaus und der analytischen Methoden .....	68
4.1.1	Thrombozytenaggregation.....	68
4.1.2	Chemilumineszenz .....	69
4.1.3	Thromboxan B <sub>2</sub> -Quantifizierung.....	70
4.2	Auswertungsmethodik.....	70
4.3	Verschiedene Bindungsmechanismen der NSAIDs .....	71
4.3.1	Lassen sich die untersuchten NSAIDs in unterschiedliche Hemmtypen unterteilen und wenn ja, hat dies Einfluss auf die Hemmkinetik? .....	72
4.3.2	Interpretation des Bindungsverhaltens von zeitabhängigen COX-Inhibitoren hinsichtlich der Interaktion mit ASS .....	73
4.3.3	Interpretation des Bindungsverhaltens von zeitunabhängigen COX-Inhibitoren hinsichtlich der Interaktion mit ASS .....	76
4.4	Interpretation der Ergebnisse dieser Dissertation vor dem Hintergrund der in der Literatur aufgeführten Theorien zur Erklärung der	

<b>unterschiedlichen Inhibitionskinetiken und Bindungsmechanismen der untersuchten NSAIDs.....</b>	<b>77</b>
<b>4.5 Bestimmung der thrombozytären Thromboxansynthese – Fehleranalyse .....</b>	<b>78</b>
<b>4.6 Schlussfolgerungen.....</b>	<b>79</b>
<b>5 Literaturverzeichnis.....</b>	<b>81</b>
<b>6 Danksagung.....</b>	<b>93</b>

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abb. 1 Thrombozytenaggregation modifiziert nach (Rassow 2012).....</b>	<b>3</b>
<b>Abb. 2: Arachidonsäuremetabolismus im Thrombozyten (modifiziert nach (Simmons et al. 2004)) .....</b>	<b>7</b>
<b>Abb. 3: Arachidonsäuremetabolismus in der COX-1, modifiziert nach (Bagheri 2015).....</b>	<b>9</b>
<b>Abb. 4: Hydrophober Tunnel der katalytischen Untereinheit nach (Hohlfeld et al. 2013) (Thrombosis and Haemostasis 109.5/2013 © Schattauer 2013). Kristallstruktur P.J. Loll, Philadelphia, USA,.....</b>	<b>10</b>
<b>Abb. 5: Prinzip der Chemilumineszenz mit Luminol.....</b>	<b>32</b>
<b>Abb. 6: Prinzip der Thrombozytenaggregometrie .....</b>	<b>34</b>
<b>Abb. 7: KWK von Diclofenac, prozentuale Darstellung .....</b>	<b>41</b>
<b>Abb. 8: Zeitkinetik von Diclofenac, prozentuale Darstellung .....</b>	<b>41</b>
<b>Abb. 9: KWK von S-(+)-Ibuprofen, prozentuale Darstellung.....</b>	<b>42</b>
<b>Abb. 10: Zeitkinetik mit 30 µM von S-(+)-Ibuprofen, prozentuale Darstellung ....</b>	<b>42</b>
<b>Abb. 11: Zeitkinetik mit 100 µM von S-(+)-Ibuprofen, prozentuale Darstellung ..</b>	<b>42</b>
<b>Abb. 12: KWK von ASS, absolute Darstellung.....</b>	<b>43</b>
<b>Abb. 13: KWK von ASS, prozentuale Darstellung.....</b>	<b>43</b>
<b>Abb. 14: Zeitkinetik von 100 µM ASS, absolute Darstellung .....</b>	<b>44</b>
<b>Abb. 15: Zeitkinetik von 100 µM ASS, prozentuale Darstellung .....</b>	<b>44</b>
<b>Abb. 16: KWK von Ketorolac .....</b>	<b>44</b>
<b>Abb. 17: Zeitkinetik von Ketorolac (0,3 µM) .....</b>	<b>44</b>
<b>Abb. 18: KWK von Ketoprofen.....</b>	<b>45</b>
<b>Abb. 19: Zeitkinetik von Ketoprofen (0,03 µM) .....</b>	<b>45</b>
<b>Abb. 20: KWK von Diclofenac .....</b>	<b>46</b>
<b>Abb. 21: Zeitkinetik von Diclofenac (0,1 µM) .....</b>	<b>46</b>
<b>Abb. 22: KWK von Flurbiprofen .....</b>	<b>46</b>

<b>Abb. 23: Zeitkinetik von Flurbiprofen (0,03 <math>\mu</math>M)</b> .....	<b>46</b>
<b>Abb. 24: KWK von Meclofenamat</b> .....	<b>47</b>
<b>Abb. 25: Zeitkinetik von Meclofenamat (0,1 <math>\mu</math>M)</b> .....	<b>47</b>
<b>Abb. 26: KWK von Indometazin</b> .....	<b>48</b>
<b>Abb. 27: Zeitkinetik von Indometazin (0,3 <math>\mu</math>M)</b> .....	<b>48</b>
<b>Abb. 28: KWK von O-Desmethyl-Indometazin</b> .....	<b>49</b>
<b>Abb. 29: Zeitkinetik von O-Desmethyl-Indometazin (3 <math>\mu</math>M)</b> .....	<b>49</b>
<b>Abb. 30: KWK von S-(+)-Ibuprofen</b> .....	<b>49</b>
<b>Abb. 31: Zeitkinetik von S-(+)-Ibuprofen (0,1 <math>\mu</math>M)</b> .....	<b>49</b>
<b>Abb. 32: KWK von Naproxen</b> .....	<b>50</b>
<b>Abb. 33: Zeitkinetik von Naproxen (0,3 <math>\mu</math>M)</b> .....	<b>50</b>
<b>Abb. 34: KWK von Celecoxib</b> .....	<b>51</b>
<b>Abb. 35: Zeitkinetik von Celecoxib (1 <math>\mu</math>M)</b> .....	<b>51</b>
<b>Abb. 36: KWK von Oxaprozin</b> .....	<b>51</b>
<b>Abb. 37: Zeitkinetik von Oxaprozin (1 <math>\mu</math>M)</b> .....	<b>51</b>
<b>Abb. 38: KWK von 6-MNA</b> .....	<b>52</b>
<b>Abb. 39: Zeitkinetik von 6-MNA (3 <math>\mu</math>M)</b> .....	<b>52</b>
<b>Abb. 40: KWK von MAA</b> .....	<b>53</b>
<b>Abb. 41: Zeitkinetik von MAA (1 <math>\mu</math>M)</b> .....	<b>53</b>
<b>Abb. 42: KWK von SC-560</b> .....	<b>53</b>
<b>Abb. 43: Zeitkinetik von SC-560 (0,03 <math>\mu</math>M)</b> .....	<b>53</b>
<b>Abb. 44: KWK von Meloxicam</b> .....	<b>54</b>
<b>Abb. 45: Zeitkinetik von Meloxicam (3 <math>\mu</math>M)</b> .....	<b>54</b>
<b>Abb. 46: KWK von Flufenamat</b> .....	<b>55</b>
<b>Abb. 47: Zeitkinetik von Flufenamat (0,3 <math>\mu</math>M)</b> .....	<b>55</b>
<b>Abb. 48: KWK von NS-398</b> .....	<b>55</b>
<b>Abb. 49: Zeitkinetik von NS-398 (3 <math>\mu</math>M)</b> .....	<b>55</b>

<b>Abb. 50: KWK von Mefenamat.....</b>	<b>56</b>
<b>Abb. 51: Zeitkinetik Mefenamat (0,3 <math>\mu</math>M).....</b>	<b>56</b>
<b>Abb. 52: KWK von Nabumeton .....</b>	<b>57</b>
<b>Abb. 53: Zeitkinetik von Nabumeton (300 <math>\mu</math>M).....</b>	<b>57</b>
<b>Abb. 54: KWK von Piroxicam.....</b>	<b>57</b>
<b>Abb. 55: Zeitkinetik von Piroxicam (10 <math>\mu</math>M) .....</b>	<b>57</b>
<b>Abb. 56: KWK von 4-Aminoantipyrin .....</b>	<b>58</b>
<b>Abb. 57: Zeitkinetik von 4-Aminoantipyrin (3 <math>\mu</math>M) .....</b>	<b>58</b>
<b>Abb. 58: k-Werte der verschiedenen NSAID-Zeitkinetiken.....</b>	<b>60</b>
<b>Abb. 59: Interaktionen der untersuchten NSAIDs mit ASS in der Thrombozytenaggregation .....</b>	<b>62</b>
<b>Abb. 60: Interaktionen der untersuchten NSAIDs mit ASS in der Thromboxan B<sub>2</sub>-Quantifizierung (EIA Kit).....</b>	<b>64</b>
<b>Abb. 61: Zusammenhang zwischen k-Werten und Interaktion (Aggregation) .....</b>	<b>66</b>
<b>Abb. 62: Zusammenhang zwischen k-Werten und Interaktion (Thromboxan B<sub>2</sub>-Quantifizierung).....</b>	<b>67</b>
<b>Tabelle 1: Biochemische Basisdaten der humanen Cyclooxygenase-1 .....</b>	<b>4</b>
<b>Tabelle 2: Liste der verwendeten NSAIDs mit ihren Eigenschaften.....</b>	<b>14</b>
<b>Tabelle 3: Übersicht der k-Werte und des jeweiligen Interaktionspotentials.....</b>	<b>59</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Hintergrund

Acetylsalicylsäure (ASS, Handelsname Aspirin<sup>R</sup>, zahlreiche Generika) ist ein häufig eingesetztes Medikament zur Therapie von Fieber und entzündlichen Schmerzprozessen sowie, dank seines antithrombotischen Effektes, zur Prävention atherothrombotischer Ereignisse wie z.B. Herzinfarkt und Schlaganfall. Es wird seit über hundert Jahren erfolgreich angewendet und seit 1977 auf der Liste der unentbehrlichen Medikamente der WHO aufgeführt.

Allein in den USA werden täglich ca. 35.000 kg ASS konsumiert (Jack 1997). Die verwendete Standarddosis zur Prävention atherothrombotischer Ereignisse liegt bei 75 – 350 mg/d. Viele Studien belegen den Nutzen des Medikaments in der kardiovaskulären Sekundärprävention, wie zum Beispiel die Metaanalyse „Collaborative meta-analysis of randomised trials of antiplatelet therapy for prevention of death, myocardial infarction and stroke in high risk patients“ der Antithrombotic Trialists‘ Collaboration (Abdolmohammad-Zadeh et al. 2014). Diese Metaanalyse umfasst 287 Studien mit insgesamt 135.000 Patienten und zeigt, dass ASS die Anzahl ernster atherothrombotischer Ereignisse um ein Viertel senken kann, während die Anzahl nicht-letaler Myokardinfarkte um ein Drittel, die nicht-letalen Schlaganfälle um ein Viertel und das Risiko des kardiovaskulären Todes um ein Sechstel gesenkt wurde. Auch wenn ASS die Inzidenz kardiovaskulärer Ereignisse “nur” graduell senkt (s.o.), würde man erwarten, dass die pharmakologische Wirkung, d.h. die Hemmung der Thrombozytenfunktion und Thromboxansynthese (s.u.), in jedem Fall erreicht wird. Genau dies ist jedoch überraschenderweise nicht der Fall.

In der Praxis wurde beobachtet, dass keineswegs bei allen Patienten die gewünschte Hemmung der Thrombozytenfunktion erzielt wird. Zahlreiche Ursachen für eine derartige „Nonresponse“ wurden diskutiert (Yi et al. 2017; Wand et al. 2018; Wand et al. 2014; Biller 2008; Hohlfeld et al. 2007).

Eine der möglichen Ursachen ist die Interaktion verschiedener NSAIDs (non-steroidal anti-inflammatory drugs) mit ASS. Vorarbeiten im eigenen Labor sowie Arbeiten verschiedener anderer Studien haben gezeigt, dass z.B. Metamizol, Ibuprofen und zahlreiche andere Nichtopioidanalgetika die Hemmung der Thrombozytenfunktion durch ASS vermindern, also mit ASS interagieren (Hohlfeld et al. 2008; Catella-Lawson et al. 2001;

Saxena et al. 2013). Diese Arbeiten zeigten allerdings auch, dass diese Arzneimittelinteraktion kein „Klasseneffekt“ der NSAID-Analgetika sein kann. Diclofenac und Ketorolac z.B. interagieren nicht mit ASS und beeinflussen das Medikament demnach nicht in seiner Wirkung (Catella-Lawson et al. 2001; Hohlfeld et al. 2013; Saxena et al. 2013). Hierbei scheint sich ein Unterschied zu ergeben, je nachdem ob das verwendete NSAID die Funktion der Thrombozyten schnell oder zeitverzögert hemmt.

Im Zentrum der vorliegenden Arbeit steht die Frage, inwiefern die pharmakodynamische Hemmkinetik der Substanzen eine Rolle bei der Interaktion mit ASS spielen könnte und worin im Detail die Unterschiede der Hemmtypen der verschiedenen NSAIDs bestehen.

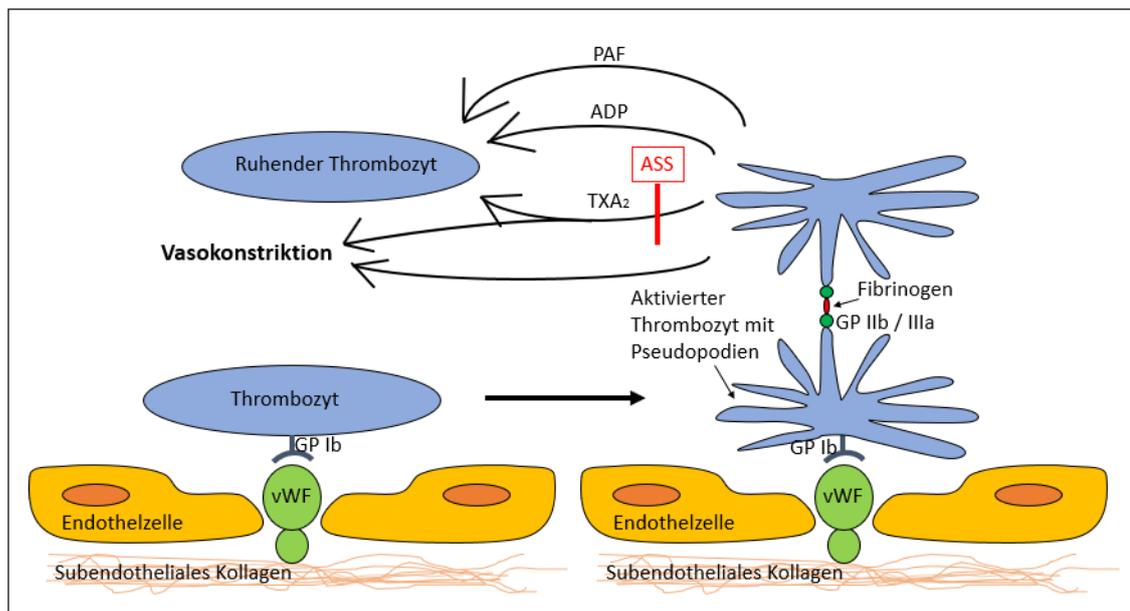
### 1.1.1 Rolle der Thrombozyten bei der Hämostase

Thrombozyten, oder auch Blutplättchen, sind im inaktiven Zustand runde, scheibenförmige Zellfragmente mit einem Durchmesser von ca. 1  $\mu\text{m}$  (Twarock et al. 2016). Aktivierte Thrombozyten bilden die Grundlage der Hämostase, also der Bildung von Blutgerinnseln oder Gefäßwandthromben, die zur Stillung einer Blutung führen. Um Thrombozyten zu aktivieren gibt es zwei verschiedene Wege: zum einen den direkten primären Weg, abgegrenzt von dem indirekten, sekundären Weg. Primärer Weg: Wird das Endothel eines Gefäßes verletzt, kommt das darunterliegende Kollagen mit dem Blut direkt in Berührung und wird von dem von-Willebrand-Faktor (vWF) markiert. Dieser Faktor ist löslich, wird jedoch bei Assoziation mit Kollagen zu einem Adapterprotein, das die Bindung zwischen dem Kollagen und dem vWF-Rezeptor der Thrombozyten, dem Glykoprotein GP Ib, vermittelt (Adhäsion). Außerdem wird GP VI durch Kollagen stimuliert, was wiederum den thrombozytären GP Ia/IIa aktiviert, wodurch der Thrombozyt mit dem subendothelialen Kollagen verbunden wird (Kuijpers et al. 2003; Versteeg et al. 2013). Somit wird der Thrombozyt zum einen am Kollagen der extrazellulären Matrix verankert, zum anderen aber auch aktiviert, was ihn zu einer Formänderung veranlasst: er gewinnt eine sphärische Gestalt und bildet Pseudopodien aus („shape change“), was seine Oberfläche vergrößert (Nieswandt et al. 2001). Außerdem bewirkt der aktivierte Thrombozyt eine Konformationsänderung des Glykoproteins IIb/IIIa in der Thrombozytenmembran, was die Adhäsion der Thrombozyten sowohl an das Kollagen als auch an das Fibronectin verstärkt (Twarock et al. 2016).

Sekundärer Weg: Mittels GP IIb/IIIa kann der Thrombozyt auch an im Blutplasma gelöstes Fibronectin, Fibrinogen und Fibrin (das bei der Gerinnung aus Fibrinogen gebildet

wird) binden und sich somit mit anderen Thrombozyten quervernetzen. Auch werden alpha-Granula ausgeschüttet, die vWF, Gerinnungsfaktor VIII und V, Fibrinogen und Wachstumsfaktoren enthalten und etwas kleinere elektronendichte delta-Granula, durch die ADP (Adenosindiphosphat), Serotonin und Calcium freigesetzt werden. Diese Substanzen verstärken die Aggregation und aktivieren ihrerseits noch inaktive Plättchen (Twarock et al. 2016). Hinzu kommt, dass aktivierte Thrombozyten Thromboxan A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) und Plättchenaktivierenden Faktor (PAF) freisetzen. TXA<sub>2</sub> wird in den aktivierten Plättchen durch die Cyclooxygenase-1 (COX-1) in der Membran der Plättchen aus Arachidonsäure synthetisiert. Es verstärkt synergistisch zu ADP die Aktivierung weiterer Thrombozyten und wirkt synergistisch zu Serotonin vasokonstriktorisch. Der Thrombozyt wird durch die genannten Mechanismen außerdem in das entstehende Fibrin-Netzwerk eingebaut, das zum Schluss den so genannten „weißen Thrombus“ bildet (Gawaz MP 1999).

ASS hemmt die COX-1 und bewirkt dadurch eine Hemmung der Synthese von TXA<sub>2</sub>. Durch diesen Mechanismus wird die Blutungszeit verlängert.



**Abb. 1 Thrombozytenaggregation modifiziert nach (Rassow 2012)**

Die Thrombozyten werden durch das (durch einen Endotheldefekt) frei liegende Kollagen über den von-Willebrand-Faktor aktiviert und bilden Pseudopodien aus. Außerdem sezernieren sie verschiedene vasokonstriktorisch wirkende Faktoren (z.B. TXA<sub>2</sub> und Serotonin) und solche, die weitere Thrombozyten aktivieren (z.B. PAF und ADP).

Bei den Experimenten, die dieser Arbeit zugrunde liegen, wird die Funktion der COX-1 über die Umsetzung von Arachidonsäure zu TXA<sub>2</sub> bestimmt.

### 1.1.2 Biochemische Basisdaten der humanen Cyclooxygenase-1

Biologische Bedeutung	Synthese von PGH <sub>2</sub> , damit ist dieses Enzym die Voraussetzung für die Synthese von PGG <sub>2</sub> , PGI <sub>2</sub> , PGD <sub>2</sub> , PGE <sub>2</sub> , PGF <sub>2a</sub> , TXA <sub>2</sub>
Molekulargewicht	71 kDa
Chromosom	9q32-q33.3
Aminosäuren	576 (Smith et al. 2011)
Expressionstyp	Zwei Monomere, die sich zu einem Homodimer zusammenschließen. Bifunktional, da jedes Monomer über eine Cyclooxygenase- und eine Peroxydaseaktivität verfügt.
Kofaktor	Häm B
Reaktionsart	Oxidation und Peroxidation
Lokalisation	integrales Membranprotein, Vorkommen v.a. im endoplasmatischen Retikulum von Zellen fast aller Gewebe (Smith und Marnett 1991)

**Tabelle 1: Biochemische Basisdaten der humanen Cyclooxygenase-1**

### 1.1.3 Cyclooxygenase-Unterformen

Bisher sind verschiedene Unterformen der COX beschrieben: Die COX-1, COX-2 und COX-3, eine Variante der COX-1 (J. R. Vane, Y. S. Bakhle, and R. M. Botting 1998; Chandrasekharan et al. 2002). Die „konstitutive“ COX-1 ist in fast allen Geweben lokalisiert und vermittelt vor allem physiologische Prozesse. So wird durch die COX-1 in der Magenmukosa z.B. das Prostacyclin PGI<sub>2</sub>, das antithrombogene und vasodilatierende Eigenschaften aufweist, synthetisiert. Im Thrombozyten hingegen wird durch die COX-1 hauptsächlich TXA<sub>2</sub> gebildet, was wiederum thrombogene und adhäsions- bzw. aggregationsfördernde Effekte vermittelt (J. R. Vane, Y. S. Bakhle, and R. M. Botting 1998). Die COX-2 wird hauptsächlich bei entzündlichen Prozessen ausgebildet. So wird ihre Synthese durch Entzündungsmediatoren wie bakterielle Lipopolysaccharide, Zytokine wie Interleukine (IL-1 und IL-2) und den Tumornekrosefaktor-alpha aktiviert (J. R. Vane, Y. S. Bakhle, and R. M. Botting 1998). Allerdings weiß man heute, dass auch die COX-2 in einigen Geweben zu einem geringen Maße ständig ausgebildet wird, wie z.B. im Nervensystem, der Niere und dem Uterus (Y. S. Bakhle, and R. M. Botting 1998; Vane et al.

1998). Über die Expression und die Funktion der COX-3 ist bisher wenig bekannt (Chandrasekharan et al. 2002).

## 1.2 Molekularer Aufbau der COX-1

Die COX-1 ist ein integrales Membranprotein, das hauptsächlich im endoplasmatischen Retikulum vorkommt (Smith und Marnett 1991). Es besteht aus zwei Untereinheiten, die aus 576 Aminosäuren aufgebaut sind. Sie ist bifunktional mit einer Peroxydaseaktivität und einer Cyclooxygenaseaktivität.

Die Primärstruktur der COX-1 besteht aus einem Signalpeptid, es folgt die Epidermal-growth-factor-like-Domäne (erinnert von der Struktur her an den Epidermal-growth-factor (EGF)) und die membranbindende Domäne, an die sich die katalytische Domäne anschließt. Carboxyterminal findet sich noch eine kurze Sequenz, die als Zielsequenz für das endoplasmatische Retikulum fungiert. Die katalytische Untereinheit mit den aktiven Zentren, der Peroxydaseaktivität und der Cyclooxygenaseaktivität, bildet mit ca. 460 Aminosäuren etwa 80% des ganzen Enzyms.

Die aktive Seite der PGHS-1 (Peroxydaseaktivität) ist rundlich angeordnet und besitzt zwei ineinandergreifende Lappen, die eine Spalte an der Oberfläche des aktiven Zentrums bilden (Simmons et al. 2004). Sie befindet sich gegenüber der Cyclooxygenaseaktivität und der membranbindenden Domäne (Picot und Garavito 1994). Der Eingang des aktiven Zentrums der Cyclooxygenaseaktivität wird durch vier amphiphile  $\alpha$ -Helices der membranbindenden Domäne eingerahmt und mündet in einen langen schmalen Tunnel mit hauptsächlich hydrophobem Charakter (Simmons et al. 2004).

### 1.2.1 Quartärstruktur der COX-1

Die COX-1 besteht aus zwei Monomeren, die sich fest zu einem Homodimer zusammenschließen (van der Ouderaa et al. 1977; Picot et al. 1994; Xiao et al. 1998) und jeweils sowohl eine Cyclooxygenase- als auch eine Peroxydaseaktivität besitzen (Smith et al. 2011). Jedes Dimer enthält ein Eisenmolekül (Smith et al. 2011). Die Verbindung zwischen den Monomeren besteht aus einer nicht-kristallogenen doppelt gefalteten Achse (Picot et al. 1994), die es den Monomeren erlaubt, in Lösung voneinander abzdifferenzieren (Smith et al. 2011). Neuere Studien zeigen, dass sich das Homodimer eher wie ein Heterodimer verhält, da ein Monomer die allosterischen Funktionen und das andere die katalytischen Funktionen übernimmt. Außerdem können gleichzeitig zwei verschiedene Liganden an die Monomere binden (Smith et al. 2011)

Das aktive Zentrum der Cyclooxygenaseaktivität befindet sich am oberen Ende des hydrophoben Tunnels (Smith et al. 2000), der sich an die membranbindende Domäne der COX anschließt (Picot et al. 1994; Otto und Smith 1994; Morita et al. 1995; Spencer et al. 1998).

Es setzt sich insgesamt aus 24 Aminosäuren zusammen, von denen für die Hemmung des Enzyms durch NSAIDs vor allem Ser<sup>530</sup> (Acetylierung durch ASS) und Arg<sup>120</sup> (Bindung an die Carboxylgruppe von sauren NSAIDs) von essentieller Bedeutung sind (DeWitt et al. 1990; Lecomte et al. 1994; Loll et al. 1995; Bhattacharyya et al. 1996; Rieke et al. 1999; Mancini et al. 1995; Greig et al. 1997).

Die membranbindende Domäne bildet den Eingang, durch den ARA und Sauerstoff in das aktive Zentrum hinein diffundieren können (Smith et al. 2000). Der Eingang des hydrophoben Tunnels selbst wird durch drei Aminosäuren flankiert: Arg<sup>120</sup>, Glu<sup>524</sup> und Tyr<sup>355</sup>, die in der Lage sind, ein hydrophobes Netzwerk auszubilden. Sie sind außerdem an katalytischen Reaktionen des aktiven Zentrums beteiligt (So et al. 1998). Das hydrophobe Netzwerk ermöglicht es dem Tunnel sich zusammenzuziehen, was sowohl für die Bindung von Substraten als auch von hemmenden NSAIDs wichtig ist (Simmons et al. 2004). Das dem Arg<sup>120</sup> gegenüberliegende Tyr<sup>355</sup> scheint sowohl für den allosterischen Effekt von ARA auf das Enzym (So et al. 1998), als auch für die Stereospezifität des hydrophoben Tunnels auf NSAIDs wichtig zu sein (Rieke et al. 1999). Außerdem scheint die Phenolgruppe von Tyr<sup>355</sup> für die zeitunabhängige Inhibition der COX-1 durch NSAIDs eine entscheidende Rolle zu spielen (So et al. 1998).

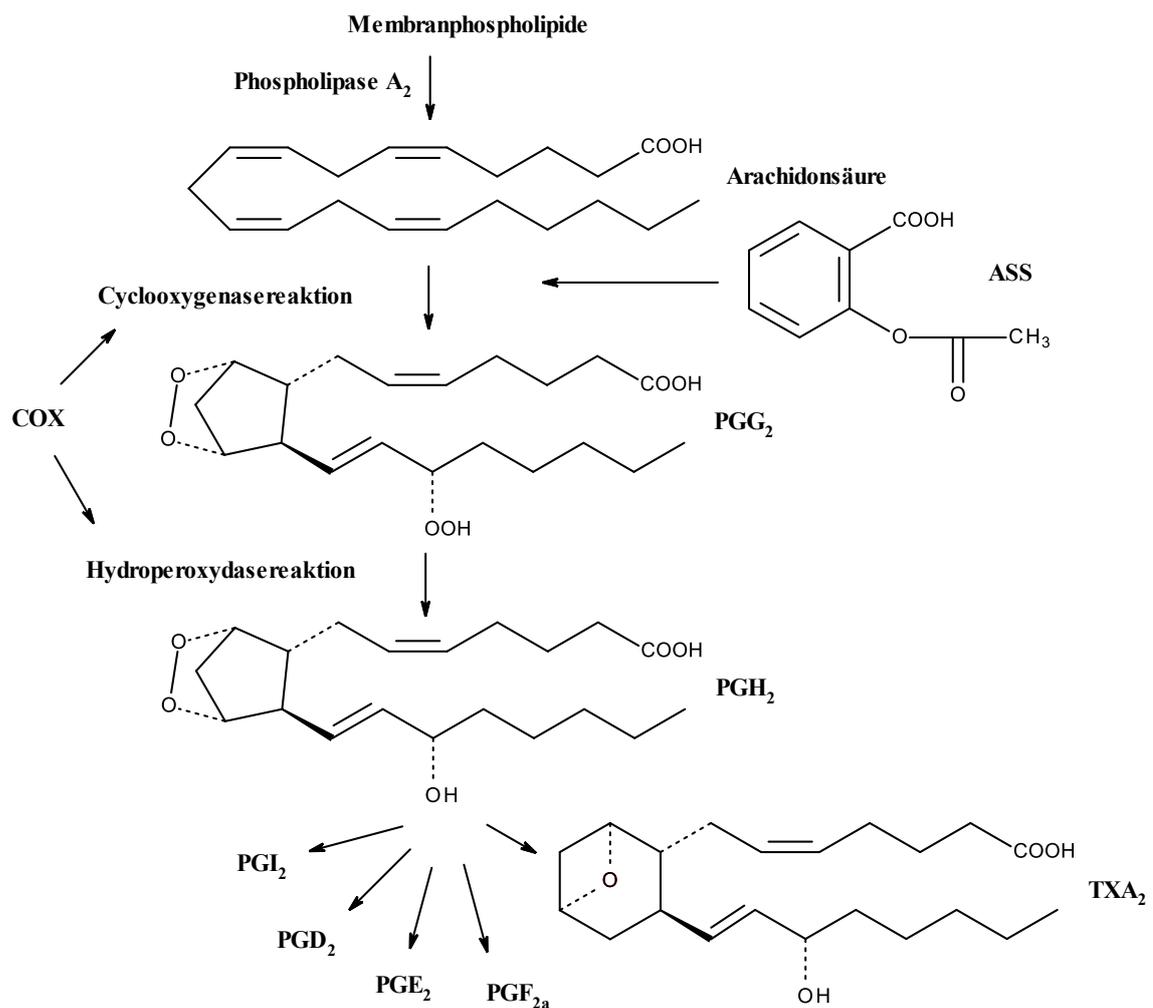
Das Ende des Tunnels bildet die Aminosäure Tyr<sup>385</sup>, die auch an den katalytischen Reaktionen beteiligt ist (So et al. 1998). Die Bindungsstelle für NSAIDs erstreckt sich somit von Arg<sup>120</sup> bis Tyr<sup>385</sup> (Smith et al. 2000).

### 1.2.2 Umsetzung von Arachidonsäure zu Thromboxan A<sub>2</sub> durch die thrombozytäre COX-1

Die Cyclooxygenaseaktivität lagert mittels eines radikalischen Mechanismus zwei Sauerstoffmoleküle an ARA an und synthetisiert so Prostaglandin G-2 (PGG<sub>2</sub>). Die Peroxydaseaktivität reduziert die Hydroperoxid-Gruppe zur Hydroxylgruppe und wandelt somit PGG<sub>2</sub> in PGH<sub>2</sub> um. Ausgehend von PGH<sub>2</sub> können durch nachgeschaltete Synthesen verschiedene Prostaglandine (PGD<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub>) und TXA<sub>2</sub> gebildet werden (s. Abb. 2: Arachidonsäuremetabolismus im Thrombozyten (modifiziert nach (Simmons et al.

2004)). Außerdem scheinen Prostaglandine auch eine Rolle im Rahmen des Bradikinin-vermittelten extravasalen Plasmaaustritts in Hautkapillaren bei inflammationsbedingten Ödemen zu spielen (Gholamreza-Fahimi et al. 2020).

TXA<sub>2</sub> wird im Serum nicht-enzymatisch zum inaktiven TXB<sub>2</sub> umgesetzt, das eine Halbwertszeit von 5 – 7 min aufweist. Es ist möglich, die Konzentration von TXB<sub>2</sub> im Serum zu messen und somit indirekt die Funktion der thrombozytären COX-1 zu quantifizieren.



**Abb. 2: Arachidonsäuremetabolismus im Thrombozyten (modifiziert nach (Simmons et al. 2004))**

Die Cyclooxygenasefunktion der COX-1 synthetisiert aus Arachidonsäure PGG<sub>2</sub>. Dies wird im Anschluss durch die Peroxydaseaktivität der COX-1 zu PGH<sub>2</sub> umgewandelt. PGH<sub>2</sub> dient im Verlauf zur Synthese weiterer Prostaglandine sowie Thromboxan A<sub>2</sub>. Die Cyclooxygenaseaktivität kann durch ASS gehemmt werden.

Verschiedene Veröffentlichungen setzen sich mit der Umsetzung von ARA durch die COX-1 auseinander. Diese besteht aus der Oxidation verschiedener Kohlenstoffatome

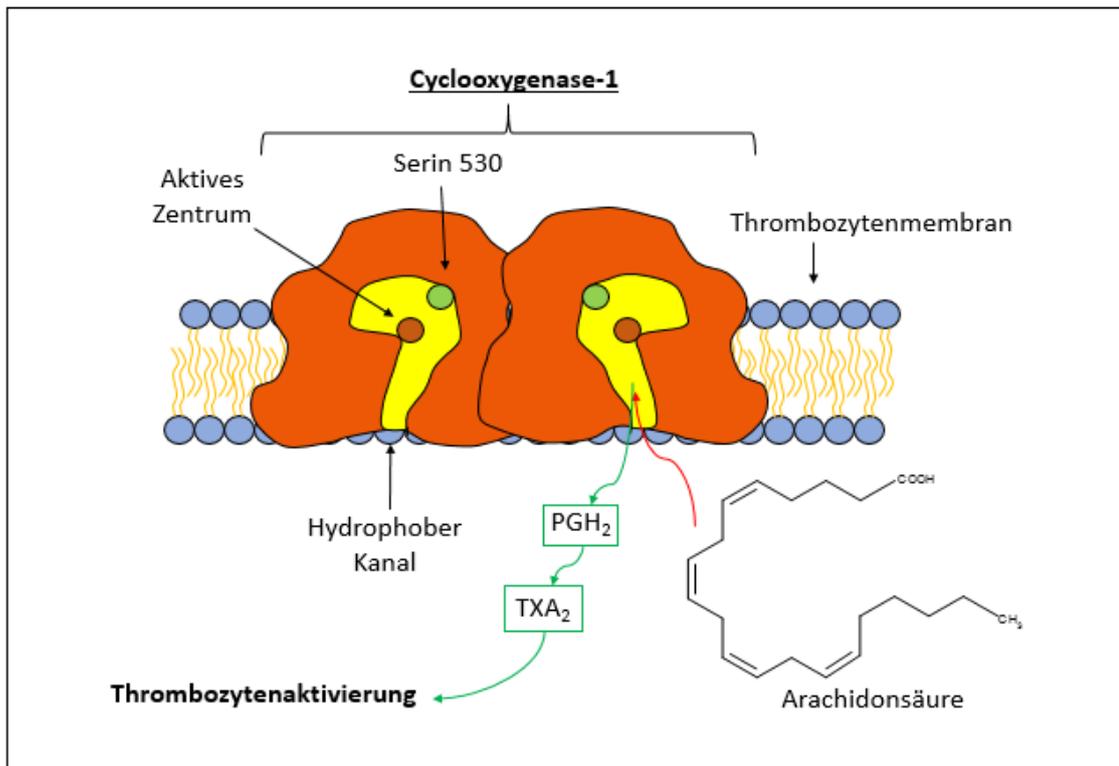
der ARA und der Abspaltung eines Wasserstoffatoms durch ein Tyrosylradikal, wodurch ein Arachidonyl-Radikal geformt wird und es zu einer Elektronenumverteilung und einem Ringschluss kommt. Das neu entstandene Hydroxyendoperoxid PGG<sub>2</sub> kann nun die Cyclooxygenaseuntereinheit der COX-1 verlassen um anschließend durch die Peroxydaseaktivität weiter zu PGH<sub>2</sub> reduziert zu werden (s. Abb. 2: Arachidonsäuremetabolismus im Thrombozyten (modifiziert nach (Simmons et al. 2004)) (Simmons et al. 2004; Wenk 2006).

Im Detail wird die ARA durch die hydrophobe Struktur des Tunnels des aktiven Zentrums der COX-1 in die für die katalytische Reaktion notwendige Position gebracht (Smith et al. 2000). Das Carboxylat der ARA geht vermutlich mit Arg<sup>120</sup> eine ionische Bindung und mit Tyr<sup>355</sup> eine Wasserstoffbrückenbindung ein (Picot et al. 1994; Luong et al. 1996; Kurumbail et al. 1996; Simmons et al. 2004; Bhattacharyya et al. 1996; Mancini et al. 1995) während die omega-methyl-Gruppe L-förmig in den hydrophoben Tunnel hineinragt (Bhattacharyya et al. 1996). Das Tyr<sup>385</sup> bildet mit Hilfe des in der COX-1 gebundenen Eisens ein Tyrosylradikal, das ein Wasserstoffatom der ARA abstrahiert, somit ein aktiviertes Arachidonylradikal formt, das die Oxygenierungsreaktion durchlaufen kann (Hamberg und Samuelsson 1967; Fried et al. 1987; Xiao et al. 1997; Simmons et al. 2004).

Die Umsetzung der ARA im aktiven Zentrum der COX-1 verläuft cyclisch: zunächst bindet die ARA L-förmig in den hydrophoben Tunnel, wobei das Kohlenstoffatom 15 der ARA so platziert wird, dass es durch das Tyrosylradikal 385 abstrahiert werden kann. Anschließend wird ein Endoperoxid geformt, da Sauerstoff die Arachidonylradikale in Position 9 und 11 attackieren kann. Auch das Carbonylradikal in Position 15 wird von einem Sauerstoffatom attackiert. In einem letzten Schritt wird das Tyrosylradikal regeneriert und das neu synthetisierte PGG<sub>2</sub> kann das aktive Zentrum verlassen (Simmons et al. 2004).

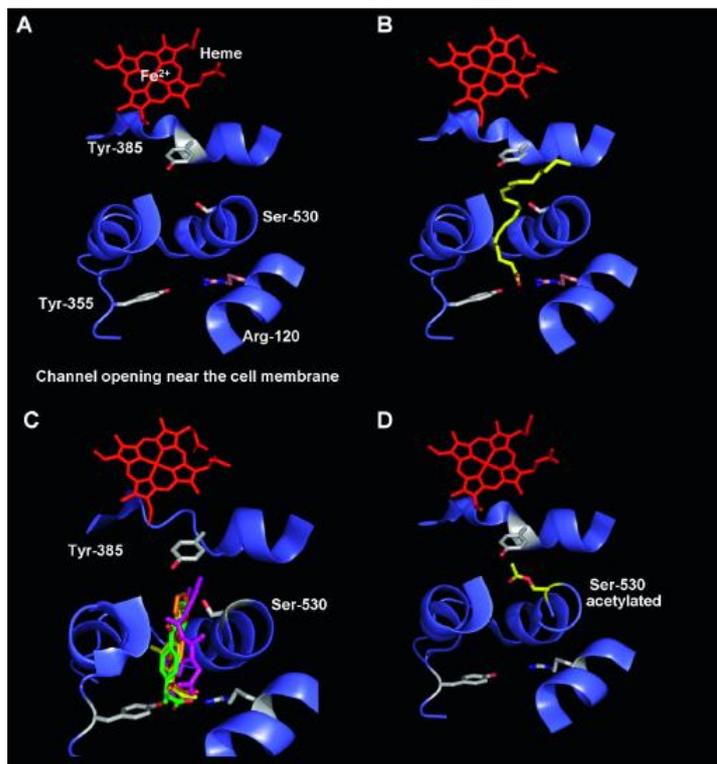
Arg<sup>120</sup> selbst soll nicht an der katalytischen Umsetzung der ARA beteiligt sein, sondern Einfluss auf die Affinität der COX-1 zur ARA haben (Bhattacharyya et al. 1996).

Allerdings wird ein Einfluss von Ser<sup>530</sup> zusammen mit Val<sup>349</sup> auf die Stereometrie der Reaktion von Sauerstoff mit dem Kohlenstoff in Position 15 der ARA angenommen, was für die Inhibition der COX-1 durch ASS von Bedeutung ist (Simmons et al. 2004).



**Abb. 3: Arachidonsäuremetabolismus in der COX-1, modifiziert nach (Bagheri 2015)**

Arachidonsäure bindet L-förmig an das aktive Zentrum der COX-1, wo sie zu PGG<sub>2</sub> umgewandelt wird.



**Abb. 4: Hydrophober Tunnel der katalytischen Untereinheit nach (Hohlfeld et al. 2013) (Thrombosis and Haemostasis 109.5/2013 © Schattauer 2013). Kristallstruktur P.J. Loll, Philadelphia, USA,**

A: leerer Tunnel ohne Substrat; B: ARA im Tunnel gebunden; C: vermutete Position von ASS und anderer nicht-selektiven NSAIDs in der Interaktion mit dem hydrophoben Tunnel; D: Acetylierung von Ser<sup>530</sup> durch ASS

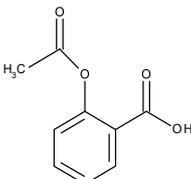
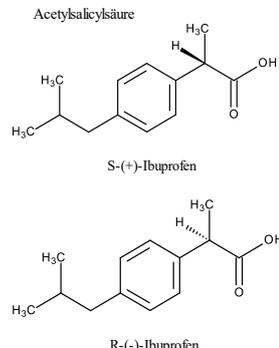
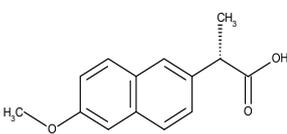
### 1.2.3 Pharmakologische Hemmung der COX-1

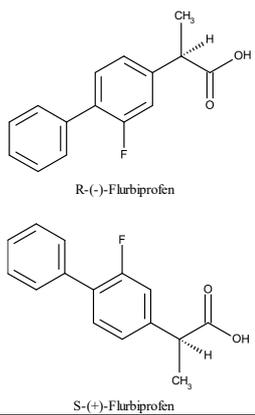
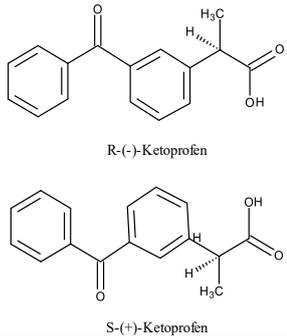
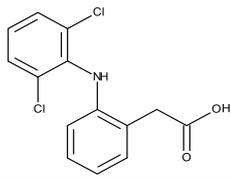
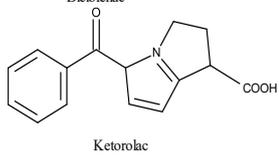
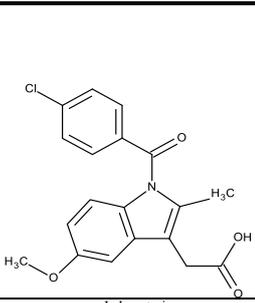
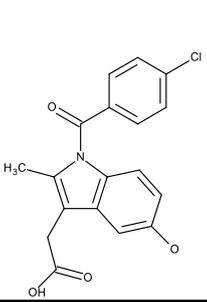
Unter den handelsüblichen NSAIDs ist ASS der einzige kovalente Inhibitor der COX (Simmons et al. 2004). Die meisten anderen NSAIDs inhibieren das Enzym, indem sie reversibel im hydrophoben Tunnel des aktiven Zentrums binden und somit mit ARA um die Bindungsstelle im katalytischen Zentrum des Enzyms konkurrieren. Bezüglich des pharmakodynamischen Mechanismus lassen sich zwei verschiedene NSAID-Hemmcharakteristiken differenzieren: ein zeitabhängiger bzw. schnell hemmender sowie ein zeitunabhängiger bzw. langsam hemmender Inhibitionstyp (Simmons et al. 2004). Die zeitunabhängigen NSAIDs binden sehr schnell an das aktive Zentrum der Cyclooxygenase-Aktivität, diffundieren allerdings auch schnell wieder aus dem Zentrum heraus. Sie bilden somit mit der COX-1 rasch reversible Enzym-Inhibitor-Komplexe (Selinsky et al. 2001). Ibuprofen ist hier das prominenteste Beispiel. Zeitabhängige NSAIDs (z.B. Indometazin oder Diclofenac) hingegen brauchen einige Sekunden bis Minuten, um an das aktive Zentrum zu gelangen und die COX-1 zu hemmen. Allerdings verbleiben sie auch länger am Enzym und brauchen mitunter Stunden,

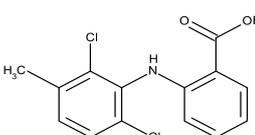
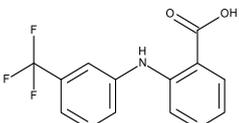
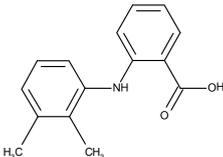
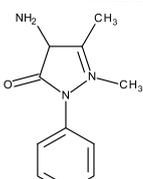
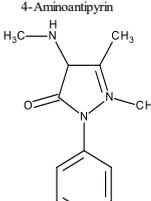
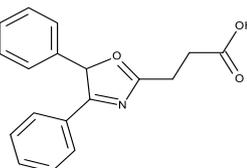
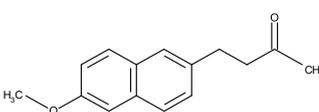
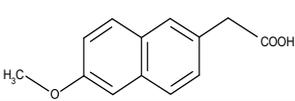
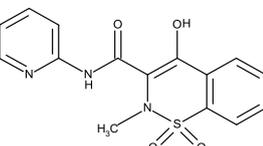
um aus der Bindung abzdifundieren (Simmons et al. 2004). Außerdem wird eine Strukturänderung im Protein durch zeitabhängige NSAIDs diskutiert (Bhattacharyya et al. 1996).

Die klinisch etablierten oder in Laboruntersuchungen näher charakterisierten NSAIDs, von denen viele im Rahmen dieser Dissertation untersucht wurden, lassen sich in verschiedene Struktur-Klassen einteilen, die im Folgenden genauer erläutert werden. Repräsentativ für die unterschiedlichen Klassen wurden jeweils klinisch häufig eingesetzte oder für ihre Gruppe charakteristische Substanzen ausgewählt und deren Interaktion mit ASS untersucht.

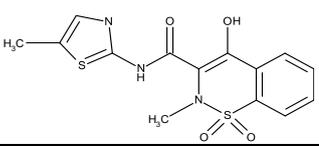
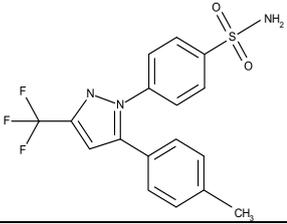
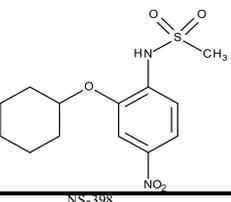
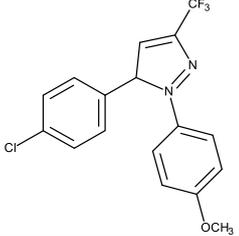
### 1.2.3.1 Liste der verwendeten NSAIDs mit ihren Eigenschaften

NSAID-Subgruppe	NSAID-Name	Struktur	Bindungsmechanismus	Hemmtyp (gemäß Literatur)
Acetylsalicylsäure-Derivate	Acetylsalicylsäure		kovalent	zeitabhängig
Arylpropion-säurederivate	S-(+)-Ibuprofen R-(-)-Ibuprofen	<p>Acetylsalicylsäure</p>  <p>S-(+)-Ibuprofen</p> <p>R-(-)-Ibuprofen</p>	kompetitiv; schnell reversibel	zeitunabhängig
	Naproxen		langsam reversibel	zeitunabhängig

	<p>Flurbiprofen (S-Enantiomer aktiv)</p>  <p>R-(-)-Flurbiprofen</p> <p>S-(+)-Flurbiprofen</p>	<p>zunächst schnell reversibel, dann langsam irreversibel</p>	<p>zeitabhängig</p>
	<p>Ketoprofen (S-Enantiomer aktiv)</p>  <p>R-(-)-Ketoprofen</p> <p>S-(+)-Ketoprofen</p>	<p>langsam reversibel</p>	<p>zeitunabhängig</p>
Arylessigsäurederivate	<p>Diclofenac</p> 	<p>nicht-kompetitiv; zunächst schnell reversibel, dann langsam irreversibel</p>	<p>zeitabhängig</p>
	<p>Ketorolac</p>  <p>Diclofenac</p> <p>Ketorolac</p>	<p>nicht-kompetitiv; zunächst schnell reversibel, dann langsam irreversibel</p>	<p>zeitabhängig</p>
Indolessigsäurederivate	<p>Indometazin</p>  <p>Indometazin</p>	<p>zunächst schnell reversibel, dann langsam irreversibel</p>	<p>zeitabhängig</p>
	<p>O-Desmethyl-Indometazin</p>  <p>O-Desmethylindometazin</p>	<p>zunächst schnell reversibel, dann langsam irreversibel</p>	<p>zeitabhängig</p>

Anthranilsäure- rederivate	Meclofen- amat		nicht-kompetitiv; zunächst schnell reversibel, dann langsam irreversi- bel	zeitabhän- gig
	Flufenamat	Meclofenamat 	kompetitiv	zeitunab- hängig
	Mefenamat	Flufenamat 	kompetitiv; zu- nächst langsam, danach reversibel - schwach bindend	zeitunab- hängig
Pyrazolderi- vate	4-Aminoan- tipyrin	Mefenamat 	kompetitiv	zeitunab- hängig
	4-Methyla- minoantipy- rin (MAA)	4-Aminoantipyrin 	kompetitiv	zeitunab- hängig
Propionsäure- derivate	Oxaprozin	MAA 	kompetitiv	zeitunab- hängig
Naphthylalka- none	Nabumeton	Oxaprozin 	kompetitiv; zu- nächst langsam, danach reversibel - schwach bindend	zeitunab- hängig
	6-MNA		kompetitiv; zu- nächst langsam, danach reversibel - schwach bindend	zeitunab- hängig
Oxicame	Piroxicam	6-MNA 	zunächst langsam, danach reversibel - schwach bindend	zeitunab- hängig

Piroxicam

	Meloxicam		zunächst langsam, danach reversibel - schwach bindend	zeitunabhängig
COX-2-Inhibitoren	Celecoxib		zunächst schnelle Interaktion, dann langsamere Konformationsänderung des COX-Enzyms	zeitunabhängig
	NS-398		zunächst schnelle Interaktion, dann langsamere Konformationsänderung des COX-Enzyms	zeitunabhängig
COX-1-selektiv	SC-560		Nicht bekannt	zeitunabhängig

**Tabelle 2: Liste der verwendeten NSAIDs mit ihren Eigenschaften**

Aufgeführt sind die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten NSAIDs geordnet nach Subgruppe mit Struktur, Bindungsmechanismus am aktiven Zentrum der Cyclooxygenaseaktivität der COX-1 sowie der in der Literatur beschriebene pharmakokinetische Hemmtyp (zeitabhängig vs. zeitunabhängig). Die aufgeführten Hemmtypen wurden folgenden Quellen entnommen: (Mancini et al. 1995; Loll et al. 1995; Kulmacz 1989; Gierse et al. 1999; Kulmacz und Lands 1985; Copeland et al. 1994; Laneuville et al. 1994; Rieke et al. 1999)

### 1.2.3.2 Acetylsalicylsäure und ihre Derivate

ASS ist wohl eines der am häufigsten verschriebenen Medikamente im medizinischen Alltag. Es wirkt analgetisch, antipyretisch, antiphlogistisch und antithrombotisch und wird unter anderem in der Sekundärprävention kardiovaskulärer Ereignisse eingesetzt.

ASS ist ein kovalenter Inhibitor beider COX-Isoenzyme mit bevorzugter Hemmung der COX-1. Es bindet an den Serin-Rest des aktiven Zentrums der COX-1 in Position 530 (Loll et al. 1995), nachdem es eine schwache ionische Bindung mit Arg<sup>120</sup> eingegangen ist und somit in eine Position gebracht wird, die die Acetylierung des Enzyms ermöglicht (Simmons et al. 2004). Dies bewirkt eine sterische Hinderung der Interaktion der

ARA mit Tyr<sup>385</sup> und somit auch der Synthese der Prostaglandine (Hohlfeld et al. 2008). Da die Thrombozyten keinen Zellkern besitzen, kann die COX nicht (oder allenfalls marginal) neu synthetisiert werden. Die Thrombozyten bleiben ihr „Leben“ lang (8-11 Tage) gehemmt und können nicht mehr über die Synthese von Thromboxan aktiviert werden (andere Mechanismen der Aktivierung bzw. Aggregation werden nicht gehemmt). Erst die Neusynthese von Thrombozyten gewährleistet eine Erholung der Thrombozytenfunktion. Somit gehört ASS zu den „hit-and-run-drugs“; die intrazelluläre Wirkung am Target-Enzym bleibt trotz einer Plasmahalbwertszeit von 15 – 20 min auch nach der Elimination weiterhin bestehen.

### 1.2.3.3 Arylpropionsäurederivate (Ibuprofen, Naproxen, Flurbiprofen, Ketoprofen)

Arylpropionsäurederivate zeichnen sich dadurch aus, dass sie aus einem 2-Methylphenyllessigsäure-Gerüst bestehen und in der meta-Position (Mitte) einen aromatischen Rest besitzen (Llorens et al. 2002).

Llorens et al. haben das Bindungsverhalten der Arylpropionsäurederivate erforscht und drei verschiedene molekulare Interaktionen herausgearbeitet, die für die Affinität der Substanzen an der COX-1 verantwortlich sein könnten: Zum einen scheint sich eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem Carboxylatanteil des Liganden und dem Arg<sup>120</sup> der COX auszubilden zu können (im Falle von Ibuprofen sogar zwei Wasserstoffbrückenbindungen), sowie eine weitere mit Tyr<sup>355</sup> (Martić et al. 2004; Saxena et al. 2013)). Zum anderen scheint eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem elektronegativen Carboxyl-Sauerstoff von Ibuprofen und dem Hydroxylrest an der Seitenkette von Ser<sup>530</sup> des aktiven Zentrums der COX zu entstehen zu können. Dieser Bindungsmodus wurde bei Ibuprofen jedoch in Frage gestellt (Martić et al. 2004). Außerdem scheint der aromatische Ring der Hemmsubstanzen hydrophobisch mit einer aromatischen Tasche im aktiven Zentrum der COX, die aus Tyr<sup>385</sup>, Trp<sup>387</sup>, Phe<sup>518</sup>, Ala<sup>201</sup>, Tyr<sup>348</sup> und Leu<sup>352</sup> gebildet wird, zu interagieren (Llorens et al. 2002).

Tyr<sup>355</sup> scheint für die Stereospezifität von Arylpropionsäurederivaten wichtig zu sein. Somit verhindert es z.B. die Interaktion von R-(-)-Ibuprofen mit Arg<sup>120</sup>, während das S-Enantiomer an Arg<sup>120</sup> binden kann (Bhattacharyya et al. 1996). Da das Ibuprofenmolekül kleiner ist als z.B. Flurbiprofen, scheinen die distalen Atome des Ibuprofens nicht in die Nähe des Endes der Tasche zu gelangen und so keine van der Waals-Kräfte mit dieser

Tasche ausbilden zu können (Selinsky et al. 2001). Ob Ibuprofen tatsächlich Wasserstoffbrückenbindungen zu Serin ausbildet, ist nicht einheitlich beschrieben. Laut Hohlfeld et al. 2013 könnten hier Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Ser<sup>530</sup> bzw. Tyr<sup>385</sup> und der Carboxylgruppe entstehen und so die Bindung von ASS an das aktive Zentrum der COX-1 verhindern. Saxena et al. 2013 vermuten zwei Wasserstoffbrückenbindungen zu Arg<sup>120</sup> und eine zu Tyr<sup>355</sup>. Selinsky et al. 2001 postulieren, dass hier keine Wasserstoffbrückenbindungen entstehen. Dies könnte erklären, warum Ibuprofen mit der COX nur eine schnell reversible Bindung eingeht.

Naproxen scheint mit den Aminosäuren Tyr<sup>385</sup>, Ser<sup>530</sup> und Tyr<sup>355</sup> Wasserstoffbrückenbindungen auszubilden (Saxena et al. 2013).

Flurbiprofen nimmt durch seine Pharmakokinetik eine Sonderrolle in der Gruppe der Arylpropionsäurederivate ein: es scheint als einziges hier untersuchtes Arylpropionsäurederivat die COX-1 nach einem zeitabhängigen Hemmtyp zu hemmen, während alle anderen Vertreter dieser Gruppe einen zeitunabhängigen Hemmtyp aufweisen (Selinsky et al. 2001). Es scheint zunächst schnell reversibel und im Anschluss langsam irreversibel an die COX-1 zu binden, wobei der zweite Bindungsmechanismus ausschlaggebend für die Hemmung ist (Kulmacz 1989 (mittels Protease digestion an circular dichroism spectroscopy)).

Die Carboxylgruppe von Flurbiprofen scheint mit Arg<sup>120</sup> zu interagieren und so die Bindung zum Enzym zu ermöglichen (Bhattacharyya et al. 1996). Außerdem vermuten Bhattacharyya et al. 1996, dass für die zeitabhängige Hemmung der COX-1 durch Flurbiprofen ein langes Verweilen des Inhibitors im hydrophoben Tunnel nötig ist. Durch die längere Verweildauer sei es dem zeitabhängigen NSAID möglich, weitere Konformationsänderungen innerhalb des aktiven Zentrums zu bewirken und somit das Enzym für längere Zeit zu inhibieren. Mit der oben beschriebenen hydrophoben Tasche am aktiven Zentrum der COX könnte Flurbiprofen aufgrund seiner Länge van der Waals-Kräfte ausbilden, die für die hohe Affinität und die nur langsame Reversibilität an der COX verantwortlich sein könnten (Selinsky et al. 2001).

Llorens et al. 2002 beschreiben zwei verschiedene Bindungsmechanismen von Ketoprofen an das aktive Zentrum der COX-1, je nach Position des Hemmstoffs im hydrophoben Tunnel. Im ersten Fall komme die Carboxylgruppe von Ketoprofen bei Arg<sup>530</sup> zum Liegen und die Ketogruppe interagiere mit Tyr<sup>355</sup>. Im zweiten Fall interagiere die

Carboxylgruppe mit Arg<sup>120</sup>, der Phenylring mit der Seitentasche um Phe<sup>518</sup> und die Keto-Gruppe mit Tyr<sup>355</sup>, was eine sehr stabile Bindung zwischen Enzym und Hemmstoff zustande kommen lassen könnte. Martić et al. 2004 hingegen postulieren insgesamt fünf Wasserstoffbrückenbindungen von Ketoprofen zu Aminosäuren der COX-1: zwei zu Arg<sup>120</sup> und jeweils eine zu Tyr<sup>355</sup>, Glu<sup>524</sup> und Ser<sup>530</sup> (Docking-Studien mit Hilfe des GOLD-Programms).

#### 1.2.3.4 Arylessigsäurederivate (Diclofenac, Ketorolac)

Diclofenac und Ketorolac inhibieren nicht-selektiv die COX-1 und 2. Das Diclofenac-Molekül besteht aus einem 2-Aminophenylelessigsäuregerüst und zwei aromatischen Ringen. Einer der beiden aromatischen Ringe des Moleküls besitzt zwei Chlorid-Substituenten und die beiden aromatischen Ringe sind durch eine Aminogruppe verbunden. Mit Hilfe von Docking-Studien und dem Programm „AMBER“ konnten Llorens et al. 2002 unter anderem den Bindungsmechanismus von Diclofenac an die COX-1 untersuchen. Hierbei scheint Ser<sup>530</sup> im aktiven Zentrum der COX eine entscheidende Rolle zu spielen. Offensichtlich interagiert Diclofenac auf zwei verschiedene Weisen mit den beiden Resten Ser<sup>530</sup> und Tyr<sup>385</sup>, die beide eine Hemmung des Enzyms bewirken (Llorens et al. 2002). Zum einen scheint der Dichlorophenylring in der Lage zu sein, in den hydrophoben Tunnel der COX zu diffundieren und das Enzym auf diese Art und Weise zu hemmen, zum anderen scheint der Dichlorophenylring aber auch in eine aromatische Tasche zwischen Tyr<sup>385</sup>, Trp<sup>387</sup> und Leu<sup>352</sup> zu passen. Beides bewirkt eine Hemmung der COX-Isoformen (Llorens et al. 2002). Allerdings scheint es zu keiner festen Bindung zwischen den Aminosäuren und Diclofenac zu kommen (Llorens et al. 2002). Laut Pouplana et al. 1999 scheint die Carboxylgruppe von Diclofenac zudem mit Tyr<sup>355</sup> des aktiven Zentrums eine Wasserstoffbrückenbindung auszubilden. Demnach würden sich die Bindungsstellen von Diclofenac und ASS überlappen.

Saxena et al. 2013 vermuten, dass sich keinerlei Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Diclofenac bzw. Ketorolac und dem aktiven Zentrum bilden.

#### 1.2.3.5 Indolessigsäurederivate (Indometazin, O-Desmethyl-Indometazin)

Indometazin und O-Desmethyl-Indometazin zählen zu den nicht-selektiven zeitabhängigen COX-Inhibitoren (Kulmacz 1989). Sie bestehen aus einem 1-H-Indol-3-Essigsäuregerüst, das einen *p*-Chlorobenzylsubstituenten in Position 1 aufweist, eine Methyl- und eine Carboxylgruppe in Position 2 bzw. 3 und eine Methoxygruppe (Indometazin) bzw.

einen Sauerstoffrest (O-Desmethyl-Indometazin) in Position 5 besitzt. Llorens et al. haben das Bindungsverhalten von Indometazin an die COX-1 untersucht. Demnach scheint das Indophenylgerüst des Indometazins am Ende des hydrophoben Tunnels des aktiven Zentrums der COX-1 in die aromatische Tasche in der Gegend um das Tyr<sup>385</sup> zu binden, während die Carboxylgruppe in der Nähe von Arg<sup>120</sup> bindet und sich die Ketogruppe Richtung Ser<sup>530</sup> ausrichtet, mit dieser aber keine direkte Bindung eingeht (Llorens et al. 2002; Loll et al. 1996). Dies scheint sowohl in der cis- als auch in der trans-Konformation möglich zu sein, wobei die cis-Konformation eine höhere Affinität zum Enzym aufweist (Llorens et al. 2002; Loll et al. 1996). Allerdings ist es laut Loll, Picot et al. in der trans-Formation zusätzlich möglich, dass die Carboxylgruppe sowohl an Arg<sup>120</sup> als auch an Tyr<sup>355</sup> binden kann (Loll et al. 1996). Somit scheint aber insgesamt keine Wasserstoffbrückenbindung zwischen der Carboxylgruppe und Ser<sup>530</sup> stattzufinden (Llorens et al. 2002).

#### 1.2.3.6 Anthranilsäurederivate (Meclofenamat, Flufenamat, Mefenamat)

Fenamate bestehen aus einer 2-Aminobenzoessäure (oder auch Anthranilsäure) und einem aromatischen Ring in ortho-Position, der in Position 2 und 6 zwei Chloridionen und in Position 3 eine Methylgruppe (Meclofenamat) (Krishna Murthy und Vijayan 1981) bzw. in Position 2 und 3 jeweils eine Methylgruppe (Mefenamat) oder in Position 5 eine Triflouromethylgruppe (Flufenamat) besitzt. Dockt die 2-Aminobenzoessäure des Meclofenamats an eine Region in der Nähe von Ser<sup>530</sup> und Tyr<sup>385</sup> der COX-1 an, bildet sich eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem Stickstoff und dem Carbonylsauerstoff des Inhibitors aus und stabilisiert so die Carboxylgruppe des Liganden im aktiven Zentrum des Enzyms (Llorens et al. 2002). Allerdings scheint keine Wasserstoffbrückenbindung zwischen Ser<sup>530</sup> und dem Liganden zu entstehen (Llorens et al. 2002). Vielmehr bindet Meclofenamat in zwei Schritten an die Region um Arg<sup>253</sup>. Bezüglich der Frage, ob die Carboxylgruppe von Meclofenamat eine Bindung zu Arg<sup>120</sup> eingeht, sind sich die Autoren verschiedener Studien nicht einig. Laut Llorens et al. 2002 entstehe keine direkte Bindung zwischen Carboxylat und Arg<sup>120</sup>, wohingegen Gierse et al. 1999 hier eine ionische Bindung postulieren.

Mefenamat scheint auf molekularer Ebene trotz Carboxylgruppe keine ionische Bindung mit Arg<sup>120</sup> eingehen zu können, da es sich zu weit entfernt hiervon im hydrophoben Tunnel befindet. Stattdessen scheint es mit seiner Struktur den hydrophoben Tunnel so auszufüllen, dass es für ASS nicht mehr möglich ist, an das aktive Zentrum zu gelangen

(Gierse et al. 1999). Anscheinend müssen außerdem beide COX-Untereinheiten gleichzeitig Mefenamat-Moleküle gebunden haben, um die Umsetzung von ARA durch die COX zu verhindern (Prusakiewicz et al. 2009).

Die Carboxylgruppe von Flufenamat scheint mit Tyr<sup>385</sup> und Ser<sup>530</sup> Wasserstoffbrückenbindungen auszubilden (Saxena et al. 2013).

Meclofenamat ist einer der zeitabhängigen Inhibitoren der COX-1 während die mit ihm strukturell verwandeten Substanzen Mefenamat und Flufenamat (zeitunabhängige) kompetitive Inhibitoren der Substratbindung sind (Pouplana et al. 1999).

### 1.2.3.7 Pyrazolderivate (4-Aminoantipyrin, Methylaminoantipyrin (MAA))

4-Aminoantipyrin und 4-Methylaminoantipyrin (MAA) sind Metabolite des klinisch häufig eingesetzten Metamizols (Handelsname u.a. Novalgin). MAA bildet den pharmakologisch aktiven Metaboliten, während 4-Aminoantipyrin einen weniger großen pharmakologischen Effekt zeigt (Vlahov et al. 1990; Levy et al. 1995).

Zum Bindungsmechanismus des MAA an die COX-1 lässt sich sagen, dass es vermutlich eine starke Bindung mit dem Ser<sup>530</sup> des aktiven Zentrums der COX eingeht (Hohlfeld et al. 2008). Befinden sich der Phenyl-Ring und die Methylgruppen des Pyrazols im Tunnel des aktiven Zentrums der COX, kann sich eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen Ser<sup>530</sup> und der Carbonylgruppe des MAAs ausbilden. Da MAA den hydrophoben Tunnel des aktiven Zentrums zu einem großen Teil ausfüllt, werden außerdem weitere Bindungsstellen wie Tyr<sup>355</sup> und Arg<sup>120</sup> blockiert (Hohlfeld et al. 2008). Eine andere Hypothese (Pierre et al. 2007) besagt, dass MAA und 4-Aminoantipyrin unabhängig vom aktiven Zentrum die COX auch über einen gänzlich anderen Mechanismus hemmen könnten. Demnach könnten beide Metabolite die Initiation und/oder den Prozess der katalytischen Umsetzung von ARA zu PGG<sub>2</sub> in der Cyclooxygenaseaktivität der COX mittels Reduktion des oxidativen Status verhindern. Nach dieser Theorie bindet MAA an das Fe<sup>3+</sup> des Häm-Moleküls der Cyclooxygenaseaktivität, wodurch eine Bindung zwischen der 4-Aminogruppe des Metamizol-Metaboliten und des Eisens entsteht. Daraufhin wird durch Oxidation durch das Fe<sup>3+</sup> ein MAA-Radikal gebildet. So kann das MAA-Radikal mit dem Peroxid des aktiven Zentrums einen Komplex bilden und dadurch die Bildung des für die Oxidation der ARA zu PGG<sub>2</sub> notwendigen Tyrosyl-Radikals verhindern (Pierre et al. 2007).

Allerdings spricht die Beobachtung, dass Dipyrone-Metaboliten mit ASS an der COX-1 interagieren, für die Hypothese, dass diese zur Inhibition der COX an das aktive Zentrum binden müssten um dort mit ASS um die Bindung zu konkurrieren (Hohlfeld et al. 2008).

#### 1.2.3.8 Propionsäurederivate (Oxaprozin)

Oxaprozin (4,5-Diphenyl-2-Oxalepropionsäure) gehört zur ersten Generation klassischer saurer NSAIDs und gilt damit als nicht-selektiver COX-Inhibitor (Kean 2004). Auch der Bindungsmodus von Oxaprozin ähnelt denen der anderen klassischen NSAIDs: seine Carboxylgruppe geht eine Wasserstoffbrückenbindung mit Tyr<sup>385</sup> und Ser<sup>530</sup> ein und verhindert so die Umsetzung von ARA zu PGG<sub>2</sub> (Saxena et al. 2013).

#### 1.2.3.9 Naphthylalkanone (Nabumeton und 6-Methoxy-2-naphthylelessigsäure (6-MNA))

6-MNA (6-Methoxy-2-Naphthylelessigsäure) ist der pharmakologisch aktive Metabolit des nicht-sauren NSAIDs Nabumeton. Beide hemmen sowohl die COX-1 als auch die COX-2, allerdings mit leichter Selektivität gegenüber der COX-2 (Blower 1992; Emery et al. 1992). Der Hemmstoff Nabumeton gilt zwar als Prodrug, allerdings fungiert auch er als schwacher Inhibitor der COX-1 (Melarange und Rashbrook 1987), während der in der Leber konvertierte aktive Metabolit 6-MNA als potenter Inhibitor gilt (Haddock et al. 1984; Hedner et al. 2004). Er hemmt die COX-1 dosisabhängig (Cipollone et al. 1995). Nähere Angaben zur molekularen Interaktion mit COX-Enzymen finden sich in der Literatur allerdings nicht. 6-MNA müsste nach Versuchen im eigenen Labor zu den zeitunabhängigen NSAIDs gerechnet werden.

Laut Friedel et al. 1993 scheint es keine Interaktion zwischen Nabumeton und ASS zu geben.

Die Zuordnung zu einer Hemmtypklasse von NSAIDs ergab für die Inhibition der COX-1 durch 6-MNA einen gemischten Hemmtyp: zunächst zeitabhängig und in einem nächsten Schritt zu einem asymptotischen Enzymaktivitätsverlust der COX, was am ehesten mit einer reversiblen Inhibition zu vereinbaren ist (Gierse et al. 1999).

#### 1.2.3.10 Oxicame (Piroxicam, Meloxicam)

Oxicame gehören zu den COX-2-selektiven Inhibitoren, die allerdings auch eine schwache Affinität zur COX-1 aufweisen. Meloxicam z.B. hemmt die COX-2 drei bis 300-mal

effektiver als die COX-1 (Gierse et al. 1999; Engelhardt et al. 1996; Patrignani et al. 1997; Pairet und van Ryn 1998).

Im Gegensatz zu klassischen sauren NSAIDs besitzen die Oxicame, wie auch die Coxibe und 6-MNA, keine Carboxylgruppe, mit deren Hilfe sie an Arg<sup>120</sup> oder andere elektronegative Aminosäure-Seitenketten im hydrophoben Kanal der COX-1 binden könnten (Xu et al. 2014b; Xu et al. 2014a).

Oxicame bestehen aus einem Benzothiazin als Grundgerüst und einem angehängten Carbonsäureamid (Xu et al. 2014a).

Bei der Interaktion des Meloxicams mit der COX-1 entsteht jedoch eine intramolekulare Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem Stickstoffatom des Carbonsäureamids und der 4-Hydroxyl-Gruppe des Benzothiazins (Xu et al. 2014b). Die 4-Hydroxyl-Gruppe kann nun über eine weitere Wasserstoffbrückenbindung an das Ser<sup>530</sup> der COX binden. Verschiedene hydrophobe Bindungen zwischen Oxicam und COX stabilisieren den Enzym-Inhibitor-Komplex. Hinzu kommen zwei polare Bindungen: zum einen zwischen dem Benzothiazinring des Oxicams und Tyr<sup>355</sup> sowie Arg<sup>120</sup> des Tunnels des aktiven Zentrums der COX, zum anderen entsteht eine Bindung zwischen Tyr<sup>385</sup> und Ser<sup>530</sup> der COX und dem Stickstoff des Carbonsäureamid-Substituenten (Xu et al. 2014b; Saxena et al. 2013). Einen anderen zusätzlichen Bindungsmechanismus der Oxicame an die COX, der bei sonst keiner anderen Strukturgruppe von NSAIDs beschrieben ist, haben Xu et al. identifiziert. In einer Bindung mit einem Oxicam scheint die Seitenkette des Leu<sup>531</sup> des aktiven Zentrums der COX durch die Bildung des Enzym-Inhibitor-Komplexes eine andere Position einzunehmen. So öffnete sich eine neue hydrophobe Tasche innerhalb des Tunnels des aktiven Zentrums des Enzyms, die möglicherweise für die Interaktion mit dem Enzym von Bedeutung ist (Xu et al. 2014a). Wegen seiner bekannten Kreuzreaktivität zur COX-1 wurde als Vertreter der Oxicame Meloxicam ausgewählt.

#### 1.2.3.11 COX-2-Inhibitoren: Coxibe (Celecoxib) sowie NS-398

Nachdem die COX-2 entdeckt wurde und sich zeigte, dass diese Isoform des Enzyms fakultativ als Antwort auf Gewebsverletzungen und Entzündungen exprimiert wird, befassten sich viele Arbeitsgruppen mit der weiteren Charakterisierung dieses Enzyms und der Suche nach selektiven Inhibitoren der COX-2 (Young et al. 1996; Kalgutkar et al. 2000; Xie et al. 1991; Song et al. 1997).

Die daraufhin entwickelten Inhibitoren wie Celecoxib, Rofecoxib, Meloxicam, Nimesulid und NS-398 gelten als COX-2-„selektiv“, da sie dieses Isoenzym zunächst potent kompetitiv inhibieren und es in einem nächsten Schritt zeitabhängig inaktivieren können. Allerdings sind diese Substanzen zusätzlich auch weniger potente, kompetitive, zeitunabhängige Inhibitoren der COX-1 (Copeland et al. 1994; Gierse et al. 1999). Für Untersuchungen zum Mechanismus der Inhibition der COX-1 eignen sich diese Substanzen daher ebenfalls.

Der Bindungsmechanismus der Coxibe an die COX-1 unterscheidet sich von dem der klassischen NSAIDs: Coxibe enthalten keine Carboxylgruppe und haben in dieser Hinsicht eine Gemeinsamkeit mit den Oxicamen (Xu et al. 2014b).

Sie scheinen außerdem nur an das aktive Zentrum eines Monomers der COX-1 zu binden und nicht, wie die meisten anderen NSAIDs, an beide Monomere (Prusakiewicz et al. 2009; Rimon et al. 2010). Bindet ein COX-2-Inhibitor an das aktive Zentrum eines der Monomere der COX-1 scheint das Ile<sup>523</sup> der COX mit dem Benzolring des Coxibs zu interagieren. Die Seitenketten des aktiven Zentrums würden räumlich anders positioniert und scheinen so Platz für das Molekül zu schaffen. Die Trifluoromethylgruppe des Pyrazolrings von Celecoxib interagiert mit Tyr<sup>533</sup> und nicht mit Arg<sup>120</sup> (Rimon et al. 2010). Außerdem scheinen sich Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Celecoxib und Tyr<sup>355</sup>, Ile<sup>517</sup> und Ser<sup>516</sup> auszubilden (Saxena et al. 2013).

Ob Coxibe und Oxicame tatsächlich mit ASS interagieren wird kontrovers diskutiert. Es gäbe eine Interaktion postulieren (Rimon et al. 2010); wohingegen laut Wilner et al. 2002; van Ryn et al. 2004; Gladding et al. 2008 keine Interaktion zu beobachten sei.

Wegen der bekannten COX-1-Kreuzreaktion wurden repräsentativ für die Versuche im Rahmen dieser Arbeit die Coxibe Celecoxib sowie NS-398 (eine bisher nur für Forschungszwecke verwendete Substanz) ausgewählt. NS-398 hemmt die COX-2 zeitabhängig, während es als Inhibitor der COX-1 zur zeitunabhängigen Hemmstoff-Gruppe zu zählen ist (Copeland et al. 1994; Ouellet und Percival 1995).

#### 1.2.3.12 COX-1 selektiver Inhibitor SC-560

SC-560 gehört zur Gruppe der Diaryl-Heterozyklen, zu der auch die Coxibe zählen. Nichtsdestotrotz ist SC-560 ein hoch selektiver COX-1-Inhibitor, während die Coxibe unterschiedlich selektive COX-2-Hemmer sind (Smith et al. 1998). Untersuchungen zur

molekularen Interaktion und zur Struktur eines Komplexes aus COX-1 und SC-560 finden sich in der Literatur bisher leider nicht.

Es lässt sich feststellen, dass die Wechselwirkungen zwischen der COX-1 und den verschiedenen Inhibitoren bisher keineswegs abschließend verstanden und geklärt sind. Außerdem finden sich in der Literatur teilweise widersprüchliche Theorien zu den Bindungsmechanismen der einzelnen Substanzen an das COX-Enzym.

### 1.3 Ziele der Arbeit

Bisher konnten von verschiedenen Arbeitsgruppen einige Interaktionen von NSAIDs mit ASS an der thrombozytären COX-1 beobachtet werden. So haben z.B. Anzellotti et al. 2011; Capone et al. 2005; Catella-Lawson et al. 2001; Gengo et al. 2008; Gladding et al. 2008; Goltsov et al. 2009; Hohlfeld et al. 2008; Grottemeyer et al. 1993; Livio et al. 1982; Rimon et al. 2010; Saxena et al. 2013 diese Interaktion einiger NSAIDs teils in vitro, teils in vivo untersucht. Sie konnten bestätigen, dass unter anderem Celecoxib, Metamizol, Ibuprofen, Flufenamat, Naproxen, Nimesulid, Oxaprozin, und Piroxicam signifikant mit ASS interagieren, während sich bei Diclofenac und Ketorolac keine Interaktion beobachten lässt.

Aufgrund dieser Beobachtungen (sowohl in experimentellen Studien als auch in der klinischen Praxis (Catella-Lawson et al. 2001; Schuijt et al. 2009)) stellt sich nun die pharmakologisch wichtige Frage, ob die Interaktion mit ASS an der COX-1 der Thrombozyten einen „Klasseneffekt“ der NSAIDs darstellt oder ob sich die interagierenden NSAIDs in ihren pharmakologischen Eigenschaften von den nicht interagierenden NSAIDs unterscheiden. Da die Wechselwirkungen der Substanzen mit dem Enzym sehr komplex, teils widersprüchlich und keineswegs verstanden sind (s. Abschnitt 1.2.3), untersucht diese Dissertation, ob sich ein Zusammenhang zwischen der Hemmkinetik der verschiedenen Substanzen und deren Interaktion mit ASS an der thrombozytären COX-1 beobachten lässt.

Aufgrund von Vorarbeiten der eigenen Arbeitsgruppe mit verschiedenen NSAID-Substanzen entstand die Arbeitshypothese, dass schnell wirksame NSAIDs eher mit ASS an der COX-1 interagieren als solche NSAIDs, die die COX-1 zeitabhängig inhibieren. Insofern sollte im Rahmen der vorliegenden Dissertation die Hypothese einer Korrelation zwischen Inhibitions geschwindigkeit möglichst vieler NSAID-Substanzen und deren Interaktion mit ASS an der COX-1 geprüft werden. Auf Basis dieser Hypothese ergeben sich folgende Fragestellungen:

1. Welche unterschiedlichen Hemmtypen an der humanen thrombozytären COX-1 lassen sich unterscheiden?
2. Ist der in der Literatur (oft tierexperimentell) beschriebene „Hemmtyp“ relevant für die Inhibitions­geschwindigkeit an der humanen thrombozytären Cyclooxygenase?
3. Die Arbeitshypothese besagt, dass schnell wirksame (= zeitunabhängige) NSAIDs die Thrombozytenfunktionshemmung durch ASS stören, während langsam wirksame (= zeitabhängige) NSAIDs keinen Einfluss auf die Aggregationshemmung der Thrombozyten durch ASS aufweisen. Lässt sich diese Hypothese durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stützen?
4. Gibt es einen Zusammenhang zwischen bekannten pharmakodynamischen Eigenschaften, insbesondere der Potenz der Hemmung der COX-1 (ausgedrückt durch die  $IC_{50}$ ) und der Zeitkinetik der Hemmung?

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Substanzen und Lösungen

4-Aminoantipyrin A4382	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
5-Aminosalicylsäure A3537	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
6-Methoxy-2-Naphthylelessigsäure (6-MNA) 70620	Cayman, Ann Arbor, Michigan, USA
Antipyrin 90567	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Aspisol (Acetylsalicylsäure)	Bayer, Leverkusen, Deutschland
Arachidonsäure AA10	Oxford Biomedical Research, Rochester Hills, USA
Celecoxib PZ0008	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Diclofenac D-6889	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
EDTA Titriplex III 108418	Merck, Darmstadt, Deutschland
Flufenamat	Universität Düsseldorf, Deutschland, Institut für medizinische und pharmazeutische Chemie, Prof. Weber
Flurbiprofen F8514	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Hematin H-3281	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Ibuprofen S-(+)	Dulorgiet, Bonn, Deutschland
Ibuprofen R-(-)	Dulorgiet, Bonn, Deutschland
Indometazin I7378	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Ketoprofen 471909	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Ketorolac K1136	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Meclofenamat M4513	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Mefenamat M-4267	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Meloxicam M3935	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Methylaminoantipyrin	Universität Düsseldorf, Deutschland, Institut für medizinische und pharmazeutische Chemie, Prof. Weber
Nabumeton N6142	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Naproxen M1275	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Nimesulid N1016-1G	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
NS-398 N194	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
O-Desmethyl-Indometazin SC-212449	Santa Cruz Biotechnology, Dalls, Texas, USA
Oxaprozin 09637	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
PGE <sub>1</sub> 13010.1	Cayman, Ann Arbor, Michigan, USA

Phenazon	Universität Düsseldorf, Deutschland, Institut für medizinische und pharmazeutische Chemie, Prof. Weber
Phenol P-4161	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Piroxicam P5654	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
PMSF P-7626	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Propyphenazon PHR1389-1G	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
SC-560 70340	Cayman, Ann Arbor, Michigan, USA
Thromboxane B <sub>2</sub> EIA Kit	Cayman, Ann Arbor, Michigan, USA
Tris	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe, Deutschland

### 2.1.1.1 Auflistung der verwendeten NSAIDs

Die Konzentrationen der Stammlösungen betragen 100 mM.

<b>Substanz</b>	<b>Firma</b>	<b>Best.-Nr.</b>	<b>Menge</b>	<b>MG [g/mol]</b>	<b>Lagerung</b>	<b>Löslichkeit</b>
4-Aminoantipyrin	Prof. Weber			245,28	4-8 °C	100 mM in DMSO
Acetylsalicylsäure	Bayer	HHU-Apotheke	0,5 g/1 g	180	4-8 °C	100 mM in MilliQ
Celecoxib	Pfizer			381,37	RT	100 mM in DMSO
Diclofenac	Sigma	D-6889	10 g	318,1	RT	100 mM in EtOH: Lagerung bei -20 °C
Flurbiprofen	Sigma	F-8514	1 g	244,3	RT	100 mM in DMSO
Flufenamat	Prof. Weber			281,2	4-8° C	200 mM in DMSO
Indometazin	Sigma	I-7378	5 g	357,8	2-8 °C	100 mM in EtOH
S-(+)-Ibuprofen	Sigma	58653	1 g	206,28	RT	100 mM in DMSO
S-(+)-Ketoprofen	Aldrich	471909	1 g	254,26	2-8 °C	100 mM in EtOH oder DMSO
Ketorolac	Sigma	K1136	1 g	376,4	RT	100 mM (bis zu 15 mg/ml wasserlöslich)
Meclofenamat	Sigma	M4531	1 g	318,13	RT	10 mM; in MilliQ-H <sub>2</sub> O, täglich frisch
Meloxicam	Sigma	M3935	100 mg	351,403	RT	100 mM in DMSO
Methylaminoantipyrin	Prof. Weber			217,3	4-8 °C	100 mM in DMSO
Mefenamat	Prof. Weber			241,3	4-8 °C	200 mM in DMSO
6-MNA	Cayman	70620	10 mg	216,2	22°C	100 mM in DMSO

Naproxen	Sigma	N-1275	5 g	252,2	RT	10 mM in Puffer löslich, höhere Konz. in DMSO
Nimesulid	Sigma	N1016	1 g	308,31	2-8 °C	200 mM in DMSO, ab 1 mM in Puffer löslich
Nabumeton	Sigma	N6142	5 g	228,29	RT	Stlsg. 100 mM in DMSO, 1 Monat stabil bei -20 °C
NS-398	Sigma	N194	5 mg	314,36	RT	5 mg/ml in DMSO löslich, wasserunlöslich!
O-Desmethyl-Indometazin	Santa Cruz	sc-212449	10 mg	343,76	-20 °C	100 mM in DMSO
Oxaprozin	Sigma	O9637	5 mg	293,32	RT	Stlsg. 100 mM gelöst in DMSO, alle weiteren Verdünnungen in DMSO
Piroxicam						60,4 mM fertige Lösung
SC-560	Cayman			352,7	-20 °C	100 mM in EtOH

## 2.1.2 Geräte

Aggregometer:	Labor APACT Labor Biomedical Technologies, Ahrensburg, Deutschland
Chemiluminometer: MiniLumat LB 9506,	EG & G Berthold, Berthold Technologies, Bad Wildbad, Deutschland
CryoPure Gefäß 1,6 ml violett	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Falcon-Röhrchen	Greiner, Kremsmünster, Österreich
Combitips Eppendorf (50-100-200µl)	Eppendorf, Wesseling, Deutschland Heraeus
Minifuge RF	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
Horizontal-Rüttler 3005	GFL Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel, Deutschland
Mikroküvetten und Mixer (Dispo-System Micro 1.5)	Labor Biomedical Technologies, Ahrensburg, Deutschland
Muliskan Photometer	Thermo Fisher Scientific, Schweiz
Multistepper Eppendorf	Eppendorf, Wesseling, Deutschland
pH-Meter: pH211 Microprocessor pH Meter,	HANNA Instruments, Vöhringen, Deutschland
Pipetten: Gilson Pipetman variable, 10 µl, 200 µl, 1000 µl	Gilson, Limburg-Offheim, Deutschland
Polycarbonate-Röhrchen 25 x 89 mm, 26,3 ml	Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland
10 ml Rundboden-PP-Reagenzröhrchen	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Tischzentrifuge: Eppendorf Centrifuge 5415 R	Eppendorf, Wesseling, Deutschland
Thromboxan B2 EIA-Kit,	Biomol GmbH, Bestellnummer 0408532600 (96 strip well bzw 4x 96 strip well (480) Cayman Chemical, Michigan, USA
Ultraschallstab: Cell Disruptor B15, Branson Sonifier	Emerson, St. Louis, USA
Ultrazentrifuge: Beckman-UZ, 50.2 TI	Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland
Schreiber: Packard model 621; Vorschub: 3 cm/min,	Packard, tipp and zone, Niederlande
50 ml-Spritze (Original Perfusor Syringe 50 ml)	B. Braun Medical AG, Sempach, Deutschland
Spritzflasche mit Multiaufsatz (8fach)	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
8-Kanal-Pipettiereinheit für QuikSip BT-Aspirator	Brand, Wertheim, Deutschland

Waage: Mettler Toledo (Einwaagen)	Mettler Toledo, Gießen, Deutschland
Waage: Sartorius Extend (Präparation)	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Wortex: Heidolph REAX 2000 Wortex	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Zentrifuge: Heraeus Minifuge RF	Heraeus, Hanau, Deutschland
Zentrifuge: Sorvall, SM-24 (TVA)	Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland

### 2.1.3 Blutgewinnung

Zur Durchführung der Thrombozytenaggregometrie wird plättchenreiches (PRP) und plättchenarmes (PAP) Plasma benötigt. Dieses wurde aus einer ACD-Vollblutentnahme von 40 ml bis 50 ml in einer 50-ml-Spritze (Original Perfusor Syringe 50 ml von Braun) von gesunden Probanden gewonnen. Hierbei wurde darauf geachtet, dass die Probanden in den letzten sieben Tagen keine NSAIDs oder andere, die Thrombozytenaktivität beeinflussende Medikamente genommen hatten. Außerdem sollten zwischen einer zweimaligen Spende eines Probanden für den gleichen Versuch mindestens zwei Wochen liegen, um zu garantieren, dass die Thrombozyten zwischen den beiden Spenden vom Körper ausgetauscht und erneuert wurden.

### 2.1.4 Plasmagewinnung

Das entnommene ACD-Blut wurde in 15-ml-Falcon-Röhrchen umgefüllt (5 ml Blut je Röhrchen) und bei 1200 rpm 10 min bei Raumtemperatur (RT) zentrifugiert, um PRP zu gewinnen (ca. 270 xg, Heraeus Minifuge RF). Das PRP, das sich abgesetzt hat, wurde abgehoben und in ein weiteres Falcon-Röhrchen (15 ml) überführt. Das verbliebene ACD-Vollblut wurde anschließend erneut bei 3000 rpm 10 min bei RT zentrifugiert (1600 xg, Heraeus Minifuge RF), um aus der Probe zusätzlich PAP zu extrahieren. Auch dieses wurde abgehoben und in ein 15-ml-Falcon-Röhrchen überführt.

### 2.1.5 Herstellung von Thrombozytenmikrosomen

Thrombozytenmikrosomen sind kleine Membranfragmente der Thrombozyten, die die thrombozytäre COX-1 enthalten. Sie wurden aus abgelaufenen Thrombozytenkonserven gewonnen, die uns großzügigerweise von PD Dr. Amin Polzin zur Verfügung gestellt wurden.

Zur Herstellung der Mikrosomen mussten die Konserven zu Beginn 30 min ruhen, bevor sie auf mit Stickstoff gefüllte 15-ml-Falcon-Röhrchen aufgeteilt (je 20 ml) und mit 4 µl 1 mM PGE<sub>1</sub> (Endkonzentration 50 nM) gemischt wurden. Anschließend wurden sie

10 min bei 2400 rpm (ca. 1082 xg, Heraeus Minifuge RF) bei RT sedimentiert, dann jedes Pellet mit 1 ml Puffer 1 resuspendiert und auf jeweils 10 ml mit Puffer 1 aufgefüllt. Danach wurde das Volumen auf je zwei 15-ml-Falcon-Röhrchen (stickstoffgefüllt) zu je 5 ml aufgeteilt. Alle Röhrchen wurden dreimal eingefroren (ca. 45 bis 90 min in Aceton bei -20 °C) und zweimal aufgetaut (ca. 15 bis 20 min in Wasser bei RT). Die Zwischenlagerung erfolgte über Nacht bei -80 °C.

Am nächsten Tag wurde die Thrombozytensuspension erneut aufgetaut, der Inhalt jedes Falcon-Röhrchens in ein mit Stickstoff gefülltes 10 ml Rundboden-PP-Reagenzröhrchen (Sarstedt aus Nümbrecht, REF 55.518) umgefüllt und anschließend 3 x 10 s mit einem Ultraschallstab (Branson Sonifier, Cell Disruptor B15) bei maximaler Leistung homogenisiert. Das Resultat ist eine durchsichtige, leicht trübe, opalescente Lösung. Die Falcon-Röhrchen wurden nun mit Puffer 1 auf ca. 10 ml aufgefüllt und mit Hilfe einer Waage (Sartorius Extend) austariert, damit die Suspension anschließend 15 min mit 12600 rpm bei 4 °C zentrifugiert werden konnte (15000 xg, Sorvall, SM-24).

Nun wurden die Überstände von je zwei 10-ml-Röhrchen in ein stickstoffgefülltes Ultrazentrifugen-Röhrchen überfüllt (Polycarbonate-Röhrchen von Beckmann, 25 mm x 89 mm, 26,3 ml, Nr. 355618), mit Puffer 1 auf ca. 20 ml aufgefüllt, genau austariert und 100 min bei 28800 rpm bei 4 °C zentrifugiert (100000 xg, Beckmann-UZ, 50.2 TI). Anschließend wurden die Überstände abgesaugt und jeweils drei Pellets in einem stickstoffgefüllten Potter mit 3 ml Puffer 2 homogenisiert. Sobald alle Pellets homogenisiert waren, wurde die Mikrosomensuspension mit Puffer 2 auf ca. 25 ml aufgefüllt, gemischt, im Anschluss zu je 250 µl in E'Cups (Sarstedt: CryoPure Gefäß 1,6 ml violett, REF: 72.380.007) aliquotiert und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und konnten so auch gelagert werden. Hierdurch zeigten sie sich bis zu drei Wochen stabil und konnten für die Messungen verwendet werden.

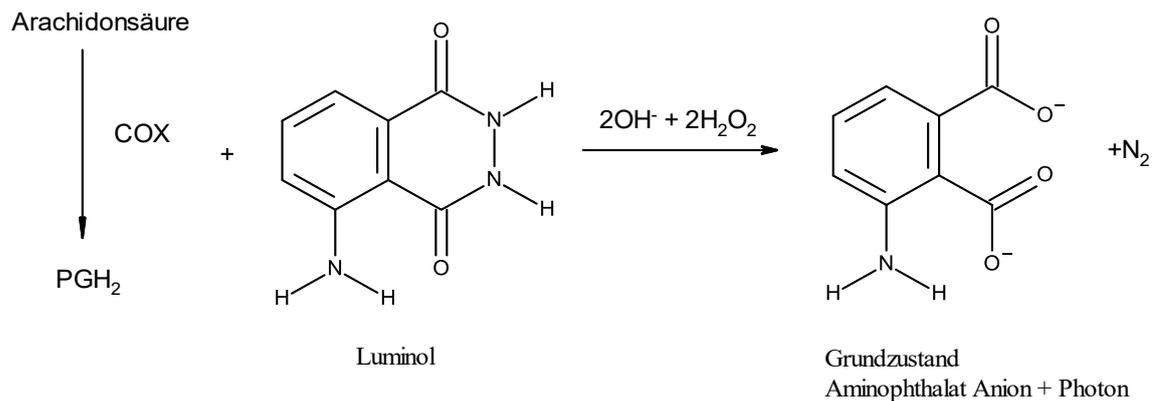
## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Chemilumineszenz

#### 2.2.1.1 Prinzip der Messung der COX-Aktivität mittels Chemilumineszenz

Die COX-1 befindet sich auf den Membranen der Thrombozyten, die durch die Präparation der Thrombozytenmikrosomen freigelegt werden. Für ihre Peroxydase-Aktivität braucht die COX ein Ko-Substrat, das während der Reaktion reduziert wird. Als Ko-Sub-

strat dient bei der Messmethode der Chemilumineszenz Luminol, welches bei der Reaktion aktiviert wird und so zu Lichtemission führt. Des Weiteren wird Häm (im Tris-Puffer enthalten) für die Reaktion benötigt. Das Chemiluminometer misst die entstandene Lichtemission mit hoher Empfindlichkeit und erlaubt so die Bestimmung der Aktivität der Peroxydase der COX. Die Aktivierung der Reaktion erfolgt durch Zugabe von Arachidonsäure (Substrat der COX), die innerhalb von Sekunden umgesetzt wird.



**Abb. 5: Prinzip der Chemilumineszenz mit Luminol**

Luminol dient als Ko-Substrat für die Peroxydase-Aktivität der COX-1 und wird durch die stattfindende Reaktion aktiviert. Die dabei entstehende Lichtemission wird mittels eines Photomultipliers gemessen und quantifiziert.

### 2.2.1.2 Durchführung

Die Chemilumineszenz wurde mit den vorher präparierten Thrombozytenmikrosomen durchgeführt. Sie erlaubt genaue Messungen direkt an der frei liegenden COX-1 selbst.

Zu Beginn jeder Messung wurde ein „Mix“ aus der frisch aufgetauten Mikrosomensuspension mit 5 µl Luminol / 50 µl Ansatz hergestellt. Dann wurden 40 µl aus dem Mix in jeweils ein Mess-Röhrchen pipettiert und 20 min bei RT inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden 5 µl NSAID-Lösung (in logarithmisch aufsteigender Verdünnungsreihe) hinzugefügt und weitere 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die COX-Reaktion mit 5 µl ARA (25 µM EK) aktiviert und die entstehende Chemilumineszenz mit Hilfe des Chemiluminometer Lumat LB9506 von Berthold in [RLU (relative light units)] gemessen. Die RLU sollten in der Kontrolle zu Beginn jeder Messung um die 200.000 – 350.000 liegen, um sicher zu gehen, dass die Mikrosomen noch intakt sind und die Messungen ein valides vergleichbares Ergebnis liefern. Werte ab 100.000 RLU bis 400.000 RLU wurden

toleriert, da sich die Thrombozytenmikrosomen je nach Alter und Spender unterschiedlich verhalten und es somit nicht immer möglich war, Werte von 200.000 RLU bzw. knapp darüber oder darunter zu erzielen.

### 2.2.1.3 Konzentrations-Wirkungs-Kurven mit der Chemilumineszenz

Wie auch bei der Aggregation wurden bei der Chemilumineszenz Konzentrations-Wirkungs-Kurven (KWKs) erstellt, indem vor dem Versuchsbeginn eine logarithmische Verdünnungsreihe des jeweils zu untersuchenden NSAIDs erstellt wurde. Um ein möglichst valides Ergebnis zu bekommen, wurden die Versuche zu jeder Konzentration des NSAIDs mit mindestens  $n = 5$  durchgeführt.

### 2.2.1.4 Zeitkinetik in der Chemilumineszenz

Die Zeitkinetiken der einzelnen NSAIDs bauen auf die zuvor ermittelten KWKs auf. Es wurde die Konzentration genutzt, die vorher in der KWK eine ca. 80 %ige Hemmung der COX verursachte. Mit dieser Konzentration wurden nun Versuche im selben Versuchsaufbau wie oben beschrieben durchgeführt, nur wurde die Inkubationszeit des NSAIDs mit dem „Mikrosomen-Mix“ entsprechend geändert. So wurde nach der generellen Inkubationszeit des Mixes von 20 min bei RT und anschließender Zugabe des NSAIDs die Chemilumineszenz nach 30 s, 1 min, 3 min und 9 min gemessen.

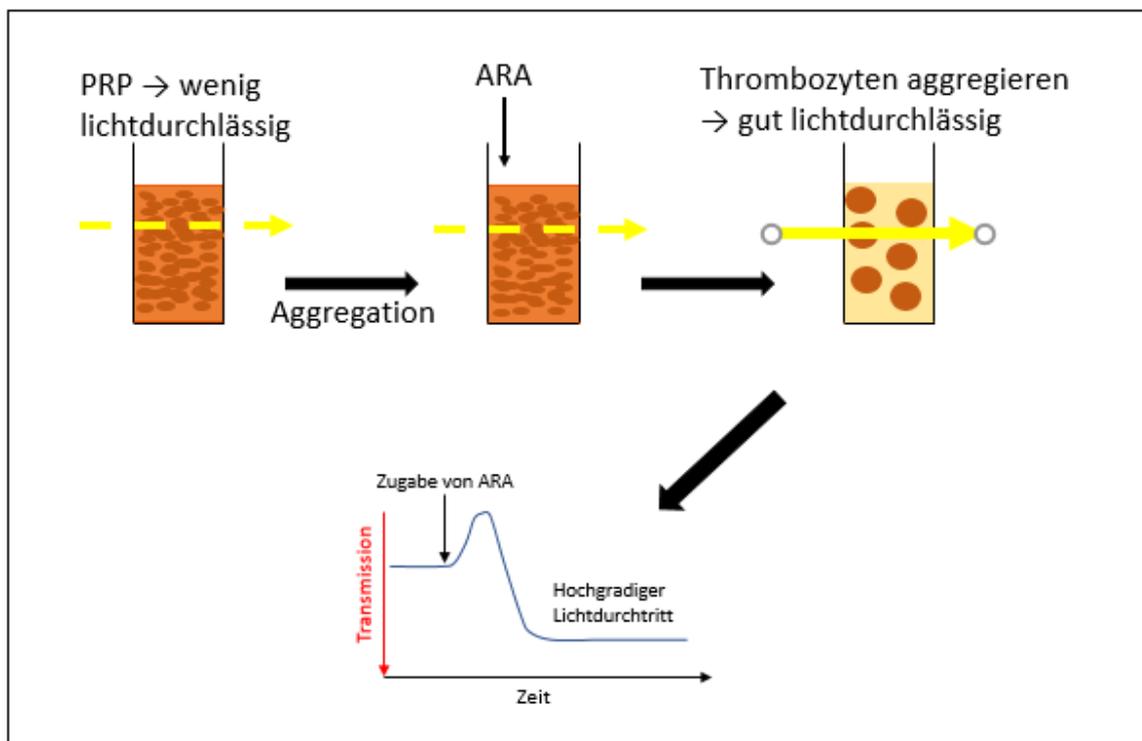
Im Falle von Ketoprofen beträgt die Anzahl der Versuche in der Zeitkinetik nur  $n = 3$ . Da sich die Aufbereitung der Thrombozytenkonzentrate durch die Blutbank geändert hat (die Thrombozytenkonzentrate werden nun bestrahlt) ist es uns nicht möglich, weitere Versuche mit Ketoprofen durchzuführen. Die Mikrosomen der bestrahlten Thrombozyten lassen sich (im Gegensatz zu denen der unbestrahlten Thrombozyten) in vitro nicht hemmen.

## 2.2.2 Thrombozytenaggregometrie

### 2.2.2.1 Prinzip der Thrombozytenaggregometrie

Mittels der Thrombozytenaggregometrie kann die Thrombozytenfunktion gemessen werden. Dies erfolgt nach dem turbidimetrischen Verfahren nach Born: Plättchenreiches ACD-Plasma wird bei 37 °C in einer Küvette in einem Magnetrührer mit 1200 U/min in Bewegung gehalten. Das Verfahren misst photometrisch die Änderung der optischen Dichte der Thrombozytensuspension (PRP) nach Aktivierung, die auf der Veränderung der Thrombozytenform und der folgenden Aggregatbildung der Thrombozyten während

des Vorgangs der Aggregation beruht. Zu Beginn der Messung (ohne Zugabe von Stimulanzien) ist die Suspension trüb und damit die optische Dichte hoch. Nach Zugabe von Arachidonsäure als Stimulus bilden sich Thrombozytenaggregate. Nun sind die Thrombozyten nicht mehr gleichmäßig in der Lösung verteilt, sondern akkumulieren. Die Trübung der Suspension wird im Laufe der Messung immer geringer und die Lichttransmission steigt (s. Abb. 6: Prinzip der Thrombozytenaggregometrie). Der Grad der Trübung wird als Funktion in Abhängigkeit von der Zeit aufgezeichnet und dient als Maß der Aggregation der Thrombozyten und damit ihrer Funktion. Zu Beginn jeder Messung wurde eine Kalibrierung durchgeführt, bei der mit PRP die minimale und mit PAP die maximale Lichttransmission als Referenzwerte festgelegt wurden.



**Abb. 6: Prinzip der Thrombozytenaggregometrie**

Aufgezeigt ist die Transmission der Lichtdurchgängigkeit des PRP (y-Achse) gegen die Aggregationszeit der Thrombozyten (x-Achse). Das trübe PRP lässt nur wenig Licht durch. Wird ein Stimulus (Arachidonsäure) hinzugegeben, werden die Thrombozyten aktiviert und es bilden sich Aggregate, wodurch die Suspension an Trübung verliert und somit lichtdurchlässiger wird.

### 2.2.2.2 Arachidonsäure-induzierte Aggregation

Das Probenvolumen der Aggregation betrug 505 ml in jeder Küvette. Es bestand aus 400 µl PRP, 100 µl TM (im Falle von Konzentrations-Wirkungs-Kurven und Zeitkinetiken von NSAIDs) bzw. 100 µl ASS-Lösung (bei NSAID-Interaktionen) und 5 µl des zu

untersuchenden NSAIDs in gelöster Form. Diese Proben wurden ca. 10 s im Rührer gerührt, dann 4 min bei RT inkubiert und anschließend noch einmal 2 min im Rührer gerührt. Dann wurden 10 µl Arachidonsäure (1 mM EK) hinzugefügt und so die Thrombozytenaggregation aktiviert. Die Aggregation wurde durch den Schreiber aufgezeichnet und nach weiteren 4 min mit 30 µl EDTA (77 mM) und 7 µl Indometazin (40 mM) gestoppt.

Mit Hilfe der Aggregation konnten Konzentrations-Wirkungs-Kurven von 0,3 µM, 1 µM, 3 µM, 10 µM und 30 µM EK des jeweiligen NSAIDs erstellt werden. Für die anschließende Zeitkinetik wurde neben der Kontrolle ohne NSAID eine Konzentration gewählt, welche in der KWK eine ca. 80 %ige Hemmung erreichte. Die Zeitkinetik wurde über 6 min, 10 min, 15 min, 20 min und 30 min gemessen

### 2.2.2.3 NSAID-Interaktionen in der Aggregation

Für die Interaktionen wurde für die Thrombozytenspende jedes Probanden vorab die Konzentration ASS bestimmt, welche die Thrombozyten gerade hemmte. Diese lagen zwischen 30 µM und 60 µM ASS.

Für die Messungen der Interaktion eines NSAIDs mit ASS gilt der gleiche Versuchsansatz wie bei der KWK oder Zeitkinetik. Hier wurde allerdings neben einer Kontrolle ohne ASS und einer Kontrolle nur mit ASS eine KWK von 0,3 µM, 1 µM, 3 µM, 10 µM und 30 µM NSAID erstellt. Für diese Arbeit konnte für die NSAIDs Ketorolac, Diclofenac, Ibuprofen, Naproxen, Oxaprozin, Flufenamat, Piroxicam, Celecoxib und Dipyron (MAA) freundlicher Weise auf schon vorhandene laborinterne Daten, die zum Teil durch Dr. Saxena veröffentlicht wurden (Saxena et al. 2013), zum Teil auch noch nicht veröffentlicht waren, zurück gegriffen werden. Zur Verifizierung und Erweiterung der Daten wurden eigene Messungen für die einzelnen NSAIDs durch weitere Versuche hinzugefügt.

### 2.2.2.4 Auswertung der Aggregationskurven

Für die Auswertung der Kurven werden die Tangentensteigung in [cm/min], die Amplitude in [cm] und der Anteil der gemessenen Amplitude an der Eichamplitude in [%] gemessen bzw. berechnet.

Die Tangentensteigung wird im Punkt der maximalen Steigung der Aggregationskurve in [cm/min] bestimmt. Die Amplitude als maximale Transmission wird im Punkt der höch-

ten Transmission bis zur Nulllinie gemessen und für den prozentualen Anteil an der Eichamplitude mit dieser verrechnet. Ist keine Amplitude nach der Stimulation in der Kurve messbar, gilt die Aggregation als nicht auslösbar.

### 2.2.3 Thromboxan B<sub>2</sub>-Quantifizierung

Die Thromboxan B<sub>2</sub>-Quantifizierung wurde mittels des „Thromboxane B<sub>2</sub> EIA Kits“ (Item No. 501020) der Firma Cayman Chemical Company durchgeführt.

#### 2.2.3.1 Prinzip der Thromboxan B<sub>2</sub>-Quantifizierung

Das Kit beruht auf der Konkurrenz zwischen TXB<sub>2</sub> und einem Tracer um die Bindungsstellen limitierter IgG Mouse Anti-Rabbit-Antikörper. Der Tracer besteht aus an TXB<sub>2</sub> konjugierter Acetylcholinesterase (AChE). Die Antikörper und der Tracer sind im Essay enthalten. Deren Konzentration bleibt in jeder Versuchsreihe konstant. Nach der Inkubation des Essays mit dem Serum werden alle ungebundenen Substanzen abgewaschen und dem Essay das sogenannte „Ellman`s Reagent“ (enthält das Substrat der AChE) hinzugefügt. Das Produkt dieser Reaktion absorbiert Licht der Wellenlänge 412 nm und leuchtet somit gelb. Die Intensität der Farbe kann mit Hilfe eines Photometers analysiert werden und verhält sich proportional zur Menge der an die Antikörper gebundenen Tracer. So lässt sich die Konzentration von TXB<sub>2</sub> im Serum errechnen. Die Durchführung der Messung folgte den Vorgaben des Herstellers (Cayman Chemical im Rahmen des Thromboxan B<sub>2</sub> EIA-Kit, Biomol GmbH, Bestellnummer 0408532600 (96 strip well bzw 4x 96 strip well (480))).

#### 2.2.3.2 Untersuchtes Material

Die untersuchten Proben stammen aus den Aggregationen zur Messung der Interaktion zwischen untersuchtem NSAID und ASS, die für diesen Zweck bei -20 °C eingefroren wurden. Gemessen wurde die Farbintensität der Kontrollen der Aggregation (PRP ohne ASS und Hemmsubstanz), der Negativkontrollen (PRP versetzt mit ASS) und der Proben (PRP + ASS + Hemmsubstanz) mit der Konzentration der untersuchten Hemmsubstanz, die in der Aggregation die größte Steigung aufwies. Da die Untersuchungen zur Interaktion mittels Thromboxan B<sub>2</sub>-Quantifizierung auf die Ergebnisse der Interaktionsversuche mittels Aggregation aufbauen, wurde auch hier für die NSAIDs Ketorolac, Diclofenac, Ibuprofen, Naproxen, Oxaprozin, Flufenamat, Piroxicam, Celecoxib und Dipyron (MAA) zusätzlich zu den im Rahmen dieser Arbeit produzierten Ergebnisse auf Daten

der Veröffentlichung (Saxena et al. 2013) sowie Daten von weiteren, bisher nicht veröffentlichten Versuchen zurück gegriffen.

## 2.2.4 Datenverarbeitung

### 2.2.4.1 Chemilumineszenz

Bei der Chemilumineszenz wird die vom Chemiluminometer gemessene Lichtemission in RLU angegeben und sowohl in absoluten Werten als auch in Prozent ausgedrückt. Um eine bessere Vergleichbarkeit der einzelnen Substanzen untereinander zu gewährleisten, wurde bei Erreichen eines minimalen Plateaus dieses Plateau gleich Null gesetzt. Somit konnte für alle Versuche bei maximaler Hemmung durch eine hohe Konzentration des jeweiligen NSAIDs die Restaktivität einfach und optisch vergleichbar ermittelt werden.

Die Aufzeichnung der Ergebnisse und Erstellung der Graphen der KWKs und Zeitkinetiken (Mittelwerte der einzelnen Messungen mit SEM) wurde mit dem Programm SigmaPlot 11.0 durchgeführt.

Für die Zeitkinetiken repräsentiert der Wert  $k$  in einer Funktion  $f_n(x) = e^{-k \cdot t}$  die Geschwindigkeit des zeitlichen Abfalls der Kurve. Hierbei kann kein Wert bestimmt werden, wenn die Kurve innerhalb zweier Messpunkte von 100 % auf 0 % fällt. Für diesen Fall wurde  $k = 20$  gesetzt, da dies die nächstgrößere natürliche Zahl über dem höchsten errechneten  $k$ -Wert ist. Ein zahlenmäßig großes  $k$  bedeutet einen schnellen Abfall, ein zahlenmäßig geringes  $k$  einen langsameren Abfall der Funktion  $f_n(x) = e^{-k \cdot t}$ . Zur Berechnung dieser Zusammenhänge wurde das Programm GraphPad Prism 6 genutzt. Hiermit konnten auch die Funktionen der einzelnen Messreihen ermittelt und somit auch die  $\log IC_{50}$  und der HillSlope berechnet werden.

### 2.2.4.2 Thrombozytenaggregation

Die Auswertung der Aggregation erfolgte mit SigmaPlot 11.0. Es wurden für die KWKs und Zeitkinetiken die maximale Steigung [cm/min], die Amplitude [cm] und die Maximale Amplitudendifferenz [%] gemessen und aufgezeichnet. Es werden die Mittelwerte mit den Standardfehlern abgebildet. Beispielhaft wird im Rahmen des Ergebnisteils nur die graphische Darstellung der Steigung aufgeführt.

Für die Interaktionen wurden die gemessenen Steigungen in der Aggregation eines NSAIDs in Anwesenheit von ASS der Negativkontrolle (nur ASS) gegenübergestellt und

mittels ANOVA Varianzanalyse geprüft, ob sich die gemessene Steigung signifikant von der Negativkontrolle unterscheidet. War dies der Fall, so ist die entsprechende Konzentration mit einem Stern in den Abbildungen gekennzeichnet.

#### 2.2.4.3 Thromboxan B<sub>2</sub>-Quantifizierung

Nach den Versuchen zur Interaktion der einzelnen NSAIDs mit ASS mittels Thrombozytenaggregation wurden die resultierenden Proben bei -20 °C eingefroren. So wurden sie konserviert, um im Anschluss für die Überprüfung der Ergebnisse der Thrombozytenaggregation hinsichtlich der Interaktion mittels Thromboxan B<sub>2</sub>-Quantifizierung zur Verfügung zu stehen. Hierfür wurde die in der Aggregation ermittelte Konzentration des jeweiligen NSAIDs gewählt, das, im Falle einer zu beobachtenden Interaktion, die Thrombozytenaggregation am wenigsten hemmt.

Die Thromboxankonzentration ebendieser Probe wurde nun mittels „Thromboxane B<sub>2</sub> EIA Kits“ (Item No. 501020) der Firma Cayman Chemical Company ermittelt (s. 2.2.3.2) und der Negativkontrolle (Thrombozyten nur mit ASS gehemmt) gegenübergestellt. Das Signifikanzniveau wurde hier mittels t-Tests mit Hilfe des Programms GraphPad Prism 6 ermittelt. Besteht ein signifikanter Unterschied, ist dies mit einem Stern markiert. Es wird der Mittelwert mit dem Standardfehler angegeben.

#### 2.2.4.4 Gegenüberstellung der k-Werte und der Interaktion

Um einen Bezug zwischen der Geschwindigkeit der Inhibition der einzelnen NSAIDs (Zeitkinetiken, gemessen mittels Chemilumineszenz) und der Interaktion der jeweiligen NSAIDs mit ASS (gemessen mittels Thrombozytenaggregation und Thromboxan B<sub>2</sub>-Quantifizierung) herzustellen, wurden die Ergebnisse der jeweiligen Versuchsaufbauten für jede einzelne Substanz einander gegenübergestellt. Die Auswertung erfolgte mit SigmaPlot 11.0, die Werte sind als Mittelwerte mit SEM angegeben und das Signifikanzniveau wurde mit Hilfe einer ANOVA Varianzanalyse berechnet.

### 2.3 Ethikvotum

Die Versuche zu der vorliegenden Arbeit wurden in Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki durchgeführt. Vor Beginn der Untersuchungen wurde ein positives Votum der Ethikkommission der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf eingeholt (Nr. 5487). Die Probanden wurden vor der Blutspende von einem approbierten Arzt über

den Eingriff und die Risiken im Rahmen der Blutentnahme sowie den Umgang mit ihren Daten schriftlich und mündlich aufgeklärt und gaben schriftlich ihr Einverständnis.

## 3 Ergebnisse

Für die einzelnen COX-Inhibitoren wurden in einem ersten Schritt jeweils Konzentrations-Wirkungs-Kurven im Versuchsmodell der Chemilumineszenz erstellt. Hierfür wurde die Konzentration des Hemmstoffs im Versuchsansatz in logarithmischer Reihenfolge erhöht.

In einem zweiten Schritt wurde für jede Substanz eine Analyse der Geschwindigkeit der Inhibition an der COX-1 erstellt. Hierfür wurde eine im ersten Schritt ermittelte Hemmkonzentration des zu untersuchenden NSAIDs genutzt, die die COX-1 gerade noch hemmt. Hiermit wurden Zeitkinetiken erstellt, die später für die Charakterisierung der Versuchssubstanzen in zeitabhängig und zeitunabhängig unabdingbar waren (wichtig in diesem Zusammenhang: der k-Wert, s. 2.2.4.1).

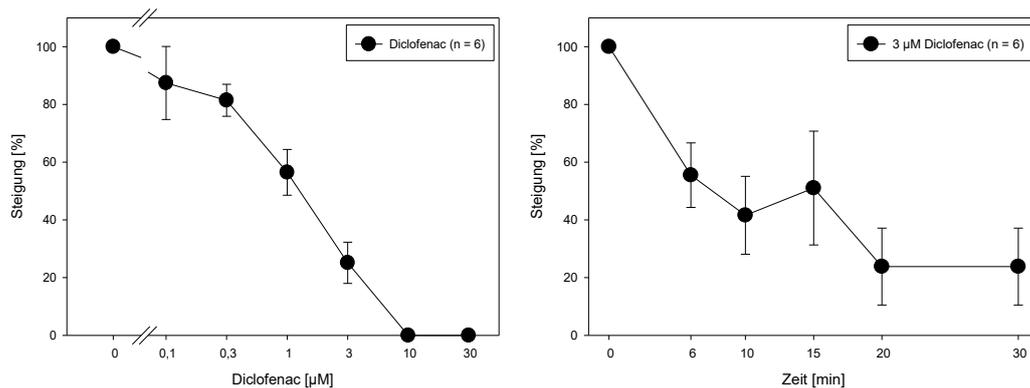
Anschließend wurde im Thrombozyten-Aggregationsmodell die Inhibition der Thrombozytenaggregation durch ASS durch das jeweilige NSAID untersucht.

In der statistischen Auswertung wurde in einem nächsten Schritt untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen der Inhibitionskinetik der NSAIDs an der COX-1 und der Inhibition der durch ASS verhinderten Thrombozytenaggregation (Inhibition der COX-1 durch ASS) besteht.

### 3.1 Arachidonsäureinduzierte thrombozytäre Aggregation

Exemplarisch wurden Diclofenac als Vertreter der zeitverzögert wirksamen Hemmstoffe und Ibuprofen als Vertreter der schnell wirksamen Hemmstoffe mittels Aggregation und Chemilumineszenz untersucht. Zunächst sollte geprüft werden, ob die untersuchten NSAID-Substanzen neben der Hemmung der Thrombozytenfunktion (Aggregation) auch eine (idealerweise vergleichbare) Hemmung der mittels Chemilumineszenz gemessenen COX-Aktivität an thrombozytären Mikrosomen bewirken. Hierbei entstand die Problematik, dass sich bei Diclofenac als zeitabhängiges NSAID zwar aussagekräftige Zeitkinetiken mit der Konzentration, die in etwa der  $IC_{80}$  entspricht, erstellen lassen, dies bei Ibuprofen als zeitunabhängiges NSAID aber nicht repräsentativ möglich war. Im Falle von Ibuprofen gab es am ehesten im Rahmen der individuellen Variabilität des Ansprechens der Thrombozyten auf die Inhibition mittels Ibuprofen eine zu große Differenz zwischen den Thrombozyten der verschiedenen Probanden. So ließen sich einige Thrombozyten schon bei 30  $\mu$ M komplett hemmen, während eine komplette Inhibition bei an-

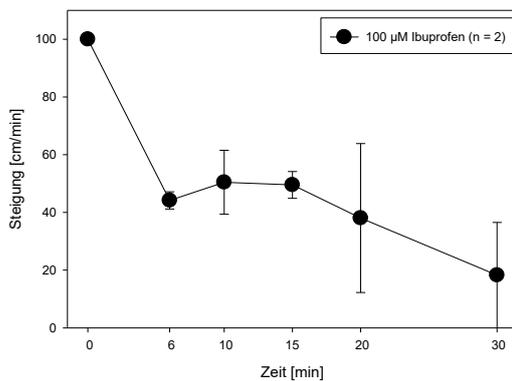
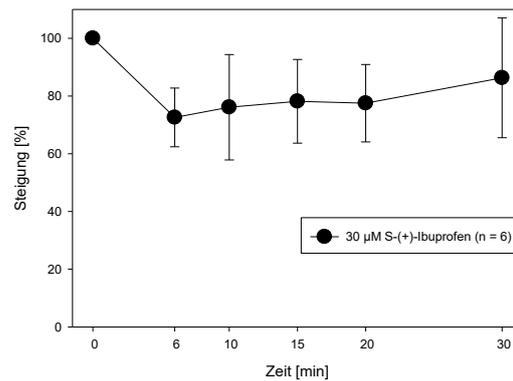
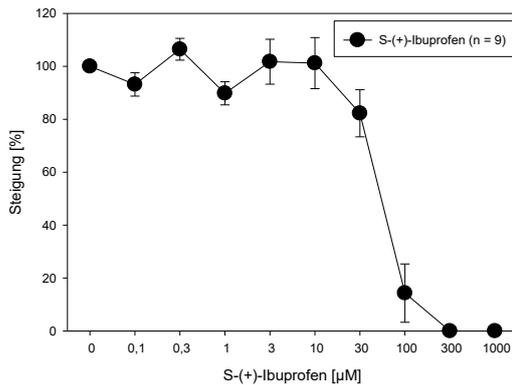
deren Probanden erst bei 100  $\mu\text{M}$  oder darüber stattfand. Daher konnte keine Konzentration als für die Versuchsreihe der Zeitkinetiken geeignet bewertet werden. Bei einigen Probanden waren es dementsprechend 30  $\mu\text{M}$ , bei anderen 100  $\mu\text{M}$  (s. Abb. 10: Zeitkinetik mit 30  $\mu\text{M}$  von S-(+)-Ibuprofen, prozentuale Darstellung). Hieraus lässt sich schließen, dass die Thrombozytenaggregation als Methode zur Bestimmung der Zeitkinetik der NSAIDs nicht für alle Substanzen geeignet erscheint.



**Abb. 7: KWK von Diclofenac, prozentuale Darstellung**

**Abb. 8: Zeitkinetik von Diclofenac, prozentuale Darstellung**

Konzentrations-Wirkungs-Kurve und entsprechende Zeitkinetik von Diclofenac gemessen mittels Thrombozytenaggregation (Aktivität der COX-1). Die COX-1-Aktivität in Prozent (y-Achse) ist abhängig von der Konzentration des Inhibitors (in  $\mu\text{M}$ ) bzw. der Zeit der Inkubation der Thrombozytensuspension mit dem Inhibitor (in min, x-Achse) aufgeführt.



**Abb. 9: KWK von S-(+)-Ibuprofen, prozentuale Darstellung**

**Abb. 10: Zeitkinetik mit 30 µM von S-(+)-Ibuprofen, prozentuale Darstellung**

**Abb. 11: Zeitkinetik mit 100 µM von S-(+)-Ibuprofen, prozentuale Darstellung**

Konzentrations-Wirkungs-Kurve und entsprechende Zeitkinetik von S-(+)-Ibuprofen gemessen mittels Thrombozytenaggregation (Aktivität der COX-1). Die COX-1-Aktivität (gemessen anhand der Steigung der Aggregationskurve absolut und in Prozent, y-Achse) ist abhängig von der Konzentration des Inhibitors in µM bzw. der Zeit der Inkubation der Thrombozytensuspension mit dem Inhibitor in min (x-Achse) aufgeführt. Mit 30 µM ließen sich die Thrombozyten in der Zeitkinetik kaum hemmen, während bei 100 µM eine zeitabhängige Inhibition zu beobachten war. Beim Erstellend der KWKs bei 100 µM S-(+)-Ibuprofen waren allerdings die Thrombozyten der meisten Spender schon komplett gehemmt, sodass eine Zeitkinetik mit 100 µM S-(+)-Ibuprofen nur bei einer geringen Anzahl an Proben (n = 2) möglich war.

### 3.2 COX-Aktivität an Mikrosomen humaner Thrombozyten

Die Ergebnisse werden nachfolgend in Form von Konzentrations-Wirkungs-Kurven (KWKs) und Zeitkinetiken dargestellt.

Hierbei werden beispielhaft für ASS die gemessene Chemilumineszenz in RLU x 1000 und die daraus berechneten prozentualen Werte in der KWK und der Zeitkinetik als zwei separate Graphen gezeigt. Da sowohl in der KWK als auch in der Zeitkinetik die Kurven der relativen und der absoluten Darstellung bei allen untersuchten COX-Inhibitoren annähernd kongruent verlaufen, wird bei allen weiteren Substanzen auf die Darstellung der

absoluten Lumineszenzwerte verzichtet und nur die prozentuale Hemmung der COX-1 durch die jeweilige Substanz abgebildet.

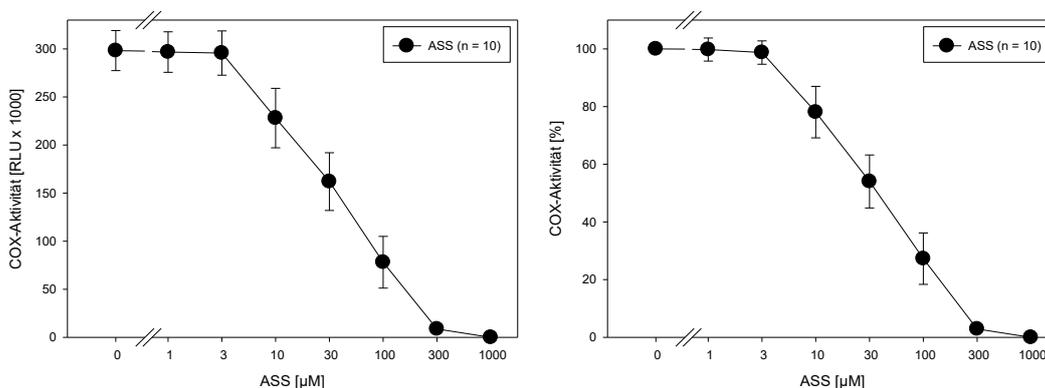
Die Reihenfolge der Aufführung der Auswertungen der einzelnen Substanzen richtet sich nach aufsteigender Größe des berechneten k-Wertes aus der Zeitkinetik, der die Geschwindigkeit des Abfalls der COX-1-Aktivität abbildet. Hierbei bedeutet ein kleiner k-Wert einen eher langsamen Abfall und ein großer k-Wert einen schnellen Abfall der Aktivität.

### 3.2.1 Hemmung der COX-1 durch ASS

Als Referenz für die untersuchten Interaktionen dienen die KWK und die sich darauf beziehende Zeitkinetik von ASS.

#### 3.2.1.1 Konzentrations-Wirkungs-Kurve von ASS

Die COX-Aktivität nimmt mit steigender Konzentration an ASS im Konzentrationsbereich zwischen 3 und 300  $\mu\text{M}$  ab und erreicht eine nahezu vollständige Inhibition.



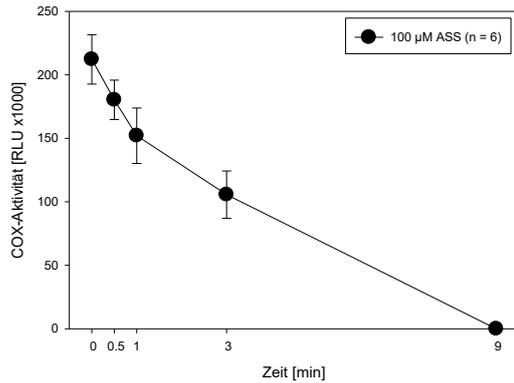
**Abb. 12: KWK von ASS, absolute Darstellung**

**Abb. 13: KWK von ASS, prozentuale Darstellung**

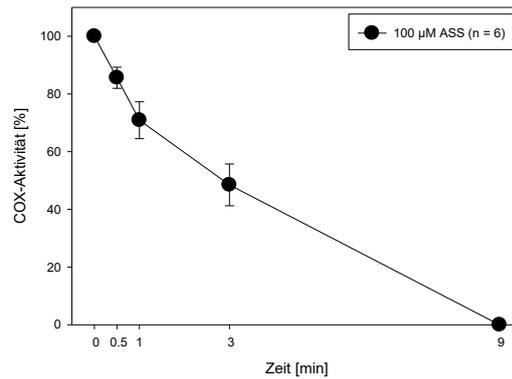
Konzentrations-Wirkungs-Kurve von ASS gemessen mittels Thrombozytenaggregation (Aktivität der COX-1 in RLU bzw. Prozent). Die COX-1-Aktivität (y-Achse) ist abhängig von der Konzentration des Inhibitors (in  $\mu\text{M}$ , x-Achse) aufgeführt.

#### 3.2.1.2 Zeitkinetik von ASS

Die Inhibition der COX-1 durch ASS erfolgt zeitabhängig. Nach ca. drei Minuten ist die halbmaximale und nach neun Minuten die vollständige Hemmung des Enzyms erreicht. Die Verläufe der Kurven der reellen Zahlen (RLU x 1000) und der prozentualen Darstellung sind kongruent.



**Abb. 14: Zeitkinetik von 100 μM ASS, absolute Darstellung**

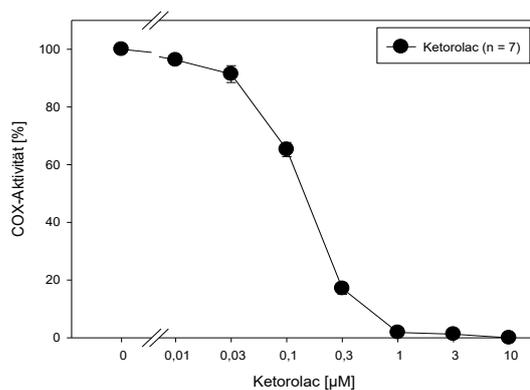


**Abb. 15: Zeitkinetik von 100 μM ASS, prozentuale Darstellung**

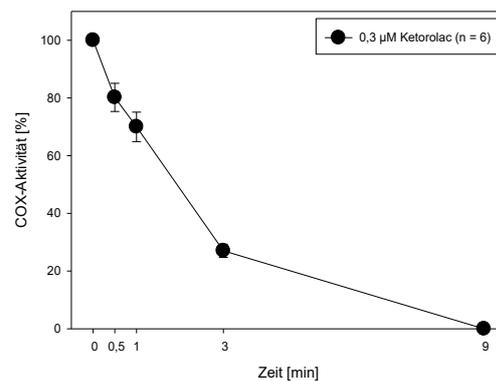
Zeitkinetik von Ketorolac gemessen mittels Chemilumineszenz (Aktivität der COX-1 in RLU bzw. Prozent). Die COX-1-Aktivität (y-Achse) ist abhängig von der Zeit der Inkubation der Thrombozytenmikrosomen mit dem Inhibitor (in min, x-Achse) aufgeführt.

### 3.2.2 Hemmung der COX-1 durch Ketorolac

Ketorolac hemmt die COX-1 zeitabhängig. Bei 0,3 μM ist das Enzym über 80 % gehemmt, bei 1 μM wird schon fast die vollständige Hemmung erreicht. Nach drei Minuten lässt sich die COX-1 zu über 70 % hemmen, während eine vollständige Inhibition nach neun Minuten erreicht wird.



**Abb. 16: KWK von Ketorolac**

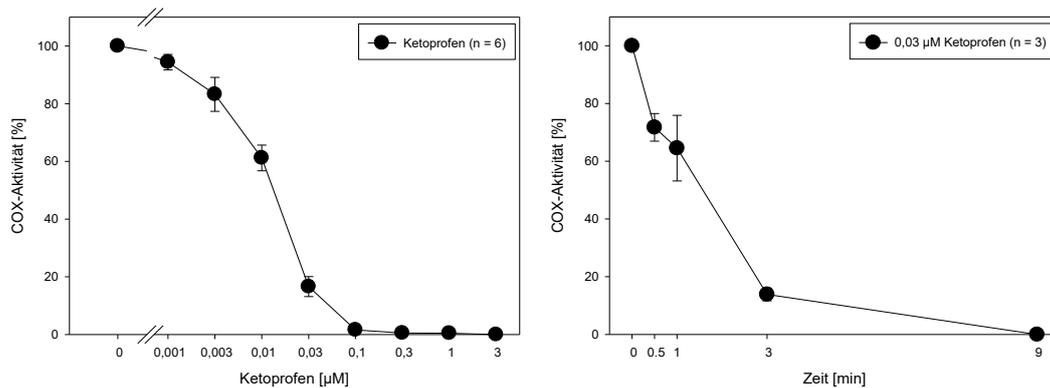


**Abb. 17: Zeitkinetik von Ketorolac (0,3 μM)**

Konzentrations-Wirkungs-Kurve und entsprechende Zeitkinetik von Ketorolac gemessen mittels Chemilumineszenz (Aktivität der COX-1). Die COX-1-Aktivität (in Prozent, y-Achse) ist abhängig von der Konzentration des Inhibitors bzw. der Zeit der Inkubation der Thrombozytenmikrosomen (in μM bzw. min, x-Achse) mit dem Inhibitor aufgeführt.

### 3.2.3 Hemmung der COX-1 durch Ketoprofen

Ketoprofen hemmt die COX-1 auch zeitabhängig. Bei 0,03  $\mu\text{M}$  war das Enzym über 80 % gehemmt, bei 0,1  $\mu\text{M}$  wurde schon fast die vollständige Hemmung erreicht. Nach drei Minuten ließ sich die COX-1 zu über 80 % hemmen, während eine vollständige Inhibition nach neun Minuten erreicht wurde.



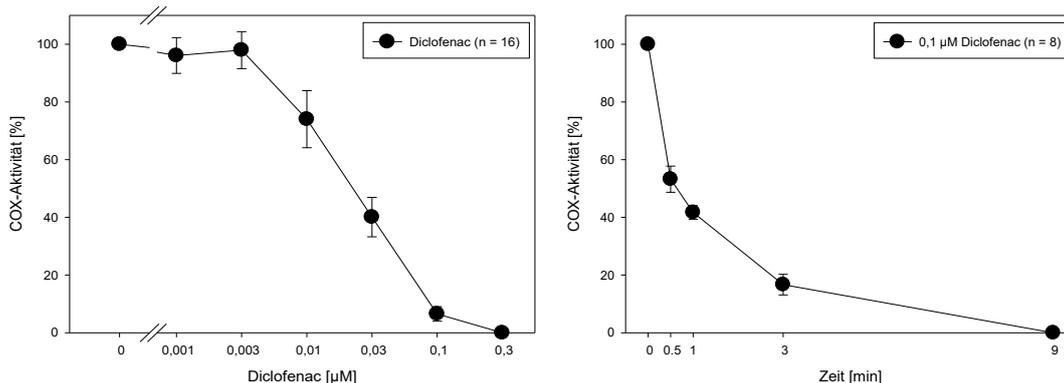
**Abb. 18: KWK von Ketoprofen**

**Abb. 19: Zeitkinetik von Ketoprofen (0,03  $\mu\text{M}$ )**

Konzentrations-Wirkungs-Kurve und entsprechende Zeitkinetik von Ketoprofen gemessen mittels Chemilumineszenz (Aktivität der COX-1). Die COX-1-Aktivität (in Prozent, y-Achse) ist abhängig von der Konzentration des Inhibitors bzw. der Zeit der Inkubation der Thrombozytenmikrosomen mit dem Inhibitor (in  $\mu\text{M}$  bzw. min, x-Achse) aufgeführt.

### 3.2.4 Hemmung der COX-1 durch Diclofenac

Diclofenac hemmt die COX-1 zeitabhängig. Bei 0,03  $\mu\text{M}$  war das Enzym ungefähr halbmaximal gehemmt, bei 0,3  $\mu\text{M}$  wurde die vollständige Hemmung erreicht. Nach drei Minuten ließ sich die COX-1 zu über 80 % hemmen, während eine vollständige Inhibition nach neun Minuten erreicht wurde.



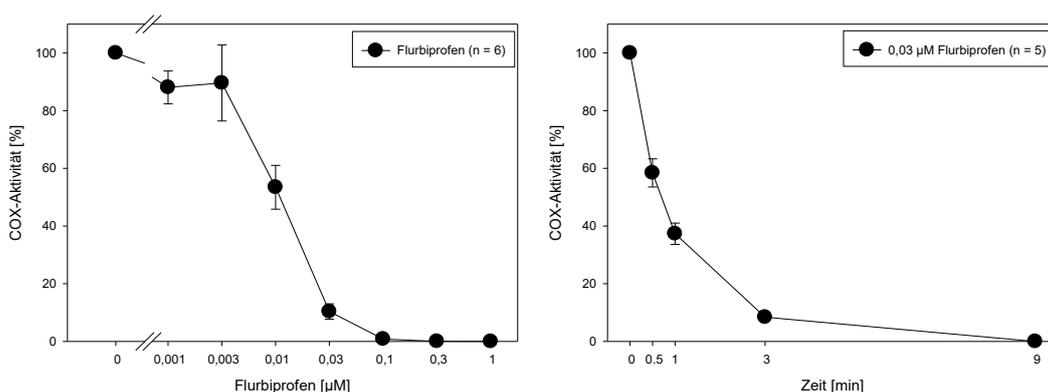
**Abb. 20: KWK von Diclofenac**

**Abb. 21: Zeitkinetik von Diclofenac (0,1  $\mu\text{M}$ )**

Konzentrations-Wirkungs-Kurve und entsprechende Zeitkinetik von Diclofenac gemessen mittels Chemilumineszenz (Aktivität der COX-1). Die COX-1-Aktivität (in Prozent, y-Achse) ist abhängig von der Konzentration des Inhibitors bzw. der Zeit der Inkubation der Thrombozytenmikrosomen mit dem Inhibitor (in  $\mu\text{M}$  bzw. min, x-Achse) aufgeführt.

### 3.2.5 Hemmung der COX-1 durch Flurbiprofen

Flurbiprofen hemmt die COX-1 zeitabhängig. Bei 0,03  $\mu\text{M}$  war das Enzym über 80 % gehemmt, bei 0,1  $\mu\text{M}$  wurde schon fast die vollständige Hemmung erreicht. Nach drei Minuten ließ sich die COX-1 zu über 80 % hemmen, während eine vollständige Inhibition nach neun Minuten erreicht wurde.



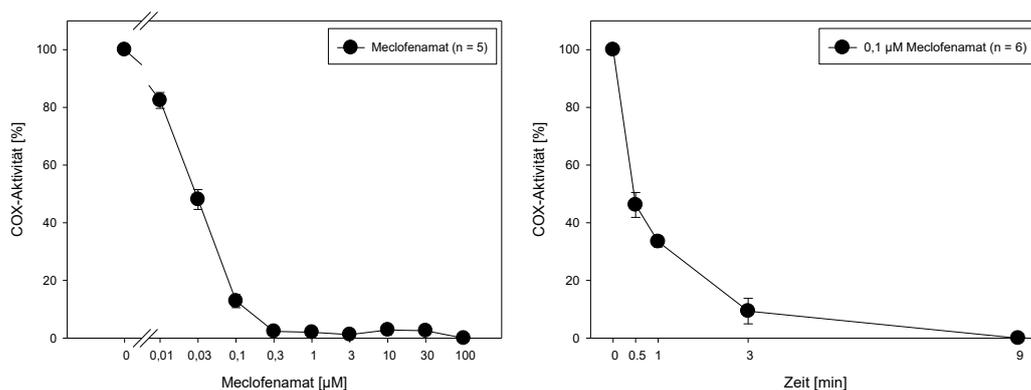
**Abb. 22: KWK von Flurbiprofen**

**Abb. 23: Zeitkinetik von Flurbiprofen (0,03  $\mu\text{M}$ )**

Konzentrations-Wirkungs-Kurve und entsprechende Zeitkinetik von Flurbiprofen gemessen mittels Chemilumineszenz (Aktivität der COX-1). Die COX-1-Aktivität (in Prozent, y-Achse) ist abhängig von der Konzentration des Inhibitors bzw. der Zeit der Inkubation der Thrombozytenmikrosomen mit dem Inhibitor (in  $\mu\text{M}$  bzw. min, x-Achse) aufgeführt.

### 3.2.6 Hemmung der COX-1 durch Meclofenamat

Meclofenamat hemmt die COX-1 ebenfalls zeitabhängig. Bei 0,03  $\mu\text{M}$  war das Enzym halbmaximal gehemmt, bei 0,3  $\mu\text{M}$  wurde schon fast die vollständige Hemmung erreicht. Nach drei Minuten ließ sich die COX-1 zu über 80 % hemmen, während eine vollständige Inhibition nach neun Minuten erreicht wurde.



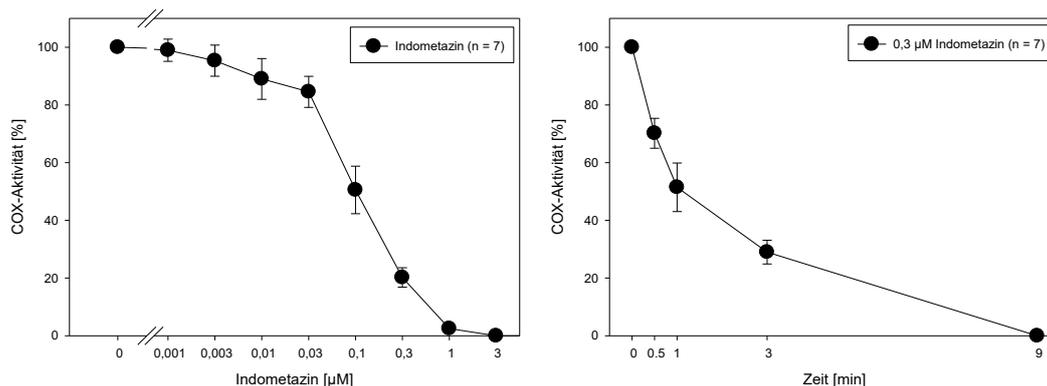
**Abb. 24: KWK von Meclofenamat**

**Abb. 25: Zeitkinetik von Meclofenamat (0,1  $\mu\text{M}$ )**

Konzentrations-Wirkungs-Kurve und entsprechende Zeitkinetik von Meclofenamat gemessen mittels Chemilumineszenz (Aktivität der COX-1). Die COX-1-Aktivität (in Prozent, y-Achse) ist abhängig von der Konzentration des Inhibitors bzw. der Zeit der Inkubation der Thrombozytenmikrosomen mit dem Inhibitor (in  $\mu\text{M}$  bzw. min, x-Achse) aufgeführt.

### 3.2.7 Hemmung der COX-1 durch Indometazin

Indometazin hemmt die COX-1 zeitabhängig. Bei 0,1  $\mu\text{M}$  war das Enzym halbmaximal gehemmt, bei 3  $\mu\text{M}$  wurde die vollständige Hemmung erreicht. Nach einer Minute ließ sich die COX-1 zu 50 % hemmen, während eine vollständige Inhibition nach neun Minuten erreicht wurde.



**Abb. 26: KWK von Indometazin**

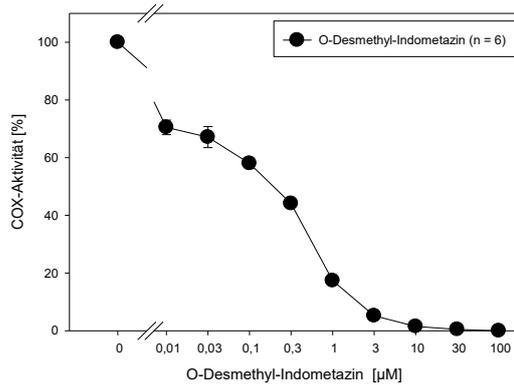
**Abb. 27: Zeitkinetik von Indometazin (0,3  $\mu\text{M}$ )**

Konzentrations-Wirkungs-Kurve und entsprechende Zeitkinetik von Indometazin gemessen mittels Chemilumineszenz (Aktivität der COX-1). Die COX-1-Aktivität (in Prozent, y-Achse) ist abhängig von der Konzentration des Inhibitors bzw. der Zeit der Inkubation der Thrombozytenmikrosomen mit dem Inhibitor (in  $\mu\text{M}$  bzw. min, x-Achse) aufgeführt.

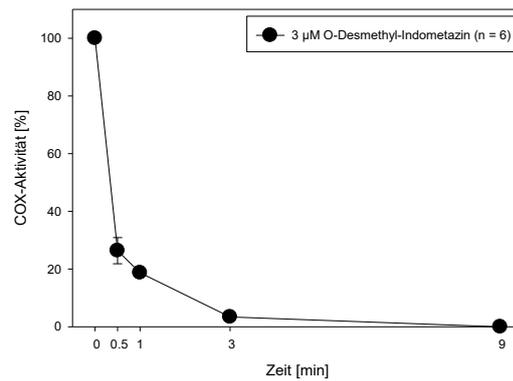
### 3.2.8 Hemmung der COX-1 durch O-Desmethyl-Indometazin

O-Desmethyl-Indometazin hemmt die COX-1 zeitabhängig. Bei 0,3  $\mu\text{M}$  war das Enzym ungefähr halbmaximal inhibiert, bei 30  $\mu\text{M}$  wurde die vollständige Hemmung erreicht. Nach einer Minute ließ sich die COX-1 zu ca. 80 % hemmen, während eine vollständige Inhibition nach neun Minuten erreicht wurde.

Auffällig war der Kurvenverlauf der KWK. Die Aktivität der COX-1 fiel mit der Zugabe der kleinsten Konzentration an Inhibitor sprunghaft ab. Die Ursache hierfür kann im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden. Es kann sein, dass bei der Verwendung noch niedrigerer Konzentrationen an O-Desmethyl-Indometazin die Kurve weniger sprunghaft abgefallen wäre und der Unterschied zwischen Positiv-Kontrolle und erster Hemmkonzentration kleiner wäre.



**Abb. 28: KWK von O-Desmethyl-Indometazin**

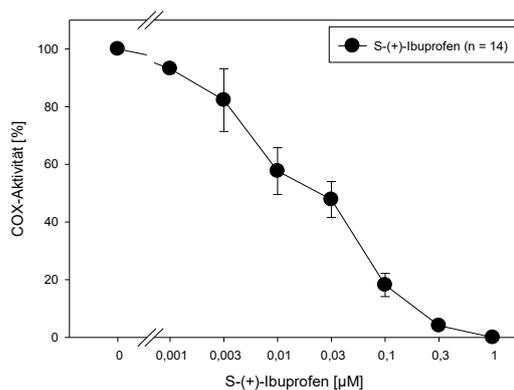


**Abb. 29: Zeitkinetik von O-Desmethyl-Indometazin (3 µM)**

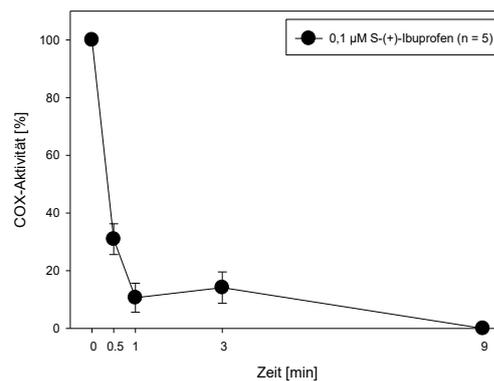
Konzentrations-Wirkungs-Kurve und entsprechende Zeitkinetik von O-Desmethyl-Indometazin gemessen mittels Chemilumineszenz (Aktivität der COX-1). Die COX-1-Aktivität (in Prozent, y-Achse) ist abhängig von der Konzentration des Inhibitors bzw. der Zeit der Inkubation der Thrombozytenmikrosomen mit dem Inhibitor (in µM bzw. min, x-Achse) aufgeführt.

### 3.2.9 Hemmung der COX-1 durch S-(+)-Ibuprofen

S-(+)-Ibuprofen hemmt die COX-1 zeitunabhängig. Bei 0,03 µM war das Enzym halbmaximal gehemmt und bei 1 µM wurde die vollständige Hemmung erreicht. Nach einer Minute ließ sich die COX-1 schon zu über 90 % hemmen, während eine vollständige Inhibition nach neun Minuten erreicht wurde.



**Abb. 30: KWK von S-(+)-Ibuprofen**

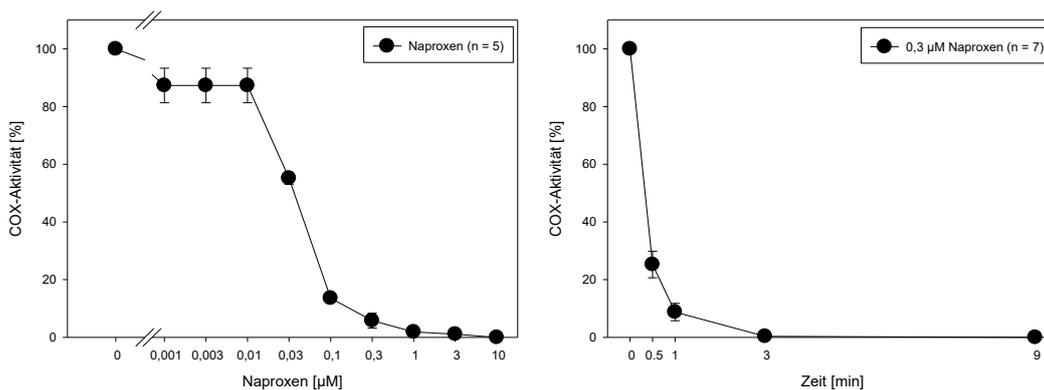


**Abb. 31: Zeitkinetik von S-(+)-Ibuprofen (0,1 µM)**

Konzentrations-Wirkungs-Kurve und entsprechende Zeitkinetik von S-(+)-Ibuprofen gemessen mittels Chemilumineszenz (Aktivität der COX-1). Die COX-1-Aktivität (in Prozent, y-Achse) ist abhängig von der Konzentration des Inhibitors bzw. der Zeit der Inkubation der Thrombozytenmikrosomen mit dem Inhibitor (in µM bzw. min, x-Achse) aufgeführt.

### 3.2.10 Hemmung der COX-1 durch Naproxen

Naproxen hemmt die COX-1 zeitunabhängig und die Kurve der KWK verläuft relativ steil. Bei 0,03  $\mu\text{M}$  war das Enzym fast halbmaximal, bei 0,1  $\mu\text{M}$  schon zu ca. 90 % gehemmt und bei 10  $\mu\text{M}$  wurde die vollständige Hemmung erreicht. Nach einer Minute ließ sich die COX-1 schon zu über 90 % hemmen, während eine vollständige Inhibition nach drei Minuten erreicht wurde.



**Abb. 32: KWK von Naproxen**

**Abb. 33: Zeitkinetik von Naproxen (0,3  $\mu\text{M}$ )**

Konzentrations-Wirkungs-Kurve und entsprechende Zeitkinetik von Naproxen gemessen mittels Chemilumineszenz (Aktivität der COX-1). Die COX-1-Aktivität (in Prozent, y-Achse) ist abhängig von der Konzentration des Inhibitors bzw. der Zeit der Inkubation der Thrombozytenmikrosomen mit dem Inhibitor (in  $\mu\text{M}$  bzw. min, x-Achse) aufgeführt.

### 3.2.11 Hemmung der COX-1 durch Celecoxib

Celecoxib hemmt die COX-1 zeitunabhängig. Bei 0,1  $\mu\text{M}$  war das Enzym fast halbmaximal gehemmt, bei 1  $\mu\text{M}$  noch zu ca. 20 % aktiv und bei 10  $\mu\text{M}$  wurde die vollständige Hemmung erreicht. Nach 30 Sekunden ließ sich die COX-1 schon zu über 90 % hemmen, während eine vollständige Inhibition schon nach drei Minuten erreicht wurde.

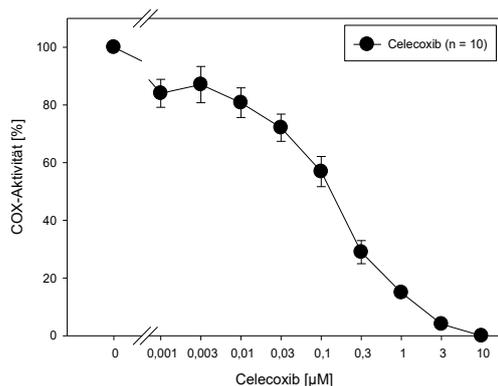


Abb. 34: KWK von Celecoxib

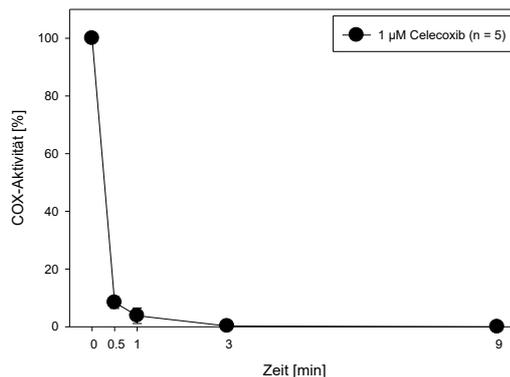


Abb. 35: Zeitkinetik von Celecoxib (1 µM)

Konzentrations-Wirkungs-Kurve und entsprechende Zeitkinetik von Celecoxib gemessen mittels Chemilumineszenz (Aktivität der COX-1). Die COX-1-Aktivität (in Prozent, y-Achse) ist abhängig von der Konzentration des Inhibitors bzw. der Zeit der Inkubation der Thrombozytenmikrosomen mit dem Inhibitor (in µM bzw. min, x-Achse) aufgeführt.

### 3.2.12 Hemmung der COX-1 durch Oxaprozin

Oxaprozin hemmt die COX-1 zeitunabhängig. Bei 0,1 µM war das Enzym mehr als halbmaximal gehemmt und bei 10 µM wurde die vollständige Hemmung erreicht. Nach 30 Sekunden ließ sich die COX-1 schon zu über 90 % hemmen, während eine vollständige Inhibition erst nach neun Minuten erreicht wurde.

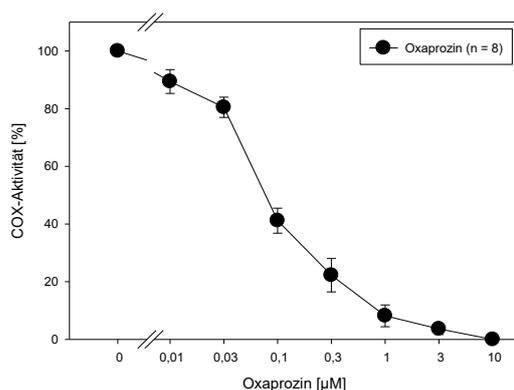


Abb. 36: KWK von Oxaprozin

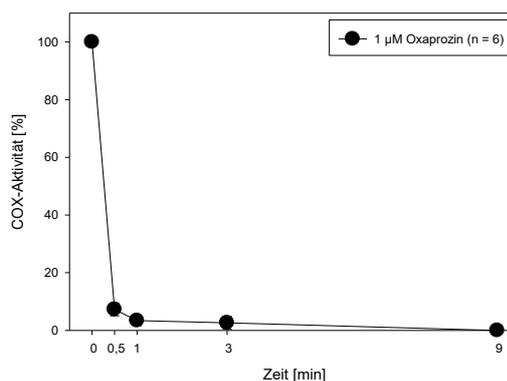
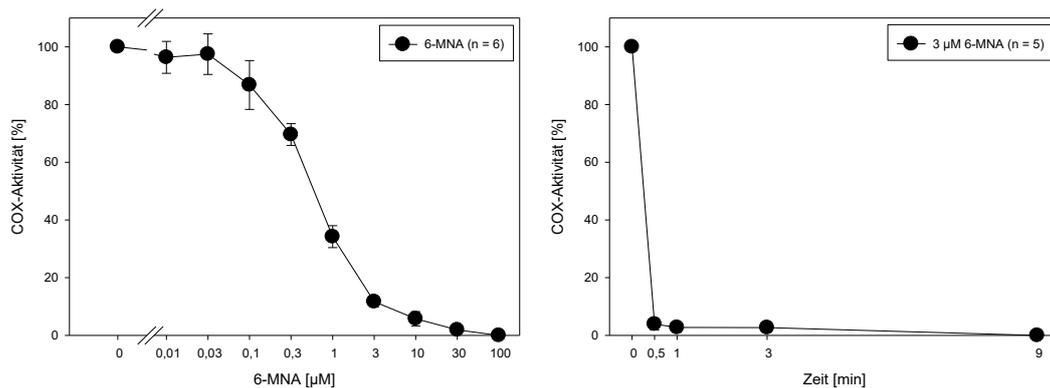


Abb. 37: Zeitkinetik von Oxaprozin (1 µM)

Konzentrations-Wirkungs-Kurve und entsprechende Zeitkinetik von Oxaprozin gemessen mittels Chemilumineszenz (Aktivität der COX-1). Die COX-1-Aktivität (in Prozent, y-Achse) ist abhängig von der Konzentration des Inhibitors bzw. der Zeit der Inkubation der Thrombozytenmikrosomen mit dem Inhibitor (in µM bzw. min, x-Achse) aufgeführt.

### 3.2.13 Hemmung der COX-1 durch 6-Methoxy-2-Naphthylessigsäure (6-MNA)

6-MNA hemmt die COX-1 zeitunabhängig. Bei 1  $\mu\text{M}$  war das Enzym zu ca. 70 % gehemmt und bei 100  $\mu\text{M}$  wurde die vollständige Hemmung erreicht. Nach 30 Sekunden ließ sich die COX-1 schon zu über 90 % hemmen, während eine vollständige Inhibition schon nach drei Minuten erreicht wurde.



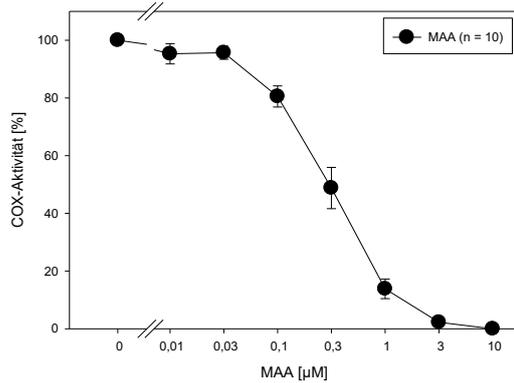
**Abb. 38: KWK von 6-MNA**

**Abb. 39: Zeitkinetik von 6-MNA (3  $\mu\text{M}$ )**

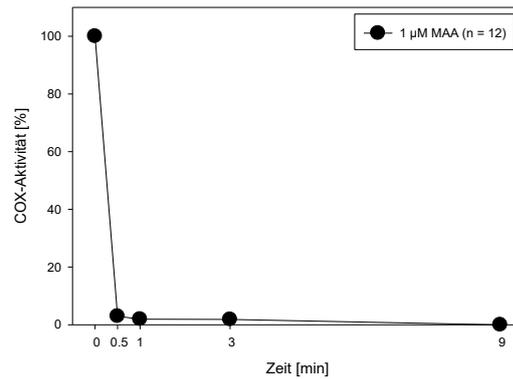
Konzentrations-Wirkungs-Kurve und entsprechende Zeitkinetik von 6-MNA gemessen mittels Chemilumineszenz (Aktivität der COX-1). Die COX-1-Aktivität (in Prozent, y-Achse) ist abhängig von der Konzentration des Inhibitors bzw. der Zeit der Inkubation der Thrombozytenmikrosomen mit dem Inhibitor (in  $\mu\text{M}$  bzw. min, x-Achse) aufgeführt.

### 3.2.14 Hemmung der COX-1 durch Methylaminoantipyrin (MAA)

MAA hemmt die COX-1 zeitunabhängig. Bei 0,3  $\mu\text{M}$  war das Enzym halbmaximal gehemmt und bei 10  $\mu\text{M}$  wurde die vollständige Hemmung erreicht. Nach 30 Sekunden ließ sich die COX-1 schon zu über 90 % hemmen, während eine vollständige Inhibition schon nach drei Minuten erreicht wurde.



**Abb. 40: KWK von MAA**

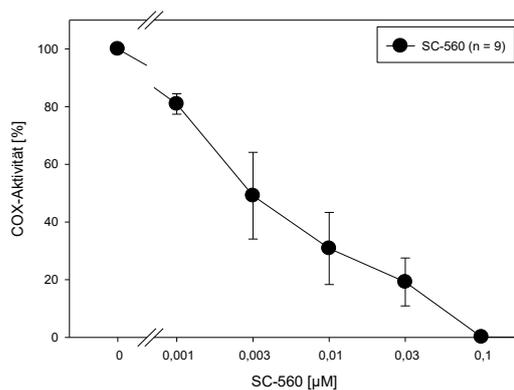


**Abb. 41: Zeitkinetik von MAA (1 µM)**

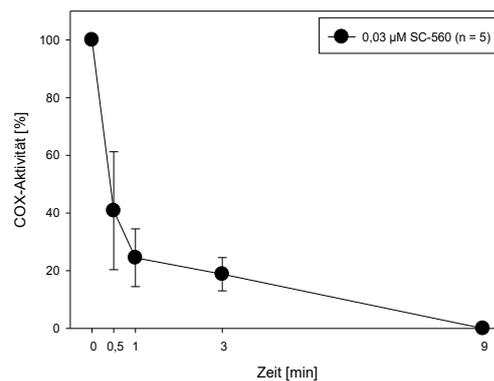
Konzentrations-Wirkungs-Kurve und entsprechende Zeitkinetik von MAA gemessen mittels Chemilumineszenz (Aktivität der COX-1). Die COX-1-Aktivität (in Prozent, y-Achse) ist abhängig von der Konzentration des Inhibitors bzw. der Zeit der Inkubation der Thrombozytenmikrosomen mit dem Inhibitor (in µM bzw. min, x-Achse) aufgeführt.

### 3.2.15 Hemmung der COX-1 durch SC-560

Celecoxib hemmt die COX-1 zeitunabhängig. Bei 0,003 µM war das Enzym fast halbmaximal gehemmt und bei 0,1 µM wurde die vollständige Hemmung erreicht. Nach drei Minuten ließ sich die COX-1 schon zu ca. 40 % hemmen, während eine vollständige Inhibition nach neun Minuten erreicht wurde.



**Abb. 42: KWK von SC-560**

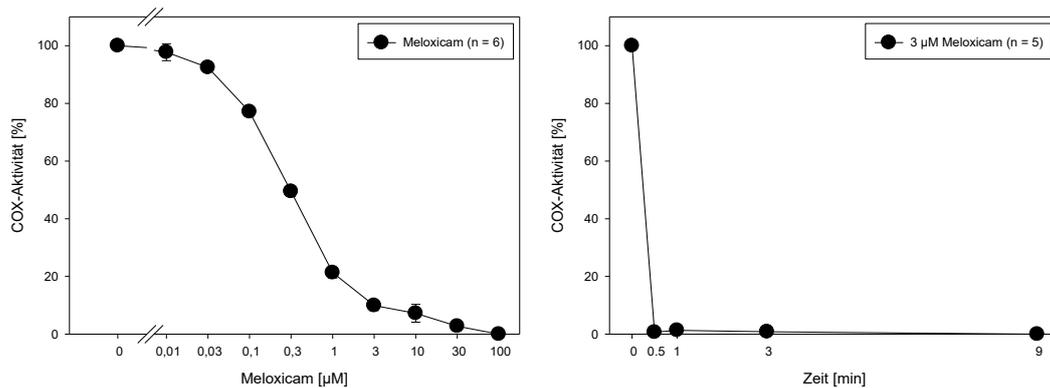


**Abb. 43: Zeitkinetik von SC-560 (0,03 µM)**

Konzentrations-Wirkungs-Kurve und entsprechende Zeitkinetik von SC-560 gemessen mittels Chemilumineszenz (Aktivität der COX-1). Die COX-1-Aktivität (in Prozent, y-Achse) ist abhängig von der Konzentration des Inhibitors bzw. der Zeit der Inkubation der Thrombozytenmikrosomen mit dem Inhibitor (in µM bzw. min, x-Achse) aufgeführt.

### 3.2.16 Hemmung der COX-1 durch Meloxicam

Meloxicam hemmt die COX-1 zeitunabhängig. Bei 0,3  $\mu\text{M}$  war das Enzym halbmaximal gehemmt, bei 1  $\mu\text{M}$  noch zu ca. 20 % aktiv und bei 100  $\mu\text{M}$  wurde die vollständige Hemmung erreicht. Nach 30 Sekunden ließ sich die COX-1 schon zu über 95 % hemmen, während eine vollständige Inhibition schon nach drei Minuten erreicht wurde.



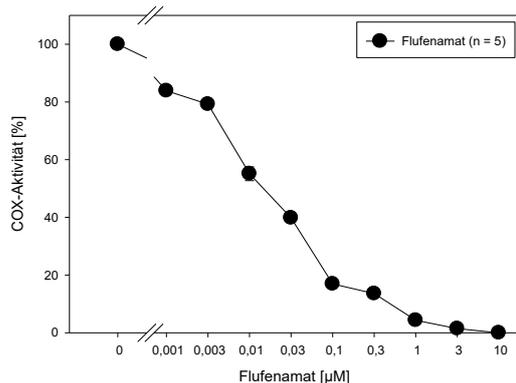
**Abb. 44: KWK von Meloxicam**

**Abb. 45: Zeitkinetik von Meloxicam (3  $\mu\text{M}$ )**

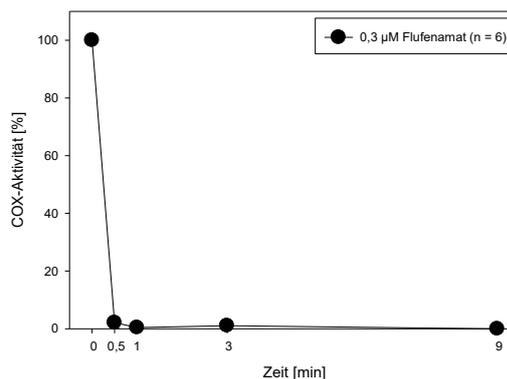
Konzentrations-Wirkungs-Kurve und entsprechende Zeitkinetik von Meloxicam gemessen mittels Chemilumineszenz (Aktivität der COX-1). Die COX-1-Aktivität (in Prozent, y-Achse) ist abhängig von der Konzentration des Inhibitors bzw. der Zeit der Inkubation der Thrombozytenmikrosomen mit dem Inhibitor (in  $\mu\text{M}$  bzw. min, x-Achse) aufgeführt.

### 3.2.17 Hemmung der COX-1 durch Flufenamat

Flufenamat hemmt die COX-1 zeitunabhängig. Bei 0,01  $\mu\text{M}$  war das Enzym fast halbmaximal gehemmt, bei 0,1  $\mu\text{M}$  noch zu ca. 20 % aktiv und bei 10  $\mu\text{M}$  wurde die vollständige Hemmung erreicht. Nach 30 Sekunden ließ sich die COX-1 schon zu über 95 % hemmen, während eine vollständige Inhibition schon nach drei Minuten erreicht wurde.



**Abb. 46: KWK von Flufenamat**

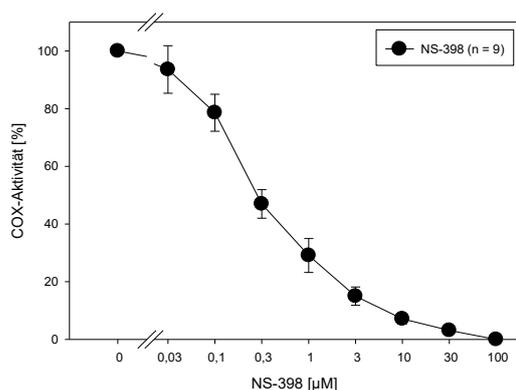


**Abb. 47: Zeitkinetik von Flufenamat (0,3 µM)**

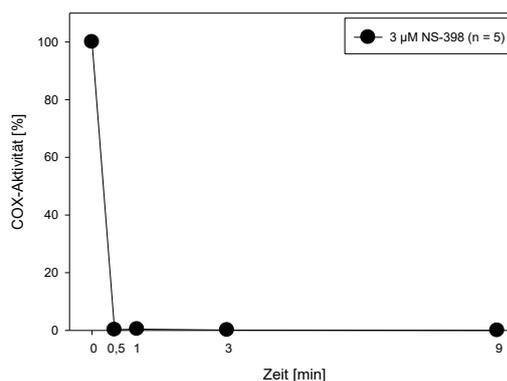
Konzentrations-Wirkungs-Kurve und entsprechende Zeitkinetik von Flufenamat gemessen mittels Chemilumineszenz (Aktivität der COX-1). Die COX-1-Aktivität (in Prozent, y-Achse) ist abhängig von der Konzentration des Inhibitors bzw. der Zeit der Inkubation der Thrombozytenmikrosomen mit dem Inhibitor (in µM bzw. min, x-Achse) aufgeführt.

### 3.2.18 Hemmung der COX-1 durch NS-398

NS-398 hemmt die COX-1 zeitunabhängig. Bei 0,3 µM war das Enzym ungefähr halbmaximal gehemmt, bei 3 µM noch zu ca. 20 % aktiv und bei 100 µM wurde die vollständige Hemmung erreicht. Nach 30 Sekunden ließ sich die COX-1 schon fast vollständig inhibieren.



**Abb. 48: KWK von NS-398**

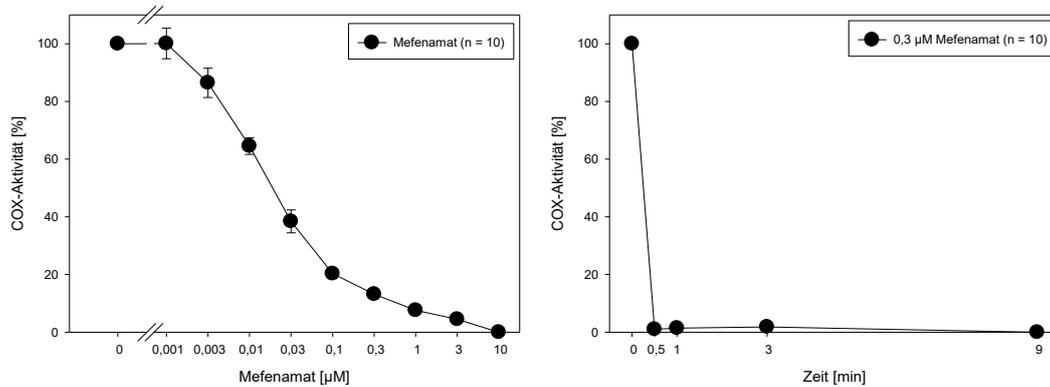


**Abb. 49: Zeitkinetik von NS-398 (3 µM)**

Konzentrations-Wirkungs-Kurve und entsprechende Zeitkinetik von NS-398 gemessen mittels Chemilumineszenz (Aktivität der COX-1). Die COX-1-Aktivität (in Prozent, y-Achse) ist abhängig von der Konzentration des Inhibitors bzw. der Zeit der Inkubation der Thrombozytenmikrosomen mit dem Inhibitor (in µM bzw. min, x-Achse) aufgeführt.

### 3.2.19 Hemmung der COX-1 durch Mefenamat

Mefenamat hemmt die COX-1 zeitunabhängig. Bei 0,1  $\mu\text{M}$  war das Enzym noch zu ca. 20 % aktiv und bei 10  $\mu\text{M}$  wurde die vollständige Hemmung erreicht. Nach 30 Sekunden ließ sich die COX-1 schon fast vollständig inhibieren.



**Abb. 50: KWK von Mefenamat**

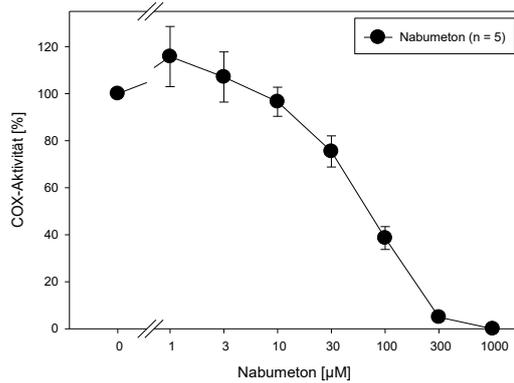
**Abb. 51: Zeitkinetik Mefenamat (0,3  $\mu\text{M}$ )**

Konzentrations-Wirkungs-Kurve und entsprechende Zeitkinetik von Mefenamat gemessen mittels Chemilumineszenz (Aktivität der COX-1). Die COX-1-Aktivität (in Prozent, y-Achse) ist abhängig von der Konzentration des Inhibitors bzw. der Zeit der Inkubation der Thrombozytenmikrosomen mit dem Inhibitor (in  $\mu\text{M}$  bzw. min, x-Achse) aufgeführt.

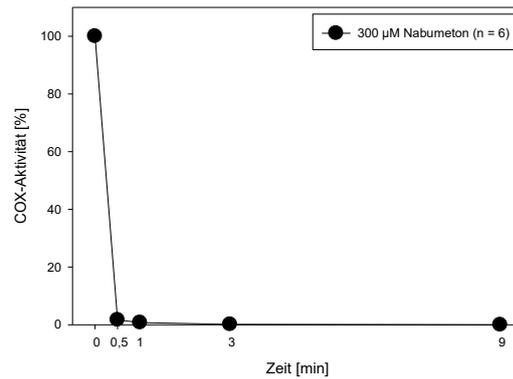
### 3.2.20 Hemmung der COX-1 durch Nabumeton

Nabumeton hemmt die COX-1 zeitunabhängig. Bei 100  $\mu\text{M}$  war das Enzym noch zu ca. 40 % aktiv und bei 1000  $\mu\text{M}$  wurde die vollständige Hemmung erreicht. Nach 30 Sekunden ließ sich die COX-1 schon fast vollständig inhibieren.

Warum die Aktivität der COX-1 nach Zugabe des Inhibitors zunächst gegenüber der Positivkontrolle anstieg, ist unklar. Allerdings war dieser Anstieg in allen Versuchen mit Nabumeton reproduzierbar.



**Abb. 52: KWK von Nabumeton**

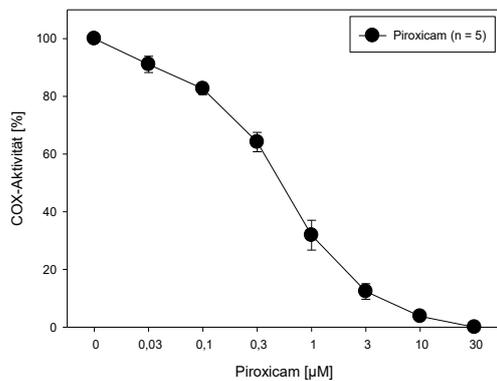


**Abb. 53: Zeitkinetik von Nabumeton (300 µM)**

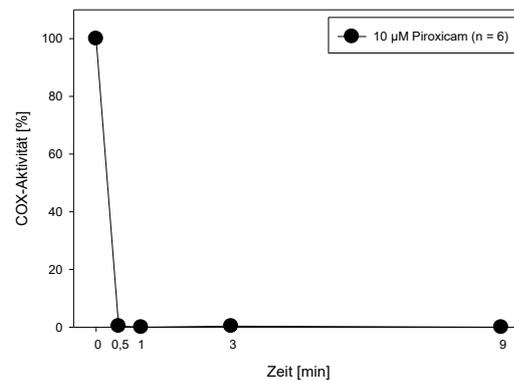
Konzentrations-Wirkungs-Kurve und entsprechende Zeitkinetik von Nabumeton gemessen mittels Chemilumineszenz (Aktivität der COX-1). Die COX-1-Aktivität (in Prozent, y-Achse) ist abhängig von der Konzentration des Inhibitors bzw. der Zeit der Inkubation der Thrombozytenmikrosomen mit dem Inhibitor (in µM bzw. min, x-Achse) aufgeführt.

### 3.2.21 Hemmung der COX-1 durch Piroxicam

Piroxicam hemmt die COX-1 zeitunabhängig. Bei 0,1 µM war das Enzym noch zu ca. 30 % aktiv und bei 30 µM wurde die vollständige Hemmung erreicht. Nach 30 Sekunden ließ sich die COX-1 schon fast vollständig inhibieren.



**Abb. 54: KWK von Piroxicam**



**Abb. 55: Zeitkinetik von Piroxicam (10 µM)**

Konzentrations-Wirkungs-Kurve und entsprechende Zeitkinetik von Piroxicam gemessen mittels Chemilumineszenz (Aktivität der COX-1). Die COX-1-Aktivität (in Prozent, y-Achse) ist abhängig von der Konzentration des Inhibitors bzw. der Zeit der Inkubation der Thrombozytenmikrosomen mit dem Inhibitor (in µM bzw. min, x-Achse) aufgeführt.

### 3.2.22 Hemmung der COX-1 durch 4-Aminoantipyrin

4-Aminoantipyrin hemmt die COX-1 zeitunabhängig. Bei 0,3  $\mu\text{M}$  war das Enzym noch zu ca. 60 % aktiv und bei 100  $\mu\text{M}$  wurde die vollständige Hemmung erreicht. Nach 30 Sekunden ließ sich die COX-1 schon fast vollständig inhibieren.

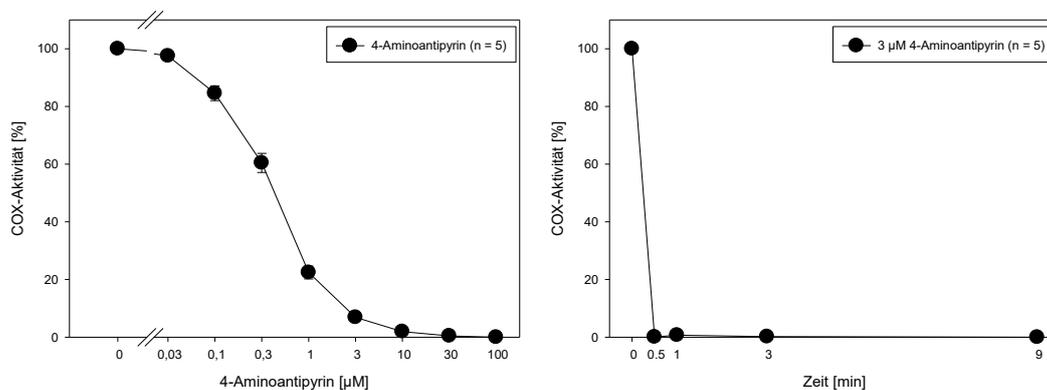


Abb. 56: KWK von 4-Aminoantipyrin

Abb. 57: Zeitkinetik von 4-Aminoantipyrin (3  $\mu\text{M}$ )

Konzentrations-Wirkungs-Kurve und entsprechende Zeitkinetik von 4-Aminoantipyrin gemessen mittels Chemilumineszenz (Aktivität der COX-1). Die COX-1-Aktivität (in Prozent, y-Achse) ist abhängig von der Konzentration des Inhibitors bzw. der Zeit der Inkubation der Thrombozytenmikrosomen mit dem Inhibitor (in  $\mu\text{M}$  bzw. min, x-Achse) aufgeführt.

### 3.2.23 Auswertung der k-Werte

Der k-Wert beschreibt die Geschwindigkeit der Inhibition der COX-1 durch die jeweilig untersuchte Hemmsubstanz, ermittelt durch die Zeitkinetik. Ein hoher Wert steht für eine schnelle Inhibition, ein niedriger Wert zeigt eine langsamere Hemmkinetik an.

Die k-Werte wurden nach aufsteigender Reihenfolge sortiert. ASS hemmt die COX-1 von allen untersuchten NSAIDs am langsamsten. 4-Aminoantipyrin zeigte unter den untersuchten Substanzen die schnellste Zeitkinetik.

NSAID-Name	k-Wert	Gewählte Hemmkonzentration	Interaktion: ja / nein?
Acetylsalicylsäure	0,3098	100 $\mu\text{M}$	nein
Ketorolac	0,4286	0,3 $\mu\text{M}$	nein
Diclofenac	1,0293	0,1 $\mu\text{M}$	nein
Flurbiprofen	1,0293	0,03 $\mu\text{M}$	nein
Meclofenamat	1,2201	0,1 $\mu\text{M}$	nein

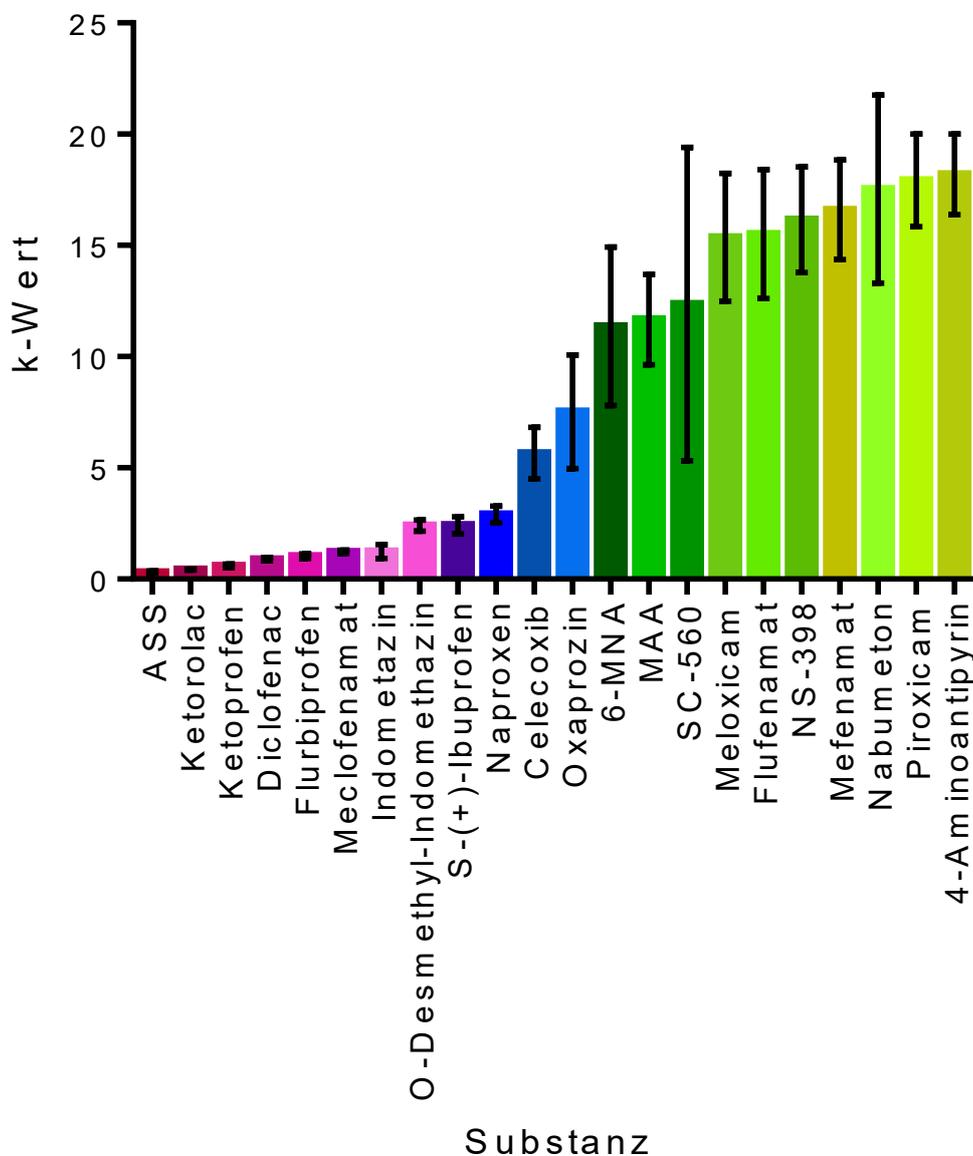
Indometazin	1,2443	0,3 $\mu\text{M}$	nein
Ketoprofen	1,4376	0,1 $\mu\text{M}$	nein
O-Desmethyl-Indometazin	2,4128	3 $\mu\text{M}$	nein
Ibuprofen	2,4184	0,1 $\mu\text{M}$	ja
Naproxen	2,9126	0,3 $\mu\text{M}$	ja
Celecoxib	5,664	1 $\mu\text{M}$	ja
Oxaprozin	7,521	0,3 $\mu\text{M}$	ja
6-MNA	11,3674	3 $\mu\text{M}$	ja
MAA	11,6723	1 $\mu\text{M}$	ja
SC-560	12,3651	0,03 $\mu\text{M}$	ja
Meloxicam	15,37	3 $\mu\text{M}$	ja
Flufenamat	15,5167	0,3 $\mu\text{M}$	ja
NS-398	16,1596	3 $\mu\text{M}$	ja
Mefenamat	16,603	0,3 $\mu\text{M}$	ja
Nabumeton	17,5307	300 $\mu\text{M}$	ja
Piroxicam	17,9177	10 $\mu\text{M}$	ja
4-Aminoantipy- rin	18,196	3 $\mu\text{M}$	ja

**Tabelle 3: Übersicht der k-Werte und des jeweiligen Interaktionspotentials**

In der obigen Tabelle ist eine Übersicht der verschiedenen Hemmsubstanzen, sortiert nach aufsteigender Geschwindigkeit der Inhibition an der COX-1, dargestellt. Außerdem führt sie für jede Substanz die mittels Konzentrations-Wirkungs-Kurve ermittelte Konzentration auf, die die COX-1 zu ca. 80 % hemmt und somit für die nachfolgende Zeitkinetik verwendet wurde, mittels derer dann der k-Wert berechnet werden konnte. In der letzten Spalte ist aufgeführt, ob sich in der Thrombozytenaggregation eine Interaktion zwischen der jeweiligen Hemmsubstanz und ASS beobachten ließ.

Es lässt sich feststellen, dass insgesamt große Unterschiede zwischen den k-Werten der einzelnen Substanzen zu beobachten sind. Diese Unterschiede lassen für sich allein allerdings noch keinen Schluss auf das Interaktionspotential des jeweiligen Inhibitors zu. Zwischen O-Desmethyl-Indometazin und Ibuprofen ist die Differenz der k-Werte sehr klein (0,0056), obwohl genau zwischen diesen beiden Substanzen die Grenze zwischen fehlender und zu beobachtender Interaktion mit ASS gezogen werden kann.

## Vergleich k-Werte



**Abb. 58: k-Werte der verschiedenen NSAID-Zeitkinetiken**

Abgebildet sind die Mittelwerte und die Standardfehler (SEM) der k-Werte der untersuchten NSAIDs in aufsteigender Reihenfolge. ASS hat mit 0,3098 den kleinsten und 4-Aminoantipyrin mit 18,196 den größten k-Wert. ASS hemmt die COX-1 in unseren Versuchen demnach am langsamsten unter allen untersuchten Substanzen und 4-Aminoantipyrin am schnellsten. Alle Substanzen mit einem kleineren k-Wert als O-Desmethyln-Indometazin inklusive O-Desmethyln-Indometazin hemmen die COX-1 zeitabhängig, während alle aufgeführten Substanzen mit einem höheren k-Wert als Ibuprofen inklusive Ibuprofen einen zeitunabhängigen Hemmtyp aufweisen.

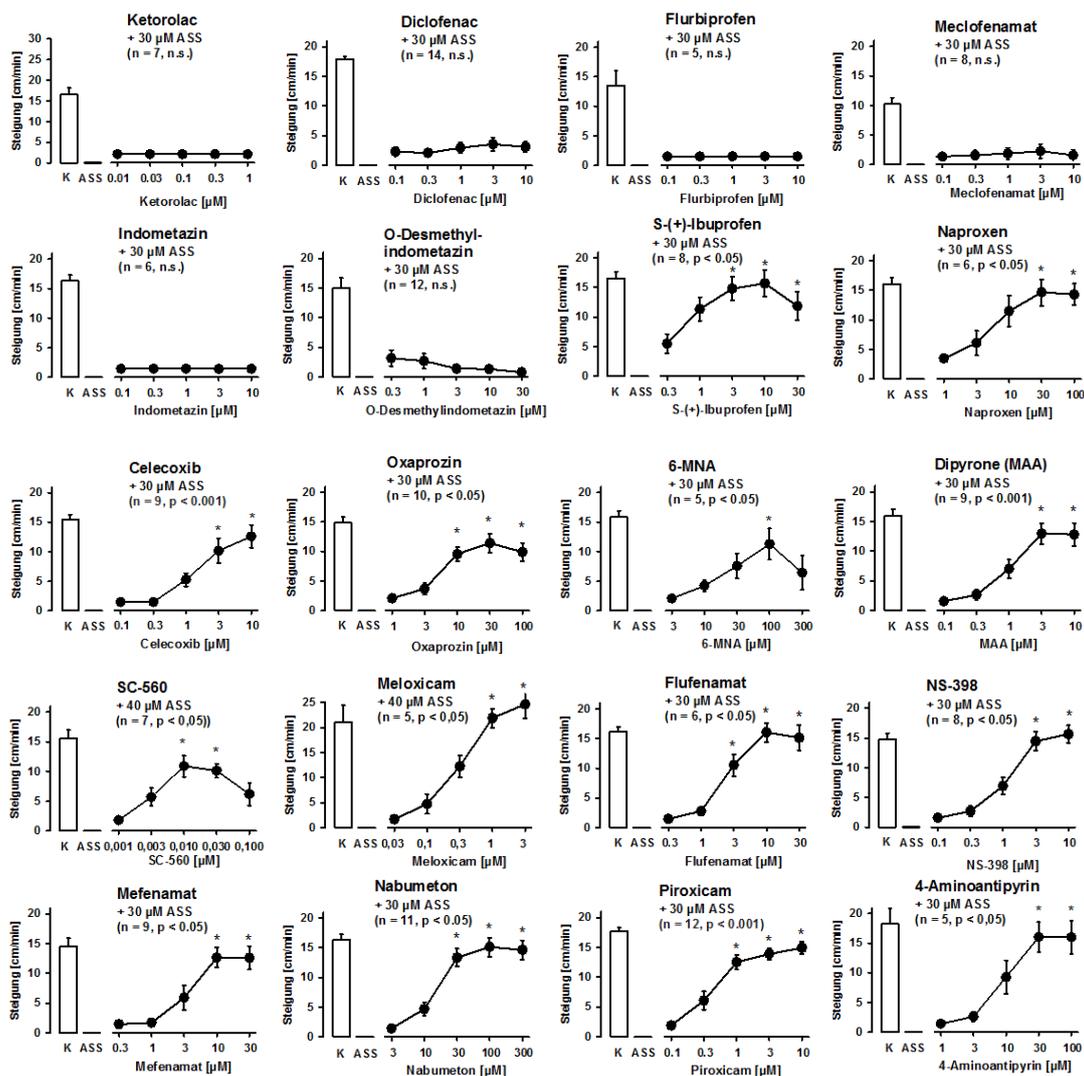
### 3.2.24 Auswertung des HillSlopes und $\log IC_{50}$ (KWK)

Als Maß der Steigung der KWKs wurde der HillSlope der KWK jeder Konzentration bestimmt. Außerdem wurde die  $\log IC_{50}$  berechnet. Es ließ sich allerdings kein Zusammenhang zwischen steigendem k-Wert (Zeitkinetik der Inhibition der COX-1 durch das entsprechende NSAID) und dem HillSlope bzw.  $\log IC_{50}$  feststellen (Daten nicht gezeigt).

## 3.3 Interaktion der untersuchten NSAID-Substanzen mit der Hemmung der Thrombozytenaggregation durch ASS

Die Ergebnisse zur Interaktion der NSAID-Substanzen mit der Thrombozytenfunktionshemmung durch ASS sind in Abb. 59: Interaktionen der untersuchten NSAIDs mit ASS in der Thrombozytenaggregation dargestellt. Freundlicherweise konnte im Rahmen dieser Arbeit für die NSAIDs Ketorolac, Diclofenac, Flurbiprofen, Meclofenamat, Indometazin, Ketoprofen, O-Desmethyl-Indometazin, 6-MNA, NS-398, Mefenamat, Nabumeton, Ibuprofen, Naproxen, Oxaprozin, Flufenamat, Piroxicam, Celecoxib und Dipyron (MAA) auf schon vorhandene laborinterne Daten zurückgegriffen werden. Diese wurden zum größten Teil von der chemisch technischen Laborassistentin durchgeführt und teils bereits von Herrn Saxena veröffentlicht (dies gilt für die NSAIDs Ketorolac, Diclofenac, Ibuprofen, Naproxen, Oxaprozin, Flufenamat, Piroxicam, Celecoxib und Dipyron (MAA) (Saxena et al. 2013)). Es wurden einzelne Versuche zur Verifikation und Erweiterung ergänzt.

Für die NSAIDs Ketorolac, Diclofenac, Flurbiprofen, Meclofenamat, Indometazin und O-Desmethyl-Indometazin konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der Negativkontrolle und dem Ansatz mit dem jeweiligen NSAID und ASS ermittelt werden. Somit konnte keine Interaktion nachgewiesen werden. Im Gegensatz hierzu ergab sich bei S-(+)-Ibuprofen, Naproxen, Celecoxib, Oxaprozin, 6-MNA, MAA, SC-560, Meloxicam, Flufenamat, NS-398, Mefenamat, Nabumeton, Piroxicam und 4-Aminoantipyrin ein signifikanter Unterschied zwischen dem Ansatz und der Negativkontrolle, was sich als Interaktion des Inhibitors mit ASS interpretieren lässt.



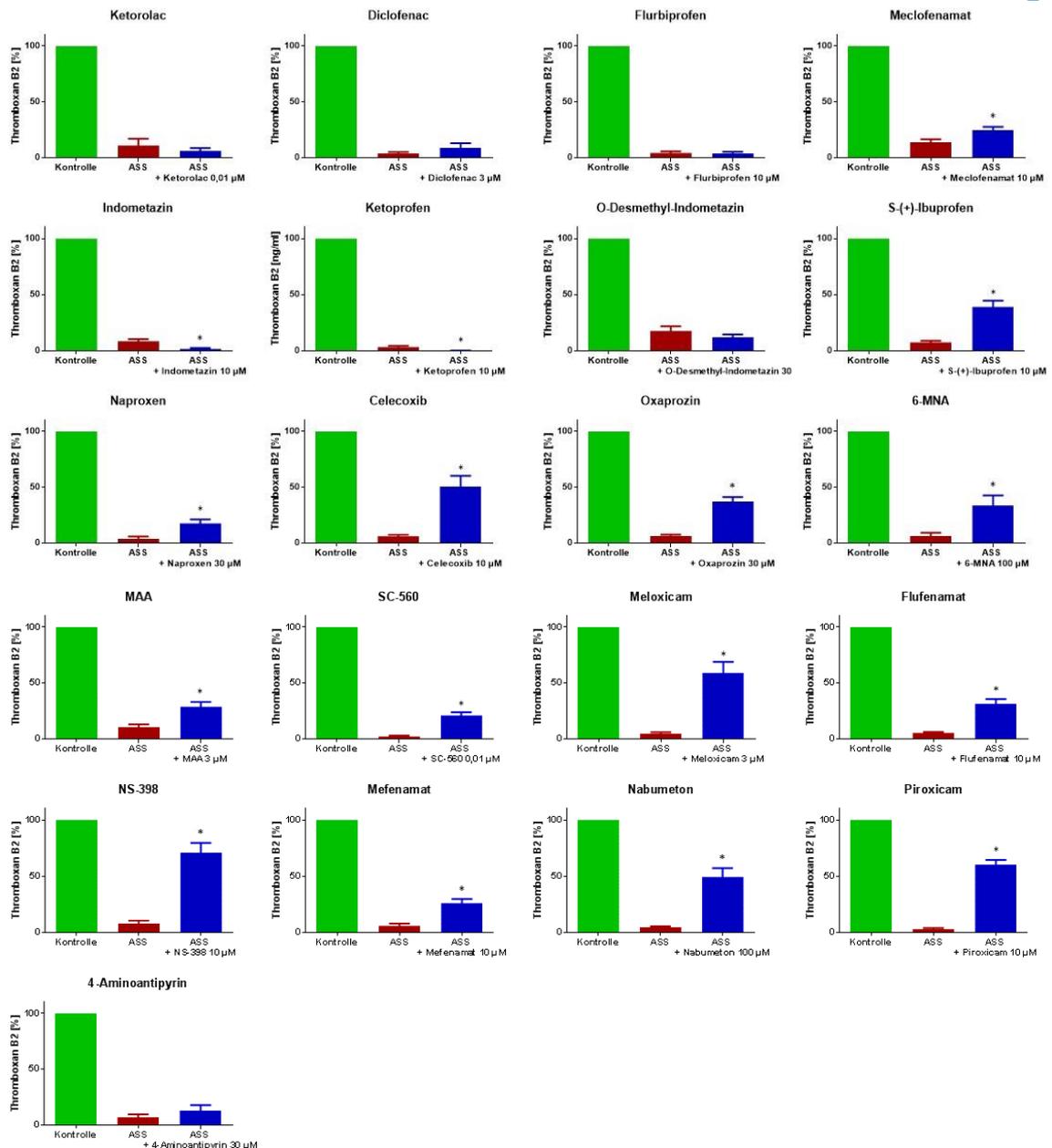
**Abb. 59: Interaktionen der untersuchten NSAIDs mit ASS in der Thrombozytenaggregation**

Jeweils dargestellt ist die Thrombozytenaggregation eines jeden Inhibitors in Anwesenheit von ASS im Versuchsansatz (Mittelwerte der Steigung der Aggregationskurve in cm/min  $\pm$  SEM, y-Achse) gegen die jeweils verwendete Inhibitor-Konzentration (in  $\mu$ M, x-Achse) aufgetragen. Die Thrombozyten wurden initial mit ASS gehemmt und im nächsten Schritt die Interaktion mit einer NSAID-KWK gemessen. Interagiert der verwendete Inhibitor nicht, so lässt sich auch bei höheren Hemmstoffkonzentrationen keine Aggregation bei den durch ASS inhibierten Thrombozyten auslösen. Aggregieren die initial mit ASS gehemmten Thrombozyten nach Zugabe eines anderen NSAIDs wieder, kann davon ausgegangen werden, dass das NSAID mit ASS interagiert. Mittels einer Varianzanalyse (t-Test) konnten die Konzentrationen des jeweiligen NSAIDs bestimmt werden, die sich in ihrer Aggregation signifikant ( $p < 0,05$ ) von 0 (= keine Aggregation) unterscheiden (markiert mit einem \*). Die Daten wurden teilweise im Rahmen von Vorarbeiten der Arbeitsgruppe erhoben (siehe Text).

### 3.4 Interaktion der untersuchten NSAID-Substanzen mit ASS, gemessen mittels Thromboxan B<sub>2</sub>-Quantifizierung (EIA Kit)

Die Interaktion mit ASS wurde mit Hilfe des „Thromboxane B<sub>2</sub> EIA Kits“ von Cayman Chemicals ermittelt. Die Ergebnisse sind in Abb. 60: Interaktionen der untersuchten

NSAIDs mit ASS in der Thromboxan B<sub>2</sub>-Quantifizierung (EIA Kit) zusammengefasst. Sie bestätigen größtenteils die mittels Thrombozytenaggregation ermittelten Ergebnisse der Interaktion der Substanzen mit ASS (vorhanden bzw. nicht vorhanden). Auch hier konnte zusätzlich zu den im Rahmen dieser Arbeit produzierten Daten auf Ergebnisse früherer Versuche mit gleichem Versuchsaufbau u.a. aus der Arbeit (Saxena et al. 2013) zurück gegriffen werden.



**Abb. 60: Interaktionen der untersuchten NSAIDs mit ASS in der Thromboxan B<sub>2</sub>-Quantifizierung (EIA Kit)**

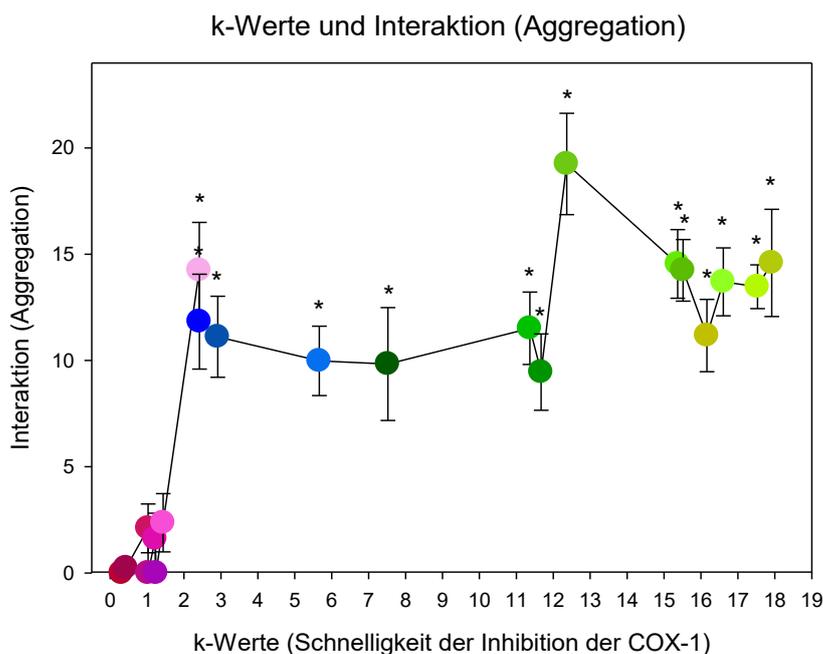
Auf der Y-Achse ist der prozentuale Anteil des jeweils synthetisierten TXB<sub>2</sub> in % (Mittelwerte +- SEM) dargestellt, wobei die Kontrolle jedes einzelnen Versuchs ohne ASS als 100 % definiert wurde (grüne Säulen). Durch Zugabe von ASS zum Assay wurde die TXB<sub>2</sub>-Synthese in nahezu allen Versuchsansätzen nahezu vollständig gehemmt (rote Säulen). Die blauen Säulen stellen die TXB<sub>2</sub>-Synthese der durch ASS inhibierten Thrombozyten bei gleichzeitiger Zugabe des jeweiligen NSAIDs dar. Der Stern bedeutet, dass sich die gemessene Konzentration an TXB<sub>2</sub> nach Zugabe des Hemmstoffes signifikant ( $p < 0,05$ ) von der Negativkontrolle (nur ASS) unterscheidet. Die Daten wurden teilweise im Rahmen von Vorarbeiten der Arbeitsgruppe erhoben (siehe Text).

### 3.5 Zusammenhang zwischen k-Werten und Interaktion

Mit steigendem k-Wert lässt sich eine erhebliche Zunahme der Interaktion beobachten, wobei hier jedoch kein linearer Zusammenhang besteht. Vielmehr scheint es einen

Schwellenwert innerhalb der k-Werte zu geben, ab dem eine Interaktion erkennbar wird. Im Falle der NSAIDs, die im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden, liegt der Schwellenwert zwischen O-Desmethyl-Indometazin (k-Wert = 2,4128) und Ibuprofen (k-Wert = 2,4184).

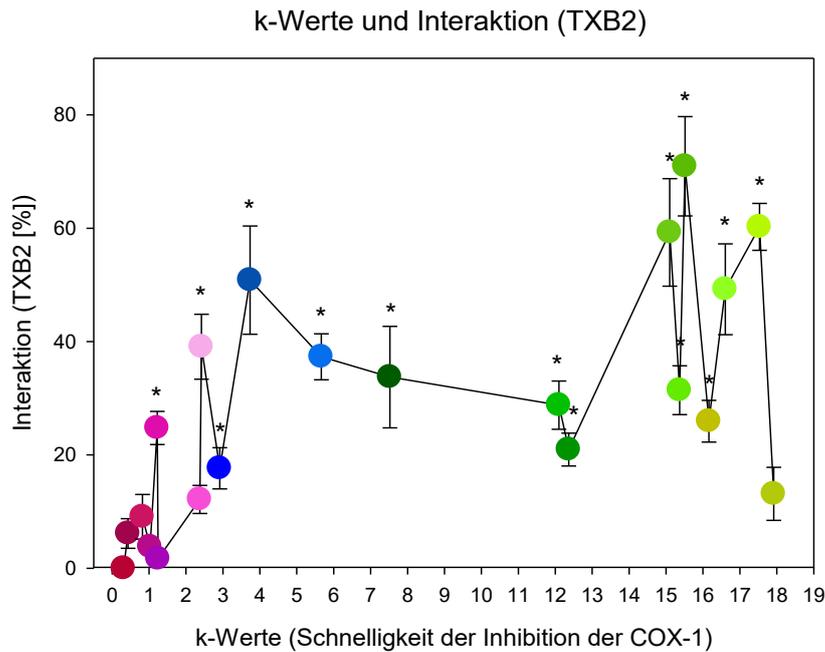
Mittels einer ANOVA Varianzanalyse zwischen der Negativkontrolle (nur ASS als Inhibitor) und den verschiedenen NSAIDs wurden diejenigen Substanzen identifiziert, deren Aggregationsverhalten sich signifikant von der Negativkontrolle unterscheiden. Hierbei zeigte sich, dass sich die Interaktion derjenigen NSAIDs, die einen kleineren k-Wert als O-Desmethyl-Indometazin (inklusive O-Desmethyl-Indometazin) aufzeigten, keinen signifikanten Unterschied zu 0 (Negativkontrolle) aufwiesen. Im Gegensatz hierzu zeigte sich für alle NSAIDs mit einem k-Wert von 2,4184 oder darüber ein signifikanter Unterschied im Vergleich zur Negativkontrolle.



**Abb. 61: Zusammenhang zwischen k-Werten und Interaktion (Aggregation)**

Abgebildet ist das Ausmaß der Interaktion des jeweiligen NSAID mit ASS als Zeitkinetik der Hemmung der COX-1 (Mittelwerte der Steigung der Aggregationskurve im Interaktions-Versuchsaufbau [cm/min]  $\pm$  SEM, y-Achse), aufgetragen gegen den k-Wert jeder einzelnen Substanz (Ausdruck der Hemmkinetik des NSAIDs im Chemilumineszenz-Versuchsaufbau, x-Achse). Jeder Punkt in der Abbildung entspricht einer Inhibitorsubstanz. Diese sind nach steigendem k-Wert aufgeführt. Die Sternchen markieren die Substanzen, die in der die Interaktion einen signifikanten Unterschied ( $p < 0,05$ ) zwischen der Negativkontrolle mit ASS und der Interaktionsmessung aufweist (ermittelt mittels ANOVA one way).

Analog wurde auch der Zusammenhang zwischen dem k-Wert und der Interaktion mittels einer Thromboxan B<sub>2</sub>-Analyse geprüft. Auch in diesem Versuchsansatz zeigt sich ein gut erkennbarer und statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen steigendem k-Wert und Interaktion. Meclofenamat und 4-Aminoantipyrin bilden hierbei jedoch eine Ausnahme: Für Meclofenamat ergibt sich in der Thromboxan B<sub>2</sub>-Quantifizierung ein Unterschied zur Negativkontrolle mit ASS (also eine Interaktion), obwohl es einen niedrigen k-Wert aufweist und in der Thrombozytenaggregation keine Interaktion zeigt. Auch bei 4-Aminoantipyrin zeigt sich ein Unterschied zwischen Thromboxan B<sub>2</sub>-Quantifizierung und Thrombozytenaggregation: Obwohl in der Aggregation ein signifikanter Unterschied zwischen der Interaktion und der Negativkontrolle gemessen wurde, lässt sich diese Signifikanz in der Thromboxan B<sub>2</sub>-Quantifizierung nicht reproduzieren.



**Abb. 62: Zusammenhang zwischen k-Werten und Interaktion (Thromboxan B<sub>2</sub>-Quantifizierung)**

Abgebildet ist das Ausmaß der Interaktion des jeweiligen NSAID mit ASS als Thromboxanproduktion der COX-1 (Mittelwerte der TXB<sub>2</sub>-Produktion im Interaktions-Versuchsaufbau [%]  $\pm$  SEM, y-Achse), aufgetragen gegen den k-Wert jeder einzelnen Substanz (Ausdruck der Hemmkinetik des NSAIDs im Chemilumineszenz-Versuchsaufbau, x-Achse). Jeder Punkt in der Abbildung entspricht einer Inhibitorsubstanz. Diese sind nach steigendem k-Wert aufgeführt. Die Sternchen markieren die Substanzen, die in der Interaktion einen signifikanten Unterschied ( $p < 0,05$ ) zwischen der Negativkontrolle mit ASS und der Interaktionsmessung aufwiesen (ermittelt mittels ANOVA one way).

## 4 Diskussion

Das Hauptergebnis dieser Dissertation besteht darin, dass erstmals gezeigt werden kann, dass das Interaktionspotential eines NSAID-Analgetikums mit ASS in einem Zusammenhang mit seiner Hemmkinetik an der humanen thrombozytären COX-1 steht. Zeitabhängige Inhibitoren interagieren nicht mit ASS, während zeitunabhängige Inhibitoren mit ASS an der initial durch ASS gehemmten COX-1 interagieren. Hier lässt sich ein Schwellenwert der Inhibitions geschwindigkeit ( $k$ -Wert) bestimmen, der zwischen zeitabhängig und zeitunabhängig differenziert und eine Grenze hinsichtlich der Interaktion zwischen NSAIDs und ASS festlegt.

Für NSAIDs lassen sich verschiedene Hemmtypen an der COX-1 unterscheiden. Die Bindungseigenschaften eines Inhibitors an das aktive Zentrum der COX und der damit verbundene Modus der Enzymhemmung haben entsprechend den Ergebnissen dieser Arbeit einen erheblichen Einfluss auf die Interaktionsfähigkeit der reversiblen COX-Inhibitoren mit ASS. Diesbezüglich lässt sich feststellen, dass die chemische Verwandtschaft der NSAIDs untereinander interessanterweise nicht einfach auf den Hemmtyp und damit die Interaktion mit ASS rückschließen lässt.

Die Ergebnisse dieser Dissertation haben ferner keinen Anhaltspunkt ergeben, dass ein Zusammenhang zwischen  $IC_{50}$  oder Hill-Slope einerseits und der Interaktion zwischen NSAID und ASS auf der anderen Seite besteht.

### 4.1 Wahl des Versuchsaufbaus und der analytischen Methoden

#### 4.1.1 Thrombozytenaggregation

Als „*read out*“ zur Eruiierung des Interaktionspotentials der Inhibitorsubstanzen mit ASS ist die Thrombozytenaggregation grundsätzlich sehr gut geeignet. Thrombozyten sind infolge stark aktivierender Feedbacksysteme (z.B. ADP, Thromboxan) nahezu nach einem Alles-Oder-Nichts-Prinzip aktivierbar, und können, sofern sie in Gegenwart eines Agonisten thromboxanabhängig aktiviert werden, durch ASS konzentrationsabhängig inhibiert werden. Die Ergebnisse dieser und vorangegangener Untersuchungen (Saxena et al. 2013) haben überzeugend gezeigt, dass die zu erwartende Hemmung von Thrombozyten z.B. nach Stimulation durch Arachidonsäure in Gegenwart zahlreicher NSAID-Analgetika teilweise oder vollständig verhindert werden kann.

Im Gegensatz hierzu eignet sich die Thrombozytenaggregation allerdings weniger gut, um Konzentrations-Wirkungs-Kurven (KWKs) zu ermitteln und darauf aufbauende Zeitkinetiken einzelner Inhibitoren der COX-1 zu bestimmen. Initiale Versuche, KWKs von schnell hemmenden COX-Inhibitoren, wie z.B. Ibuprofen, mittels Thrombozytenaggregation zu erstellen, führten zu dem Problem, dass die Thrombozyten unterschiedlicher Spender bei individuell sehr unterschiedlich hohen Hemmstoffkonzentrationen inhibiert wurden. Es zeigte sich ferner, dass die relativ steilen Konzentrations-Wirkungs-Kurven so „schnell“ auf sehr niedrige Werte fielen, dass es nicht immer möglich war, reproduzierbare  $IC_{80}$ -Werte zur Erstellung der Zeitkinetiken für jeden Versuch einzeln zu bestimmen.

Daher war es notwendig, auf ein anderes Modell zurückzugreifen, das die Aktivität der thrombozytären Cyclooxygenase (COX-1) besser repräsentiert.

#### 4.1.2 Chemilumineszenz

Für die vorliegende Dissertation wurde zur Messung der Aktivität der thrombozytären Cyclooxygenase (COX-1) die Chemilumineszenzbestimmung an Mikrosomen gewählt, die aus fragmentierten Thrombozyten gesunder Spender gewonnen wurden. Die COX-1-Aktivität in Mikrosomen humaner Thrombozyten verhält sich bei geeigneter Lagerung unter Stickstoff über mehrere Tage ausreichend stabil. Das COX-Enzym befindet sich für die Hemmsubstanzen offensichtlich gut zugänglich an der mikrosomalen Membran.

Die Bestimmung der Enzymaktivität mittels Chemilumineszenz unterliegt im Unterschied zur Aktivierungsreaktion bei der Aggregation intakter Thrombozyten zudem keiner zeitlichen Latenz, d.h. die zeitliche Kinetik der Hemmung des COX-Enzyms kann direkt verfolgt werden. Außerdem verhält sich die COX-1 an Thrombozytenmikrosomen verschiedener Spender konstanter als im Aggregationsmodell.

Es stellt sich in diesem Zusammenhang die Frage, ob die Untersuchungen im Rahmen dieser Dissertation auch am isolierten, gereinigten Enzym durchgeführt werden könnten. Ein gereinigtes COX-1-Enzym wäre jedoch von der Zellmembran gelöst, was nicht mehr dem physiologischen Zustand dieses membranständigen homodimeren Enzyms entspricht. Neben zu erwartenden Auswirkungen auf die Interaktion des isolierten COX-Enzyms mit Inhibitoren ist das isolierte Enzym weitaus instabiler als die membranständige COX-1 im Mikrosomen-Modell. Dies haben Erfahrungen im eigenen Labor mit kommerziell erhältlichem gereinigtem COX-Enzym (z.B. aus der Samenblase von Schafen) gezeigt.

Mit Hilfe der in dieser Dissertation verwendeten Methode der Chemilumineszenz lässt sich die Aktivität der thrombozytären COX-1 sensitiv messen. Mit Hilfe des lumineszierenden Ko-Substrates Luminol konnte die Aktivität der COX indirekt sehr genau objektiviert werden (vgl. Absatz 2.2.1.1 Prinzip der Messung der COX-Aktivität mittels Chemilumineszenz).

Dank der standardisierten Präparation der Thrombozytenmikrosomen und genauer qualitativer und quantitativer Kontrolle der COX-Aktivität der humanen thrombozytären Mikrosomen vor jedem Experiment, kann daher von einer guten Vergleichbarkeit der durchgeführten Versuche ausgegangen werden.

Zwischen den anhand der Konzentrations-Wirkungs-Kurven errechneten Parametern  $\log IC_{50}$  (Halbmaximale Inhibition der COX-1 durch den entsprechenden Inhibitor) sowie HillSlope (Geschwindigkeit des Aktivitätsverlust der COX-1 in Gegenwart unterschiedlicher Konzentrationen eines Inhibitors) und Interaktionspotential des NSAIDs mit ASS konnte kein Zusammenhang beobachtet werden. Die beiden Parameter verhielten sich unabhängig vom mittels Zeitkinetik errechneten k-Wert.

#### 4.1.3 Thromboxan B<sub>2</sub>-Quantifizierung

Die TXB<sub>2</sub>-Quantifizierung dient in der vorliegenden Dissertation als zusätzliche Messmethode der Interaktion zwischen NSAID-Analgetikum und ASS, die die Ergebnisse der Thrombozytenaggregation weiter ergänzt. Da Thromboxan A<sub>2</sub> (das Produkt der COX-1 und des im Thrombozyten nachfolgenden Enzyms PGH-Synthase) im Serum schnell in TXB<sub>2</sub> umgewandelt wird (nichtenzymatische Hydrolyse), lässt sich durch die Messung der TXB<sub>2</sub>-Konzentration in den Aggregationsproben indirekt auf die Aktivität der COX-1 rückschließen.

Diese Methodik wandten wir zur zusätzlichen Objektivierung der Ergebnisse der Thrombozytenaggregation an.

## 4.2 Auswertungsmethodik

Da Daten zu zahlreichen pharmakologischen Wirkstoffen erhoben wurden war es erforderlich, diese mittels Varianzanalyse zu vergleichen. Hier wurde auf signifikante Unterschiede zwischen der zeitunabhängigen bzw. –abhängigen Inhibition der entsprechenden Substanzen und der nur mit ASS inhibierten Thrombozyten geprüft.

### 4.3 Verschiedene Bindungsmechanismen der NSAIDs

Nach aktueller Kenntnis spielen mindestens drei verschiedene Bindungsmechanismen der NSAIDs an die COX-1 eine Rolle, die bei der Differenzierung zwischen zeitabhängiger und zeitunabhängiger Inhibition berücksichtigt werden müssen. Hier ist zum einen der irreversible (oder kovalente) Hemmtyp der COX-1, repräsentiert durch ASS als Leitsubstanz (Acetylierung von Ser<sup>530</sup>), zu nennen. Des Weiteren hemmen zeitabhängige NSAIDs (z.B. Flurbiprofen) die COX-1 mit zunächst schneller, wenig affiner Bindung, die in einem zweiten Reaktionsschritt anschließend in eine feste, hoch affine und nur langsam reversible Bindung, jedoch ohne kovalente Modifikation des Enzyms, übergeht. Dem gegenüber steht die zeitunabhängige, schnell reversible Inhibition der COX-1 (z.B. Ibuprofen), die zum Teil einen kompetitiven Mechanismus aufzeigt (Pouplana et al. 1999; Simmons et al. 2004; Blobaum und Marnett 2007; DeWitt 1999). In einigen Publikationen wurden sogar vier verschiedene Mechanismen der Interaktion von Inhibitoren mit dem COX-Enzym unterschieden: kovalent (z.B. ASS), zeitabhängig mit fester Bindung (z.B. Indometazin), gemischt mit schwacher Bindung (z.B. Naproxen) und kompetitiv (z.B. Ibuprofen) (Gierse et al. 1999).

Eine andere Arbeitsgruppe (Selinsky et al. 2001) teilte die Bindungsmechanismen anhand der Kinetik der Bindung und der strukturellen Beschaffenheit des Enzym-Inhibitor-Komplexes ein. Auch hier wird differenziert zwischen einem zeitabhängigen und einem zeitunabhängigen Hemmtyp. Im Falle des zeitabhängigen Typs wird in einem ersten Schritt eine reversible Bindung des Inhibitors an das COX-Enzym aufgebaut und in einem zweiten Schritt ein fester Enzym-Inhibitor-Komplex zwischen Inhibitor und COX gebildet. Diese Kinetik wird durch die Reaktionsgleichung  $E + I \rightleftharpoons EI \rightleftharpoons EI^*$  dargestellt, wobei E für das Enzym und I für den Inhibitor steht, EI den reversiblen Enzym-Inhibitor-Komplex und EI\* den inaktivierten Enzym-Inhibitor-Komplex symbolisiert. Für den zeitunabhängigen Bindungstyp ergibt sich dementsprechend die Formel  $E + I \rightleftharpoons EI$ .

Ein wiederum anderer Inhibitionsmechanismus wird für die NSAIDs aus der Gruppe der Coxibe (soweit diese neben COX-2 auch COX-1 inhibieren) und Oxicame beschrieben (Xu et al. 2014b; Prusakiewicz et al. 2009; Rimon et al. 2010). Beide NSAID-Subgruppen besitzen keine Carboxylgruppe und weisen ein zeitunabhängiges Bindungsverhalten auf. Sie hemmen, wie Mefenamat und 6-MNA auch, die COX-1 im Sinne eines „gemischten“ Hemmtyps: die zunächst zeitabhängige Hemmung führt in einem zweiten Schritt zu einer

reversiblen, schwach gebundenen Inhibition der COX-1 (Gierse et al. 1999; Orlando et al. 2015). Mefenamat und 6-MNA folgen möglicherweise auch diesem Hemmtyp.

#### 4.3.1 Lassen sich die untersuchten NSAIDs in unterschiedliche Hemmtypen unterteilen und wenn ja, hat dies Einfluss auf die Hemmkinetik?

Alle im Rahmen dieser Arbeit ausgewählten NSAIDs können entsprechend der vorliegenden Literatur anhand ihrer Kinetik am Enzym den oben beschriebenen Hemmtypen zugeordnet werden:

1. ASS selbst hemmt die COX-1 kovalent und irreversibel (Loll et al. 1995; Simmons et al. 2004; Hohlfeld et al. 2008; Smith et al. 2000).
2. Die zeitabhängige Hemmung erfolgt mittels einer zweiphasigen Inhibition: zunächst in einem schnellen, wenig affinen Schritt, der dann in eine hoch-affine und nur langsam reversible Bindung übergeht. Die Substanzen, die unter diesen Bindungstyp fallen, interagieren entsprechend Vorarbeiten verschiedener Arbeitsgruppen nicht mit ASS (z.B. Indometazin, Flurbiprofen) (Selinsky et al. 2001; Simmons et al. 2004; Bhattacharyya et al. 1996; Smith et al. 2000).
3. Als nächste Inhibitionsklasse lässt sich der „gemischte“ Hemmtyp abgrenzen. Eine zunächst zeitabhängige Inhibition wird in eine zeitunabhängige Bindung umgewandelt. Dieser Bindungsmechanismus stellt gewissermaßen einen Mischtyp zwischen zeitabhängig und zeitunabhängig dar, wobei die diesem Hemmtyp entsprechenden Substanzen in den Versuchen ein schnelles Inhibitionsverhalten zeigen und mit ASS interagieren, weshalb sie hier den zeitunabhängigen Substanzen zugerechnet werden. Dies trifft z.B. auf Coxibe und Oxicame zu (Xu et al. 2014b; Prusakiewicz et al. 2009; Rimon et al. 2010; Gierse et al. 1999; Orlando et al. 2015).
4. Zusätzlich lässt sich der kompetitive Inhibitionstyp abgrenzen. Hier konkurrieren die NSAIDs mit ASS wahrscheinlich um die Bindungsstelle im hydrophoben Tunnel des Enzyms und bilden mit dem aktiven Zentrum der COX sofort eine hoch affine, aber auch schnell reversible Bindung aus. Alternativ blockieren sie den Eingang zum hydrophoben Tunnel des COX-Enzyms. Allerdings konkurrieren sie auch hierbei mit ASS um die Möglichkeit, in den Bereich des aktiven Zentrums zu gelangen. Diese Gruppe von Substanzen wird zu den zeitunabhängigen NSAIDs gezählt. Die Leitsubstanzen hierfür sind Ibuprofen und wahrscheinlich

auch Metamizol sowie dessen Derivate (Selinsky et al. 2001; Gierse et al. 1999; Pouplana et al. 1999; Simmons et al. 2004; DeWitt 1999; Blobaum und Marnett 2007; Smith et al. 2000).

Über die Unterteilung in die Hemmtypen hinaus lassen sich auch einige generelle Feststellungen zu dem Bindungsverhalten klassischer nicht-selektiver saurer NSAIDs treffen. Die wichtigsten Bindungen im Rahmen der Interaktion des NSAIDs mit dem aktiven Zentrum der COX-1 scheinen 1) eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem Carboxylrest des Liganden und der Seitenkette von Arg<sup>120</sup> oder alternativ dem Aminosäurepaar Tyr<sup>385</sup> und Ser<sup>530</sup>, 2) einer Wasserstoffbrückenbindung zwischen der Carbonylgruppe des Liganden und der Seitenkette von Ser<sup>530</sup> oder 3) einer Interaktion zwischen dem aromatischen Ring des Liganden und der hydrophoben „Tasche“ um Tyr<sup>385</sup> zu sein (Llorens et al. 2002). Welcher Bindungsmodus auf welches klassische (saure) NSAID zutrifft, hängt auch von der Größe und der Stereometrie des NSAIDs ab. Befindet sich die Carboxylgruppe in ortho-Position zum aromatischen Rest, interagiert der aromatische Rest mit der Seitenkette von Tyr<sup>385</sup> (z.B. Meclofenamat und Diclofenac). Steht die Carboxylgruppe hingegen in meta- oder para-Position zum aromatischen Rest (z.B. Ketoprofen), bildet sich eher eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen Carboxylrest und Arg<sup>120</sup> aus (Llorens et al. 2002).

#### 4.3.2 Interpretation des Bindungsverhaltens von zeitabhängigen COX-Inhibitoren hinsichtlich der Interaktion mit ASS

Als Vertreter der zeitabhängigen NSAIDs sind vor allem Ketoprofen, Diclofenac, Flurbiprofen, Meclofenamat, und Indometazin eingehend im Rahmen mehrerer Studien untersucht worden (Pouplana et al. 1999; Kulmacz 1989; Llorens et al. 2002). Indometazin, Flurbiprofen und Ketoprofen inhibieren die COX-1 im Sinne eines zweiphasigen Bindungsmechanismus: zunächst schnell reversibel und im Anschluss langsam irreversibel (Kulmacz 1989). Die Carboxylgruppe dieser Inhibitoren interagiert mit Arg<sup>120</sup> (Llorens et al. 2002), aber nicht mit anderen Aminosäuren des aktiven Zentrums (Saxena et al. 2013). Diclofenac und Meclofenamat bilden auf Grund ihrer Stereometrie (Carboxylgruppe in ortho-Position) eine Ausnahme: obwohl sie zu den klassischen sauren NSAIDs gehören, interagiert die Carboxylgruppe nicht mit Arg<sup>120</sup>, sondern richtet sich zur Region um Tyr<sup>385</sup> und Ser<sup>530</sup> aus (Rowlinson et al. 2003; Llorens et al. 2002). Feste

Interaktionen zu Ser<sup>530</sup> oder anderen, für die Bindung von zeitunabhängigen NSAIDs relevanten Aminosäuren, ließen sich bei Diclofenac wie auch bei Ketorolac in Docking-Analysen der eigenen Arbeitsgruppe allerdings nicht beobachten (Saxena et al. 2013).

Flurbiprofen ist im Gegensatz zu anderen Arylpropionsäurederivaten in der Lage, van der Waals-Kräfte mit der aromatischen hydrophoben Tasche am aktiven Zentrum der COX, bestehend aus Tyr<sup>385</sup>, Trp<sup>387</sup>, Phe<sup>518</sup>, Ala<sup>201</sup>, Tyr<sup>348</sup> und Leu<sup>352</sup>, auszubilden (Selinsky et al. 2001) und somit eine stärkere Bindung mit dem Enzym einzugehen.

Dennoch weisen alle genannten zeitabhängigen Substanzen eine für saure NSAIDs typische Gemeinsamkeit auf: in ihren chemischen Strukturen befindet sich eine Carboxylgruppe (Xu et al. 2014b). Verschiedene Autoren (Rome und Lands 1975 Dec; Gierse et al. 1999; Pouplana et al. 1999) konnten als Charakteristikum eines zeitabhängigen Inhibitors die Interaktion zwischen der Carboxylgruppe des NSAIDs und dem Arg<sup>120</sup> der COX identifizieren. Sie postulierten, dass das negative Potential um die Carboxylgruppe saurer NSAIDs mit der positiv geladenen Guanidin-Gruppe um Arg<sup>120</sup> der COX-1 interagiert und so eine feste Bindung zwischen dem Enzym-Inhibitor-Komplex entsteht. Außerdem scheint hier das „Schlüssel-Schloss-Prinzip“ eine große Rolle zu spielen: die Inhibitoren, die genau in den hydrophoben Tunnel des aktiven Zentrums der COX-1 passen, aufrecht zwischen aromatischen Ringen stehen und so eine besonders feste Konformation erzeugen, produzieren auch ein besonders großes positives „membrane electric potential“ (MEP), was die Bindung zum Enzym umso stärker werden lässt. Außerdem könnte es sein, dass Diclofenac, Indometazin und Meclofenamat eine kleine Konformationsänderung innerhalb der COX verursachen, durch die die Seitenketten von Arg<sup>277</sup> und Gln<sup>358</sup> reorientiert werden und so für eine noch festere Bindung zwischen Enzym und Inhibitor sorgen (Pouplana et al. 1999).

Generell lässt sich feststellen, dass Diclofenac, Meclofenamat und Indometazin als Beispiele zeitabhängiger NSAIDs an der COX-1 eine Konformationsänderung induzieren, die die Bindung zwischen Ligand und Enzym sehr stark ausfallen lässt (Pouplana et al. 1999). Ein weiteres Charakteristikum zeitabhängiger NSAIDs ist die Interaktion der Carboxylgruppe mit Arg<sup>120</sup>.

Im Gegensatz zu älteren Publikationen stellt eine Arbeitsgruppe (Selinsky et al. 2001) eine andere Theorie zur Erklärung des unterschiedlichen Bindungsverhaltens zeitabhängiger und zeitunabhängiger NSAIDs auf. Diese Autoren haben die Kristallstrukturen des

Enzym-Inhibitor-Komplexes der COX-1 mit Ibuprofen und Methyl-Flurbiprofen als zeitunabhängige und Alclofenac und Flurbiprofen als zeitabhängige Inhibitoren analysiert und festgestellt, dass alle Substanzen ähnlich an dieses Enzym binden und hierbei nur eine minimale Konformationsänderung am Enzym entsteht. Die Art der Konformationsänderung könnte demnach unabhängig vom Bindungsverhalten der einzelnen Inhibitoren sein. Stattdessen kommt die Arbeitsgruppe zu dem Schluss, dass die erwähnten Unterschiede aus der unterschiedlichen Geschwindigkeit und Effektivität der Störung des Wasserstoffbrückenbindungen-Netzwerkes um Arg<sup>120</sup> und Tyr<sup>355</sup> durch den jeweiligen Inhibitor resultieren. Somit könnte es z.B. auch sein, dass sowohl die zeitabhängigen als auch die zeitunabhängigen NSAIDs im Endeffekt einen inaktiven Enzym-Inhibitor-Komplex (EI\*) bilden, mit dem Unterschied, dass man bei den langsam wirksamen NSAIDs eine entsprechend langsame Transition zwischen EI und EI\* beobachten kann, während die entsprechende Transition bei den schnell wirksamen Substanzen sehr schnell abläuft.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass zahlreiche Arbeitsgruppen sich mit den enzymologisch interessanten zeitabhängigen Inhibitoren der COX-1 befasst und durchaus divergierende Konzepte zur molekularen Erklärung dieses Hemmtyps entwickelt haben. Der Hemmtyp der zeitabhängigen NSAIDs lässt sich als nicht-kompetitiv, zunächst reversibel und im Anschluss langsam irreversibel klassifizieren. In diese Gruppe von Substanzen gehören viele klassische „saure“ NSAIDs. Einige bilden eine Bindung zwischen ihrer Carboxylgruppe und Arg<sup>120</sup> aus, allerdings keine zu Ser<sup>350</sup> (Saxena et al. 2013).

Voruntersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe (Saxena et al. 2013) haben Anhaltspunkte geliefert, dass Interaktionen zwischen Inhibitor und Aminosäuren aus dem hydrophoben Tunnel der COX-1 eine Voraussetzung für die Hemmung der ASS-Wirkung auf die Thrombozytenaggregation durch das NSAID darstellen. Teilweise scheinen die zeitabhängigen Inhibitoren eine Bindung zwischen ihrer Carboxylgruppe und Arg<sup>120</sup> auszubilden, die wahrscheinlich jedoch nicht ausreicht, um ASS an der Bindung an das aktive Zentrum der COX-1 zu hindern (Saxena et al. 2013). Die Bindungsstellen von zeitabhängigen Inhibitoren und ASS im aktiven Zentrum überlagern sich nicht, da kein zeitabhängiges NSAID Bindungen zu Ser<sup>350</sup> ausbildet. Dementsprechend würden diese NSAIDs nicht den hydrophoben Tunnel des aktiven Zentrums der COX-1, sondern einen anderen Bindungsort am Enzym zur Inhibition nutzen und müssten nicht mit ASS um die Bindungsstelle konkurrieren (Kulmacz 1989). Dies könnte eine andere Erklärung dafür sein, warum Diclofenac, trotz fehlender Interaktion seiner Carboxylgruppe mit dem Arg<sup>120</sup> der COX, ein zeitabhängiges Bindungsverhalten zeigt.

Zusammenfassend lässt sich hier schlussfolgern, dass andere Mechanismen (wie das Bindungsmuster) und weniger die Strukturverwandtschaft bzw. Zugehörigkeit zu einer Strukturgruppe für die Interaktion zwischen zeitabhängigen NSAIDs und ASS entscheidend sind (Pouplana et al. 1999). Die zeitabhängigen Inhibitoren Ketoprofen, Diclofenac, Flurbiprofen, Meclofenamat, und Indometazin zeigen ein zeitabhängiges Bindungsverhalten, obwohl sie aus unterschiedlichen Substanzklassen stammen und somit auch molekular deutlich unterschiedlich aufgebaut sind.

#### 4.3.3 Interpretation des Bindungsverhaltens von zeitunabhängigen COX-Inhibitoren hinsichtlich der Interaktion mit ASS

Zeitunabhängige NSAIDs wie z.B. Naproxen, Flufenamat, Oxaprozin und Metamizol-Derivate bilden Wasserstoffbindungen mit Ser<sup>530</sup> des hydrophoben Tunnels der COX aus. Diesen Bindungsmechanismus nutzt auch ASS, das in Gegenwart der oben aufgezählten NSAIDs nun mit diesen um die Bindungsstelle konkurrieren muss (Saxena et al. 2013). Hinzu kommen je nach NSAID noch andere Bindungen, die der jeweilige Inhibitor mit dem aktiven Zentrum der COX eingeht: So bindet z.B. Naproxen auch an Tyr<sup>385</sup> und Tyr<sup>355</sup> und Oxaprozin, Flufenamat und Piroxicam bilden zusätzlich zu der Bindung zu Ser<sup>530</sup> eine Wasserstoffbrückenbindung mit Tyr<sup>385</sup> aus (Saxena et al. 2013). Trotz fehlender Bindung zu Ser<sup>530</sup> interagieren Ibuprofen und Celecoxib mit ASS, was vermutlich daran liegt, dass Ibuprofen durch seine zwei Wasserstoffbrückenbindungen zu Arg<sup>120</sup> und einer zu Tyr<sup>355</sup> und Celecoxib durch Wasserstoffbrückenbindungen zu Tyr<sup>355</sup>, Ile<sup>517</sup> und Ser<sup>516</sup> des aktiven Zentrums der COX den Eingang des hydrophoben Tunnels für ASS blockieren (Saxena et al. 2013; Hohlfeld et al. 2013). Der Hemmtyp dieser NSAIDs kann (selbstverständlich mit Ausnahme von ASS) als kompetitiv klassifiziert werden.

Im Falle der Coxibe beschreiben (Rimon et al. 2010) das Phänomen, dass diese Substanzgruppe in niedrigen Konzentrationen keinen Einfluss auf die Umsetzung von ARA durch die COX-1 zu haben scheint. Allerdings interagieren Coxibe trotzdem mit ASS, wenn dieses in niedriger Konzentration in den Versuchsaufbau mit eingebracht wurde. Da im Rahmen dieser Dissertation eine Konzentration von ASS gewählt wurde, bei der eine Thrombozytenaktivierung in der Aggregation „gerade eben“ weitgehend gehemmt war, sind diese Ergebnisse vergleichbar. Auch in dieser Dissertation konnte eine Interaktion zwischen Celecoxib, Meloxicam und NS-398 festgestellt werden.

Celecoxib geht keine Bindung mit Ser<sup>530</sup> ein, allerdings bildet es wahrscheinlich Wasserstoffbrückenbindungen zu Tyr<sup>355</sup>, Ile<sup>517</sup> und Ser<sup>516</sup> aus (Saxena et al. 2013). So könnte

diese Substanz ähnlich wie Ibuprofen verhindern, dass ASS in den hydrophoben Tunnel der COX-1 gelangt. Jedoch dürfte die Interaktion mit Celecoxib zusätzlich insofern komplizierter sein, als diese Substanz nur an eines der beiden COX-Monomere bindet und möglicherweise dadurch die Interaktion zwischen dem anderen COX-Monomer und ASS ändert, was die Acetylierung von Ser<sup>530</sup> durch ASS verlangsamen könnte (Saxena et al. 2013; Rimon et al. 2010).

Wie oben beschrieben, hemmen Coxibe, Oxicame, wie auch Mefenamat, 6-MNA und Nabumeton die COX-1 im Sinne eines gemischten Hemmtyps: zunächst zeitabhängig verzögert und danach schnell reversibel, was in Kombination in einem zeitunabhängigen Hemmtyp resultiert (Gierse et al. 1999). Da sich dieser Hemmtyp bei keiner der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten zeitabhängigen NSAIDs beobachten lässt, liegt der Schluss nahe, dass der von diesen beiden Substanzgruppen gezeigte Bindungsmechanismus mit einer zeitunabhängigen Inhibitionskinetik vergesellschaftet ist.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass zeitunabhängig wirkende NSAIDs entweder einem kompetitiven Hemmtyp unterliegen (Interaktion mit Ser<sup>530</sup> oder Verschluss des Eingangs des hydrophoben Tunnels) oder einen gemischten Hemmtyp zeigen, was in Summe zu einer reversiblen, schwachen Bindung bzw. einer Konformationsänderung des aktiven Zentrums der COX-1 führt.

#### 4.4 Interpretation der Ergebnisse dieser Dissertation vor dem Hintergrund der in der Literatur aufgeführten Theorien zur Erklärung der unterschiedlichen Inhibitionskinetiken und Bindungsmechanismen der untersuchten NSAIDs

Zwischen der in der Literatur aufgeführten Einteilung der NSAIDs in zeitabhängig und zeitunabhängig anhand ihrer Inhibitionskinetik an der COX-1 und den im Rahmen dieser Dissertation erhobenen Inhibitionskinetiken ebendieser NSAIDs lässt sich eine Übereinstimmung der Ergebnisse feststellen. Somit lässt sich die vielfach beschriebene Einteilung der NSAIDs in zeitabhängig und zeitunabhängig für die in dieser Dissertation untersuchte humane thrombozytäre COX-1 reproduzieren.

Auch die Charakterisierung der einzelnen NSAIDs als entweder zeitabhängig oder zeitunabhängig konnte nachvollzogen werden. Hierzu wurde in dieser Dissertation der  $k$ -Wert als Konstante der Zeitkinetik und damit der Inhibitions geschwindigkeit herange-

zogen. Zusätzlich konnte eine definierte Grenze zwischen den  $k$ -Werten der als zeitabhängig und der als zeitunabhängig definierten NSAIDs gezogen werden (Ketorolac, Diclofenac, Flurbiprofen, Meclofenamat, Indometazin, Ketoprofen und O-Desmethyl-Indometazin als zeitabhängig; Ibuprofen, Naproxen, Celecoxib, Oxaprozin, 6-MNA, MAA, SC-560, Meloxicam, Flufenamat, NS-398, Mefenamat, Nabumeton, Piroxicam, 4-Aminoantipyrin als zeitunabhängig).

Hierbei ließ sich beobachten, dass die als zeitabhängig klassifizierten NSAIDs nicht mit ASS an der COX-1 interagierten, während zeitunabhängige NSAIDs ein Interaktionspotential zeigten.

In Zusammenschau der in der Literatur aufgeführten Theorien zu den Bindungsmechanismen der verschiedenen NSAIDs an der COX-1 und der gemessenen Inhibitionskinetik lässt sich ein Zusammenhang zwischen den jeweiligen Bindungsmechanismen und der kinetischen Einteilung in entweder zeitabhängig oder zeitunabhängig feststellen. Hieraus lässt sich schlussfolgern, dass der Bindungsmechanismus eine Determinante zur kinetischen Klassifizierung der NSAIDs ist. Demgegenüber scheint die Zugehörigkeit der Inhibitorsubstanz zu einer bestimmten Strukturklasse nur indirekt eine Rolle zu spielen.

Dies erklärt auch, weshalb einige Substanzen aus einer Strukturgruppe mit ASS an der COX-1 interagieren und andere nicht, wie zum Beispiel die Propionsäurederivate Ibuprofen und Ketoprofen.

## 4.5 Bestimmung der thrombozytären Thromboxansynthese – Fehleranalyse

Für die Thromboxanquantifizierung mittels „Thromboxane B<sub>2</sub> EIA Kits“ mit dem Ziel, die Interaktionen zwischen ASS und NSAIDs nachzuweisen, wurden die PRP-Suspensionen nach Ablauf der Aggregationsreaktion verwendet (s. Beschreibung der Methodik, Abschnitt 2.2.3.2). Daher wäre zu erwarten, dass die TXB<sub>2</sub>-Messungen ein ähnliches Ergebnis für die Interaktion zeigen wie in der Aggregation. Dies ließ sich für die meisten, jedoch nicht für alle Substanzen bestätigen. Bei dem Ergebnis der TXB<sub>2</sub>-Bestimmung von Meclofenamat fiel ein signifikanter Unterschied in der TXB<sub>2</sub>-Produktion zwischen ASS-Kontrolle und Interaktion auf, was nach dieser Methode Meclofenamat als zeitunabhängigen und nicht, wie mittels der Aggregation bestimmt, als zeitabhängigen Inhibitor klassifizierte (s. Abschnitt 3.5).

Der Grund für diese Diskrepanz konnte nicht abschließend geklärt werden. Eine mögliche Erklärung könnte z.B. sein, dass es einen Unterschied zwischen dem Bindungsmechanismus von Meclofenamat bei intakten Thrombozyten und dem Bindungsmechanismus bei Mikrosomen gibt. Alternativ könnte an intakten Thrombozyten Meclofenamat aufgrund zusätzlicher antithrombozytärer Wirkungsmechanismen einen weiteren, bisher nicht bekannten Inhibitionsmechanismus aufweisen.

Ein ähnliches Problem manifestiert sich in der Auswertung der TXB<sub>2</sub>-Quantifizierung von 4-Aminoantipyrin: in der Aggregation zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen Negativkontrolle und ASS + 4-Aminoantipyrin, während sich dieser Unterschied in der TXB<sub>2</sub>-Quantifizierung nicht feststellen lässt (s. Abschnitt 3.5). Das kinetische und strukturelle Bindungsverhalten von 4-Aminoantipyrin passt zu der Beobachtung in der Aggregation. Außerdem bindet das im Rahmen dieser Arbeit untersuchte andere Metamizol-Derivat (MAA) in ähnlicher Weise an die COX-1, zeigt auch eine zeitunabhängige Inhibitionskinetik und weist, wie 4-Aminoantipyrin auch, ein Interaktionspotential mit ASS auf. Auch in Bezug auf diese Substanz lässt sich über die Gründe des unterschiedlichen Verhaltens innerhalb der beiden Versuchsaufbauten nur spekulieren. Ein Grund könnte in dem sich unterscheidenden Inhibitionsverhalten direkt an der COX-1 in Thrombozytenmikrosomen und an der COX-1 intakter Thrombozyten oder in einer raschen Inaktivierung der Substanz nach Durchtritt durch die Thrombozytenmembran liegen.

## 4.6 Schlussfolgerungen

Bisher sind Interaktionen mit ASS in Hinsicht auf einen Verlust der Plättchenhemmung durch ASS lediglich in den Fachinformationen für Ärzte von Ibuprofen, Metamizol und Oxaprozin zu finden. Im Rahmen dieser Dissertation konnte in einem Versuchsmodell mit humanen Thrombozyten die Liste der mit ASS interagierenden NSAIDs deutlich erweitert werden und darüberhinausgehende Erkenntnisse im Hinblick auf einen Verlust der Plättchenhemmung durch ASS durch die als „zeitunabhängig“ eingestuften NSAIDs gewonnen werden.

Mit der Chemilumineszenz konnten die Zeitkinetiken zu den einzelnen NSAIDs und die damit verbundene Einteilung in „zeitabhängig“ und „zeitunabhängig“ vorangegangener Arbeiten verschiedener Arbeitsgruppen hier erstmalig an der humanen thrombozytären COX-1 an Thrombozytenmikrosomen reproduziert werden. Als „zeitabhängig“ gilt dabei der kovalente Hemmtyp mit ASS als Leitsubstanz sowie derjenige, der zeitabhängig mit fester Bindung (z.B. Indometazin) die COX-1 hemmt. Der kompetitive Hemmtyp (z.B.

Ibuprofen) und der, der als gemischt mit schwacher Bindung (z.B. Naproxen) gilt, werden als „zeitunabhängig“ eingestuft.

Die Arbeitshypothese dieser Dissertation (vergl. Abschnitt 1.3), nach welcher zeitabhängige NSAIDs nicht mit ASS an der humanen thrombozytären COX-1 interagieren, während zeitunabhängige NSAIDs die Wirkung von ASS an der COX-1 verhindern, konnte somit bestätigt werden. Tatsächlich scheint es eine Korrelation zwischen der Hemmkinetik verschiedener COX-1-Inhibitoren und deren Interaktion mit ASS zu geben. Die im Rahmen dieser Dissertation untersuchten NSAIDs, die einen zeitabhängigen Hemmtyp aufweisen, interagierten nicht mit ASS. Hingegen interagierten die Substanzen mit einem zeitunabhängigen Hemmtyp an der COX-1 mit ASS, wodurch die erwünschte Wirkung von ASS (Thrombozytenaggregationshemmung) gegebenenfalls nicht mehr erreicht werden kann.

Ein Zusammenhang zwischen Hemmkinetik und  $IC_{50}$  bzw. HillSlope der Konzentrations-Wirkungs-Kurven der Hemmung der Thrombozyten ist nicht erkennbar.

Trotz statistisch signifikanter Ergebnisse im Labor lässt sich der Zusammenhang zwischen der Wirkung von ASS und der Inhibition dieser Wirkung durch zeitunabhängige NSAIDs nicht ohne Weiteres auf die klinische Praxis übertragen. Hierzu wäre eine weitere Untersuchung und Überprüfung der Ergebnisse in prospektiv geplanten klinischen Studien in einem klinischen Setting notwendig, d.h. an Patienten mit kardiovaskulären Erkrankungen, welche ggf. infolge Begleiterkrankungen gezielt ausgewählte NSAID-Analgetika einnehmen. Derartige Studien würden jedoch über den Horizont dieser Dissertation weit hinausgehen und bleiben daher zukünftiger Forschung vorbehalten.

## 5 Literaturverzeichnis

Abdolmohammad-Zadeh, H.; Morshedzadeh, F.; Rahimpour, E. (2014): Trace analysis of mefenamic acid in human serum and pharmaceutical wastewater samples after pre-concentration with Ni-Al layered double hydroxide nano-particles. In: *Journal of pharmaceutical analysis* 4 (5), S. 331–338. DOI: 10.1016/j.jpha.2014.04.003.

Anzellotti, P.; Capone, M. L.; Jeyam, A.; Tacconelli, S.; Bruno, A.; Tontodonati, P. et al. (2011): Low-dose naproxen interferes with the antiplatelet effects of aspirin in healthy subjects: recommendations to minimize the functional consequences. In: *Arthritis and rheumatism* 63 (3), S. 850–859. DOI: 10.1002/art.30175.

Bagheri, S. (2015): NSAIDs verhindern die Thrombozytenaggregationshemmung durch Acetylsalicylsäure: Entwicklung eines enzymkinetischen Modells, experimentelle Überprüfung und mögliche Konsequenzen für die klinische Anwendung. Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmakologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Bhattacharyya, D. K.; Lecomte, M.; Rieke, C. J.; Garavito, R. M.; Smith, W. L. (1996): Involvement of Arginine 120, Glutamate 524, and Tyrosine 355 in the Binding of Arachidonate and 2-Phenylpropionic Acid Inhibitors to the Cyclooxygenase Active Site of Ovine Prostaglandin Endoperoxide H Synthase-1. In: *Journal of Biological Chemistry* 271 (4), S. 2179–2184. DOI: 10.1074/jbc.271.4.2179.

Biller, J. (2008): Aspirin nonresponse in patients with arterial causes of ischemic stroke: considerations in detection and management. In: *Journal of the neurological sciences* 272 (1-2), S. 1–7. DOI: 10.1016/j.jns.2008.04.023.

Blobaum, A. L.; Marnett, L. J. (2007): Structural and functional basis of cyclooxygenase inhibition. In: *Journal of medicinal chemistry* 50 (7), S. 1425–1441. DOI: 10.1021/jm0613166.

Blower, P. R. (1992): The unique pharmacologic profile of nabumetone. In: *The Journal of rheumatology. Supplement* 36, S. 13–19.

Capone, M. L.; Sciulli, M. G.; Tacconelli, S.; Grana, M.; Ricciotti, E.; Renda, G. et al. (2005): Pharmacodynamic interaction of naproxen with low-dose aspirin in healthy subjects. In: *Journal of the American College of Cardiology* 45 (8), S. 1295–1301. DOI: 10.1016/j.jacc.2005.01.045.

- Catella-Lawson, F.; Reilly, M. P.; Kapoor, S. C.; Cucchiara, A. J.; DeMarco, S.; Tourner, B. et al. (2001): Cyclooxygenase inhibitors and the antiplatelet effects of aspirin. In: *The New England journal of medicine* 345 (25), S. 1809–1817. DOI: 10.1056/NEJMoa003199.
- Chandrasekharan, N. V.; Dai, H.; Roos, K. L.; Evanson, N. K.; Tomsik, J.; Elton, T. S.; Simmons, D. L. (2002): COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (21), S. 13926–13931. DOI: 10.1073/pnas.162468699.
- Cipollone, F.; Ganci, A.; Panara, M. R.; Greco, A.; Cuccurullo, F.; Patrono, C.; Patrignani, P. (1995): Effects of nabumetone on prostanoid biosynthesis in humans. In: *Clinical pharmacology and therapeutics* 58 (3), S. 335–341. DOI: 10.1016/0009-9236(95)90251-1.
- Copeland, R. A.; Williams, J. M.; Giannaras, J.; Nurnberg, S.; Covington, M.; Pinto, D. et al. (1994): Mechanism of selective inhibition of the inducible isoform of prostaglandin G/H synthase. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91 (23), S. 11202–11206.
- DeWitt, D. L. (1999): Cox-2-selective inhibitors: the new super aspirins. In: *Molecular pharmacology* 55 (4), S. 625–631.
- DeWitt, D. L.; el-Harith, E. A.; Kraemer, S. A.; Andrews, M. J.; Yao, E. F.; Armstrong, R. L.; Smith, W. L. (1990): The aspirin and heme-binding sites of ovine and murine prostaglandin endoperoxide synthases. In: *The Journal of biological chemistry* 265 (9), S. 5192–5198.
- Emery, P.; Clarke, A.; Williams, P.; Kill, D.; Cree, F.; Redhead, R.; Poland, M. (1992): Nabumetone compared with naproxen in the treatment of rheumatoid arthritis: a multi-center, double blind, randomized, parallel group trial in hospital outpatients. In: *The Journal of rheumatology. Supplement* 36, S. 41–47.
- Engelhardt, G.; Bögel, R.; Schnitzer, C.; Utzmann, R. (1996): Meloxicam: influence on arachidonic acid metabolism. Part 1. In vitro findings. In: *Biochemical pharmacology* 51 (1), S. 21–28.

- Fried, J.; Kwok, P. Y.; Muellner, F. W. (1987): Synthesis and enzymatic studies of fluorinated arachidonic acids. In: *Advances in prostaglandin, thromboxane, and leukotriene research* 17B, S. 803–810.
- Friedel, H. A.; Langtry, H. D.; Buckley, M. M. (1993): Nabumetone. A reappraisal of its pharmacology and therapeutic use in rheumatic diseases. In: *Drugs* 45 (1), S. 131–156. DOI: 10.2165/00003495-199345010-00009.
- Gawaz MP (1999): Das Blutplättchen: Physiologie, Pathophysiologie, Membranrezeptoren, antithrombozytäre Wirkstoffe und antithrombozytäre Therapie bei koronarer Herzerkrankung. Stuttgart, New York: Thieme.
- Gengo, F. M.; Rubin, L.; Robson, M.; Rainka, M.; Gengo, M. F.; Mager, D. E.; Bates, V. (2008): Effects of ibuprofen on the magnitude and duration of aspirin's inhibition of platelet aggregation: clinical consequences in stroke prophylaxis. In: *Journal of clinical pharmacology* 48 (1), S. 117–122. DOI: 10.1177/0091270007310379.
- Gholamreza-Fahimi, E.; Bisha, M.; Hahn, J.; Straßen, U.; Krybus, M.; Khosravani, F. et al. (2020): Cyclooxygenase activity in bradykinin-induced dermal extravasation. A study in mice and humans. In: *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie* 123, S. 109797. DOI: 10.1016/j.biopha.2019.109797.
- Gierse, J. K.; Koboldt, C. M.; Walker, M. C.; Seibert, K.; Isakson, P. C. (1999): Kinetic basis for selective inhibition of cyclo-oxygenases. In: *Biochemical Journal* 339 (Pt 3), S. 607–614.
- Gladding, P. A.; Webster, M. W. I.; Farrell, H. B.; Zeng, I. S. L.; Park, R.; Ruijne, N. (2008): The antiplatelet effect of six non-steroidal anti-inflammatory drugs and their pharmacodynamic interaction with aspirin in healthy volunteers. In: *The American journal of cardiology* 101 (7), S. 1060–1063. DOI: 10.1016/j.amjcard.2007.11.054.
- Goltsov, A.; Maryashkin, A.; Swat, M.; Kosinsky, Y.; Humphery-Smith, I.; Demin, O. et al. (2009): Kinetic modelling of NSAID action on COX-1: focus on in vitro/in vivo aspects and drug combinations. In: *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences* 36 (1), S. 122–136. DOI: 10.1016/j.ejps.2008.10.015.
- Greig, G. M.; Francis, D. A.; Falguyret, J. P.; Ouellet, M.; Percival, M. D.; Roy, P. et al. (1997): The interaction of arginine 106 of human prostaglandin G/H synthase-2 with

- inhibitors is not a universal component of inhibition mediated by nonsteroidal anti-inflammatory drugs. In: *Molecular pharmacology* 52 (5), S. 829–838.
- Grotemeyer, K.-H.; Scharafinski, H.-W.; Husstedt, I.-W. (1993): Two-year follow-up of aspirin responder and aspirin non responder. A pilot-study including 180 post-stroke patients. In: *Thrombosis Research* 71 (5), S. 397–403. DOI: 10.1016/0049-3848(93)90164-J.
- Haddock, R. E.; Jeffery, D. J.; Lloyd, J. A.; Thawley, A. R. (1984): Metabolism of nabumetone (BRL 14777) by various species including man. In: *Xenobiotica; the fate of foreign compounds in biological systems* 14 (4), S. 327–337. DOI: 10.3109/00498258409151419.
- Hamberg, M.; Samuelsson, B. (1967): On the mechanism of the biosynthesis of prostaglandins E-1 and F-1-alpha. In: *The Journal of biological chemistry* 242 (22), S. 5336–5343.
- Hedner, T.; Samulesson, O.; Währborg, P.; Wadenvik, H.; Ung, K-A.; Ekbom, A. (2004): Nabumetone: therapeutic use and safety profile in the management of osteoarthritis and rheumatoid arthritis. In: *Drugs* 64 (20), 2315-43; discussion 2344-5. DOI: 10.2165/00003495-200464200-00004.
- Hohlfeld, T.; Saxena, A.; Schrör, K. (2013): High on treatment platelet reactivity against aspirin by non-steroidal anti-inflammatory drugs--pharmacological mechanisms and clinical relevance. In: *Thrombosis and haemostasis* 109 (5), S. 825–833. DOI: 10.1160/TH12-07-0532.
- Hohlfeld, T.; Weber, A-A; Junghans, U.; Schumacher, M.; Boucher, M.; Schrör, K.; Siebler, M. (2007): Variable platelet response to aspirin in patients with ischemic stroke. In: *Cerebrovascular diseases (Basel, Switzerland)* 24 (1), S. 43–50. DOI: 10.1159/000103115.
- Hohlfeld, T.; Zimmermann, N.; Weber, A-A; Jessen, G.; Weber, H.; Schrör, K. et al. (2008): Pyrazolinone analgesics prevent the antiplatelet effect of aspirin and preserve human platelet thromboxane synthesis. In: *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* 6 (1), S. 166–173. DOI: 10.1111/j.1538-7836.2007.02800.x.
- J. R. Vane, Y. S. Bakhle, and R. M. Botting (1998): Cyclooxygenases 1 and 2.
- Jack, D. B. (1997): One hundred years of aspirin. In: *Lancet (London, England)* 350 (9075), S. 437–439. DOI: 10.1016/S0140-6736(97)07087-6.

- Kalgutkar, A. S.; Marnett, A. B.; Crews, B. C.; Rimmel, R. P.; Marnett, L. J. (2000): Ester and Amide Derivatives of the Nonsteroidal Antiinflammatory Drug, Indomethacin, as Selective Cyclooxygenase-2 Inhibitors. In: *Journal of medicinal chemistry* 43 (15), S. 2860–2870. DOI: 10.1021/jm000004e.
- Kean, W. F. (2004): Oxaprozin: kinetic and dynamic profile in the treatment of pain. In: *Current medical research and opinion* 20 (8), S. 1275–1277. DOI: 10.1185/030079904125004420.
- Krishna Murthy, H. M.; Vijayan, M. (1981): Structural studies of analgesics and their interactions. VIII. Rotational isomerism and disorder in the crystal structure of meclofenamic acid. In: *Acta Crystallogr B Struct Sci* 37 (5), S. 1102–1105. DOI: 10.1107/S0567740881005141.
- Kuijpers, M. J. E.; Schulte, V.; Bergmeier, W.; Lindhout, T.; Brakebusch, C.; Offermanns, S. et al. (2003): Complementary roles of glycoprotein VI and alpha2beta1 integrin in collagen-induced thrombus formation in flowing whole blood ex vivo. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 17 (6), S. 685–687. DOI: 10.1096/fj.02-0381fje.
- Kulmacz, R. J. (1989): Topography of prostaglandin H synthase. Antiinflammatory agents and the protease-sensitive arginine 253 region. In: *Journal of Biological Chemistry* 264 (24), S. 14136–14144.
- Kulmacz, R. J.; Lands, W. E. (1985): Stoichiometry and kinetics of the interaction of prostaglandin H synthase with anti-inflammatory agents. In: *The Journal of biological chemistry* 260 (23), S. 12572–12578.
- Kurumbail, R. G.; Stevens, A. M.; Gierse, J. K.; McDonald, J. J.; Stegeman, R. A.; Pak, J. Y. et al. (1996): Structural basis for selective inhibition of cyclooxygenase-2 by anti-inflammatory agents. In: *Nature* 384 (6610), S. 644–648. DOI: 10.1038/384644a0.
- Laneuville, O.; Breuer, D. K.; DeWitt, D. L.; Hla, T.; Funk, C. D.; Smith, W. L. (1994): Differential inhibition of human prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2 by nonsteroidal anti-inflammatory drugs. In: *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 271 (2), S. 927–934.
- Lecomte, M.; Laneuville, O.; Ji, C.; DeWitt, D. L.; Smith, W. L. (1994): Acetylation of human prostaglandin endoperoxide synthase-2 (cyclooxygenase-2) by aspirin. In: *The Journal of biological chemistry* 269 (18), S. 13207–13215.

- Levy, M.; Zylber-Katz, E.; Rosenkranz, B. (1995): Clinical pharmacokinetics of Dipyrrone and its metabolites. In: *Clinical pharmacokinetics* 28 (3), S. 216–234. DOI: 10.2165/00003088-199528030-00004.
- Livio, M.; Del Maschio, A.; Cerletti, C.; Gaetano, G. de (1982): Indomethacin prevents the long-lasting inhibitory effect of aspirin on human platelet cyclo-oxygenase activity. In: *Prostaglandins* 23 (6), S. 787–796. DOI: 10.1016/0090-6980(82)90123-X.
- Llorens, O.; Perez, J. J.; Palomer, A.; Mauleon, D. (2002): Differential binding mode of diverse cyclooxygenase inhibitors. In: *Journal of molecular graphics & modelling* 20 (5), S. 359–371.
- Loll, P. J.; Picot, D.; Ekabo, O.; Garavito, R. M. (1996): Synthesis and use of iodinated nonsteroidal antiinflammatory drug analogs as crystallographic probes of the prostaglandin H<sub>2</sub> synthase cyclooxygenase active site. In: *Biochemistry* 35 (23), S. 7330–7340. DOI: 10.1021/bi952776w.
- Loll, P. J.; Picot, D.; Garavito, R. M. (1995): The structural basis of aspirin activity inferred from the crystal structure of inactivated prostaglandin H<sub>2</sub> synthase. In: *Nature structural biology* 2 (8), S. 637–643.
- Luong, C.; Miller, A.; Barnett, J.; Chow, J.; Ramesha, C.; Browner, M. F. (1996): Flexibility of the NSAID binding site in the structure of human cyclooxygenase-2. In: *Nature structural biology* 3 (11), S. 927–933.
- Mancini, J. A.; Riendeau, D.; Falgoutyret, J. P.; Vickers, P. J.; O'Neill, G. P. (1995): Arginine 120 of prostaglandin G/H synthase-1 is required for the inhibition by nonsteroidal anti-inflammatory drugs containing a carboxylic acid moiety. In: *The Journal of biological chemistry* 270 (49), S. 29372–29377.
- Martić, M.; Tatić, I.; Marković, S.; Kujundzić, N.; Kostrun, S. (2004): Synthesis, biological activity and molecular modeling studies of novel COX-1 inhibitors. In: *European journal of medicinal chemistry* 39 (2), S. 141–151. DOI: 10.1016/j.ejmech.2003.11.011.
- Melarange, R.; Rashbrook, L. C. (1987): Comparison of the effects of nabumetone with indomethacin on rat gastric mucosal 6-keto-PGF<sub>1α</sub> production and on bile salt-induced changes in gastric mucosal function. In: *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 39 (9), S. 717–720. DOI: 10.1111/j.2042-7158.1987.tb06975.x.

- Morita, I.; Schindler, M.; Regier, M. K.; Otto, J. C.; Hori, T.; DeWitt, D. L.; Smith, W. L. (1995): Different intracellular locations for prostaglandin endoperoxide H synthase-1 and -2. In: *The Journal of biological chemistry* 270 (18), S. 10902–10908. DOI: 10.1074/jbc.270.18.10902.
- Nieswandt, B.; Brakebusch, C.; Bergmeier, W.; Schulte, V.; Bouvard, D.; Mokhtari-Nejad, R. et al. (2001): Glycoprotein VI but not alpha2beta1 integrin is essential for platelet interaction with collagen. In: *The EMBO journal* 20 (9), S. 2120–2130. DOI: 10.1093/emboj/20.9.2120.
- Orlando, B. J.; Lucido, M. J.; Malkowski, M. G. (2015): The structure of ibuprofen bound to cyclooxygenase-2. In: *Journal of structural biology* 189 (1), S. 62–66. DOI: 10.1016/j.jsb.2014.11.005.
- Otto, J. C.; Smith, W. L. (1994): The orientation of prostaglandin endoperoxide synthases-1 and -2 in the endoplasmic reticulum. In: *The Journal of biological chemistry* 269 (31), S. 19868–19875.
- Ouellet, M.; Percival, M. D. (1995): Effect of inhibitor time-dependency on selectivity towards cyclooxygenase isoforms. In: *Biochemical Journal* 306 (Pt 1), S. 247–251.
- Pairat, M.; van Ryn, J. (1998): Experimental models used to investigate the differential inhibition of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 by non-steroidal anti-inflammatory drugs. In: *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society ... [et al.]* 47 Suppl 2, S93-101.
- Patrignani, P.; Panara, M. R.; Sciulli, M. G.; Santini, G.; Renda, G.; Patrono, C. (1997): Differential inhibition of human prostaglandin endoperoxide synthase-1 and -2 by non-steroidal anti-inflammatory drugs. In: *Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society* 48 (4), S. 623–631.
- Picot, D.; Garavito, R. M. (1994): Prostaglandin H synthase: implications for membrane structure. In: *FEBS letters* 346 (1), S. 21–25.
- Picot, D.; Loll, P. J.; Garavito, R. M. (1994): The X-ray crystal structure of the membrane protein prostaglandin H2 synthase-1. In: *Nature* 367 (6460), S. 243–249. DOI: 10.1038/367243a0.
- Pierre, S. C.; Schmidt, R.; Brenneis, C.; Michaelis, M.; Geisslinger, G.; Scholich, K. (2007): Inhibition of cyclooxygenases by Dipyrone. In: *British journal of pharmacology* 151 (4), S. 494–503. DOI: 10.1038/sj.bjp.0707239.

Pouplana, R.; Pérez, C.; Sánchez, J.; Lozano, J. J.; Puig-Parellada, P. (1999): The structural and electrical factors that contribute affinity for the time-dependent inhibition of PGHS-1 by indomethacin, diclofenac and fenamates. In: *Journal of computer-aided molecular design* 13 (3), S. 297–313.

Prusakiewicz, J. J.; Duggan, K. C.; Rouzer, C. A.; Marnett, L. J. (2009): Differential sensitivity and mechanism of inhibition of COX-2 oxygenation of arachidonic acid and 2-arachidonoylglycerol by ibuprofen and mefenamic acid. In: *Biochemistry* 48 (31), S. 7353–7355. DOI: 10.1021/bi900999z.

Rassow, J. (2012): Biochemie. Mit 67 Tabellen ; [mit Stoffwechselweg-Animationen]. 3., vollst. überarb. u. erw. Aufl. Stuttgart: Thieme (Duale Reihe). Online verfügbar unter <http://dx.doi.org/10.1055/b-002-6235>.

Rieke, C. J.; Mulichak, A. M.; Garavito, R. M.; Smith, W. L. (1999): The role of arginine 120 of human prostaglandin endoperoxide H synthase-2 in the interaction with fatty acid substrates and inhibitors. In: *Journal of Biological Chemistry* 274 (24), S. 17109–17114.

Rimon, G.; Sidhu, R. S.; Lauver, D. A.; Lee, J. Y.; Sharma, N. P.; Yuan, C. et al. (2010): Coxibs interfere with the action of aspirin by binding tightly to one monomer of cyclooxygenase-1. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (1), S. 28–33. DOI: 10.1073/pnas.0909765106.

Rome, L. H.; Lands, W. E. (1975 Dec): Structural requirements for time-dependent inhibition of prostaglandin biosynthesis by anti-inflammatory drugs. (72(12), S. 4863–4865.

Rowlinson, S. W.; Kiefer, J. R.; Prusakiewicz, J. J.; Pawlitz, J. L.; Kozak, K. R.; Kalgutkar, A. S. et al. (2003): A novel mechanism of cyclooxygenase-2 inhibition involving interactions with Ser-530 and Tyr-385. In: *The Journal of biological chemistry* 278 (46), S. 45763–45769. DOI: 10.1074/jbc.M305481200.

Saxena, A.; Balaramnavar, V. M.; Hohlfeld, T.; Saxena, A. K. (2013): Drug/drug interaction of common NSAIDs with antiplatelet effect of aspirin in human platelets. In: *European journal of pharmacology* 721 (1-3), S. 215–224. DOI: 10.1016/j.ejphar.2013.09.032.

Schuijt, M. P.; Huntjens-Fleuren, H. W. H. A.; Metz, M. de; Vollaard, E. J. (2009): The interaction of ibuprofen and diclofenac with aspirin in healthy volunteers. In: *British journal of pharmacology* 157 (6), S. 931–934. DOI: 10.1111/j.1476-5381.2009.00243.x.

Selinsky, B. S.; Gupta, K.; Sharkey, C. T.; Loll, P. J. (2001): Structural analysis of NSAID binding by prostaglandin H2 synthase: time-dependent and time-independent inhibitors elicit identical enzyme conformations. In: *Biochemistry* 40 (17), S. 5172–5180.

Simmons, D. L.; Botting, R. M.; Hla, T. (2004): Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. In: *Pharmacological reviews* 56 (3), S. 387–437. DOI: 10.1124/pr.56.3.3.

Smith, C. J.; Zhang, Y.; Koboldt, C. M.; Muhammad, J.; Zweifel, B. S.; Shaffer, A. et al. (1998): Pharmacological analysis of cyclooxygenase-1 in inflammation. In: *European journal of pharmacology* 95 (22), S. 13313–13318. DOI: 10.1073/pnas.95.22.13313.

Smith, W. L.; DeWitt, D. L.; Garavito, R. M. (2000): Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. In: *Annual review of biochemistry* 69, S. 145–182. DOI: 10.1146/annurev.biochem.69.1.145.

Smith, W. L.; Marnett, L. J. (1991): Prostaglandin endoperoxide synthase: structure and catalysis. In: *Biochimica et biophysica acta* 1083 (1), S. 1–17.

Smith, W. L.; Urade, Y.; Jakobsson, P.-J. (2011): Enzymes of the cyclooxygenase pathways of prostanoid biosynthesis. In: *Chemical reviews* 111 (10), S. 5821–5865. DOI: 10.1021/cr2002992.

So, O. Y.; Scarafia, L. E.; Mak, A. Y.; Callan, O. H.; Swinney, D. C. (1998): The dynamics of prostaglandin H synthases. Studies with prostaglandin h synthase 2 Y355F unmask mechanisms of time-dependent inhibition and allosteric activation. In: *The Journal of biological chemistry* 273 (10), S. 5801–5807.

Song, Y.; Connor, D. T.; Sorenson, R. J.; Doubleday, R.; Sercel, A. D.; Unangst, P. C. (1997): 2,6-di-tert-butylphenols: A new class of potent and selective PGHS-2 inhibitor. In: *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society ... [et al.]* 46 (0), S. 141–142. DOI: 10.1007/s000110050145.

Spencer, A. G.; Woods, J. W.; Arakawa, T.; Singer, I. I.; Smith, W. L. (1998): Subcellular localization of prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2 by immunoelectron

microscopy. In: *The Journal of biological chemistry* 273 (16), S. 9886–9893. DOI: 10.1074/jbc.273.16.9886.

Twarock, S.; Bagheri, S.; Hohlfeld, T. (2016): Platelet-vessel wall interactions and drug effects. In: *Pharmacology & therapeutics* 167, S. 74–84. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2016.07.008.

van der Ouderaa, F. J.; Buytenhek, M.; Nugteren, D. H.; van Dorp, D. A. (1977): Purification and characterisation of prostaglandin endoperoxide synthetase from sheep vesicular glands. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism* 487 (2), S. 315–331. DOI: 10.1016/0005-2760(77)90008-X.

van Ryn, J.; Kink-Eiband, M.; Kuritsch, I.; Feifel, U.; Hanft, G.; Wallenstein, G. et al. (2004): Meloxicam does not affect the antiplatelet effect of aspirin in healthy male and female volunteers. In: *Journal of clinical pharmacology* 44 (7), S. 777–784. DOI: 10.1177/0091270004266623.

Vane, J. R.; Bakhle, Y. S.; Botting, R. M. (1998): Cyclooxygenases 1 and 2. In: *Annual review of pharmacology and toxicology* 38, S. 97–120. DOI: 10.1146/annurev.pharmtox.38.1.97.

Versteeg, H. H.; Heemskerk, J. W. M.; Levi, M.; Reitsma, P. H. (2013): New Fundamentals in Hemostasis. In: *Physiological Reviews* 93 (1), S. 327–358. DOI: 10.1152/physrev.00016.2011.

Vlahov, V.; Badian, M.; Verho, M.; Bacracheva, N. (1990): Pharmacokinetics of metamizol metabolites in healthy subjects after a single oral dose of metamizol sodium. In: *European journal of clinical pharmacology* 38 (1), S. 61–65.

Wand, S.; Adam, E. H.; Wetz, A. J.; Meybohm, P.; Kunze-Szikszay, N.; Zacharowski, K. et al. (2018): The Prevalence and Clinical Relevance of ASA Nonresponse After Cardiac Surgery: A Prospective Bicentric Study. In: *Clinical and applied thrombosis/hemostasis : official journal of the International Academy of Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis* 24 (1), S. 179–185. DOI: 10.1177/1076029617693939.

Wand, S.; Baro, D.; Baecker, C.; Meybohm, P.; Schmitz-Rixen, T.; Zacharowski, K. et al. (2014): Response to dual antiplatelet therapy in patients with peripheral artery occlusive disease suffering from critical limb ischemia. In: *Clinical laboratory* 60 (10), S. 1601–1607.

Wenk, A. C. (2006): Thrombozytäre Funktion und Thromboxansynthese nach koronarer Bypassoperation. Verzögerte Zeitkinetik der Cyclooxygenasehemmung durch Acetylsalicylsäure. Düsseldorf, Univ., Diss., 2006 (Nicht für den Austausch).

Wilner, K. D.; Rushing, M.; Walden, C.; Adler, R.; Eskra, J.; Noveck, R.; Vargas, R. (2002): Celecoxib does not affect the antiplatelet activity of aspirin in healthy volunteers. In: *Journal of clinical pharmacology* 42 (9), S. 1027–1030.

Xiao, G.; Chen, W.; Kulmacz, R. J. J. (1998): Comparison of Structural Stabilities of Prostaglandin H Synthase-1 and -2. In: *Journal of Biological Chemistry* 273 (12), S. 6801–6811. DOI: 10.1074/jbc.273.12.6801.

Xiao, G.; Tsai, A. L.; Palmer, G.; Boyar, W. C.; Marshall, P. J.; Kulmacz, R. J. (1997): Analysis of hydroperoxide-induced tyrosyl radicals and lipoxygenase activity in aspirin-treated human prostaglandin H synthase-2. In: *Biochemistry* 36 (7), S. 1836–1845. DOI: 10.1021/bi962476u.

Xie, W. L.; Chipman, J. G.; Robertson, D. L.; Erikson, R. L.; Simmons, D. L. (1991): Expression of a mitogen-responsive gene encoding prostaglandin synthase is regulated by mRNA splicing. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88 (7), S. 2692–2696. DOI: 10.1073/pnas.88.7.2692.

Xu, S.; Hermanson, D. J.; Banerjee, S.; Ghebreselasie, K.; Clayton, G. M.; Garavito, R. M.; Marnett, L. J. (2014a): Oxicams bind in a novel mode to the cyclooxygenase active site via a two-water-mediated H-bonding Network. In: *The Journal of biological chemistry* 289 (10), S. 6799–6808. DOI: 10.1074/jbc.M113.517987.

Xu, S.; Rouzer, C. A.; Marnett, L. J. (2014b): Oxicams, a class of nonsteroidal anti-inflammatory drugs and beyond. In: *IUBMB life* 66 (12), S. 803–811. DOI: 10.1002/iub.1334.

Yi, X.; Lin, J.; Wang, C.; Huang, R.; Han, Z.; Li, J. (2017): Platelet function-guided modification in antiplatelet therapy after acute ischemic stroke is associated with clinical outcomes in patients with aspirin nonresponse. In: *Oncotarget* 8 (63), S. 106258–106269. DOI: 10.18632/oncotarget.22293.

Young, J. M.; Panah, S.; Satchawatcharaphong, C.; Cheung, P. S. (1996): Human whole blood assays for inhibition of prostaglandin G/H synthases-1 and -2 using A23187 and

lipopolysaccharide stimulation of thromboxane B2 production. In: *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society ... [et al.]* 45 (5), S. 246–253.

## 6 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei den vielen Menschen bedanken, die mich beim Erstellen dieser Arbeit begleitet und maßgeblich zum Gelingen beigetragen haben.

Mein erster Dank gebührt Prof. Dr. Thomas Hohlfeld für die Bereitstellung des Themas und die hervorragende Betreuung sowie die kritische Durchsicht der Manuskripte.

Mein besonderer Dank gilt Frau Kirsten Bartkowski für die großartige Motivation und Zusammenarbeit, die labortechnische Anleitung, die Unterstützung bei den Messungen und die Durchsicht meines Kapitels „Material und Methoden“. Nicht zuletzt danke ich den technischen Mitarbeitern des Instituts für die freundschaftliche Atmosphäre und die unzähligen großartigen und konstruktiven Gespräche. Ich habe die Zeit im Labor sehr genossen und werden sie vermissen.

Für die private Unterstützung danke ich vor allem meinen Eltern, die mir das Studium der Medizin und das Freisemester im Rahmen der Laborarbeit erst ermöglicht und mich immer seelisch unterstützt haben. Außerdem danke ich ihnen für die Durchsicht meiner Arbeit und die ein oder anderen grammatikalischen Korrekturen. In diesem Zusammenhang möchte ich auch einen großen Dank an meinen Freund aussprechen, der mir über die Zeit der schriftlichen Ausarbeitung meiner Arbeit immer helfend zur Seite stand.